

N° d'ordre : 4224

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA MATIERE, DU RAYONNEMENT ET DE
L'ENVIRONNEMENT

Doctorat

Chimie Organique et Macromoléculaire

Natascha CHAVAIN

CONCEPTION, SYNTHÈSE, ANALYSE STRUCTURALE ET
ACTIVITÉ ANTIPALUDIQUE DE DÉRIVÉS DE LA
FERROQUINE

Investigation des Mécanismes d'Action

Thèse dirigée par le Dr. Christophe BIOT

Soutenue le 29 septembre 2008 devant la commission d'examen

Rapporteurs :

Pr. J. SCHREVEL

Dr. S. TOP

Examineurs :

Dr. J.-B. BEHR

Dr. C. BIOT

Pr. J. BROCARD

Dr. E. DAVIOUD-CHARVET

Dr. D. DIVE

Chaire de Protistologie, MNHN, Paris

Directeur de Recherche CNRS, ENSCP, Paris

Maître de Conférences, ICMR, Reims

Maître de Conférences, UCCS, Villeneuve d'Ascq

Professeur émérite, UCCS, Villeneuve d'Ascq

Directeur de Recherche CNRS, BZH, Heidelberg

Directeur de Recherche INSERM, IPL, Lille

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au sein de l'Unité de Catalyse et de Chimie du Solide (UCCS, UMR 8181) dirigé par Monsieur le Professeur Edmond Payen, et plus précisément dans le groupe de Catalyse Enantiosélective et Biomolécules dirigé par Madame le Docteur Francine Agbossou, Directeur de Recherche au CNRS de l'équipe de Synthèse Organométallique et Catalyse dirigée par Monsieur le Professeur André Mortreux.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Docteur Christophe Biot, pour m'avoir fait l'honneur de travailler avec lui durant ces trois années de recherche. Ses compétences, sa grande motivation pour le sujet et ses conseils (scientifiques et professionnels) m'ont beaucoup aidée au cours de ma thèse.

Je remercie également le Professeur Jacques Brocard, Professeur émérite au Laboratoire, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur le projet « Ferroquine » et m'avoir accordé sa confiance durant ces trois années de thèse.

Mes remerciements vont également au Docteur Elisabeth Davioud-Charvet, Directeur de Recherche au CNRS, pour m'avoir fait découvrir le domaine passionnant de la biochimie, pour sa gentillesse et son hospitalité lors des différents séjours que j'ai effectués dans son groupe au Biochemie Zentrum Heidelberg et aussi pour m'avoir fait l'honneur de participer au Jury de soutenance.

Pour ses précieux conseils de tous ordres, sa disponibilité et sa grande sympathie, je remercie tout particulièrement le Docteur Xavier Trivelli, Ingénieur de Recherche au Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Villeneuve d'Ascq. Son expérience et ses grandes compétences en RMN ont permis l'accomplissement de ce travail.

Je remercie le Docteur Kati Tóth et le Professeur Jörg Langowski, du Deutsches Krebsforschungszentrum d'Heidelberg, pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe et m'avoir énormément appris sur la biophysique et l'ADN.

Merci au Docteur Daniel Dive, Directeur de Recherche INSERM à l'Institut Pasteur de Lille, pour les discussions scientifiques enrichissantes que j'ai eues l'honneur de partager avec lui, pour son aide et ses conseils dans la rédaction du manuscrit. Je tiens également à le remercier pour sa présence dans cette Commission d'examen.

Je tiens également à exprimer mes remerciements aux autres membres du Jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci au Dr. Siden Top, Directeur de Recherche CNRS du Laboratoire de Chimie et Biochimie des Complexes Moléculaires de Paris, et au Pr.

Joseph Schrevel, Chaire de Protistologie du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci également au Dr. Jean-Bernard Behr, Maître de Conférences à l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims, pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon Jury de thèse.

Pour leurs encouragements et leur assistance aussi bien matérielle que morale qui m'ont permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions, je remercie chaudement le Docteur Sophie Picart, le Professeur Lydie Péliniski et Claudine Buttica.

Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : aussi bien par les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux, leurs suggestions ou contributions dans le cadre de collaborations. Je pense ici en particulier à Nicole Wenzel, Eric Buisine, Hervé Vezin, Adeline Page, Nadia Touati, Wassim Daher, Isabelle Forfar, Bruno Pradines, Christel Herold-Mende, Laurent Fraisse, Thierry Fandeur, Jamal Khalife, Jean-François Paul, Guy Nowogrocki, Erik De Clercq, Reto Brun, Louis Maes, Matthias Rottmann.

Je souhaiterais également remercier le CNRS et la Région Nord Pas-de-Calais pour avoir financé ces trois années de thèse par une Bourse Docteur Ingénieur mais également l'organisme EGIDE pour avoir financé la collaboration franco-allemande par une Bourse Procope.

Merci aussi à tous mes collègues et amis du Laboratoire (et des laboratoires voisins) qui se reconnaîtront ici. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite une bonne continuation. Je remercie également chaleureusement toute l'équipe du Biochemie Zentrum Heidelberg pour m'avoir accueillie avec toujours beaucoup de gentillesse lors de mes séjours à Heidelberg, pour leur aide et les précieux conseils qu'ils m'ont apportés.

Finalement, j'adresse un grand merci à Ludo, à Alex, à mes parents, à ma famille et à mes amis qui ont toujours été présents lorsque j'en ai eu besoin.

TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE 1

Chapitre I : De la chimie bioorganométallique à la découverte d'un nouvel antipaludique

I. LA CHIMIE BIOORGANOMÉTALLIQUE 5

I.1.	INTRODUCTION.....	5
I.2.	LES PRINCIPAUX TYPES DE COMPLEXES ORGANOMETALLIQUES.....	6
I.3.	LES METALLOCENES.....	6
I.3.1.	<i>Les liaisons dans les complexes cyclopentadiényles.....</i>	7
I.3.2.	<i>Chiralité plane des métallocènes.....</i>	8
I.3.3.	<i>Le ferrocène.....</i>	9
I.3.4.	<i>Propriétés redox des métallocènes sandwiches.....</i>	10
I.4.	LES MOLECULES ORGANOMETALLIQUES ACTIVES BIOLOGIQUEMENT.....	11
I.4.1.	<i>Le premier médicament organométallique.....</i>	11
I.4.2.	<i>Des complexes métalliques aux métallocènes dans la conception de médicaments.....</i>	12
I.4.3.	<i>Les ferrocifènes.....</i>	13
I.4.4.	<i>La ferroquine.....</i>	16
I.4.5.	<i>Autres exemples de molécules ferrocéniques biologiquement actives.....</i>	17
I.5.	LE METABOLISME DES METALLOCENES.....	20
I.6.	LES TRACEURS PHARMACEUTIQUES.....	22
I.6.1.	<i>Les traceurs pharmaceutiques radioactifs.....</i>	22
I.6.2.	<i>Les traceurs pharmaceutiques non radioactifs.....</i>	23

II. LE PALUDISME 26

II.1.	SITUATION MONDIALE.....	26
II.2.	AGENT CAUSAL.....	27
II.3.	DESCRIPTION DU CYCLE DE <i>PLASMODIUM</i>	28
II.4.	LES DIFFERENTS TYPES DE PALUDISME.....	32
II.4.1.	<i>Le neuropaludisme.....</i>	32
II.4.2.	<i>Le paludisme de la femme enceinte.....</i>	32
II.5.	CYCLE ERYTHROCYTAIRE, DIGESTION DE L'HEMOGLOBINE ET FORMATION DU PIGMENT MALARIQUE.....	33
II.6.	LES PRINCIPAUX ANTIPALUDIQUES.....	39
II.6.1.	<i>La chloroquine et les amino-4-quinoléines.....</i>	42
II.6.2.	<i>La méfloquine et les arylaminoalcools.....</i>	48
II.6.3.	<i>L'artémisinine et ses dérivés.....</i>	49

III. LA FERROQUINE 51

III.1.	INTRODUCTION.....	51
III.2.	DE LA CHLOROQUINE A LA FERROQUINE.....	52
III.3.	ACTIVITE ANTIPALUDIQUE.....	55
III.4.	ENANTIOMERES.....	57
III.5.	METABOLISME.....	57

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 59**Publication 1 : Probing the Role of the Covalent Linkage of Ferrocene into a Chloroquine Template**

Chapitre II : Synthèse, caractérisation et mécanisme d'action de nouveaux dérivés de la ferroquine

I. LES DÉRIVÉS DE LA FERROQUINE : MODIFICATION SUR L'AMINE TERMINALE 77

I.1.	DÉRIVÉS AMINÉS DE LA FERROQUINE.....	77
I.1.1.	<i>Introduction.....</i>	77
I.1.2.	<i>Synthèse des dérivés amines secondaires de la ferroquine.....</i>	77

I.1.3.	Synthèse des dérivés amines tertiaires de la ferroquine	78
I.1.4.	Activité antipaludique des dérivés aminés de la ferroquine	79
I.2.	MODIFICATION EN POSITION 11 DE LA FERROQUINE	80
I.2.1.	Introduction	80
I.2.2.	Synthèse des dérivés 20-24	81
I.2.3.	Activité antipaludique des dérivés 20-24	82
I.3.	CARACTERISATION	83
I.3.1.	Caractérisation par rayons X du dérivé 6	83
I.3.2.	Caractérisation RMN du dérivé 6	85
I.3.3.	Caractérisation RMN du dérivé 23	90
I.4.	PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES	93
I.5.	INHIBITION DE LA FORMATION DE LA β -HEMATINE	96
I.6.	CONCLUSION	100
II.	LES HYDROXYFERROQUINES	102
II.1.	INTRODUCTION	102
II.2.	SYNTHESE DES HYDROXYFERROQUINES	104
II.3.	ACTIVITE ANTIPALUDIQUE	104
II.4.	ACTIVITE ANTIVIRALE	107
II.5.	CONCLUSION	108
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	109
Publication 2 : Design and Synthesis of Hydroxyferroquine Derivatives with Antimalarial and Antiviral Activities		
 Chapitre III : Molécules duales dérivées de la ferroquine		
I.	LES MOLÉCULES DUALES	113
I.1.	PRODROGUES ET MOLECULES DUALES D'INHIBITEURS DE GLUTATHION REDUCTASE CONJUGUES A UNE AMINO-4-QUINOLEINE	114
I.2.	LES TRIOXAQUINES	117
I.3.	MOLECULES DUALES PRIMAQUINE-STATINE	117
I.4.	MOLECULES DUALES TRIFLUOROMETHYLARTEMISININE-MEFLOQUINE	118
I.5.	MOLECULES RESTAURANT LA SENSIBILITE A LA CQ	119
II.	MOLÉCULES DUALES ASSOCIANT DES DÉRIVÉS DE LA FERROQUINE À DES INHIBITEURS DE GLUTATHION RÉDUCTASE OU DÉPLÉTEURS DE GLUTATHION	120
II.1.	SYNTHESE DES MOLECULES DUALES AVEC UN LIEN AMIDE	121
II.2.	SYNTHESE DES MOLECULES DUALES AVEC UN LIEN AMINE	122
II.3.	ACTIVITE ANTIPALUDIQUE DES MOLECULES DUALES	124
II.4.	CARACTERISATION DE LA MOLECULE DUALE 49	127
II.4.1.	Caractérisation par rayons X de la molécule duale 49	127
II.4.2.	Caractérisation RMN de la molécule duale 49	128
II.5.	INHIBITION DE LA FORMATION DE β -HEMATINE	133
II.6.	INHIBITION DE LA GLUTATHION REDUCTASE DE <i>P. FALCIPARUM</i>	134
II.7.	ETUDE METABOLIQUE QUALITATIVE DES MOLECULES DUALES	134
II.7.1.	Influence du pH	135
II.7.2.	Influence de la présence de β -hématine	136
II.7.3.	Influence de la présence de H_2O_2	136
II.8.	CONCLUSION	137
III.	MOLÉCULES DUALES BASÉES SUR DES BASES DE MANNICH	138
III.1.	INTRODUCTION	138
III.2.	SYNTHESE DES MOLECULES DUALES	141
III.3.	ACTIVITE ANTIPALUDIQUE ET CYTOTOXICITE	143

III.4.	INHIBITION DE LA FORMATION DE β -HEMATINE	146
IV.	INTERACTION DE NOUVELLES AMINO-4-QUINOLÉINES AVEC L'ADN	147
IV.1.	INTRODUCTION	147
IV.2.	EVALUATION DE L'AFFINITE DE NOUVELLES AMINO-4-QUINOLEINES POUR L'ADN	149
IV.2.1.	<i>Evaluation qualitative de l'interaction avec l'ADN</i>	<i>149</i>
IV.2.2.	<i>Evaluation quantitative de l'interaction avec l'ADN.....</i>	<i>151</i>
IV.2.3.	<i>Réversibilité de l'interaction</i>	<i>155</i>
IV.3.	IDENTIFICATION DE L'INTERCALATION COMME MODE D'INTERACTION PAR GEL D'ELECTROPHORESE	156
IV.3.1.	<i>Principe des gels d'électrophorèse</i>	<i>156</i>
IV.3.2.	<i>La méthode de comptage des bandes (« band-counting method »).....</i>	<i>157</i>
IV.3.3.	<i>Intercalation de nos amino-4-quinoléines avec l'ADN.....</i>	<i>158</i>
IV.4.	ETUDE DE DENATURATION DE L'ADN EN PRESENCE D'AMINO-4-QUINOLEINE.....	160
IV.4.1.	<i>Fusion ou dénaturation de l'ADN.....</i>	<i>160</i>
IV.4.2.	<i>Dénaturation de l'ADN en présence d'amino-4-quinoléines.....</i>	<i>161</i>
IV.5.	CONCLUSION SUR L'INTERACTION DES AMINO-4-QUINOLEINES AVEC L'ADN	163
IV.6.	ACTIVITE ANTICANCEREUSE	165
IV.7.	CONCLUSION.....	166
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		167

Chapitre IV : Etude du mécanisme d'action de la ferroquine

I.	MÉCANISME D'ACTION DE LA FERROQUINE PAR COMPARAISON AVEC LA CHLOROQUINE	173
II.	TENTATIVES D'INDUCTION DE RÉSISTANCE DE LA FERROQUINE	175
III.	ACTIVITÉ REDOX DE LA FERROQUINE	177
III.1.	OXYDATION DE LA FERROQUINE EN ION FERRIQUINIUM.....	178
III.1.1.	<i>Voltamétrie cyclique.....</i>	<i>178</i>
III.1.2.	<i>Oxydation chimique de la FQ.....</i>	<i>180</i>
III.1.3.	<i>Caractérisation du sel de ferriquinium par RPE et calculs théoriques</i>	<i>180</i>
III.2.	LA FERROQUINE : CATALYSEUR DE LA REACTION DE HABER-WEISS	181
III.2.1.	<i>Technique de piégeage de radicaux libres.....</i>	<i>182</i>
III.2.2.	<i>Mise en évidence de la formation de radicaux hydroxyles par la ferroquine (réaction de Fenton)</i>	<i>184</i>
III.3.	STABILITE DE LA FERROQUINE EN PRESENCE DE H ₂ O ₂	185
III.4.	ACTIVITE REDOX DE LA FQ DANS LES CONDITIONS OXYDANTES DE LA VACUOLE DIGESTIVE DE <i>P. FALCIPARUM</i>	187
IV.	RÉÉVALUATION DE L'ACCUMULATION DE LA FERROQUINE DANS LA VACUOLE DIGESTIVE DU PARASITE	189
V.	CONCLUSION.....	192
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		194
Publication 3 : Investigation of the Redox Behavior of Ferroquine, a New Antimalarial		
CONCLUSION GENERALE		197

Partie expérimentale

CHIMIE.....	201
I. DÉRIVÉS AMINES SECONDAIRES ET TERTIAIRES DE LA FERROQUINE.....	203
II. MODIFICATION EN POSITION 11 DE LA FERROQUINE.....	210
III. LES HYDROXYFERROQUINES	216
IV. MOLÉCULES DUALES FERROQUINE-INHIBITEURS DE GR OU DÉPLÉTEURS DE GSH AVEC UN LIEN AMIDE	218
V. MOLÉCULES DUALES FERROQUINE-DÉPLÉTEURS DE GSH AVEC UN LIEN AMINDE	234
VI. MOLÉCULE DUALE FERROCÉNIQUE BASÉE SUR LES BASES DE MANNICH	238
VII. OXYDATION CHIMIQUE DE LA FERROQUINE.....	242
VIII. CARACTÉRISATION RMN DES DÉRIVÉS 6, 23 ET 49 DE LA FERROQUINE.....	242
BIOCHIMIE	243
I. INHIBITION DE LA FORMATION DE LA β-HÉMATINE	243
II. INHIBITION DE LA GLUTATHION RÉDUCTASE DE <i>P. FALCIPARUM</i>	244
III. ETUDE MÉTABOLIQUE DES MOLÉCULES DUALES.....	244
IV. SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI-TOF.....	245
BIOPHYSIQUE.....	246
I. INTERACTION DES LIGANDS AVEC L'ADN	246
II. MESURES OPTIQUES DES POINTS DE FUSION DE L'ADN	247
III. EXPÉRIENCE DE PIÉGEAGE DE RADICAUX LIBRES.....	247

Annexes

ANNEXE 1 : DÉTERMINATION DES CI_{50} ET CI_{90}	249
ANNEXE 2 : LA SPECTROSCOPIE RMN	250
ANNEXE 3 : CI_{50} ET CI_{90} (NM) DES DÉRIVÉS DE LA FQ 20-24, DES ANALOGUES COURTS DE LA FQ 5 ET DE LA CQ 74 ET DES MOLÉCULES DUALES 71-73	253

ABREVIATIONS

ABC : ATP Binding Cassette
 ADN : Acide DésoxyriboNucléique
 AgBF₄ : tétrafluoroborane d'argent
 APCI : ionisation chimique à pression atmosphérique
 AQ : amodiaquine
 ARS : artésunate
 ART : artémisinine
 ART-CF₃ : trifluorométhylartémisinine
 AT : paires de bases Adénine-Thymine
 ATP : Adénosine TriPhosphate
 BCNU : chimiothérapie à base de nitrosourées
 CE₅₀ : concentration efficace à 50%
 CI₅₀ et CI₉₀ : concentration inhibitrice à 50% et à 90%, respectivement
 Cp₂M : métallocène
 CQ : chloroquine
 CQ.2H₃PO₄ : chloroquine diphosphate
 COSY : COrrrelation SpectroscopY
 CW-RPE : Continuous Wave – Résonance Paramagnétique Electronique
 CyP-450 : Cytochrome P-450
 dEFQ : mono-*N*-déEthylFerroQuine
 DE₅₀ : dose efficace à 50%
 DFT : théorie de la fonctionnelle de la densité (Density Functional Theory)
 DMAF : DiMéthylAminoFerrocène
 DMF : DiMéthylFormamide
 dMFQ : mono-*N*-déMéthylFerroQuine
 DMPO : 5,5-DiMéthyl-1-Pyrroline-*N*-Oxyde
 DMSO : DiMéthylSulfOxide
 EDCI : *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide
 EDTA : acide EthylèneDiamineTétraAcétique
 ELISA : dosage d'immunosorptionliée à enzyme (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
 ER : récepteur œstrogène (Estrogen Receptor)
 ESI : ionisation electrospray
 E_{1/2} : potentiel de demi-vague
 F : point de fusion

FETAX : Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus
 Fe(III)PPIX : ferriprotoporphyrine IX
 FT-IR : infrarouge à transformée de Fourier (Fourier Transformed InfraRed)
 FQ : ferroquine
 GC : paires de bases Guanine-Cytosine
 gp120 : glycoprotéine 120
 GR : glutathion réductase
 GSH : glutathion
 GSSG : glutathion oxydé
 GST : glutathion *S*-transférase
 HCQ : hydroxychloroquine
 HEPES : acide-4-(2-HydroxyEthyl)-1-PipérazineEthaneSulfonique
 hERG : Human Ether-a-go-go Related Gene
 HFQ : hydroxyferroquine
 HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation
 HO[•] : radical hydroxyle
 HPLC : chromatographie en phase liquid à haute performance (High Performance Liquid Chromatography)
 HRP : protéine riche en histidine (Histidine Rich Protein)
 HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation
 Kass : constante d'association
 Kd : constante de dissociation
 log *D* : coefficient de distribution
 log *P* : coefficient de partage
 MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight
 MF : méfloquine
 NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
 NAMI-A : *trans*-imidazole(diméthylsulfoxyde)tétrachlororuthénate d'imidazolium
 NMP : *N*-MéthylPyrolidone
 NOE : Nuclear Overhauser Effect
 NOESY : Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
 PBN : α-Phényl-*n*-terButylNitron
 PfATP6 : *Plasmodium falciparum* Ca²⁺-ATPase
 PfCRT : *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistant Transporter
 pfmdr : *Plasmodium falciparum* multidrug resistance

Pgh1 : P-glycoprotéine homologue 1

PLM II : Plamsepsine II

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : espèces oxygénées réactives (Reactive Oxygen Species)

RSA : Relations Structure-Activité

RT-PCR : Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction

RX : Rayons X

SARS-CoV : Syndrome Aigu Respiratoire Sévère – CoronaVirus

SERCA : Sarco/Endoplasmic Reticulum membrane Calcium ATPase

SERMs : modulateurs sélectifs des récepteurs à oestrogène (Selective Estrogen Receptor Modulators)

TBAP : Tetra-*n*-ButylAmmonium Per-ruthénate

tctp : translationally controlled tumor protein

TE : tampon de pH 7,5 contenant 10 mM de tris(-hydroxymethyl)aminométhane et 5 mM de NaCl

TEMPO : 2,2,6,6-tétra-méthylpipéridinyl-1-oxyle

THAP : TriHydroxyAcétoPhénone

THF : TétraHydroFurane

T_m : température de fusion de l'ADN

TMS : TétraMéthylSilane

TrxR : Thiorédoxine Réductase

UDEFT : Uniform Driven Equilibrium Fourier Transform

UV : UltraViolet

VAR : rapport d'accumulation vacuolaire (Vacular Accumulation Ratio)

VIH : Virus d'Immunodéficience Humaine

VP : Vérapamil

ΔE_p : différence de potentiel

INTRODUCTION GENERALE

Le paludisme est un problème majeur de santé publique international. Dans le monde, chaque année, entre 300 et 500 millions de personnes souffrent d'un accès palustre et environ 1 à 3 millions de personnes en meurent. Il touche principalement les enfants de moins de 5 ans et les zones endémiques se situent surtout dans les zones en voie de développement. *Plasmodium falciparum* est l'espèce parasitaire responsable de la mortalité liée au paludisme et sa résistance aux antipaludiques ne fait que croître dans de nombreuses régions du monde. Les chimistes et les biologistes se sont associés pour combattre cette maladie et ils combinent tous leurs efforts pour trouver des molécules à la fois efficaces et économiquement accessibles aux pays en voie de développement.

La ferroquine illustre comment la chimie bioorganométallique peut constituer une alternative intéressante pour faire face aux problèmes de résistance. La ferroquine, dénomination commune internationale, est née de l'incorporation d'un groupement ferrocénique au sein de la molécule de chloroquine. Elle est actuellement l'antipaludique le plus avancé dans son développement industriel en France et l'un des rares antipaludiques 100% de conception française (découverte, validation pharmacologique, développement) en passe d'entrer sur le marché international. Les essais cliniques de phase IIb de la ferroquine associée à l'artésunate, comme recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé, ont été débutés par la société Sanofi-Aventis.

Dans l'espoir d'arriver à une meilleure compréhension du mécanisme d'action de la ferroquine, de modifier sa biodisponibilité ou d'améliorer la spécificité, des analogues structuraux ont été synthétisés. Une modulation des substituants de la chaîne latérale aminée ainsi que de l'amine en position 4 du cycle quinoléine a été introduite. Leur activité antipaludique a été testée *in vitro* sur des clones chloroquino-sensibles et chloroquino-résistants de *P. falciparum* et des études physicochimiques et biophysiques ont été menées. Une caractérisation structurale complète de ces dérivés ainsi que la mesure de leur aptitude à inhiber la formation de β -hématine ont permis d'avoir une idée plus précise de leur mécanisme d'action. Ces différentes études ont permis de compléter les relations de structure-activité entamées depuis plusieurs années et apportent de nouvelles notions concernant l'action antiparasitaire de la ferroquine.

Selon Warhurst et *coll.*,¹ l'introduction d'un groupement amino-alcool sur la chaîne aminée latérale de la chloroquine semblait être une autre alternative pour surmonter les problèmes de chloroquino-résistance de *P. falciparum*. Les hydroxychloroquines sont moins toxiques que la chloroquine, mais malheureusement inactives sur les clones chloroquino-résistants de *P. falciparum*. Encouragés par les effets de la ferroquine sur les clones résistants, nous avons conçu et synthétisé des hydroxyferroquines dans l'espoir d'associer la forte activité antipaludique de la molécule parente à une toxicité plus faible, comme déjà observé pour les hydroxychloroquines. De plus, les molécules antipaludiques comme la chloroquine sont connues pour avoir une action synergétique avec les inhibiteurs de protéases du virus de déficience immuno-humaine et possèdent une activité antivirale sur le syndrome respiratoire aigu sévère. Les hydroxyferroquines ont donc été testées sur une série de virus.

Enfin, une nouvelle stratégie basée sur des molécules hybrides a été récemment développée pour pallier aux problèmes de résistance. Elle consiste à associer deux molécules ayant des mécanismes d'action différents par une liaison covalente ce qui devrait modifier leur biodisponibilité. Une fois le site d'action atteint, la molécule est supposée être clivée par le parasite et deux fragments actifs seraient ainsi libérés. Les chances de développement de résistance devraient être largement amoindries en raison de l'action simultanée de ces molécules sur deux cibles thérapeutiques différentes. En nous basant sur cette nouvelle approche thérapeutique, nous avons combiné par une liaison amide ou amine covalente deux fragments actifs, un dérivé de la ferroquine à une ménadione, à un dérivé du bromobenzène ou à une base de Mannich, dont les modes d'action sont indépendants. La partie ferroquine est supposée inhiber la formation de l'hémozoïne alors que les ménadiones, les dérivés du bromobenzène ou les bases de Mannich sont connus pour diminuer le taux de glutathion chez le parasite. Une série de nouvelles molécules duales a été synthétisée. Les composés ont été testés pour leur capacité à inhiber la croissance du parasite. Une investigation poussée sur le mécanisme d'action et le métabolisme de ces molécules a été entreprise en alliant la biophysique à la biochimie.

En fonction des résultats obtenus sur les hydroxyferroquines et les analogues de la ferroquine antérieurement synthétisés ou présentés dans ce travail, une investigation plus complexe sur le mécanisme d'action de la ferroquine a été entreprise. Jusqu'à présent le mécanisme d'action de la ferroquine avait toujours été comparé à celui de la chloroquine. La

¹ Warhurst et al. *J. Antimicrob. Chemother* **2003**, 52,188-193.

différence majeure entre les molécules de chloroquine et de ferroquine repose sur la présence du groupement ferrocénique dans la structure de la ferroquine. Ce groupement semble être un paramètre discriminant pour son activité antipaludique, en particulier contre les clones résistants à la chloroquine. Comme cette dernière, la ferroquine interagit avec l'hématine et inhibe la formation de β -hématine mais une question essentielle se pose : quelle est l'importance du groupement ferrocénique dans cette nouvelle molécule aux propriétés antipaludiques exceptionnelles ? Le groupement ferrocénique augmente considérablement la lipophilie de la ferroquine par comparaison avec la chloroquine. Cette propriété semble essentielle aux vues des nouvelles découvertes concernant le mécanisme de croissance du cristal d'hémozoïne qui s'effectuerait à l'interface entre la membrane et le milieu aqueux de la vacuole digestive du parasite. Les deux molécules présentent également des basicités différentes. Une étude poussée sur le comportement des deux molécules a été réinvestie. D'autre part, le ferrocène dans son état d'oxydation Fe(II) est capable de catalyser des réactions de type Haber-Weiss (appelées réactions de Fenton). Une étude des propriétés redox de la ferroquine a donc été établie afin d'observer si la ferroquine pouvait également catalyser ce type de réaction et ainsi générer des radicaux hydroxyles. Cette production de radicaux hydroxyles provoquerait un stress oxydant chez le parasite et expliquerait une différence fondamentale entre la ferroquine et la chloroquine qui n'est pas capable de produire chimiquement des espèces oxygénées réactives.

Plan du manuscrit

Le premier chapitre est destiné à situer ce travail de thèse dans le cadre général de la chimie bioorganométallique et à le positionner par rapport aux problèmes de résistance liés aux antipaludiques actuels. Dans les chapitres suivants seront abordés les travaux propres à cette thèse. Le deuxième chapitre traite des différentes pharmacomodulations qui ont été effectuées sur la ferroquine ainsi que des hydroxyferroquines. Les molécules duales basées sur des dérivés de la ferroquine sont ensuite présentées au troisième chapitre. Finalement, le dernier chapitre propose de nouvelles avancées vers une meilleure compréhension du mécanisme d'action de la ferroquine.

Chapitre I

De la chimie bioorganométallique à la découverte d'un nouvel antipaludique

I. La chimie bioorganométallique

I.1. Introduction

La chimie bioorganométallique consiste en la synthèse et l'étude d'espèces organométalliques d'intérêt biologique et médical. Un complexe organométallique est un complexe contenant une liaison métal-carbone. Jusqu'à dans les années 1950, toutes les molécules organométalliques ne comprenaient uniquement qu'une liaison σ entre le carbone et le métal. Après la découverte du ferrocène en 1951 par Pauson et Kealy confirmée en 1952 par Wilkinson (Prix Nobel en 1973),¹⁻² de nouvelles liaisons carbone-métal ont été découvertes : les liaisons π et δ . Cette diversité structurale a permis le développement de la chimie organométallique des métaux de transition puis de la chimie bioorganométallique.

La chimie organométallique des métaux de transition a débuté dans la seconde moitié du 20^{ème} siècle avec la catalyse et en particulier, avec la polymérisation de Ziegler-Natta, la synthèse asymétrique et la métathèse des oléfines. Les applications des composés organométalliques sont diverses : réactifs pour la synthèse organique, catalyseurs, matériaux avec de nouvelles propriétés électroniques, médicaments et stabilisation d'intermédiaires à courte durée de vie.

Ce n'est que peu de temps après, en 1985, qu'est née la chimie bioorganométallique.^{3,4} Son développement a été rapide et on distingue aujourd'hui 5 grands domaines de chimie bioorganométallique :

- les composés organométalliques en thérapie,
- la toxicologie et l'environnement,
- la reconnaissance moléculaire en milieu aqueux,
- les enzymes, protéines et peptides,
- la bioanalyse et les traceurs pharmaceutiques.

Quelques composés organométalliques sont également présents dans les organismes vivants.

¹ Pauson, P. L.; Kealy, T. J. *Nature*. **1951**, 168, 1039-1040.

² Wilkinson et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 2125-2126.

³ Top et al. *Organometallics*. **1985**, 4, 2143-2150.

⁴ Jaouen, G.; Vessieres, A. *Pure & Appl. Chem.* **1985**, 57, 1865-1874.

I.2. Les principaux types de complexes organométalliques

La figure 1 présente les principaux complexes organométalliques. Cette liste est loin d'être exhaustive. Le nombre d'électrons donnés par un ligand peut être déterminé grâce à une approche d'électrons de valence. Pour cela, le complexe organométallique doit respecter la règle de Sidgwick qui dit que « 18 électrons doivent être fournis par le métal et ses ligands associés pour atteindre la configuration électronique d'un gaz noble ». En réalité, cette règle est la règle de l'octet appliquée aux complexes organométalliques. En effet, les éléments du bloc *d* contiennent une sous-couche *d* qui a besoin de 10 électrons supplémentaires pour être remplie ((*n*-1)*d*¹⁰*ns*²*np*⁶).

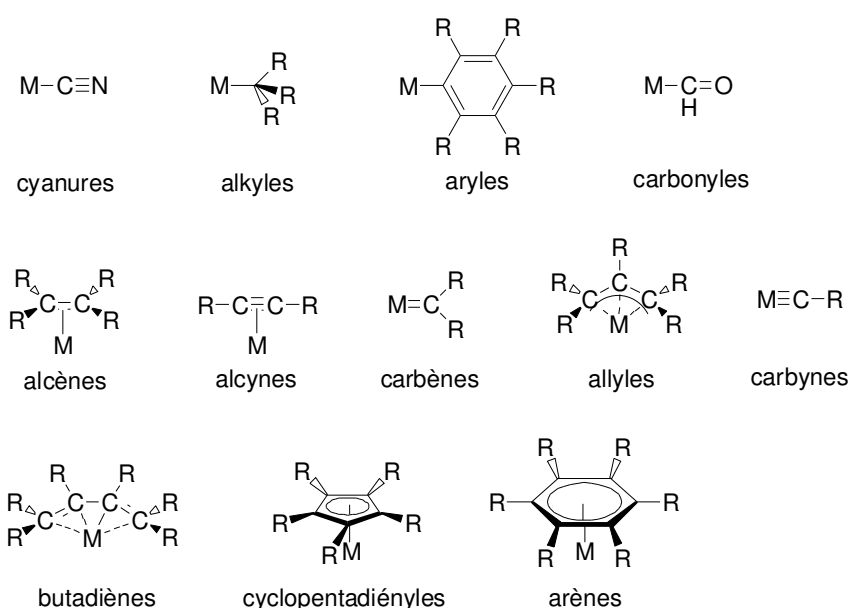


Figure 1 : Les principaux complexes organométalliques.

I.3. Les métallocènes

Les métallocènes sont des complexes cyclopentadiényles de formule générale Cp_2M : deux anions cyclopentadiényles s'associent à un métal de transition (bloc *d*) central dans son état d'oxydation II. Les deux anions cyclopentadiényles sont parallèles avec des longueurs et des forces de liaison égales. On dit de ces complexes qu'ils possèdent une structure sandwich. Le plus connu est le ferrocène¹ dont le nom de « métallocène » en est dérivé.

Seuls les métallocènes des groupes 1 et 2 présentent une structure sandwich. Les métallocènes du groupe 3 et la majorité des composés métallocéniques des groupes 4 et 5 ont une structure sandwich pliée. Les deux cycles cyclopentadiényles ne sont plus coplanaires

mais forment un angle de 130° . Ils sont accompagnés d'au plus trois ligands, en particulier pour le groupe 5 (figure 2).



Figure 2 : Les différentes structures métallocéniques.

Il existe également des composés demi-sandwiches : leur structure comporte un cycle cyclopentadiényle et un à quatre autres ligands. Ces complexes sont très stables, notamment lorsque ces ligands sont de bons acides π , tels que CO et NO. Des exemples de complexes demi-sandwiches sont donnés en figure 3.

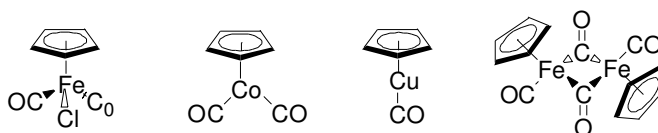


Figure 3 : Exemples de complexes demi-sandwiches.

I.3.1. Les liaisons dans les complexes cyclopentadiényles

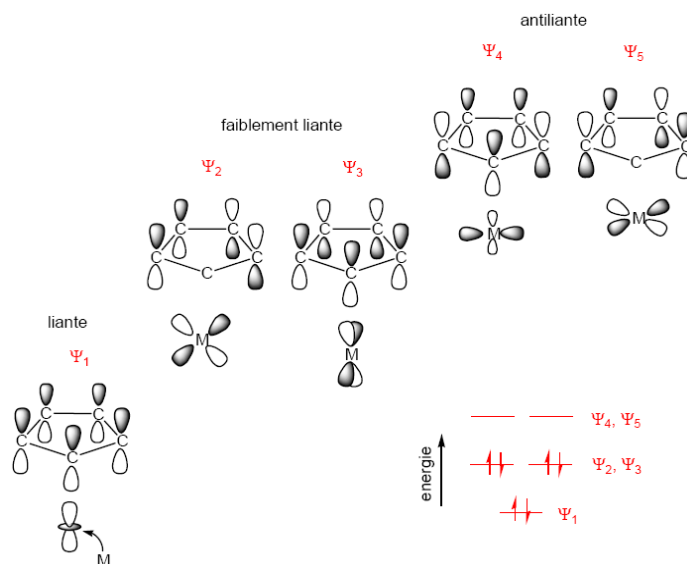
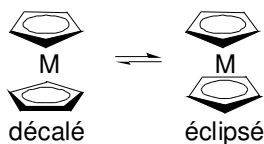


Figure 4 : Orbitales moléculaires des métallocènes.⁵

⁵ Astruc, D. Chimie organométallique. *Collection Grenoble Sciences*, **2000**, p 251.

**Schéma 5 :** Libre rotation des cycles cyclopentadiényles des métallocènes.

Tous les atomes de carbone des métallocènes sont équidistants du métal. La barrière de rotation autour de l'axe métal-cycles est extrêmement faible (2 à 5 kcal) ce qui rend la rotation toujours libre et rapide en solution (schéma 5). On observe donc un seul pic en spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C . Les orbitales π du cyclopentadiényle forment avec les orbitales du métal des liaisons covalentes (figure 4). C_5H_5^- étant très stable, une contribution ionique est également observée.

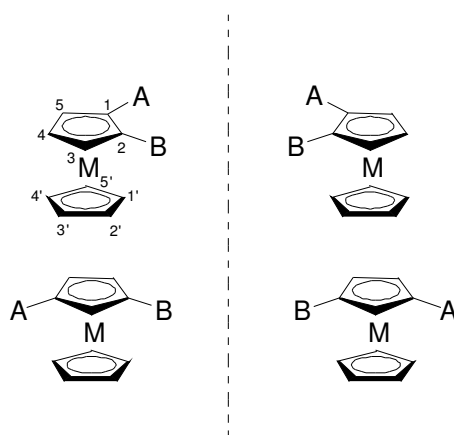
Il existe des complexes cyclopentadiényles qui n'obéissent pas à la règle des 18 électrons ($d^n \neq d^6$) comme par exemple les complexes organométalliques paramagnétiques (tableau 6). Ces complexes sont très réactifs et difficiles à isoler et ont tendance à former des liaisons covalentes supplémentaires.



M	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni
n	3	4	5	6	7	8

Tableau 6 : Exemples de complexes paramagnétiques (hors ferrocène).

I.3.2. Chiralité plane des métallocènes

**Figure 7 :** Chiralité métallocénique plane des dérivés hétérodisubstitués en 1,2 ou 1,3.

Les métallocènes peuvent présenter une chiralité, appelée chiralité plane, lorsque deux substituants différents se trouvent sur le même cycle cyclopentadiényle. Cette chiralité est

possible uniquement si le métallocène est hétérodisubstitué en 1,2 ou en 1,3. En effet, les dérivés hétérosubstitués en 1,1' ne présentent pas de chiralité du fait de la libre rotation des cycles cyclopentadiényles.

I.3.3. Le ferrocène

Le ferrocène est un solide diamagnétique (bas spin) orangé. Son moment dipolaire est nul. Il est stable jusqu'à 400°C. Le ferrocène peut adopter 2 conformations. La première est la symétrie D_{5h} : les deux cycles sont éclipsés (figure 8). Cette conformation a été établie par diffraction des rayons X^{6,7} et diffraction des neutrons.⁸ La deuxième est la symétrie D_{5d} : les cycles sont alors décalés (figure 8). Le ferrocène se trouve généralement dans cette conformation lorsqu'il est substitué. Les deux conformations sont isoénergétiques.

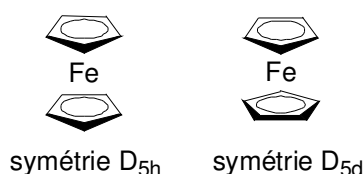


Figure 8 : Les deux conformations du ferrocène.

Le ferrocène est un aromatique car les anions cyclopentadiényles $C_5H_5^-$ sont plans et possèdent 6 électrons π . Le ferrocène possède une réactivité plus grande qu'un composé aromatique ordinaire. C'est pourquoi, on le qualifie d'aromatique activé. A titre d'exemple, son acylation selon la réaction de Friedel et Crafts ne requiert pas de catalyseur élaboré (schéma 9). L'acide phosphorique concentré suffit. On obtient également une petite quantité de produit diacétylé sur l'autre cycle.

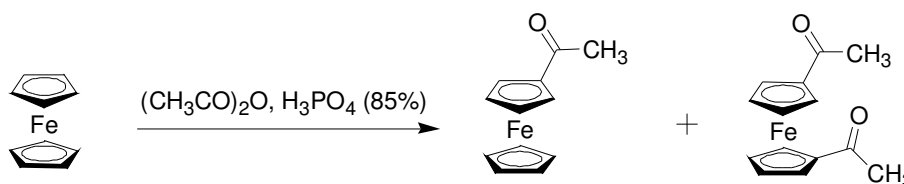


Schéma 9 : Acétylation du ferrocène.

La métallation du ferrocène est également une réaction courante en chimie organométallique. Le butyllithium (BuLi) réagit avec un cyclopentadiényle du ferrocène pour

⁶ Leiland, P. F.; Pepinsky, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 4971.

⁷ Dunitz, J. D.; Orgel, L. E. *Nature*, **1953**, 171, 121-122.

⁸ Dunitz, J. D.; Orgel, L. E.; Rich, A. *Acta. Cryst.* **1956**, 9, 373-375.

former un nouveau complexe (schéma 10). Cette réaction est couramment utilisée en synthèse organométallique.

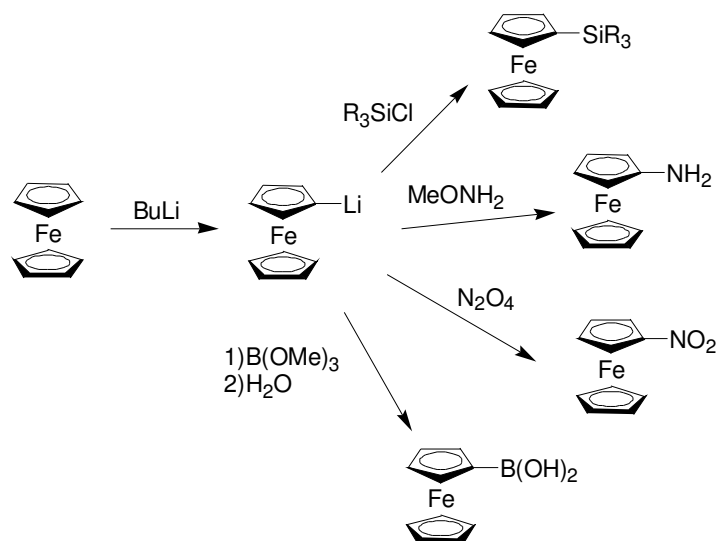
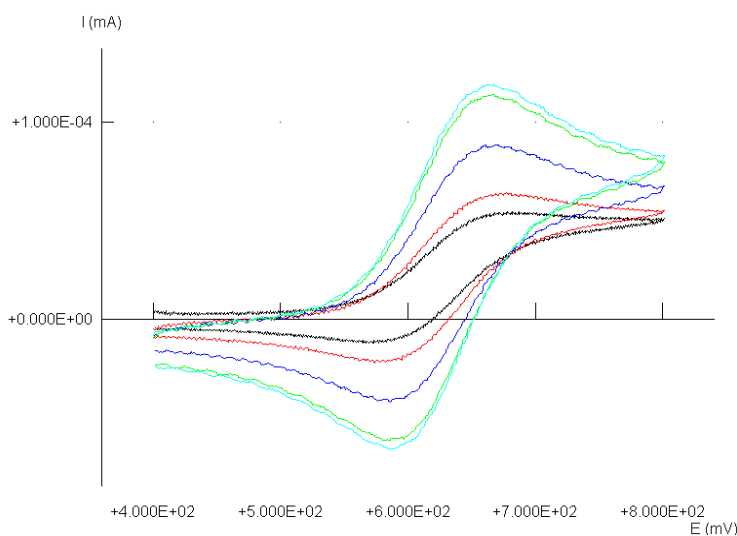


Schéma 10 : La métallation du ferrocène.

I.3.4. Propriétés redox des métallocènes sandwichs



Graph 11 : Voltamétrie cyclique du ferrocène (Fc) à différentes vitesses de balayage, solvant = 0,1M tétrabutylammonium perchlorate/DMF, pression atmosphérique, $T = 25^\circ C$, $[Fc] = 10^{-3} M$.⁹

Comme nous l'avons vu précédemment, les métallocènes peuvent adopter une structure sandwich tout en ayant un nombre d'électrons différent de 6 dans les orbitales d . Le nombre d'électrons de valence peut varier entre 15 et 20. Plus on s'éloigne de la structure à 18

⁹ Chanfreau, S. **2005**, thèse de doctorat génie des procédés et de l'environnement.

électrons, moins le métallocène est stable. Les métallocènes possèdent donc des propriétés redox : ils peuvent exister sous différents degrés d'oxydation. La voltamétrie cyclique est une méthode qui permet de caractériser ces différents états redox. Le graphe 11 montre le voltamogramme du ferrocène, chaque vague correspond à un changement de degré d'oxydation.

Pour le ferrocène, l'oxydation ou la réduction à un électron est réversible et a lieu sans variation structurale. Les sels de ferricinium (figure 12), formés par oxydation du ferrocène, sont stables mais sont malgré tout relativement sensibles à l'air et en solution. D'ailleurs, ces sels sont très utilisés en tant qu'oxydants doux en chimie redox organométallique ainsi qu'en électrochimie. Les sels de ferricinium sont connus comme ayant une bonne activité antitumorale *in vivo*,^{10,11} indiquant que ce sont uniquement les composés avec le fer à l'état d'oxydation Fe^{3+} qui sont capables de déclencher les effets toxiques. Les propriétés redox du ferrocène peuvent également être utilisées pour marquer les peptides et les enzymes qui deviennent alors électroactives.¹²

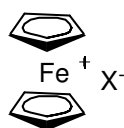


Figure 12 : Structure générale des sels de ferricinium.

I.4. Les molécules organométalliques actives biologiquement

I.4.1. Le premier médicament organométallique

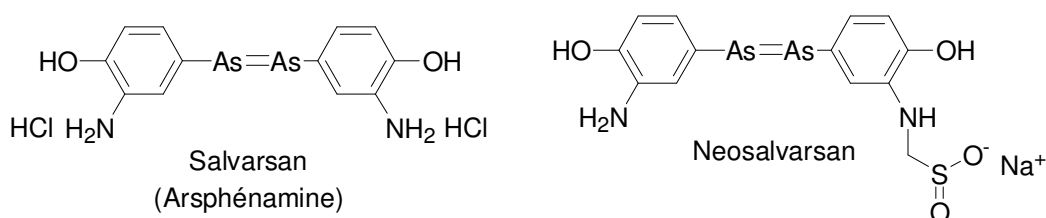


Figure 13 : Structure chimique du Salvarsan et du Neosalvarsan.

Alors que l'arsenic fût longtemps considéré comme un poison, au 19^{ème} siècle, Paul Ehrlich (prix Nobel de médecine en 1908) a réalisé que les composés organométalliques à base d'arsenic pouvaient être moins toxiques et plus faciles à manipuler que leurs homologues

¹⁰ Köpf-Maier, P.; Klapötke, T. *Arzneimittelforschung*. **1989**, 39, 369-371.

¹¹ Joy, A. M.; Goodgame, D. M.; Stratford, I. J. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1989**, 16, 1053-1056.

¹² Di Gleria, K.; Hill, H. A.; Wong, L. L. *FEBS Lett.* **1996**, 390, 142-144.

inorganiques. Après un criblage de plus de 100 dérivés organo-arséniques, il découvrit le salvarsan qui est particulièrement actif contre la syphilis, une maladie répandue qui ne pouvait être guérie à l'époque (figure 13).¹³ Le salvarsan n'est pas très soluble dans l'eau et sous sa forme de chlorhydrate, il est très toxique. Il est alors administré en solution basique *per os*. Plus tard fût découvert le neosalvarsan qui est quant à lui soluble dans l'eau (figure 13). Aujourd'hui encore, le mécanisme d'action de ce composé organo-arsénique n'est pas connu et ce n'est que depuis peu que des études de spectrométrie de masse ont permis de postuler une structure convenable. Le salvarsan serait un mélange d'oligomères dont les produits principaux seraient des cycles à 3 ou à 5 d'arsénobenzol (figure 14).¹⁴

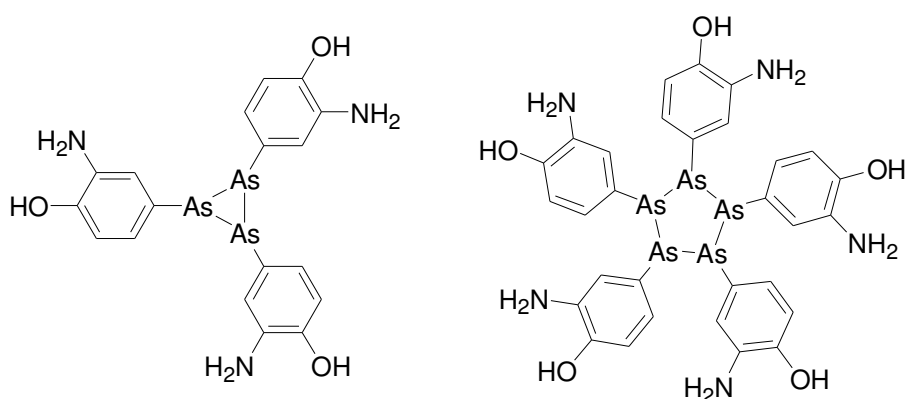


Figure 14 : Structures cycliques du Salvarsan.

I.4.2. Des complexes métalliques aux métallocènes dans la conception de médicaments

Dans la seconde moitié du 20^{ème} siècle, Rosenberg a découvert les effets antitumoraux du cisplatine, un complexe inorganique (figure 15). Il est en particulier actif contre le cancer des testicules. Le cisplatine fût synthétisé en 1844 par Peyronne mais c'est seulement 120 ans plus tard que Rosenberg a révélé ses propriétés.^{15,16} Le développement d'une résistance cellulaire au platine, les effets secondaires toxiques du cisplatine et son activité limitée à certains cancers, amènent les chercheurs à trouver d'autres molécules anticancéreuses. Un sel de ruthénium, le *trans*-imidazole(diméthylsulfoxyde) tétrachlororuthénate d'imidazolium (NAMI-A), (figure 15) a été retenu pour son activité antimétastatique et sa faible toxicité *in*

¹³ Gensini, G.F.; Conti, A.A.; Lippi, D. *J. Infect.* **2007**, *54*, 221-224.

¹⁴ Lloyd et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 941-944.

¹⁵ Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. *Nature.* **1965**, *205*, 698-699.

¹⁶ Rosenberg et al. *Nature.* **1969**, *222*, 385-386.

vivo.^{17,18} Les essais cliniques en phase I ont montré une bonne tolérance de la molécule chez l'Homme.¹⁹

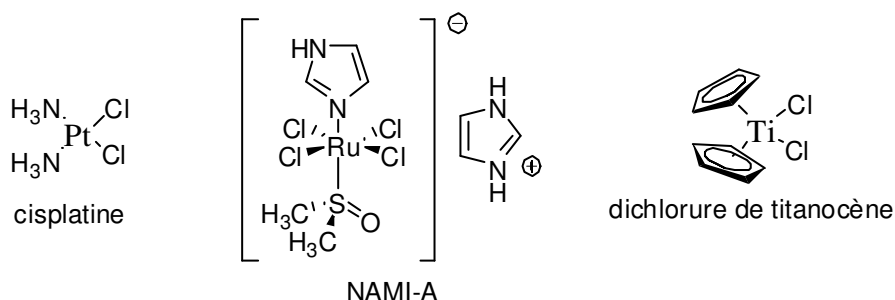


Figure 15 : Structure chimique du cisplatine, du NAMI-A et du chlorure de titanocène.

L'utilisation de la chimie organométallique semble être également une bonne alternative. En effet, la recherche de molécules actives biologiquement métallo-céniques ne cesse d'être développée. Pour exemple, nous pouvons citer le dichlorure de titanocène (figure 15) qui a une structure proche du cisplatine. Ce métallocène aux propriétés antiprolifératives était en phase I d'essais cliniques²⁰ mais les tests cliniques ont été récemment arrêtés du fait de son activité insuffisante (arrêt en phase II).

Une récente approche dans la recherche de nouveaux médicaments consiste à modifier des bioligands connus via la chimie organométallique dans le but d'optimiser leurs effets. De par la fonction organométallique, les chercheurs souhaitent observer une augmentation de l'efficacité et peut-être la formation d'espèces oxydées près du site actif.^{21,22,23,24,25,26} De cette stratégie sont nées deux classes de molécules : les ferrocifènes et la ferroquine (FQ).

I.4.3. Les ferrocifènes

Dans les pays en voie de développement, le cancer du sein concerne une femme sur huit. Le tamoxifène, un modulateur des récepteurs œstrogène (ER), est le médicament le plus

¹⁷ Carmona, D.; Lamata, M.P.; Oro, L.A. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 9, 2239-2251.

¹⁸ Velders et al. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1110-1121.

¹⁹ Bergamo et al. *Int. J. Oncol.* **2004**, 24, 373-379.

²⁰ Mross et al. *Onkologie.* **2000**, 23, 576-579.

²¹ Jaouen, G.; Top, S.; Raynaud, J.P. French Patent 2725720-AI, **1994**.

²² Top et al. *Chem. Commun.*, **1996**, 8, 955-956.

²³ Jaouen et al. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 2505-2517.

²⁴ Brocard, J.; Lebibi, J.; Maciejewski, L. French Patent 2733985-A1, **1996**.

²⁵ Biot et al. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3715-3718.

²⁶ Biot et al. *J. Organomet. Chem.* **1999**, 589, 59-65.

utilisé chez les patientes atteintes du cancer du sein hormone-dépendant.^{23,27,28} De manière générale, les cancers du sein peuvent être divisés en 2 groupes qui sont distingués par la présence ER(+) ou l'absence ER(-) de récepteurs œstrogène. Environ deux tiers des cas sont ER(+), il s'agit d'une sur-expression du récepteur œstrogène qui peut être traitée par une hormone thérapie par des modulateurs sélectifs des récepteurs à œstrogène (SERMs = Selective Estrogen Receptor Modulators). Dans la lignée des cellules ER(+), il existe deux sous types de récepteurs : ER α et ER β . Les patientes peuvent au départ être traitées par le tamoxifène (figure 16). La forme active du tamoxifène est en réalité son métabolite, l'hydroxytamoxifène, mais pour des raisons de biodisponibilité, c'est le tamoxifène qui est administré (figure 16). L'action antiproliférative de l'hydroxytamoxifène est due à une liaison compétitive aux ERs. La transcription de l'ADN oestradiol-médiée est alors réprimée dans les tissus tumoraux.²⁹ Malheureusement, les cellules tumorales peuvent changer sous la thérapie et l'expression des ER α peut être diminuée de telle sorte que la prise de tamoxifène n'a plus d'effet. Il semble donc important de trouver une nouvelle molécule.

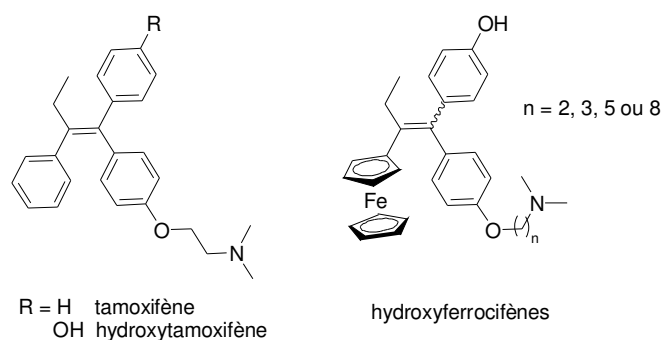


Figure 16 : Structures chimiques du tamoxifène, de l'hydroxytamoxifène et des hydroxyferrocifènes.

Le Pr. Jaouen et son équipe ont remplacé un benzène par un ferrocène dans la molécule d'hydroxytamoxifène. De cette modification sont nés les hydroxyferrocifènes (figure 16). Dans les cellules MCF7 ER(+), les hydroxyferrocifènes se comportent comme l'hydroxytamoxifène du fait de leur effet antioestrogène (schéma 17). Récemment, les hydroxyferrocifènes ont montré aussi une activité sur les cellules ER(-) mais on ne connaît pas le mode d'action.

²⁷ Jordan, V.C. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 883-908.

²⁸ Jordan, V.C. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 1081-111.

²⁹ Shiao et al. *Cell.* **1998**, 95, 927-937.

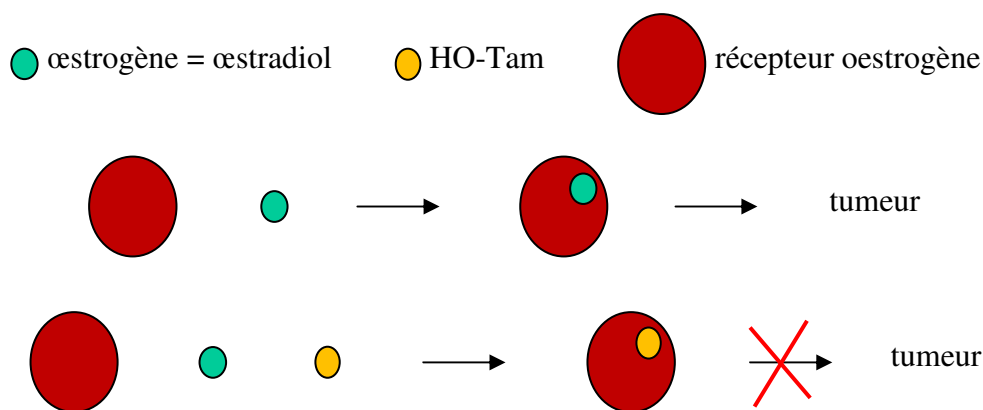


Schéma 17 : Représentation schématique de l'action de l'hydroxytamoxifène (HO-Tam).

L'analogue ruthénocénique agit comme antioestrogène sur les cellules ER(+) mais l'effet antiprolifératif sur les cellules ER(-) est inférieur à celui des hydroxyferrocifènes.³⁰ La différence structurale entre les 2 analogues métallocéniques de l'hydroxytamoxifène étant faible ($M - Cp = 2,03 \text{ \AA}$ pour le ferrocène contre $2,21 \text{ \AA}$ pour le ruthénocène), l'équipe du Pr. G. Jaouen pense que cette différence d'activité est due à la différence de propriété redox. En effet, l'électrochimie du ruthénocène n'est pas analogue au couple $[Fe(Cp)_2]^+/[Fe(Cp)_2]$ qui est une réaction réversible à un électron. Avec une électrode de platine, des mesures chronopotentiométriques suggèrent que le ruthénocène est impliqué dans une oxydation irréversible à deux électrons en une étape dans l'éthanenitrile.³¹ Il est important de noter qu'il n'est pas possible de mettre en évidence l'existence de $[Ru(Cp)_2]^+$ et toutes les tentatives d'oxydation du ruthénocène ont conduit à des complexes au Ru(IV).³² L'influence du potentiel redox de $Fe^{II/III}$ et du pH de la solution sur les propriétés cytotoxiques a été explorée à l'aide d'expériences électrochimiques par l'équipe du Pr. Jaouen.³¹ Le processus d'activation redox est montré sur le schéma 18. Lors de l'oxydation du ferrocène, la charge positive est partiellement délocalisée sur le groupement hydroxyle en para au travers du système π conjugué, ce qui rend le proton acide et accessible à une base. Cette délocalisation du radical a été montrée par calculs DFT. Dans une seconde étape d'oxydation, la perte du proton forme une quinone méthylène. Les quinones méthylènes des hydroxytamoxifènes sont connues comme étant exceptionnellement stables avec une durée de demi-vie de 3 heures sous

³⁰ Pigeon et al. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2814-2821.

³¹ Hillard et al. *Angew. Chem.* **2006**, 118, 291-296.

³² Seddon, E.A.; Seddon, K.R. *The chemistry of ruthenium*. Elsevier, **1984**, p 754.

conditions physiologiques. Les adduits de tels métabolites avec le glutathion et les bases nucléiques seraient responsables de son potentiel mutagène et de sa toxicité générale.^{33,34,35}

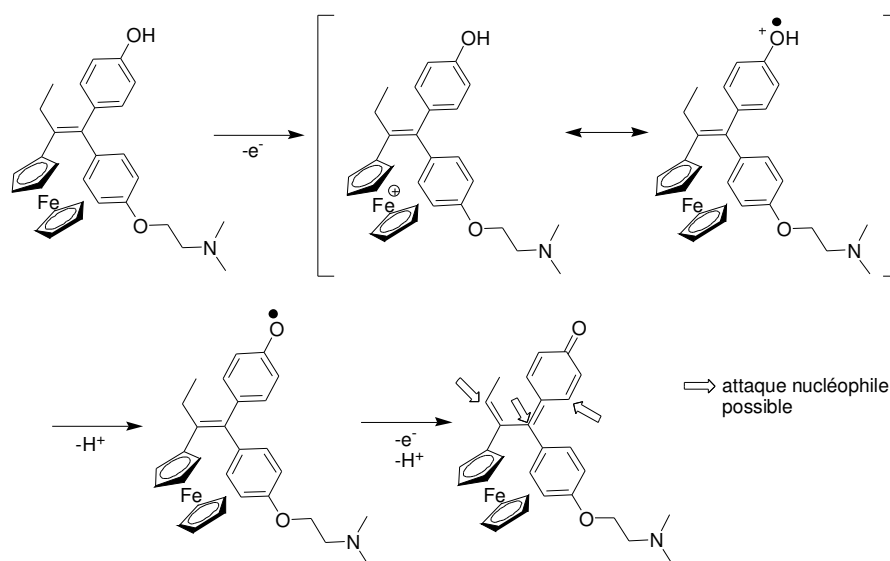


Schéma 18 : Activation redox des hydroxyferrocifènes.³⁶

I.4.4. La ferroquine

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde avec une estimation entre 1 et 3 millions de morts chaque année, la majorité étant des enfants de moins de 5 ans. Elle touche 90 % des africains sub-sahariens. Le parasite *Plasmodium falciparum*, qui est responsable de la maladie, a su développer une forte résistance à de nombreux médicaments courants comme la chloroquine (CQ) et cette résistance s'est étendue au monde entier (voir paragraphe II).^{37,38,39} La découverte de nouveaux antipaludiques est donc très importante pour pallier à ce problème de résistance. De nombreux dérivés ferrocéniques de l'artémisinine (ART),⁴⁰ de la quinine (Q) et de la méfloquine (MF)⁴¹ ont été synthétisés mais c'est dans la série de la CQ que le groupe du Pr. Brocard a découvert la FQ (figure 19).^{24,41,42} La FQ est active *in vitro* sur les clones chloroquino-sensibles mais également sur les clones chloroquino-résistants ($<CI_{50}> = 10$ nM). Elle montre également une bonne activité sur des

³³ Fan, P.W.; Zhang, F.; Bolton, J.L. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 45-52.

³⁴ Zhang et al. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 53-62.

³⁵ Terashima, I.; Suzuki, N.; Shibutani, S. *Cancer. Res.* **1999**, *59*, 2091-2095.

³⁶ Schatzschneider, U.; Metzler-Nolte, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1504-1507.

³⁷ Ridley, R.G. *Curr. Biol.* **1998**, *8*, R346-349.

³⁸ Sullivan et al. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31103-31107.

³⁹ Winstanley, P. A. *Parasitol. Today.* **2000**, *16*, 146-153.

⁴⁰ Delhaes et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2739-2745.

⁴¹ Biot et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 707-714.

⁴² Domarle et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 540-544.

isolats de terrain de *P. falciparum*, originaires du Gabon,^{43,44} du Sénégal²⁵ et du Cambodge.^{45,46,47} *In vivo*, la FQ est active sur *P. vinckei* à une dose de 8 mg/kg/j. La FQ est actuellement en phase Iib d'essais cliniques chez Sanofi-Aventis. Nous reparlerons plus en détail de la FQ au paragraphe III.

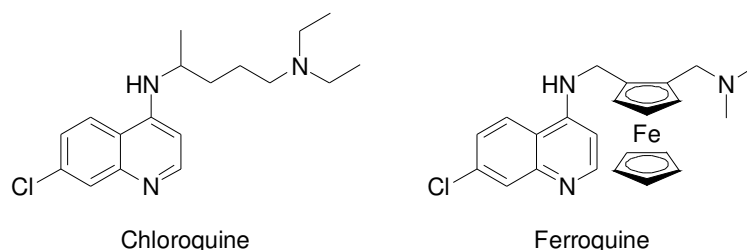


Figure 19 : Structures chimiques de la chloroquine et de la ferroquine.

I.4.5. Autres exemples de molécules ferrocéniques biologiquement actives

a) Antibactériens peptidiques

Du fait du développement accru et rapide des résistances aux antibiotiques, il est nécessaire de trouver de nouvelles classes de médicaments avec des mécanismes d'action nouveaux.^{48,49} Le groupe de recherche du Pr. Metzler-Nolte travaille sur des antibactériens peptidiques. Ces peptides sont présents chez les êtres vivants et protègent des bactéries. Ils ont associé ces peptides à des fonctions organométalliques à l'aide de synthèses biphasiques. L'introduction d'un groupement organométallique modifie et renforce la spécificité de l'activité biologique de ces peptides. Le groupe du Pr. Metzler-Nolte a choisi comme groupement metallocénique le ferrocène qui est connu pour modifier le profil pharmacodynamique des composés bioactifs.^{23,50}

Le complexe ferrocénique modifie l'activité du peptide de telle sorte que suivant la partie liée au complexe métallique, le peptide sera sélectif soit des bactéries Gram négatifs soit des bactéries Gram positifs. En effet, le composé 1 montre une très bonne activité sur *Staphylococcus aureus* Gram positif ($CI_{50} = 7,1 \mu M$) alors que le composé 2 est, quant à lui, plus actif sur *Escherichia coli* Gram négatif ($CI_{50} = 16 \mu M$) (figure 20).⁴⁹ Alors que tous les

⁴³ Atteke et al. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, 51, 1021-1024.

⁴⁴ Pradines et al. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2001**, 48, 179-184.

⁴⁵ Pradines, B. et al. *Trop. Med. Int. Health.* **2002**, 7, 265-270.

⁴⁶ Chim, P. et al. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **2004**, 98, 419-424.

⁴⁷ Kreidenweiss, A. et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, 75, 1178-1181.

⁴⁸ Chantson et al. *J. Organomet. Chem.* **2005**, 690, 4564-4572.

⁴⁹ Chantson et al. *ChemMedChem.* **2006**, 1, 1268-1274.

⁵⁰ Noor et al. *Angew. Chem.* **2006**, 118, 291-296.

antibactériens peptidiques synthétisés par le groupe du Pr. Metzler-Nolte sont actifs sur des bactéries Gram négatifs, le composé 1 est le seul à présenter une activité sur *S. aureus* Gram positif. Il est d'ailleurs plus actif que la pilosuline 2, un peptide à 20 acides aminés naturel.

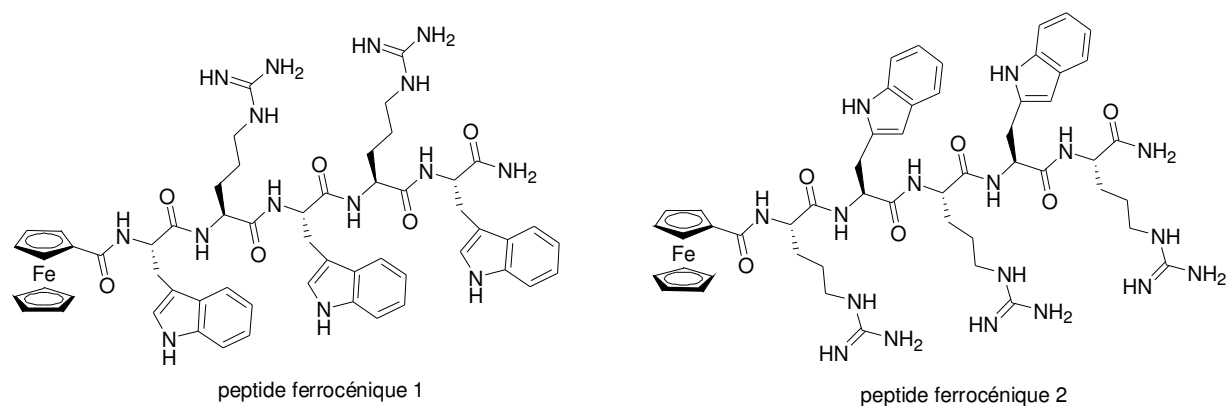


Figure 20 : Antibactériens peptidiques.

En raison de l'excellente stabilité des métallocènes, des études biologiques sous conditions physiologiques ont été aisément réalisées. Des études mécanistiques ont été faites sur ces peptides métallocéniques et ont montré que ces peptides se localisent sélectivement dans le noyau des cellules grâce à des transporteurs spécifiques. Ils se retrouvent donc près de l'ADN.⁵¹ Il s'agirait de la première étude intracellulaire non radioactive.

b) Ligands des récepteurs dopaminergiques

Le groupe du Pr. Gmeiner a identifié des métallocènes très affins pour les récepteurs dopaminergiques et sérotoninergiques du système nerveux central. Ces métallocènes sont décrits comme étant des bioisostères « amusants ».⁵² Le remplacement bioisostérique est communément utilisé comme une stratégie efficace dans la découverte de médicaments. Il permet d'améliorer les propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques.⁵³ Profitant de la variété structurale des dérivés hétéroarènes, le groupe du Pr. Gmeiner a développé des ligands spécifiques des récepteurs dopaminergiques D3^{54,55} et des modulateurs sélectifs des récepteurs dopaminergiques D4.^{56,57} De nouveaux carboxamides ferrocéniques associent une

⁵¹ Fuertes et al. *Curr. Med. Chem.: Anti-Canc. Agents*. **2002**, 2, 539-551.

⁵² Schlotter et al. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3696-3699.

⁵³ Chen, X.; Wang, W. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2003**, 38, 333-346.

⁵⁴ Bettinetti et al. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 4594-4597.

⁵⁵ Boeckler et al. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 66, 1025-1032.

⁵⁶ Löber et al. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2691-2694.

⁵⁷ Boeckler et al. *Psychopharmacology*. **2004**, 175, 7-17.

activité subnanomolaire sur les récepteurs dopaminergiques D4 à une activité sur les récepteurs sérotoninergiques 5HT1A pour le composé 1 et à une activité sur les récepteurs dopaminergiques D3 pour le composé 2 (figure 21). En revanche, le composé ruthénocénique 3 possède des propriétés agonistes sélectives des récepteurs dopaminergiques D4 (figure 21). L'encombrement stérique des dérivés ferrocéniques et ruthénocéniques ne semble pas perturber la liaison des carboxamides aux récepteurs couplés à la protéine G. Ces bioisostères semblent intéressants pour traiter les maladies neuropathologiques comme la schizophrénie, la L-dopa dyskinésie, les déficits d'attention, l'hyperactivité, l'abus de psychostimulants et les dysfonctionnements sexuels.

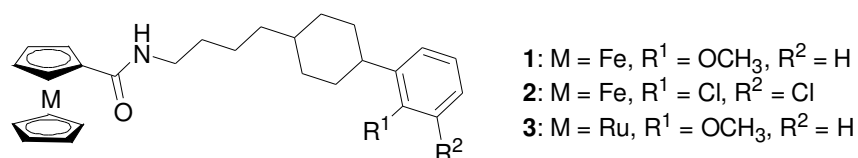


Figure 21 : Ligands des récepteurs dopaminergiques et sérotoninergiques.

c) Inhibiteurs de kinase analogues de la staurosporine

Les protéines kinases sont importantes pour la modulation de l'activité des enzymes par transfert du groupe γ -phosphate de l'ATP co-substrat à des groupes hydroxyles de certaines sérines, thréonines ou tyrosines dans la protéine cible. Cette phosphorylation est importante particulièrement dans le contrôle du signal cellulaire de transduction, et l'activité de régulation des kinases est une cause fréquente de maladies. Pim-1 est une protéine kinase surexprimée dans le cancer de la prostate. De nouveaux agents chimiothérapeutiques bloquent son activation hormone-indépendante du récepteur androgène qui est typique du cancer de la prostate avancé. Le groupe du Pr. Meggers a synthétisé des analogues ruthénocéniques de la staurosporine, un inhibiteur de la protéine kinase Pim-1 qui prévient de la liaison de l'ATP à la kinase. Ces analogues ont une bonne affinité de l'ordre du nanomolaire, soit 2 fois plus actifs en magnitude que les inhibiteurs organiques.^{58,59,60} Avec un criblage d'au moins 60 kinases différentes, l'analogue représenté en figure 22, montre une bonne sélectivité pour la protéine kinase Pim-1. La stéréochimie est importante : l'énantiomère S est plus affin que le

⁵⁸ Bregman et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13594-13595.

⁵⁹ Williams et al. *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2020-2023.

⁶⁰ Williams et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1984-1987.

R. Une structure cristallographique montre l'affinité et la sélectivité de l'inhibiteur ruthénocène pour Pim-1.⁶¹

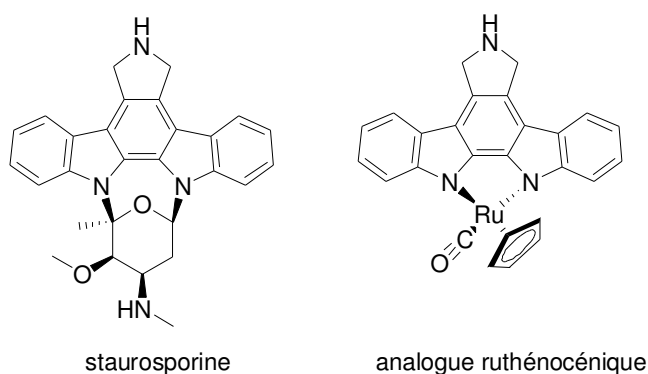


Figure 22 : Structure chimique de la staurosporine et de son analogue ruthénocénique.

I.5. Le métabolisme des métallocènes

L'hydroxylation enzymatique des aromatiques est un processus vital de métabolisme des exogènes. Le benzène a un potentiel redox très élevé qui rend la formation de radicaux-cations difficile par des processus d'oxydation à un électron. Le benzène ne peut donc pas être oxydé par des peroxydases. Son métabolisme implique donc le cytochrome P-450 dans une réaction d'époxydation suivie d'un réarrangement non enzymatique de l'oxyde arénique résultant (schéma 23).^{62,63} Parfois, il y a hydroxylation directe du cycle aromatique.⁶⁴

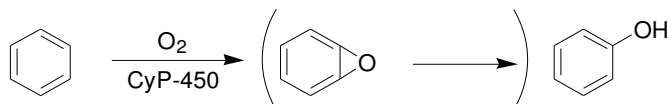


Schéma 23 : Hydroxylation du benzène catalysée par le cytochrome P-450 via la formation d'un oxyde arénique.

Le mécanisme d'hydroxylation n'est pas encore bien connu et des questions se posent encore concernant la toxicité des métabolites produits lors de ce processus.⁶⁵ Des études plus récentes suggèrent que le phénol soit formé indépendamment de l'oxyde arénique.^{66,67} Deux études théoriques basées sur des calculs DFT ont été réalisées concernant l'hydroxylation des arènes. Elles montrent que l'activation de la liaison devrait avoir lieu via un mécanisme à

⁶¹ Debreczeni et al. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1610-1615.

⁶² Jerina, D.M.; Daly, J.W. *Science*. **1974**, *185*, 573-582.

⁶³ De Visser, S.P.; Shaik, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7413-7124.

⁶⁴ Tomaszewski, J.E.; Jerina, D.M.; Daly, J.W. *Biochemistry*, **1975**, *14*, 2024-2031.

⁶⁵ Sono et al. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841-2887.

⁶⁶ de Visser, S.P.; Shaik, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7413-7424.

⁶⁷ Bathelt et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15004-15005.

l'état doublet. Le premier mécanisme propose la formation d'un complexe σ radicalaire (schéma 24) et le deuxième, la formation du complexe σ cationique correspondant (schéma 24). La théorie n'exclut pas le fait que le complexe cationique puisse être généré à partir du complexe radicalaire via un transfert d'électron intramoléculaire comme montré à la figure xx mais les calculs montrent que les deux complexes sont générés selon des mécanismes indépendants. La voie électrophile qui conduit au complexe cationique, a une énergie plus faible que le mécanisme radicalaire par polarité et l'effet de la liaison hydrogène NH-S. Les calculs montrent que la voie majoritaire de l'hydroxylation arénique est la voie électrophile. Les intermédiaires cationiques et radicalaires évoluent alors vers la formation d'un complexe ferrique d'oxyde de benzène par fermeture de cycle ou vers la formation d'un phénol ou d'une cétone par transfert de proton.

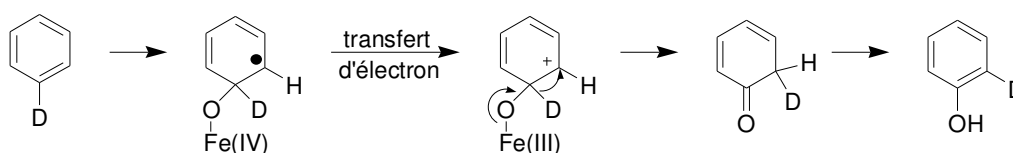


Schéma 24 : Hydroxylation du benzène via la formation de complexes radicalaires et cationiques.⁶⁸

Comme pour tout autre aromatique, le métabolisme du ferrocène passe par son hydroxylation qui semble être un processus cytochrome P-450 dépendant (figure 25),⁶⁹ nécessitant de l'oxygène moléculaire et du NADPH comme cofacteur. Le produit hydroxylé peut ensuite se lier à une molécule d'acide glucuronique provenant du système uridine diphosphate/glucuronate ou à un sulfate « actif » provenant du 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate. L'ester ainsi formé est un composé polaire soluble dans l'eau et facilement excrété par la bile ou l'urine.

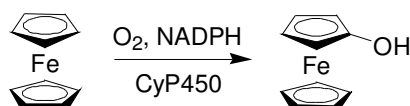


Figure 25 : Hydroxylation du ferrocène.

Des études sur le métabolisme du ferrocène, utilisant un marquage au ^{59}Fe , suggèrent une excrétion urinaire du fer sous une forme non ferrocénique.⁶⁹ En effet, *in vivo*, la décomposition spontanée de l'hydroxyferrocène qui échappe à la conjugaison avec le sulfate

⁶⁸ Meunier, B.; de Visser, S.P.; Shaik, S. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947-3980.

⁶⁹ Hanzlik, R.P.; Soine, W.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1290-1291.

ou l'acide glucuronique libre du fer qui est utilisé pour la synthèse de l'hémoglobine (25 % du fer absorbé sous forme de ferrocène se retrouvent dans l'hémoglobine).⁷⁰ Le métabolisme du ruthénocène est identique à celui du ferrocène.^{71,72}

Les métallocènes montrent des affinités spécifiques aux différents organes suivant les substituants qu'ils portent. Les métallocènes avec des substituants polaires seront localisés au niveau du foie et des reins alors que les métallocènes avec des groupes hydrophobes ou acétyles auront quant à eux comme cible les glandes surrénales, responsables de la détoxification des hormones stéroïdiques.

L'affinité spécifique aux différents organes est également fonction de la nature du métal. En effet, la méthylruthénylcétone se concentre dans les glandes surrénales alors que la méthylsmyciocénylcétone ne montre aucune affinité pour celles-ci. Ce processus de sélection serait dû à un effet stérique du complexe métallocénique : l'osmium étant plus gros que le ruthénium.

L'absorption des dérivés ferrocéniques est aussi liée à la nature de la chaîne latérale. Plus la molécule est lipophile, meilleure est l'absorption.⁷³

I.6. Les traceurs pharmaceutiques

I.6.1. Les traceurs pharmaceutiques radioactifs

Les radiopharmaceutiques, produits pharmaceutiques radioactifs, sont utilisés dans le domaine de la médecine nucléaire comme traceurs dans le diagnostic et le traitement de nombreuses maladies. Un noyau radioactif est un noyau atomique instable qui se désintègre en dégageant de l'énergie sous forme de rayonnements divers pour se transmuter en des noyaux atomiques plus stables. Les rayonnements ainsi émis sont appelés, selon leur nature, α (hélicon), β (électron) ou γ (rayonnement électromagnétique). Les propriétés des complexes radioactifs sont liées aux caractéristiques physiques du métal isotopique : l'énergie, la durée de demi-vie, la nature des rayonnements et la nature chimique du composé.

Beaucoup de produits radiopharmaceutiques utilisent le technétium (^{99m}Tc) car il est facilement disponible grâce à un générateur de ^{99}Mo . Il émet des rayonnements γ purs dont

⁷⁰ Golberg, L.; Martin, L.E. *Life Science*. **1964**, 3, 1464-1474.

⁷¹ Taylor, A.J.; Wenzel, M. *Xenobiotica*. **1978**, 8, 107-112.

⁷² Taylor, A.J.; Wenzel, M. *Naturwissenschaften*, **1977**, 64, 273-274.

⁷³ Nielsen, P.; Heinrich, H.C. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, 45, 385-391.

l'énergie est de 140 keV. La période radioactive est courte (6h) et le ^{99m}Tc peut marquer de nombreuses molécules. Schwochau a décrit différents radiopharmaceutiques dérivés du technétium utilisés pour l'imagerie et les études fonctionnelles du cerveau, du myocarde, de la thyroïde, des poumons, du foie, de la vésicule biliaire, des reins, du squelette, du sang et des tumeurs.^{74,75,76} Le radionucléide peut être administré seul, sous forme ionique ou inerte (ex : ^{99m}Tc) ou associé à une molécule simple (ex : le ^{99m}Tc associé à un diphosphonate pour la scintigraphie du squelette) ou plus complexe (ex : l'indium 111 lié à un analogue de la somatostatine). Certains métallocènes comportant un atome de métal radioactif trouvent leurs applications en médecine nucléaire.

Les essais radioimmunologiques, méthodes utilisant des traceurs radioactifs ou des anticorps spécifiques de l'analyte, ont été fortement développés dans les années 1960 suite aux travaux de Yalow et Berson.^{77,78} Ce développement a été décisif dans l'histoire de la bioanalyse car l'approche augmente la sensibilité d'un facteur 1000. La possibilité d'utiliser des complexes organométalliques dans ce contexte a été évoquée la première fois par Gill et Mann.⁷⁹ Ces auteurs se sont intéressés au marquage du ferrocène par du ^{59}Fe , un isotope radioactif du Fe qui émet des rayonnements β et γ avec une durée de demi-vie de 44,5 jours. L'injection d'un polypeptide synthétique marqué avec 2 ou 16 ferrocènes chez le lapin produit des anticorps spécifiques anti-ferrocène, établissant incidemment la non toxicité et la stabilité du ferrocène *in vivo*. L'utilisation de radioisotopes n'est pas sans problème : le nombre d'isotopes utilisables est faible et ils présentent un coût élevé et une durée de vie limitée.

I.6.2. Les traceurs pharmaceutiques non radioactifs

Au début des années 70, une approche non isotopique a été développée : des tests immunologiques qui ne requièrent pas de traceurs radioactifs ont été mis au point. C'est alors que les essais enzymatiques, de fluorescence et de luminescence ont attiré une attention particulière.⁸⁰ Des échantillons métalliques ont été très rapidement développés : métaux sous forme de colloïdes d'or, de chélateurs de terres rares avec des propriétés fluorescentes

⁷⁴ Leesmeister, K.; Schwochau, K. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B.* **1992**, 19, 73-78.

⁷⁵ Schwochau, K.; Linse, K.H.; Su, Z.F. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A.* **1992**, 43, 1079-1082.

⁷⁶ Schwochau et al. *Nucl. Med. Biol.* **1993**, 20, 317-324.

⁷⁷ Yalow, R.S.; Berson, S.A. *J. Clin. Invest.* **1960**, 39, 1157-1175.

⁷⁸ Islam-Ali, B.S.; Tisdale, M.J. *Nature.* **1959**, 84, 1648-1649.

⁷⁹ Gill, T.J.; Mann, L.T. *J. Immunol.* **1966**, 96, 906-912.

⁸⁰ Gosling, J.P. *Clin. Chem.* **1990**, 36, 1408-1427.

intéressantes ou des complexes organométalliques.^{81,82} Cais a introduit le terme d'essai immunométallique en 1977 pour qualifier les tests immunologiques utilisant des complexes métalliques en tant que traceurs.⁸³ Certains d'entre eux possèdent des propriétés physicochimiques spécifiques qui leur permettent d'être analysés à des concentrations de l'ordre de la picomole, ce qui est nécessaire pour les tests immunologiques. De plus, la grande versatilité de la synthèse organométallique permet un accès à un grand nombre d'analytes (table 26). Nous n'évoquerons ici que les exemples pionniers dans ce domaine.

Dans la fin des années 1980 ont été découverts les 3 premiers traceurs organométalliques. Ils sont utilisés dans différentes techniques : l'absorption atomique, l'électrochimie et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR).^{84,85,86}

Brossier a été le premier à se servir de l'absorption atomique dans le cas d'antidépresseurs⁸⁴ en quantifiant l'atome de manganèse dans le traceur nortryptiline (table 26). Toutefois, cette technique souffre d'un manque de sensibilité à cause d'une éventuelle contamination avec le solvant des traceurs et n'a, de ce fait, pas été développée davantage.

Du fait d'une réponse redox réversible et stable, le comportement électrochimique inhabituel du ferrocène fût rapidement reconnu dans le domaine de l'analyse électrochimique. Mc Neil a publié en 1986 un essai immunologique ampérométrique de la lidocaïne, un médicament utilisé dans le traitement de l'arythmie cardiaque, qui utilise un traceur ferrocényle de la lidocaïne (table 26).⁸⁵ Degrand et Limoges ont également développé un nouvel essai immunologique basé sur la détection électrochimique d'un dérivé cobaltocénium cationique électroactif de l'amphétamine (table 26) combiné avec les propriétés spécifiques du Nafion®.⁸⁷ La détection électrochimique est également la base des senseurs à ADN ou des génosenseurs qui font partie d'une nouvelle famille de biosenseurs utilisés pour la détection de pathogènes ou de gènes spécifiques associés à différentes pathologies. Le eSensor® est un biosenseur de ce type qui a été développé par Farkas.

⁸¹ Hainfeld, J.F. *Science*. **1987**, 236, 450-453.

⁸² Leuvering et al. *J. Immunol. Methods*. **1983**, 60, 9-23.

⁸³ Cais et al. *Nature*. **1977**, 270, 534-535.

⁸⁴ Cheret, P.; Brossier, P. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1986**, 54, 237-253.

⁸⁵ Di Gleria et al. *Anal. Chem.* **1986**, 58, 1203-1205.

⁸⁶ Salmay et al. *J. Immunol. Methods*. **1992**, 148, 65-75.

⁸⁷ Limoges et al. *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1054-1060.

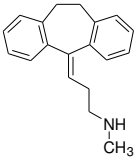
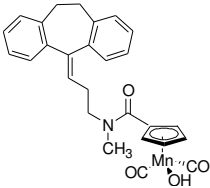
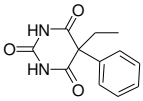
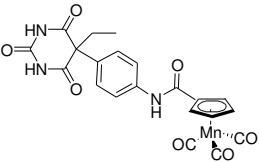
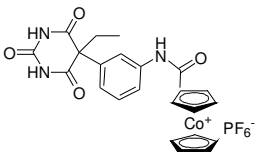
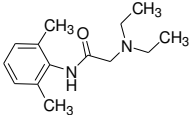
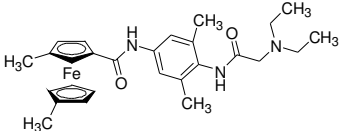
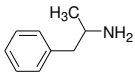
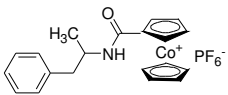
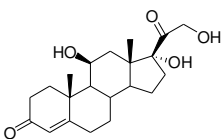
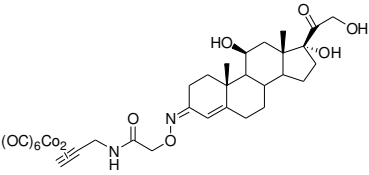
Analytes	Traceurs	Méthode analytique
Nortriptyline (antidépresseur)		
		Absorption atomique
phénobarbital (antiépileptique)		
		Absorption atomique FT-IR
		Voltamétrie
Lidocaïne (arythmie cardiaque)		
		Voltamétrie cyclique
Amphétamine (drogue)		
		Voltamétrie
Cortisol (hormone)		
		FT-IR

Table 26 : Exemples de traceurs organométalliques et de leur application.

La troisième technique, la spectroscopie infrarouge (IR), a révolutionné au début des années 80 lorsqu'elle a été équipée de la transformée de Fourier. Cette révolution technique a permis l'utilisation de la spectroscopie IR pour des techniques d'analyse sensibles et fiables.^{88,89} Les complexes métalliques carbonyles avec une liaison M-CO sont connus pour leurs propriétés spectroscopiques uniques en IR. En effet, les vibrations d'élongation très intenses de la liaison M-CO résonnent dans la région des 2000 cm⁻¹, une zone où aucune

⁸⁸ Salmain et al. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2323-2329.⁸⁹ Butler et al. *Appl. Spectrosc.* **1989**, 43, 1497-1498.

fonction organique standard ne résonne. Ceci est clairement visible sur le spectre du complexe carbonyle du chromium (table 26). Cette remarquable propriété et ce potentiel analytique particulier furent démontrés pour la première fois en 1985 dans le cas d'une liaison d'une hormone à son récepteur spécifique.^{3,4,90}

II. Le paludisme

Le paludisme est une parasitose aiguë ou chronique due à un protozoaire du genre *Plasmodium* qui est transmis à l'Homme par un agent vecteur, l'Anophèle.

II.1. Situation mondiale

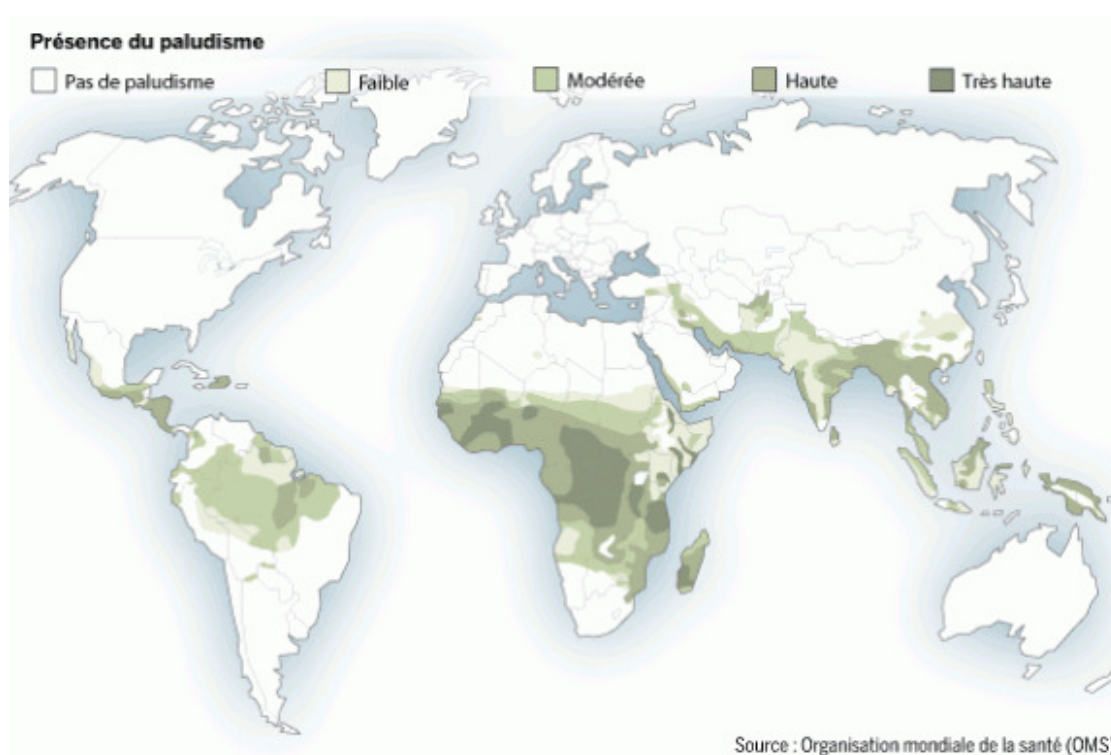


Figure 27 : Répartition géographique du paludisme dans le monde.

40 % de la population mondiale sont situés dans une zone infectée par le paludisme (figure 27). Dans le monde, le paludisme contamine 20 nouvelles personnes chaque seconde et cause une mort prématurée toutes les douze secondes. Le paludisme frappe les enfants en bas âge, les adultes non immuns et les femmes au cours de leur première grossesse. Environ 1 million de ces décès touche des enfants de moins de 5 ans. Plus de 90 % de l'incidence totale du paludisme, et la grande majorité des décès qui lui sont associés, concernent les pays

⁹⁰ Jaouen et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4778-4780.

d'Afrique sub-saharienne. Pour prévenir de la mortalité, un diagnostic précoce et un traitement rapide et approprié sont indispensables.

En dehors de sa mortalité importante, le paludisme a une incidence considérable sur la santé, en particulier chez les enfants. Le paludisme cérébral non mortel et le paludisme chronique entraînent des retards intellectuels importants et des déficits significatifs de développement staturopondéral.^{91,92}

Le poids économique du paludisme apparaît comme un facteur majeur d'entrave au développement dans les pays concernés. Chez l'adulte, l'accès palustre entraîne des pertes d'efficacité dans le travail, notamment dans les zones agricoles situées dans les régions endémiques, qui peuvent atteindre 40 %.⁹³ Dans les pays situés en zone d'endémie, le paludisme coûterait entre 0,25 et 1,3 points de croissance du PIB par an, ce qui se traduit par un retard de croissance de moitié en 25 ans. Chez les familles pauvres, le paludisme (soins, prévention et traitement) peut représenter 20 % du budget total annuel.

II.2. Agent causal

Cinq espèces de *Plasmodium* sont pathogènes pour l'Homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi*.

P. falciparum est la forme la plus pathogène et la seule à être fréquemment mortelle. C'est l'espèce prédominante en Afrique tropicale, en Asie orientale, en Océanie et dans la région amazonienne. Il sévit toute l'année dans les pays équatoriaux. Cependant, il peut y avoir des recrudescences saisonnières. Il ne survient qu'à la période chaude et humide dans les régions subtropicales. En effet, le cycle biologique de *P. falciparum* ne peut se dérouler qu'à des températures supérieures à 20°C, ce qui définit les régions où il sévit.⁹⁴

P. vivax infecte entre 130 et 435 millions des 2,6 milliards de personnes qui vivent dans les zones à risque.^{95,96} *P. vivax* n'est pas une espèce rare ni bénigne : des études récentes suggèrent que *P. vivax* peut devenir létal tout comme *P. falciparum*. Il sévit dans les zones

⁹¹ Bjorkman, A.; Bhattacharai, A. *Acta Trop.* **2005**, *94*, 163-169.

⁹² Yakoob et al. *J. Pak. Med. Assoc.* **2005**, *55*, 543-546.

⁹³ Malaney, P.; Spielman, A.; Sachs, J. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, *71*, 141-146.

⁹⁴ Daher, W. **2006**, thèse de Parasitologie – Biologie Moléculaire.

⁹⁵ Guerra, C.A.; Snow, R.W.; Hay, S.I. *Trends Parasitol.* **2006**, *22*, 353-358.

⁹⁶ Hay et al. *Lancet Infect. Dis.* **2004**, *4*, 327-336.

tropicales excepté en Afrique sub-saharienne ouest et centrale où les personnes sont protégées par l'absence d'un récepteur spécifique sur les globules rouges.⁹⁷

P. ovale et *P. malariae* sont des formes relativement rares. Les infections dues à *P. malariae* ont lieu principalement en Afrique sub-saharienne et dans le Pacifique sud ouest.⁹⁸ Elles sont présentes également en Asie, au Moyen-Orient, en Amérique du Sud et en Amérique centrale mais sont beaucoup moins fréquentes dans ces régions. Les infections dues à *P. ovale* sont plus limitées.⁹⁸ Elles ont lieu en Afrique tropicale, en Nouvelle Guinée, à l'est de l'Indonésie et dans les Philippines. Des infections dues à *P. ovale* ont été également observées au Moyen-Orient, en Inde subcontinentale et dans différentes régions de l'Asie du Sud-Est. Dans la majorité des zones où *P. ovale* est observé, il reste très rare et représente uniquement 3 à 5 % des infections par *Plasmodium*.

P. knowlesi a été récemment diagnostiqué comme étant une espèce de *Plasmodium* infectant l'Homme et sévit en Malaisie.⁹⁹

II.3. Description du cycle de *Plasmodium*

Le parasite ne peut pas se transmettre d'Homme à Homme. Le cycle parasitaire est constitué de 2 phases : une phase asexuée chez l'Homme et une phase sexuée qui débute chez l'Homme et se termine chez le moustique (figure 28).

Lors d'un repas de sang, le moustique femelle Anophèle injecte le parasite à son hôte. Le parasite se présente alors sous la forme d'un sporozoïte. Il circule dans le sang et pénètre rapidement dans le foie (en 30 minutes).¹⁰⁰ Dans les hépatocytes, le sporozoïte se multiplie par schizogonie pendant 5 à 7 jours donnant des milliers de cellules formant un schizonte hépatique : c'est la phase pré-érythrocytaire ou exo-érythrocytaire. Cette phase va permettre à certaines espèces de survivre longtemps dans l'organisme alors qu'il aura disparu du sang. Chez *P. vivax* et *P. ovale*, un certain nombre de sporozoïtes qui colonisent avec succès l'hépatocyte, ne se développent pas immédiatement pour former un schizonte hépatique.¹⁰¹ On appelle cette phase, la "phase dormante" : le parasite ne se réplique plus et est alors appelé hypnozoïte. Les hypnozoïtes dorment pendant une période plus ou moins longue puis, en fonction de facteurs encore mal connus, entrent en développement et vont provoquer des

⁹⁷ Baird, J.K. *Trends parasitol.* **2007**, 23, 533-539.

⁹⁸ Mueller, I.; Zimmerman, P.A.; Reeder, J.C. *Trends parasitol.* **2007**, 23, 278-283.

⁹⁹ Cox-Singh et al. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, 46, 165-171.

¹⁰⁰ Yuda, M.; Ishino, T. *Cell. Microbiol.* **2004**, 6, 1119-1125.

accès récurrents de paludisme. *P. malariae* ne donne pas d'hypnozoïtes mais peut tout de même persister pendant des dizaines d'années sous forme d'une infection asymptomatique lors de l'étape sanguine asexuée.¹⁰¹

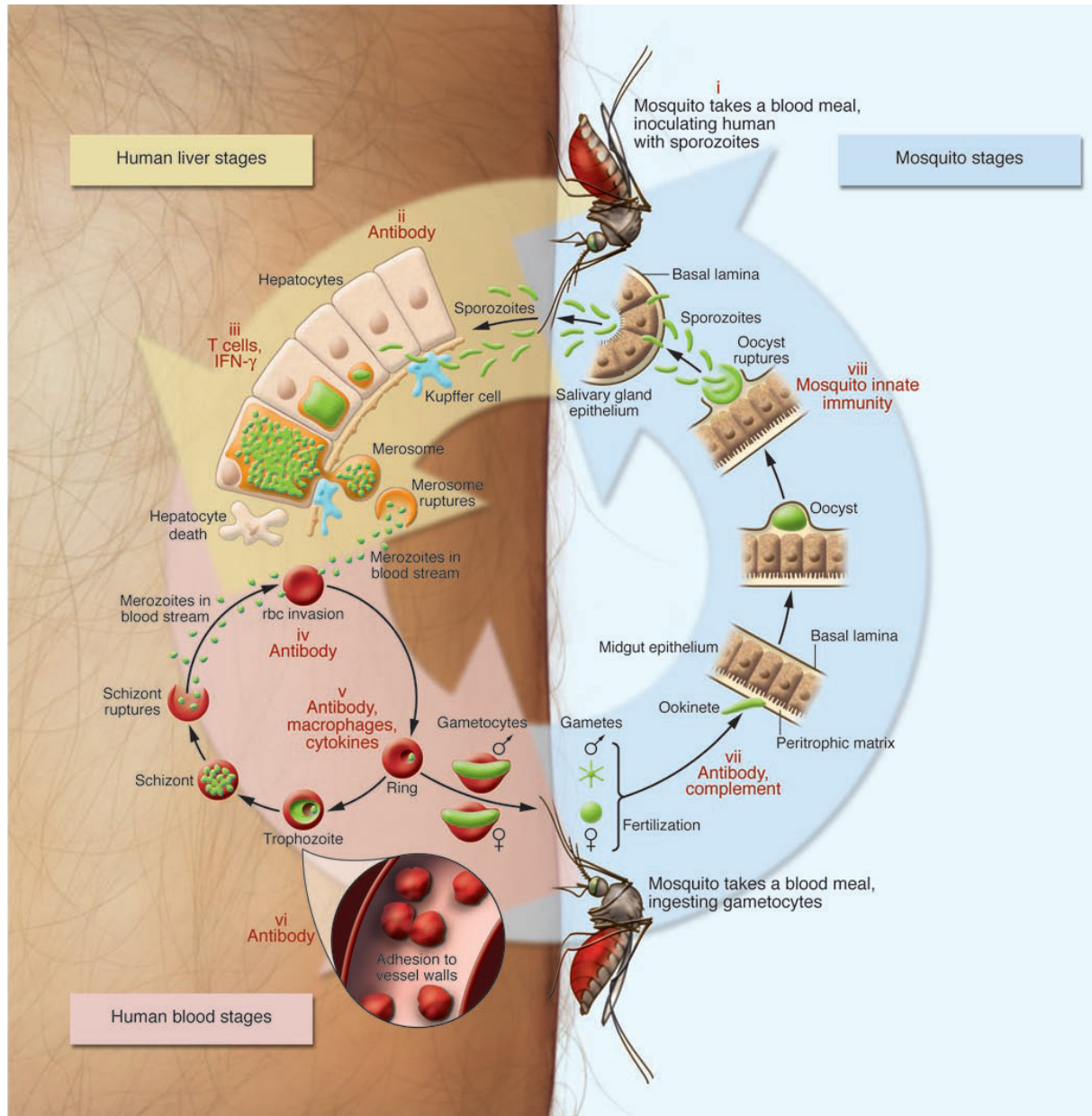


Figure 28 : Le cycle de vie de *Plasmodium* chez le moustique et chez l'Homme.¹⁰¹

¹⁰¹ Greenwood et al. *J. Clin. Invest.* **2008**, 118, 1266-1276.

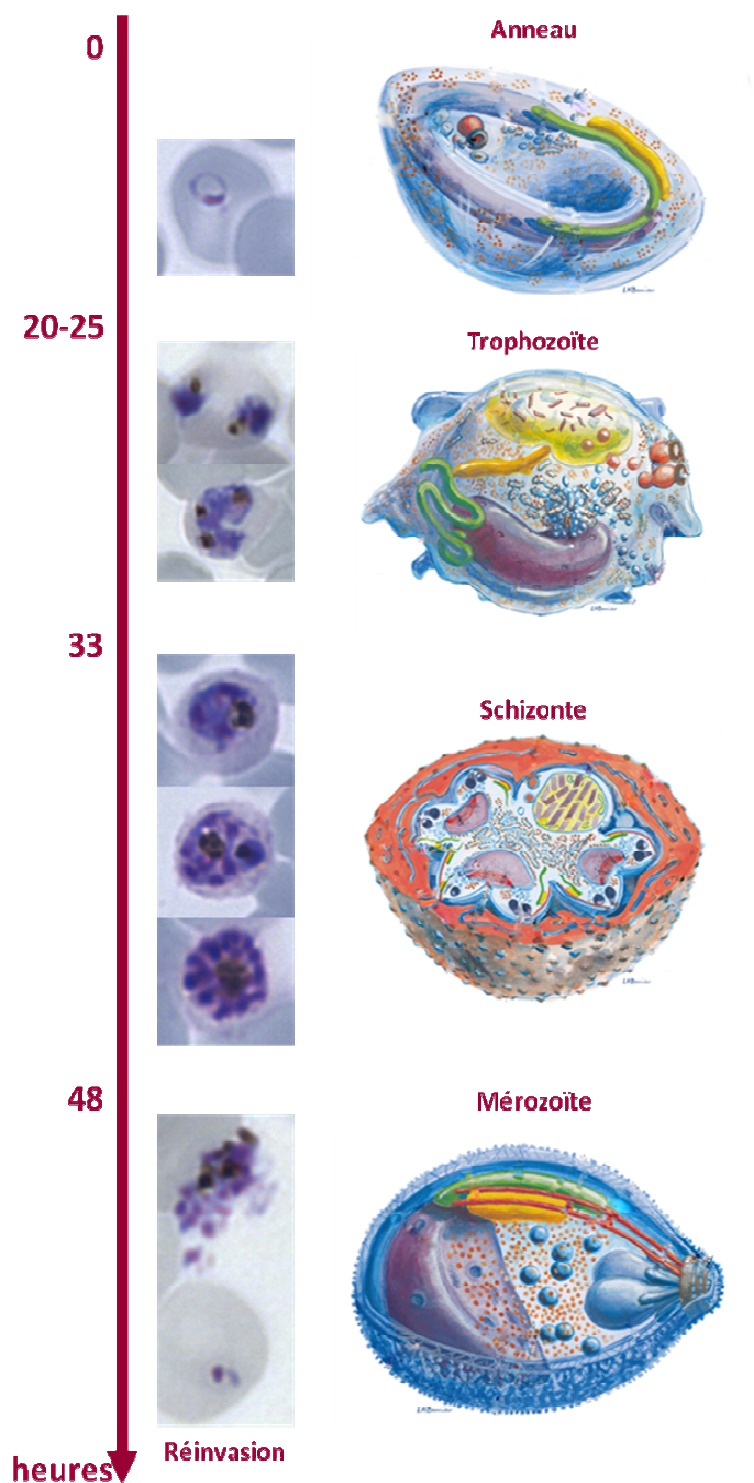


Figure 29 : Cycle schizogonique du parasite dans le sang (d'après un schéma du Dr. Dive). Reconstitutions en 3D d'un anneau, d'un trophozoïte, d'un schizonte et d'un mérozoïte.¹⁰²

¹⁰² Bannister et al. *Parasitol. Today*. **2000**, 16, 427-433.

Après 8 à 10 jours, le schizonte hépatique est à maturité : il éclate et libère entre 10 000 et plus de 30 000 mérozoïtes qui envahissent les globules rouges initiant ainsi le cycle érythrocytaire. Les mérozoïtes sont originalement, pour une part, contenus dans des mérosomes qui permettent de les transporter dans le sang.¹⁰³ Les mérosomes s'accumulent dans les capillaires pulmonaires où la circulation sanguine est ralentie. Ainsi, la libération de nombreux mérozoïtes s'effectue-t-elle au niveau des poumons. Dans l'hématie colonisée, un mérozoïte se différencie en anneau puis en trophozoïte qui donne, à la suite de plusieurs divisions nucléaires, un schizonte érythrocytaire qui contient un nombre variable de mérozoïtes selon les espèces. On parle alors de cycle schizogonique (figure 29). L'hématie éclate ensuite et les mérozoïtes, les parasites infectieux, passent dans le sang et envahissent de nouveaux érythrocytes. *P. falciparum* est capable de se lier à l'endothélium durant l'étape sanguine asexuée chez l'hôte et par conséquent, il peut envahir de nombreux organes y compris le cerveau.¹⁰¹

L'éclatement des cellules sanguines infectées par le parasite provoque de la fièvre, des frissons, puis une anémie progressive, qui sont les symptômes caractéristiques du paludisme. La mort peut être due à l'anémie, à des perturbations de la circulation du sang et des réactions inflammatoires dans les vaisseaux du cerveau, des poumons ou dans d'autres organes profonds. Quand une femme enceinte primipare est infectée, son bébé est contaminé et subit un retard de croissance.

Après 9 à 11 jours, certains mérozoïtes envahissent les globules rouges, puis au bout de 24 h, se séquestrent dans la moelle osseuse ou la rate où ils se différencient en gamétocytes mâles et femelles, formes sexuées non pathogènes.¹⁰⁴ Les parasites lors de cette phase n'ont aucune chance de survie chez l'Homme : ils restent vivants une vingtaine de jours. Ils peuvent être pompés avec le sang par un moustique Anophèle femelle. Il a été récemment montré que la présence de gamétocytes dans le sang de l'hôte pouvait attirer le moustique suivant un mécanisme non encore élucidé.¹⁰⁵

Dans l'estomac de l'Anophèle, les gamétocytes ingérés par le moustique sont transformés en gamètes. Un gamétocyte femelle donne un gamète femelle alors qu'un gamétocyte mâle donne 8 gamètes mâles après division du noyau. De la rencontre des

¹⁰³ Baer et al. *PLoS Pathogens*. **2007**, 3, e171.

¹⁰⁴ Diebner et al. *J. Theor. Biol.* **2000**, 202, 113-127.

¹⁰⁵ Lacroix et al. *PLoS Biol.* **2005**, 3, e298.

gamètes mâles et femelles, un zygote va être formé dans la demi-heure suivant la piqure. Après la fertilisation commence la phase asexuée chez le moustique. Le zygote se transforme en ookinète qui migre à travers l'épithélium endoplasmique du moustique,¹⁰⁶ s'installe dans les espaces intracellulaires et se développe en oocyste. A l'intérieur de cet oocyste, des milliers de sporozoïtes se forment et perforent la coque de l'oocyste pour migrer vers les glandes salivaires par chimiotactisme.¹⁰⁷ Ainsi, ils sont prêts à être transmis au prochain individu, lors du prochain repas sanguin de l'Anophèle femelle devenu infectieux.

Durant son cycle, le parasite utilise un matériel génétique de plus de 5 000 gènes pour pouvoir assurer les différentes métamorphoses qui lui permettent d'affronter les nombreux environnements variés et barrières qu'il rencontre.¹⁰⁸

II.4. Les différents types de paludisme

Il existe différentes formes de paludisme qui sont caractérisées par différents symptômes (fièvre, anémie, hypoglycémie, œdèmes ...) et touchent différents types de population mais surtout les enfants et les femmes enceintes. Nous ne présenterons ici que les deux formes les plus importantes en termes de mortalité et de séquelles graves.

II.4.1. Le neuropaludisme

Le neuropaludisme, appelé aussi accès pernicieux, est la forme la plus grave du paludisme. Il est dû à *P. falciparum* et affecte le cerveau. Le parasite adhère aux parois des capillaires ce qui provoque un mauvais échange avec l'oxygène. Les enfants en sont le plus souvent touchés mais les femmes enceintes en zone d'endémie et les voyageurs sans immunité antipaludique peuvent également être atteints. Des troubles neurologiques de type troubles de la conscience et convulsions peuvent survenir, allant parfois même jusqu'au coma. Au départ, les symptômes sont de simples tremblements, des délires et une fièvre très élevée. Une hypoglycémie intense est également observable, surtout chez la femme enceinte.

II.4.2. Le paludisme de la femme enceinte

Chez la femme enceinte, l'infection du placenta par *P. falciparum* induit un poids faible du nourrisson, tout particulièrement quand il s'agit d'un premier accouchement. Dans les zones de transmission stable, la quantité de parasites présents dans les globules rouges est

¹⁰⁶ Kariu et al. *Mol. Microbiol.* **2006**, 59, 1369-1379.

¹⁰⁷ Akaki, M.; Dvorak, J.A. *J. Exp. Biol.* **2005**, 208, 3211-3218.

¹⁰⁸ Gardner et al. *Nature.* **2002**, 419, 498-511.

faible. Les femmes ne présentent alors pas de symptômes bien que des parasites soient présents dans la petite circulation sanguine du placenta. Dans les zones où la transmission est instable (zones d'hypo ou de mésoendémie), les femmes enceintes présentent des infections sévères : anémie, hypoglycémie et œdèmes des poumons. Des contractions prématurées, un avortement spontané ou une mortalité à l'accouchement peuvent survenir et souvent des retards de développement physique et intellectuel chez les enfants concernés. Le paludisme congénital touche environ 5 % des enfants nés de mères infectées.

II.5. Cycle érythrocytaire, digestion de l'hémoglobine et formation du pigment malarique

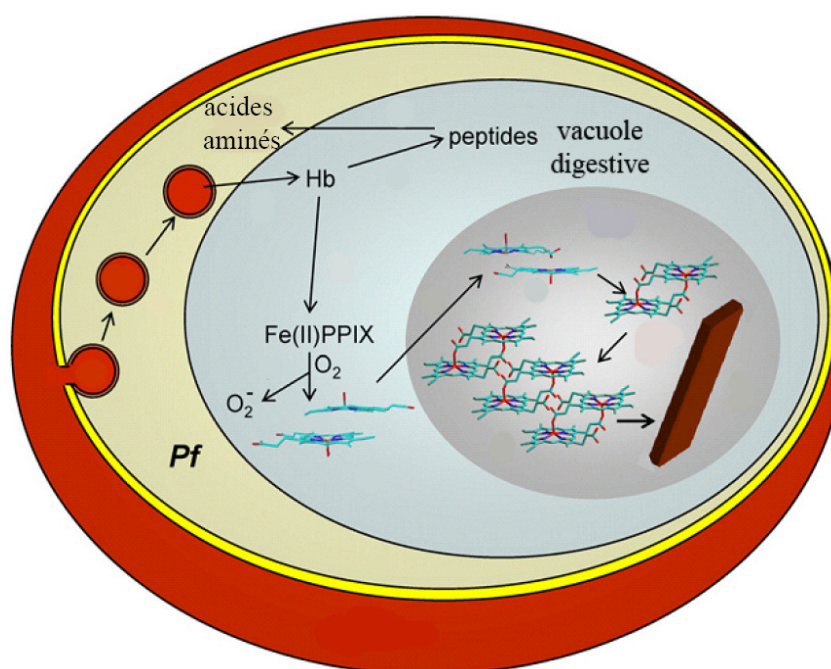


Figure 30 : Représentation schématique de l'ingestion et du catabolisme de l'hémoglobine chez *P. falciparum*.¹⁰⁹

Lors de la phase érythrocytaire, le parasite vit à l'intérieur des globules rouges de l'hôte. Le constituant majeur des globules rouges est l'hémoglobine et le parasite l'utilise comme sa principale source d'acides aminés.¹¹⁰ En effet, lors d'une infection par *Plasmodium falciparum*, environ 75 % de l'hémoglobine¹¹¹ sont digérés sous l'action combinée de différentes enzymes : deux aspartate protéases, les plasmepsines I, II et IV, les falcipaines 2 et 3 et une falcilysine (figure 30).^{112,113,114,115} Ces dernières clivent la protéine de l'hémoglobine

¹⁰⁹ Egan, T.J. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, 157, 127-136.

¹¹⁰ Aikawa, M et al. *J. Cell. Biol.* **1966**, 28, 355-373.

¹¹¹ Loria et al. *Biochem. J.* **1999**, 339, 363-370.

¹¹² Goldberg et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, 87, 2931-2935.

en peptides qui sont finalement hydrolysés en acides aminés dans le cytosol du parasite, probablement par des aminopeptidases.¹¹⁶ Des études récentes ont montré que seulement une petite quantité des acides aminés résultants est vraiment utilisée par le parasite pour la synthèse des protéines.¹¹⁷ Le but de cette dégradation d'hémoglobine n'est pas encore totalement compris. La digestion de l'hémoglobine serait principalement la source d'acides aminés et d'osmolytes du parasite et servirait également à faire de la place au parasite dans le globule rouge afin de favoriser sa croissance et sa division.¹¹⁸

Le parasite dans le globule rouge utilise des cytotomes, formés de l'invagination des membranes plasmique et vacuolaire du parasite, pour ingérer des petites portions d'hémoglobine du cytoplasme de l'hôte. Les vésicules formées contenant l'hémoglobine sont ensuite transportées vers la vacuole digestive avec laquelle ils fusionnent et où l'hémoglobine est digérée par les protéines.^{119,120} La caractérisation biochimique des cytotomes est difficile car ils sont difficilement isolables. De plus, il n'existe aucun marqueur spécifique de ces cytotomes qui permettrait de les identifier. Lazarus et *coll.* se sont donc basés sur les similarités entre le modèle de transport de l'hémoglobine existant et la voie endocytaire des eucaryotes^{112,121,122,123} pour mettre en évidence le rôle de l'actine dans le transport de l'hémoglobine vers la vacuole digestive (figure 31).¹²⁴ L'actine jouerait de multiples rôles importants dans le mécanisme de transport et les cytotomes semblent être essentiels pour la survie du parasite. Un nouveau modèle de transport indépendant des vésicules a également été établi. Elliot et *coll.* ont été plus loin dans le mécanisme d'ingestion et de transport de l'hémoglobine. Ils ont identifié par microscopie électronique et reconstitution tridimensionnelle, 4 processus d'ingestion de l'hémoglobine indépendants temporellement, morphologiquement et dont la sensibilité pharmacologique est spécifique.¹²⁵

¹¹³ Banerjee et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 990-995.

¹¹⁴ Rosenthal et al. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, 8, 1659-1672.

¹¹⁵ Eggleston, K.K.; Duffin, K.L.; Goldberg, D.E. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 32411-32417.

¹¹⁶ Gavigan, C.S.; Dalton, J.P.; Bell, A. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, 117, 37-48.

¹¹⁷ Krugliak, M.; Zhang, J.; Ginsburg, H. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, 119, 249-256.

¹¹⁸ Lew et al. *Blood*. **2003**, 101, 4189-4194.

¹¹⁹ Rosenthal, P.J.; Meshnick, S.R. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, 83, 131-139.

¹²⁰ Francis, S.E.; Sullivan, D.J. Jr.; Goldberg, D.E. *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, 51, 97-123.

¹²¹ Hoppe et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 2370-2378.

¹²² Langreth et al. *J. Protozool.* **1978**, 25, 443-452.

¹²³ Saliba et al. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 5605-5612.

¹²⁴ Lazarus, M.D.; Schneider, T.G.; Taraschi, T.F. *J. Cell Science*. **2008**, 121, 1937-1949.

¹²⁵ Elliott et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2008**, 105, 2463-2468.

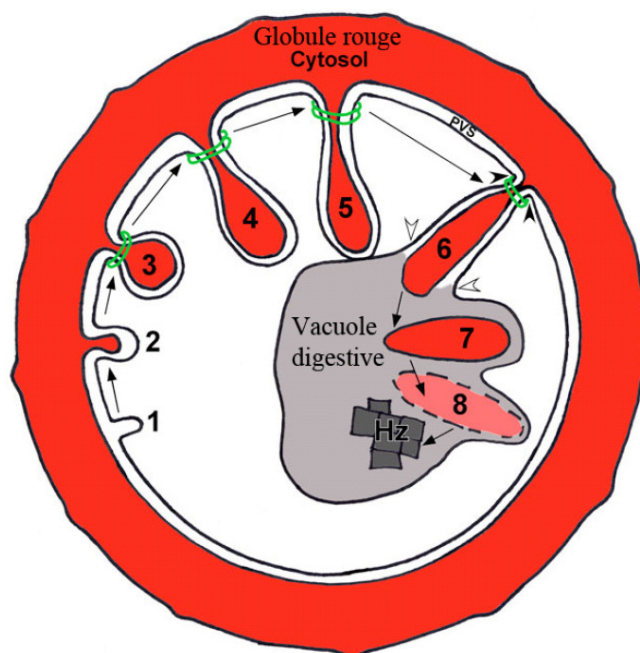


Figure 31 : Nouveau modèle de transport de l'hémoglobine vers la vacuole digestive du parasite proposé par Lazarus et coll.¹²⁴

Il est supposé que la dégradation de l'hémoglobine hôte se déroulerait dans un compartiment acide spécialisé du parasite appelé vacuole digestive.¹²⁶ Cependant, une autre hypothèse suggère que ce processus de dégradation s'effectuerait dans les vésicules cytotomales acides qui transportent le cytoplasme des globules rouges dans la vacuole digestive.^{127,128,129} D'autres auteurs suggèrent que la digestion de l'hémoglobine a lieu uniquement après que la membrane externe des vésicules cytotomales ait fusionné avec la membrane de la vacuole digestive et que les vésicules contenant l'hémoglobine soient libérées dans la vacuole digestive.¹²⁶ La membrane est supposée être dégradée par des phospholipases de telle sorte que l'hémoglobine puisse être digérée par les protéases de la vacuole digestive.¹³⁰

Lors du processus de dégradation de l'hémoglobine de l'hème est libéré. *P. falciparum* est dépourvu de l'hème oxygénase nécessaire pour dégrader de manière enzymatique l'hème.¹³¹ Chez *P. falciparum*, l'hème (FeII) serait oxydé en ferriprotophyrine IX (Fe(III)PPIX) appelée également hématine (FeIII) par le dioxygène et incorporé dans un

¹²⁶ Olliaro, P.L.; Goldberg, D.E. *Parasitol. Today*. **1995**, *11*, 294-297.

¹²⁷ Slomianny, C. *Blood Cells*. **1990**, *16*, 369-378.

¹²⁸ Hempelmann et al. *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 23-26.

¹²⁹ Goldberg, D.E. *Semin. Cell Biol.* **1993**, *4*, 355-361.

¹³⁰ Slomianny, C.; Prensier, G. *J. Protozool.* **1990**, *37*, 465-470.

¹³¹ Eckman et al. *J. Lab. Clin. Med.* **1977**, *90*, 767-770.

microcristal : l'hémozoïne ou encore pigment malarique.¹³² En effet, l'hématine est connue comme étant toxique pour les microorganismes.¹³³ Elle pourrait perturber les membranes, inhiber les processus enzymatiques et initier des dommages oxydatifs chez le parasite.¹³⁴ La formation de l'hémozoïne apparaît donc comme étant un mécanisme de détoxification pour le parasite. Des arguments de Pagola et *coll.* sous-entendent que la vacuole digestive du parasite pourrait contenir plus de 80 mM d'hématine lorsque celle-ci est totalement dissoute.¹³⁵ Ce taux excédant la limite de solubilité de l'hématine, une partie de l'hématine est supposée migrer vers les membranes étant donné sa nature lipophile. En convertissant l'hématine en hémozoïne, le parasite limite de manière continue la concentration en hématine de la vacuole digestive. Des études avaient proposé que la majorité de l'hème dérivée de l'hémoglobine n'était pas incorporée dans l'hémozoïne mais plutôt dégradée chimiquement (80 %) avec libération de fer.^{111,136} Il a néanmoins été montré qu'une proportion importante d'hème est en effet incorporée dans l'hémozoïne.¹³⁷ A la fin du cycle intraérythrocytaire, il semblerait que plus de 80-90 % de l'hème se localiseraient dans la vacuole digestive du parasite et 95 % de cet hème seraient convertis en hémozoïne.¹³⁷ Après éclatement des érythrocytes, l'hémozoïne serait libérée et ingérée par des cellules phagocytaires dans le sang périphérique et la rate.¹³⁸

Le mécanisme impliqué dans la formation de l'hémozoïne n'est pas encore bien compris. Il a été supposé qu'une protéine riche en histidine (HRP = histidine rich protein) initierait ou catalyserait la formation d'hémozoïne¹³⁹ mais cette protéine est peu présente sur le site de formation de l'hémozoïne dans la vacuole digestive.¹⁴⁰ De plus, aucune présence des gènes codant pour HRP2 et HRP3 dont le rôle dans la formation d'hémozoïne a été mis en évidence *in vivo*,^{141,142} n'a été observée chez *P. vivax* et *P. berghei*.¹⁴³ L'implication d'une hème polymérase a également été évoquée^{144,145} mais différentes études montrent que des lipides pourraient être impliqués dans la formation de l'hémozoïne *in vivo*.^{146,147,148,149,150} Cette

¹³² Brown, W. H. *J. Exp. Med.* **1911**, 13, 290-300.

¹³³ Ladan, H.; Nitzan, Y.; Malik, Z. *FEMS Microbiol. Lett.* **1993**, 112, 173-178.

¹³⁴ Becker et al. *Int. J. Parasitol.* **2004**, 34, 163-189.

¹³⁵ Pagola et al. *Nature*. **2000**, 404, 307-310.

¹³⁶ Ginsburg et al. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 56, 1305-1313.

¹³⁷ Egan et al. *Biochem. J.* **2002**, 365, 343-347.

¹³⁸ Day et al. *Blood*. **1996**, 88, 4694-700.

¹³⁹ Sullivan et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1996**, 93, 11865-11870.

¹⁴⁰ Papalexis et al. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, 115, 77-86.

¹⁴¹ Sullivan, D.J.; Gluzman, I.Y.; Goldberg, D.E. *Science*. **1996**, 271, 219-222.

¹⁴² Choi et al. *Biochemistry*. **1999**, 38, 16916-16924.

¹⁴³ Sullivan, D.J. *Int. J. Parasitol.* **2002**, 32, 1645-1653.

¹⁴⁴ Slater et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1991**, 88, 325-329.

¹⁴⁵ Bohle et al. *J. Biol. Chem.* **1996**, 272, 713-716.

¹⁴⁶ Bendrat, K.; Berger, B.J.; Cerami, A. *Nature*. **1995**, 378, 138.

dernière hypothèse semble très probablement être la base du processus biologique. En effet, Jackson et coll. ont utilisé un marqueur hydrophobe fluorescent pour observer les corps lipidiques associés à la vacuole digestive du parasite.¹⁵¹ Des études de microscopie électronique chez *Schistosoma mansoni* et *Rhodnius prolixus* indiquent clairement que le cristal d'hémozoïne croît à l'interface eau/lipide.¹⁵² Pisciotta et coll. ont montré également que la formation d'hémozoïne s'effectuait dans des nanosphères lipidiques dans la vacuole digestive de *P. falciparum*.¹⁵³ Enfin, de récentes études proposent un mécanisme de formation de l'hémozoïne et montrent que celle-ci serait facilitée aux interfaces eau/lipide.¹⁵⁴ *In vitro*, la croissance de la β -hématine, équivalent chimique de l'hémozoïne, dans des conditions biomimétiques indique que ce solide cristallin se forme de manière très efficace dans un environnement lipidique, surtout lorsque Fe(III)PPIX est directement introduit près ou à l'interface eau/lipide.¹⁵⁴ La vitesse de formation suggère que l'interface eau/lipide est probablement suffisante pour provoquer la formation d'hémozoïne *in vivo*. En effet, il est supposé que les corps lipidiques sont produits par le parasite spécifiquement pour la détoxification de l'hème par formation d'hémozoïne. Des études de modélisation suggèrent que la faible constante diélectrique de l'environnement lipidique favorise la formation du cristal.^{155,156}

La nature chimique et structurale de l'hémozoïne a été déterminée il y a une dizaine d'années.¹³³ Auparavant, on pensait que l'hémozoïne était un polymère de l'hématine mais sa détermination structurale par l'équipe de Pagola, a permis de déterminer que l'unité de base de l'hémozoïne est en fait un dimère. Les molécules de Fe(III)PPIX sont liées deux à deux par des liaisons de coordination entre le groupement propionate de l'une et le centre Fe(III) de l'autre. Des liaisons hydrogène entre les acides propioniques, lient les unités dimériques entre-elles dans le cristal (figure 32).¹⁵⁷ L'hémozoïne est chimiquement et structurellement identique à l'hématine de synthèse : la β -hématine.¹⁴⁵ La formation de l'hémozoïne apparaît

¹⁴⁷ Dorn et al. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 55, 737-747.

¹⁴⁸ Fitch et al. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, 1454, 31-37.

¹⁴⁹ Coppens, I.; Vielemeyer, O. *Int. J. Parasitol.* **2005**, 35, 597-615.

¹⁵⁰ Soares, J.B.R.C. et al. *FEBS Lett.* **2007**, 581, 1742-1750.

¹⁵¹ Jackson et al. *Mol. Microbiol.* **2004**, 54, 109-122.

¹⁵² Oliveira et al. *FEBS Lett.* **2005**, 579, 6010-6016.

¹⁵³ Pisciotta et al. *Biochem. J.* **2007**, 402, 197-204.

¹⁵⁴ Egan et al. *FEBS Lett.* **2006**, 580, 5105-5110.

¹⁵⁵ Corrêa Soares et al. *FEBS Lett.* **2007**, 581, 1742-1750.

¹⁵⁶ Egan, T.J. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, 102, 1288-1299.

¹⁵⁷ Hempelmann, E.; Egan, T.J. *Trends Parasitol.* **2002**, 18, 11.

donc comme étant un processus de biominéralisation.^{158,159} La taille des cristaux d'hémozoïne est approximativement de $1\ \mu\text{m} \times 0,4\ \mu\text{m} \times 0,2\ \mu\text{m}$ ¹⁶⁰ et environ 3 à 5 cristaux sont produits par parasite¹⁶¹ ce qui représente une quantité d'hémozoïne produite par cycle érythrocytaire entre 0,2 à 2,0 g chez une personne dont la parasitémie est de 1-10 %.¹⁶² Il est à noter que la forme et la taille des cristaux sont différentes suivant l'espèce de *Plasmodium*.¹⁶¹

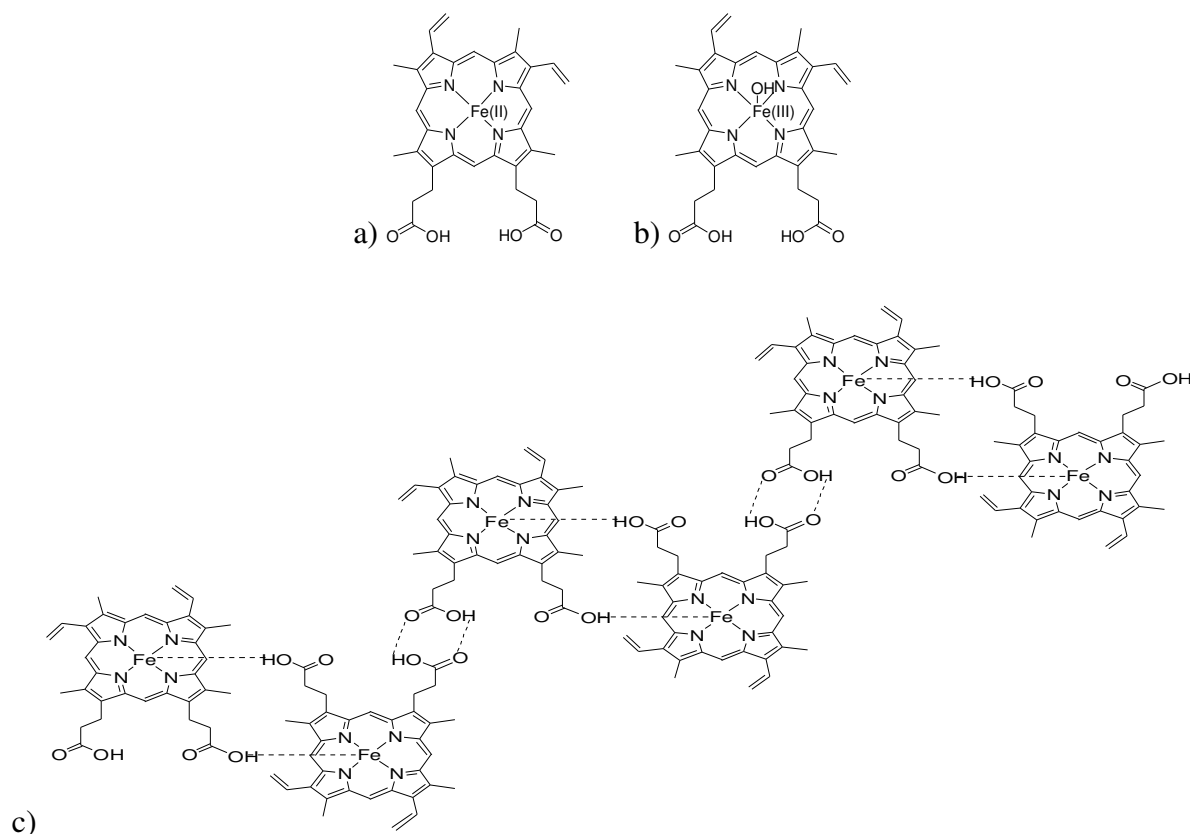


Figure 32 : Structures chimiques de l'hème (a), de l'hématine (b) et de l'hémozoïne (c).

L'hémozoïne est l'un des facteurs impliqués dans l'immunopathologie du paludisme mais on ne connaît pas son rôle exact.¹⁶³ La détection de l'hémozoïne dans le sang de la personne parasitée est un moyen de diagnostiquer le paludisme. L'hémozoïne est biréfringente et paramagnétique,¹⁶⁴ ces propriétés permettent sa détection au microscope polarisant dans les leucocytes et les érythrocytes parasités.^{165,166} La microscopie électronique

¹⁵⁸ Ziegler, J.; Chang, R.T.; Wright, D.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2395-2400.

¹⁵⁹ Egan, T.J.; Mavuso, W.W.; Ncokazi, K.K. *Biochemistry*. **2001**, *40*, 204-213.

¹⁶⁰ Egan, T.J.; Hempelmann, E.; Mavuso, W.W. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *73*, 101-107.

¹⁶¹ Noland, G.S.; Briones, N.; Sullivan, D.J. Jr. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *130*, 91-99.

¹⁶² Omodeo-Sale et al. *Eur. J. Haematol.* **2005**, *74*, 324-332.

¹⁶³ Hänscheid, T.; Egan, T.J.; Grobusch, M.P. *Lancet. Infect. Dis.* **2007**, *7*, 675-685.

¹⁶⁴ Paul et al. *Lancet*. **1981**, *2*, 70-71.

¹⁶⁵ Packer, H. *J. Natl. Malar. Soc.* **1945**, *4*, 330-340.

¹⁶⁶ Lawrence, C. *Lancet*. **2002**, *353*, 1852.

à fond noir¹⁶⁷ ainsi que la spectrométrie LDMS (« laser desorption mass spectrometry »)^{168,169} sont des techniques qui peuvent également être utilisées pour le diagnostic du paludisme.

Le parasite posséderait également d'autres processus de détoxification de l'hème. Par exemple, le groupe de Loria a suggéré qu'une destruction peroxidative de la Fe(III)PPIX pourrait se produire grâce au peroxyde d'hydrogène formé dans la vacuole digestive.¹¹¹ Une dégradation de l'hème par le glutathion (GSH) en dehors de la vacuole digestive est également envisagée par l'équipe de Ginsburg.¹³⁶ La petite quantité d'hème libérée dans le cytosol serait rapidement réduite par le milieu réducteur incluant le GSH. L'hème pourrait alors être impliquée dans une réaction de Fenton qui participe à la destruction de la protoporphyrine du fait de la formation de radicaux hydroxyles. Le GSH interviendrait de manière indirecte dans le processus de dégradation de l'hème dans le cytosol (via la réaction de Fenton) par redox-cycling de l'hème oxydé (Fe³⁺) en hème réduit (Fe²⁺).¹⁷⁰ L'équipe d'Harwaldt, quant à elle, suppose que la Fe(III)PPIX se fixerait sur la glutathion transférase du parasite.¹⁷¹ Tous ces processus de détoxification ne représenteraient qu'un faible pourcentage étant donné que 98 % du fer contenu dans le parasite se trouve dans le pigment malarique.¹³⁷

II.6. Les principaux antipaludiques

Les principaux antipaludiques peuvent être classés en fonction de leur mode d'action : les schizonticides, les inhibiteurs d'acides nucléiques et les gamétocytocides (table 33). Les schizonticides agissent sur la forme érythrocytaire asexuée de tous les *Plasmodium*. Ils regroupent les dérivés quinoléiques et les dérivés de l'ART. Les inhibiteurs des acides nucléiques agissent à la fois sur les stades érythrocytaires et sur les stades hépatiques. Ils regroupent les antimétabolites et les bloqueurs mitochondriaux. Les gamétocytocides agissent spécifiquement sur les stades sexués. Certains sont également actifs sur les stades hépatiques. Ils inhibent la transformation des gamétocytes en gamètes lors du cycle sporogonique. Les gamétocytocides sont généralement des amino-8-quinoléines ou des dérivés de l'ART.

¹⁶⁷ Jamjoom, G.A. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1991**, 85, 38-39.

¹⁶⁸ Scholl et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, 71, 546-551.

¹⁶⁹ Nyunt et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, 73, 485-490.

¹⁷⁰ Atamna, H.; Ginsburg, H. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 24876-24883.

¹⁷¹ Harwaldt, P.; Rahlfs, S.; Becker, K. *Biol Chem.* **2002**, 383, 821-830.

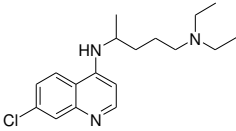
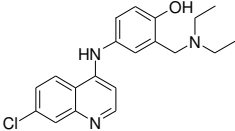
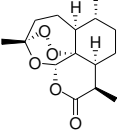
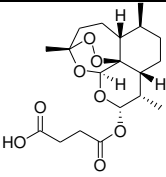
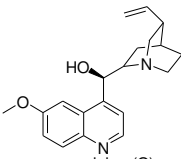
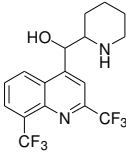
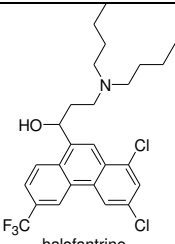
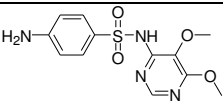
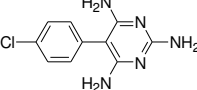
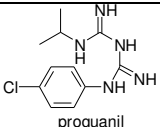
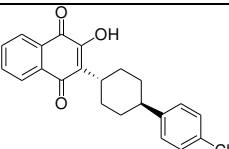
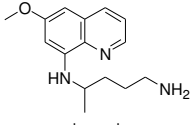
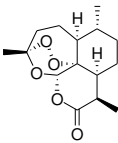
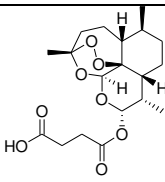
SCHIZONTICIDES			
Amino-4-quinoléines		Dérivés de l'artémisinine	
	chloroquine (CQ)		amodiaquine (AQ)
	artémisinine (ART)		artésunate (ARS)
Arylaminoalcools			
	quinine (Q)		méfloquine (MF)
			halofantrine
INHIBITEURS DES ACIDES NUCLEIQUES			
Antimétabolites			
	sulfadoxine		pyriméthamine
			proguanil
Bloqueurs mitochondriaux			
			atovaquone
GAMETOCYTOCIDES			
Amino-8-quinoléines		Dérivés de l'artémisinine	
	primaquine		artémisinine (ART)
			artésunate (ARS)

Table 33 : Les principaux antipaludiques.

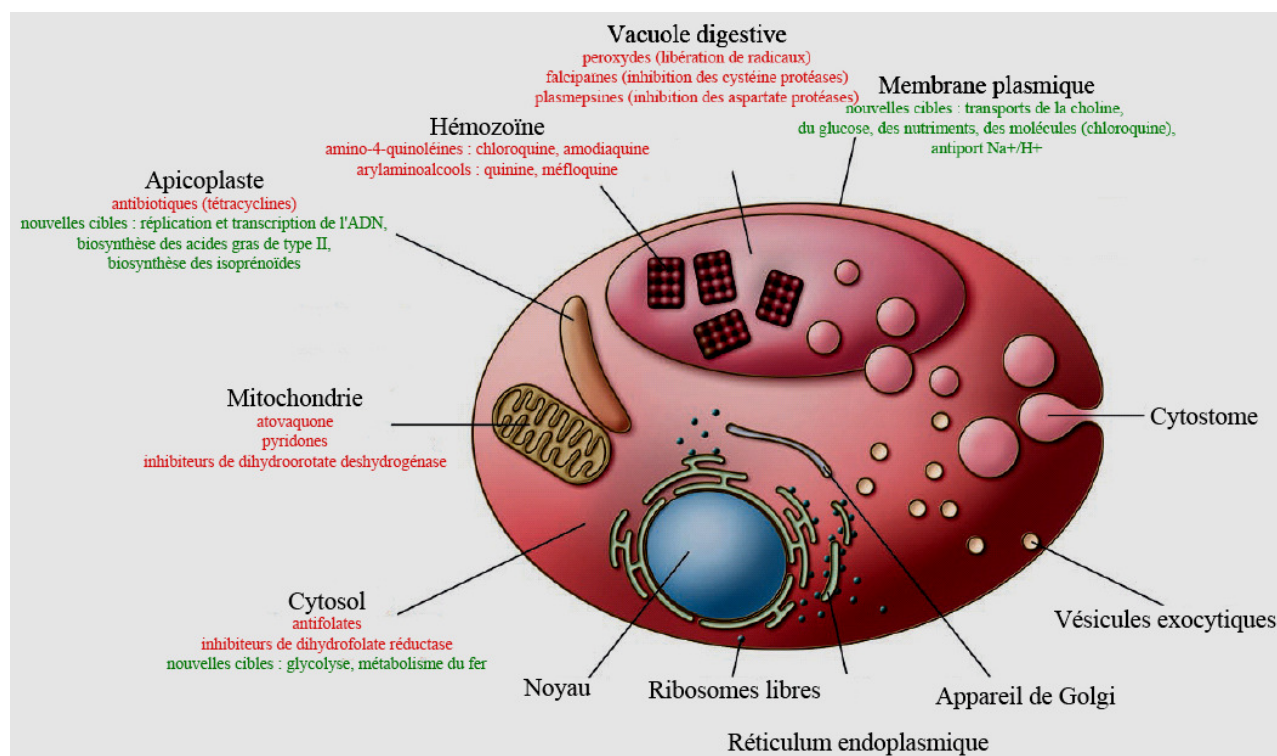


Figure 34 : Cibles potentielles identifiées chez *P. falciparum*.¹⁰¹

De manière générale, les antipaludiques agissent en perturbant les processus biologiques ou les voies métaboliques dans les différents compartiments du parasite (figure 34). Les amino-4-quinoléines (ex : CQ, amodiaquine (AQ)) et les arylaminoalcools (ex : Q et MF) se concentrent dans la vacuole digestive du parasite où ils sont supposés inhiber la formation d'hémozoïne et interférer avec la détoxification de l'hème. Les inhibiteurs de falcipaine, qui sont actuellement en développement, ciblent les cystéine protéases qui participent à la dégradation de l'hémoglobine dans la vacuole digestive. Le bleu de méthylène interfère avec l'hémoglobine et le métabolisme de l'hème dans la vacuole digestive. Il a aussi récemment été montré que le bleu de méthylène était non seulement un inhibiteur sélectif des dissulfures réductases mais également un substrat agissant comme un redox-cycling des dissulfures réductases.¹⁷² Les antibiotiques comme l'azithromycine, la doxycycline et la clindamycine agissent au niveau de l'apicoplaste où ils inhibent la traduction des protéines, ce qui conduit à la mort du parasite. L'atovaquone, quant à elle, inhibe le transport d'électrons dans la mitochondrie alors que les antifolates perturbent la biosynthèse *de novo* du folate dans le cytosol. Les connaissances acquises sur le mécanisme d'action des antipaludiques ainsi que

¹⁷² Buchholz et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 183-191.

sur le cycle de développement du parasite devraient permettre de découvrir de nouvelles molécules actives. Les cibles potentielles sont résumées à la figure 34.^{173,174}

Dans ce paragraphe, nous n'évoquerons que les principaux antipaludiques quinoléiques ainsi que les dérivés de l'ART.

II.6.1. La chloroquine et les amino-4-quinoléines

La CQ est l'une des plus anciennes molécules antipaludiques de synthèse dont la première utilisation date des années 40, peu de temps après la seconde guerre mondiale. Elle fût synthétisée pour la première fois en 1934 en Allemagne par la société Bayer.¹⁷⁵ Elle présente de nombreux avantages, notamment un faible coût et peu d'effets secondaires (toxicité uniquement en cas de surdosage) et peut être utilisée aussi bien en prophylaxie qu'en chimiothérapie. Elle était à l'origine efficace sur toutes les formes de paludisme mais, malheureusement, *P. falciparum* a développé une résistance à la CQ. Apparue à la fin des années 50 en Thaïlande et en Colombie, la résistance a rapidement gagné presque toutes les régions où sévit *P. falciparum*. Une résistance à la CQ chez *P. vivax* est également apparue à la fin des années 80 en Nouvelle Guinée mais elle se propage moins vite.^{176,177}

a) Mécanisme d'action

A l'heure actuelle, le mécanisme d'action de la CQ n'est pas encore bien connu. De nombreuses hypothèses ont été évoquées. Une des hypothèses abandonnées aujourd'hui, suggérait que la CQ s'intercale dans l'hélice de l'ADN,¹⁷⁸ l'empêchant ainsi de se répliquer et conduisant à la mort du parasite (voir chapitre III). Cette interaction avec l'ADN étant observable uniquement à de fortes concentrations en CQ, supérieures à la dose active, cette hypothèse a été rapidement réfutée d'autant plus que la CQ est connue pour s'accumuler dans la vacuole digestive et non dans le noyau.

L'activité antipaludique des quinoléines est principalement due à leur accumulation dans les érythrocytes infectés.^{179,180} En effet, les quinoléines ont des propriétés de base faible

¹⁷³ Danis, M. *Med. Trop.* **2003**, 63, 267-270.

¹⁷⁴ Pradines, B.; Vial, H.; Oliaro, P. *Med. Trop.* **2003**, 63, 79-98.

¹⁷⁵ Coatney, G.R. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1963**, 12, 121-128.

¹⁷⁶ Baird, J.K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 4075-4083.

¹⁷⁷ Wernsdorfer, W.H. *Parasitol. Today.* **1991**, 7, 297-303.

¹⁷⁸ Cohen, S. N.; Yielding, K. L. *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 3123-3131.

¹⁷⁹ Pradines et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 2061-2068.

¹⁸⁰ Schlesinger, P.H.; Krogstad, D.J.; Herwaldt, B.L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, 32, 793-798.

qui leur permettent de s'accumuler dans la vacuole digestive par diffusion en raison de la différence de pH entre la vacuole digestive (pH supposé à 5,2) et le cytosol (pH supposé à 7,4) du parasite. Une fois dans la vacuole digestive, il leur est impossible d'en sortir par simple diffusion car ces molécules sont protonées.

L'accumulation de la CQ dans la vacuole digestive montre une grande spécificité structurale suggérant la participation d'un transporteur perméase spécifique.¹⁸¹ Le passage passif du milieu extérieur vers l'intérieur du parasite pourrait être facilité par un transporteur membranaire comme Pgh1 ou PfCRT.¹⁸² Wunsch et coll. suggèrent que le transporteur serait un échangeur Na^+/H^+ .^{183,184} L'accumulation de CQ peut être inhibée de manière compétitive par des inhibiteurs spécifiques de ce transporteur mettant ainsi en évidence le transport de CQ par cet échangeur. La CQ stimulerait cet échangeur chez les clones CQ-sensibles et la pénétration de CQ chez les clones CQ-résistants ne serait pas favorisée. Bray et coll. ont mis en évidence que l'accumulation de CQ chez *P. falciparum* serait liée à sa séquestration par interaction avec l'hème et non à une stimulation de l'échangeur Na^+/H^+ .¹⁸⁵ En effet, des inhibiteurs de protéase spécifiques, capables de bloquer la dégradation de l'hémoglobine et de stopper la libération d'hème, inhibent également l'accumulation de CQ.

Le mécanisme exact de l'action antipaludique de la CQ n'est pas totalement élucidé. Comme nous l'avons vu au paragraphe II.5., le parasite se débarrasse de l'hématine toxique, libérée lors de la dégradation de l'hémoglobine, en formant de l'hémozoïne non toxique. Dans la vacuole digestive, les quinoléines interagissent avec l'hématine ce qui bloquerait le processus de formation de l'hémozoïne suivant un mécanisme encore en discussion dans ses détails.¹⁸⁶ Cette interaction a été démontrée grâce à différentes approches biophysiques mais son mécanisme n'est pas encore bien connu à l'heure actuelle. Différentes hypothèses ont été formulées :

1. D'après une étude de RMN ^1H , Moreau et coll. suggèrent que le noyau quinoléique de la CQ s'intercale entre deux dimères μ -oxo.¹⁸⁷

¹⁸¹ Bray et al. *Mol. Pharmacol.* **1998**, 54, 170-179.

¹⁸² Fidock et al. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, 110, 1-10.

¹⁸³ Sanchez, C.P.; Wunsch, S.; Lanzer, M. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 2652-2658.

¹⁸⁴ Wunsch et al. *J. Cell. Biol.* **1998**, 140, 335-345.

¹⁸⁵ Bray et al. *J. Cell. Biol.* **1999**, 145, 363-376.

¹⁸⁶ Egan, T.J. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 100, 916-26.

¹⁸⁷ Moreau, S.; Perly, B.; Biguet, J. *Biochimie.* **1982**, 64, 1015-1025.

2. Constantinidis et Satterlee pensent que les amino-4-quinoléines s'intercalent entre deux molécules Fe(III)PPIX.¹⁸⁸
3. Egan et *coll.* ont suggéré que l' amino-4-quinoléine rompt le dimère Fe(III)PPIX pour former un complexe Fe(III)PPIX-quinoléine,¹⁸⁹ complexe supposé très toxique pour le parasite qui provoquerait la lyse de la cellule et la mort du parasite.
4. D'après Dascombe et *coll.*, la quinoléine interagirait avec la face liante de la protoporphyrine au niveau de l'amine en position 1.¹⁹⁰
5. D'après Egan et Sullivan, la chimioadsorption des amino-4-quinoléines sur l'hémozoïne cristallisée conduirait à l'inhibition de l'aggrégation ultérieure d'autres unités de Fe(III)PPIX. En effet, les amino-4-quinoléines réduisent la vitesse de croissance des cristaux de β -hématine¹⁹¹ et influencent ainsi leur morphologie.¹⁹²
6. Finalement, de Villers et Egan supposent que la molécule active induit la formation de dimères μ -oxo.¹⁹³

Il est supposé que l'accumulation des quinoléines dans la vacuole digestive modifierait le pH vacuolaire, maintenu acide par une pompe à protons ATP-dépendante, ce qui perturberait le métabolisme vacuolaire. L'activité des protéases acides vacuolaires serait alors inhibée et le parasite ne pourrait plus digérer l'hémoglobine et cristalliser l'hème (action lysosomotrope). D'ailleurs, il a longtemps été supposé que le pH vacuolaire était plus acide chez les clones CQ-sensibles que chez les clones CQ-résistants.¹⁹⁴ L'hème libre présent dans la vacuole digestive est moins soluble à pH acide ce qui empêcherait l'interaction de la CQ avec l'hématine chez les clones CQ-résistants.¹⁹⁵ La cristallisation en hémozoïne s'effectuant à des pH inférieurs à 5,5, serait alors favorisée. Cependant, de récentes études montrent qu'aucune différence de pH entre les clones CQ-sensibles et CQ-résistants ne peut être observée.¹⁹⁶

¹⁸⁸ Constantinidis, I.; Satterlee, J.D. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4391-4395.

¹⁸⁹ Egan et al. *J. Inorg. Biochem.* **1997**, *68*, 137-145.

¹⁹⁰ Dascombe et al. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5423-5436.

¹⁹¹ Chong, C.R.; Sullivan, D.J. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 2201-2212.

¹⁹² Egan, T.J.; Ncokazi, K.K. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1532-1539.

¹⁹³ de Villiers et al. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 101-117.

¹⁹⁴ Ursos, L.M.; Dzekunov, S.M.; Roepe, P.D. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *110*, 125-134.

¹⁹⁵ Ursos, L.M.; DuBay, K.F.; Roepe, P.D. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *112*, 11-17.

¹⁹⁶ Klonis et al. *Biochem. J.* **2007**, *407*, 343-354.

Les quinoléines pourraient aussi interférer avec le transport intracellulaire, le transport des vésicules d'endocytose contenant l'hémoglobine vers la vacuole digestive¹²¹ ou celui des enzymes lysosomales comme les protéases vers la vacuole digestive.¹⁹⁷

b) Mécanisme de résistance

Le développement de la résistance à la CQ est dû principalement à deux facteurs : une demi-vie assez longue de la drogue¹⁹⁸ et une utilisation massive en prophylaxie, mais souvent mal conduite, conduisant à une pression médicamenteuse insuffisante, qui a permis la sélection de parasites résistants. La CQ s'accumule moins chez le parasite résistant.^{199,200} Ce phénomène pourrait être expliqué par deux hypothèses : (1) l'entrée de la molécule dans les érythrocytes parasités serait inhibée, (2) la molécule serait expulsée de la vacuole digestive. Chez le parasite résistant, différents gènes mutés ont été identifiés. Toutes ces mutations semblent intervenir simultanément dans un mécanisme complexe de résistance.

Dans un premier temps, un mécanisme d'efflux de la CQ a été identifié.²⁰¹ Chez les parasites résistants, la CQ sort plus vite que chez les parasites sensibles. Ce phénomène est entravé par le vérapamil, qui restaure la sensibilité à la CQ. Cette observation a conduit à rechercher une protéine de transport analogue à celles connues chez les cellules cancéreuses (mdr : multidrug resistance). Une protéine originellement peu exprimée ou non fonctionnelle pour le transport de la CQ chez le parasite sensible, serait surexprimée, activée ou mutée chez le parasite résistant et provoquerait l'efflux de la drogue hors du parasite. Deux gènes codant pour des glycoprotéines ATP-dépendantes ont été identifiés chez *P. falciparum* : *pfmdr1* (*Plasmodium falciparum* multi drug resistant) codant pour la protéine Pgh1 (P-glycoprotéine homologue 1, transporteur ATP) et *pfmdr2*. Le gène *pfmdr1* présente des mutations chez de nombreux clones et isolats résistants à la CQ.²⁰² La corrélation entre les mutations et la résistance n'est pas systématiquement vérifiée.²⁰³ Il a été montré que la seule implication du gène *pfmdr1* n'était pas suffisante au développement de la résistance à la CQ.^{204,205} Une récente analyse complète du génome a révélé qu'un gène de récepteur nucléaire serait à

¹⁹⁷ Gluzman et al. *J. Clin. Invest.* **1994**, 93, 1602-1608.

¹⁹⁸ White, N.J. *Drug Res. Updates.* **1998**, 1, 3-9.

¹⁹⁹ Macomber, P.B.; O'Brien, R.L.; Hahn, F.E. *Science.* **1966**, 152, 1374-1375.

²⁰⁰ Verdier et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, 27, 561-564.

²⁰¹ Krogstad et al. *Science.* **1987**, 238, 1283-1285.

²⁰² Foote et al. *Nature.* **1990**, 345, 255-258.

²⁰³ Dorsey et al. *J. Infect. Dis.* **2001**, 183, 1417-1420.

²⁰⁴ Reed et al. *Nature.* **2000**, 403, 906-909.

²⁰⁵ Duraisingh et al. *Mol. Microbiol.* **2000**, 36, 955-961.

l'origine de la surexpression de Pgh1 et constituerait un mécanisme de régulation génétique chez *P. falciparum*.²⁰⁶ En revanche, la présence de multiples copies du gène *pfmdr1* a été associée à la résistance à la MF. Des expériences de transfections ont également montré que des mutations ponctuelles de *pfmdr1* étaient associées à des modifications de sensibilité à la MF, l'halofantrine et l'ART.²⁰⁵

Plus tard, un autre gène a été proposé également dans le mécanisme de résistance à la CQ : le gène *cg2* codant pour la protéine CG2.²⁰⁷ Cette protéine se situe au niveau de la membrane de la vacuole digestive du parasite et serait impliquée dans des phénomènes de transport. Tout comme pour *pfmdr1*, le gène *cg2* n'est pas responsable de la résistance à la CQ. En effet, le phénotype supposé être associé à la résistance a été retrouvé sur un clone CQ-sensible.²⁰⁸ D'ailleurs, de récentes expériences de transfection chez *P. falciparum* semblent écarter le rôle du gène *cg2* dans le mécanisme de résistance.¹⁸¹

Suite à de nombreux travaux, un gène *pfcr1* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistant transporter) a été identifié, cloné et séquencé.^{209,210} Ce gène code pour une protéine de 424 acides aminés, la PfCRT, localisée dans la membrane de la vacuole digestive.²¹¹ La mutation K76T semble être à l'origine de cette résistance à la CQ mais elle est toujours associée à d'autres mutations. Cette mutation consiste en un remplacement de la lysine 76 chargée positivement (groupement NH_3^+) par une thréonine neutre. Ce gène permettrait un efflux plus important de la CQ hors de la vacuole digestive chez les parasites résistants.²¹² Le mode d'action de la protéine PfCRT n'est pas encore bien compris mais des manipulations génétiques sur le taux d'expression de PfCRT sur des clones CQ-résistants semblent associer l'augmentation de la sensibilité à la CQ à une diminution de transport de la drogue par PfCRT.²¹³ La protéine présente certaines propriétés d'un canal chlore.^{214,215,216} La protéine mutée diminuerait le pH vacuolaire parasitaire^{217,218} ce qui favoriserait la formation

²⁰⁶ Johnson et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 1438-1445.

²⁰⁷ Su et al. *Cell.* **1997**, 91, 593-603.

²⁰⁸ Ridley, R.G. *Curr. Biol.* **1998**, 8, R346-349.

²⁰⁹ Fidock et al. *Mol. Cell.* **2000**, 6, 861-871.

²¹⁰ Wellem, T.E.; Plowe, C.V. *J. Infect. Dis.* **2001**, 184, 770-776.

²¹¹ Cooper et al. *Mol. Pharmacol.* **2002**, 61, 35-42.

²¹² Sanchez et al. *Biochemistry.* **2004**, 43, 16365-16373.

²¹³ Waller et al. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 33593-33601.

²¹⁴ Dutzler et al. *Nature.* **2002**, 415, 287-294.

²¹⁵ Zhang, H.; Howard, E.M.; Roepe, P.D. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 49767-49775.

²¹⁶ Warhurst, D.C. *Malar. J.* **2003**, 2, 31.

²¹⁷ Dzekunov, S.M.; Ursos, L.M.; Roepe, P.D. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, 110, 107-124.

²¹⁸ Bennett et al. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, 133, 99-114.

d'hémozoïne mais de récents travaux montrent que la diminution du pH par la protéine ne serait qu'un phénomène minime face à son rôle de transporteur²¹⁹ d'autant plus qu'il a été montré par Klonis et coll. que le pH des clones CQ-sensibles et CQ-résistants n'était pas différents.¹⁹⁶ Warhurst a proposé qu'il existerait une interaction électrostatique entre le groupement NH_3^+ de la lysine du transporteur non muté et la CQ diprotonée (CQH_2^{2+}) du fait du pH acide de la vacuole digestive. Cette répulsion électrostatique permettrait le maintien de la CQ dans la vacuole digestive. La mutation de la lysine chargée en thréonine neutre sur le transporteur muté empêcherait la répulsion électrostatique, l'efflux de la CQ hors de la vacuole digestive serait par conséquent favorisé (voir chapitre IV).²¹⁶ De nombreuses études montrent que la mutation K76T est associée à la résistance à la CQ.^{220,221} La mutation K76T de la protéine *PfCRT* n'est pas seule en cause dans l'expression de la résistance, elle est toujours associée à d'autres mutations.²²²

Le glutathion (GSH) pourrait également jouer un rôle dans la résistance à la CQ (voir chapitre III). En effet, il a été montré que le taux de GSH était plus important chez les clones CQ-résistants de *P. berghei* et *P. falciparum*.^{223,224,225} Des travaux ont suggéré que la ferroprotoporphyrine IX pouvait être dégradée en présence de glutathion réduit²²⁶ et cette réaction est inhibée de façon compétitive par la CQ et l'AQ.²²⁵ La résistance à la CQ pourrait être liée à une augmentation du taux de glutathion réduit intracellulaire. Une augmentation de l'expression de la γ -glutamyl cystéine synthétase provoque la résistance chez *P. berghei*²²⁷ mais pas chez *P. chabaudi*.²²⁸ La résistance à la CQ a été associée à l'augmentation de l'activité de la glutathion *S*-transférase.^{229,230,231} Toutefois, des résultats contradictoires ont été obtenus : l'inhibition de la glutathion réductase,²³² une inhibition de la synthèse du GSH²³³ ou

²¹⁹ Hayward, R.; Saliba, K.J.; Kirk, K. *J. Cell. Sci.* **2006**, *119*, 1016-1025.

²²⁰ Djimdé et al. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 257-263.

²²¹ Durand et al. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *114*, 95-102.

²²² Durrand et al. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, *136*, 273-285.

²²³ Dubois et al. *Exp. Parasitol.* **1995**, *81*, 117-124.

²²⁴ Platel, D.F.; Mangou, F.; Tribouley-Duret, J. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1999**, *98*, 215-223.

²²⁵ Ginsburg, H.; Golenser, J. *Redox Rep.* **2003**, *8*, 276-279.

²²⁶ Famin, O.; Krugliak, M.; Ginsburg, H. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 59-68.

²²⁷ Perez-Rosado et al. *Exp. Parasitol.* **2002**, *101*, 175-182.

²²⁸ Ferreira et al. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, *136*, 43-50.

²²⁹ Srivastava et al. *Trop. Med. Int. Health.* **1999**, *4*, 251-254.

²³⁰ Rojpiulst et al. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* **2004**, *35*, 1489-1499.

²³¹ Deponte, M.; Becker, K. *Methods Enzymol.* **2005**, *401*, 241-253.

²³² Meierjohann, S.; Walter, R.D.; Müller, S. *Biochem. J.* **2002**, *368*, 761-768.

²³³ Safeukui et al. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 1903-1910.

une interaction de certains composés avec le GSH²³⁴ peuvent également être responsables de l'augmentation de la résistance.

II.6.2. La méfloquine et les arylaminoalcools

La MF a été développée à partir d'analogues de la Q synthétisés durant la seconde guerre mondiale suite au programme de recherche sur le paludisme qui a été réalisé au Walter Reed Army Institute of Research. La MF a été largement utilisée notamment en Asie, où une résistance a été développée depuis peu. En 2003, l'efficacité de la MF était seulement de 62 % dans certaines régions de la Thaïlande.²³⁵ C'est pourquoi, il est recommandé de l'utiliser en combinaison avec l'ARS²³⁶ bien qu'une recrudescence a été rapportée suite à l'utilisation de cette combinaison.²³⁷ L'utilisation prophylactique de la MF est associée à des effets secondaires neuropsychiatriques : insomnies, dépression, attaques de panique... Elle est par conséquent interdite chez les personnes ayant des troubles psychomoteurs.^{238,239,240,241,242}

a) Mécanisme d'action

Les arylaminoalcools sont des molécules monoprotionables qui, comme les amino-4-quinoléines, peuvent s'accumuler dans la vacuole digestive du parasite et inhiber la formation de l'hémozoïne.^{243,192} Le mécanisme d'action de la MF et des arylaminoalcools n'est pas clair. Il semble être différent de celui des amino-4-quinoléines. Hoppe et *coll.* ont montré que la MF était également un puissant inhibiteur de l'endocytose (internalisation du contenu de l'hématie dans des vésicules où il est dégradé).¹²¹ La MF interagirait fortement avec les phospholipides membranaires²⁴⁴ et inhiberait les canaux calciques cellulaires^{245,246} et le canal hERG K⁺ exprimé dans des cellules HEK293.²⁴⁷ Sa neurotoxicité peut être expliquée par la rupture de l'homéostasie des neurones.²⁴⁸ Il a été proposé récemment que les arylaminoalcools agissaient

²³⁴ Deharo et al. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 66, 809-817.

²³⁵ Vijaykadge et al. *Trop. Med. Int. Health.* **2006**, 11, 211-219.

²³⁶ Adjui et al. *Lancet.* **2002**, 359, 1365-1372.

²³⁷ Price et al. *Lancet.* **2004**, 364, 438-447.

²³⁸ Shanks, G.D.; Edstein, M.D. *Drugs.* **2005**, 65, 2091-2110.

²³⁹ Conner, B.A. *J. Travel Med.* **2001**, 8, S57-S64.

²⁴⁰ Franco-Paredes, C.; Santos Preciado, J.I. *Lancet.* **2006**, 6, 139-149.

²⁴¹ Bermann, J. *Travel Med. Infect. Dis.* **2004**, 2, 171-184.

²⁴² Taylor, W.R.J.; White, N.J. *Drug Saf.* **2004**, 27, 25-61.

²⁴³ Dorn et al. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 55, 727-736.

²⁴⁴ Go, M.L.; Ngiam, T.L. Thermodynamics of partitioning of the antimalarial drug mefloquine in phospholipid bilayers and bulk solvents. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, 21, 29-34.

²⁴⁵ Go, M.L.; Lee, H.S.; Palade, P. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1995**, 329, 255-271.

²⁴⁶ Nori, V.S.; Barry, S.R. *J. Comp. Physiol. [A]*. **1997**, 180, 473-480.

²⁴⁷ Traebert et al. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, 484, 41-48.

²⁴⁸ Dow et al. *Malar. J.* **2003**, 2, 14.

sur la même cible membranaire, non identifiée, que les amino-4-quinoléines mais de manière antagoniste en inhibant la libération d'ions Ca^{2+} empêchant ainsi la fusion des vésicules transportant l'hémoglobine et la vacuole digestive.²⁴⁹

b) Mécanisme de résistance

La protéine de transport membranaire *PfMDR1*, analogue chez *P. falciparum* des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) multidrogues résistants des mammifères, joue un rôle essentiel dans la sensibilité du parasite à la MF et aux autres arylaminoalcools. Une mutation ponctuelle N86Y du gène *pfmdr1* coexiste avec la mutation K76T du gène *pfcr1* qui confère la résistance à la CQ. Cette mutation de *pfmdr1* conduit à une augmentation de la sensibilité du parasite à la MF.^{250,237} D'autres mutations ponctuelles S1034C et N1042D sur le gène *pfmdr1* sont prédominantes sur les clones CQ-résistants mais augmentent la sensibilité à la MF.²⁵¹

La résistance à la MF et aux arylaminoalcools serait associée à une augmentation du nombre de copies du gène *pfmdr1*.^{252,253,254,255,256} Quatre gènes (PFD0090c, PFI0195c, PF10 0372 et PF14 0649), dont la fonction est inconnue, ont été récemment identifiés (sur les chromosomes 4,9, 10 et 14, respectivement) chez *P. falciparum* comme étant responsables du développement de résistance à la MF.²⁵⁷ Une analyse de ces gènes dans des clones résistants et sensibles de *P. falciparum* par séquençage et par RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) semi-quantitative montre que la résistance n'est pas due à des mutations mais à une surexpression des gènes PFI0195c et PF14 0649.

II.6.3. L'artémisinine et ses dérivés

L'ART fût extraite, en 1971, de l'armoise annuelle *Artemisia annua* qui est une plante chinoise utilisée dans le traitement de la fièvre en Chine depuis 2000 ans.²⁵⁸ Cette lactone sesquiterpénique est un antipaludique très puissant. La première utilisation de l'ART fût lors de la guerre du Viêt-nam pour combattre le paludisme qui faisait plus de morts que la guerre

²⁴⁹ Fitch, C.D. *Life Sci.* **2004**, 74, 1957-1972.

²⁵⁰ Duraisingh et al. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, 108, 13-23.

²⁵¹ Sidhu, A.B.S.; Valderramos, S.G.; Fidock, D.A. *Mol. Microbiol.* **2005**, 57, 913-926.

²⁵² White, N.J. *J. Clin. Invest.* **2004**, 113, 1084-1092.

²⁵³ Duraisingh, M.T.; Cowman, A.F. *Acta Trop.* **2005**, 94, 181-190.

²⁵⁴ Uhlemann et al. *J. Infect. Dis.* **2005**, 192, 1830-1835.

²⁵⁵ Uhlemann, A.-C.; Krishna, S. *Curr. Trop. Microb. Immun.* **2005**, 295, 39-53.

²⁵⁶ Woodrow, C.J.; Krishna, S. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, 63, 1586-1596.

²⁵⁷ Jeffress, M.; Fields, S. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2005**, 139, 133-139.

²⁵⁸ Haynes, R.K.; Vonwiller, S.C. *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 73-79.

elle-même. Ce n'est qu'après l'augmentation des problèmes de résistance de *Plasmodium* face aux antipaludiques classiques comme la CQ ou l'AQ que les laboratoires pharmaceutiques ont commencé à s'intéresser à l'ART au début des années 90. Il a fallu attendre 2001 pour que l'OMS déclare l'ART comme étant "le plus grand espoir mondial contre le paludisme".

a) Mécanisme d'action

Les dérivés de l'ART sont actifs à tous les stades du cycle. Leur mode d'action n'est pas encore totalement élucidé.^{259,260,261} Le pont endoperoxyde de la molécule est indispensable à son activité. Les analogues de l'ART ne possédant pas ce pont endoperoxyde sont inactifs.²⁶²

Contrairement aux quinoléines, les dérivés de l'ART n'inhibent pas la formation d'hémozoïne. Il est supposé que l'action de cette classe de molécules résiderait en un clivage du pont endoperoxyde dans la vacuole digestive du parasite, dû à un transfert d'électron fourni par le Fe(II) de l'hème. Cette ouverture faciliterait la libération de radicaux libres,²⁶³ l'alkylation de protéines,^{259,264,265} et la production de composés d'oxydation,^{266,267} toxiques pour *Plasmodium*.²⁶⁸ L'ART peut donc être considérée comme un composé pro-oxydant. Il est également supposé que l'ART réagisse avec l'hème ce qui empêcherait la détoxification de cette dernière et inhiberait une multitude d'enzymes.^{269,270,271,272} De récentes expériences localisent, par marquage radioactif, l'ART en dehors de la vacuole digestive et non à l'intérieur.²⁷³ Krishna et *coll.* ont fait récemment une nouvelle hypothèse : le clivage de l'endoperoxyde aurait lieu dans le cytoplasme et serait catalysé par une source de Fe(II) cytoplasmique. Les espèces réactives inhiberaient ensuite de manière très spécifique une pompe à calcium ATP-dépendante *PfATP6*, homologue de la protéine SERCA

²⁵⁹ Faye et al. *Med. Trop.* **1998**, 58, 13-17.

²⁶⁰ Olliaro et al. *Trends Parasitol.* **2001**, 17, 122-126.

²⁶¹ Cumming, J.N.; Ploypradith, P.; Posner, G.H. *Adv. Pharmacol.* **1997**, 37, 253-297.

²⁶² Brossi et al. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 645-650.

²⁶³ Robert, A.; Coppel, Y.; Meunier, B. *Chem. Commun.* **2002**, 5, 414-415.

²⁶⁴ Meshnick, S.R. *Int. J. Parasitol.* **2002**, 32, 1655-1660.

²⁶⁵ O'Neill, P.M.; Posner, G.H. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2945-2964.

²⁶⁶ Sibmooh et al. *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, 23, 1275-1280.

²⁶⁷ Berman, P.A.; Adams, P.A. *Free Rad. Biol. Med.* **1997**, 22, 1283-1288.

²⁶⁸ Meshnick et al. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1993**, 37, 1108-1114.

²⁶⁹ Robert et al. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2005**, 102, 13676-13680.

²⁷⁰ Posner, G.H.; O'Neill, P.M. *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 397-404.

²⁷¹ Haynes, R.K.; Krishna, S. *Microbes Infect.* **2004**, 6, 1339-1346.

²⁷² Krishna, S.; Uhlemann, A.-C.; Haynes, R.K. *Drug Resist. Updates.* **2004**, 7, 233-244.

²⁷³ Krishna et al. *Trends Mol. Med.* **2006**, 12, 200-205.

(sarco/endoplasmic reticulum membrane calcium ATPase) des mammifères,²⁷⁴ localisée sur le réticulum endoplasmique. L'ART se lierait à cette protéine cible par un processus d'activation peroxydative catalysé par le Fe(II).²⁷⁵

b) Mécanisme de résistance

Les dérivés de l'ART présentent une chimiosensibilité très élevée. En effet, il existe uniquement quelques cas isolés de diminution de sensibilité *in vitro*.²⁷⁶ L'ART agit à tous les stades de développement du parasite même ceux où il n'y a pas de production d'hémozoïne. Le développement de résistance semble par conséquent difficile. Il existe que très peu de cas de résistance aux dérivés de l'ART sur le terrain.^{277,278} Une résistance peut être provoquée en effectuant une mutation sur le troisième segment transmembranaire de l'enzyme *PfATP6* (L263E).²⁷⁹ Cette résistance semble être associée à une mutation de la protéine *PfATP6* (S769N) mais les mécanismes de résistance ne sont pas encore bien connus.²⁷⁷ Un polymorphisme du gène encodant pour *PfATP6* serait associé à une résistance *in vitro* à l'artéméter chez les isolats de terrain de *P. falciparum*.²⁷³ Chez *P. chabaudi*, l'acquisition d'une résistance stable est génétiquement transmissible et ne s'accompagne d'aucune mutation et d'aucune modification du nombre de copies des gènes *mdr1*, *cg10*, *tctp* et *atp6*.²⁸⁰

III. La ferroquine

III.1. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment au chapitre II.6., *P. falciparum* a développé une résistance aux antipaludiques les plus communément utilisés comme la CQ par exemple.²⁸¹ Il est donc urgent de développer de nouveaux antipaludiques actifs sur les formes résistantes de *P. falciparum* et qui ne seraient pas susceptibles de développer de nouvelles résistances. Une des approches utilisées dans la recherche de nouveaux médicaments est la modification du squelette de molécules existantes. Il y a 20 ans, un groupement ferrocénique a été associé pour la première fois à une molécule organique.²⁸² L'idée était d'utiliser la partie organique pour ses propriétés spécifiques (sa biodisponibilité, son transport, sa liaison à la

²⁷⁴ Eckstein-Ludwig et al. *Nature*. **2003**, 424, 957-961.

²⁷⁵ Jung et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2994-2997.

²⁷⁶ Das et al. *J. Ass. Physicians India*. **2000**, 48, 443-444.

²⁷⁷ Jambou et al. *Lancet*. **2005**, 366, 1960-1963.

²⁷⁸ Menard et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, 73, 616-621.

²⁷⁹ Uhlemann et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, 12, 628-629.

²⁸⁰ Afonso et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 480-489.

²⁸¹ World Health Organization. The World Health Report **2006**, <http://www.who.int/en>.

²⁸² Dombrowski, K.E.; Baldwin, W.; Sheats, J.E. *J. Organomet. Chem.* **1986**, 302, 281-306.

cible) et une partie organométallique pour altérer les effets indésirables (résistance) et/ou améliorer les propriétés initiales.²⁸³

Le ferrocène fût rapidement identifié comme étant le métallocène de choix. En effet, c'est une petite molécule rigide et lipophile ($\log P = 3,28$) qui peut facilement pénétrer les membranes cellulaires. Cette propriété confère à la molécule une bonne biodisponibilité. Le ferrocène est stable en solution aqueuse et en conditions aérobiques. De plus, son comportement électrochimique le rend attractif pour des applications biologiques et particulièrement pour la conception de médicaments.²⁸⁴

III.2. De la chloroquine à la ferroquine

Pour pallier aux problèmes de résistance de *P. falciparum*, l'équipe du Pr. Brocard a synthétisé de nombreux analogues et dérivés ferrocéniques de molécules antipaludiques. Ces travaux de recherche ont conduit à la synthèse de la FQ qui résulte de l'introduction d'un groupement ferrocénique dans la structure de la CQ. C'est l'un des premiers antipaludiques organométalliques qui a été synthétisé.^{24,25} La synthèse de la FQ est relativement simple et assez économique, ce qui la rend particulièrement intéressante pour le développement d'un médicament antipaludique.

Cette association CQ-ferrocène donne à la FQ toutes les propriétés requises pour être un antipaludique de choix. En effet, la CQ comprend une partie amino-4-quinoléine, base faible, qui va avoir pour rôle de cibler le parasite et en particulier la vacuole digestive et ainsi, d'inhiber la formation de l'hémozoïne. La présence d'une deuxième amine, base faible, sur la chaîne latérale de la CQ aide également à la vectorisation de la molécule par diffusion entre le cytosol (pH supposé à 7,4) et la vacuole digestive (pH supposé à 5,2). Le ferrocène, quant à lui, de par sa grande lipophilie et ses propriétés électrochimiques, permet à la molécule une bonne délivrance tissulaire, une bonne pénétration des membranes et des réactions de transfert d'électron. Cette modification structurale de la CQ sous-tend un mécanisme d'action plus complexe de la FQ (voir chapitre IV).

Un criblage de plus de 50 molécules ferrocéniques a été effectué mais aucune molécule ne semble actuellement plus prometteuse que la FQ.

²⁸³ Top et al. *Chem. Commun.* **1996**, 8, 955-956.

²⁸⁴ van Staveren, D.R.; Metzler-Nolte, N. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 5931-5986.

Dans un premier temps, il a été montré que le ferrocène devait être lié de manière covalente à la CQ pour surmonter les problèmes de résistance du parasite. En effet, le ferrocène a été associé à la CQ sous forme d'acide ferrocénique par une liaison saline faible (figure 35). Des tests *in vitro* ont montré que cette association était moins active que la CQ diphosphate.⁴² Il a été supposé que les deux parties avaient un effet antagoniste. Le ferrocène seul ne semble pas avoir d'activité antipaludique mais augmente l'efficacité de la CQ lorsqu'il est introduit dans la molécule.

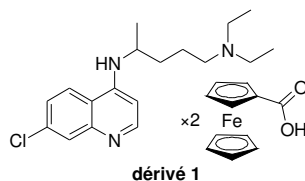


Figure 35 : Sel ferrocénique de la chloroquine.

Dans un deuxième temps, la position du groupement ferrocénique dans la molécule de CQ a été étudiée. L'insertion du ferrocène sur la partie amino-4-quinoléine de la CQ fait diminuer l'activité antipaludique de celle-ci sur *P. falciparum* (figure 36). Le groupement ferrocénique augmente l'encombrement stérique au niveau du cycle quinoléine et empêcherait de ce fait son interaction avec l'hématine.²⁸⁵ De plus, lorsque le groupement se situe en position 1 sur l'atome d'azote de la quinoléine, la molécule devient cationique. Des problèmes de passage des membranes et/ou une modification de l'interaction de la molécule avec l'hématine pourraient alors survenir.

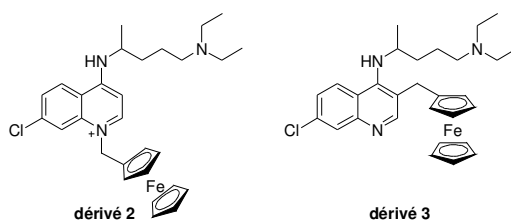


Figure 36 : Dérivés ferrocéniques de la chloroquine : ferrocène sur la partie quinoléine.

La distance entre les deux azotes situés sur la chaîne latérale de la CQ semble être également un paramètre important. En effet, elle influence le développement de la résistance de *P. falciparum*.²⁸⁶ Les amino-4-quinoléines ayant une courte chaîne latérale (2 ou 3 atomes de carbone) ou une longue chaîne latérale (10 à 12 atomes de carbone) sont plus actifs que la

²⁸⁵ Biot, C. **1998**, thèse de doctorat chimie organique et macromoléculaire.

²⁸⁶ De et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1996**, 55, 579-583.

CQ sur les clones CQ-, MF- et multi-résistants de *P. falciparum*.²⁸⁷ Ces molécules sont supposées être moins facilement expulsées de la vacuole digestive du parasite. Etant donné l'importance de cette chaîne latérale, il a donc été supposé que l'introduction du groupement ferrocénique à ce niveau devait pouvoir améliorer l'activité sur les clones CQ-résistants de *P. falciparum*. Une série d'analogues de la CQ comprenant un groupement ferrocényle sur la chaîne latérale a été synthétisée et testée (figure 37).^{288,289} Le dérivé **4** présentant le groupement ferrocénique sur l'amine terminale de la CQ est moins actif que la CQ. Ceci pourrait être expliqué par la libération du dérivé monodeséthylé de la CQ après métabolisation oxydative, qui a été référencé comme étant inactif.²⁹⁰ Des analogues aminés et uréiques de la FQ avec différents bras espaceurs ont été synthétisés et testés *in vitro* sur des clones sensible (D10) et résistant (K1) de *P. falciparum* (figure 37, dérivés **5**). La plupart des analogues sont plus actifs que la CQ sur les deux clones. Sur D10, les analogues uréiques sont plus actifs que les analogues aminés.¹⁴⁶ Les dérivés **6** présentent également une bonne activité sur clone CQ-sensible (HB3) et CQ-résistants (Dd2, W2) de *P. falciparum* mais celle-ci décroît rapidement avec le taux de résistance à la CQ des clones de *P. falciparum* testés. Une résistance croisée pourrait être développée rapidement. De plus, aucune relation significative n'est observée entre le caractère lipophile ou l'inhibition de la formation de la β -hématine et les valeurs de CI_{50} de ces analogues.¹⁴⁷ Il a été également observé que l'efficacité de la molécule diminuait lorsque la chaîne latérale était ramifiée (figure 37, dérivés **7**).¹⁴⁷ Tous les analogues de la FQ synthétisés présentent une activité antipaludique meilleure que la CQ sur les clones CQ-résistants excepté lorsque le groupement ferrocényle est introduit sur l'atome d'azote terminal.¹⁴⁸

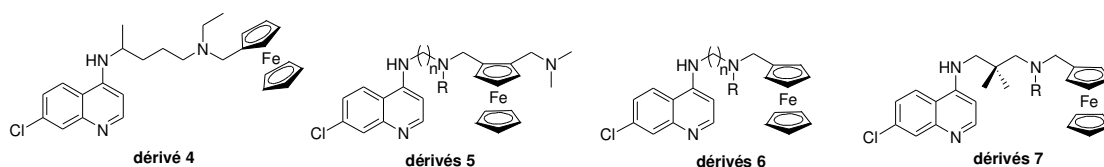


Figure 37 : Dérivés ferrocéniques de la chloroquine : ferrocène sur la chaîne latérale.

²⁸⁷ Thompson, P.E.; Werbel, L.M. Academic Press, New York, **1972**.

²⁸⁸ Chibale et al. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6231-6235.

²⁸⁹ Biot et al. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4707-4714.

²⁹⁰ Verdier et al. *The lancet.* **1984**, *323*, 1186-1187.

Etant donné que la présence de deux substituants différents sur le ferrocène provoque une chiralité, d'autres dérivés achiraux de la FQ ont été synthétisés (figure 38).²⁹¹ Ces molécules présentent une moins bonne activité sur les clones CQ-résistants que sur les clones CQ-sensibles (figure 38, dérivés **8** et **9**). Une tendance similaire fût également observée pour des dérivés bis-quinoléiniques (figure 38, dérivé **10**).²⁹² Suite à ces études de relations structure-activité, la FQ reste la molécule ferrocénique présentant la meilleure activité antipaludique sur les clones CQ-résistants de *P. falciparum*.

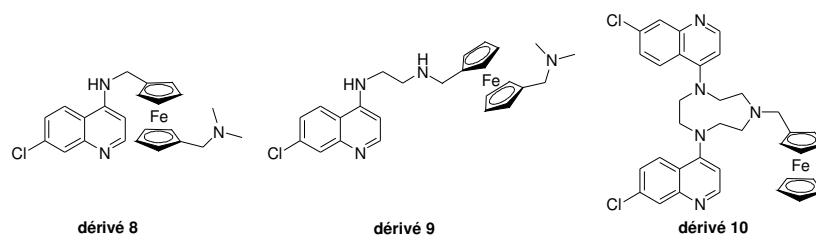
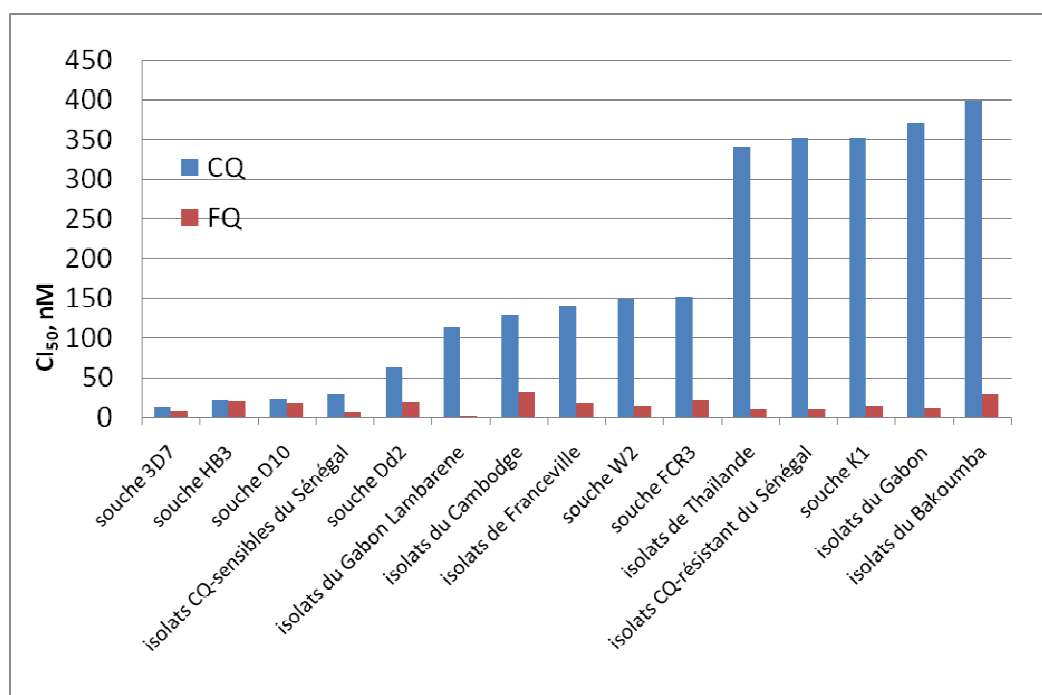


Figure 38 : Dérivés achiraux ferrocéniques de la chloroquine.

III.3. Activité antipaludique



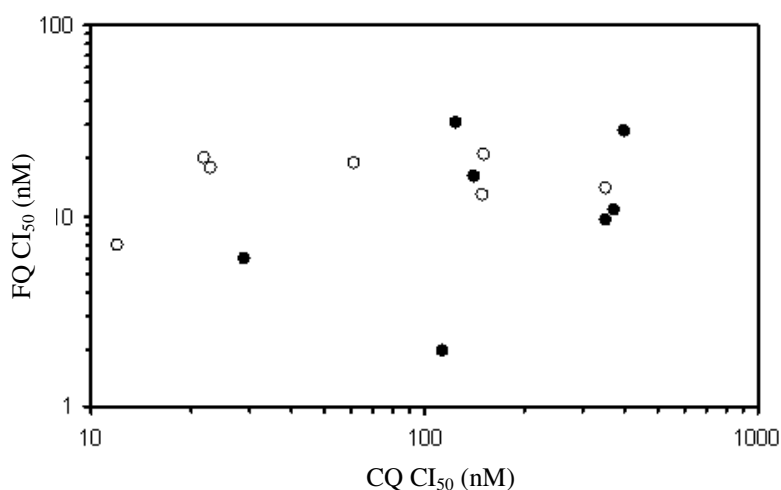
Graphe 39 : Comparaison de l'activité de la CQ et de la FQ sur différents clones de laboratoire et différents isolats de terrain.

²⁹¹ Beagley et al. *Dalton Trans.* **2003**, 15, 3046-3051.

²⁹² Biot et al. *Organomet. Chem.* **2004**, 689, 4678-4682.

La FQ a été testée sur de nombreux clones de *P. falciparum*^{289,293} et isolats de terrain (Gabon, du Sénégal et du Cambodge).^{43,44,45,46,47} Le graphe 39 montre l'activité de la FQ sur ces différents clones et isolats. Quelque soit le degré de résistance du clone ou de l'isolat de terrain à la CQ, la FQ maintient toujours la même activité *in vitro*.

A l'heure actuelle, aucune relation entre l'activité antipaludique de la CQ et de la FQ n'apparaît (graphe 40) ce qui suggère qu'aucune résistance croisée n'est susceptible de se développer.²⁹⁴ Des tests *in vivo* sur des rongeurs infectés par des clones de *Plasmodium* montrent que quelque soit la susceptibilité du clone pour la CQ et le mode d'administration, la dose curative de la FQ est la même.¹³⁹ Ceci démontre bien la puissante activité du candidat médicament et sa bonne biodisponibilité orale : deux qualités majeures pour le développement d'un médicament.



Graphe 40 : CI₅₀ de la FQ *versus* CI₅₀ de la CQ sur 7 clones de laboratoire de *P. falciparum* (points blancs) et 7 clones d'isolat de terrain du Gabon, du Sénégal et du Cambodge (points noirs).²⁹⁵

Il est important de noter que la FQ répond de manière négative aux tests de toxicité Ames et FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus). La FQ est également négative sur les tests *in vitro* et *in vivo* dans les micronoyaux conduits sous les standards de bonnes

²⁹³ Delhaes et al. *Parasitol. Res.* **2001**, 87, 239-244.

²⁹⁴ Kreidenweiss et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, 75, 1178-1181.

²⁹⁵ Dive, D.; Biot, C. *ChemMedChem.* **2007**, 3, 383-391.

pratiques de laboratoire. Contrairement, sur les mêmes expériences, la CQ est mutagène et génotoxique.²⁹⁶

III.4. Enantiomères

Du fait de ses deux substituants différents en positions 1 et 2 du ferrocène, la FQ possède une chiralité plane. Afin de savoir si l'un des deux énantiomères est toxique et si les deux énantiomères sont actifs, les énantiomères purs (1'*R*)-FQ et (1'*S*)-FQ ont été synthétisés par le Dr. Biot par résolution enzymatique utilisant un biocatalyseur (figure 41).²⁹⁷ Cette étape est importante dans le développement d'un médicament. Les deux énantiomères ont une activité *in vitro* similaire sur *P. falciparum* à des concentrations nanomolaires. *In vivo*, les deux énantiomères ont une activité légèrement inférieure à celle du mélange racémique sur les clones CQ-sensibles et CQ-résistants de *P. vinckei vinckei* chez la souris. De cette légère différence d'activité, un effet complémentaire ou synergique entre les deux énantiomères peut être suggéré. De plus, l'énantiomère (1'*R*)-FQ possède une activité légèrement supérieure à celle de l'énantiomère (1'*S*)-FQ: les deux énantiomères doivent avoir des propriétés pharmacocinétiques légèrement différentes. Le mélange racémique semble être la formulation optimale car elle permet de diminuer les coûts de revient de production de la molécule, l'étape de séparation des énantiomères n'étant pas nécessaire.

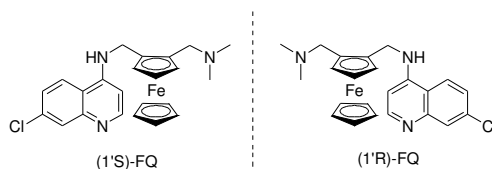


Figure 41 : Enantiomères de la ferroquine.

III.5. Métabolisme

Le schéma 42 nous montre la voie métabolique de la FQ proposée, basée sur des expériences sur modèles hépatiques animal et humain. La FQ est principalement métabolisée par voie oxydative. La voie majeure de désalkylation aboutit à la FQ mono-*N*-déméthylée (Met 1) puis à la FQ di-*N,N*-déméthylée (Met 2).²⁹⁸ D'autres voies métaboliques mineures ont été également identifiées. Les cytochromes P-450 2C9, 2C19, 3A4 et 2D6 sont les principaux mis en jeu dans l'oxydation de la FQ. Les métabolites ont été synthétisés et testés sur les

²⁹⁶ Chatterjee et al. *Mutagenesis*, **1998**, 13, 619-624.

²⁹⁷ Delhaes et al. *ChemBioChem*, **2002**, 3, 418-423.

²⁹⁸ Daher et al. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, 34, 667-682.

clones 3D7 (CQ-sensible) et W2 (CQ-résistant) de *P. falciparum*. L'activité des deux métabolites principaux est inférieure à celle de la FQ mais reste meilleure que celle de la CQ sur les clones CQ-résistants.^{127,299} Ces deux métabolites sont supposés être présents à de fortes concentrations dans le sang après administration de la FQ, ils pourraient jouer un rôle important dans l'activité antipaludique de la FQ. Il est à noter que ces études ont été faites *in vitro*, des études *in vivo* supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

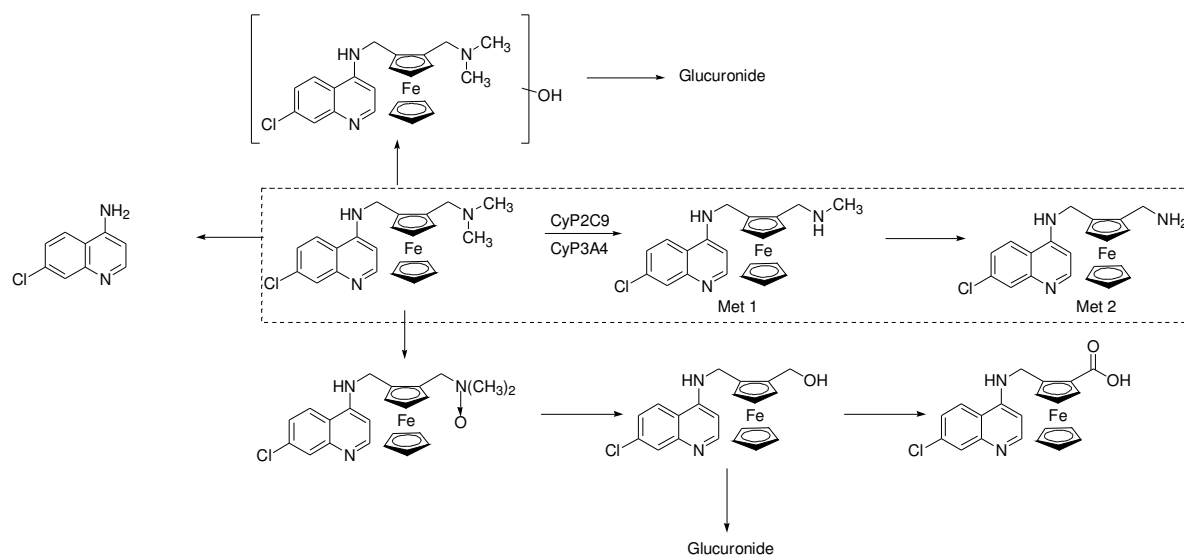


Schéma 42 : Voie métabolique de la FQ proposée sur modèles hépatiques humains. La voie métabolique principale est encadrée.

²⁹⁹ Biot et al. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2843-2847.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Pauson, P. L.; Kealy, T. J. A New Type of Organo-Iron Compound. *Nature*. **1951**, *168*, 1039-1040.
- [2] Wilkinson, G.; Rosenblum, M.; Whiting, M. C.; Woodward, R. B. The Structure of iron bis-cyclopentadienyl. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 2125-2126.
- [3] Top, S.; Jaouen, G.; Vessieres, A.; Abjean, J.-P.; Davoust, D.; Rodger, C. A.; Sayer, B. G.; McGlinchey, M. J. Chromium tricarbonyl complexes of estradiol derivatives: differentiation of .alpha.- and .beta.-diastereoisomers using 1- and 2-dimensional NMR spectroscopy at 500 MHz. *Organometallics*. **1985**, *4*, 2143-2150.
- [4] Jaouen, G.; Vessieres, A. Transition metal carbonyl oestrogen receptor assay. *Pure & Appl. Chem.* **1985**, *57*, 1865-1874.
- [5] Astruc, D. Chimie organométallique. *Collection Grenoble Sciences*, **2000**, p 251.
- [6] Leiland, P. F.; Pepinsky, R. X-ray examination of iron biscyclopentadienyl. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 4971.
- [7] Dunitz, J. D.; Orgel, L. E. Bis-cyclopentadienyl Iron: a Molecular Sandwich. *Nature*, **1953**, *171*, 121-122.
- [8] Dunitz, J. D.; Orgel, L. E.; Rich, A. The crystal structure of ferrocene. *Acta Cryst.* **1956**, *9*, 373-375.
- [9] Chanfreau, S. *Mise au point d'un procédé de carboxylation par électrosynthèse en milieu CO₂ sous pression et application en chimie fine*. Thèse de doctorat, Génie des procédés et de l'environnement, Institut National Polytechnique de Toulouse, **2005**.
- [10] Köpf-Maier, P.; Klapötke, T. Tumor inhibition by ferricenium complexes. Activity against some solid experimental tumors. *Arzneimittelforschung*. **1989**, *39*, 369-371.
- [11] Joy, A. M.; Goodgame, D. M.; Stratford, I. J. High efficiency of ferricenium salts as radiosensitizers of V79 cells in vitro and the KHT tumor in vivo. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1989**, *16*, 1053-1056.
- [12] Di Gleria, K.; Hill, H. A.; Wong, L. L. N-(2-ferrocene-ethyl)maleimide: a new electroactive sulphydryl-specific reagent for cysteine-containing peptides and proteins. *FEBS Lett.* **1996**, *390*, 142-144.
- [13] Gensini, G.F.; Conti, A.A.; Lippi, D. The contributions of Paul Ehrlich to infectious disease. *J. Infect.* **2007**, *54*, 221-224.
- [14] Lloyd, N.C.; Morgan, H.W.; Nicholson, B.K.; Ronimus, R.S. The composition of Ehrlich's salvarsan: resolution of a century-old debate. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 941-944.
- [15] Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*. **1965**, *205*, 698-699.
- [16] Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Trosko, J.E.; Mansour, V.H. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature*. **1969**, *222*, 385-386.
- [17] Carmona, D.; Lamata, M.P.; Oro, L. A. Half-Sandwich Complexes with Aminocarboxylate Ligands and Their Use as Enantioselective Hydrogen Transfer Catalysts. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, *9*, 2239-2251.
- [18] Velders, A. H., Bergamo, A., Alessio, E., Zangrando, E., Hasnoot, J.G., Casarsa, C., Cocchietto, M., Zorget, S., Sava, G. Synthesis and chemical-pharmacological characterization of the antimetastatic NAMI-A-type

Ru(III) complexes (Hdmp)[trans-RuCl₄(dmsO-S)(dmp)], (Na)[trans-RuCl₄(dmsO-S)(dmp)], and [mer-RuCl₃(H₂O)(dmsO-S)(dmp)] (dmp = 5,7-dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine). *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1110-1121.

[19] Bergamo, A., Stocco, G., Casarsa, C., Cocchietto, M., Alessio, E., Serli, B., Zorget, S., Sava, G. Reduction of in vivo lung metastases by dinuclear ruthenium complexes is coupled to inhibition of in vitro tumour invasion. *Int. J. Oncol.* **2004**, *24*, 373-379.

[20] Mross, K.; Robben-Bathe, P.; Edler, L.; Baumgart, J.; Berdel, W.E.; Fiebig, H.; Unger, C. Phase I Clinical Trial of a Day-1, -3, -5 Every 3 Weeks Phase I Clinical Trial of Day-1, -3, -5 Every 3 Weeks Schedule with Titanocene Dichloride (MKT 5) in Patients with Advanced Cancer. (Phase I Study Group of the AIO of the German Cancer Society). *Onkologie.* **2000**, *23*, 576-579.

[21] Jaouen, G.; Top, S.; Raynaud, J.P. French Patent 2725720-AI, **1994**.

[22] Top, S.; Tang, J.; Vessièrès, A.; Carrez, D.; Provot, C.; Jaouen, G. Ferrocenyl hydroxytamoxifen: a prototype for a new range of oestradiol receptor site-directed cytotoxics. *Chem. Commun.*, **1996**, *8*, 955-956.

[23] Jaouen, G., Top, S., Vessièrès, A., Leclercq, G., McGlinchey, M.J. The first organometallic selective estrogen receptor modulators (SERMs) and their relevance to breast cancer. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2505-2517.

[24] Brocard, J.; Lebibi, J.; Maciejewski, L. French Patent 2733985-A1, **1996**.

[25] Biot, C., Glorian, G., Maciejewski, L.A., Brocard, J.S.; Domarle, O.; Blampain, G.; Millet, P.; Georges, A.J.; Abessolo, H.; Dive, D.; Lebibi, J. Synthesis and antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* of a new ferrocene-chloroquine analogue. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3715-3718.

[26] Biot, C., Delhaes, L., Abessolo, H., Domarle, O., Maciejewski, L., Mortuaire, M., Delcourt, P., Deloron, P., Camus, D., Dive, D., Brocard, J. Novel metallocenic compounds as antimalarial agents. Study of the position of ferrocene in chloroquine. *J. Organomet. Chem.* **1999**, *589*, 59-65.

[27] Jordan, V.C. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 1. Receptor interactions. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 883-908.

[28] Jordan, V.C. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 2. Clinical considerations and new agents. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1081-111.

[29] Shiau, A.K.; Barstad, D.; Loria, P.M.; Cheng, L.; Kushner, P.J.; Agard, D.A.; Greene, G.A. The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen. *Cell.* **1998**, *95*, 927-937.

[30] Pigeon, P.; Top, S.; Vessièrès, A.; Huché, M.; Hillard, E.A.; Salomon, E.; Jaouen, G. Selective estrogen receptor modulators in the ruthenocene series. Synthesis and biological behavior. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2814-2821.

[31] Hillard, E.; Vessièrès, A.; Thouin, L.; Jaouen, G.; Amatore, C. Ferrocene-Mediated Proton-Coupled Electron Transfer in a Series of Ferrocifen-Type Breast-Cancer Drug Candidates. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 291-296.

[32] Seddon, E.A.; Seddon, K.R. The chemistry of ruthenium. Elsevier, **1984**, p 754.

[33] Fan, P.W.; Zhang, F.; Bolton, J.L. 4-Hydroxylated metabolites of the antiestrogens tamoxifen and toremifene are metabolized to unusually stable quinone methides. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 45-52.

- [34] Zhang, F.; Fan, P.W.; Liu, X.; Shen, L.; van Breeman, R.B.; Bolton, J.L. Synthesis and reactivity of a potential carcinogenic metabolite of tamoxifen: 3,4-dihydroxytamoxifen-o-quinone. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 53-62.
- [35] Terashima, I.; Suzuki, N.; Shibutani, S. Mutagenic potential of alpha-(N2-deoxyguanosinyl)tamoxifen lesions, the major DNA adducts detected in endometrial tissues of patients treated with tamoxifen. *Cancer. Res.* **1999**, *59*, 2091-2095.
- [36] Schatzschneider, U.; Metzler-Nolte, N. New Principles in Medicinal Organometallic Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1504-1507.
- [37] Ridley, R.G. Malaria: dissecting chloroquine resistance. *Curr. Biol.* **1998**, *8*, R346-349.
- [38] Sullivan, D.J. Jr.; Matile, H.; Ridley, R.G.; Goldberg, D.E. A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31103-31107.
- [39] Winstanley, P.A. Chemotherapy for falciparum malaria: the armoury, the problems and the prospects. *Parasitol. Today.* **2000**, *16*, 146-153.
- [40] Delhaes, L.; Biot, C.; Berry, L.; Maciejewski, L.A.; Camus, D.; Brocard, J.S.; Dive, D. Novel ferrocenic artemisinin derivatives: synthesis, in vitro antimalarial activity and affinity of binding with ferroprotoporphyrin IX. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2739-2745.
- [41] Biot, C.; Delhaes, L.; Maciejewski, L.A.; Mortuaire, M.; Camus, D.; Dive, D.; Brocard, J.S. Synthetic ferrocenic mefloquine and quinine analogues as potential antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 707-714.
- [42] Domarle, O. ; Blampain, G. ; Agnani, H. ; Nzadiyabi, T. ; Lebibi, J. ; Brocard, J. ; Maciejewski, L.; Biot, C. Georges, A.J.; Millet, P. *In vitro* antimalarial activity of a new organometallic analog, ferrocene-chloroquine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 540-544.
- [43] Atteke, C. ; Ndong, J. M. ; Aubouy, A. ; Maciejewski, L. ; Brocard, J. ; Lebibi, J. ; Deloron, P. *In vitro* susceptibility to a new antimalarial organometallic analogue, ferroquine, of *Plasmodium falciparum* isolates from the Haut-Ogooue region of Gabon. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 1021-1024.
- [44] Pradines, B.; Fusai, T.; Daries, W.; Laloge, V.; Rogier, C.; Millet, P.; Pancni, E.; Kombila, M.; Parzy, D. Ferrocene-chloroquine analogues as antimalarial agents: in vitro activity of ferrochloroquine against 103 Gabonese isolates of *Plasmodium falciparum*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *48*, 179-184.
- [45] Pradines, B.; Tall, A.; Rogier, C.; Spiegel, A.; Mosnier, J.; Marrama, L.; Fusai, T.; Millet, P.; Panconi, E.; Trape, J.F.; Parzy, D. *In vitro* activities of ferrochloroquine against 55 Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum* in comparison with those of standard antimalarial drugs. *Trop. Med. Int. Health.* **2002**, *7*, 265-270.
- [46] Chim, P.; Lim, P.; Sem, R.; Nhem, S.; Maciejewski, L.; Fandeur, T. The *in-vitro* antimalarial activity of ferrochloroquine, measured against Cambodian isolates of *Plasmodium falciparum*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **2004**, *98*, 419-424.
- [47] Kreidenweiss, A.; Kremsner, P.G.; Dietz, K.; Mordmüller, B. *In vitro* activity of ferroquine (SAR97193) is independent of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *75*, 1178-1181.
- [48] Chantson, J.T.; Falzacappa, M.V.V.; Crovella, S.; Metzler-Nolte, N. Antibacterial activities of ferrocenoyl- and cobaltoceniumpeptide Bioconjugates. *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690*, 4564-4572.
- [49] Chantson, J.T.; Falzacappa, M.V.V.; Crovella, Metzler-Nolte, N. Solid-phase synthesis, characterization, and antibacterial activities of metallocene-peptide bioconjugates. *ChemMedChem.* **2006**, *1*, 1268-1274.

- [50] Noor, F.; Wüstholtz, A.; Kinscherf, R.; Metzler-Nolte, N. Ein Peptid-Cobaltocenium-Biokonjugat mit verbesserter Aufnahme in Zellen und Anreicherung im Zellkern. *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2481-2485.
- [51] Fuertes, M.A.; Castilla, J.; Alonso, C.; Perez, J.M. Novel concepts in the development of platinum antitumor drugs. *Curr. Med. Chem.: Anti-Canc. Agents.* **2002**, *2*, 539-551.
- [52] Schlotter, K.; Boeckler, F.; Hübner, H.; Gmeiner, P. Fancy Bioisosteres: Metallocenes-Derived G-Protein-Coupled Receptor Ligands with Subnanomolar Binding Affinity and Novel Selectivity Profiles. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3696-3699.
- [53] Chen, X.; Wang, W. Chapter 32. The use of bioisosteric groups in lead optimization. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2003**, *38*, 333-346.
- [54] Bettinetti, L.; Schlotter, K.; Hübner, H.; Gmeiner, P. Interactive SAR studies: rational discovery of super-potent and highly selective dopamine D3 receptor antagonists and partial agonists. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4594-4597.
- [55] Boeckler, F.; Leng, A.; Mura, A.; Bettinetti, L.; Feldon, J.; Gmeiner, P.; Ferger, B. Attenuation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity by the novel selective dopamine D3-receptor partial agonist FAUC 329 predominantly in the nucleus accumbens of mice. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 1025-1032.
- [56] Löber, S.; Hübner, H.; Utz, W.; Gmeiner, P. Rationally based efficacy tuning of selective dopamine d4 receptor ligands leading to the complete antagonist 2-[4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-ylmethyl]pyrazolo[1,5-a]pyridine (FAUC 213). *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2691-2694.
- [57] Boeckler, F.; Zhang, H.W.; Löber, S.; Schetz, J.; Hübner, H.; Ferger, B.; Gmeiner, P.; Feldon, J. FAUC 213, a highly selective dopamine D 4 receptor full antagonist, exhibits atypical antipsychotic properties in behavioural and neurochemical models of schizophrenia. *Psychopharmacology.* **2004**, *175*, 7-17.
- [58] Bregman, H.; Williams, D.S.; Atilla, G.E.; Carroll, P.J.; Meggers, E. An Organometallic Inhibitor for Glycogen Synthase Kinase 3. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13594-13595.
- [59] Williams, D.S.; Atilla, G.E.; Bregman, H.; Arzoumanian, A.; Klein, P.S.; Meggers, E. Switching on a Signaling Pathway with an Organoruthenium Complex. *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2020-2023.
- [60] Williams, D.S.; Atilla, G.E.; Bregman, H.; Arzoumanian, A.; Klein, P.S.; Meggers, E. Switching on a Signaling Pathway with an Organoruthenium Complex. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1984-1987.
- [61] Debreczeni, J.E.; Bullock, A.N.; Atilla, G.E.; Williams, D.S.; Bregman, H.; Knapp, S.; Meggers, E. Ruthenium Half-Sandwich Complexes Bound to Protein Kinase Pim-1. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1610-1615.
- [62] Jerina, D.M.; Daly, J.W. Arene Oxides: A New Aspect of Drug Metabolism. *Science.* **1974**, *185*, 573-582.
- [63] De Visser, S.P.; Shaik, S. A proton-shuttle mechanism mediated by the porphyrin in benzene hydroxylation by cytochrome p450 enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7413-7424.
- [64] Tomaszewski, J.E.; Jerina, D.M.; Daly, J.W. Deuterium isotope effects during formation of phenols by hepatic monooxygenases. Evidence for an alternative to arene oxide pathway. *Biochemistry*, **1975**, *14*, 2024-2031.
- [65] Sono, M.; Roach, M.P.; Coulter, E.D.; Dawson, J.H. Heme-Containing Oxygenases. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841-2887.
- [66] de Visser, S.P.; Shaik, S. A proton-shuttle mechanism mediated by the porphyrin in benzene hydroxylation by cytochrome p450 enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7413-7424.

- [67] Bathelt, C.M.; Ridder, L.; Mulholland, A.J.; Harvey, J.N. Aromatic hydroxylation by cytochrome P450: model calculations of mechanism and substituent effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15004-15005.
- [68] Meunier, B.; de Visser, S.P.; Shaik, S. Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947-3980.
- [69] Hanzlik, R.P.; Soine, W.H. Enzymic hydroxylation of ferrocene. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *180*, 1290-1291.
- [70] Golberg, L.; Martin, L.E. The absorption, distribution and utilization of iron in fat-soluble form. *Life Science.* **1964**, *3*, 1464-1474.
- [71] Taylor, A.J.; Wenzel, M. The fate of [103Ru]ruthenocene in mice and rats. *Xenobiotica.* **1978**, *8*, 107-112.
- [72] Taylor, A.J.; Wenzel, M. Biochemistry of metallocenes: conjugation of 103Ru-Ruthenocene with glucuronic acid in rats. *Naturwissenschaften*, **1977**, *64*, 273.
- [73] Nielsen, P.; Heinrich, H.C. Metabolism of iron from (3,5,5-trimethylhexanoyl)ferrocene in rats. A dietary model for severe iron overload. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *45*, 385-391.
- [74] Leesmeister, K.; Schwochau, K. Synthesis, characterization and biodistribution of tris(beta-diketonato)technetium(III) complexes. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B.* **1992**, *19*, 73-78.
- [75] Schwochau, K.; Linse, K.H.; Su, Z.F. Synthesis, characterization and biodistribution of the cationic technetium(II) 1,10-phenanthroline chelate. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A.* **1992**, *43*, 1079-1082.
- [76] Schwochau, K.; Linse, K.H.; Steinmetz, H.J.; Astheimer, L. Preparation, characterization and biological evaluation of cationic 99Tc/99mTc-dioxime complexes. *Nucl. Med. Biol.* **1993**, *20*, 317-324.
- [77] Yalow, R.S.; Berson, S.A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* **1960**, *39*, 1157-1175.
- [78] Islam-Ali, B.S.; Tisdale, M.J. Effect of a tumour-produced lipid-mobilizing factor on protein synthesis and degradation. *Nature.* **1959**, *84*, 1648-1649.
- [79] Gill, T.J.; Mann, L.T. Studies on Synthetic Polypeptide Antigens: XV. The Immunochemical Properties of Ferrocenyl-poly Glu⁵⁸Lys³⁶Tyr⁶ (No. 2) Conjugates. *J. Immunol.* **1966**, *96*, 906-912.
- [80] Gosling, J.P. A decade of development in immunoassay methodology. *Clin. Chem.* **1990**, *36*, 1408-1427.
- [81] Hainfeld, J.F. A small gold-conjugated antibody label: improved resolution for electron microscopy. *Science.* **1987**, *236*, 450-453.
- [82] Leuversing, J.H.; Goverde, B.C.; Thal, P.J.; Schuurs, A.H. A homogeneous sol particle immunoassay for human chorionic gonadotrophin using monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods.* **1983**, *60*, 9-23.
- [83] Cais, M.; Dani, S.; Eden, Y.; Gandolfi, O.; Horn, M.; Isaacs, E.E.; Josephy, Y.; Saar, Y.; Slovin, E.; Snarsky, L. Metalloimmunoassay. *Nature.* **1977**, *270*, 534-535.
- [84] Cheret, P.; Brossier, P. Metalloimmunoassay of tricyclic antidepressant drugs: production and characterization of antiserum. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1986**, *54*, 237-253.
- [85] Di Gleria, K.; Hill, H.A.; McNeil, C.J.; Green, M.J. Homogeneous ferrocene-mediated amperometric immunoassay. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1203-1205.

- [86] Salmain, M.; Vessières, A.; Brossier, P.; Butler, I.S.; Jaouen, G. Carbonylmetalloimmunoassay (CMIA) a new type of non-radioisotopic immunoassay. Principles and application to phenobarbital assay. *J. Immunol. Methods*. **1992**, *148*, 65-75.
- [87] Limoges, B.; Degrand, C.; Brossier, P.; Blankespoor, R.L. Homogeneous electrochemical immunoassay using a perfluorosulfonated ionomer-modified electrode as detector for a cationic-labeled hapten. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1054-1060.
- [88] Salmain, M.; Vessières, A.; Jaouen, G.; Butler, I.S. Fourier transform infrared spectroscopic method for the quantitative trace analysis of transition-metal carbonyl-labeled bioligands. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2323-2329.
- [89] Butler, I.; Vessières, A.; Salmain, M.; Brossier, P.; Jaouen, G. Quantitative IR Analysis in the Picomole Range of Organometallic-Labeled Biomolecules in KBr Disks. *Appl. Spectrosc.* **1989**, *43*, 1497-1498.
- [90] Jaouen, G.; Vessieres, A.; Top, S.; Ismail, A.A.; Butler, I.S. Metal carbonyl fragments as a new class of markers in molecular biology. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4778-4780.
- [91] Bjorkman, A.; Bhattacharai, A. Public health impact of drug resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Trop.* **2005**, *94*, 163-169.
- [92] Yakoob, M.Y.; Zakaria, A.; Waqar, S.N.; Zafar, S.; Wahla, A.S.; Zaidi, S.K.; Sarwari, A.R.; Qureshi, R.N.; Siddiqui, A.R. Does malaria during pregnancy affect the newborn ? *J. Pak. Med. Assoc.* **2005**, *55*, 543-546.
- [93] Malaney, P.; Spielman, A.; Sachs, J. The malaria gap. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, *71*, 141-146.
- [94] Daher, W. *Nouvelles voies de lutte contre Plasmodium falciparum. I. Analogues ferrocéniques. II. LRR : une nouvelle famille de protéines parasitaires*. Thèse de doctorat, Parasitologie – Biologie Moléculaire, Institut Pasteur de Lille, **2006**.
- [95] Guerra, C.A.; Snow, R.W.; Hay, S.I. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitol.* **2006**, *22*, 353-358.
- [96] Hay, S.I.; Guerra, C.A.; Tatem, A.J.; Noor, A.M.; Snow, R.W. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect. Dis.* **2004**, *4*, 327-336.
- [97] Baird, J.K. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends parasitol.* **2007**, *23*, 533-539.
- [98] Mueller, I.; Zimmerman, P.A.; Reeder, J.C. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* – the ‘bashful’ malaria parasites. *Trends parasitol.* **2007**, *23*, 278-283.
- [99] Cox-Singh, J.; Davis, T.M.; Lee, K.S.; Shamsul, S.S.; Matusop, A.; Ratnam, S.; Rahman, H.A.; Conway, D.J.; Singh, B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46*, 165-171.
- [100] Yuda, M.; Ishino, T. Liver invasion by malarial parasites – how do malarial parasites break through the host barrier ? *Cell. Microbiol.* **2004**, *6*, 1119-1125.
- [101] Greenwood, B.M.; Fidock, D.A.; Kyle, D.E.; Kappe, S.H.I.; Alonso, P.L.; Collins, F.H.; Duffy, P.E. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 1266-1276.
- [102] Baer, K.; Klotz, C.; Kappe, S.H.; Schnieder, T.; Frevert, U. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathogens*. **2007**, *3*, e171.
- [103] Bannister, L.H.; Hopkins, J.M.; Fowler, R.E.; Krishna, S.; Mitchell, G.H. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol. Today*. **2000**, *16*, 427-433.

- [104] Diebner, H.H.; Eichner, M.; Molineaux, L.; Collins, W.E.; Jeffery, G.M.; Dietz, K. Modelling the transition of asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* to gametocytes. *J. Theor. Biol.* **2000**, *202*, 113-127.
- [105] Lacroix, R.; Mukabana, W.R.; Gouagna, L.C.; Koella, J.C. Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes. *PLoS Biol.* **2005**, *3*, e298.
- [106] Kariu, T.; Ishino, T.; Yano, K.; Chinzei, Y.; Yuda, M. CelTOS, a novel malaria protein that mediates transmission to mosquitos and vertebrate hosts. *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 1369-1379.
- [107] Akaki, M.; Dvorak, J.A. A chemotactic response facilitates mosquito salivary gland infection by malaria sporozoites. *J. Exp. Biol.* **2005**, *208*, 3211-3218.
- [108] Gardner, M.J.; Hall, N.; Fung, E.; White, O.; Berriman, M.; Hyman, R.W.; Carlton, J.M.; Pain, A.; Nelson, K.E.; Bowman, S.; Paulsen, I.T.; James, K.; Eisen, J.A.; Rutherford, K.; Salzberg, S.L.; Craig, A.; Kyes, S.; Chan, M.S.; Nene, V.; Shallom, S.J.; Suh, B.; Peterson, J.; Angiuoli, S.; Pertea, M.; Allen, J.; Selengut, J.; Haft, D.; Mather, M.W.; Vaidya, A.B.; Martin, D.M.; Fairlamb, A.H.; Fraunholz, M.J.; Roos, D.S.; Ralph, S.A.; McFadden, G.I.; Cummings, L.M.; Subramanian, G.M.; Mungall, C.; Venter, J.C.; Carucci, D.J.; Hoffman, S.L.; Newbold, C.; Davis, R.W.; Fraser, C.M.; Barrell, B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* **2002**, *419*, 498-511.
- [109] Egan, T. J. Haemozoin formation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, *157*, 127-136.
- [110] Aikawa, M.; Hepler, P.K.; Huff, C.G.; Sprinz, H. The feeding mechanism of avian malarial parasites. *J. Cell. Biol.* **1966**, *28*, 355-373.
- [111] Loria, P.; Miller, S.; Foley, M.; Tilley, L. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochem. J.* **1999**, *339*, 363-370.
- [112] Goldberg, D.E.; Slater, A.F.; Cerami, A.; Henderson, G.B. Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1990**, *87*, 2931-2935.
- [113] Banerjee, R.; Liu, J.; Beatty, W.; Pelosof, L.; Klemba, M.; Goldberg, D.E. Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 990-995.
- [114] Rosenthal, P.J.; Sijwali, P.S.; Singh, A.; Shenai, B.R. Cysteine proteases of malaria parasites: targets for chemotherapy. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 1659-1672.
- [115] Eggleston, K.K.; Duffin, K.L.; Goldberg, D.E. identification and characterization of falcilysin, a metallopeptidase involved in haemoglobin catabolism within the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 32411-32417.
- [116] Gavigan, C.S.; Dalton, J.P.; Bell, A. The role of aminopeptidases in haemoglobin degradation in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *117*, 37-48.
- [117] Krugliak, M.; Zhang, J.; Ginsburg, H. Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *119*, 249-256.
- [118] Lew, V.L.; Tiffert, T.; Ginsburg, H. Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood.* **2003**, *101*, 4189-4194.
- [119] Rosenthal, P.J.; Meshnick, S.R. Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, *83*, 131-139.

- [120] Francis, S.E.; Sullivan, D.J. Jr.; Goldberg, D.E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, *51*, 97-123.
- [121] Hoppe, H.C.; van Schalkwyk, D.A.; Wiehart, U.I.; Meredith, S.A.; Egan, J.; Weber, B.W. Antimalarial quinolines and artemisinin inhibit endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2370-2378.
- [122] Langreth, S.G.; Jensen, J.B.; Reese, R.T.; Trager, W. Fine structure of human malaria in vitro. *J. Protozool.* **1978**, *25*, 443-452.
- [123] Saliba, K.J.; Allen, R.J.; Zissis, S.; Bray, P.G.; Ward, S.A.; Kirk, K. Acidification of the malaria parasite's digestive vacuole by a H⁺-ATPase and a H⁺-pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 5605-5612.
- [124] Lazarus, M.D.; Schneider, T.G.; Taraschi, T.F. A new model for hemoglobin ingestion and transport by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Cell Science.* **2008**, *121*, 1937-1949.
- [125] Elliott, D.A.; McIntosh, M.T.; Hosgood, H.D.; Chen, S.; Zhang, G.; Baeovova, P.; Joiner, K.A. Four distinct pathways of hemoglobin uptake in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2008**, *105*, 2463-2468.
- [126] Oliaro, P.L.; Goldberg, D.E. The *Plasmodium* digestive vacuole: metabolic headquarters and choice drug target. *Parasitol. Today.* **1995**, *11*, 294-297.
- [127] Slomianny, C. Three-dimensional reconstruction of the feeding process of the malaria parasite. *Blood Cells.* **1990**, *16*, 369-378.
- [128] Hempelmann, E.; Motta, C.; Hughes, R.; Ward, S.A.; Bray, P.G. *Plasmodium falciparum*: sacrificing membrane to grow crystals? *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 23-26.
- [129] Goldberg, D.E. Hemoglobin degradation in *Plasmodium*-infected red blood cells. *Semin. Cell Biol.* **1993**, *4*, 355-361.
- [130] Slomianny, C.; Prensier, G. A cytochemical ultrastructural study of the lysosomal system of different species of malaria parasites. *J. Protozool.* **1990**, *37*, 465-470.
- [131] Eckman, J.R. ; Modler, S. ; Eaton, J.W. ; Berger, E. ; Engel, R.R. Host heme catabolism in drug-sensitive and drug-resistant malaria. *J. Lab. Clin. Med.* **1977**, *90*, 767-770.
- [132] Brown, W.H. Malarial pigment (so-called melanin): its nature. and mode of production. *J. Exp. Med.* **1911**, *13*, 290-300.
- [133] Ladan, H.; Nitzan, Y.; Malik, Z. The antibacterial activity of haemin compared with cobalt, zinc and magnesium protoporphyrin and its effect on potassium loss and ultrastructure of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1993**, *112*, 173-178.
- [134] Becker, K.; Tilley, L.; Vennerstrom, J.L.; Roberts, D.; Rogerson, S.; Ginsburg, H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int. J. Parasitol.* **2004**, *34*, 163-189.
- [135] Pagola, S.; Stephens, P.W.; Bohle, D.S.; Kosar, A.D.; Madsen, S.K. The structure of malaria pigment (β -haematin). *Nature.* **2000**, *404*, 307-310.
- [136] Ginsburg, H.; Famin, O.; Zhang, J.; Krugliak, M. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 1305-1313.

- [137] Egan, T.J.; Combrinck, J.M.; Egan, J.; Hearne, G.R.; Marques, H.M.; Ntenti, S.; Sewell, B.T.; Smith, P.J.; Taylor, D.; van Schalkwyk, D.A.; Walden, J.C. Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* **2002**, *365*, 343-347.
- [138] Day, N.P.; Pham, T.D.; Phan, T.L.; Dinh, X.S.; Pham, P.L.; Ly, V.C.; Tran, T.H.; Nguyen, T.H.; Bethell, D.B.; Nguyen, H.P.; Tran, T.H.; White, N.J. Clearance kinetics of parasites and pigment-containing leukocytes in severe malaria. *Blood*. **1996**, *88*, 4694-700.
- [139] Sullivan, D.J.; Gluzman, I.Y.; Russell, D.G.; Goldberg, D.E. On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1996**, *93*, 11865-11870.
- [140] Papalexis, V.; Siomos, M.A.; Campanale, N.; Guo, X.; Kocak, G.; Foley, M.; Tilley, L. Histidine-rich protein 2 of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is involved in detoxification of the by-products of haemoglobin degradation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *115*, 77-86.
- [141] Sullivan, D.J.; Gluzman, I.Y.; Goldberg, D.E. *Plasmodium* Hemozoin Formation Mediated by Histidine-Rich Proteins. *Science*. **1996**, *271*, 219-222.
- [142] Choi, C.Y.H.; Cerda, J.F.; Chu, H.-A.; Babcock, G.T.; Marletta, M.A. Spectroscopic Characterization of the Heme-Binding Sites in *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2. *Biochemistry*. **1999**, *38*, 16916-16924.
- [143] Sullivan, D.J. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int. J. Parasitol.* **2002**, *32*, 1645-1653.
- [144] Slater, A.F.G.; Swiggard, W.J.; Orton, B.R.; Flitter, W.D.; Goldberg, D.E.; Cerami, A.; Henderson, G.B. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1991**, *88*, 325-329.
- [145] Bohle, S.D.; Dinnebier, R.E.; Madsen, S.K.; Stephens, P.W. Characterization of the Products of the Heme Detoxification Pathway in Malarial Late Trophozoites by X-ray Diffraction. *J. Biol. Chem.* **1996**, *272*, 713-716.
- [146] Bendrat, K.; Berger, B.J.; Cerami, A. Haem polymerization in malaria. *Nature*. **1995**, *378*, 138.
- [147] Dorn, A.; Vippagunta, S.R.; Matile, H.; Bubendorf, A.; Vennerstrom, J.L.; Ridley, R.G. A Comparison and analysis of several ways to promote haematin (haem) polymerisation and an assessment of its initiation *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 737-747.
- [148] Fitch, C.D.; Cai, G.Z.; Chen, Y.F.; Shoemaker, J.D. Involvement of lipids in ferriprotoporphyrin IX polymerization in malaria. *Biochim. Biophys. Acta*. **1999**, *1454*, 31-37.
- [149] Coppens, I.; Vielemeyer, O. Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: from storage to potential mediation in parasite metabolic activities. *Int. J. Parasitol.* **2005**, *35*, 597-615.
- [150] Soares, J.B.R.C.; Lara, F.A.; Cunha, P.R.B.B.; Atella, G.C.; Maya-Monteiro, C.M.; d'Avila, J.C.P.; Menezes, D.; Vannier-Santos, M.; Oliveira, P.L.; Egan, T.J.; Oliveira, M.F. Extracellular lipid droplets promote hemozoin crystallization in the gut of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 1742-1750.
- [151] Jackson, K.E.; Klonis, N.; Ferguson, D.J.P.; Adisa, A.; Dogovski, C.; Tilley, L. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **2004**, *54*, 109-122.
- [152] Oliveira, M.F.; Kycia, S.W.; Gomez, A.; Kosar, A.J.; Bohle, D.S.; Hempelmann, E.; Menezes, D.; Vannier-Santos, M.A.; Oliveira, P.L.; Ferreira, S.T. Structural and morphological characterization of hemozoin produced by *Schistosoma mansoni* and *Rhodnius prolixus*. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6010-6016.

- [153] Pisciotta, J.M.; Coppens, I.; Tripathi, A.K.; Scholl, P.F.; Shuman, J.; Bajad, S.; Shulaev, V.; Sullivan, D.J. Jr. The role of neutral lipid nanospheres in *Plasmodium falciparum* heme crystallization. *Biochem. J.* **2007**, *402*, 197-204.
- [154] Egan, T.J.; Chen, J.Y.-J.; de Villiers, K.A.; Mabotha, T.E.; Naidoo, K.J.; Ncokazi, K.K.; Langford, S.J.; McNaughton, D.; Pandiancherri, S.; Wood, B.R. Haemozoin (beta-haematin) biomineralization occurs by self-assembly near the lipid/water interface. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 5105-5110.
- [155] Corrêa Soares, J.B.; Maya-Monteiro, C.M.; Bittencourt-Cunha, P.R.; Atella, G.C.; Lara, F.A.; d'Avila, J.C.; Menezes, D.; Vannier-Santos, M.A.; Oliveira, P.L.; Egan, T.J.; Oliveira, M.F. Extracellular lipid droplets promote hemozoin crystallization in the gut of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 1742-1750.
- [156] Egan, T.J. Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1288-1299.
- [157] Hempelmann, E.; Egan, T.J. Pigment biocrystallization in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* **2002**, *18*, 11.
- [158] Ziegler, J.; Chang, R.T.; Wright, D.W. Multiple-antigenic peptides of histidine-rich protein II of *Plasmodium falciparum* : dendrimeric biomineralization templates. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2395-2400.
- [159] Egan, T.J.; Mavuso, W.W.; Ncokazi, K.K. The Mechanism of β -Hematin Formation in Acetate Solution. Parallels between Hemozoin Formation and Biomineralization Processes. *Biochemistry.* **2001**, *40*, 204-213.
- [160] Egan, T.J.; Hempelmann, E.; Mavuso, W.W. Characterisation of synthetic beta-haematin and effects of the antimalarial drugs quinidine, halofantrine, desbutylhalofantrine and mefloquine on its formation. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *73*, 101-107.
- [161] Noland, G.S.; Briones, N.; Sullivan, D.J. Jr. The shape and size of haemozoin crystals distinguishes diverse *Plasmodium* species. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *130*, 91-99.
- [162] Omodeo-Sale, F.; Motti, A.; Dondorp, A.; White, N.J.; Taramelli, D. Destabilisation and subsequent lysis of human erythrocytes induced by *Plasmodium falciparum* haem products. *Eur. J. Haematol.* **2005**, *74*, 324-332.
- [163] Hänscheid, T.; Egan, T.J.; Grobusch, M.P. Haemozoin: from melatonin pigment to drug target, diagnostic tool, and immune modulator. *Lancet. Infect. Dis.* **2007**, *7*, 675-685.
- [164] Paul, F.; Roath, S.; Melville, D.; Warhurst, D.C.; Osisanya, J.O. Separation of malaria-infected erythrocytes from whole blood: use of a selective high-gradient magnetic separation technique. *Lancet.* **1981**, *2*, 70-71.
- [165] Packer, H. The use of darkfield illumination in studies of malaria patients. *J. Natl. Malar. Soc.* **1945**, *4*, 330-340.
- [166] Lawrence, C. Laveran remembered: malaria haemozoin in leucocytes. *Lancet.* **2002**, *353*, 1852.
- [167] Jamjoom, G.A. Improvement in dark-field microscopy for the rapid detection of malaria parasites and its adaptation to field conditions. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1991**, *85*, 38-39.
- [168] Scholl, P.F.; Kongkasuriyachai, D.; Demirev, P.A.; Feldman, A.B.; Lin, J.S.; Sullivan, D.J. Jr.; Kumar, N. Rapid detection of malaria infection in vivo by laser desorption mass spectrometry. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, *71*, 546-551.
- [169] Nyunt, M.; Pisciotta, J.; Feldman, A.B.; Thuma, P.; Scholl, P.F.; Demirev, P.A.; Lin, J.S.; Shi, L.; Kumar, N.; Sullivan, D.J. Jr. Detection of *Plasmodium falciparum* in pregnancy by laser desorption mass spectrometry. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, *73*, 485-490.

- [170] Atamna, H.; Ginsburg, H. Heme degradation in the presence of glutathione. A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24876-24883.
- [171] Harwaldt, P.; Rahlfs, S.; Becker, K. Glutathione S-transferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: characterization of a potential drug target. *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 821-830.
- [172] Buchholz, K.; Schirmer, R.H.; Eubel, J.K.; Akoachere, M.B.; Dandekar, T.; Becker, K.; Gromer, S. Interactions of methylene blue with human disulfide reductases and their orthologues from *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 183-191.
- [173] Danis, M. Therapeutic advances against malaria in 2003. *Med. Trop.* **2003**, *63*, 267-270.
- [174] Pradines, B.; Vial, H.; Olliaro, P. Malaria prophylaxis and treatment: problems, recent developments and perspectives. *Med. Trop.* **2003**, *63*, 79-98.
- [175] Coatney, G.R. Pitfalls in a discovery: the chronicle of chloroquine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1963**, *12*, 121-128.
- [176] Baird, J.K. Resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 4075-4083.
- [177] Wernsdorfer, W.H. The development and spread of drug-resistant malaria. *Parasitol. Today.* **1991**, *7*, 297-303.
- [178] Cohen, S. N.; Yielding, K. L. Spectrophotometric studies of the interaction of chloroquine with deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 3123-3131.
- [179] Pradines, B.; Alibert, S.; Houdoin, C.; Santelli-Rouvier, C.; Mosnier, J.; Fusai, T.; Rogier, C.; Barbe, J.; Parzy, D. *In vitro* increase in chloroquine accumulation induced by dihydroethano- and ethenoanthracene derivatives in *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2061-2068.
- [180] Schlesinger, P.H.; Krogstad, D.J.; Herwaldt, B.L. Antimalarial agents: mechanisms of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32*, 793-798.
- [181] Bray, P.G.; Mungthin, M.; Ridley, R.G.; Ward, S.A. Access to Hematin: The Basis of Chloroquine resistance. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 170-179.
- [182] Fidock, D.A.; Nomura, T.; Cooper, R.A.; Su, X.; Talley, A.K.; Wellems, T.E. Allelic modifications of the *cg2* and *cg1* genes do not alter the chloroquine response of drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *110*, 1-10.
- [183] Sanchez, C.P.; Wunsch, S.; Lanzer, M. Identification of a chloroquine importer in *Plasmodium falciparum*. Differences in import kinetics are genetically linked with the chloroquine-resistant phenotype. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2652-2658.
- [184] Wunsch, S.; Sanchez, C.P.; Gekle, M.; Große-Wortmann, L.; Wiesner, J.; Lanzer, M. Differential stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger determines chloroquine uptake in *Plasmodium falciparum*. *J. Cell. Biol.* **1998**, *140*, 335-345.
- [185] Bray, P.G.; Janneh, O.; Raynes, K.J.; Mungthin, M.; Ginsburg, H.; Ward, S.A. Cellular uptake of chloroquine is dependent on binding to ferriprotoporphyrin IX and is independent of NHE activity in *Plasmodium falciparum*. *J. Cell. Biol.* **1999**, *145*, 363-376.
- [186] Egan, T.J. Interactions of quinoline antimalarials with hematin in solution. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 916-26.

- [187] Moreau, S.; Perly, B.; Biguet, J. Interactions de la chloroquine avec la ferriprotoporphyrine IX : étude par résonnance magnétique nucléaire. *Biochimie*. **1982**, *64*, 1015-1025.
- [188] Constantinidis, I.; Satterlee, J.D. UV-visible and carbon NMR studies of chloroquine binding to urohematin I chloride and uroporphyrin I in aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4391-4395.
- [189] Egan, T.J.; Mavuso, W.W.; Ross, D.C.; Marques, H.M. Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. *J. Inorg. Biochem.* **1997**, *68*, 137-145.
- [190] Dascombe, M.J.; Drew, M.G.B.; Morris, H.; Wilairat, P.; Auparakkitanon, S.; Moule, W.A.; Alizadeh-Shekalgourabi, S.; Evans, P.G.; Lloyd, M.; Dyas, A.M.; Carr, P.; Ismail, F.M. Mapping antimalarial pharmacophores as a useful tool for the rapid discovery of drugs effective in vivo: design, construction, characterization, and pharmacology of mefloquine. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5423-5436.
- [191] Chong, C.R.; Sullivan, D.J. Inhibition of heme crystal growth by antimalarials and other compounds: implications for drug discovery. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 2201-2212.
- [192] Egan, T.J.; Ncokazi, K.K. Quinoline antimalarials decrease the rate of beta-hematin formation. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1532-1539.
- [193] de Villiers, K.A.; Kaschula, C.H.; Egan, T.J.; Marques, H.M. Speciation and structure of ferriprotoporphyrin IX in aqueous solution: spectroscopic and diffusion measurements demonstrate dimerization, but not 1-oxo dimer formation. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 101-117.
- [194] Ursos, L.M.; Dzekunov, S.M.; Roepe, P.D. The effects of chloroquine and verapamil on digestive vacuolar pH of *P. falciparum* either sensitive or resistant to chloroquine. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *110*, 125-134.
- [195] Ursos, L.M.; DuBay, K.F.; Roepe, P.D. Antimalarial drugs influence the pH dependent solubility of heme via apparent nucleation phenomena. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *112*, 11-17.
- [196] Klonis, N.; Tan, O.; Jackson, K.; Goldberg, D.; Klemba, M.; Tilley, L. Evaluation of pH during cytosomal endocytosis and vacuolar catabolism of haemoglobin in *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* **2007**, *407*, 343-354.
- [197] Gluzman, I.Y.; Francis, S.E.; Oksman, A.; Smith, C.E.; Duffin, K.L.; Goldberg, D.E. Order and specificity of the *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation pathway. *J. Clin. Invest.* **1994**, *93*, 1602-1608.
- [198] White, N.J. Preventing antimalarial drug resistance through combinations. *Drug Res. Updates.* **1998**, *1*, 3-9.
- [199] Macomber, P.B.; O'Brien, R.L.; Hahn, F.E. Chloroquine: physiological basis of drug resistance in *Plasmodium berghei*. *Science*. **1966**, *152*, 1374-1375.
- [200] Verdier, F.; Le Bras, J.; Clavier, F.; Hatin, I.; Blayo, M.C. Chloroquine uptake by *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes during *in vitro* culture and its relationship to chloroquine resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 561-564.
- [201] Krogstad, D.J.; Gluzman, I.Y.; Kyle, D.E.; Oduola, A.M.; Martin, S.K.; Milhous, W.K.; Schlesinger, P.H. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science*. **1987**, *238*, 1283-1285.
- [202] Foote, S.J.; Kyle, D.E.; Martin, R.K.; Oduola, A.M.J.; Forsyth, K.; Kemp D.J.; Cowman, A.F. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. **1990**, *345*, 255-258.

- [203] Dorsey, G.; Kamya, M.R.; Singh, A.; Rosenthal, P.J. Polymorphisms in the *Plasmodium falciparum* *pfcr* and *pfmdr-1* genes and clinical response to chloroquine in Kampala, Uganda. *J. Infect. Dis.* **2001**, *183*, 1417-1420.
- [204] Reed, M.B.; Saliba, K.J.; Caruana, S.R.; Kirk, K.; Cowman, A.F. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. **2000**, *403*, 906-909.
- [205] Duraisingh, M.T.; Roper, C.; Walliker, D.; Warhurst, D.C. Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **2000**, *36*, 955-961.
- [206] Johnson, D.J.; Owen, A.; Plant, N.; Bray, P.G.; Ward, S.A. Drug-regulated expression of *Plasmodium falciparum* P-glycoprotein homologue 1: a putative role for nuclear receptors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 1438-1445.
- [207] Su, X.; Kirkman, L.A.; Fujioka, H.; Wellems, T.E. Complex polymorphisms in an approximately 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell*. **1997**, *91*, 593-603.
- [208] Ridley, R.G. Malaria: dissecting chloroquine resistance. *Curr. Biol.* **1998**, *8*, R346-349.
- [209] Fidock, D.A.; Nomura, T.; Talley, A.K.; Cooper, R.A.; Dzekunov, S.M.; Ferdig, M.T.; Ursos, L.M.; Sidhu, A.B.; Naudé, B.; Deitsch, K.W.; Su, X.Z.; Wootton, J.C.; Roepe, P.D.; Wellems, T.E. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *PfCRT* and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol. Cell.* **2000**, *6*, 861-871.
- [210] Wellems, T.E.; Plowe, C.V. Chloroquine-resistant malaria. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 770-776.
- [211] Cooper, R.A.; Ferdig, M.T.; Su, X.Z.; Ursos, L.M.; Mu, J.; Nomura, T.; Fujioka, H.; Fidock, D.A.; Roepe, P.D.; Wellems, T.E. Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein *PfCRT* are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 35-42.
- [212] Sanchez, C.P.; McLean, J.E.; Stein, W.; Lanzer, M. Evidence for a substrate specific and inhibitable drug efflux system in chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* strains. *Biochemistry*. **2004**, *43*, 16365-16373.
- [213] Waller, K.L.; Muhle, R.A.; Ursos, L.M.; Horrocks, P.; Verdier-Pinard, D.; Sidhu, A.B.; Fujioka, H.; Roepe, P.D.; Fidock, D.A. Chloroquine resistance modulated in vitro by expression levels of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 33593-33601.
- [214] Dutzler, R.; Campbell, E.B.; Cadene, M.; Chait, B.T.; MacKinnon, R. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*. **2002**, *415*, 287-294.
- [215] Zhang, H.; Howard, E.M.; Roepe, P.D. Analysis of the antimalarial drug resistance protein *Pfcr* expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 49767-49775.
- [216] Warhurst, D.C. Polymorphism in the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance transporter protein links verapamil enhancement of chloroquine sensitivity with the clinical efficacy of amodiaquine. *Malar. J.* **2003**, *2*, 31.
- [217] Dzekunov, S.M.; Ursos, L.M.; Roepe, P.D. Digestive vacuolar pH of intact intraerythrocytic *P. falciparum* either sensitive or resistant to chloroquine. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *110*, 107-124.
- [218] Bennett, T.N.; Kosar, A.D.; Ursos, L.M.; Dzekunov, S.; Singh Sidhu, A.B.; Fidock, D.A.; Roepe, P.D. Drug resistance-associated *PfCRT* mutations confer decreased *Plasmodium falciparum* digestive vacuolar pH. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, *133*, 99-114.

- [219] Hayward, R.; Saliba, K.J.; Kirk, K. The pH of the digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* is not associated with chloroquine resistance. *J. Cell. Sci.* **2006**, *119*, 1016-1025.
- [220] Djimdé, A.; Doumbo, O.K.; Cortese, J.F.; Kayentao, K.; Doumbo, S.; Diourté, Y.; Dicko, A.; Su, X.Z.; Nomura, T.; Fidock, D.A.; Wellems, T.E.; Plowe, C.V.; Coulibaly, D. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 257-263.
- [221] Durand, R.; Jafari, S.; Vauzelle, J.; Delabre, J.F.; Jesic, Z.; Le Bras, J. Analysis of *pfcr* point mutations and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *114*, 95-102.
- [222] Durrand, V.; Berry, A.; Sem, R.; Glaziou, P.; Beaudou, J.; Fandeur, T. Variations in the sequence and expression of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*PfCRT*) and their relationship to chloroquine resistance *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, *136*, 273-285.
- [223] Dubois, V.L.; Platel, D.F.; Pauly, G.; Tribouley-Duret, J. *Plasmodium berghei* : implication of intracellular glutathione and its related enzyme in chloroquine resistance *in vivo*. *Exp. Parasitol.* **1995**, *81*, 117-124.
- [224] Platel, D.F.; Mangou, F.; Tribouley-Duret, J. Role of glutathione in the detoxification of ferriprotoporphyrin IX in chloroquine resistant *Plasmodium berghei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1999**, *98*, 215-223.
- [225] Ginsburg, H.; Golenser, J. Glutathione is involved in the antimalarial action of chloroquine and its modulation affects drug sensitivity of human and murine species of *Plasmodium*. *Redox Rep.* **2003**, *8*, 276-279.
- [226] Famin, O.; Krugliak, M.; Ginsburg, H. Kinetics of inhibition of glutathione-mediated degradation of ferriprotoporphyrin IX by antimalarial drugs. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 59-68.
- [227] Perez-Rosado, J.; Gervais, G.W.; Ferrer-Rodríguez, I.; Peters, W.; Serrano, A.E. *Plasmodium berghei*: analysis of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene in drug-resistant lines. *Exp. Parasitol.* **2002**, *101*, 175-182.
- [228] Ferreira, I.D.; Nogueira, F.; Borges, S.T.; do Rosário, V.E.; Cravo, P. Is the expression of genes encoding enzymes of glutathione (GSH) metabolism involved in chloroquine resistance in *Plasmodium chabaudi* parasites? *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, *136*, 43-50.
- [229] Srivastava, P.; Puri, S.K.; Kamboj, K.K.; Pandey, V.C. Glutathione-S-transferase activity in malarial parasites. *Trop. Med. Int. Health.* **1999**, *4*, 251-254.
- [230] Rojpiulstit, P.; Kangsadalampai, S.; Ratanavalachai, T.; Denduangboripant, J.; Chavalitsheewinkoon-Petmitr, P. Glutathione-S-transferases from chloroquine-resistant and -sensitive strains of *Plasmodium falciparum*: what are their differences? *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* **2004**, *35*, 1489-1499.
- [231] Deponte, M.; Becker, K. Glutathione S-transferase from malarial parasites: structural and functional aspects. *Methods Enzymol.* **2005**, *401*, 241-253.
- [232] Meierjohann, S.; Walter, R.D.; Müller, S. Regulation of intracellular glutathione levels in erythrocytes infected with chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* **2002**, *368*, 761-768.
- [233] Safeukui, I.; Mangou, F.; Malvy, D.; Vincendeau, P.; Mossalayi, D.; Haumont, G.; Vatan, R.; Oliaro, P.; Millet, P. *Plasmodium berghei*: dehydroepiandrosterone sulfate reverses chloroquine-resistance in experimental malarial infection; correlation with glucose 6-phosphate dehydrogenase and glutathione synthesis pathway. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 1903-1910.

- [234] Deharo, E.; Barkan, D.; Krugliak, M.; Golenser, J.; Ginsburg, H. Potentiation of the antimalarial action of chloroquine in rodent malaria by drugs known to reduce cellular glutathione levels. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 809-817.
- [235] Vijaykadga, S.; Rojanawatsirivej, C.; Cholpol, S.; Phoungmanee, D.; Nakavej, A.; Wongsrichanalai, C. In vivo sensitivity monitoring of mefloquine monotherapy and artesunate-mefloquine combinations for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Thailand in 2003. *Trop. Med. Int. Health.* **2006**, *11*, 211-219.
- [236] Adjuik, M.; Agnamey, P.; Babiker, A.; Borrmann, S.; Brasseur, P.; Cisse, M.; Cobelens, F.; Diallo, S.; Faucher, J.F.; Garner, P.; Gikunda, S.; Kremsner, P.G.; Krishna, S.; Lell, B.; Loolpapit, M.; Matsiegui, P.-B.; Missinou, M.A.; Mwanza, J.; Ntoumi, F.; Olliaro, P.; Osimbo, P.; Rezbach, P.; Some, E.; Taylor, W.R.J. Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in African children: a randomised, multicentre trial. *Lancet.* **2002**, *359*, 1365-1372.
- [237] Price, R.N.; Uhlemann, A.C.; Brockmann, A.; McGready, R.; Ashley, E.; Phaipun, L.; Patel, R.; Laing, K.; Looareesuwan, S.; White, N.J.; Nosten, F.; Krishna, S. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet.* **2004**, *364*, 438-447.
- [238] Shanks, G.D.; Edstein, M.D. Modern malaria chemoprophylaxis. *Drugs.* **2005**, *65*, 2091-2110.
- [239] Conner, B.A. Expert recommendations for antimalarial prophylaxis. *J. Travel Med.* **2001**, *8*, S57-S64.
- [240] Franco-Paredes, C.; Santos Preciado, J.I. Problem pathogens: prevention of malaria in travellers. *Lancet.* **2006**, *6*, 139-149.
- [241] Bermann, J. Toxicity of commonly-used antimalarial drugs. *Travel Med. Infect. Dis.* **2004**, *2*, 171-184.
- [242] Taylor, W.R.J.; White, N.J. Antimalarial drug toxicity: a review. *Drug Saf.* **2004**, *27*, 25-61.
- [243] Dorn, A.; Vippagunta, S.R.; Matile, H.; Jaquet, C.; Vennerstrom, J.L.; Ridley, R.G. An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinone antimalarials. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 727-736.
- [244] Go, M.L.; Ngiam, T.L. Thermodynamics of partitioning of the antimalarial drug mefloquine in phospholipid bilayers and bulk solvents. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *21*, 29-34.
- [245] Go, M.L.; Lee, H.S.; Palade, P. Effets of mefloquine on Ca^{2+} uptake by crude microsomes of rabbit skeletal muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1995**, *329*, 255-271.
- [246] Nori, V.S.; Barry, S.R. Toxic effects of antimalarial drugs in *Paramecium*: role of calcium channels. *J. Comp. Physiol. [A]*. **1997**, *180*, 473-480.
- [247] Traebert, M.; Dumotier, B.; Meister, L.; Hoffmann, P.; Dominguez-Estevéz, M.; Suter, W. Inhibition of hERG K^+ currents by antimalarial drugs in stably transfected HEK293 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *484*, 41-48.
- [248] Dow, G.S.; Hudson, T.H.; Vahey, M.; Koenig, M.L. The acute neurotoxicity of mefloquine may be mediated through a disruption of calcium homeostasis and ER function *in vitro*. *Malar. J.* **2003**, *2*, 14.
- [249] Fitch, C.D. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci.* **2004**, *74*, 1957-1972.
- [250] Duraisingh, M.T.; Jones, P.; Sambou, I.; von Seidlein, L.; Pinder, M.; Warhurst, D.C. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *108*, 13-23.

- [251] Sidhu, A.B.S.; Valderramos, S.G.; Fidock, D.A. *pfmdr1* mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **2005**, *57*, 913-926.
- [252] White, N.J. Antimalarial drug resistance. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1084-1092.
- [253] Duraisingh, M.T.; Cowman, A.F. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop.* **2005**, *94*, 181-190.
- [254] Uhlemann, A.-C.; Ramharter, M.; Lell, B.; Kremsner, P.G.; Krishna, S. Amplification of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1 in isolates from Gabon. *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 1830-1835.
- [255] Uhlemann, A.-C.; Krishna, S. Malaria: Drugs, Disease and Post-genomic Biology. *Curr. Trop. Microb. Immun.* **2005**, *295*, 39-53.
- [256] Woodrow, C.J.; Krishna, S. Antimalarial drugs: recent advances in molecular determinants of resistance and their clinical significance. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 1586-1596.
- [257] Jeffress, M.; Fields, S. Identification of putative *Plasmodium falciparum* mefloquine resistance genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2005**, *139*, 133-139.
- [258] Haynes, R.K.; Vonwiller, S.C. From *qinghao*, marvelous herb of antiquity, to the antimalarial trioxane *qinghaosu*: and some remarkable new chemistry. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 73-79.
- [259] Faye, O.; Conca, J.; Camara, B.; Dieng, T.; Dieng, Y.; Gaye, O.; Bah, I.B.; N'Dir, O.; Fall, M.; Diello, S. Létalité palustre en milieu pédiatrique dakarois : étude des facteurs de risque. *Med. Trop.* **1998**, *58*, 361-364.
- [260] Olliaro, P.L.; Haynes, R.K.; Meunier, B.; Yuthavong, Y. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. *Trends Parasitol.* **2001**, *17*, 122-6.
- [261] Cumming, J.N.; Ploypradith, P.; Posner, G.H. Antimalarial activity of artemisinin (*qinghaosu*) and related trioxanes: mechanism(s) of action. *Adv. Pharmacol.* **1997**, *37*, 253-297.
- [262] Brossi, A.; Venugopalan, B.; Dominguez Gerpe, L.; Yeh, H.J.; Flippen-Anderson, J.L.; Buchs, P.; Luo, X.D.; Milhous, W.; Peters, W. Arteether, a new antimalarial drug: synthesis and antimalarial properties. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 645-650.
- [263] Robert, A.; Coppel, Y.; Meunier, B. Alkylation of heme by the antimalarial drug artemisinin. *Chem. Commun.* **2002**, *5*, 414-415.
- [264] Meshnick, S.R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int. J. Parasitol.* **2002**, *32*, 1655-1660.
- [265] O'Neill, P.M.; Posner, G.H. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2945-2964.
- [266] Sibmooh, N.; Pipitaporn, B.; Wilairatana, P.; Dangdounjai, J.; Udomsangpetch, R.; Looareesuiwan, S.; Chantharaksri, U. Effect of artemisinin on lipid peroxidation and fluidity of the erythrocyte membrane in malaria. *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, *23*, 1275-1280.
- [267] Berman, P.A.; Adams, P.A. Artemisinin enhances heme-catalysed oxidation of lipid membranes. *Free Rad. Biol. Med.* **1997**, *22*, 1283-1288.
- [268] Meshnick, S.R.; Yang, Y.Z.; Lima, V.; Kuypers, F.; Kamchonwongpaisan, S.; Yuthavong, Y. Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (*qinghaosu*). *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1993**, *37*, 1108-1114.

- [269] Robert, A.; Benoit-Vical, F.; Claparols, C.; Meunier, B. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 13676-13680.
- [270] Posner, G.H.; O'Neill, P.M. Knowledge of the proposed chemical mechanism of action and cytochrome p450 metabolism of antimalarial trioxanes like artemisinin allows rational design of new antimalarial peroxides. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 397-404.
- [271] Haynes, R.K.; Krishna, S. Artemisinins: activities and actions. *Microbes Infect.* **2004**, *6*, 1339-1346.
- [272] Krishna, S.; Uhlemann, A.-C.; Haynes, R.K. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resist. Updates.* **2004**, *7*, 233-244.
- [273] Krishna, S.; Woodrow, C.J.; Staines, H.M.; Haynes, R.K.; Mercereau-Puijalon, O. Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of *in vitro* resistance. *Trends Mol. Med.* **2006**, *12*, 200-205.
- [274] Eckstein-Ludwig, U.; Webb, R.J.; Van Goethem, I.D.; East, J.M.; Lee, A.G.; Kimura, M.; O'Neill, P.M.; Bray, P.G.; Ward, S.A.; Krishna, S. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature.* **2003**, *424*, 957-961.
- [275] Jung, M.; Kim, H.; Nam, K.Y.; No, K.T. Three-dimensional structure of *Plasmodium falciparum* Ca²⁺ - ATPase(PfATP6) and docking of artemisinin derivatives to PfATP6. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2994-2997.
- [276] Das, B.; Jena, R.K.; Swain, K.P.; Parida, P. Emerging resistance of *Plasmodium falciparum* to artemisinin and related compounds. *J. Ass. Physicians India.* **2000**, *48*, 443-444.
- [277] Jambou, R.; Legrand, E.; Niang, M.; Khim, N.; Lim, P.; Volney, B.; Ekala, M.T.; Bouchier, C.; Esterre, P.; Fandeur, T.; Mercereau-Puijalon, O. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to *in vitro* artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet.* **2005**, *366*, 1960-1963.
- [278] Menard, D.; Matsika-Claquin, M.D.; Djalle, D.; Yapou, F.; Manirakiza, A.; Dolmazon, V.; Sarda, J.; Talarmin, A. Association of failures of seven-day courses of artesunate in a non-immune population in Bangui, Central African Republic with decreased sensitivity of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, *73*, 616-621.
- [279] Uhlemann, A.-C.; Cameron, A.; Eckstein-Ludwig, U.; Fischbarg, J.; Iserovich, P.; Zuniga, F.A.; East, M.; Lee, A.; Brady, L.; Haynes, R.K.; Krishna, S. A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 628-629.
- [280] Afonso, A.; Hunt, P.; Cheesman, S.; Alves, A.C.; Cunha, C.V.; do Rosário, V.; Cravo, P. Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 480-489.
- [281] World Health Organization. The World Health Report **2006**, <http://www.who.int/en>.
- [282] Dombrowski, K.E.; Baldwin, W.; Sheats, J.E. Metallocenes in biochemistry, microbiology and medicine. *J. Organomet. Chem.* **1986**, *302*, 281-306.
- [283] Top, S.; Tang, J.; Vessièrès, A.; Carrez, D.; Provot, C.; Jaouen, G. First synthesis of a C-glycoside analogue of a tumor-associated carbohydrate antigen employing samarium diiodide promoted C-glycosylation. *Chem. Commun.* **1996**, *8*, 955-956.
- [284] van Staveren, D.R.; Metzler-Nolte, N. Bioorganometallic chemistry of ferrocene. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5931-5986.

- [285] Biot, C. *Molécules ferrocéniques antipaludiques – Synthèse, caractérisation et activité*. Thèse de doctorat, Chimie organique et macromoléculaire, Université de Lille 1, **1998**.
- [286] De, D.; Krogstad, F.M.; Cogswell, F.B.; Krogstad, D.J. Aminoquinolines that circumvent resistance in *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1996**, *55*, 579-583.
- [287] Thompson, P.E.; Werbel, L.M. *Antimalarial agents: chemistry and pharmacology*. Academic Press, New York, **1972**.
- [288] Chibale, K.; Moss, J.R.; Blackie, M.; van Schalkwyk, D.; Smith, P.J. New amine and urea analogs of ferrochloroquine: synthesis, antimalarial activity in vitro and electrochemical studies. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6231-6235.
- [289] Biot, C.; Daher, W.; Ndiaye, C.M.; Melnyk, P.; Pradines, B.; Chavain, N.; Pellet, A.; Fraisse, L.; Pelinski, L.; Jarry, C.; Brocard, J.; Khalife, J.; Forfar-Bares, I.; Dive, D. Probing the role of the covalent linkage of ferrocene into a chloroquine template. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4707-4714.
- [290] Verdier, F.; Le Bras, J.; Clavier, F.; Hatin, I. Blood levels and in vitro activity of desethylchloroquine against *Plasmodium falciparum*. *The lancet.* **1984**, *323*, 1186-1187.
- [291] Beagley, P.; Blackie, M.A.L.; Chibale, K.; Clarkson, C.; Meijboom, R.; Moss, J.R.; Smith, P.J.; Su, H. Synthesis and antiplasmodial activity in vitro of new ferrocene-chloroquine analogues. *Dalton Trans.* **2003**, *15*, 3046-3051.
- [292] Biot, C.; Dessolin, J.; Ricard, I.; Dive D. Easily synthesized antimalarial ferrocene triazacyclononane quinoline conjugates. *Organomet. Chem.* **2004**, *689*, 4678-4682.
- [293] Delhaes, L.; Abessolo, H.; Biot, C.; Berry, L.; Delcourt, P.; Maciejewski, L.; Brocard, J.; Camus, D.; Dive, D. In vitro and in vivo antimalarial activity of ferrochloroquine, a ferrocenyl analogue of chloroquine against chloroquine-resistant malaria parasites. *Parasitol. Res.* **2001**, *87*, 239-244.
- [294] Kreidenweiss, A.; Kremsner, P.G.; Dietz, K.; Mordmüller, B. In vitro activity of ferroquine (SAR97193) is independent of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *75*, 1178-1181.
- [295] Dive, D.; Biot, C. Ferrocene Conjugates of Chloroquine and other Antimalarials: the Development of Ferroquine, a New Antimalarial. *ChemMedChem.* **2007**, *3*, 383-391.
- [296] Chatterjee, T.; Mukhopadhyay, A.; Khan, K.A.; Giri, A.K. Comparative mutagenic and genotoxic effects of three antimalarial drugs, chloroquine, primaquine and amodiaquine. *Mutagenesis*, **1998**, *13*, 619-624.
- [297] Delhaes, L.; Biot, C.; Berry, L.; Delcourt, P.; Maciejewski, L.A.; Camus, D.; Brocard, J.S.; Dive, D. Synthesis of ferroquine enantiomers: first investigation of effects of metallocenic chirality upon antimalarial activity and cytotoxicity. *ChemBioChem.* **2002**, *3*, 418-423.
- [298] Daher, W.; Pelinski, L.; Klieber, S.; Sadoun, F.; Meunier, V.; Bourrie, M.; Biot, C.; Guillou, F.; Fabre, G.; Brocard, J.; Fraisse, L.; Maffrand, J.P.; Khalife, J.; Dive, D. In vitro metabolism of ferroquine (SSR97193) in animal and human hepatic models and antimalarial activity of major metabolites on *Plasmodium falciparum*. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 667-682.
- [299] Biot, C.; Delhaes, L.; N'Diaye, C.M.; Maciejewski, L.A.; Camus, D.; Dive, D.; Brocard, J. S. Synthesis and antimalarial activity in vitro of potential metabolites of ferrochloroquine and related compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2843-2847.

Probing the Role of the Covalent Linkage of Ferrocene into a Chloroquine Template

Christophe Biot,^{*,†} Wassim Daher,[‡] Cheikh M. Ndiaye,[†] Patricia Melnyk,[§] Bruno Pradines,^{||} Natascha Chavain,[†] Alain Pellet,[⊥] Laurent Fraisse,[⊥] Lydie Pelinski,[†] Christian Jarry,[⊗] Jacques Brocard,[†] Jamal Khalife,[‡] Isabelle Forfar-Bares,[⊗] and Daniel Dive[‡]

Unité de Catalyse et Chimie du Solide - UMR CNRS 8181, ENSCL, Bâtiment C7, USTL, B.P. 90108, 59652, Villeneuve d'Ascq Cedex, France, Inserm, U547, Institut Pasteur, 1 rue du Pr Calmette, B.P. 245, 59019 Lille Cedex, France, UMR CNRS 8161, Universités Lille1 et Lille2, IPL, 1 rue du Pr. Calmette, B.P. 245, 59019 Lille Cedex, France, Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées, Unité de Parasitologie, Bd Charles Livon, Parc le Pharo, BP 46, 13998 Marseille Armées, France, Sanofi-Aventis Recherche, Discovery Department, 31000 Toulouse Cedex, France, and EA 2962 Pharmacochimie Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

Received March 8, 2006

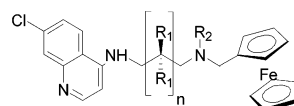
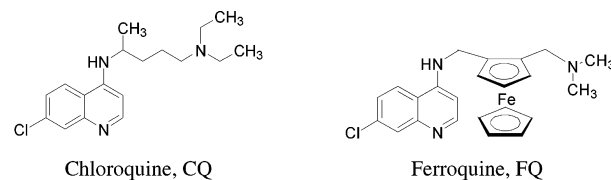
A new therapeutic approach to malaria led to the discovery of ferroquine (FQ, SR97276). To assess the importance of the linkage of the ferrocenyl group to a 4-aminoquinoline scaffold, two series of 4-aminoquinolines, structurally related to FQ, were synthesized. Evaluation of antimalarial activity, physicochemical parameters, and the β -hematin inhibition property indicate that the ferrocene moiety has to be covalently flanked by a 4-aminoquinoline and an alkylamine. Current data reinforced our choice of FQ as a drug candidate.

Introduction

Malaria is one of the most prevalent causes of morbidity and mortality worldwide. Therefore, chemotherapy is a major element of malaria control^{1,2} in the absence of an active vaccine.^{3,4} Owing to the widespread occurrence of drug resistance to *Plasmodium falciparum*, many ways are being currently explored to develop new antimalarials.^{5–7}

We have previously reported the design, synthesis and antimalarial activity of FQ (SR97276), a metallocenic compound (Figure 1).⁸ The probable mechanism of action of FQ has been partially studied and should be in part similar to that of chloroquine (CQ). It probably involves hematin as the drug target and inhibition of hemozoin formation.⁹ Subsequently, variation of the attachment position of the ferrocenic moiety on the quinoline ring of CQ has been investigated, but unfortunately such a strategy afforded no improvement of the antiparasitodal activity.⁸ Besides, it has been shown in many studies that CQ^{10,11} and FQ^{12,13} analogues with shortened side chains may be good schizontocides. All these results prompted us to investigate the role of the covalent linkage of the ferrocenyl moiety to CQ-like drugs.

In this work we describe two series of 4-aminoquinolines structurally related to FQ (Figure 1) designed in order to study the structural basis for in vitro effects on *P. falciparum* and on β -hematin formation. Moreover, low-cost preparation and easy accessibility were the main criteria for the design of molecules in series A. Such compounds would indeed meet the current need for cheap, novel antimalarials. For that purpose, the ferrocene moiety was introduced at the extremity of a (branched) lateral side chain of a 4-aminoquinoline derivative. In addition, these structures allow the modulation of the substituent on the amino group. Compounds of series B were designed through the variation of the side chain of FQ. Not only do these new analogues offer new therapeutic possibilities, but they will also



compd	R ₁	R ₂	n
1a	H	H	0
1b	H	H	1
1c	H	H	2
1d	H	H	4
2a	H	CH ₃	0
2b	H	CH ₃	1
2c	H	CH ₃	2
2d	H	CH ₃	4
3a	H	C ₂ H ₅	0
3b	H	C ₂ H ₅	1
3c	H	C ₂ H ₅	2
3d	H	C ₂ H ₅	4
4a	H	FcCH ₂	0
4b	H	FcCH ₂	1
4c	H	FcCH ₂	2
4d	H	FcCH ₂	4
5a	CH ₃	H	1
5b	CH ₃	CH ₃	1
5c	CH ₃	C ₂ H ₅	1

FQ Analogues, Series B

compd	R ₁	R ₂
6	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
7a	CH ₃	H
7b	CH ₃	C ₂ H ₅
8a	FcCH ₂	H
8b	FcCH ₂	CH ₃
8c	FcCH ₂	C ₂ H ₅

with Fc = ferrocenyl

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +33-(0)-320434893. Fax: +33-(0)320436585 E-mail: christophe.biot@enscl-lille.fr.

[†] Unité de Catalyse et Chimie du Solide - UMR CNRS 8181.

[‡] Inserm, U547, Institut Pasteur.

[§] Universités Lille1 et Lille2.

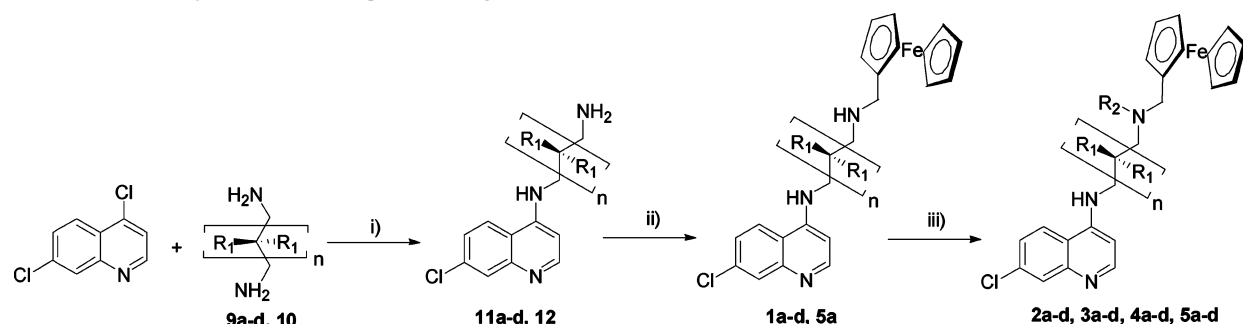
^{||} Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées.

[⊥] Sanofi-Aventis Recherche.

[⊗] EA 2962 Pharmacochimie Université Victor Segalen Bordeaux 2.

Figure 1. Structure of chloroquine, ferroquine, and ferroquine analogues (Series A and B).

Scheme 1. Series A: Synthesis of Ferroquine Analogues

Table 1. Series A: In Vitro Sensitivities of *P. falciparum* Strains

compd	strains	IC ₅₀ (nM)	±SEM	n ^a	IC ₉₀ (nM)	±SEM	n ^a
CQ	HB3	21.8^d	4.52	10	45.7	13.9	10
	Dd2	61.8	28.7	4	166.7	45.2	4
	W2	452.4	92.7	8	802.2	151.9	8
FQ	HB3	20.2	6.1	10	28.6	7.3	10
	Dd2	18.9	4.3	4	28.4	7.9	4
	W2	8.1	2.1	8	13.8	3.0	8
1a	HB3	73.0		2	>3800		2
	Dd2	29.3	12.2	3	>3800		3
	W2	63.5	83.0	3	>2000		3
1b	HB3	65.1		2	2643		2
	Dd2	63.0	10.8	3	>700		3
	W2			2			2
1c	HB3	58.8		2	1844.0		2
	Dd2	68.1	25.6	3	630.0	368.2	3
	W2			3			3
1d	HB3	127.0	13.3	3	>274		3
	Dd2	>274		2	>274		2
	W2			3	>274		3
2b	HB3	45.7		2	66.4		2
	Dd2	50.6	14.7	4	66.2	21.8	3
	W2	26.7	11.4	4	>500		4
2c	HB3	118.3		2	>319		3
	Dd2	120.1	36.9	4	182.8	70.3	3
	W2			2			2
2d	HB3	80.0		2	>356		2
	Dd2	78.3	5.1	3	114.5		2
	W2			3			3
3a	Dd2	63.6	5.8	3	>274		3
	HB3	50.3		2	70.9		2
	Dd2	61.5	18	3	79.0		2
3b	W2	24.0	5.7	3	>500		3
	HB3	61.8		2	103.8		2
	Dd2	96.5	8.9	4	140.6	13.2	3
3c	W2	134.4	33.6	3	>500		3
	HB3	93.9		2	>356		2
	Dd2	86.9	9.7	4	192.6	49.4	4
5a	HB3	53.0		2	1451.5		2
	Dd2	54.5	21.0	3	7322.5		2
	W2	50.6	30.6	4	>500		4
5b	HB3	181.0		2	442.6		2
	Dd2	212.9	81.5	3			3
	W2			2			2
5c	HB3	268.0		2	962.5		2
	Dd2	399.2	229.7	4	>400		4

^a n: number of experiments. ^b Values in bold indicated IC < 100 nM.

be helpful in providing an understanding of the mode of action of FQ. The lipophilicity behavior dependence of new compounds was studied with respect to the parasite vacuolar and cytosolic pHs.

Chemistry. A rapid and cost-effective procedure was developed for syntheses of all FQ analogues of series A. Condensation of diamines **9a–d** and **10** with 4,7-dichloroquinoline afforded the primary amines **11a–d** and **12** (Scheme 1).¹⁰ Upon further reaction with ferrocenecarboxaldehyde, the intermediate imines were converted to the corresponding amines **1a–d** and **5a** in 62–84% global yields by addition of NaBH₄. The ferrocenic amines **2a–d**, **3a–d**, **4a–d**, and **5b,c** were then obtained in 14–88% yields by a typical Borch's mechanism.^{14,15} Compounds of series B were obtained as previously reported.⁸ Metallocene **6** was synthesized in a similar way to FQ (Scheme

2). Quaternization of the tertiary amine of FQ was achieved by reaction with methyl iodide. The resulting salt was then condensed with methylamine or ferrocenylmethylamine to afford **7a** and **8a**.⁹ These secondary amines **7a** and **8a** were then converted to the corresponding tertiary amines **7b** and **8b,c** (25–80% yields).

Results and Discussion

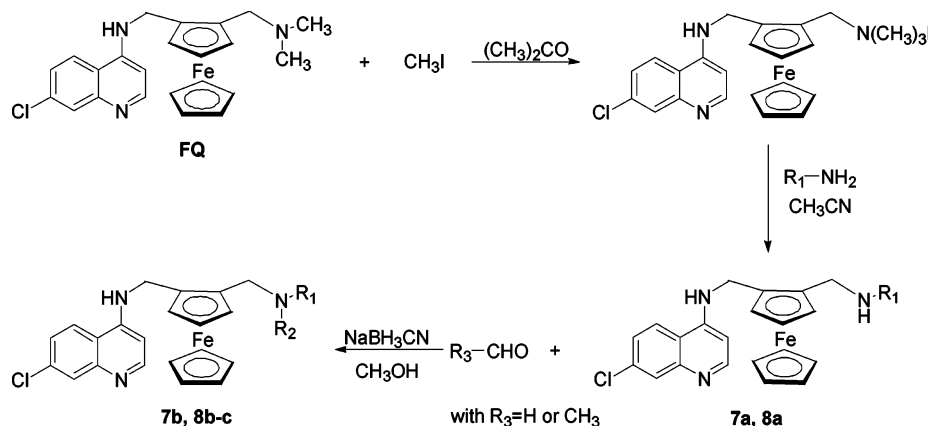
The new compounds were evaluated in vitro against *P. falciparum* strains (Tables 1 and 2). As limitation to the IC₅₀ values could lead to erroneous conclusions in the supposed efficacy of the compounds, the IC₉₀ also have to be evaluated and discussed.

Compounds **2b** and **3b** inhibited parasite development of HB3 and Dd2 clones (IC₅₀ and IC₉₀ at or below 100 nM). Nevertheless, the efficacy decreased (IC₉₀ > 500 nM) against the more resistant strain W2, suggesting that these molecules will probably be inefficient on strongly resistant *P. falciparum* strains. Whereas compounds **1a–d** and **5a** displayed potential activity (IC₅₀ < 150 nM on both tested *P. falciparum* strains), they were less active than CQ (and FQ) against the CQ-sensitive strain HB3. All showed superior IC₉₀ values to CQ and FQ. Striking differences were observed for **1a** and **5a** between their low IC₅₀ (roughly 50 nM) and their high IC₉₀ (>500 nM). A decrease of the efficacy was observed between the linear (**1b**, **2b**, and **3b**) and branched (**5a–c**) propylamino chain derivatives. Introduction of methyl groups in the side chain was not favorable to the antimalarial activity. Finally compounds **4a–d**, bearing two ferrocenic moieties in their skeleton, gave erratic and inconsistent results in a range of concentrations varying from 10 to 1000 nM which did not allow a precise determination of their IC₅₀. In conclusion, none of the series A compounds exhibited a global antimalarial activity similar (or better) to that of FQ on the three tested strains.

In series B, metallocenes **8a–c** including two ferrocenic nuclei showed lower activity than CQ (Table 2). The IC values observed for the first FQ metabolite **7a** were in accordance with those previously reported.^{16,17} Its antimalarial activity against the Dd2 clone has also been included here for comparison. Tertiary amines **6** and **7b** showed strong antimalarial activity (IC₅₀ and IC₉₀ < 42 nM) on the three laboratory strains and appeared as efficient as CQ against the HB3 strain and much more active against the Dd2 and W2 strains (2 to 10-fold). These structure–activity relationship studies on the side chain of the basic amino group of FQ revealed that the in vitro antimalarial activity was not disturbed by slight chemical modifications (from hydrogen to ethyl).

Next, compounds were tested for their ability to inhibit β-hematin formation (Figure 2 and Table 4), the synthetic equivalent of hemozoin, induced by lipids in 96-well plate format.^{18,19} Low solubility in DMSO of compounds **1d**, **3c**, **4a**,

Scheme 2. Series B: Synthesis of FQ Analogues

Table 2. Series B: In Vitro Sensitivities of *P. falciparum* Strains

compd	strains	IC ₅₀ (nM)	±SEM	n ^a	IC ₉₀ (nM)	±SEM	n ^a
CQ	HB3	21.8^b	4.5	10	45.7	13.9	10
	Dd2	61.8	28.7	4	166.7	45.2	4
	W2	452.4	92.7	8	802.2	151.9	8
FQ	HB3	20.2	6.1	10	28.6	7.3	10
	Dd2	18.9	4.3	4	28.4	7.9	4
	W2	8.1	2.1	8	13.8	3.0	8
6	HB3	12.4	3.6	4	18.0	3.7	4
	Dd2	17.7	3.7	5	28.3	6.4	5
	W2	16.8	5.1	6	25.3	6.4	6
7a	HB3	29.6	8.7	7	45.7	12.6	7
	Dd2 ^b	23.2	1.7	3	ND ^c	ND	ND
	W2	23.1	6.1	6	42.1	17.8	6
7b	HB3	23.6	3.6	3	34.1	1.2	3
	Dd2	17.0	6.1	6	30.2	8.2	6
	W2	19.2	4.6	6	30.9	7.0	6
8a	HB3	155.5	39.7	3	>582		3
	Dd2	169.5	70.0	6	>582		6
8b	HB3	204.8	84.0	3	>582		3
	Dd2	88.5	7.4	3	>582		3
8c	HB3	156.4	39.6	3	>582		3
	Dd2	51.3	2.6	3	>582		3

^a n: number of experiments ^b For IC₅₀ determination, see ref 16. ^c ND = not determined. ^d Values in bold indicated IC < 100 nM.

4c, 5c and series B did not allow the study of their influence on β -hematin formation. FQ is a 2-fold more potent inhibitor of β -hematin formation than CQ.⁹ In general, the introduction of a second ferrocenyl substituent (compounds 4b and 4d) resulted in a dramatic increase of the IC₅₀ values. The majority of the other compounds were potent inhibitors with IC₅₀ lower than 50 μ M. Four of the metallocenic complexes 1c, 2a, 2b, and 2c inhibit the process similarly to CQ. Four other compounds 1b, 3b, 3d, and 5a are better inhibitors than CQ, with IC₅₀ values close to that of FQ. The best β -hematin formation inhibitor is 1a which showed an IC₅₀ value equal to 9.3 μ M.

HPLC determination of log $D^{9,20}$ was achieved for these compounds at two distinct pHs (5.2 considered close to the probable pH of the digestive vacuole and 7.4 assumed to be the cytosol pH).

It can be seen on Figure 2 that, at pH 7.4, all of the compounds studied were found to be highly lipid soluble with a difference near 300-fold between them. Introduction of a ferrocenic moiety in the lateral chain considerably increased the lipophilicity, compared to the purely organic CQ molecule. Moreover, compounds 4a, 4b, 5b, 5c, 8a, and 8b were found the most lipophilic (log D > 4). This can be explained by the fact that 4a, 4b, 8a, and 8b include a second ferrocenic group in their chemical structure, and 5b and 5c are sterically hindered due to the branched side chain.

At pH 5.2, a large difference can be noticed (more than 1000-fold) between the log D values. All compounds except products 4a, 4b, 5b, 5c, 8a, and 8b have hydrophilic properties. Reference molecules CQ and FQ presented the most hydrophilic behavior with log D values of -1.2 and -0.77 , respectively. An increase of lipophilicity can be noticed for 1a, 2a, 3a, and 4a where a hydrogen atom (1a) was replaced by a methyl (2a), an ethyl (3a), and a FcCH_2 group (4a). The same statement can be made for 2b, 3b, and 4b. Log D values of FQ and compound 6 are similar (Table 3); indeed, methyl groups of FQ have just been replaced by ethyl groups. Expectedly, log D increased upon introduction of a second ferrocenyl moiety, as exemplified by compounds 8a and 8b. In conclusion, either the introduction of a second bulky group such as a ferrocene or the introduction of

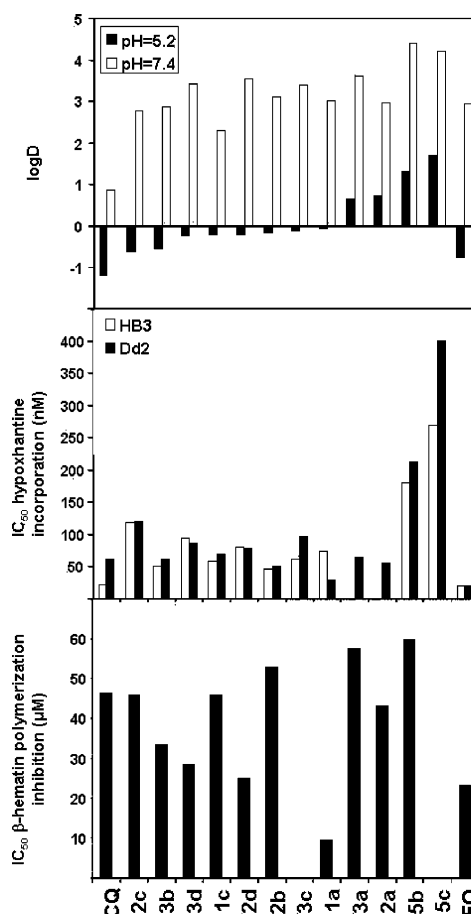


Figure 2. Series A analogues:^a Relationship between in vitro antimalarial activity, (pH 5.2 and 7.4) log D , and in vitro β -hematin inhibition.

three alkyl substituents on the lateral chain led to compounds with a particularly lipophilic behavior. On the other hand, the relative position of the ferrocenic group on the lateral chain of the 4-aminoquinoline ring seemed to have no significant influence in terms of lipophilicity results.

A plot of antimalarial IC_{50} values against log D values showed that there is no correlation between $P. falciparum$ culture growth inhibition and lipophilicity of the ferrocenic compounds ($r^2 = 0.0184$).²¹ Similarly, a plot of antimalarial IC_{50} values against β -hematin formation inhibition IC_{50} values did not show any linear correlation ($r^2 = 0.184$).²² The high lipophilicity of the ferrocene nucleus should mask the influence of the alkyl part. Note here that we were unable to obtain pK_a values (owing to the low aqueous solubility of the FQ analogues) and thereafter to correct for the extent of pH trapping.²²

The in vitro behavior of the FQ analogues (series A) with low IC_{50} and high IC_{90} values could not be easily explained and is undoubtedly multifactorial. Evidently, the remarkable activity of FQ depends on the position of the ferrocenic nucleus in the side chain. 4-Aminoquinolines **6**, **7a**, and **7b** (series B) closely related to FQ, and designed to influence its physico-chemical properties, showed similar antimalarial activity against both CQ-susceptible and CQ-resistant strains of *P. falciparum*.

This study supports the continued synthesis and investigation of ferrocenic CQ-like compounds in the search for "back-up" 4-aminoquinolines. Further studies on the relationship between bioorganometallics accumulation and activity (implicating or not the involvement of additional mechanisms) will be needed for drug design and development.

Experimental Section

Chemistry. The 1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker AC 300 MHz spectrometer using tetramethylsilane (TMS) as the internal standard and $CDCl_3$ or $DMSO-d_6$ as the solvent. D_2O was added to remove exchangeable protons. MS-MALDI-TOF spectra were obtained using a Vision 2000 time-of-flight instrument (Finnigan MAT, Bremen, Germany) equipped with a nitrogen laser operating at a wavelength of 337 nm. Between 20 and 30 single-shot spectra in the reflector mode were accumulated to obtain a good signal-to-noise ratio. The matrix used was 2,4,6-trihydroxyacetophenone (thap). EI mass spectra were acquired with a quadrupole instrument (Nermag R 10-10 H). Melting points are uncorrected. Merck's Kieselgel 60 PF254 was used for the chromatography.

Ferroquine Analogues. Series A. N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-2,2-dimethyl-1,3-propanediamine 12. 4,7-Dichloroquinoline (1.98 g, 10 mmol) and 2,2-dimethyl-1,3-propanediamine (4.59 g, 45 mmol) were placed in a round-bottom flask. The mixture was stirred at 85 °C for 5 h. The mixture was allowed to cool to 50 °C before adding an aqueous solution of 1 N NaOH (10 mL). The mixture was stirred until it cooled to room temperature. The product was extracted with dichloromethane (3×50 mL). The combined organic fractions were washed with distilled water (5×50 mL). The organic layer was dried over sodium sulfate. The solvent was removed under reduced pressure yielding the product (1.7 g, 6.45 mmol) as a white solid. Yield: 63%. M.p.: 94 °C. 1H NMR ($CDCl_3$) δ 8.50 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, ArC_2-H), 7.93 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, ArC_8-H), 7.73 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, ArC_5-H), 7.33 (1H, dd, $J = 1.7$ and 8.8 Hz, ArC_6-H), 6.27 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, ArC_3-H), 3.16 (2H, s, $ArNDCH_2$), 2.85 (2H, s, CH_2ND_2), 1.06 (6H, s, CH_3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 151.9, 150.9, 149.1, 134.5, 128.2, 124.7, 122.4, 117.7, 97.7, 55.6, 52.6, 33.7, 24.4.

Synthetic Procedure for 1a–d and 5a. A mixture of ferrocenecarboxaldehyde (1.02 equiv) and the appropriate N1-(7-chloro-4-quinolyl)-1, ω -alkyldiamine (1 equiv) were dissolved in dry methanol (50 mL) with 4 Å molecular sieves (7 g). The mixture was stirred for 1 to 5 h at room temperature depending on the diamine. An excess of sodium borohydride (15 equiv) was added slowly,

and the resulting mixture was stirred for an additional 1 h. After addition of 0.6 N hydrochloric acid (100 mL) and water (100 mL), the aqueous layer was washed with diethyl ether (3×100 mL). The aqueous layer was basified by sodium carbonate (pH 7) and was extracted with dichloromethane (3×100 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$. The product was purified by column chromatography on silica gel.

N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-N2-ferrocenyl 1,2-ethanediamine 1a. Yield: 80%. M.p.: 48 °C. 1H NMR ($CDCl_3$) δ 8.50 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, ArC_2-H), 7.95 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, ArC_8-H), 7.70 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, ArC_5-H), 7.37 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, ArC_6-H), 6.40 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, ArC_3-H), 4.18 (2H, m, Cp), 4.14 (2H, m, Cp), 4.12 (5H, s, Cp'), 3.58 (2H, s, $FcCH_2N$), 3.34 (2H, m, $ArNDCH_2$), 3.13 (2H, m, CH_2ND). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 151.9, 149.9, 149.0, 134.8, 128.5, 125.2, 121.4, 99.1, 86.2, 68.4, 68.4, 68.0, 48.3, 46.7, 41.9. MS-MALDI-TOF (thap): 444 ($M^{37}Cl + Na$)⁺, 442 ($M^{35}Cl + Na$)⁺, 421 ($MH^{+37}Cl$), 420 ($MH^{+35}Cl$), 199 ($FcCH_2$)⁺. Anal. ($C_{22}H_{22}ClN_3Fe$) C, H, N.

N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-N1-ferrocenyl-1,3-propanediamine 1b. Yield: 69%. M.p.: 71 °C. 1H NMR ($CDCl_3$) δ 8.47 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, ArC_2-H), 7.90 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, ArC_8-H), 7.60 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, ArC_5-H), 7.21 (1H, dd, $J = 2.2$ and 9.0 Hz, ArC_6-H), 6.27 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, ArC_3-H), 4.22 (2H, m, Cp), 4.20 (2H, m, Cp), 4.14 (5H, s, Cp'), 3.58 (2H, s, $FcCH_2N$), 3.37 (2H, m, $ArNDCH_2$), 2.96 (2H, m, CH_2ND), 1.91 (2H, m, CH_2). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 152.1, 150.5, 134.5, 128.3, 124.8, 122.5, 98.0, 68.7, 68.5, 68.1, 49.5, 49.4, 44.2, 27.1. MS-MALDI-TOF (thap): 458 ($M^{37}Cl + Na$)⁺, 456 ($M^{35}Cl + Na$)⁺, 435 ($MH^{+37}Cl$), 434 ($MH^{+35}Cl$), 199 ($FcCH_2$)⁺. Anal. ($C_{23}H_{24}ClN_3Fe$) C, H, N.

N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-N4-ferrocenyl-1,4-butanediamine 1c. Yield: 77%. M.p.: 55 °C. 1H NMR ($CDCl_3$) δ 8.47 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, ArC_2-H), 7.90 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, ArC_8-H), 7.64 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, ArC_5-H), 7.27 (1H, dd, $J = 2.0$ and 8.9 Hz, ArC_6-H), 6.36 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, ArC_3-H), 4.18 (2H, m, Cp), 4.14 (2H, m, Cp), 4.12 (5H, s, Cp'), 3.58 (2H, s, $FcCH_2N'$), 3.28 (2H, m, $ArNDCH_2$), 2.72 (2H, m, $CH_2N'D$), 1.86 (2H, m, CH_2), 1.67 (2H, m, CH_2). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 152.0, 149.1, 134.6, 128.6, 125.0, 121.5, 98.8, 68.4, 68.2, 67.9, 49.0, 48.5, 43.1, 43.1, 27.7, 26.2. MS-MALDI-TOF (thap): 472 ($M^{37}Cl + Na$)⁺, 470 ($M^{35}Cl + Na$)⁺, 450 ($MH^{+37}Cl$), 448 ($MH^{+35}Cl$), 199 ($FcCH_2$)⁺. Anal. ($C_{24}H_{26}ClN_3Fe$) C, H, N.

N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-N6-ferrocenyl-1,6-hexanediamine 1d. Yield: 62%. M.p.: 88 °C. 1H NMR ($CDCl_3$) δ 8.52 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, ArC_2-H), 7.95 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, ArC_8-H), 7.75 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, ArC_5-H), 7.37 (1H, dd, $J = 2.0$ and 8.9 Hz, ArC_6-H), 6.40 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, ArC_3-H), 4.18 (2H, m, Cp), 4.14 (7H, m, Cp, Cp'), 3.58 (2H, s, $FcCH_2N'$), 3.32 (2H, m, $ArNDCH_2$), 2.72 (2H, m, $CH_2N'D$), 1.80 (2H, m, CH_2), 1.56 (6H, m, CH_2). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 151.9, 128.5, 125.1, 121.2, 98.9, 68.5, 68.4, 67.8, 49.1, 48.9, 43.1, 29.7, 28.6, 26.9. MS-MALDI-TOF (thap): 500 ($M^{37}Cl + Na$)⁺, 498 ($M^{35}Cl + Na$)⁺, 478 ($MH^{+37}Cl$), 476 ($MH^{+35}Cl$), 199 ($FcCH_2$)⁺. Anal. ($C_{26}H_{30}ClN_3Fe$) C, H, N.

N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-N3-ferrocenyl-2,2-dimethyl-1,3-propanediamine 5a. Yield: 84%. M.p.: 116 °C. 1H NMR ($CDCl_3$) δ 8.50 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, ArC_2-H), 7.95 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, ArC_8-H), 7.70 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, ArC_5-H), 7.37 (1H, dd, $J = 2.0$ and 8.8 Hz, ArC_6-H), 6.40 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, ArC_3-H), 4.18 (2H, m, Cp), 4.14 (2H, m, Cp), 4.12 (5H, s, Cp'), 3.58 (2H, s, $FcCH_2N'$), 3.16 (2H, s, $ArNDCH_2$), 2.72 (2H, s, CH_2ND_2), 1.09 (6H, s, CH_3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 152.0, 150.9, 149.0, 134.4, 128.2, 124.7, 122.8, 117.7, 97.7, 85.6, 68.8, 68.5, 68.2, 61.0, 55.8, 50.2, 33.6, 24.9. MS-MALDI-TOF (thap): 486 ($M^{37}Cl + Na$)⁺, 484 ($M^{35}Cl + Na$)⁺, 464 ($MH^{+37}Cl$), 462 ($MH^{+35}Cl$), 199 ($FcCH_2$)⁺. Anal. ($C_{25}H_{28}ClN_3Fe$) C, H, N.

Synthetic Procedure for 2a–d, 3a–d, and 5b,c. A mixture of the corresponding primary amine **1a–d** or **5a** (1 equiv) and aldehyde (see below, 10 equiv) was dissolved in dry methanol (10 mL). After addition of sodium cyanoborohydride (1.8 equiv), the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solvent was then removed under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in dichloromethane and the solution filtered through

Celite. The product was purified using silica gel chromatography, eluting with diethyl ether–petroleum ether–triethylamine (6:3:1). Formaldehyde (37% solution in water) was used to introduce the methyl group, and acetaldehyde was used to introduce the ethyl group.

N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-N2-ferrocenyl-N2-methyl-1,2-ethanediamine 2a. Yield: 82%. M.p.: 163 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.50 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.95 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.70 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.37 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.40 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.18 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, Cp), 4.14 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, Cp), 4.12 (5H, s, Cp'), 3.58 (2H, s, $\text{FcCH}_2\text{N}'$), 3.34 (2H, t, $J = 5.0$ Hz, ArNDCH_2), 2.72 (2H, t, $J = 5.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{N}'\text{D}$), 2.35 (3H, s, NCH_3). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 152.0, 128.5, 125.0, 121.5, 99.1, 83.0, 77.0, 68.5, 68.2, 57.0, 53.3, 41.5, 39.6. MS-MALDI-TOF (thap): 458 ($M^{37}\text{Cl} + \text{Na}$) $^+$, 456 ($M^{35}\text{Cl} + \text{Na}$) $^+$, 436 ($M\text{H}^+^{37}\text{Cl}$), 434 ($M\text{H}^+^{35}\text{Cl}$), 199 (FcCH_2) $^+$. Anal. ($\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{ClN}_3\text{Fe}$) C, H, N.

N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-N3-ferrocenyl-N3-methyl-1,3-propanediamine 2b. Yield: 72%. M.p.: 82 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.47 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.90 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.60 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.21 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.27 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.22 (2H, m, Cp), 4.20 (2H, m, Cp), 4.14 (5H, s, Cp'), 3.58 (2H, s, $\text{FcCH}_2\text{N}'$), 3.45 (2H, t, $J = 5.0$ Hz, ArNDCH_2), 2.67 (2H, t, $J = 5.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{N}'\text{D}$), 2.40 (3H, s, NCH_3), 1.91 (2H, m, CH_2). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 153.1, 152.0, 149.0, 148.9, 141.1, 134.3, 132.9, 128.2, 124.9, 122.4, 101.0, 98.1, 82.7, 70.3, 68.5, 68.3, 57.7, 57.4, 51.5, 44.4, 30.3. MS-MALDI-TOF (thap): 482 ($M^{37}\text{Cl} + \text{Na}$) $^+$, 480 ($M^{35}\text{Cl} + \text{Na}$) $^+$, 450 ($M\text{H}^+^{37}\text{Cl}$), 448 ($M\text{H}^+^{35}\text{Cl}$), 199 (FcCH_2) $^+$. Anal. ($\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{Fe}$) C, H.

N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-N4-ferrocenyl-N4-methyl-1,4-butanediamine 2c. Yield: 78%. M.p.: 118 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.52 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.90 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.64 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.27 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.36 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.18 (2H, m, Cp), 4.14 (2H, m, Cp), 4.12 (5H, s, Cp'), 3.48 (2H, s, $\text{FcCH}_2\text{N}'$), 3.28 (2H, m, ArNDCH_2), 2.42 (2H, m, $\text{CH}_2\text{N}'\text{D}$), 2.19 (3H, s, NCH_3), 1.86 (2H, m, CH_2), 1.67 (2H, m, CH_2). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 161.6, 152.0, 150.2, 149.1, 134.5, 128.4, 124.7, 121.8, 117.4, 98.7, 82.4, 70.2, 68.5, 68.1, 56.8, 55.7, 43.0, 42.1, 26.4, 25.2. MS-MALDI-TOF(thap): 496 ($M^{37}\text{Cl} + \text{Na}$) $^+$, 494 ($M^{35}\text{Cl} + \text{Na}$) $^+$, 464 ($M\text{H}^+^{37}\text{Cl}$), 462 ($M\text{H}^+^{35}\text{Cl}$), 199 (FcCH_2) $^+$. Anal. ($\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{Fe}$) C, H.

N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-N6-ferrocenyl-N6-methyl-1,6-hexanediamine 2d. Yield: 78%. M.p.: 112 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.52 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.95 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.75 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.37 (1H, dd, $J = 1.9$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.40 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.18 (2H, m, Cp), 4.14 (7H, m, Cp, Cp'), 3.58 (2H, s, $\text{FcCH}_2\text{N}'$), 3.32 (2H, m, ArNDCH_2), 2.32 (2H, t, $J = 5.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{N}'\text{D}$), 2.15 (3H, s, NCH_3), 1.80 (2H, m, CH_2), 1.56 (6H, m, CH_2). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 152.0, 149.7, 149.1, 134.7, 128.6, 125.1, 120.7, 121.0, 117.1, 99.0, 82.9, 70.2, 68.4, 67.9, 57.2, 56.3, 43.1, 41.8, 28.7, 27.2, 27.0. MS-MALDI-TOF (thap): 514 ($M^{37}\text{Cl} + \text{Na}$) $^+$, 512 ($M^{35}\text{Cl} + \text{Na}$) $^+$, 492 ($M\text{H}^+^{37}\text{Cl}$), 490 ($M\text{H}^+^{35}\text{Cl}$), 199 (FcCH_2) $^+$. Anal. ($\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{ClN}_3\text{Fe}$) C, H.

N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-N3-ferrocenyl-N3-methyl-2,2-dimethyl-1,3-propanediamine 5b. Yield: 61%. M.p.: 130 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.48 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.92 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.22 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.05 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.30 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.18 (4H, m, Cp), 4.12 (5H, s, Cp'), 3.48 (2H, s, $\text{FcCH}_2\text{N}'$), 3.06 (2H, s, ArNDCH_2), 2.52 (2H, s, CH_2ND_2), 2.25 (3H, s, NCH_3), 1.09 (6H, s, CH_3). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 151.9, 150.7, 149.0, 134.3, 128.1, 124.8, 122.4, 117.6, 97.6, 83.5, 70.2, 69.5, 68.4, 59.8, 55.6, 50.4, 44.3, 34.2, 25.6. MS-MALDI-TOF (thap): 500 ($M^{37}\text{Cl} + \text{Na}$) $^+$, 498 ($M^{35}\text{Cl} + \text{Na}$) $^+$, 478 ($M\text{H}^+^{37}\text{Cl}$), 476 ($M\text{H}^+^{35}\text{Cl}$), 199 (FcCH_2) $^+$. Anal. ($\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{ClN}_3\text{Fe}$) C, H.

N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-N2-ethyl-N2-ferrocenyl-1,2-ethanediamine 3a. Yield: 75%. M.p.: 138 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.50 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.95 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$),

Table 3. Measured Values of Drug Lipophilicity ($\log D$) at Two Different pHs (pH 5.2 and pH 7.4)

compound	$\log D$, pH = 5.2	$\log D$, pH = 7.4
FQ	−0.77	2.95
CQ	−1.2	0.85
1a	−0.08	3.02
1c	−0.21	2.29
2a	0.72	2.97
2b	−0.15	3.1
2c	−0.62	2.77
2d	−0.21	3.52
3a	0.65	3.61
3b	−0.54	2.87
3c	−0.12	3.39
3d	−0.24	3.42
4a	2.55	4.01
4b	1.83	4.78
5b	1.32	4.4
5c	1.69	4.2
6	−0.24	3.42
7a	−1.18	1.95
7b	−0.69	3.19
8a	1.07	4.13
8b	1.7	4.35

Table 4. Series A Analogues: In Vitro Inhibition of β -Hematin Formation

compd	IC_{50} (μM), β -hematin formation	$\pm\text{SEM}$	n^a
CQ	46.3	9.5	10
FQ.2 HCl	23.0	15.1	4
1a	9.3		2
1b	22.7		2
1c	45.9		2
1d	ND ^b		
2a	43.05	4.3	3
2b	52.7		2
2c	46.0		2
2d	24.8		2
3a	57.4		2
3b	33.5		2
3c	ND ^b		
3d	28.5		2
4a	ND ^b		
4b	> 100		2
4c	ND ^b		
4d	> 100		2
5a	35.6		2
5b	51.9		2
5c	ND ^b		

^a n : number of experiments. ^b ND: Not determined. Compounds **1d**, **3c**, **4a**, **4c**, and **5c** showed (partial) insolubility under the experimental conditions used.

7.63 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.37 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.40 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.18 (2H, m, Cp), 4.14 (2H, m, Cp), 4.12 (5H, s, Cp'), 3.58 (2H, s, $\text{FcCH}_2\text{N}'$), 3.34 (2H, m, ArNDCH_2), 2.72 (2H, t, $J = 5.0$, $\text{CH}_2\text{N}'\text{Et}$), 2.67 (2H, q, $\text{N}'\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.13 (3H, t, $\text{N}'\text{CH}_2\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 152.1, 128.6, 125.0, 121.4, 99.1, 83.4, 69.9, 68.5, 68.2, 52.4, 50.0, 46.9, 39.7, 12.4. MS-MALDI-TOF (thap): 472 ($M^{37}\text{Cl} + \text{Na}$) $^+$, 470 ($M^{35}\text{Cl} + \text{Na}$) $^+$, 450 ($M\text{H}^+^{37}\text{Cl}$), 448 ($M\text{H}^+^{35}\text{Cl}$), 199 (FcCH_2) $^+$. Anal. ($\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{Fe}$) C, H.

N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-N3-ethyl-N3-ferrocenyl-1,3-propanediamine 3b. Yield: 69%. M.p.: 99 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.47 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.90 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.60 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.21 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.27 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.22 (2H, m, Cp), 4.20 (2H, m, Cp), 4.14 (5H, s, Cp'), 3.58 (2H, s, $\text{FcCH}_2\text{N}'$), 3.45 (2H, m, ArNDCH_2), 2.67 (2H, m, $\text{CH}_2\text{N}'\text{Et}$), 2.60 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, $\text{N}'\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.91 (2H, m, $\text{ArNDCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}'\text{D}$), 1.13 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, $\text{N}'\text{CH}_2\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 152.0, 128.3, 124.6, 122.6, 98.1, 82.7, 70.2, 68.5, 68.3, 53.3, 52.9, 47.0, 44.6, 24.2, 11.3. MS-MALDI-TOF (thap): 486 ($M^{37}\text{Cl} + \text{Na}$) $^+$, 484 (M

$^{35}\text{Cl} + \text{Na}^+$, 464 ($M\text{H}^+ {}^{37}\text{Cl}$), 462 ($M\text{H}^+ {}^{35}\text{Cl}$), 199 (FcCH_2^+). Anal. ($\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{Fe}$) C, H.

N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-N4-ethyl-N4-ferrocenyl-1,4-butanediamine 3c. Yield: 88%. M.p.: 122 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.52 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.90 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.64 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.27 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.36 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.18 (2H, m, Cp), 4.14 (2H, m, Cp), 4.12 (5H, s, Cp'), 3.48 (2H, s, $\text{FcCH}_2\text{N}'$), 3.28 (2H, m, ArNDCH_2), 2.42 (4H, m, $\text{CH}_2\text{N}'\text{Et}$, $\text{N}'\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.86 (2H, m, CH_2), 1.67 (2H, m, CH_2), 1.13 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, $\text{N}'\text{CH}_2\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 152.0, 128.5, 124.8, 121.6, 98.9, 70.2, 68.4, 68.0, 52.5, 51.7, 46.9, 42.9, 26.5, 25.1, 11.4. MS-MALDI-TOF (thap): 500 ($M {}^{37}\text{Cl} + \text{Na}^+$), 498 ($M {}^{35}\text{Cl} + \text{Na}^+$), 479 ($M\text{H}^+ {}^{37}\text{Cl}$), 477 ($M\text{H}^+ {}^{35}\text{Cl}$), 199 (FcCH_2^+). Anal. ($\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{ClN}_3\text{Fe}$) C, H.

N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-N6-ethyl-N6-ferrocenyl-1,6-hexanediamine 3d. Yield: 78%. M.p.: 109 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.52 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.95 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.75 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.37 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.40 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.18 (2H, m, Cp), 4.14 (7H, m, Cp, Cp'), 3.58 (2H, s, $\text{FcCH}_2\text{N}'$), 3.32 (2H, m, ArNDCH_2), 2.32 (4H, m, $\text{CH}_2\text{N}'\text{CH}_2$), 1.80 (2H, m, $(\text{CH}_2)_4$), 1.56 (6H, m, $(\text{CH}_2)_4$), 1.08 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, $\text{N}'\text{CH}_2\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 152.0, 128.8, 125.2, 120.7, 99.0, 70.0, 68.4, 67.8, 52.4, 52.4, 46.8, 43.2, 28.8, 27.2, 27.0, 12.0. MS-MALDI-TOF (thap): 527 ($M {}^{37}\text{Cl} + \text{Na}^+$), 525 ($M {}^{35}\text{Cl} + \text{Na}^+$), 505 ($M\text{H}^+ {}^{37}\text{Cl}$), 503 ($M\text{H}^+ {}^{35}\text{Cl}$), 199 (FcCH_2^+). Anal. ($\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{ClN}_3\text{Fe}$) C, H.

N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-N3-ethyl-N3-ferrocenyl-2,2-dimethyl-1,3-propanediamine 5c. Yield: 69%. M.p.: 155 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.48 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.92 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.22 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.05 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.30 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.18 (4H, m, Cp), 4.12 (5H, s, Cp'), 3.48 (2H, s, $\text{FcCH}_2\text{N}'$), 3.06 (2H, s, ArNDCH_2), 2.69 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, $\text{N}'\text{CH}_2\text{Me}$), 2.52 (2H, s, CH_2NEt), 1.19 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, $\text{N}'\text{CH}_2\text{Me}$), 1.09 (6H, s, CH_3). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 152.0, 150.7, 149.0, 134.3, 128.2, 124.6, 122.6, 117.7, 97.8, 83.5, 70.1, 68.5, 68.3, 65.6, 55.8, 55.2, 48.6, 34.1, 25.8, 10.6. MS-MALDI-TOF (thap): 514 ($M {}^{37}\text{Cl} + \text{Na}^+$), 512 ($M {}^{35}\text{Cl} + \text{Na}^+$), 492 ($M\text{H}^+ {}^{37}\text{Cl}$), 490 ($M\text{H}^+ {}^{35}\text{Cl}$), 199 (FcCH_2^+). Anal. ($\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{ClN}_3\text{Fe}$) C, H.

Synthetic Procedure for 4a–d. Bisferrocene 4a–d were obtained from the same procedure as reported above. A mixture of the corresponding primary amine 1a–d (1 equiv) and ferrocene carboxaldehyde (3 equiv) was dissolved in dry methanol (10 mL). After addition of sodium cyanoborohydride (1.8 equiv), the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solvent was then removed under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in dichloromethane and the solution filtered through Celite. The product was then purified using silica gel chromatography, eluting with diethyl ether–petroleum ether–triethylamine (6:3:1).

N1,N1-Bisferrocenyl-N2-(7-chloro-4-quinolyl)-1,2-ethanediamine 4a. Yield: 14%. M.p.: 181 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.50 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.95 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.50 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.32 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.34 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.18 (8H, m, Cp), 4.12 (10H, s, Cp'), 3.48 (4H, s, $\text{FcCH}_2\text{N}'$), 3.11 (2H, m, ArNDCH_2), 2.75 (2H, m, $\text{CH}_2\text{N}'\text{D}$). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 151.9, 149.7, 134.7, 128.4, 124.9, 121.6, 99.0, 83.5, 69.9, 68.5, 68.2, 53.1, 48.9, 39.6. MS-MALDI-TOF (thap): 642 ($M {}^{37}\text{Cl} + \text{Na}^+$), 640 ($M {}^{35}\text{Cl} + \text{Na}^+$), 420 ($M\text{H}^+ {}^{37}\text{Cl}$), 618 ($M\text{H}^+ {}^{35}\text{Cl}$), 199 (FcCH_2^+).

N1,N1-Bisferrocenyl-N3-(7-chloro-4-quinolyl)-1,3-propanediamine 4b. Yield: 79%. M.p.: 173 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.47 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.90 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.82 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.15 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.25 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.22 (8H, m, Cp), 4.14 (10H, s, Cp'), 3.48 (4H, s, $\text{FcCH}_2\text{N}'$), 3.27 (2H, m, ArNDCH_2), 2.65 (2H, m, $\text{CH}_2\text{N}'\text{D}$), 1.90 (2H, m, CH_2). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 152.0, 150.6, 149.0, 134.4, 128.1, 123.0, 117.5, 98.1, 82.5, 70.3, 68.5, 68.3, 52.9, 44.4, 24.2. MS-MALDI-TOF (thap): 656 ($M {}^{37}\text{Cl} + \text{Na}^+$), 654 ($M {}^{35}\text{Cl} + \text{Na}^+$), 634 ($M\text{H}^+ {}^{37}\text{Cl}$), 632 ($M\text{H}^+ {}^{35}\text{Cl}$), 199 (FcCH_2^+).

N1,N1-Bisferrocenyl-N4-(7-chloro-4-quinolyl)-1,4-butanediamine 4c. Yield: 30%. M.p.: 191 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.47 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.94 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.64 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.30 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.36 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.18 (4H, m, Cp), 4.14 (4H, m, Cp), 4.12 (10H, s, Cp'), 3.48 (4H, s, $\text{FcCH}_2\text{N}'$), 3.28 (2H, m, ArNDCH_2), 2.41 (2H, m, $\text{CH}_2\text{N}'\text{D}$), 1.80 (2H, m, $(\text{CH}_2)_2$), 1.67 (2H, m, $(\text{CH}_2)_2$). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 152.0, 150.0, 135.9, 128.6, 124.7, 121.7, 117.3, 98.9, 82.8, 70.2, 68.5, 68.0, 52.9, 50.8, 42.8, 26.2, 24.9. MS-MALDI-TOF (thap): 670 ($M {}^{37}\text{Cl} + \text{Na}^+$), 668 ($M {}^{35}\text{Cl} + \text{Na}^+$), 648 ($M\text{H}^+ {}^{37}\text{Cl}$), 646 ($M\text{H}^+ {}^{35}\text{Cl}$), 199 (FcCH_2^+).

N1,N1-Bisferrocenyl-N6-(7-chloro-4-quinolyl)-1,6-hexanediamine 4d. Yield: 41%. M.p.: 158 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.52 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.96 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.91 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.63 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.39 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.16 (4H, m, Cp), 4.11 (4H, m, Cp), 4.08 (10H, s, Cp'), 3.41 (4H, s, FcCH_2), 3.26 (2H, m, ArNDCH_2), 2.27 (2H, m, $\text{CH}_2\text{N}'$), 1.71 (2H, m, CH_2), 1.40 (4H, m, CH_2), 1.30 (2H, m, CH_2). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 152.03, 149.08, 128.78, 125.23, 120.89, 99.03, 83.48, 70.18, 68.51, 67.83, 52.74, 51.55, 43.04, 28.77, 27.01, 26.85. MS-MALDI-TOF (thap): 700 ($M {}^{37}\text{Cl} + \text{Na}^+$), 698 ($M {}^{35}\text{Cl} + \text{Na}^+$), 678 ($M\text{H}^+ {}^{37}\text{Cl}$), 675 ($M\text{H}^+ {}^{35}\text{Cl}$), 199 (FcCH_2^+).

Ferroquine Analogues. Series B. The synthesis of compounds 7a–b and 8a–c is analogous to the synthesis of compounds 2a–d, 3a–d, and 4a–d.

N4-[2-[Ethyl(methyl)amino]methylferrocenyl]-7-chloro-4-quinolinamine 7b. Yield: 65%. M.p.: 130 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.52 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.91 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.65 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.27 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.46 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.35 (1H, d, $J = 13.1$ Hz, ArNDCH_2), 4.25 (1H, m, Cp), 4.17 (3H, m, ArNDCH_2 , Cp), 4.13 (5H, s, Cp'), 4.06 (1H, m, Cp), 3.82 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, $\text{FcCH}_2\text{NRR}'$), 2.90 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, $\text{FcCH}_2\text{NRR}'$), 2.61 (1H, m, NCHMe), 2.37 (1H, m, NCHMe), 2.15 (3H, s, CH_3), 1.01 (3H, m, CH_3). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 125.0, 150.1, 149.3, 134.6, 128.2, 124.5, 122.5, 117.7, 98.9, 84.1, 83.8, 71.6, 70.4, 69.2, 65.9, 55.4, 51.1, 42.2, 41.3, 11.5. EIMS m/z 449 ($M^+ {}^{37}\text{Cl}$), 447 ($M^+ {}^{35}\text{Cl}$), 390 ($\text{M-HNEtMe}^+ {}^{37}\text{Cl}$), 388 ($\text{M-HNEtMe}^+ {}^{35}\text{Cl}$). Anal. ($\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{Fe}$) C, H, N.

N4-[2-[(Ferrocenylamino)methyl]ferrocenyl]-7-chloro-4-quinolinamine 8a. Yield: 45%. M.p.: 194 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.49 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.87 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.55 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 7.05 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.42 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.20 (1H, d, $J = 13.1$ Hz, ArNDCH_2), 4.23 (1H, m, Cp), 4.17 (1H, m, Cp), 4.15 (5H, s, Cp'), 4.08 (5H, s, Cp'), 4.10 (7H, m, Cp), 3.70 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, $\text{FcCH}_2\text{NRR}'$), 3.53 (2H, m, CH_2Fc). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 151.9, 149.9, 149.1, 134.5, 128.5, 125.0, 122.8, 117.6, 98.8, 85.6, 85.2, 83.5, 70.5, 70.3, 69.2, 68.9, 68.7, 68.5, 68.2, 66.1, 48.9, 47.5, 42.0. EIMS m/z 605 ($M^+ {}^{37}\text{Cl}$), 603 ($M^+ {}^{35}\text{Cl}$), 390 ($\text{M-FcCH}_2\text{NH}_2^+ {}^{37}\text{Cl}$), 388 ($\text{M-FcCH}_2\text{NH}_2^+ {}^{35}\text{Cl}$). Anal. ($\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{ClFe}_2\text{N}_3$) C, H, N.

N4-[2-[(Ferrocenyl(methyl)amino]methylferrocenyl]-7-chloro-4-quinolinamine 8b. Yield: 80%. M.p.: 90 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.47 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, $\text{ArC}_2\text{-H}$), 7.83 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{ArC}_8\text{-H}$), 7.24 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, $\text{ArC}_5\text{-H}$), 6.94 (1H, dd, $J = 2.1$ and 8.9 Hz, $\text{ArC}_6\text{-H}$), 6.43 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, $\text{ArC}_3\text{-H}$), 4.24 (2H, m, ArNDCH_2), 4.16 (2H, m, Cp), 4.12 (5H, s, Cp'), 4.10 (2H, m, Cp), 4.07 (5H, s, Cp'), 3.97 (1H, m, Cp), 3.85 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, $\text{FcCH}_2\text{NRR}'$), 3.51 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, CH_2Fc), 3.25 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, CH_2Fc), 2.91 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, $\text{FcCH}_2\text{NRR}'$), 2.01 (3H, s, CH_3). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 151.5, 150.4, 148.7, 134.7, 127.5, 124.9, 122.9, 117.7, 98.8, 84.0, 83.9, 82.5, 71.4, 70.6, 70.5, 70.3, 69.2, 68.5, 68.3, 65.9, 56.9, 56.1, 42.1, 41.1. EIMS m/z 619 ($M\text{H}^+ {}^{37}\text{Cl}$), 618 ($M\text{H}^+ {}^{35}\text{Cl}$), 389 ($\text{M} - \text{N}(\text{FcCH}_2)(\text{CH}_3)^+ {}^{37}\text{Cl}$), 387 ($\text{M} - \text{N}(\text{FcCH}_2)(\text{CH}_3)^+ {}^{35}\text{Cl}$). Anal. ($\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{ClFe}_2\text{N}_3$) C, H, N.

N4-[2-[(Ferrocenyl(ethyl)amino]methylferrocenyl]-7-chloro-4-quinolinamine 8c. Yield: 56%. M.p.: 67 °C. ^1H NMR (CDCl_3)

δ 8.48 (1H, d, J = 5.4 Hz, ArC₂-H), 7.84 (1H, d, J = 2.1 Hz, ArC₈-H), 7.27 (1H, d, J = 8.9 Hz, ArC₅-H), 6.97 (1H, dd, J = 2.1 and 8.9 Hz, ArC₆-H), 6.40 (1H, d, J = 5.4 Hz, ArC₃-H), 4.26 (1H, m, Cp), 4.21 (2H, m, ArCH₂ND), 4.11 (4H, m, Cp), 4.08 (5H, s, Cp'), 4.04 (5H, s, Cp'), 4.00 (1H, m, Cp), 3.86 (1H, m, Cp), 3.80 (1H, d, J = 12.8 Hz, FcCH₂NRR'), 3.64 (1H, d, J = 13.2 Hz, FcCH₂), 3.17 (1H, d, J = 13.2 Hz, FcCH₂), 2.98 (1H, d, J = 12.8 Hz, FcCH₂NRR'), 2.60 (1H, m, CH₂Me), 2.25 (1H, m, CH₂Me), 0.85 (3H, t, J = 7.1 Hz, CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 151.9, 150.1, 149.1, 134.5, 128.0, 124.7, 123.0, 117.7, 98.9, 84.7, 83.8, 82.9, 71.6, 70.6, 70.5, 70.2, 69.2, 68.5, 68.1, 65.9, 52.2, 51.6, 46.4, 42.3, 10.1. EIMS m/z 634 (MH⁺ ³⁷Cl), 632 (MH⁺ ³⁵Cl), 389 (M - N(FcCH₂)(C₂H₅))⁺ ³⁷Cl, 387 (M - N(FcCH₂)(C₂H₅))⁺ ³⁵Cl. Anal. (C₃₄H₃₄ClFe₂N₃) C, H, N.

Antimalarial Activity. Chloroquine diphosphate was purchased from Sigma. Ferroquine base (SR97276) was obtained from Sanofi Synthelabo (France), and RPMI 1640 culture medium was purchased from Life Technologies. Human erythrocytes and plasma were obtained through the EFS (Etablissement Français du Sang, France).

The HB3, Dd2, and W2 clones of *P. falciparum* were used as a control for sensitivity to chloroquine and ferroquine. The subclone of *P. falciparum* clone W2 was provided by Dr B. Pradines (PHARO Marseille, France). Parasites were grown in vitro. The microdilution radioisotope technique of Desjardins was used. IC₅₀ and IC₉₀ were calculated from response curves by linear interpolation. The critical threshold for IC₅₀ was considered as 100 nM, which is the critical value recognized for definition of CQ resistance in *P. falciparum*, and was considered equivalent for FQ resistance in field studies. Comparison within molecules was done using chloroquine as internal standard.

Inhibition of β -Hematin Formation. Experiments were carried out in duplicate, in 96-deep-wells. In each well, 250 μ L of a solution of 700 μ M of hemin in 25 mM NaOH were added to 250 μ L of a suspension of 1 mM 1-monooleoylglycerol in 90 mM sodium acetate at pH 5. Drugs were added from DMSO stock solutions (5 μ L). Microplates were incubated for 24 h at 37 °C. Controls contained an equal amount of DMSO. Following incubation, the samples were centrifuged at 4000 rpm at 4 °C for 30 min. The pellet of β -hematin was washed with 10 mM sodium phosphate, pH 7.4, containing 2.5% SDS, and was vortexed for 10 min at 20 °C before repelleting until the supernatant was colorless (five times). Dissolution of β -hematin was achieved by addition of 450 μ L of 10 mM sodium phosphate, pH 7.4, containing 2.5% SDS and 25 μ L of NaOH 1 M. Concentration of heme was calculated from absorbance at 405 nm.

Partition Coefficients: log D (pH 7.4 or pH 5.2). The relative log D (pH 7.4 or 5.2) in this study was assessed by the micro-HPLC method. These determinations were performed with a chromatographic apparatus (Spectra Series, San Jose, CA) equipped with a model P1000XR pump and a model SCM 1000 vacuum membrane degasser, a model UV 150 ultraviolet detector (λ = 330 nm), and a ChromJet data module integrator (ThermoFinnigan, San Jose, CA). A reversed phase column was used: a Waters XTerraMS C₁₈ (3.9 $\times$ 150 mm; 5 μ m particle size) with a mobile phase consisting of acetonitrile–phosphate buffer [KH₂PO₄/K₂HPO₄] (pH = 7) (60:40, v/v (FQ, **1a**, **1c**, **2a–d**, **3b**, **3d**, and **4a**), and 20:80, v/v (CQ)), acetonitrile–phosphate buffer (pH = 6) (60:40, v/v (**3c** and **8a**), 50:50, v/v (**3a** and **6** and **7b**) and 40:60, v/v (**7a**)), acetonitrile–phosphate buffer (pH = 5) (60:40, v/v (**4b**, **5b**, **5c**, and **8b**)).

The compounds were partitioned between *n*-octanol (HPLC grade) and phosphate buffer (pH = 5.2 or 7.4). Octanol was presaturated with buffer, and conversely. An amount of 1 mg of each compound was dissolved in an adequate volume of methanol in order to achieve 1 mg/mL stock solutions. Then an appropriate aliquot of these methanolic solutions was dissolved in buffer to obtain final concentration of 100 μ g/mL. Under the above-described chromatographic conditions, 20 μ L of this aqueous phase was injected into the chromatograph, leading to the determination of a peak area before partitioning (W_0).

In screw-capped tubes, 500 μ L of the aqueous phase (V_{aq}) was then added to 100 μ L of *n*-octanol (V_{oct}) when working at pH = 5.2; V_{aq} = 2000 μ L and V_{oct} = 10 μ L for determination at pH = 7.4. The mixture was shaken by mechanical rotation during 30 min. Then the centrifugation was achieved at 3000 rpm in 15 min. An amount of 20 μ L of the lower phase was injected into the chromatograph column. This led to the determination of a peak area after partitioning (W_1). The log D was determined by the formula:

$$\log D = \log [(W_0 - W_1)V_{aq}/W_1V_{oct}]$$

Acknowledgment. This work was supported by Sanofi Aventis (fellowship attributed to W.D.), by the “Fondation des Treilles” (fellowship attributed to W.D.) by the CNRS, by the Universités de Lille I and Lille II, and by the Inserm. A BDI fellowship from CNRS and Region Nord-Pas-de-Calais to N.C. is also gratefully acknowledged. C.B. thanks Timothy J. Egan for stimulating discussions and careful reading of the manuscript. L. Maciejewski is acknowledged for helpful discussions. I. Ricard, L. Cattiaux, H. Kalamou, and D. Lamberton are acknowledged for their expert technical intervention.

Supporting Information Available: Combustion analyses for target compounds **1a–d**, **2a–d**, **3a–d**, **5a–c**, **7b**, and **8a–c**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- Biagini, G. A.; O'Neill, P. M.; Bray, P. G.; Ward, S. A. Current drug development portfolio for antimalarial therapies. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, *5*, 473–478.
- Baird, J. K. Effectiveness of antimalarial drugs. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 1565–1577.
- Ballou, W. R.; Arevalo-Herrera, M.; Carucci, D.; Richie, T. L.; Corradin, G.; Diggs, C.; Druilhe, P.; Giersing, B. K.; Saul, A.; Heppner, D. G.; Kester, K. E.; Lanar, D. E.; Lyon, J.; Hill, A. V.; Pan, W.; Cohen, J. D. Update on the clinical development of candidate malaria vaccines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, *71*, 239–247.
- Greenwood, B. M.; Bojang, K.; Whitty, C. J.; Targett, G. A. Malaria. *Lancet* **2005**, *365*, 1487–1498.
- Pink, Richard; Hudson, A.; Mouris, M.-A.; Bendig, M. Opportunities and Challenges in Antiparasitic Drug Discovery. *Nature Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 727–740.
- Biot, C.; Chibale, K. Novel approaches to antimalarial drug discovery. *Infect. Disord. Drug Targets* **2006**, *6*, 173–204.
- Kapoor, V. K.; Kumar, K. Recent advances in the search for newer antimalarial agents. *Prog. Med. Chem.* **2005**, *43*, 189–237.
- For a detailed review about ferroquine, see: Biot, C. Ferroquine: a new weapon in the fight against malaria. *Curr. Med. Chem.: Anti-infect. Agents* **2004**, *3*, 135–147.
- Biot, C.; Taramelli, D.; Forfar-Bares, I.; Maciejewski, L. A.; Boyce, M.; Nowogrocki, G.; Brocard, J. S.; Basilico, N.; Oliaro, P.; Egan, T. J. Insights into the mechanism of action of ferroquine. Relationship between physicochemical properties and antiparasitic activity. *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 185–193.
- Ridley, R. G.; Hofheinz, W.; Matile, H.; Jaquet, C.; Dorn, A.; Masciadri, R.; Jolidon, S.; Richter, W. F.; Guenzi, A.; Girometta, M. A.; Urwyler, H.; Huber, W.; Thaitong, S.; Peters, W. 4-Aminoquinoline Analogs of Chloroquine with Shortened Side Chains Retain Activity Against Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 1846–1854.
- De, D.; Krogstad, F. M.; Byers, L. D.; Krogstad, D. J. Structure–Activity Relationships for Antiplasmodial Activity among 7-Substituted 4-Aminoquinolines. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4918–4926.
- Chibale, K.; Moss, J. R.; Blackie, M.; van Schalkwyk, D.; Smith, P. J. New amine and urea analogs of ferrochloroquine: synthesis, antimalarial activity in vitro and electrochemical studies. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6231–6235.
- Beagley, P.; Blackie, M. A. L.; Chibale, K.; Clarkson, C.; Mos, J. R.; Smith, P. J. Synthesis and antimalarial activity in vitro of new ruthenocene-chloroquine analogs. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 4426–4433.
- Borch, R. F.; Durst, H. D. Lithium cyanohydridoborate, a versatile new reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3996–3997.

- (15) Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D. Cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2897–2904.
- (16) Biot, C.; Delhaes, L.; N'Diaye, C. M.; Maciejewski, L. A.; Camus, D.; Dive, D.; Brocard, J. S. Synthesis and antimalarial activity in vitro of potential metabolites of ferrochloroquine and related compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2843–2847.
- (17) Daher, W.; Pelinski, L.; Klieber, S.; Sadoun, F.; Meunier, V.; Bourrie, M.; Biot, C.; Guillou, F.; Fabre, G.; Brocard, J.; Fraisse, L.; Maffrand, J. P.; Khalife, J.; Dive, D. In vitro metabolism of ferroquine (SSR97193) in animal and human hepatic models and antimalarial activity of major metabolites on *Plasmodium falciparum*. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 667–682.
- (18) Parapini, S.; Basilico, N.; Pasini, E.; Egan, T. J.; Olliaro, P.; Taramelli, D.; Monti, D. Standardization of the physicochemical parameters to assess in vitro the β -hematin inhibitory activity of antimalarial drugs. *Exp. Parasitol.* **2000**, *96*, 249–256.
- (19) Déprez-Poulain, R.; Melnyk, P. 1,4-bis(3-aminopropyl)-piperazine libraries: from the discovery of classical chloroquine-like antimalarials to the identification of new targets. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2005**, *8*, 39–48.
- (20) Warhurst, D. C.; Craig, J. C.; Agadu, I. S.; Meyer, D. J.; Lee, S. Y. The relationships of physicochemical properties and structure to the differential antiplasmodial activity of the cinchona alkaloids. *Malaria J.* **2003**, *2*, 26–40.
- (21) The lack of correlation is also striking in Figure 2, where the compounds have been distributed as a function of increasing log *D* (pH = 5.2) values.
- (22) Kaschula, C. H.; Egan, T. J.; Hunter, R.; Basilico, N.; Parapini, S.; Pasini, E.; Monti, D. Structure–activity relationships in 4-aminoquinoline antiplasmodials. The role of the group at the 7-position. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3531–3539.

JM060259D

Chapitre II

Synthèse, caractérisation et mécanisme d'action de nouveaux dérivés de la ferroquine

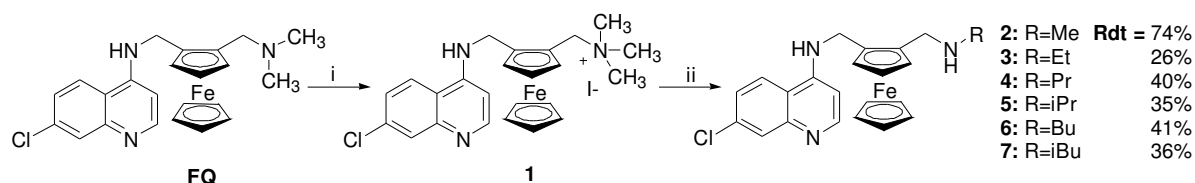
I. Les dérivés de la ferroquine : modification sur l'amine terminale

I.1. Dérivés aminés de la ferroquine

I.1.1. Introduction

La chimie bioorganométallique apporte une contribution intéressante à la résolution du grave problème posé par la chimiorésistance de *P. falciparum* aux médicaments antipaludiques usuels. L'efficacité de la FQ est un argument en faveur de la pertinence de cette nouvelle stratégie (voir chapitre I, paragraphe III). Dans le but de modifier la biodisponibilité ou d'améliorer la spécificité mais aussi de mieux comprendre le mécanisme d'action de la FQ, dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons établi un programme de synthèse d'une série de dérivés de la FQ. A partir du squelette de la FQ, une modulation des substituants sur l'amine terminale de la chaîne latérale a été effectuée. Ces nouvelles molécules ont été testées sur des clones de *P. falciparum* CQ-sensibles et CQ-résistants. Ces études de pharmacomodulation couplées à la mesure de leurs coefficients de partage apparents ($\log D$) aux pH du cytoplasme (7,4) et de la vacuole digestive (5,2) du parasite, permettent de compléter l'analyse de relations structure-activité (RSA) débutée depuis l'origine du projet FQ.^{1,2,3,4,5,6,7}

I.1.2. Synthèse des dérivés amines secondaires de la ferroquine



(i) CH_3I , acetone; (ii) RNH_2 , K_2CO_3 , CH_3CN , reflux

Schéma 1 : Synthèse des dérivés amines secondaires de la ferroquine 2-7.

Les dérivés amines secondaires de la FQ sont synthétisés à partir de la FQ. L'atome d'azote terminal de la FQ est quaternisé à l'aide d'iodure de méthyle dans l'acétone à température ambiante. Le groupement ammonium résultant est ensuite substitué par l'amine

¹ Domarle et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42, 540-544.

² Biot, C. **1998**, thèse de doctorat chimie organique et macromoléculaire.

³ De et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1996**, 55, 579-583.

⁴ De et al. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4918-4926.

⁵ Chibale et al. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 6231-6235.

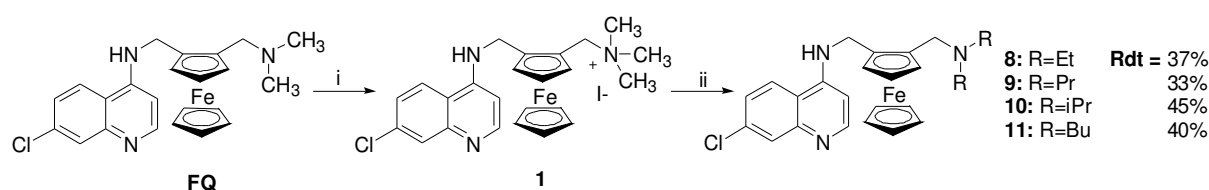
⁶ Biot et al. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 4707-4714.

⁷ Beagley et al. *Dalton Trans.* **2003**, 15, 3046-3051.

primaire correspondante dans l'acétonitrile à reflux. Cette substitution nucléophile conduit aux produits **2** à **7** avec des rendements variants de 26 à 74 % selon la nature des amines introduites.

I.1.3. Synthèse des dérivés amines tertiaires de la ferroquine

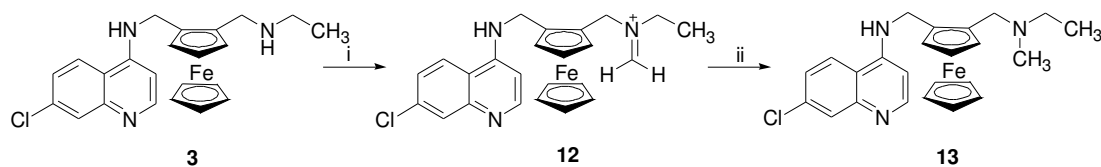
Deux voies de synthèse différentes ont été envisagées pour la synthèse des dérivés amines tertiaires de la FQ. Les dérivés présentant deux substituants identiques sur l'amine terminale ont été obtenus suivant la voie de synthèse des dérivés secondaires (voir paragraphe I.1.2). Une substitution nucléophile de l'ammonium de la FQ par l'amine secondaire correspondante permet d'obtenir les dérivés de **8** à **11** avec des rendements variants de 33 à 45 %.



(i) CH_3I , acétone; (ii) RNH_2 , K_2CO_3 , CH_3CN , reflux

Schéma 2 : Synthèse des dérivés amines tertiaires de la ferroquine **8-11**.

Le dérivé **13** comprenant deux substituants différents sur l'amine terminale de la FQ a été synthétisé selon la réaction de Borch.⁸ L'amine secondaire **3** est mise en présence de formaldéhyde. Il y a alors formation d'une imine **12** qui est réduite par le cyanoborohydrure de sodium dans le méthanol pour conduire au dérivé tertiaire **13** souhaité avec un rendement global de 65 %.



(i) HCHO , MeOH ; (ii) NaBH_3CN , MeOH .

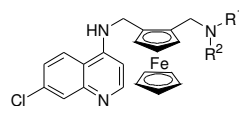
Schéma 3 : Synthèse du dérivé amine tertiaire **13** de la ferroquine.

⁸ Borch, R.F.; Bernstein, M.D.; Dupont Durst, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 2897-2904.

I.1.4. Activité antipaludique des dérivés aminés de la ferroquine

Le test de chimiosensibilité *in vitro* de *P. falciparum* a pour but de déterminer la sensibilité des parasites à des molécules antipaludiques. Il consiste à cultiver les parasites en présence de différentes concentrations d'antipaludiques. Il permet ainsi de déterminer la concentration inhibitrice 50 % (CI₅₀) et la concentration inhibitrice 90 % (CI₉₀) des molécules antipaludiques (voir annexe 1).

L'activité antipaludique des dérivés amines secondaires **2-7** et tertiaires **9-11** de la FQ a été testée sur deux clones de *P. falciparum* : un clone CQ-sensible (NF54) et un clone CQ-résistant (K1) (table 4). Ces tests ont été réalisés par le Dr. Rottmann au Swiss Tropical Institute à Bâle dans le laboratoire du Pr. Brun. L'activité antipaludique des dérivés **8** et **13** a été testée sur trois clones de laboratoire de *P. falciparum* : HB3, clone CQ-sensible, Dd2, clone légèrement CQ-résistant et MF-résistant, et W2, clone CQ-résistant (table 5). Ces tests ont été réalisés par le Dr. Pradines à l'Institut de Médecine tropicale du Service de Santé des Armées à Marseille. La CQ, l'ARS et la FQ ont été pris comme références pour ces tests.

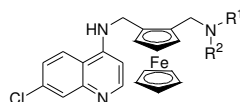


composés	R ¹	R ²	NF54		K1	
			CI ₅₀ , nM	CI ₉₀ , nM	CI ₅₀ , nM	CI ₉₀ , nM
2	Me	H	7,5	10,9	15,6	21,7
3	Et	H	13,0	20,5	11,2	18,6
4	Pr	H	9,4	18,1	7,0	9,7
5	iPr	H	8,0	10,6	7,2	10,0
6	Bu	H	14,9	20,8	5,1	9,0
7	iBu	H	12,0	19,3	8,0	14,2
9	Pr	Pr	10,0	13,8	14,0	21,9
10	iPr	iPr	7,6	10,4	14,1	20,8
11	Bu	Bu	10,3	13,6	35,1	57,3
CQ	-	-	5,1	9,1	206,7	405,5
ARS	-	-	9,8	18,7	3,4	7,6
FQ	Me	Me	9,3	15,9	11,0	15,8

Table 4 : Sensibilité *in vitro* des clones NF54 et K1 de *P. falciparum* aux dérivés de la FQ **2-7** et **9-11**.

Toutes les amines secondaires **2-7** et tertiaires **8-10** et **13** ont des valeurs de CI₅₀ et de CI₉₀ autour de 10 nM, similaires à celles de la FQ, légèrement supérieures à celles de l'ARS et largement inférieures à celles de la CQ sur le clone CQ-résistant. Le composé **11** avec deux groupements *n*-butyles, quant à lui, possède une activité légèrement inférieure à celle des autres amines sur les clones NF54 et K1 de *P. falciparum*. On constate également que 4 nouveaux analogues (**4-7**) possèdent une meilleure activité antipaludique que la FQ sur le

clone CQ-résistant K1. Comme il a déjà été constaté précédemment,⁶ une légère modification sur l'amine basique terminale de la chaîne latérale de la FQ n'affecte pas son activité si les substituants ne sont pas trop volumineux.



composés	R ¹	R ²	HB3		Dd2		W2	
			CI ₅₀ , nM	CI ₉₀ , nM	CI ₅₀ , nM	CI ₉₀ , nM	CI ₅₀ , nM	CI ₉₀ , nM
8	Et	Et	12,4	18,0	17,7	28,3	16,8	25,3
13	Me	Et	23,6	34,1	17,0	30,2	19,2	30,9
CQ	-	-	21,8	45,7	61,8	166,7	452,4	802,2
FQ	Me	Me	20,2	28,6	18,9	28,4	8,1	13,8

Table 5 : Sensibilité *in vitro* des clones HB3, Dd2 et W2 de *P. falciparum* aux dérivés de la FQ **8** et **13**.

I.2. Modification en position 11 de la ferroquine

I.2.1. Introduction

La FQ, tout comme la CQ, s'accumule dans la vacuole digestive du parasite en raison de la protonation de l'azote de la quinoléine (position 1) et de l'azote de la chaîne latérale (position 23). Les valeurs de pKa de l'azote de la quinoléine (pKa₁) et de l'amine terminale de la chaîne latérale (pKa₂) de la CQ et de la FQ ont été mesurées dans le but d'expliquer la différence de réactivité observée entre les deux molécules sur tous les clones et isolats de terrain de *P. falciparum* CQ-résistants testés jusqu'à présent.⁹ Ces valeurs sont très différentes (pKa₁ = 8,19 et pKa₂ = 6,99 pour la FQ ; pKa₁ = 10,03 et pKa₂ = 7,94 pour la CQ) et amènent à prédire une plus faible accumulation de la FQ que de la CQ dans la vacuole digestive du parasite. Cependant, une méthode alternative qui permet de calculer le VAR (rapport d'accumulation vacuolaire) à partir des valeurs de log *D*, donne des résultats contradictoires (voir chapitre IV). La détermination de l'accumulation des molécules dans la vacuole digestive du parasite dépend fortement des conditions considérées et des méthodes utilisées. Des manipulations supplémentaires seraient nécessaires pour mieux comprendre ce phénomène d'accumulation. Nous pouvons cependant supposer que les valeurs de pKa moins basiques de la FQ sont liées à la forte activité antipaludique de la molécule.

⁹ Biot, C. et al. *Mol. Pharm.* **2005**, 2, 185-193.

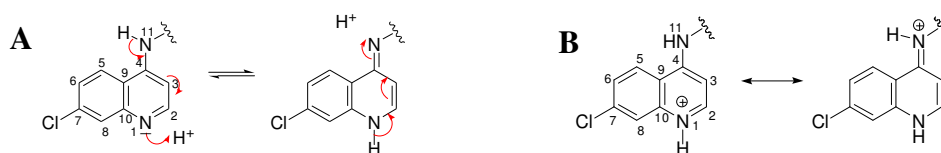
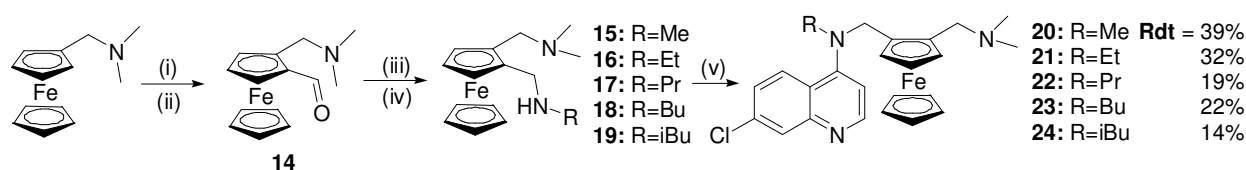


Schéma 6 : Formes tautomères du groupement quinoléine des amino-4-quinoléines (A) et structures de résonance entre le quinolinium et l'ammonium des dérivés quinoléiques (B).

Dans le but de mieux comprendre l'influence des valeurs de pK_a dans le mécanisme d'action de la FQ, une série de 5 dérivés a été synthétisée. Une modification structurale a été faite au niveau de l'azote en position 11 en greffant différents substituants alkyles. Avec un substituant en cette position, le transfert de proton de la position 1 à la position 11 n'est plus possible sur la forme neutre (schéma 6). Cette série a été testée sur 12 clones de *P. falciparum* ayant une sensibilité variable à la CQ par le Dr. Pradines à Marseille. Les valeurs de $\log D$ de ces dérivés ont été mesurées par HPLC et les valeurs de pK_a par titration en collaboration avec le Dr. Forfar à Bordeaux.

I.2.2. Synthèse des dérivés 20-24

La synthèse des dérivés 20-24 est similaire à celle de la FQ. Elle consiste, tout d'abord, en une lithiation en position 1 de la *N,N*-diméthyl(ferrocénylméthyl)amine suivie d'une formylation par la diméthylformamide (DMF). Une amination réductrice de type Mignonac avec l'amine correspondante est ensuite réalisée sur l'aldéhyde obtenu. Finalement, une substitution nucléophile aromatique de l'amine sur la 4,7-dichloroquinoléine dans la *N*-méthylpyrrolidone (NMP) à 135°C, conduit aux produits désirés avec des rendements globaux de 14 à 39 %.

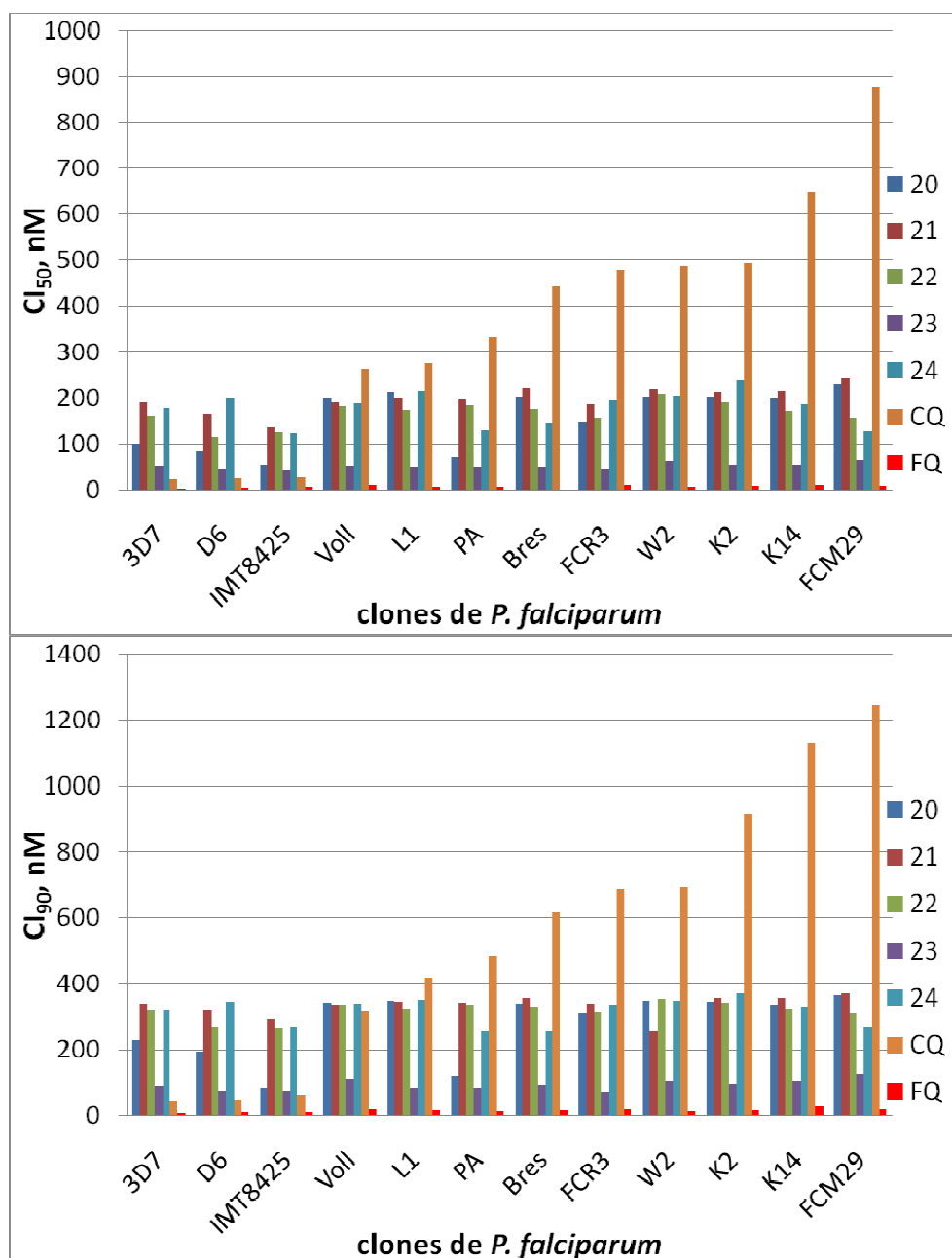


(i) *t*-BuLi, atm. N₂, Et₂O; (ii) DMF; (iii) RNH₂, THF anh.; (iv) NaBH₄, MeOH anh.; (v) 4,7-dichloroquinoléine, K₂CO₃, NEt₃, NMP, atm. N₂, 135°C.

Schéma 7 : Synthèse des dérivés 20-24 de la FQ.

I.2.3. Activité antipaludique des dérivés 20-24

L'activité antipaludique des dérivés **20-24** a été testée sur 12 clones de *P. falciparum* différentes à l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées à Marseille par le Dr. Pradines (graphes 8). Classés du plus sensible au plus résistant à la CQ, les clones testés sont les suivants : 3D7, D6, IMT8425, Voll, L1, PA, Bres, FCR3, W2, K2, K14 et FCM29.



Graphes 8 : Représentation des valeurs de CI_{50} et CI_{90} des dérivés **20-24** de la ferroquine sur différents clones de *P. falciparum* (tableau de valeurs en annexe 3).

Les dérivés **20-24** de la FQ présentent une activité inférieure à celle de la CQ sur les clones CQ-sensibles 3D7, D6, 8425 et Voll mis à part pour le composé **23** qui présente une

activité du même ordre de grandeur que la CQ et la FQ sur ces clones. En revanche, tous les dérivés possèdent une activité supérieure à la CQ sur les clones CQ-résistants : ils sont entre 1,3 et 13,5 fois plus actifs. Bien qu'étant plus actifs que la CQ sur les parasites CQ-résistants, les composés de la nouvelle série restent néanmoins moins actifs que la FQ. Le composé **23** présente la meilleure activité. Tout comme pour la FQ, nous pouvons constater que quelque soit le degré de résistance du clone à la CQ, les nouveaux dérivés **20-24** présentent une activité constante sauf le composé **20** qui possède une activité légèrement supérieure sur certains clones (3D7, D6, 8425 et PA).

Cette étude nous permet de conclure que l'introduction d'un groupement alkyle en position 11 de la FQ n'est pas favorable à l'activité antipaludique.

I.3. Caractérisation

I.3.1. Caractérisation par rayons X du dérivé **6**

Paramètres	
Formule brute	C ₂₅ H ₂₈ ClFeN ₃
MW (g.mol ⁻¹)	461,80
<i>a</i> [Å]	8,72640(10)
<i>b</i> [Å]	10,23050(10)
<i>c</i> [Å]	13,4208(2)
α [°]	82,9590(10)
β [°]	76,5770(10)
γ [°]	75,6730(10)
<i>V</i> [Å ³]	1126,47(2)
Z	2
Système cristallin	triclinique
Groupe d'espace	P-1
μ (cm ⁻¹)	0,805
ρ (g cm ⁻³)	1,361
F(000)	484
limites θ [°]	1,56-29,99
T (K)	100
Nombre de données collectées	6494
$R = \sum F_o - F_c / \sum F_o $	0,0272
R_w	0,0740
Qualité de l'ajustement	1,050
$\Delta\rho_{\min}$ [eÅ ⁻³]	-0,268
$\Delta\rho_{\max}$ [eÅ ⁻³]	0,511

Table 9 : Données cristallographiques du dérivé **6**.

La cristallisation du dérivé **6** a été obtenue par évaporation lente d'une solution réalisée dans du dichlorométhane. Des cristaux jaunes ont été obtenus et ont permis une détermination structurale par rayons X (RX) de l'amine secondaire. Le composé **6** cristallise dans un réseau triclinique P-1. Les données cristallographiques sont résumées dans la table 9 et la structure moléculaire est présentée en figure 10.

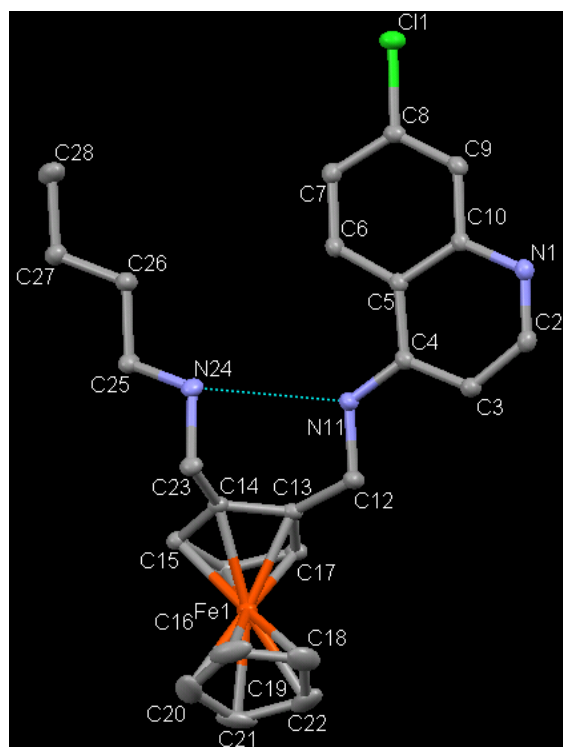


Figure 10 : Structure cristalline du dérivé **6** de la FQ.

La structure à l'état solide du dérivé **6** est stabilisée par une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'hydrogène de l'amine N11 et le doublet non liant de l'amine secondaire N24, avec une distance entre N24 et N11 de 3,01 Å. La liaison N11-C12 est parallèle au cycle quinoléine avec un angle dièdre C3-C4-N11-C12 de 3,1°. La valeur de l'angle dièdre C4-N11-C12-C13 le long de la liaison N11-C12 est de 166,2°. De ce fait, la distance entre les protons diastéréoisotopiques H12a et H12b et le proton H3 du cycle quinoléique est proche : 2,61 et 2,21 Å (pro-*S* et pro-*R*, respectivement) et la molécule adopte une conformation coudée (figure 11).

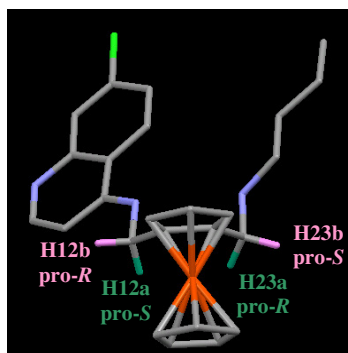


Figure 11 : Définition de H12a, H12b, H23a et H23b.

Dans la structure cristalline, les cycles quinoléines du dérivé **6** font un empilement de type π - π *stacking* dans une configuration antiparallèle avec une distance inter-plans de 3,6 Å (figure 12). Ce type d'interaction n'était pas présent dans la structure cristallographique de la FQ à cause de la répulsion stérique entre l'un des groupements méthyles et le cycle quinoléique.

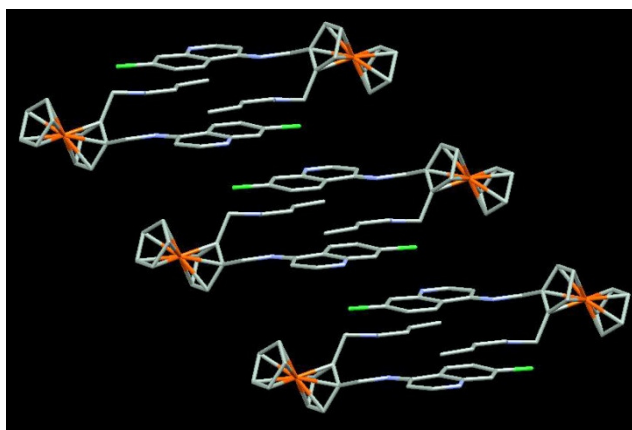
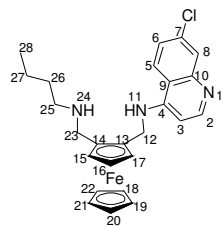


Figure 12 : Diagramme d'empilement du dérivé **6**.

I.3.2. Caractérisation RMN du dérivé 6

Des expériences RMN ont été enregistrées dans du chloroforme deutéré à 280 K et à une fréquence ^1H de 400 MHz en collaboration avec le Dr. Trivelli du Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (USTL). La concentration dans le tube de RMN du composé **6** est de 77 mM. L'attribution complète (table 13) des signaux RMN ^1H , ^{13}C et ^{15}N du dérivé **6** a été réalisée sur la base d'expériences COSY, ^{13}C -HSQC, ^{13}C -HMBC, ^{15}N -HSQC, ^{15}N -HMBC et NOESY (annexe 2).

Une goutte de H₂O a été ajoutée à la surface du tube afin d'éviter l'évaporation du solvant et par conséquent la dégradation de l'homogénéité du champ durant l'acquisition.¹⁰ Le signal pour H11 porté par l'azote N11 est fin, ce qui nous permet d'observer un doublet avec une constante de couplage $^3J = 6,9$ Hz, couplage vicinal entre H11 et H12b (spectre 14). Par ailleurs, le proton H24 qui n'est pas impliqué dans une liaison hydrogène n'est pas observable en RMN ¹H. L'échange de ce proton H24 avec les protons de l'eau présente dans le solvant est beaucoup trop rapide.



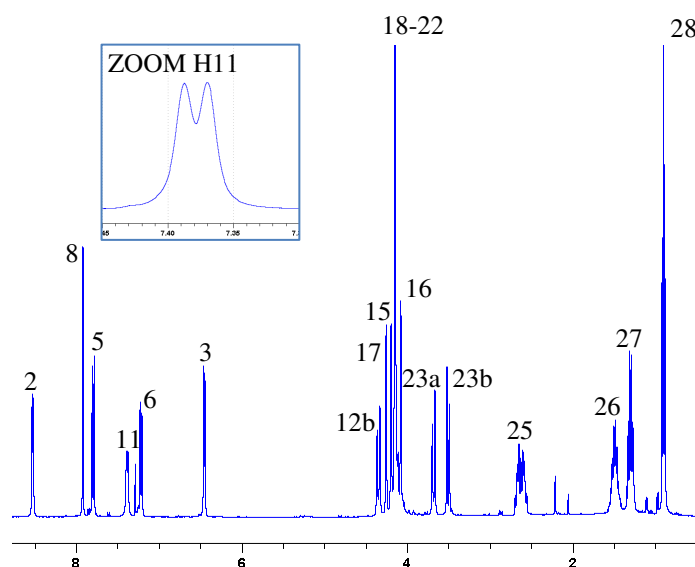
	¹ H		¹³ C	¹⁵ N
Atome	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm)
1				238,8
2	8,52	5,2 (d)	151,1	
3	6,45	5,2 (d)	97,9	
4			149,1	
5	7,79	9,1 (d)	121,9	
6	7,21	2,0; 9,1 (dd)	123,5	
7			133,6	
8	7,91	2,0 (d)	127,3	
9			116,7	
10			148,2	
11	7,38	6,9 (d)		85,3
12a	4,34	13,0 (d)	41,3	
12b	4,14	6,9; 13,0 (dd)	41,3	
13			82,4	
14			84,4	
15	4,19		69,4	
16	4,07	2,4 (t)	65,1	
17	4,25		69,2	
18-22	4,14		68,1	
23a	3,68	12,3 (d)	46,8	
23b	3,50	12,3 (d)	46,8	
24				50,6
25a	2,64		48,5	
25b	2,60		48,5	
26	1,48		30,8	
27	1,30		19,5	
28	0,89	7,3 (t)	13,0	

Table 13 : Attribution des déplacements chimiques ¹H, ¹³C et ¹⁵N du dérivé **6** dans CDCl₃ à 280 K et à une fréquence ¹H de 400 MHz.

La séquence classique de type zgig30 (spectre 1D ¹³C découplé ¹H à l'acquisition avec une excitation du ¹³C par une impulsion de 30°) ne permet pas toujours de détecter tous les

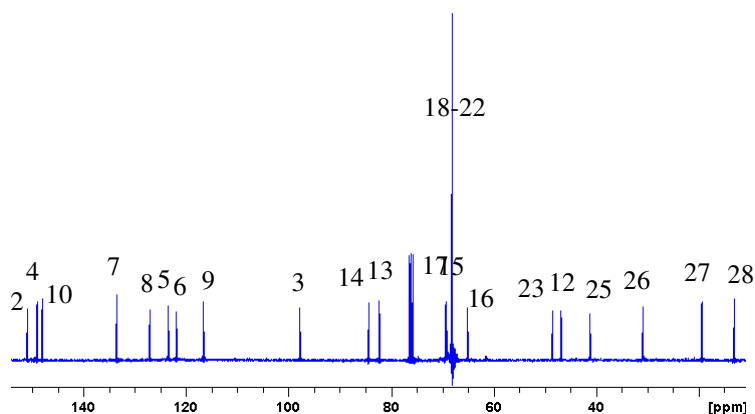
¹⁰ Wieruszkeski, J.M. et al. *J. Magn. Reson.* **2006**, *181*, 199-202.

carbones quaternaires de la molécule à cause de leur vitesse de relaxation longitudinale plus longue par rapport aux carbones protonés. Le groupe du Dr. Lippens a mis au point une nouvelle séquence beaucoup plus sensible appelée UDEFT (Uniform Driven Equilibrium Fourier Transform).¹¹ Cette séquence permet de forcer les aimantations à revenir plus rapidement à l'état d'équilibre et de faciliter ainsi leur relaxation longitudinale notamment celle des carbones quaternaires qui est plus problématique. Par conséquent, le temps de retour à l'équilibre entre chaque scan est diminué. Le délai de relaxation entre chaque scan des séquences UDEFT est plus court que celui des séquences classiques, ce qui accélère le processus d'acquisition du spectre 1D ^{13}C découplé ^1H . Cette séquence est surtout nécessaire pour tous les noyaux qui relaxent lentement. Elle permet aussi d'obtenir un spectre quantitatif. C'est cette séquence que nous avons utilisé pour obtenir le spectre ^{13}C du dérivé **6** (spectre 15) et de toutes les molécules qui sont présentées dans ce manuscrit.



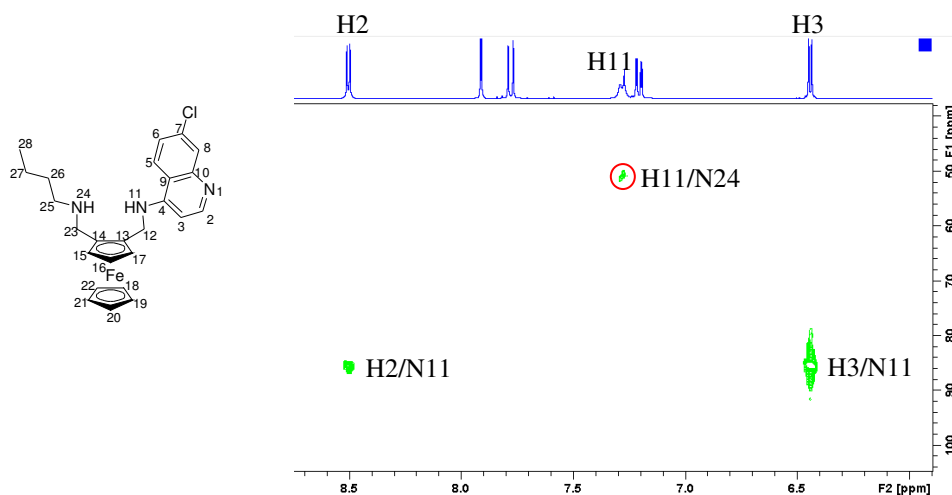
Spectre 14 : Spectre ^1H du dérivé **6** à une fréquence ^1H de 400 MHz à 280 K dans CDCl_3 et zoom sur le doublet du proton H11.

¹¹ Piotto, M. et al. *Magn. Reson. Chem.* **2006**, 44, 943-947.



Spectre 15 : Spectre ^{13}C du dérivé **6** à une fréquence ^{13}C de 100,6 MHz à 280 K dans CDCl_3 .

L'expérience ^{15}N -HMBC permet d'attribuer les trois signaux ^{15}N des azotes à partir des protons à travers 2 ou 3 liaisons. L'expérience ^{15}N -HMBC montre une corrélation scalaire entre N24 et H11 ce qui confirme la présence de la liaison hydrogène en solution, comme observée dans la structure cristalline par rayons X (spectre 16).



Spectre 16 : Spectre ^{15}N -HMBC du dérivé **6** à une fréquence ^1H de 400 MHz à 294,4 K dans CDCl_3 .

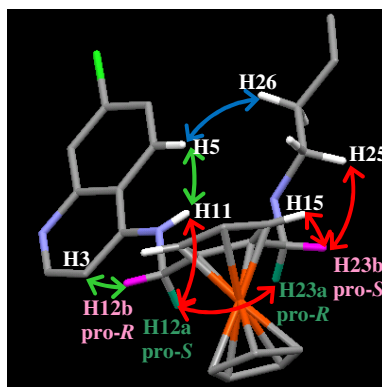
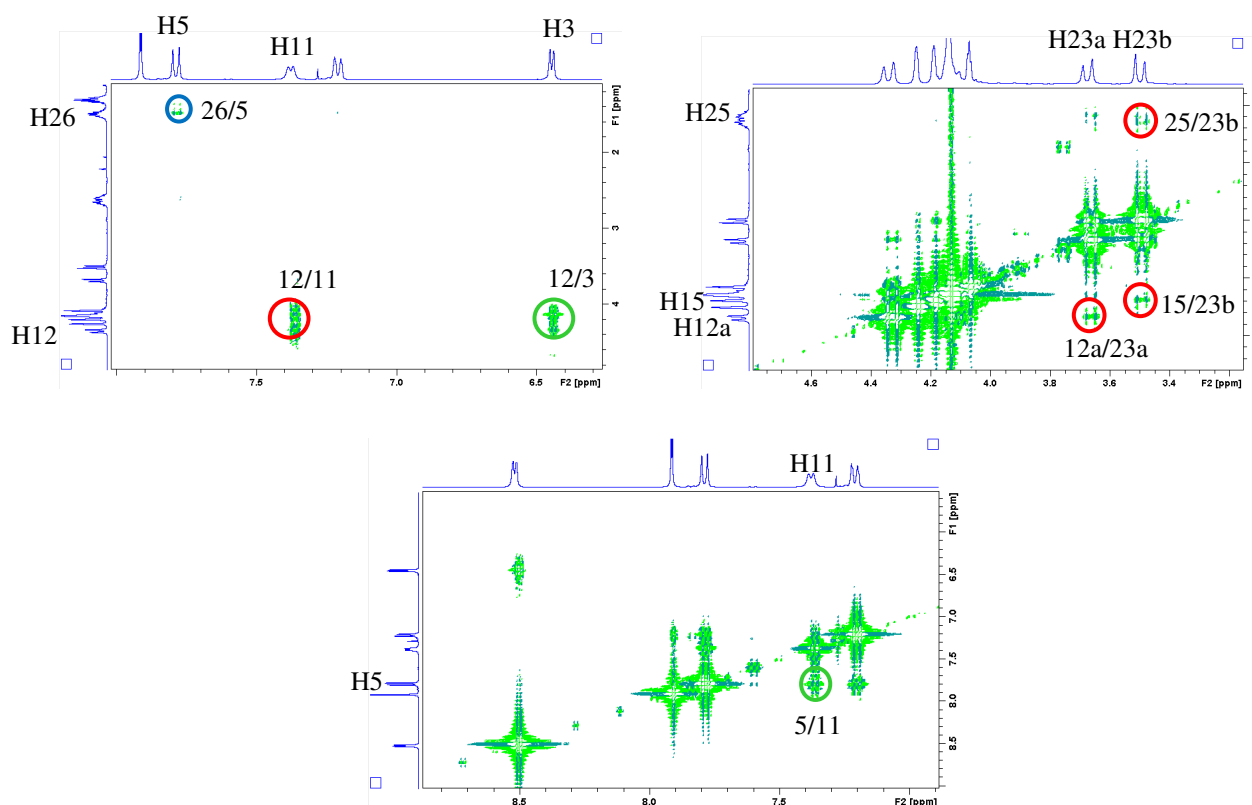


Figure 17 : NOEs observés pour le dérivé **6**. Les NOEs en bleu démontrent la liaison intramoléculaire, en vert, la conformation bloquée de la liaison C4-N11 et en rouge la conformation coudée de la molécule.



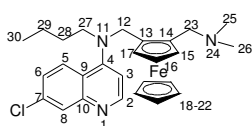
Spectres 18 : Zooms du spectre NOESY du dérivé **6** à une fréquence ^1H de 400 MHz à 280 K dans CDCl_3 avec un temps de mélange de 0,3 s. Les NOEs entourés démontrent la liaison intramoléculaire (en bleu), la conformation de la liaison C4-N11 bloquée (en vert) et la conformation coudée de la molécule (en rouge).

Des expériences NOESY permettent d'observer la conformation particulière qu'adopte le dérivé **6**. Sur le spectre NOESY, des NOEs (nuclear overhauser effects) entre H11 et H12a (pro-S), H12a et H23a (pro-R), H23b (pro-S) et H25, H12b (pro-R) et H17, H23b et H15 sont observables (spectres 18). Ces NOEs montrent la conformation coudée adoptée par le

ferrocène (figure 17). De plus, des NOEs supplémentaires entre H5 et H11 et H3 et H12a-b montrent que la conformation de la liaison C4-N11 est bloquée comme dans la structure cristalline. Un NOE entre H5 et H26 montre le repliement de la molécule et confirme la formation de la liaison hydrogène intramoléculaire.

En conclusion, les données RMN montrent que la structure spatiale du dérivé **6** en solution est proche de celle à l'état cristallin. Cette structure présente une liaison hydrogène intramoléculaire entre N24, H11 et N11 et molécule adopte une conformation coudée privilégiée.

I.3.3. Caractérisation RMN du dérivé **23**

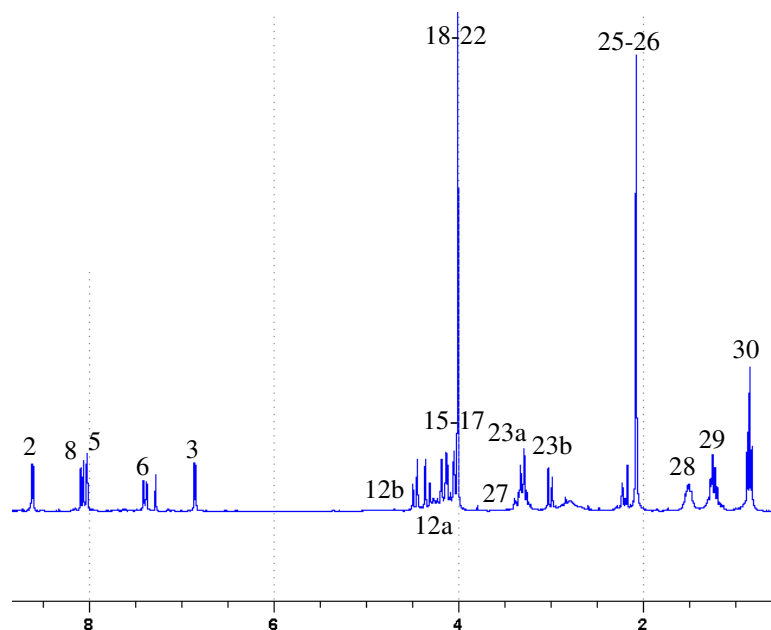


Atome	¹ H		¹³ C
	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)
2	8,62	5,3 (d)	151,2
3	6,86	5,3 (d)	111,0
4			150,5
5	8,08	9,3 (d)	125,9
6	7,40	2,1; 9,3 (dd)	125,5
7			134,6
8	8,03	2,1 (d)	128,6
9			122,9
10			156,1
12a	4,48	14,7 (d)	51,6
12b	4,34	14,7 (d)	51,6
13			83,4
14			83,6
15	4,13		69,7
16	4,01		66,7
17	4,18		70,7
18-22	4,05		69,4
23a	3,32	13,4 (d)	57,6
23b	3,01	13,4 (d)	57,6
25-26	2,08		45,2
27	3,34		51,2
28	1,51		28,6
29	1,24		20,3
28	0,85	7,3 (t)	13,9

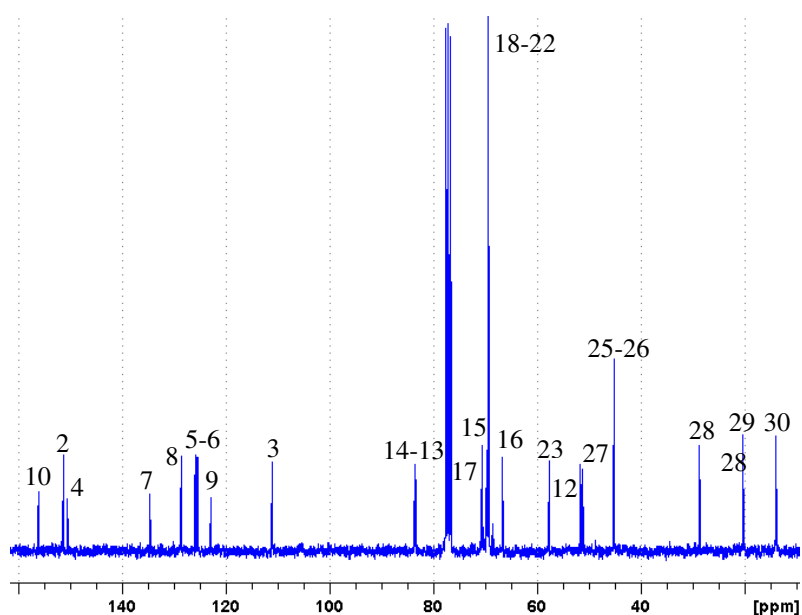
Table 19 : Attribution des déplacements chimiques ¹H et ¹³C du dérivé **23** dans CDCl₃ à 280 K et à une fréquence ¹H de 300 MHz.

Malheureusement, du fait de l'état huileux du composé, aucun cristal du dérivé **23** n'a pu être obtenu. Nous avons donc eu recours à des expériences RMN pour déterminer la

conformation de la molécule. L'attribution complète des signaux RMN ^1H et ^{13}C du dérivé **23** a été réalisée avec des expériences COSY, ^{13}C -HSQC et NOESY (table 19). Les expériences RMN ont été enregistrées dans du chloroforme deutéré à 280 K à une fréquence ^1H de 300 MHz en collaboration avec le Dr. Trivelli du Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (USTL).



Spectre 20 : Spectre ^1H du dérivé **23** à 300 MHz à 280K dans CDCl_3 .



Spectre 21 : Spectre ^{13}C du dérivé **23** à 75,4 MHz à 280 K dans CDCl_3 .

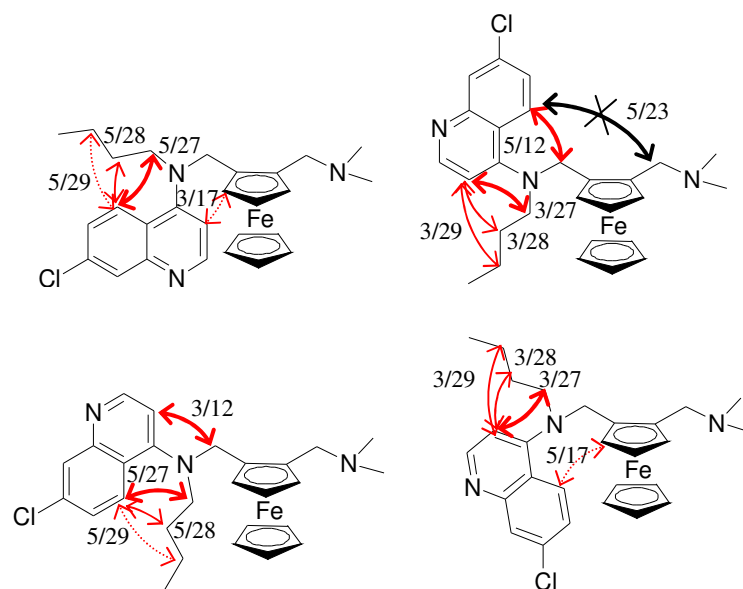
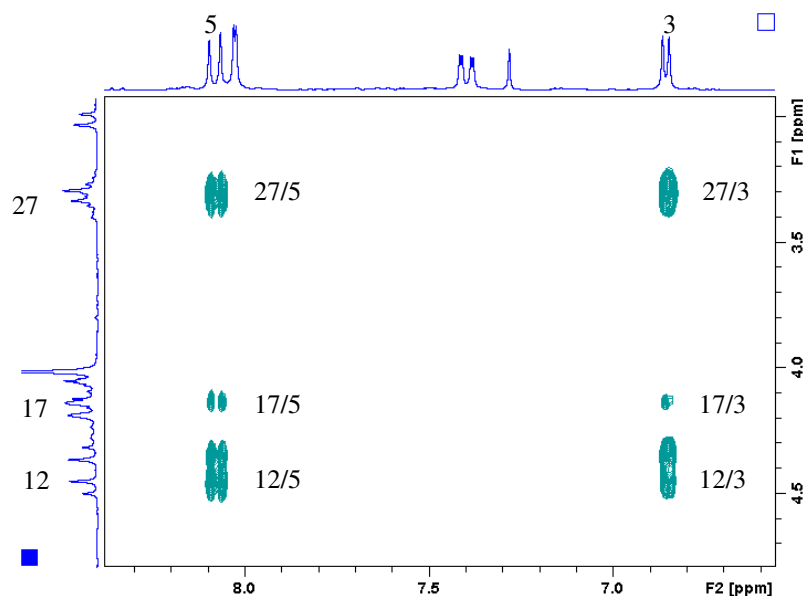


Figure 22 : NOEs observés (supposés intramoléculaires) pour le dérivé **23** sur certains conformères privilégiés. Les traits épais, fins et en pointillés indiquent respectivement des NOEs forts, moyens et faibles.



Spectre 23 : Spectre NOESY du dérivé **23** à 280 K à une fréquence ^1H de 300 MHz dans CDCl_3 avec un temps de mélange de 0,3 s.

La présence d'un seul signal singulet à 2,05 ppm correspondant aux deux CH_3 en position 25 et 26 met en évidence l'interconversion rapide d'une position à l'autre. Des NOEs entre H5 et H12, H17, H27, H28, H29 et des NOEs entre H3 et H12, H17, H27, H28, H29 montrent que la liaison C4-N11 n'est pas bloquée (figure 22 et spectre 23). Il y a libre rotation autour de cette liaison ce qui implique la perte de la coplanarité et perturbe la conjugaison de

la molécule. Par conséquent, la conformation coudée de la molécule n'est pas observée. Des expériences NOESY ont également été réalisées dans de la pyridine-d5 à faible concentration (1 mM) et haute température (343 K) à 400 MHz. Ainsi, on évite toute interaction intermoléculaire. Dans ces conditions expérimentales, aucune différence n'a été observée sur le spectre NOESY, ce qui confirme que les NOEs observés sont bien intramoléculaires et non intermoléculaires.

Nous pouvons conclure que l'analogue **6** et l'analogue **23** ont des structures tridimensionnelles différentes. Dans la structure du dérivé **6**, le ferrocène est très disponible du fait de sa conformation coudée. L'absence de liaison hydrogène intramoléculaire et la présence d'un groupement volumineux sur l'atome d'azote en position 11 devraient expliquer en partie la diminution d'activité antipaludique des analogues du composé **23**. Il serait intéressant d'explorer de manière plus précise la relation entre la présence de liaison hydrogène intramoléculaire et l'activité antipaludique des dérivés de la FQ.

I.4. Propriétés physicochimiques

Pour les molécules ionisables, il est nécessaire de prendre en compte l'état ionique de la molécule. Le coefficient de distribution, $\log D$, reflète bien le comportement des composés ionisables en solution à un pH donné.¹² Par définition, le $\log D$ est le rapport des concentrations de toutes les espèces (ionisées et non ionisées) de la molécule dans l'octanol à l'équilibre avec les mêmes espèces en phase aqueuse à une température donnée, habituellement de 25°C. Ce paramètre diffère du $\log P$, coefficient de partage, car il considère aussi bien les espèces ionisées que les espèces neutres de la molécule et est dépendant du pH. Le $\log D$ est défini comme suit :

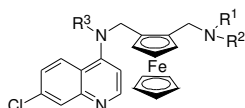
$$\log D = \log \left(\frac{\sum [C_i]_{\text{oct}}}{\sum [C_i]_{\text{aq}}} \right)$$

Où $[C_i]_{\text{oct}}$ représente les concentrations des différentes espèces de la molécule dans l'octanol et $[C_i]_{\text{aq}}$ représente les concentrations de ces mêmes espèces dans la phase aqueuse.

¹² Bhal et al. *Mol. Pharm.* **2007**, 4, 556-560.

Les log D ont été déterminés par une méthode HPLC au pH du cytosol du parasite (7,4), et au pH de la vacuole digestive du parasite (5,2) par le Dr. Forfar du laboratoire de pharmacochimie de l'Université Victor Segalen de Bordeaux 2 (EA 4138) (table 24).¹³

A pH 7,4, les valeurs de log D des nouveaux composés sont toutes supérieures à 2,4 sauf pour le composé **2** qui possède un log D de 1,95. A pH cytosolique, les molécules sont très liposolubles : les dérivés **6-7**, **9-11**, **13** et **20-24** sont les plus lipophiles (log D > 3,3). Les composés **9-11** possèdent deux chaînes alkyles sur l'azote terminal de la FQ. Lorsque ces deux substituants sont un méthyle et/ou un éthyle (FQ, **8** et **13**), la lipophilie n'excède pas 3,4 mis à part lorsqu'il y a un substituant en position 11 (**13** et **20-24**). A pH 5,2, tous les dérivés présentent des propriétés hydrophiles avec des valeurs de log D négatives excepté pour les composés **9**, **11**, **13** et **20-24** qui ont des log D compris entre 0,09 et 1,44. La présence de deux longues chaînes alkyles (propyles ou butyles) sur l'azote terminal de la FQ ou d'un substituant en position 11 contribue à l'augmentation de la valeur de log D . En revanche, l'introduction de deux chaînes ramifiées isopropyles sur la position terminale (**10**, log D = - 0,08) a la même influence qu'une monosubstitution par une chaîne butyle (**6**, log D = - 0,10).



Cpd	R ¹	R ²	R ³	Log $D_{7,4}$	Log $D_{5,2}$	pKa ₁	pKa ₂
CQ	Et	Et	H	0,85	-1,20	-	-
2	Me	H	H	1,95	-1,19	-	-
3	Et	H	H	2,47	-0,83	-	-
5	iPr	H	H	2,73	-0,93	-	-
4	Pr	H	H	2,92	-0,75	-	-
FQ	Me	Me	H	2,95	-0,77	7,00	8,45
20	Me	Me	Me	3,04	-0,56	7,05	8,80
13	Me	Et	H	3,19	-0,69	-	-
7	iBu	H	H	3,38	-0,30	-	-
8	Et	Et	H	3,42	-0,24	-	-
21	Me	Me	Et	3,42	0,09	7,10	9,10
6	Bu	H	H	3,45	-0,10	-	-
22	Me	Me	Pr	3,68	0,83	6,70	9,20
10	iPr	iPr	H	3,95	-0,08	-	-
23	Me	Me	Bu	3,97	1,2	6,85	9,05
24	Me	Me	iBu	3,99	1,4	6,70	8,90
9	Pr	Pr	H	4,32	0,39	-	-
11	Bu	Bu	H	4,73	1,44	-	-

Table 24 : Coefficients de distribution des dérivés **2-11**, **13** et **20-24** par ordre croissant de log $D_{7,4}$ et pKa des dérivés **20-24** (pKa₁ de l'amine N1 et pKa₂ de l'amine N24).

¹³ Pehourcq et al. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2000**, 23, 443-453.

Les résultats obtenus indiquent clairement que quelque soit le choix des substituants sur la position amine terminale de la FQ, la molécule possède un caractère hydrophile à pH vacuolaire et lipophile à pH cytosolique comme pour la FQ (excepté pour le composé **11**). Ce profil lipophilique semble être fondamental pour l'activité antipaludique *in vitro* des molécules de l'ordre de 10 nM. Les récentes découvertes sur le mécanisme de formation de l'hémozoïne faites par Egan¹⁴ et par Sullivan^{15,16} suggérant que ce phénomène se produit à l'interface eau/lipide, expliquent en partie la plus forte activité antipaludique de la FQ et de ses dérivés par rapport à la CQ. En effet, la FQ étant 100 fois plus lipophile que la CQ, se localiserait préférentiellement à cette interface eau/lipide où est supposée se former l'hémozoïne et par conséquent, serait plus à même d'inhiber la formation de cette dernière.

En revanche, l'introduction d'une chaîne en position 11 rend la molécule plus lipophile à pH vacuolaire. Plus le substituant en position 11 est encombrant, plus la molécule est lipophile. Cette augmentation de lipophilie au pH vacuolaire expliquerait l'activité antipaludique décroissante de cette série de dérivés de la FQ. Ces molécules seraient peut-être trop lipophiles. Elles ne se localiseraient plus à l'interface eau/lipide et resteraient piégées dans la membrane ce qui les empêcherait d'inhiber la formation de l'hémozoïne.

Afin d'évaluer l'influence des pKa des molécules sur l'activité antipaludique, les valeurs de pKa ont été mesurées par titration par le Dr. Forfar. Les nouveaux dérivés **20-24** ont des valeurs de pKa₂ de l'amine tertiaire terminale N24 supérieures à celle de la FQ de 0,4 à 0,7 unité. Dans la structure de la FQ, la présence de l'hydrogène sur l'azote N11 permet la formation d'une liaison hydrogène avec l'atome d'azote N24 de la chaîne latérale basique. Le doublet libre sur cet azote n'est alors plus disponible et la molécule se trouve dans une conformation coudée comme les dérivés amines secondaires (voir paragraphe I.3). En revanche, comme nous l'avons vu au paragraphe I.3, la caractérisation par RMN et RX du dérivé **23** montre que les dérivés **20-24** n'ont pas cette conformation coudée due à l'absence de la liaison hydrogène. La protonation de l'amine tertiaire terminale N24 est alors plus facile en raison de la bonne accessibilité ce qui explique l'augmentation des valeurs de pKa₂.

Pour la FQ, une seconde protonation est possible sur le groupe aminé endocyclique du cycle quinoléine. Cette protonation forme une structure de résonance plane stabilisée entre le

¹⁴ Egan, T.J. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, 102, 1288-1299.

¹⁵ Pisciotto et al. *Biochem. J.* **2007**, 402, 197-204.

¹⁶ Pisciotto, J.M.; Sullivan, D. *Parasitology International.* **2008**, 57, 89-96.

quinolinium et l'ammonium. Pour les dérivés **20-24**, la substitution sur l'azote en position 11 provoque un encombrement stérique avec le proton en position 5 du cycle quinoléine ce qui déstabilise la structure de résonnance (Schéma 25). La diminution de l'énergie de stabilisation de la structure de résonnance expliquerait la diminution des valeurs de pK_{a1} .

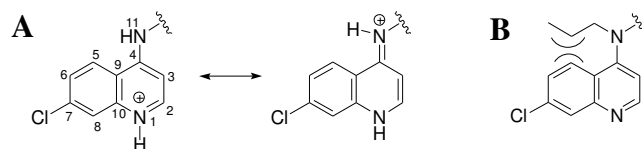


Schéma 25 : Structure de résonnance entre le quinolinium et l'ammonium des dérivés quinoléiques (A). Représentation de l'encombrement stérique entre le proton H5 de la quinoléine et le substituant sur l'azote N11 (B, exemple dans le cas du groupement propyle).

L'ajout d'un substituant sur l'azote N11 a une légère influence sur les valeurs de pK_a des amines N1 et N24 par comparaison avec les pK_a de la FQ. Pourtant, les dérivés **20-24** montrent une différence significative d'activité antipaludique en comparaison à la FQ (entre 1,6 et 8,9 moins actifs). Aucune relation entre la structure de la molécule, l'activité antipaludique et le pK_a n'a pu être établie.

I.5. Inhibition de la formation de la β -hématine

Tous les dérivés de la FQ ont été testés pour leur aptitude à inhiber la formation de la β -hématine, l'équivalent synthétique de l'hémozoïne.^{17,18} Ces tests ont été réalisés au Biochemie Zentrum Heidelberg et encadrés par le Dr. Davioud-Charvet. Nous avons utilisé le test du Pr. Egan que nous avons légèrement modifié. Une solution d'inhibiteur est mise en présence d'hématine à pH 4,5. Le pH est maintenu à 4,5 par une solution d'acétate de sodium à 12,9 M de pH 5. Le milieu réactionnel est incubé à 60°C pendant une heure. La réaction est stoppée par addition d'une solution de pyridine (schéma 26). La pyridine forme un complexe avec l'hématine libre présente en solution qui absorbe à 405 nm. Lorsqu'il y a formation de la β -hématine, il n'y a plus d'hématine libre dans le milieu réactionnel. Le complexe hématine : pyridine ne peut alors pas se former et on n'observe pas d'absorbance à 405 nm. Si la molécule active présente des propriétés inhibitrices de la formation de la β -hématine, il n'y a pas de formation de β -hématine et par conséquent, il reste de l'hématine libre dans le milieu réactionnel et on observe une absorbance à 405 nm. L'absorbance à 405 nm est proportionnelle à la concentration du complexe hématine : pyridine dans le milieu. Plus

¹⁷ Bohle et al. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 713-716.

¹⁸ Egan, T.J.; Hempelmann, E.; Mavuso, W.W. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, 73, 101-107.

l'absorbance à 405 nm est élevée, plus la molécule inhibe la formation de la β -hématine. Les modifications apportées au test original du Pr. Egan sont les suivantes :

- Afin d'éviter que la β -hématine ne se forme avant le début du test, nous avons préféré ajouter la solution d'hématine en dernier.
- Les tubes Eppendorf ont été incubés à 60°C avant l'addition de la solution tampon d'acétate de sodium pour éviter sa reprécipitation et obtenir le volume exact qui détermine la valeur du pH du milieu réactionnel.

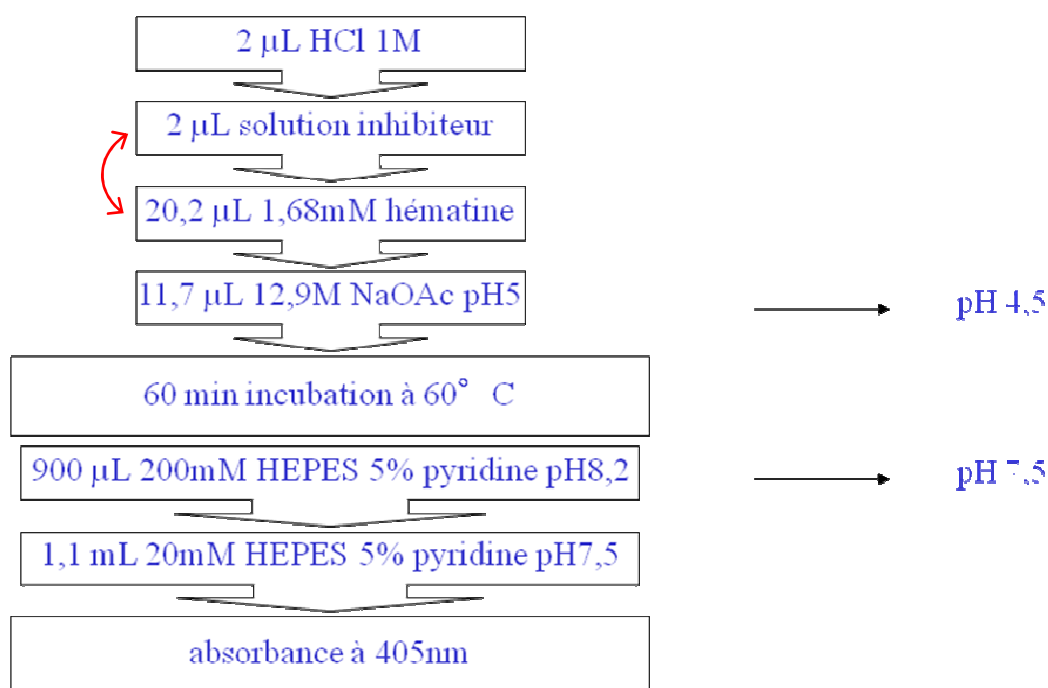


Schéma 26 : Protocole du test de la β -hématine.

Les amines secondaires **2-7**, les amines tertiaires **8** et **13** et les dérivés **20-24** ont été dissous dans le méthanol mais du fait de leur faible solubilité, les amines tertiaires **9-11** ont été dissoutes dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Les CI_{50} sont définies comme étant le rapport du nombre d'équivalents d'inhibiteur nécessaire pour atteindre 50 % de l'inhibition maximale par équivalent d'hématine. Les valeurs de CI_{50} ont été déterminées en augmentant les concentrations d'inhibiteur de 0 à 5 mM.

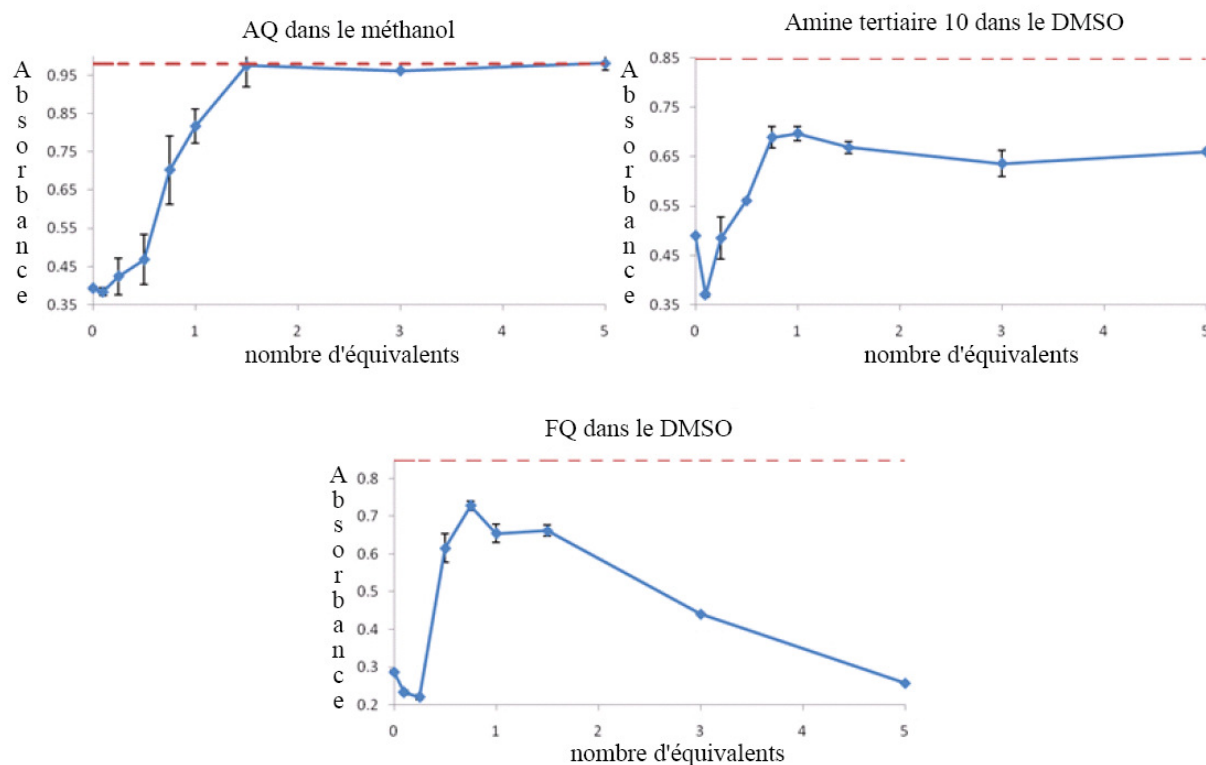


Figure 27 : Exemples de courbes d'inhibition de la formation de la β -hématine.

Nous pouvons observer que le solvant a un léger effet sur l'absorbance du complexe pyridine : hématine à 405 nm. On observe un petit « décrochement » aux rapports inhibiteur : hématine faibles qui est plus marqué lorsque l'inhibiteur est solubilisé dans le DMSO plutôt que dans le méthanol (figure 27). Nous pouvons supposer que les inhibiteurs sont capables de déplacer l'équilibre solvant : hématine en faveur de la formation du complexe inhibiteur : hématine. Nous pouvons noter que certains composés déplacent l'équilibre beaucoup plus rapidement que d'autres. Nous pouvons donc suggérer que les molécules qui déplacent le plus rapidement l'équilibre solvant : hématine sont les meilleurs inhibiteurs de la formation de la β -hématine. Dans d'autres termes, les meilleurs inhibiteurs sont ceux qui présentent les plus faibles valeurs de CI_{50} .

Les dérivés de la FQ montrent une forte inhibition de la formation de la β -hématine (tables 28-29). Sauf pour les composés **2**, **8** et les dérivés **20-22** et **24**, les valeurs de CI_{50} sont proches de celle de la FQ. Le meilleur inhibiteur est l'amine tertiaire **11** avec les deux groupements butyles sur l'amine terminale.

composé	inhibition max. (%) (rapport inhibiteur : hématine)	CI ₅₀
2	83 (1,5:1)	0,6
3	81 (0,5:1)	0,2
4	84 (0,75:1)	0,3
5	90 (0,75:1)	0,2
6	58 (0,5:1)	0,2
7	76 (0,5:1)	0,2
8	78 (1,5:1)	0,6
13	72 (0,75:1)	0,2
20	87 (3:1)	2,0
21	65 (5:1)	2,2
22	81 (5:1)	1,0
23	97 (3:1)	0,4
24	93 (3:1)	1,2
CQ	71 (2:1)	1,3
AQ	100 (1,5:1)	0,7
FQ	76 (0,75:1)	0,3

Table 28 : Inhibition *in vitro* de la formation de β -hématine pour les amines secondaires **2-7**, les amines tertiaires **8** et **13** et les dérivés **20-24** dans le méthanol.

Afin de déterminer la valeur d'absorbance correspondant à une inhibition de 100 %, l'absorbance de l'hématine libre a été mesurée en remplaçant la solution d'inhibiteur par du solvant uniquement. La valeur d'absorbance est de 0,98 lorsque le solvant est du méthanol et de 0,85 lorsque le solvant est du DMSO. Pour ne pas tenir compte de l'effet de solvant, les rapports de l'absorbance maximale atteinte par l'inhibiteur sur l'absorbance correspondant à 100 % d'inhibition dans le solvant correspondant ont été calculés (tables 28-29). Nous pouvons constater qu'aucun des inhibiteurs n'atteint les 100 % d'inhibition mis à part l'AQ, comme reporté précédemment.¹⁹ Plus le pourcentage d'inhibition est élevé, meilleur est l'inhibiteur. Les composés avec une inhibition inférieure à 60 %, comme le composé **6**, sont considérés comme mauvais inhibiteurs. Cependant, l'activité antipaludique des composés n'est pas liée uniquement à l'inhibition de la formation de β -hématine. D'ailleurs, le dérivé **6**, qui est supposé être le moins bon inhibiteur, présente la plus forte activité antipaludique. Il est difficile d'établir une relation entre activité antipaludique et inhibition de la formation de la β -hématine.

¹⁹ Ncokazi, K.K.; Egan, T.J. *Anal. Biochem.* **2005**, 338, 306-319.

composé	inhibition max. (%) (rapport inhibiteur : hématine)	CI ₅₀
9	76 (0,5:1)	0,3
10	83 (1:1)	0,4
11	87 (0,5:1)	0,1
CQ	89 (3:1)	1,9
AQ	100 (1,5:1)	0,7
FQ	86 (0,75:1)	0,4

Table 29 : Inhibition *in vitro* de la formation de β -hématine pour les amines tertiaires **11-13** dans le DMSO.

L'interprétation des résultats n'est pas directe car il faut tenir compte aussi bien des valeurs de CI₅₀ que du rapport inhibiteur : hématine pour lequel le pourcentage d'inhibition maximale est atteint par la molécule. Les meilleurs inhibiteurs sont donc les composés qui ont les meilleurs pourcentages d'inhibition à un rapport inhibiteur : hématine faible accompagnés d'une faible valeur de CI₅₀. Prenant en compte tous ces paramètres, nos meilleurs inhibiteurs sont les amines secondaires **3-5**, l'amine tertiaire **11** et le dérivé **23**.

Lors de ce test de la β -hématine, nous avons observé deux types de courbe d'inhibition (figure 27). Certains composés (molécules **8**, **9-10** et les dérivés **20-24**) ont un profil sigmoïdal comme l'AQ et la CQ. D'autres composés (les amines secondaires **2-7**, les amines tertiaires **11** et **13**) présentent un maximum puis une diminution d'inhibition voire une non-inhibition à forte concentration comme la FQ (courbe en cloche). Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce phénomène. Les composés avec un comportement comme la FQ ont peut-être un autre mécanisme d'inhibition de la formation de la β -hématine que les composés se comportant comme l'AQ ou la CQ. Ou alors, les composés se comportant comme la FQ, s'agrègent à forte concentration et ne peuvent plus inhiber la formation de β -hématine.²⁰ En effet, il a été montré que les molécules de FQ s'associaient entre elles par des interactions non liantes de type $+\pi/+-\pi$ entre les cycles quinoléinium chargés positivement de deux molécules. Les molécules de FQ forment des structures dimériques stables à l'état solide et également en solution aqueuse à pH acide.²⁰

I.6. Conclusion

In vitro, les dérivés aminés **2-7**, **9-11** et **13** de la FQ présentent une très bonne activité antipaludique aussi bien sur les clones CQ-sensibles que CQ-résistants de *P. falciparum* à des

²⁰ Buisine et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 12122-12128.

concentrations nanomolaires. Ils ont une activité comparable à celle de la FQ et une meilleure activité que la CQ sur les clones de *P. falciparum* résistants. Comme pour la FQ, les dérivés **2-7** et **9-11** obtenus présentent un caractère lipophile à pH cytosolique et un caractère hydrophile à pH vacuolaire. De plus, on observe également que plus l'amine terminale de la FQ est encombrée, plus la molécule est lipophile. Une bonne lipophilie des dérivés de la FQ semble être intéressante pour l'inhibition de la formation de l'hémozoïne étant donné qu'il a été récemment proposé que celle-ci s'effectue à une interface eau /lipide.

Les dérivés **20-24** (sauf le dérivé **23**) présentent quant à eux une activité antipaludique moins bonne que la FQ sur les clones CQ-sensibles et CQ-résistants. Ils restent néanmoins plus actifs que la CQ sur les parasites CQ-résistants. Ces dérivés sont plus lipophiles que la FQ et ses dérivés aminés. Plus le substituant en position 11 est encombrant, plus la molécule est lipophile. La forte lipophilie de cette série empêche peut-être aux molécules de se placer correctement à l'interface eau/lipide où la formation de l'hémozoïne se produirait et expliquerait de ce fait en partie la diminution d'activité antipaludique de ces composés.

La caractérisation par RX et RMN du composé **6** permet d'identifier, comme pour la FQ, la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre N24 et H11. Cette liaison donne une conformation coudée à la molécule rendant disponible le ferrocène. Cette liaison hydrogène intramoléculaire n'est pas observable par RMN pour le dérivé **23**. Cette différence de conformation des 2 séries de molécules pourrait expliquer en partie la différence d'activité antipaludique par la meilleure disponibilité du ferrocène dans la série la plus active. Ceci nous conforte dans l'hypothèse que le ferrocène contribue au mécanisme d'action de la FQ.

Tous les dérivés de la FQ synthétisés inhibent la formation de la β -hématine. Les meilleurs inhibiteurs sont les amines secondaires **2-5**, l'amine tertiaire **11** et le dérivé **23**. Lors du test de la β -hématine, on observe deux types de courbe d'inhibition. Certains composés ont un profil sigmoïdal comme l'AQ et d'autres composés présentent une courbe en cloche avec une diminution d'inhibition à forte concentration comme la FQ. Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène. Soit les composés ont des mécanismes d'inhibition différents, soit les composés ayant le même profil que la FQ s'agrègent à forte concentration. On constate également que les deux séries, dérivés aminés de la FQ et modification en position 11 de la FQ, n'ont pas les mêmes profils. Étant donné que les deux séries n'ont pas la même conformation, nous pouvons également supposer que cette conformation a une

influence sur l'inhibition de la formation de β -hématine et en particulier la disponibilité du groupement ferrocénique de la molécule.

En résumé, nous avons pu démontrer à travers ce travail, que la lipophilie de la molécule ainsi que la liaison hydrogène intramoléculaire de la FQ sont essentielles à la bonne activité antipaludique de la molécule. La liaison hydrogène donne à la molécule une conformation particulière qui devrait (1) permettre au groupement hydrophobe ferrocénique de se placer au niveau des lipides de la membrane vacuolaire là où est supposée cristalliser l'hémozoïne (2) rendre accessible le cycle quinoléine pour son interaction avec la porphyrine (schéma 30).

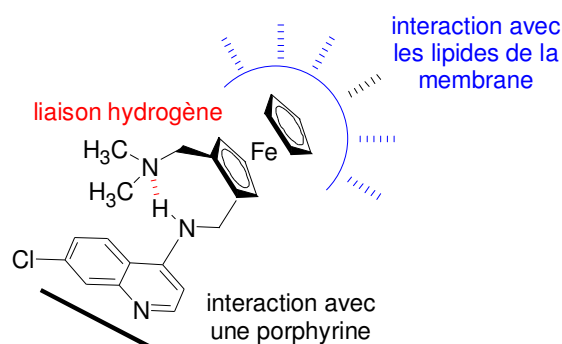


Schéma 30 : Proposition d'interactions de la FQ avec les lipides de la membrane vacuolaire et la porphyrine.

II. Les hydroxyferroquines

II.1. Introduction

L'hydroxychloroquine (HCQ) est une amino-4-quinoléine largement utilisée dans le traitement des maladies autoimmunes et est également employée dans le traitement du paludisme (figure 31).²¹ L'HCQ a une activité similaire à la CQ sur les clones CQ-sensibles de *P. falciparum* mais malheureusement, elle est moins active sur les clones CQ-résistants.²² Son avantage repose dans le fait qu'elle est moins toxique que la CQ.

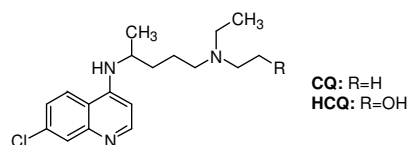


Figure 31 : Structure chimique de la chloroquine (CQ) et de l'hydroxychloroquine (HCQ).

²¹ Hoekenga, M.T. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1955**, 4, 221-223.

²² Warhurst et al. *J. Antimicrob. Chemother* **2003**, 52, 188-193.

De précédentes études révèlent que les antipaludiques comme la CQ ou la MF ont une activité antivirale et montrent une action synergique avec les inhibiteurs de protéase du virus de déficience immuno-humaine (VIH).^{23,24} L'effet anti-VIH-1 de la CQ a été montré en 1990 par le groupe de Tsai. La CQ a également une bonne activité antivirale sur le virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS).²⁵

Plusieurs hypothèses ont été émises sur le mode d'action antivirale de la CQ²⁶ :

1. La CQ pourrait être responsable de l'inhibition des virus nécessitant une étape pH dépendante pour leur entrée dans la cellule hôte.
2. La CQ inhiberait les modifications post-translationnelles des glycoprotéines de l'enveloppe du virus par des protéases et des glycosyltransférases dans le réseau *trans*-Golgi et les vésicules endoplasmiques.
3. La CQ altérerait les modèles de glycosylation et de la charge des acides aminés dans différentes régions de la protéine de l'enveloppe virale gp120.

Encouragés par la forte activité antipaludique de la FQ sur *P. falciparum* CQ-résistant, nous avons tenté d'appliquer une stratégie similaire à l'HCQ. Une série de nouveaux composés bioorganométalliques a été conçue et synthétisée dans le but de combiner les propriétés spécifiques des trois molécules actives : la faible toxicité de l'HCQ, la remarquable activité antipaludique de la FQ et l'activité antivirale sur différents virus de la CQ. Ces hydroxyferroquines (HFQ) devraient être une alternative intéressante de la FQ vers la découverte de nouveaux antipaludiques.

Trois nouveaux dérivés hydroxylés de la FQ ont donc été synthétisés. Nous avons comparés, dans un premier temps, leur activité antipaludique avec celle de la FQ et certains antipaludiques communément utilisés et, dans un deuxième temps, nous avons évalué leur activité sur une série de virus impliqués dans l'infection humaine, incluant le VIH et le SRAS.

La CQ connue pour son activité antipaludique mais également pour ses propriétés antivirales et anti-inflammatoires, a été recommandée pour son utilisation potentielle, de préférence en combinaison avec d'autres antiviraux, dans le traitement du VIH aussi bien que

²³ Savarino et al. *J. Clin. Virol.* **2001**, 20, 131-135.

²⁴ Romanelli, F.; Smith, K.M.; Hoven, A.D. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, 10, 2643-2648.

²⁵ Vincent et al. *Virol. J.* **2005**, 2, 69.

²⁶ Rolain, J.M.; Colson, P.; Raoult, D. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2007**, 30, 297-308.

du SRAS.²⁷ La CQ inhibe la réplication du SRAS-CoV dans les cellules Vero avec une concentration effectrice 50% (CE₅₀) de 8,8 µM. *In vitro*, la CE₅₀ de la CQ pour l'inhibition du SRAS-CoV approche les concentrations plasmatiques atteintes lors du traitement d'un paludisme sévère.²⁸ La synthèse d'HFQ obéissait à un double but : 1) obtenir des molécules conservant les propriétés antipaludiques de la FQ tout en étant moins toxiques pour la cellule ; 2) examiner si l'insertion du ferrocène dans la CQ pouvait améliorer ses propriétés antivirales.

II.2. Synthèse des hydroxyferroquines

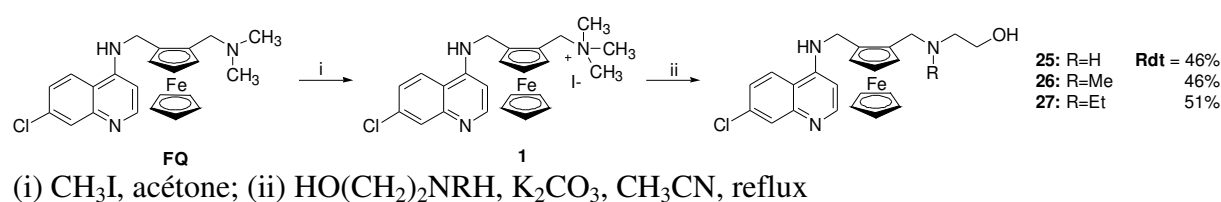


Schéma 32 : Synthèse des dérivés hydroxylés de la ferroquine **25-27**.

Les dérivés hydroxylés de la FQ sont synthétisés selon le même schéma que les dérivés amines secondaires de la FQ (voir paragraphe I.1.). La quaternisation de l'atome d'azote terminal de la FQ a été réalisée avec de l'iodure de méthyle dans l'acétone à température ambiante. L'ammonium résultant, le groupement partant, est substitué par l'aminoalcool correspondant dans l'acétonitrile à reflux. Cette substitution nucléophile conduit aux produits **25**, **26** et **27** avec des rendements respectifs de 46 %, 46 % et 51 %.

II.3. Activité antipaludique

composés	Clones	CI ₅₀ , nM	n	CI ₉₀ , nM	n
25	3D7	15,4 ± 5,5	4	25,7 ± 7,1	4
	W2	133,2 ± 7,4	3	459,1 ± 53,3	3
26	3D7	21,5 ± 14,5	8	51,0 ± 22,2	8
	W2	30,0 ± 8,8	3	99,9 ± 5,3	3
27	3D7	11,7 ± 5,7	9	29,2 ± 17,9	9
	W2	20,4 ± 1,1	3	56,0 ± 1,9	3
CQ	3D7	10,6 ± 5,6	16	31,0 ± 16,5	16
	W2	138,9 ± 20,0	11	> 500	11
ARS	3D7	2,1 ± 0,3	13	9,1 ± 5,1	3
	W2	2,1 ± 0,2	4	14,0 ± 1,6	4
FQ	3D7	7,8 ± 2,9	13	16,4 ± 9,4	13
	W2	9,7 ± 2,4	4	24,6 ± 4,6	4

Table 33 : Sensibilité *in vitro* des clones de *P. falciparum*.

²⁷ Savarino et al. *Lancet Infect. Dis.* **2003**, 3, 722-727.

²⁸ Keyaerts et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 323, 264-268.

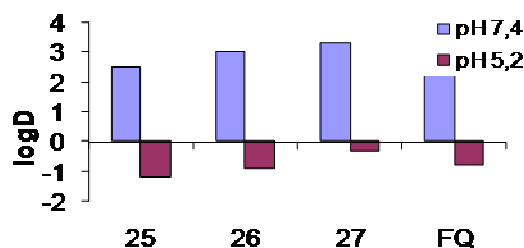
Les métalloènes **25-27** ont été testés *in vitro* sur les clones CQ-sensible 3D7 et CQ-résistant W2 de *P. falciparum* par le Dr. Daher dans l'équipe du Dr. Dive à l'Institut Pasteur de Lille (Table 33). Les HFQ **25-27** sont plus actifs que la CQ sur le clone résistant. Parmi ces dérivés aminoalcools de la FQ, l'activité augmente du non-substitué **25** au *N*-éthyl-substitué **27**. On remarque que le produit le plus actif **27** est également plus actif que la MF mais seulement un peu moins actif que la FQ sur les 2 clones de *P. falciparum* testés.

Un criblage a également été effectué sur 25 isolats de terrain cambodgiens en partenariat avec le Dr. Fandeur UMR Université-INRA d'Immunologie Parasitaire de Tours. La grande activité antipaludique du nouveau composé métallocénique **27** sur *P. falciparum* est confirmée (Table 34). L'HFQ **27** est beaucoup plus actif que la CQ et seulement un peu moins actif que la FQ et la MF. Il n'y a donc pas de résistance croisée observée ni avec la MF ($r^2 = 0,021$), ni avec la Q ($r^2 = 0,00005$), ni avec l'ARS ($r^2 = 0,0732$). Une légère résistance croisée a été observée avec la CQ ($r^2 = 0,32$). Comme prévu, une forte corrélation ($r^2 = 0,7129$) entre les CI_{50} de la FQ et du métallocène **27** a été observée au sein des isolats testés. Ceci suggère que les 2 composés ont un mode d'action et/ou une assimilation par le parasite similaire.

composés	CI_{50} , nM	plage	n	Résistance, %
27	32,4	17,9-83,6	25	3,8
CQ	191,8	80,0-538,0	25	92,0
MF	25,2	1,4-106,5	23	56,0
Q	146,0	50,0-827,0	25	3,8
ARS	1,5	0,4-5,4	25	7,6
FQ	22,9	11,7-83,6	25	3,8

Table 34 : Comparaison du métallocène **27** avec d'autres composés antipaludiques sur les isolats de terrain cambodgiens.

Parmi les 3 HFQ synthétisées, les résultats obtenus pour les deux clones de laboratoire et les isolats de terrain montrent la forte activité antipaludique du composé **27**. Il est seulement 1,5 fois moins actif que la FQ sur tous les clones et isolats de *P. falciparum* testés et beaucoup plus actif que la CQ (6 fois plus actif). Ce composé est le plus lipophile des 3 synthétisés (graphe 35). La lipophilie observée pour ces HFQ est en accord avec les hypothèses de mécanisme de transport déjà proposées pour expliquer la forte activité de la FQ sur les clones CQ-résistants de *P. falciparum* (voir chapitre I).⁹ Le mécanisme d'action des dérivés hydroxylés de la FQ est probablement multifactoriel comme pour la FQ.



Graph 35 : Lipophilie des hydroxyferroquines **25-27** à pH cytosolique (7,4) et vacuolaire (5,2).

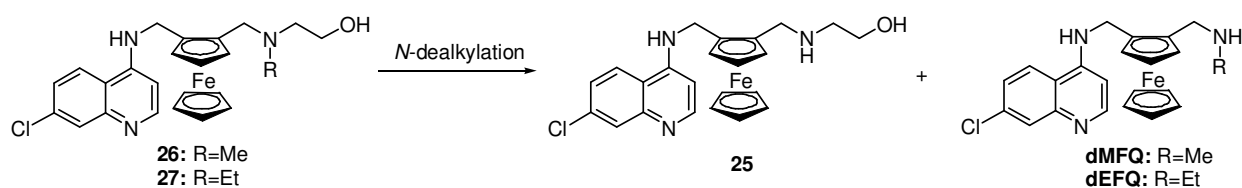


Schéma 36 : Métabolisme des dérivés hydroxylés de la ferroquine proposé.

Le métabolisme oxydatif des amines tertiaires comme la CQ,²⁹ l'HCQ,³⁰ et la FQ³¹ s'effectue via le système cytochrome P-450. Les principaux métabolites seraient générés par la désalkylation de la chaîne secondaire qui conduit d'abord au dérivé monodésalkylé et ensuite aux dérivés didésalkylés. La biotransformation de la FQ a été étudiée *in vitro* sur des modèles animaux et humains (voir chapitre I).³² Même si la mono-*N*-déméthyl-FQ et la di-*N,N*-déméthyl-FQ ont montré une plus faible activité *in vitro* que la FQ, elles restent plus actives que la CQ sur les clones CQ-résistants de *P. falciparum*. Les métabolites de la CQ n'ont, en revanche, pas montré d'activité sur les clones CQ-résistants.³³ L'activité antipaludique des métabolites de la FQ sur la croissance des parasites CQ-résistants de *P. falciparum* permet de supposer une activité antipaludique de longue durée durant la chimiothérapie du paludisme. Nous pouvons supposer que, comme pour la FQ ou pour l'HCQ, des conditions oxydatives chez le parasite pourraient désalkyler les composés bioorganométalliques **26** et **27** (Schéma 36).³⁴ La perte du fragment éthanol génèrerait l'amine secondaire **25** et le clivage de l'autre liaison C-N, deux molécules actives : la mono-*N*-déméthyl-FQ (dMFQ) dans le cas de l'HFQ **26** et la mono-*N*-dééthyl-FQ (dEFQ) dans le cas

²⁹ Lee et al. *N. Engl. J. Med.* **2003**, 348, 1986-1994.

³⁰ Wei et al. *Chirality*. **1995**, 7, 598-604.

³¹ Daher et al. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, 34, 667-682.

³² Biot et al. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2843-2847.

³³ Aderounmu, A.F. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1984**, 78, 581-585.

³⁴ Meunier, B.; de Visser, S.P.; Shaik, S. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 3947-3980.

de l'HFQ **27**. Par comparaison avec l'HCQ et la FQ, la formation de ces métabolites actifs devrait avoir lieu chez le parasite et participerait à l'activité antipaludique de ces HFQ.

Il a également été montré que le composé **27** est 5 fois moins toxique que la FQ (concentration cytotoxique 50% (CC₅₀) de 200 µM et 40 µM, respectivement sur cellules MT-4). L'HFQ **27** peut être considérée comme une alternative prometteuse à la FQ pour la chimiothérapie du paludisme CQ-résistant.

II.4. Activité antivirale

Le mécanisme d'action anti-VIH de la CQ et l'HCQ n'est pas encore totalement compris mais il a été associé à l'entrée du virus et l'inhibition des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la glycoprotéine de l'enveloppe de surface du VIH gp120. En effet, ces composés sont supposés augmenter le pH endosomal et altérer les enzymes requises pour la production de gp120.^{24,27} Basés sur leur structure chimique, les dérivés hydroxylés de la ferroquine **25-27** devraient cibler le processus complexe d'entrée d'une manière similaire.

La CQ, l'HCQ, la FQ et les métalloécènes **25-27** ont également été testés sur le VIH-1 par le Pr. De Clercq du Rega Institute for Medical Research de Louvain. Les composés ne semblent pas avoir d'activité anti-VIH-1 hormis la CQ et le composé **26** qui manifestent une légère activité avec un indice de sélectivité de 3 et 6, respectivement (Table 37).

composés	CE ₅₀ , µM ^a	CC ₅₀ , µM ^b	IS ^c
25	> 2,3	> 2,3	-
26	2,9 ± 1,1	9,1 ± 6,6	3
27	10	> 10	-
FQ	> 2,4	> 2,4	-
HCQ	> 12	> 12	-
CQ	8,9 ± 1,2	54,4 ± 23,9	6

- Concentration effectrice nécessaire pour réduire de 50% les effets cytopathiques induits par le VIH-1 sur cellules MT-4.
- Concentration cytotoxique nécessaire pour réduire de 50% la viabilité des cellules MT-4.
- Indice de sélectivité: rapport CC₅₀/EC₅₀.

Table 37 : Activité anti-HIV-1, cytotoxicité et indice de sélectivité des hydroxyferroquines **25-27**.

Il a été montré que la CQ est un inhibiteur de la réplication du virus SRAS-CoV *in vitro*^{25,27,35} mais le mode d'action de ce composé est aujourd'hui encore inconnu. Dans ce contexte, les composés métalloécéniques **25-27** ont été évalués pour leur activité contre le coronavirus

³⁵ Keyaerts et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **2004**, 323, 264-268.

félin et humain du SRAS (Table 38) et comparés avec la CQ, l'HCQ et la FQ par le Pr. De Clercq. Tous les composés, excepté l'HCQ, sont des inhibiteurs de la réplication du SRAS-CoV dans les cellules Vero dans un intervalle de concentration de 1 à 10 μM . Les composés **26**, **27**, la FQ et la CQ sont de potentiels anti-SRAS, ils manifestent un indice de sélectivité d'environ 15.

composés	SRAS coronavirus félin ^a		SRAS coronavirus humain ^b		
	CE ₅₀ , μM	CC ₅₀ , μM	CE ₅₀ , μM	CC ₅₀ , μM	IS ^c
25	> 4	12,0 $\pm$ 0,0	4,9 $\pm$ 4,3	23,0 $\pm$ 15,0	4
26	$\geq$ 10	12,0 $\pm$ 0,0	1,9 $\pm$ 0,1	30,0 $\pm$ 3,0	16
27	> 4,0	13,0 $\pm$ 0,0	3,6 $\pm$ 2,0	61,0 $\pm$ 1,0	17
FQ	2,9 $\pm$ 1,2	12,0 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,1	20,0 $\pm$ 8,0	15
HCQ	28,0 $\pm$ 27,0	84,0 $\pm$ 14,0	34,0 $\pm$ 5,0	>100	>3
CQ	>0,8	3,6 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 3,2	>100	>15

a. Cellules CRFK (Crandell-Reese Feline Kidney).

b. SRAS-CoV dans les cellules Vero.

c. Indice de sélectivité: rapport CC₅₀/EC₅₀.

Table 38 : Activité anti-SRAS-CoV, cytotoxicité et indice de sélectivité des hydroxyferroquines **25-27**.

La CQ, l'HCQ, la FQ et les composés **25-27** ont également été testés sur différents virus par le Pr. De Clercq: le virus de parainfluenza-3, le réovirus-1, le virus de Sindbis, le virus de Coxsackie B4, le virus de Punta Toro, le virus syncytial respiratoire, le virus-1 de l'herpes simplex (HSV-1; KOS), le virus-2 de l'herpes simplex (HSV-2; G), le virus de la vaccinia, le virus stomatitis vésiculaire, le virus-1 de l'herpes simplex (TK-KOS ACV) et le virus influenza A (H3N2). Aucune activité significative n'a été observée. Ceci indique que ces composés présentent une plus grande sélectivité pour le SRAS-CoV.

II.5. Conclusion

Nos résultats montrent que les dérivés hydroxylés de la FQ apparaissent comme étant de nouvelles molécules antipaludiques prometteuses puisqu'ils sont actifs, ainsi que leurs métabolites potentiels, sur les clones CQ-résistants de *P. falciparum*. De plus, nous avons montré que ces molécules biologiquement actives ont une activité anti-VIH (composé **26**) et surtout une activité anti-SRAS-CoV (composé **26** et **27**). Ces résultats montrent la potentialité des métallocènes dans la chimiothérapie dans les pays où le paludisme coexiste avec le SRAS.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Domarle, O.; Blampain, G.; Agnani, H.; Nzadiyabi, T.; Lebibi, J.; Brocard, J.; Maciejewski, L.; Biot, C.; Georges, A. J.; Millet, P. *In vitro* antimalarial activity of a new organometallic analog, ferrocene-chloroquine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 540-544.
- [2] Biot, C. *Molécules ferrocéniques antipaludiques – Synthèse, caractérisation et activité*. Thèse de doctorat, Chimie organique et macromoléculaire, Université de Lille 1, **1998**.
- [3] De, D.; Krogstad, F.M.; Cogswell, F.B.; Krogstad, D.J. Aminoquinolines that circumvent resistance in *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1996**, *55*, 579-583.
- [4] De, D.; Krogstad, F.M.; Byers, L.D.; Krogstad, D.J. Structure-activity relationships for antiplasmodial activity among 7-substituted 4-aminoquinolines. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4918-4926.
- [5] Chibale, K.; Moss, J.R.; Blackie, M.; van Schalkwyk, D.; Smith, P.J. New amine and urea analogs of ferrochloroquine: synthesis, antimalarial activity *in vitro* and electrochemical studies. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6231-6235.
- [6] Biot, C.; Daher, W.; Ndiaye, C. M.; Melnyk, P.; Pradines, B.; Chavain, N.; Pellet, A.; Fraisse, L.; Pelinski, L.; Jarry, C.; Brocard, J.; Khalife, J.; Forfar-Bares, I.; Dive, D. Probing the role of the covalent linkage of ferrocene into a chloroquine template. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4707-4714.
- [7] Beagley, P.; Blackie, M.A.L.; Chibale, K.; Clarkson, C.; Meijboom, R.; Moss, J.R.; Smith, P.J.; Su, H. Synthesis and antiplasmodial activity *in vitro* of new ferrocene-chloroquine analogues. *Dalton Trans.* **2003**, *15*, 3046-3051.
- [8] Borch, R.F.; Bernstein, M.D.; Dupont Durst, H. Cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2897-2904.
- [9] Biot, C.; Taramelli, D.; Forfar-Bares, I.; Maciejewski, L.A.; Boyce, M.; Nowogrocki, G.; Brocard, J.S.; Basilico, N.; Oliaro, P.; Egan, T.J. Insights into the mechanism of action of ferroquine. Relationship between physicochemical properties and antiplasmodial activity. *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 185-193.
- [10] Wieruszeski, J.M.; Landrieu, I.; Hanouille, X.; Lippens G. ELISE NMR: experimental liquid sealing of NMR samples. *J. Magn. Reson.* **2006**, *181*, 199-202.
- [11] Piotto, M.; Bourdonneau, M.; Elbayed, K.; Wieruszeski, J.M.; Lippens, G. New DEFT sequences for the acquisition of one-dimensional carbon NMR spectra of small unlabelled molecules. *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44*, 943-947.
- [12] Bhal, S.K.; Kassam, K.; Peirson G.I.; Pearl, G.M. The rule of five revisited: applying log *D* in place of log *P* in drug-likeness filters. *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 556-560.
- [13] Pehourcq, F.; Thomas, J.; Jarry, C. A microscale HPLC method for the evaluation of octanol-water partition coefficients in a series of new 2-amino-2-oxazolines. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2000**, *23*, 443-453.
- [14] Egan, T.J. Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1288-1299.
- [15] Pisciotto, J.M.; Coppens, I.; Tripathi, A.K.; Scholl, P.F.; Shuman, J.; Bajad, S.; Shulaev, V.; Sullivan, D.J. Jr. The role of neutral lipid nanospheres in *Plasmodium falciparum* haem crystallization. *Biochem. J.* **2007**, *402*, 197-204.
- [16] Pisciotto, J.M.; Sullivan, D. Hemozoin: Oil versus water. *Parasitology International.* **2008**, *57*, 89-96.

- [17] Bohle, D.S.; Dinnebier, R.E.; Madsen, S.K.; Stephens, P.W. Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malarial late trophozoites by X-ray diffraction. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 713-716.
- [18] Egan, T.J.; Hempelmann, E.; Mavuso, W.W. Characterisation of synthetic β -haematin and effects of the antimalarial drugs quinidine, halofantrine, desbutylhalofantrine and mefloquine on its formation. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *73*, 101-107.
- [19] Ncokazi, K.K.; Egan, T.J. A colorimetric high-throughput beta-hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compounds. *Anal. Biochem.* **2005**, *338*, 306-319.
- [20] Buisine, E.; de Villiers, K.; Egan, T.J.; Biot, C. Solvent-Induced Effects: Self-Association of Positively Charged π Systems. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 12122-12128.
- [21] Hoekenga, M.T. The treatment of malaria with hydroxychloroquine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1955**, *4*, 221-223.
- [22] Warhurst, D.C.; Steele, J.C.; Adagu, I.S.; Craig, J.C.; Cullander, C. Hydroxychloroquine is much less active than chloroquine against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*, in agreement with its physicochemical properties. *J. Antimicrob. Chemother* **2003**, *52*, 188-193.
- [23] Savarino, A.; Gennero, L.; Sperber, K.; Boelaert, J.R. The anti-HIV-1 activity of chloroquine. *J. Clin. Virol.* **2001**, *20*, 131-135.
- [24] Romanelli, F.; Smith, K.M.; Hoven, A.D. Chloroquine and hydroxychloroquine as inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV-1) activity. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 2643-2648.
- [25] Vincent, M.J.; Bergeron, E.; Benjannet, S.; Erickson, B.R.; Rollin, P.E.; Ksiazek, T.G.; Seidah, N.G.; Nichol, S.T. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virol. J.* **2005**, *2*, 69.
- [26] Rolain, J.M.; Colson, P.; Raoult, D. Recycling of chloroquine and its hydroxyl analogue to face bacterial, fungal and viral infections in the 21st century. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2007**, *30*, 297-308.
- [27] Savarino, A.; Boelaert, J.R.; Cassone, A.; Majori, G.; Cauda, R. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 722-727.
- [28] Keyaerts, E.; Vijgen, L.; Maes, P.; Neyts, J.; Van Ranst, M. In vitro inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus by chloroquine. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **2004**, *323*, 264-268.
- [29] Lee, N.; Hui, D.; Wu, A.; Chan P.; Cameron P.; Joynt GM; Ahuja A; Yung MY; Leung CB; To KF; Lui SF; Szeto CC; Chung S; Sung JJ. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1986-1994.
- [30] Wei, Y.; Nygard, G.A.; Ellertson, S.L.; Khalil, S.K. Stereoselective disposition of hydroxychloroquine and its metabolite in rats. *Chirality.* **1995**, *7*, 598-604.
- [31] Daher, W.E.; Pelinski, L.; Klieber, S.; Sadoun, F.; Meunier, V.; Bourrie, M.; Biot, C.; Guillou, F.; Fabre, G.; Brocard, J.; Fraisse, L.; Maffrand, J.P.; Khalife, J.; Dive, D. *In vitro* metabolism of ferroquine (SSR97193) in animal and human hepatic models and antimalarial activity of major metabolites on *Plasmodium falciparum*. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 667-682.
- [32] Biot, C.; Delhaes, L.; NcDiaye, C.M.; Maciejewski, L.A.; Camus, D.; Dive, D.; Brocard, J.S. Synthesis and antimalarial activity *in vitro* of potential metabolites of ferrochloroquine and related compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2843-2847.
- [33] Aderounmu, A.F. In vitro assessment of the antimalarial activity of chloroquine and its major metabolites. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1984**, *78*, 581-585.
- [34] Meunier, B.; de Visser, S.P.; Shaik, S. Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P₄₅₀ Enzymes. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947-3980.

[35] Keyaerts, E., Vijgen, L., Maes, P., Neyts, J., Van Ranst, M. In vitro inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus by chloroquine. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **2004**, 323, 264-268.

Design and Synthesis of Hydroxyferroquine Derivatives with Antimalarial and Antiviral Activities

Christophe Biot,^{*,†} Wassim Daher,[‡] Natascha Chavain,[†] Thierry Fandeur,[§] Jamal Khalife,[‡] Daniel Dive,[‡] and Erik De Clercq^{||}

Unité de Catalyse et Chimie du Solide - UMR CNRS 8181, ENSCL, Bâtiment C7, USTL, B.P. 90108, 59652, Villeneuve d'Ascq Cedex, France, Inserm, U547, Institut Pasteur, 1 rue du Pr Calmette, B.P. 245, 59019 Lille Cedex, France, UMR Université-INRA d'Immunologie Parasitaire, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 31, avenue Monge, Parc Grandmont, 37200 Tours, France, and Rega Institute for Medical Research, K.U.Leuven, B-3000 Leuven, Belgium

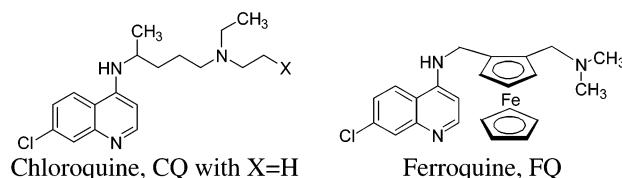
Received February 17, 2006

Three ferroquine (FQ) derivatives, closely mimicking the antimalarial drug hydroxychloroquine (HCQ), have been prepared. Whereas these organometallic compounds provide the expected reduced cytotoxic effects compared to FQ, they inhibit *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* far better than chloroquine (CQ). Moreover, this new class of bioorganometallic compounds exert antiviral effects with some selectivity toward SARS-CoV infection. These new drugs may offer an interesting alternative for Asia where SARS originated and malaria has remained endemic.

Introduction

Malaria is a major international public health problem, causing 300–500 million infections worldwide and a death toll of approximately 1.1–2.7 million annually.¹ *Plasmodium falciparum* accounts for most of the mortality, and its resistance to antimalarial drugs has developed in many regions of the world.^{2,3} Chemists and biologists have combined their efforts in an attempt to find efficient and affordable drugs for the developing countries. Several approaches have been investigated,^{4,5} and new projects at various stages of development have emerged.⁶ Besides, apart from these classical organic schemes, an atypical strategy based on modification of the old drug chloroquine (CQ) by a ferrocenyl fragment led to the identification of FQ (Figure 1).^{7,8}

Ferroquine has been shown to be remarkably effective against CQ-resistant *P. falciparum*.⁷ Moreover, no observable immunotoxic effects were detected in naïve and infected young rats.⁹ The mode of action of FQ is believed to be similar to that of CQ and probably involves hemozoin formation.¹⁰ A recent study of FQ metabolism in animal and human hepatic models revealed similarities to that of CQ.¹¹ One notable difference is that while the two main CQ metabolites are not active against CQ-resistant *P. falciparum*, FQ metabolites still exhibited a significant activity. Also, it is important to note that the close parent of CQ, hydroxychloroquine (HCQ), was reported to be less toxic than CQ, but was found inactive on CQ-resistant *P. falciparum*.¹² On the other hand, aminoquinoline-based antimalarials such as CQ or mefloquine (MF) also had antiviral efficacy and showed a synergistic action with HIV protease inhibitors (PIs).^{13–16} CQ has been reported to possess strong antiviral effects on the severe acute respiratory syndrome (SARS) causative agent.¹⁷ SARS is a febrile respiratory illness caused by a novel coronavirus, SARS-associated coronavirus (SARS-CoV),^{18–21} which emerged in southern China in November 2002. SARS-CoV is believed to be of zoonotic origin. Although



HydroxyCQ, HCQ with X=OH

Figure 1. Chemical structure of chloroquine, hydroxychloroquine, and ferroquine.

several animal species (e.g., civet) sold for human consumption in markets in southern China have demonstrated evidence of SARS-CoV infection, the wild reservoir of SARS-CoV is still unknown.²² As of today, no efficacious therapy is available, although many candidate anti-SARS-CoV agents have been identified.^{17,23–25}

Encouraged by the strong antimalarial activity of FQ on CQ-resistant clones and field isolates, we aimed to study if hydroxyferroquine (HFQ) might retain a significant activity against *P. falciparum* and a set of different viruses. A series of new bioorganometallics (Figure 1) was designed and synthesized in an effort to combine specific properties of both drugs: an assumed lower toxicity of HFQ associated with a restored antimalarial activity against CQ-resistant parasites. Such molecules would be an interesting alternative to ferroquine for malaria therapy and provide an additional interest in areas where malaria and viruses infection coexist.

Results and Discussion

Synthesis. Like FQ, the hydroxyl FQ derivatives 2–4 can be synthesized easily from inexpensive starting materials.⁷ Quaternization of the terminal nitrogen atom of FQ was performed with methyl iodide in acetone at room temperature (Scheme 1). The resulting quaternary ammonium is the leaving group that was displaced by the appropriate amino-alcohol in acetonitrile under reflux. This nucleophilic substitution afforded products 2, 3, and 4 in 46%, 46%, and 51% yield, respectively.

Antimalarial Activity. Metalloenes 2–4 were evaluated *in vitro* against the CQ-sensitive HB3 strain and the CQ-resistant W2 strain of *P. falciparum* (Table 1). The three hydroxyderivatives 2–4 were more active than CQ against the resistant

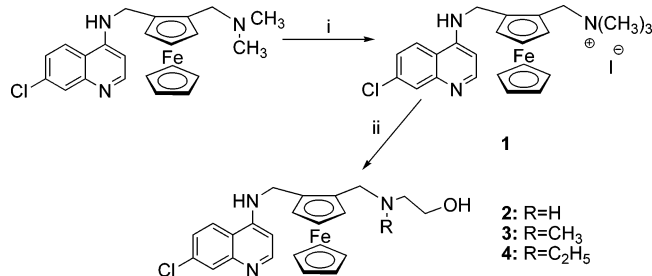
* To whom correspondence should be addressed. Phone: +33-(0)-320434893. Fax: +33-(0)320436585. E-mail: christophe.biot@enscl-lille.fr.

[†] Unité de Catalyse et Chimie du Solide - UMR CNRS 8181.

[‡] Inserm, U547, Institut Pasteur.

[§] UMR Université-INRA d'Immunologie Parasitaire.

^{||} Rega Institute for Medical Research.

Scheme 1. Synthesis of Hydroxyferroquine Derivatives 2–4^a**Table 1.** In Vitro Sensitivities of *P. falciparum* Strains

compd ^a	strain	IC ₅₀ , nM ^b	n	IC ₉₀ , nM ^b	n
2	3D7	15.4 ± 5.5	4	25.7 ± 7.1	4
	W2	133.2 ± 7.4	3	459.1 ± 53.3	3
3	3D7	21.5 ± 14.5	8	51.0 ± 22.2	8
	W2	30 ± 8.8	3	99.9 ± 5.3	3
4	3D7	11.7 ± 5.7	9	29.19 ± 17.9	9
	W2	20.4 ± 1.1	3	56 ± 1.9	3
CQ	3D7	10.6 ± 5.6	16	31 ± 16.5	16
	W2	138.9 ± 20	11	> 500	11
MF	3D7	38.7 ± 5.3	13	138.2 ± 29.7	4
	W2	14.9 ± 0.4	4	66.1 ± 24.3	3
ARS	3D7	2.1 ± 0.3	13	9.1 ± 5.1	3
	W2	2.1 ± 0.2	4	14 ± 1.6	4
FQ	3D7	7.8 ± 2.9	13	16.4 ± 9.4	13
	W2	9.7 ± 2.4	4	24.6 ± 4.6	4

^a CQ = chloroquine; MF = mefloquine; ARS = artesunate; FQ = ferroquine. ^b The results are expressed by the mean ± standard deviation of the mean.

Table 2. Comparison of the Most Active Compound 4 with Other Antimalarials on Cambodian Field Isolates

compd ^a	IC ₅₀ , nM ^b and range	n	resistance, %
4	32.4 (17.9–83.6)	25	3.8
CQ	191.8 (80–538)	25	92
MF	25.2 (1.4–106.5)	23	56
Q	146 (50–827)	25	3.8
ARS	1.47 (0.41–5.35)	25	7.6
FQ	22.94 (11.7–83.6)	25	3.8

^a CQ = chloroquine; MF = mefloquine; Q = quinine; ARS = artesunate; FQ = ferroquine. ^b IC₅₀ values are geometric means among isolates.

strain. Among these amino-alcohol derivatives, the activity increased from the unsubstituted 2 to the *N*-ethyl-substituted 4. Note also that the most active product 4 was even more active than mefloquine and only slightly less active than FQ against both *P. falciparum* strains.

The screening performed on 25 Cambodian field isolates confirmed the high potent antimalarial activity of the novel metallocenic compound 4 against *P. falciparum* (Table 2). Hydroxyferroquine derivative 4 was much more active than CQ and only slightly less active than FQ and MF. Although no cross resistance was found with MF ($r^2 = 0.021$), Q ($r^2 = 0.00005$) and ARS ($r^2 = 0.0732$), a slight cross response was observed with CQ ($r^2 = 0.32$). Metallocene 4 showed almost the same level of activity as that of FQ. As expected, a high correlation ($r^2 = 0.7129$) between the IC₅₀ of FQ and 4 was noted within the isolates tested. This suggests that the two compounds have a similar mode of action and/or uptake by the parasite.

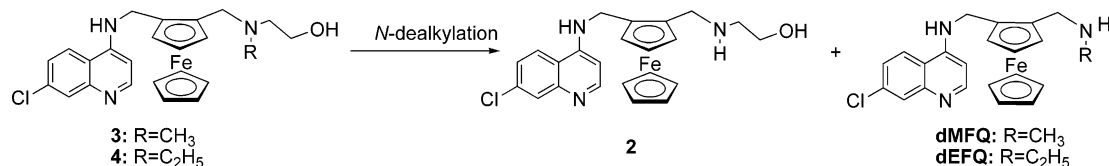
Studies concerning toxicity and antimalarial activity of HCQ are controversial and HCQ appears as lacking activity against CQ resistant strains of *P. falciparum*.¹² Our goal, on the basis of the high activity of FQ, was to synthesize a potentially less toxic molecule which would exhibit significant antimalarial activity. Among the three hydroxyferroquine-type derivatives

synthesized, the results obtained for both laboratory clones and field isolates confirmed the strong antimalarial activity of compound 4 which is only 1.5-fold less active than FQ against all strains and isolates of *P. falciparum* tested and much more active than CQ (6-fold). This product is the most lipophilic of the three compounds synthesized, and the results observed are in accordance with the hypothesis already proposed to explain the strong activity of FQ against *P. falciparum* CQ resistant strains.¹⁰ Moreover, the mechanism of action of the hydroxyferroquine derivatives is probably multifactorial, and involves pharmacokinetic parameters. Indeed, oxidative metabolization of tertiary amines such as CQ,²⁶ HCQ,²⁷ and FQ¹¹ occurs via the cytochrome P-450 system. The main metabolites are generated by side-chain de-alkylation leading first to the monodesalkyl and then to the didesalkyl derivatives. The biotransformation of FQ has been recently studied *in vitro* in animal and human models.¹¹ Even if mono-*N*-desmethyl- and di-*N,N*-desmethyl-FQ showed a decreased *in vitro* activity compared to the parent molecule, they remained more active than CQ on *P. falciparum* CQ-resistant strains.^{11,28} It is notably that the metabolites of CQ showed no activity against CQ-resistant strains. The dramatic activity of FQ metabolites against CQ-resistant *P. falciparum* parasites growth enables us to expect a long-acting antimalarial activity during chemotherapy of malaria. Oxidative pathways should mediate the de-alkylation of bioorganometallics 3 and 4 as previously shown for HCQ²⁷ and FQ¹¹ (Scheme 2). The loss of the ethanol fragment generates the secondary amine 2. The other C–N cleavage generates the active mono-*N*-desmethyl- (dMFQ)¹¹ and mono-*N*-desethyl-FQ (dEFQ),²⁸ respectively. By comparison with HCQ and FQ, it is tempting to suggest that during a clinical use of metallocenes 3 and 4, formation of these active metabolites may occur and participate in the global activity of the parent products. These results, together with the fact that compound 4 was 5-fold less toxic than FQ (see Tables 1 and 2 in Supporting Information) indicate that bioorganometallics 4 can be considered as a promising alternative to FQ for chemotherapy of CQ-resistant malaria.

Antiviral Activity. CQ, HCQ, and the metallocenes (FQ and 2–4) were also tested against HIV-1. CQ and compound 3 exhibited some activity against HIV-1 with a selectivity index of 3 and 6, respectively (Table 3).

The mechanism of the anti-HIV activity of CQ and HCQ is still not fully understood. But it has been linked with the viral entry and related to inhibition of HIV surface envelope glycoprotein gp120. Indeed, these compounds are supposed to increase endosomal pH and alter enzymes required for gp120 production.^{14,24} On the basis of their chemical structures, hydroxyferroquine derivatives 2–4 might target the complex entry process in a similar manner.

Whereas CQ has been shown to inhibit SARS-CoV replication *in vitro*, the mode of action of this compound is currently still unknown.¹⁷ In this context, the metallocenic compounds 2–4 were evaluated for their activity against feline and human (SARS) coronavirus (Table 4) and compared to their parent drugs, CQ, HCQ, and FQ. All compounds, except for HCQ, were effective inhibitors of SARS-CoV replication in Vero cells within the 1–10 μ M concentration range. Compounds 3, 4, FQ, and CQ exhibited a selectivity index of approximately 15. These data confirm the anti-SARS-CoV activity noted previously with CQ.^{17,25,29} In fact, CQ had been quoted as potentially active against SARS-CoV.²⁴ The current data supports this hypothesis and extend the anti-SARS-CoV potential further to CQ derivatives such as, in particular, the metallocenes FQ, 3, and

Scheme 2. Proposed Conversion of Hydroxyferroquine Derivatives to Active Metabolites, 2, DMFQ, and DEFQ**Table 3.** Anti HIV-1 Activity, Cytotoxicity, and Selectivity Index in MT-4 Cells

compd ^a	EC ₅₀ , μM^b	CC ₅₀ , μM^c	SI ^d
2	>2.3	>2.3	-
3	2.9 $\pm$ 1.1	9.1 $\pm$ 6.6	3
4	10	>10	-
FQ	>2.4	>2.4	-
HCQ	>12	>12	-
CQ	8.86 $\pm$ 1.18	54.4 $\pm$ 23.9	6

^a FQ = ferroquine; CQ = chloroquine; HCQ = hydroxychloroquine.
^b Effective concentration required to reduce HIV-1-induced cytopathic effect by 50% in MT-4 cells. ^c Cytotoxic concentration required to reduce MT-4 cell viability by 50%. ^d Selectivity index: ratio CC₅₀/EC₅₀.

Table 4. Anti-Coronavirus Activity

compd ^a	feline coronavirus ^b		human corona (SARS) virus ^c		
	EC ₅₀ , μM	CC ₅₀ , μM	EC ₅₀ , μM	CC ₅₀ , μM	SI ^d
2	>4	12 $\pm$ 0	4.9 $\pm$ 4.3	23 $\pm$ 15	4
3	$\geq$ 10	12 $\pm$ 0	1.9 $\pm$ 0.1	30 $\pm$ 3	16
4	>4	13 $\pm$ 0	3.6 $\pm$ 2.0	61 $\pm$ 1	17
FQ	2.9 $\pm$ 1.2	12 $\pm$ 0	1.4 $\pm$ 0.1	20 $\pm$ 8.0	15
HCQ	28 $\pm$ 27	84 $\pm$ 14	34 $\pm$ 5	>100	>3
CQ	>0.8	3.6 $\pm$ 0.3	6.5 $\pm$ 3.2	>100	>15

^a FQ = ferroquine; CQ = chloroquine; HCQ = hydroxychloroquine.
^b Feline corona virus in Crandell-Reese feline kidney (CRFK) cells. ^c SARS-coronavirus in Vero cells. ^d Selectivity index (for SARS-coronavirus): ratio CC₅₀/EC₅₀.

4. CQ, HCQ, FQ, and compounds 2–4 were evaluated against parainfluenza-3 virus, reovirus-1, Sindbis virus, Coxsackie virus B4, Punta Toro virus, respiratory syncytial virus, herpes simplex virus-1 (HSV-1; KOS), herpes simplex virus-2 (HSV-2; G), vaccinia virus, vesicular stomatitis virus, herpes simplex virus-1 (TK-KOS ACV), and influenza A virus (H3N2). Unfortunately, no significant activity was noted (SI Tables 1–4). This indicates that these compounds present a higher specificity for HIV and SARS-CoV viruses.

Our results showed that HFQ derivatives appear as promising new antimalarial molecules, since they are active with their potential metabolites against CQ-resistant *P. falciparum*. Moreover, we showed that these drugs have anti-HIV and anti-SARS-CoV activities. These findings highlighted the potential interest of metallocenes FQ, 3, and 4 use in all countries where malaria coinfection with HIV and SARS viruses will occur.

Experimental Section

Chemistry. Nuclear magnetic resonance (¹H and ¹³C NMR) spectra were recorded at ambient temperature on a Bruker AC 300 spectrometer, and TMS was used as an internal standard. ¹H NMR analyses were obtained at 300 MHz (s: singlet, d: doublet, t: triplet, dd: double doublet, m: multiplet), whereas ¹³C NMR analyses were obtained at 75.4 MHz. The chemical shifts (δ) are given in parts per million relative to TMS (δ = 0.00). Diverse solvents were used in the determination of spectra for different compounds. Mass spectra were recorded by means of a Waters Micromass Quattro II triple quadrupole LC mass spectrometer equipped with electrospray ionization (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) sources. Melting points were determined by a Kofler and are uncorrected. Column chromatography, carried out on silica gel (Merck Kiesegel 60), was used in purification of samples. Reactions

were monitored by thin-layer chromatography (TLC) using coated silica gel plates and detection by an ultraviolet lamp.

General Procedure for Preparation of 2–4. A mixture of the corresponding amino-alcohol (2-amino-1-ethanol, 2-amino-1-propanol, or 2-amino-1-butanol, 10 mmol) and *N*-(7-chloro-4-quinolyl)-*N*-2-[(1,1,1-trimethylammonio)methyl]ferrocenylmethylamine iodide recently prepared (0.41 mmol) was dissolved in acetonitrile (25 mL). Potassium carbonate (10 mmol) was added in excess, and the mixture was stirred for 3–7 h at reflux. After being cooled to room temperature, the reaction was quenched with water (25 mL). The aqueous layer was then extracted with dichloromethane (3 $\times$ 50 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (EtOAc, 5% triethylamine).

2-[(2-[(7-Chloro-4-quinolyl)amino]methyl]ferrocenylmethyl)amino]-1-ethanol (2). Following the general procedure, a yellow solid was obtained: yield 46%; mp: decomposed before melting; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.41 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz), 7.79 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.68 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz), 7.11 (dd, 1H, *J* = 2.0, 9.8 Hz), 6.89 (m, 1H), 6.38 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz), 4.28 (d, 1H, *J* = 13.0 Hz), 4.19 (m, 1H), 4.14 (m, 1H), 4.09 (s, 5H), 4.03 (m, 2H), 3.67 (m, 3H), 3.49 (d, 1H, *J* = 12.4 Hz), 2.73 (m, 2H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 150.7 (CH), 149.0 (C^{IV}), 147.8 (C^{IV}), 133.7 (C^{IV}), 126.9 (CH), 123.7 (CH), 121.5 (CH), 116.5 (C^{IV}), 97.8 (CH), 84.3 (C^{IV}), 82.2 (C^{IV}), 69.5 (CH), 69.2 (CH), 68.2 (5CH), 65.4 (CH), 59.8 (CH₂), 50.1 (CH₂), 46.6 (CH₂), 41.1 (CH₂); MS *m/z* 452 (MH⁺ ³⁷Cl), 451 (M⁺ ³⁷Cl), 450 MH⁺ ³⁵Cl, 449 (M⁺ ³⁵Cl), 391 (M ³⁷Cl – NHCH₂CH₂OH)⁺, 389 (M ³⁵Cl – NHCH₂CH₂OH)⁺, 271 (M – NH₂)₂O).

2-[(2-[(7-Chloro-4-quinolyl)amino]methyl]ferrocenylmethyl)amino]-1-ethanol (3). A yellow solid was obtained: yield 46%; mp 164 $\pm$ 1 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.45 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz), 7.86 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 7.71 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz), 7.23 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 6.77 (m, 1H), 6.46 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz), 4.32 (m, 2H), 4.20 (m, 2H), 4.15 (s, 5H), 4.11 (m, 1H), 3.88 (d, 1H, *J* = 12.9 Hz), 3.67 (m, 2H), 3.07 (d, 1H, *J* = 12.9 Hz), 2.74 (m, 1H), 2.48 (m, 1H), 2.19 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 151.4 (CH), 150.1 (C^{IV}), 148.5 (C^{IV}), 134.8 (C^{IV}), 127.6 (CH), 124.8 (CH), 122.4 (CH), 117.4 (C^{IV}), 98.8 (CH), 84.0 (C^{IV}), 83.8 (C^{IV}), 71.5 (CH), 70.3 (CH), 69.3 (5CH), 66.4 (CH), 59.2 (CH₂), 59.1 (CH₂), 56.4 (CH₂), 42.4 (CH₂), 41.9 (CH₃); MS *m/z* 466 (MH⁺ ³⁷Cl), 465 (M⁺ ³⁷Cl), 464 MH⁺ ³⁵Cl, 463 (M⁺ ³⁵Cl), 391 (M ³⁷Cl – NHCH₂CH₂OH)⁺, 389 (M ³⁵Cl – NHCH₂CH₂OH)⁺.

2-[(2-[(7-Chloro-4-quinolyl)amino]methyl]ferrocenylmethyl)amino]-1-ethanol (4). A yellow solid was obtained: yield 51%; mp 180 $\pm$ 1 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.43 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz), 7.82 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 7.70 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz), 7.21 (dd, 1H, *J* = 8.9, 2.1 Hz), 6.42 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz), 4.25 (m, 1H), 4.20 (s, 1H), 4.16 (m, 1H), 4.09 (s, 5H), 4.07 (m, 2H), 3.78 (d, 1H, *J* = 13.0 Hz), 3.50 (m, 2H), 3.13 (d, 1H, *J* = 13.0 Hz), 2.71 (m, 1H), 2.58 (m, 1H), 2.40 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 151.2 (CH), 149.0 (C^{IV}), 148.4 (C^{IV}), 134.1 (C^{IV}), 127.4 (CH), 124.3 (CH), 121.6 (CH), 116.7 (C^{IV}), 98.6 (CH), 83.8 (C^{IV}), 82.9 (C^{IV}), 70.9 (CH), 69.4 (CH), 68.6 (5CH), 65.9 (CH), 58.5 (CH₂), 53.8 (CH₂), 51.8 (CH₂), 47.2 (CH₂), 40.9 (CH₂), 10.1 (CH₃); MS *m/z* 480 (MH⁺ ³⁷Cl), 479 (M⁺ ³⁷Cl), 478 MH⁺ ³⁵Cl, 477 (M⁺ ³⁵Cl), 391 (M ³⁷Cl – NHCH₂CH₂OH)⁺, 389 (M ³⁵Cl – NHCH₂CH₂OH)⁺.

Antiviral Evaluation. As described in refs 25, 30, 31, and 32: ref 25 as to SARS-CoV; ref 30 as to HSV-1, HSV-2, vaccinia virus; ref 31 as to various other RNA viruses; ref 32 as to HIV-1.

Antimalarial Activity. Laboratory Strains. The 3D7 and W2 strains of *P. falciparum* used as a control for sensitivity to CQ and

FQ were cultured as previously described. Parasites were grown in vitro on O⁺ human red blood cells in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% AB human serum (EFS), and 0.01 mg/mL gentamicin under an atmosphere of 90% nitrogen/ 5% oxygen/ 5% carbon dioxide.

Field Isolates. Isolates of *P. falciparum* were collected from 25 subjects recruited, for in vivo trials of mefloquine-artesunate, by the Cambodian Ministry of Health. All the subjects came from malaria-endemic areas of Cambodia. Sampling and further treatment of samples were previously described.³³ All antimalarial measurements were done on fresh samples.

For antimalarial activity measurements, a microplate assay measuring [³H]hypoxanthine incorporation in parasite nucleic acids and derived from the method of Desjardins³⁴ was used to test FQ antimalarial properties on laboratory strains and Cambodian field isolates. Test procedures for laboratory strains were as previously described (0.5% hematocrit; 0.5% parasitaemia) (4, 5). IC₅₀s were calculated from response curves by linear interpolation.

Concerning field isolates, fresh blood samples were tested without prior culture adaptation. Erythrocyte suspensions (1.5% hematocrit; 0.1–1% parasitaemia) were cultivated as described above in an atmosphere enriched with 5% CO₂. Ranges of concentrations were 5–5120 nM for CQ and FQ. Test microplates were incubated for 42–46 h at 37 °C. Only assays showing at least a 10-fold increase in parasite counts between drug free control wells containing uninfected or infected red blood cells were considered for IC₅₀ (inhibitory concentration 50%) calculations which were done by log-probit approximation.

Acknowledgment. Dedicated to Dr. Lucien Maciejewski on the occasion of his 60th birthday. This work was supported by “Fondation des Treilles” (fellowship attributed to W.D.) by the CNRS, by the Universités de Lille I and Lille II and by the Inserm. A BDI fellowship from CNRS and Region Nord-Pas-de-Calais to N.C. is also gratefully acknowledged. H. Kalamou and D. Lamberton are acknowledged for their expert technical intervention. We thank Dr. J. Balzarini, Dr. M. Van Ranst, Dr. C. Pannecouque for supervision, and Mrs. A. Van Lierde, F. De Meyer, L. Persoons, C. Heens, K. Erven, L. van Berckelaer, and E. Keyaerts for performing the antiviral tests.

Supporting Information Available: Elemental analyses; compared cytotoxicity and antiviral activity of HFQ derivatives on viruses infecting Vero, HEL, and HeLa cell cultures. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- Snow, R. W.; Guerra, C. A.; Noor, A. M.; Myint, H. Y.; Hay, S. I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **2005**, *434*, 214–217.
- World Health Organization: Chemotherapy of Malaria and Resistance in *Plasmodium falciparum*: What next? *Trends Parasitol.* **2001**, *17*, 582–588.
- Hastings, I. M. The origins of antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol.* **2004**, *512*–518.
- Biot, C.; Chibale, K. Novel Approaches to Antimalarial Drug Discovery *Curr. Drug Targets – Infectious Disorders* **2006**, in press.
- Tripathi, R. P.; Mishra, R. C.; Dwivedi, N.; Tewari, N.; Verma, S. S. Current Status of Malaria Control. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2643–2659.
- Biagini, G. A.; O'Neill, P. M.; Bray, P. G.; Ward, S. A. Current drug development portfolio for antimalarial therapies. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, *5*, 473–478.
- Biot, C. Ferroquine: a new weapon in the fight against malaria. *Curr. Med. Chem.: Anti-infect. Agents*, **2004**, *3*, 135–147.
- Pink, Richard; Hudson, A.; Mouris, M.-A.; Bendig, M. Opportunities and Challenges in Antiparasitic Drug Discovery. *Nature Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 727–740.
- Pierrot, C.; Lafitte, S.; Dive, D.; Fraisse, L.; Brocard, J.; Khalife, J. Analysis of immune response patterns in naive and *Plasmodium* berghei-infected young rats following a ferroquine treatment. *Int. J. Parasitol.* **2005**, *35*, 1601–1610.
- Biot, C.; Taramelli, D.; Forfar-Bares, I.; Maciejewski, L. A.; Boyce, M.; Nowogrocki, G.; Brocard, J. S.; Basilico, N.; Olhio, P.; Egan, T. J. Insights into the Mechanism of Action of Ferroquine. Relationship between Physicochemical Properties and Antiplasmodial Activity *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 185–193.
- Daher, W. E.; Pelinski, L.; Klieber, S.; Sadoun, F.; Meunier, V.; Bourrie, M.; Biot, C.; Guillou, F.; Fabre, G.; Brocard, J.; Fraisse, L.; Maffrand, J. P.; Khalife, J.; Dive, D. In vitro metabolism of ferroquine (SSR97193) in animal and human hepatic models and antimalarial activity of major metabolites on *Plasmodium falciparum*. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, in press.
- Warhurst, D. C.; Steele, J. C.; Adagu, I. S.; Craig, J. C.; Cullander, C. Hydroxychloroquine is much less active than chloroquine against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*, in agreement with its physicochemical properties. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*, 188–193.
- Savarino, A.; Gennero, L.; Sperber, K.; Boelaert, J. R. The anti-HIV-1 activity of chloroquine. *J. Clin. Virol.* **2001**, *20*, 131–135.
- Romanelli, F.; Smith, K. M.; Hoven, A. D. Chloroquine and hydroxychloroquine as inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV-1) activity. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 2643–2648.
- Savarino, A.; Lucia, M. B.; Rastrelli, E.; Rutella, S.; Golotta, C.; Morra, E.; Tamburrini, E.; Perno, C. F.; Boelaert, J. R.; Sperber, K.; Cauda, R. Anti-HIV effects of chloroquine: inhibition of viral particle glycosylation and synergism with protease inhibitors. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2004**, *35*, 223–232.
- Owen, A.; Jannet, O.; Hartkoorn, R. C.; Chandler, B.; Bray, P. G.; Martin, P.; Ward, S. A.; Hart, C. A.; Khoo, S. H.; Back, D. J. In vitro synergy and enhanced murine brain penetration of saquinavir coadministered with mefloquine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *314*, 1202–1209.
- Vincent, M. J.; Bergeron, E.; Benjannet, S.; Erickson, B. R.; Rollin, P. E.; Ksiazek, T. G.; Seidah, N. G.; Nichol, S. T. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virol. J.* **2005**, *2*, 69.
- Peiris, J. S. M.; Lai, S. T.; Poon, L. L. M.; Guan, Y.; Yam, L. Y. C.; Lim, W.; Nicholls, J.; Yee, W. K. S.; Yan, W. W.; Cheung, M. T.; Cheng, V. C. C.; Chan, K. H.; Tsang, D. N. C.; Yung, R. W. H.; Ng, T. K.; Yuen, K. Y. Coronavirus as a Possible Cause of Severe Acute Respiratory Syndrome *Lancet* **2003**, *361*, 1319–1325.
- Ksiazek, T. G.; Erdman, D.; Goldsmith, C. S.; Zaki, S. R.; Peret, T.; Emery, S.; Tong, S.; Urbani, C.; Comer, J. A.; Lim, W.; Rollin, P. E.; Dowell, S. F.; Ling, A.-E.; Humphrey, C. D.; Shieh, W.-J.; Guarner, J.; Paddock, C. D.; Rota, P.; Fields, B.; DeRisi, J.; Yang, J.-Y.; Cox, N.; Hughes, J. M.; LeDuc, J. W.; Bellini, W. J.; Anderson, L. J. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1953–1966.
- Drosten, C.; Günther, S.; Preiser, W.; van der Werf, S.; Brodt, H.-R.; Becker, S.; Rabenau, H.; Panning, M.; Kolesnikova, L.; Fouchier, R. A. M.; Berger, A.; Burguiere, A.-M.; Cinatl, J.; Eickmann, M.; Escriou, N.; Grywna, K.; Kramme, S.; Manuguerra, J.-C.; Müller, S.; Rickerts, V.; Stürmer, M.; Vieth, S.; Klenk, H.-D.; Osterhaus, A. D. M. E.; Schmitz, H.; Doerr, H. W. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1967–1976.
- He, J.-F.; Peng, G.-W.; Min, J.; Yu, D.-W.; Liang, W.-J.; Zhang, S.-Y.; Xu, R.-H.; Zheng, H.-Y.; Wu, X.-W.; Xu, J.; Wang, Z.-H.; Fang, L.; Zhang, X.; Li, H.; Yan, X.-G.; Lu, J.-H.; Hu, Z.-H.; Huang, J.-C.; Wan, Z.-Y.; Hou, J.-L.; Lin, J.-Y.; Song, H.-D.; Wang, S.-Y.; Zhou, X.-J.; Zhang, G.-W.; Gu, B.-W.; Zheng, H.-J.; Zhang, X.-L.; He, M.; Zheng, K.; Wang, B.-F.; Fu, G.; Wang, X.-N.; Chen, S.-J.; Chen, Z.; Hao, P.; Tang, H.; Ren, S.-X.; Zhong, Y.; Guo, Z.-M.; Liu, Q.; Miao, Y.-G.; Kong, X.-Y.; He, W.-Z.; Li, Y.-X.; Wu, C.-J.; Zhao, G.-P.; Chiu, R. W. K.; Chim, S. S. C.; Tong, Y.-k.; Chan, P. K. S.; Tam, J. S.; Lo, Y. M. D. Molecular Evolution of the SARS Coronavirus During the Course of the SARS Epidemic in China. *Science* **2004**, *303*, 1666–1669.
- Guan, Y.; Zheng, B. J.; He, Y. Q.; Liu, X. L.; Zhuang, Z. X.; Cheung, C. L.; Luo, S. W.; Li, P. H.; Zhang, L. J.; Guan, Y. J.; Butt, K. M.; Wong, K. L.; Chan, K. W.; Lim, W.; Shortridge, K. F.; Yuen, K. Y.; Peiris, J. S.; Poon, L. L. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* **2003**, *302*, 276–278.
- Shie, J. J.; Fang, J. M.; Kuo, C. J.; Kuo, T. H.; Liang, P. H.; Huang, H. J.; Yang, W. B.; Lin, C. H.; Chen, J. L.; Wu, Y. T.; Wong, C. H. Discovery of Potent Anilide Inhibitors against the Severe Acute Respiratory Syndrome 3CL Protease. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4469–4473.

- (24) Savarino, A., Boelaert, J. R., Cassone, A., Majori, G., Cauda, R. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 722–727.
- (25) Keyaerts, E., Vijgen, L., Maes, P., Neyts, J., Van Ranst, M. In vitro inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus by chloroquine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *323*, 264–268.
- (26) Aderounmu, A. F. In vitro assessment of the antimalarial activity of chloroquine and its major metabolites. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1984**, *78*, 581–585.
- (27) Wei, Y.; Nygard, G. A.; Ellertson, S. L.; Khalil, S. K. Stereoselective disposition of hydroxychloroquine and its metabolite in rats. *Chirality* **1995**, *7*, 598–604.
- (28) Biot, C.; Delhaes, L.; N'Diaye, C. M.; Maciejewski, L. A.; Camus, D.; Dive, D.; Brocard, J. S. Synthesis and antimalarial activity in vitro of potential metabolites of ferrochloroquine and related compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2843–2847.
- (29) For a review, see: De Clercq, E. Potential antivirals and antiviral strategies against SARS (severe acute respiratory syndrome)-coronavirus infections. *Expert. Rev. Anti-Infective Ther.* **2006**, submitted for publication.
- (30) De Clercq, E., Descamps, J., Verhelst, G., Walker, R. T., Jones, A. S., Torrence, P. F., Shugar, D. Comparative efficacy of different antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus. *J. Infect. Dis.* **1980**, *141*, 563–574.
- (31) De Clercq, E. Antiviral and antimetabolic activities of neplanocins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *28*, 84–89.
- (32) Pauwels, R., De Clercq, E., Desmyter, J., Balzarini, J., Goubau, P., Herdewijn, P., Vanderhaeghe, H., Vandeputte, M. Sensitive and rapid assay on MT-4 cells for detection of antiviral compounds against the AIDS virus. *J. Virol. Methods* **1987**, *16*, 171–185.
- (33) Durrand, V., Berry, A., Sem, R., Glaziou, P., Beaudou, J., Fandeur, T. Variations in the sequence and expression of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (PfCRT) and their relationship to chloroquine resistance *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, *136*, 273–285.
- (34) Desjardins, R. E.; Canfield, J.; Haynes, D.; Chulay, D. J. Quantitative Assessment of Antimalarial Activity in Vitro by a Semi-automated Microdilution Technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *16*, 710–718.

JM0601856

Chapitre III

Molécules duales dérivées de la ferroquine

I. Les molécules duales

Pour pallier aux problèmes de résistance, la World Health Organisation (WHO) a recommandé l'utilisation de combinaisons de médicaments en particuliers avec l'ART (figure 1).¹ L'ART et ses dérivés (l'ARS, l'artéméther...) diminuent rapidement la parasitémie ainsi que les symptômes. Ils réduisent le nombre de parasites d'un facteur d'environ 10 000 à chaque cycle asexué, ce qui est beaucoup plus que les autres antipaludiques qui réduisent seulement d'un facteur 100 à 1 000 le nombre de parasites par cycle. L'ART et ses dérivés sont peu stables et sont éliminés rapidement par l'organisme : une thérapie de 7 jours est alors nécessaire et la cure n'est pas toujours totale. On assiste alors à des recrudescences. Lorsque l'ART ou ses dérivés sont administrés avec des antipaludiques à élimination lente, un traitement de 3 jours est suffisant pour guérir radicalement le malade de ses parasites. Il est évident que la combinaison, en comparaison à la monothérapie, a une efficacité supérieure. Lorsqu'elle est administrée en combinaison avec d'autres antipaludiques, l'ART est protégée du développement de résistance par le médicament associé. Les dérivés de l'ART sont actifs sur les 4 espèces de *Plasmodium* qui infectent l'Homme le plus fréquemment (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*) et sont généralement bien tolérés. Le seul effet secondaire rare (environ 1 personne sur 3 000) met en jeu des réactions d'hypersensibilité manifestées initialement par de l'urticaire. Les dérivés de l'ART ont l'avantage d'agir sur les gamétocytes et de ce fait, sur la transmission du paludisme au travers du moustique.^{2,3}

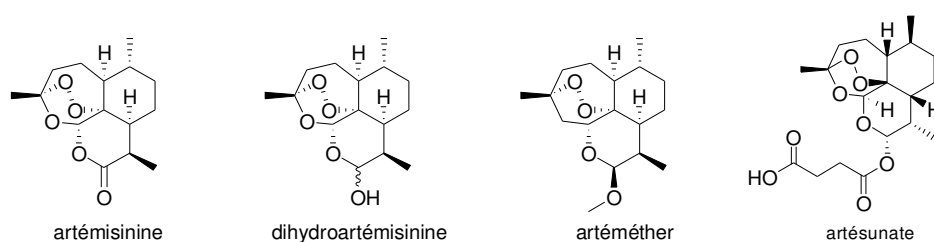


Figure 1 : Structure chimique de l'artémisinine et de ses dérivés.

Les combinaisons de médicaments posent cependant des problèmes du fait de la différence de biodisponibilité des différentes molécules présentes. Afin de résoudre ce problème de biodisponibilité, une alternative prometteuse consiste à lier les molécules actives entre-elles (actives sur différentes cibles) par une liaison covalente. En effet, la liaison covalente entre les deux molécules actives permet de les véhiculer vers les cibles

¹ World Health Organisation. Guidelines for the treatment of malaria. **2006**.

² Price et al. *Lancet*. **1996**, 347, 1654-1658.

³ Targett et al. *J. Infect. Dis.* **2001**, 183, 1254-1259.

pharmacologiques à la même vitesse. De plus, comme les différentes parties de ces molécules hybrides n'ont pas forcément le même mode d'action, ni la même cible pharmacologique, l'action multiple de ces nouvelles molécules diminuerait le risque d'apparition de résistance.

Cette nouvelle stratégie de molécules duales a déjà été appliquée avec succès pour la découverte de nouveaux antipaludiques^{4,5,6,7,8,9,10} et pour le traitement d'autres maladies comme la tuberculose,¹¹ le cancer¹² et le VIH.^{13,14} Le schéma 2 représente les différents modes d'interaction possible des molécules hybrides.¹⁵ La conception de molécules hybrides avec deux modes d'action est une niche originale dans le domaine de la conception du médicament. C'est une approche rationnelle qui permet de créer de nouveaux candidats médicaments à un prix raisonnable. Nous allons voir plus en détail cette stratégie appliquée au paludisme.

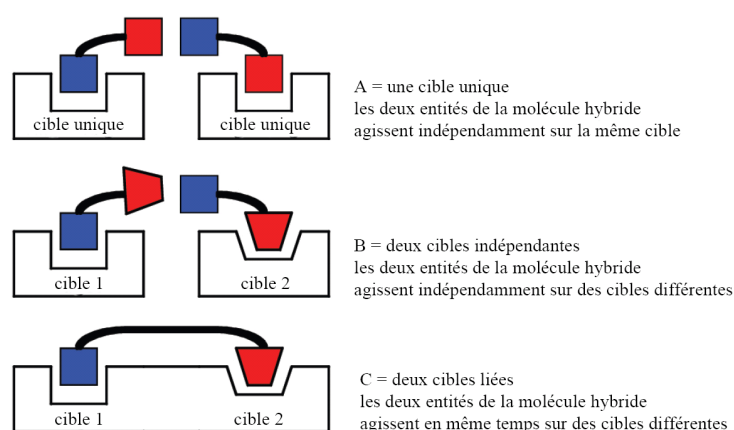


Schéma 2 : Représentation schématique de trois modes d'interactions possibles des molécules hybrides.¹⁵

I.1. Prodrogues et molécules duales d'inhibiteurs de glutathion réductase conjugués à une amino-4-quinoléine

Le Dr. Davioud-Charvet fût l'un des pionniers de cette stratégie de molécules duales appliquée aux antipaludiques. Son groupe a synthétisé en 2001 des molécules duales associant

⁴ Davioud-Charvet et al. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 4268-4276.

⁵ Burgess et al. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 5623-5625.

⁶ Grellepois et al. *ChemBioChem.* **2005**, 6, 648-652.

⁷ Dechy-Cabaret et al. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 1625-1636.

⁸ Romeo et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 2931-2934.

⁹ Salom-Roig et al. *Comb. Chem. High Throughput Scree.* **2005**, 8, 49-62.

¹⁰ Friebolin et al. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 1260-1277.

¹¹ Jawahar, M.S. *Indian J. Med. Res.* **2004**, 120, 398-417.

¹² Qian et al. *Cancer Res.* **2004**, 64, 6626-6634.

¹³ Matsumoto et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 1227-1231.

¹⁴ Petersen et al. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1211-1220.

¹⁵ Meunier, B. *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 69-77.

un inhibiteur de glutathion réductase (GR) à une amino-4-quinoléine (figure 3) ayant une activité antipaludique puissante *in vitro* et *in vivo*.⁴

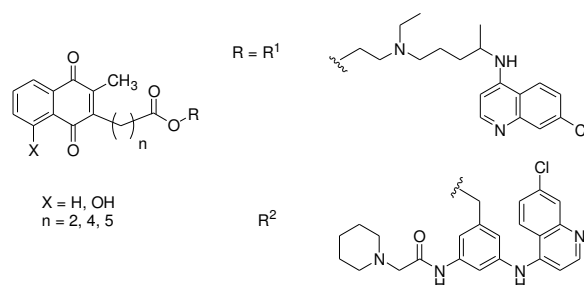


Figure 3 : Structure des molécules duales inhibiteur de glutathion réductase conjugué à une amino-4-quinoléine.

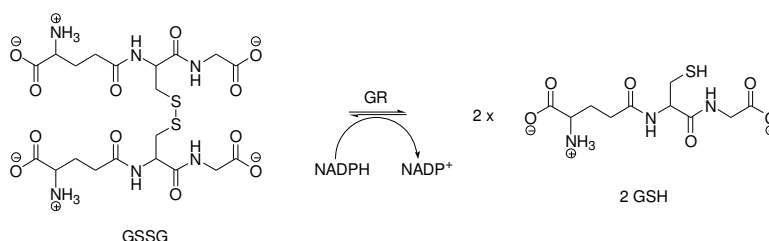


Schéma 4 : Réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH) par la glutathion réductase (GR) en présence de coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH).

Les parasites sont exposés à des flux d'espèces oxygénées réactives (ROS, reactive oxygen species) et ont besoin de systèmes antioxydants intracellulaires non enzymatiques et d'enzymes antioxydantes pour neutraliser ou éliminer ces ROS. Le GSH est l'un des antioxydants les plus abondants dans le cytosol cellulaire. Il a été montré qu'une élévation de la quantité de GSH chez *P. falciparum* était liée à une augmentation de résistance à la CQ alors qu'une déplétion en GSH restaurait la sensibilité à la CQ d'un clone résistant.^{16,17} En effet, le GSH est connu pour protéger le parasite des dommages oxydatifs générés lors de la digestion de l'hémoglobine et des réponses immunitaires de l'hôte.¹⁸ Le GSH se trouve principalement à l'état réduit et le maintien de son taux intracellulaire sous cette forme dépend de l'efficacité de la réduction du glutathion oxydé (GSSG) par la GR (schéma 4). De nombreux inhibiteurs de GR, en particulier dans la série des naphtoquinones,^{4,10} ont été

¹⁶ Ginsburg et al. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 56, 1305-1313.

¹⁷ Müller, S. *Mol. Microbiol.* **2004**, 53, 1291-1305.

¹⁸ Schirmer et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 141-154.

développés comme nouveaux agents antipaludiques,^{17,19} seuls ou en combinaison, pour restaurer la sensibilité à la CQ.

Basée sur les propriétés des inhibiteurs de GR, les auteurs ont utilisé la stratégie des molécules duales afin de véhiculer directement dans le parasite les deux molécules actives que sont les alcools quinoléiniques et les inhibiteurs de GR. Ces deux molécules sont liées de manière covalente par une liaison ester qui peut être métabolisée chez le parasite pour libérer deux molécules actives. La molécule duale la plus active, dérivée d'une anilinoquinoléine ($n = 5$, $X = H$, $R = R^2$; figure 3), présente une bonne activité sur tous les clones avec une CI_{50} de 28 nM. Elle entraîne une diminution dose-dépendante du taux de GSH chez le parasite ainsi qu'une augmentation de l'activité de la GR et une diminution de l'activité de la glutathion *S*-transférase. Cette molécule a également été testée *in vivo*. Le temps de survie moyen a été augmenté de 178 % après un traitement des souris infectées par *P. berghei* avec 40 mg/kg pendant 4 jours. Aucune cytotoxicité n'a été observée pour ce composé sur cellules hMRC-5.

Le groupe du Dr. Davioud-Charvet a également synthétisé une série de molécules duales de 18 naphthoquinones et phénols avec trois types de liaisons covalentes différentes entre la partie amino-4-quinoléine et le composé ayant une activité redox.¹⁰ Nos travaux concernant la première série de molécules duales ont été réalisés en parallèle à cette série de molécules. Deux amides tertiaires montrent une activité antipaludique à faible concentration nanomolaire sur les clones CQ-résistants de *P. falciparum* ($CI_{50} < 10$ nM sur K1) (figure 5). Ces molécules inhibent la formation de l'hémozoïne comme leurs analogues de la CQ à chaîne latérale courte. Le comportement de ces molécules duales est cependant différent de celui de l'analogue de la CQ car ces molécules ne semblent pas interférer avec le transporteur *Pf*CRT responsable de l'efflux de CQ hors de la vacuole digestive chez les parasites résistants (voir chapitre I). Bien que les molécules ont été conçues comme molécules duales pouvant subir une étape oxydative de *N*-désalkylation et libérer les deux entités actives dans le parasite, le clivage n'a pas été démontré.

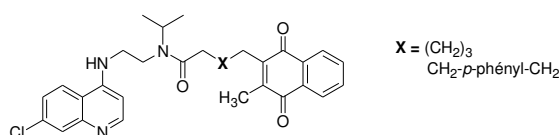


Figure 5 : Structure des molécules duales basées sur les inhibiteurs de glutathion réductase de *P. falciparum*.

¹⁹ Meierjohan, S.; Walter, R.D.; Müller, S. *Biochem. J.* **2002**, 368, 761-768.

I.2. Les trioxaquines

En parallèle, le Pr. Meunier a également développé cette stratégie de molécules duales en synthétisant des trioxaquines.⁷ Les trioxaquines sont des molécules duales qui contiennent un motif endoperoxyde trioxane (pour mimer les propriétés de l'ART) lié à une entité amino-4-quinoléine. La trioxaquine DU1302c (figure 6) préparée à partir de l' α -terpinène, un produit naturel peu coûteux, présente une activité antipaludique *in vitro* très puissante aussi bien sur les clones CQ-sensibles que CQ-résistants de *P. falciparum* (CI_{50} = 5-19 nM). Des souris infectées par *P. vinckei* ont été traitées par le DU1302c durant 4 jours. La dose nécessaire pour réduire de 50 % la parasitémie est de 5 et 18 mg.kg⁻¹.j⁻¹ par voie intrapéritonéale et orale, respectivement. Il y a disparition totale des parasites sans recrudescence par voie intrapéritonéale à une dose de 20 mg.kg⁻¹.j⁻¹.

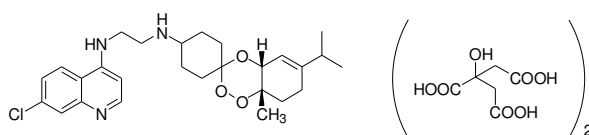


Figure 6 : Structure de la trioxaquine DU1302c.

I.3. Molécules duales primaquine-statine

La Plasmepsine II (PLM II) est une des aspartate protéases impliquées dans la dégradation de l'hémoglobine durant le cycle intraérythrocytaire de *P. falciparum* (voir chapitre I).²⁰ Cette enzyme, dont l'inhibition entraîne la mort du parasite, est considérée comme une cible de choix. Des inhibiteurs de la PLM II, incluant les molécules basées sur la statine, ont été développés. Ils s'associent très bien avec l'enzyme (K_i de l'ordre du nanomolaire) mais ils ne sont pas très efficaces dans les tests *in vitro* (CI_{50} de l'ordre de 10-20 μ M).²¹ La mauvaise activité antipaludique de ces inhibiteurs est probablement due à un problème de biodisponibilité du fait du caractère peptidique de ces molécules.

²⁰ Banejee et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2002**, 99, 990-995.

²¹ Boss et al. *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 883-907.

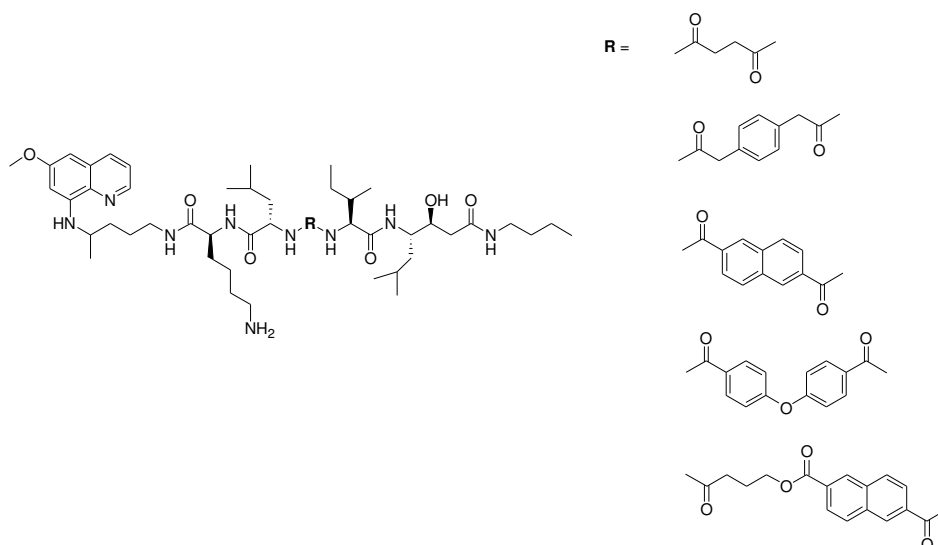


Figure 7 : Structure chimique des molécules duales primaquine-statine.

Romeo et *coll.* ont donc utilisé la stratégie des molécules duales pour coupler des inhibiteurs de PLM II basés sur la statine avec des primaquines (figure 7).⁸ Les valeurs de CI_{50} d'inhibition de l'activité de la PLM II *in vitro* pour ces molécules duales varient de 0,59 à 400 nM. La molécule qui se montre la plus active sur *P. falciparum in vitro* a une CI_{50} de 0,4 μ M. Bien que les activités sur le parasite restent très en deçà de celles attendues pour un nouvel antipaludique, l'augmentation de l'activité antipaludique de ces molécules duales en comparaison avec les inhibiteurs de PLM II initiaux montre l'efficacité de la stratégie.

I.4. Molécules duales trifluorométhylartémisinine-méfloquine

Le groupe du Pr. Bégué a synthétisé deux molécules duales couplant des trifluorométhylartémisines (ART- CF_3) à la MF (figure 8).⁶ La première lie de manière covalente et non labile la partie ART- CF_3 au groupement pipéridinyle de la MF alors que la deuxième lie la ART- CF_3 à la MF par une liaison diester qui est supposée, quant à elle, être facilement clivée par hydrolyse *in vivo*. *In vitro*, les deux molécules montrent une bonne activité (CI_{50} entre 2,4 et 17,2 nM) sur quatre clones de *P. falciparum* ayant différents degrés de sensibilité à la CQ et à la MF. *In vivo*, les deux molécules sont très actives. Elles présentent une meilleure inhibition de la croissance du parasite que la molécule de référence, l'artéméter et une activité du même ordre de grandeur que l'autre molécule de référence, la MF. Ces premiers résultats encouragent l'utilisation de la stratégie des molécules duales pour la conception d'antipaludiques nouveaux.

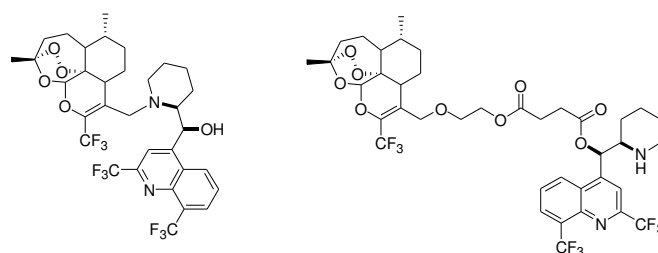


Figure 8 : Structure des molécules duales trifluorométhylartémisinine-méfloquine.

I.5. Molécules restaurant la sensibilité à la CQ

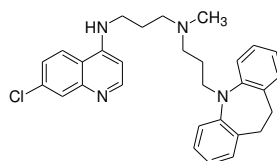


Figure 9 : Première molécule duale restaurant la sensibilité à la chloroquine.

Une classe de molécules hybrides restaurant la sensibilité à la CQ a été conçue par le groupe du Pr. Peyton. La résistance à la CQ chez *P. falciparum* a été associée à une mutation sur une protéine située dans la membrane de la vacuole digestive du parasite, *PfCRT*.^{22,23,24,25} Cette mutation serait responsable de l'efflux de CQ hors de la vacuole digestive, son site d'action (voir chapitre I). De nombreuses molécules restaurant la sensibilité à la CQ ont été identifiées (ex : le vérapamil, bloqueur de canal calcique ; l'imipramine, un antidépresseur). Elles inhiberaient l'efflux de CQ hors de la vacuole digestive associé à *PfCRT* chez les parasites CQ-résistants.^{26,27,28,29} Un pharmacophore de ces molécules a même été décrit afin d'établir des relations structure-activité.³⁰ Il s'agit de deux cycles aromatiques souvent associés à une amine aliphatique se situant à proximité des cycles. Les auteurs pensent que l'association de dérivés de la CQ à des agents restaurant la sensibilité à la CQ devrait aboutir à des molécules antipaludiques très efficaces. Une molécule prototype a été synthétisée et testée sur les clones CQ-sensibles et CQ-résistants de *P. falciparum* (figure 9).⁵ Les tests *in vitro* indiquent que cette molécule est efficace à des concentrations faibles de l'ordre du

²² Zhang, H.; Paguio, M.; Roepe, P.D. *Biochemistry*. **2004**, *43*, 8290-8296.

²³ Bennett et al. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, *133*, 99-114.

²⁴ Martin, R.E.; Kirk, K. *Mol. Biol. Evol.* **2004**, *21*, 1938-1949.

²⁵ Ginsburg, H. *Acta Trop.* **2005**, *96*, 16-23.

²⁶ Martin, S.K.; Oduola, A.M.; Milhous, W.K. *Science*. **1987**, *235*, 899-901.

²⁷ Krogstad et al. *Science*. **1987**, *238*, 1283-1285.

²⁸ van Schalkwyk, D.A.; Walden, J.C.; Smith, P.J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 3171-3174.

²⁹ Millet et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2753-2756.

³⁰ Bhattacharjee et al. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 1212-1220.

nanomolaire sur les deux types de clone. Une étude préliminaire sur la souris démontre une efficacité orale sur *P. chabaudi* et l'absence de toxicité évidente. La stratégie utilisée par les auteurs semble être une bonne méthode pour restaurer la sensibilité de *P. falciparum*.

II. Molécules duales associant des dérivés de la ferroquine à des inhibiteurs de glutathion réductase ou dépléteurs de glutathion

Etant donnée la forte activité antipaludique de la FQ sur les clones CQ-sensibles et CQ-résistants de *P. falciparum*, nous avons établi une collaboration avec le Dr. Davioud-Charvet afin de mettre à profit la stratégie des molécules duales. Cette collaboration fût financée par l'EGIDE grâce à une bourse PROCOPE. Une série de molécules duales associant des inhibiteurs de la GR ou des dépléteurs de GSH à des dérivés de la FQ a été conçue, synthétisée et étudiée pour ses propriétés antiparasitaires et son interaction avec les différentes cibles.

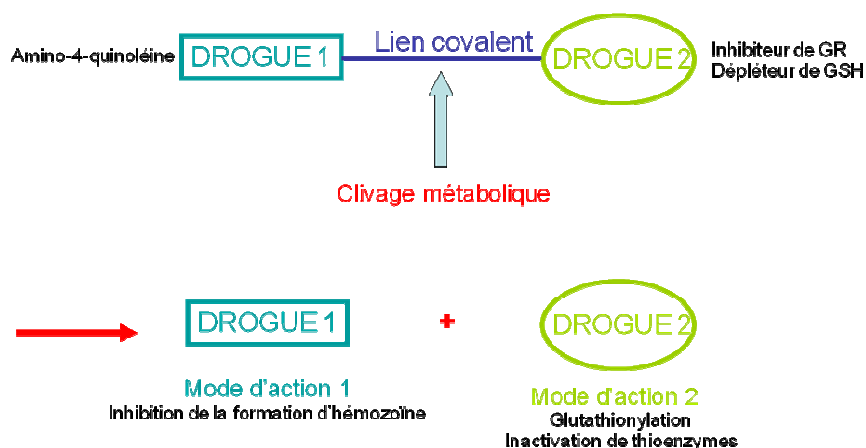


Schéma 10 : Mécanisme de clivage métabolique proposé des molécules duales.

Au chapitre II, une optimisation de la structure de la FQ a été tentée en introduisant une certaine diversité structurale sur la chaîne latérale terminale de la FQ. Cette étude de relations structure-activité a montré que des modifications des substituants de l'azote terminal de la chaîne latérale de la FQ n'avaient que peu (ou pas) d'influence sur l'activité antipaludique de la molécule finale.³¹ Ces travaux suggéraient une certaine tolérance structurale permettant la conception de nouvelles molécules duales.

Dans ce paragraphe, nous présenterons le travail effectué sur les molécules duales qui associent un inhibiteur de la GR ou un dépléteur du GSH à un dérivé de la FQ. Les deux

³¹ Biot et al. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 4707-4714.

parties actives sont liées de manière covalente par une liaison amide ou amine qui est supposée être clivée métaboliquement par une protéase dans le cas des amides ou par *N*-désalkylation oxydative dans le cas des amines par une réaction de biocatalyse mettant en jeu des porphyrines et des peroxydes (schéma 10).¹⁰ Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux inhibiteurs de la GR ont été développés pour prévenir du paludisme¹⁸ et pour restaurer la sensibilité des clones CQ-résistants.^{17,19} En tant qu'inhibiteurs de la GR, nous avons sélectionné deux acides carboxyliques dérivés de la ménadione, l'acide 6-[2'-3'-méthyl)-1',4'-naphtoquinolyl]hexanoïque appelé **M₅**^{32,33,34} ainsi que son analogue **22**, dont la chaîne latérale a été rigidifiée par un groupement phényle introduit comme bioisostère de 3 ponts méthyléniques.³⁵ Dans le souci de limiter le poids moléculaire des molécules duales, nous avons également sélectionné des molécules ayant un faible poids moléculaire et connues pour diminuer le taux de GSH dans les cellules. Le bromobenzène est connu pour être converti durant son métabolisme oxydatif en phénol et autres espèces réactives électrophiles qui réagissent avec le GSH.^{36,37,38} Nous avons donc sélectionné en tant que dépléteur de GSH, l'acide 4-bromobenzoïque et une légère pharmacomodulation a été amenée avec l'acide 4-méthoxybenzoïque. La série avec la liaison amine met également en jeu des dépléteurs de GSH dérivés du bromobenzène, la 4-bromoaniline, la 4-méthoxyaniline ainsi que le 4-aminophénylpivalate.

II.1. Synthèse des molécules duales avec un lien amide

Les molécules duales sont synthétisées à partir des dérivés amines secondaires de la FQ (la synthèse de ces dérivés est décrite au chapitre II). Le dérivé de la FQ est lié à l'inhibiteur de GR ou dépléteur de GSH par une liaison peptidique. La réaction de couplage peptidique entre l'amine et l'acide carboxylique a été réalisée dans le dichlorométhane à température ambiante pendant 3 à 5 heures en présence de l'agent de couplage, le chlorhydrate de *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide (EDCI) (schéma 11). Les acides carboxyliques inhibiteurs de la GR **M₅** et **28** mis en jeu dans la série A ont été synthétisés dans le laboratoire du Dr. Davioud-Charvet au Biochemie Zentrum Heidelberg comme décrit précédemment.^{33,35} Les acides benzoïques **29** et **30** mis en jeu dans la série B sont commerciaux (Aldrich). La

³² Salmon-Chemin et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10:631-635.

³³ Salmon-Chemin et al. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 48-65.

³⁴ Biot et al. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 5972-5983.

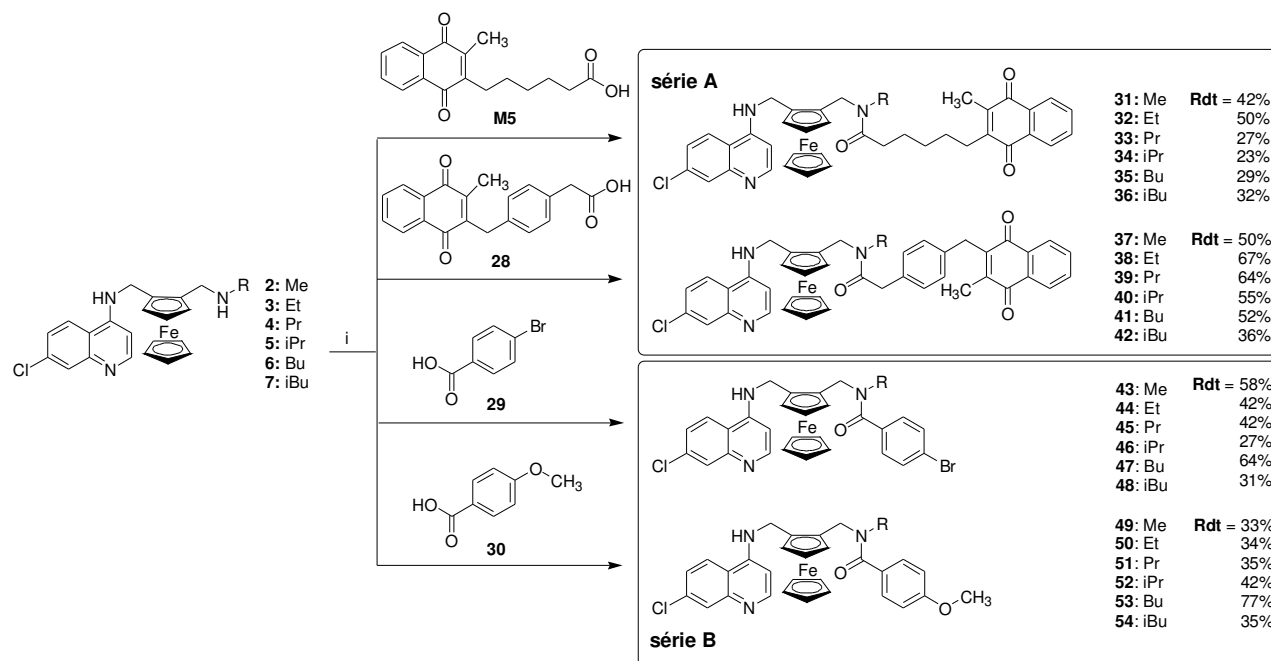
³⁵ Bauer et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10784-10794.

³⁶ Comporti, M. *Chem. Biol. Interact.* **1989**, 72, 1-56.

³⁷ Harauchi, T.; Hirata, M. *Biol. Pharm. Bull.* **1994**, 17, 658-661.

³⁸ Rietjens et al. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, 629-635.

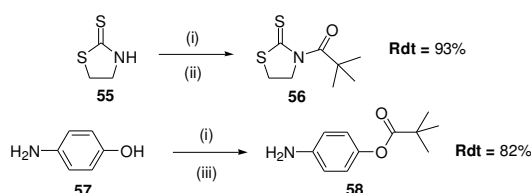
réaction de couplage amène aux molécules duales désirées **31-54** avec des rendements non optimisés de modérés (23 %) à bons (77 %).



(i) EDCI, CH_2Cl_2 .

Schéma 11 : Synthèse des molécules duales 31-54.

II.2. Synthèse des molécules duales avec un lien amine

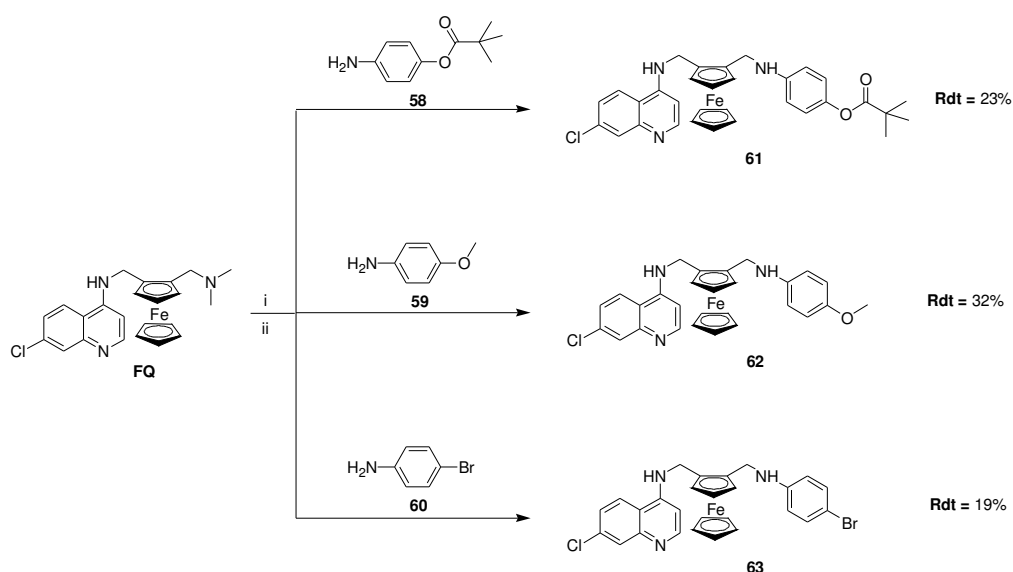


(i) NaH, THF anh., atm. N_2 , 0°C ; (ii) $\text{ClCOC}(\text{CH}_3)_3$, THF anh., atm. N_2 , reflux ; (iii) **56**, THF anh., atm. N_2 , 25°C .

Schéma 12 : Synthèse du 4-aminophénylpivalate.

Avant de synthétiser les molécules duales **61-63**, il est nécessaire de synthétiser le 4-aminophénylpivalate **58** qui, contrairement aux autres anilines **59** et **60**, n'est pas commercial (schéma 12). Il faut tout d'abord préparer le réactif **56**, la 2,2-diméthyl-1-(2-thioxothiazolidin-3-yl)propan-1-one, qui permettra de protéger la fonction alcool du 4-aminophénol **57**. Le réactif **56** est synthétisé à partir de 2-mercaptothiazoline **55** dont on déprotone l'amine par de l'hydruure de sodium à 0°C pendant 10 minutes dans le THF anhydre sous atmosphère inerte.

L'anion résultant est impliqué ensuite dans une réaction d'addition-élimination sur le chlorure de triméthylacétyle à reflux pendant 3 heures dans le THF anhydre sous atmosphère inerte pour donner le réactif **56** désiré avec un rendement global de 93 %.³⁹ La fonction alcool de la 4-aminophénol **57** est ensuite protégée par un groupement acétate de *t*-butyle par le réactif **56**. On effectue dans un premier temps la déprotonation de l'alcool **57** par action d'hydrure de sodium à 0°C dans le THF anhydre sous atmosphère inerte pendant 10 minutes. L'alcoolate obtenu effectue une réaction de substitution nucléophile sur le réactif **56** pour donner l'aniline souhaitée **58**.⁴⁰ La réaction est effectuée dans le THF anhydre à 25°C sous atmosphère inerte durant 30 minutes avec un rendement global de 82 %.



(i) CH_3I , acétone ; (ii) K_2CO_3 , CH_3CN , reflux.

Schéma 13 : Synthèse des molécules duales **61-63**.

La synthèse des molécules duales **61-63** est similaire à celle des dérivés amines secondaires de la FQ (voir chapitre II) (schéma 13). La FQ est tout d'abord méthylée par l'iodure de méthyle dans l'acétone à température ambiante. L'ammonium formé, le groupement partant, est ensuite substitué par l'aniline correspondante **58-60** dans l'acétonitrile à reflux pendant 3 à 7 heures pour donner les molécules duales **61-63** avec des faibles rendements de 19 à 32 % en raison de la faible nucléophilie des amines aromatiques.

³⁹ Nicolaou, K.C.; Dai, W.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8908-8921.

⁴⁰ Dai et al. *Tetrahedron*. **1995**, *45*, 12263-12276.

II.3. Activité antipaludique des molécules duales

L'activité antipaludique des molécules duales a été testée sur un clone CQ-sensible (NF54) et un clone CQ-résistant (K1) de *P. falciparum* par le Dr. Rottmann au Swiss Tropical Institute à Bâle dans le laboratoire du Pr. Brun. La CQ, la FQ et l'ARS ont été pris pour références pour ce test. Les dérivés amines secondaires de la FQ **2-7** présentés au chapitre II ont été testés en même temps afin de pouvoir comparer leur activité avec celle des molécules duales. Nous rappelons que ces dérivés ont une bonne activité antipaludique que ce soit sur clone CQ-sensible ou CQ-résistant du même ordre de grandeur que la FQ (de l'ordre du nanomolaire). Une légère modification sur l'amine terminale de la FQ n'a peu (ou pas) d'influence sur l'activité antipaludique sous réserve que le substituant ne soit pas trop encombrant.

	clone	NF54	K1
	composé	CI ₅₀ , nM	CI ₅₀ , nM
Dérivés de FQ	2	7,5	15,6
	3	13,0	11,2
	4	9,4	7,0
	5	8,0	7,2
	6	14,9	5,1
	7	12,0	8,0
Série A	31	48,7	36,6
	32	44,2	27,4
	33	92,2	26,7
	34	42,6	40,8
	35	104,2	58,8
	36	51,4	67,8
	37	205,8	186,3
	38	90,4	35,8
	39	318,9	252,9
	40	384,3	306,8
	41	336,2	333,8
	42	389,0	444,8
	CQ	5,1	206,7
	ARS	9,8	3,4
	FQ	9,3	11,0

Table 14 : Sensibilité *in vitro* des clones de *P. falciparum* aux molécules duales **31-42**.

Dans la série A, les molécules duales **31-36**, mettant en jeu **M₅**, ont une activité légèrement inférieure à la FQ et aux dérivés amines secondaire de la FQ **2-7** correspondants (table 14). Ces composés ont néanmoins une très bonne activité sur *P. falciparum* avec des valeurs de CI_{50} inférieures à 100 nM. Ils sont d'ailleurs plus actifs que la CQ sur le clone CQ-résistant K1. Les valeurs de CI_{50} sont 3 à 7 fois plus petites que celle de la CQ sur K1. Trois hypothèses peuvent expliquer la diminution d'activité par rapport aux dérivés de la FQ. La première hypothèse suppose que la liaison amide ne soit pas clivée. La liaison amide supprime la basicité de l'azote tertiaire terminal qui avait été reportée comme étant importante pour l'activité antipaludique lors de résultats précédents.^{41,42} En effet, cet atome d'azote terminal est supposé être essentiel pour une accumulation efficace de la molécule dans la vacuole digestive du parasite. La deuxième hypothèse suppose que la liaison amide soit clivée avant que la molécule duale ne soit entrée dans la vacuole digestive du parasite. Les deux parties actives, dérivé de la FQ et **M₅**, ne sont alors peut-être pas correctement véhiculées jusqu'à leur cible pharmacologique. La première hypothèse sera privilégiée étant donné que les valeurs de CI_{50} des dérivés aminés **2-7** ne sont pas atteintes par les molécules duales. En effet, si on suppose qu'il y ait clivage de nos molécules duales, nous pouvons supposer la libération des dérivés aminés **2-7** qui présentent une bonne activité antipaludique. Étant donné que nos molécules duales ont une activité antipaludique inférieure à celle des dérivés aminés **2-7**, nous pouvons supposer qu'il n'y a pas clivage ou clivage partiel de la liaison amide. Néanmoins, l'absence du deuxième atome d'azote basique dans la structure de ces molécules ne semble pas altérer de manière significative leur activité antipaludique. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus en série non ferrocénique par Davioud-Charvet et coll.¹⁰ La troisième hypothèse est basée sur le poids moléculaire très élevé des molécules duales qui ne correspond plus aux paramètres essentiels de la pharmacocinétique gouvernant la biodisponibilité d'un médicament.

Excepté pour le composé **38**, les molécules duales **37-42** avec le motif **28** ont une activité inférieure à la CQ sur les clones CQ-sensibles et CQ-résistants. Nous pouvons supposer que ces molécules ont une moins bonne activité due à leur haut poids moléculaire qui est supérieur à 700 g/mol.

⁴¹ Solomon et al. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 394-398.

⁴² Musonda et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3901-3905.

	clone	NF54	K1
	composé	CI ₅₀ , nM	CI ₅₀ , nM
Série B	43	50,8	53,2
	44	80,6	79,2
	45	44,0	57,8
	46	71,7	105,7
	47	62,9	68,0
	48	127,4	161,2
	49	61,5	93,4
	50	68,3	114,8
	51	44,0	55,9
	52	48,0	67,7
	53	58,1	80,2
	54	77,6	151,6
	CQ	11,9	289,2
	ARS	5,1	2,9
	FQ	11,6	16,1

Table 15 : Sensibilité *in vitro* des clones de *P. falciparum* aux molécules duales **43-54**.

Dans la série B, les molécules duales **43-54**, mettant en jeu les dépléteurs de GSH **29** et **30**, ont des CI₅₀ inférieures à 100 nM (table 15). Ils sont plus actifs que la CQ sur le clone résistant mais à peu près quatre fois moins actifs que la FQ et les dérivés amines secondaires **2-7**. La taille du substituant sur l'atome d'azote N24 a une influence sur l'activité antipaludique. Plus le substituant est petit, meilleure est l'activité. La diminution d'activité antipaludique par rapport aux dérivés aminés de la FQ correspondants est probablement due à un effet antagoniste des deux parties de la molécule. En effet, après avoir synthétisé cette nouvelle série de molécules duales, il a été récemment décrit que la présence d'une solution d'acide benzoïque, ou dérivé de l'acide benzoïque, favorisait la formation de la β -hématine.⁴³ Or, c'est précisément une molécule d'acide benzoïque qui est supposée être libérée si il y a clivage des molécules **43-54** de la série B. Les dérivés aminés de la FQ **2-7** n'inhiberaient pas suffisamment la formation du cristal pour compenser l'effet de l'acide benzoïque sur cette formation. L'acide benzoïque a lui-même des effets antagonistes puisqu'il déplete le GSH et favorise la formation de la β -hématine. De plus, il est à noter que ces molécules n'atteignent pas les 100 % d'inhibition. Cela est probablement dû à une concentration apparente plus faible de ligand libre dans la solution aqueuse du fait d'une agrégation possible de la molécule duale à forte concentration. Comme il a été décrit au chapitre II, des études RMN et des

⁴³ Egan, T.J.; Tshivhase, M.G. *Dalton Trans.* **2006**, 5024-5032.

calculs de chimie quantique montrent que la FQ s'aggrave à forte concentration en solution aqueuse.⁴⁴ Seul le composé **43** atteint les 100 % d'inhibition de croissance des clones.

Les molécules duales **61-63** ont été testées sur 5 clones de *P. falciparum* (3D7, W2, K14, 8425 et Voll) par le Dr. Pradines à l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées à Marseille. Malheureusement, les molécules duales avec une liaison amine **61-63** ne présentent pas d'activité antipaludique sur *P. falciparum* (valeurs de $CI_{50} > 500$ nM). La non activité de ces molécules duales est probablement due à l'encombrement stérique du groupement phényle au niveau de l'atome d'azote terminal. De plus, si nous supposons qu'une *N*-désalkylation a lieu, le dérivé amine primaire de la FQ didéméthylé, qui est connu pour être moins actif que la FQ, est supposé être libéré.^{45,46} Ceci pourrait expliquer en partie la diminution d'activité de cette série.

II.4. Caractérisation de la molécule duale **49**

II.4.1. Caractérisation par rayons X de la molécule duale **49**

Des cristaux orange de la molécule duale **49** ont été obtenus par recristallisation lente dans le dichlorométhane. Ces cristaux ont été analysés par diffraction des rayons X par le Pr. Nowogrocki de l'Unité de Catalyse et de Chimie du Solide de Lille. Les résultats sont donnés en table 17. Une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'oxygène en position 27 et l'azote en position 11 est observée dans la structure cristalline du composé **49** avec une distance O27-N11 de 2,90 Å (figure 16). Par conséquent, seule la conformation *s-cis* de la liaison peptidique est observée à l'état solide. Avec cette liaison hydrogène intramoléculaire, un pseudocycle à 9 centres est formé et impose au groupement ferrocényle une position orthogonale par rapport au plan de la quinoléine avec un angle de torsion C4-N11-C12-C13 de -76,7°. Du fait de la conformation imposée au ferrocène, les distances entre les deux protons diastéréotopiques du carbone C12 et du carbone C23 sont très différentes. La distance entre les protons H12b (pro-*R*) et H23b (pro-*S*) est de 3,53 Å alors qu'elle n'est que de 2,12 Å entre les protons H12a (pro-*S*) et H23a (pro-*R*) (figure 18). Contrairement au dérivé **6** de la FQ, aucun arrangement particulier n'est observé dans le diagramme d'empilement de la molécule duale **49**.

⁴⁴ Buisine et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 12122-12128.

⁴⁵ Daher et al. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, 34, 667-682.

⁴⁶ Biot et al. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2843-2847.

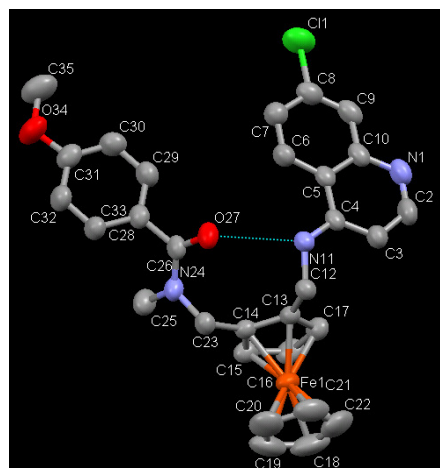


Figure 16 : Structure cristalline du dérivé **49** de la FQ.

Paramètres	49
Formule	$C_{30}H_{28}ClFeN_3O_2$
MW ($g \cdot mol^{-1}$)	553,85
a [Å]	9,9372(1)
b [Å]	12,3443(2)
c [Å]	21,0098(3)
α [°]	90,00
β [°]	91,281(1)
γ [°]	90,00
V [Å ³]	2576,58(6)
Z	4
Système cristallin	Monoclinique
Groupe d'espace	$P2_1/c$
μ (cm^{-1})	0,723
ρ ($g \cdot cm^{-3}$)	1,428
F(000)	1152
limites θ [°]	1,90-27,00
T (K)	100
Nombre de données collectées	5626
$R = \sum F_o - F_c / \sum F_o $	0,0370
R_w	0,0789
Qualité de l'ajustement	1,033
$\Delta\rho_{min}$ [$e \cdot \text{\AA}^{-3}$]	-0,231
$\Delta\rho_{max}$ [$e \cdot \text{\AA}^{-3}$]	0,398

Table 17 : Données cristallographiques du dérivé **49**.

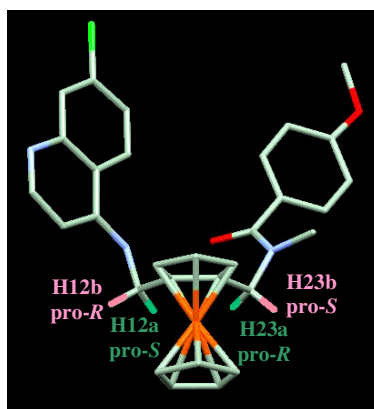
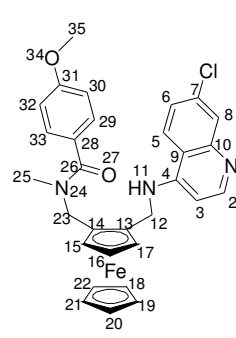


Figure 18 : Définition de H12a, H12b, H23a et H23b.

II.4.2. Caractérisation RMN de la molécule duale **49**

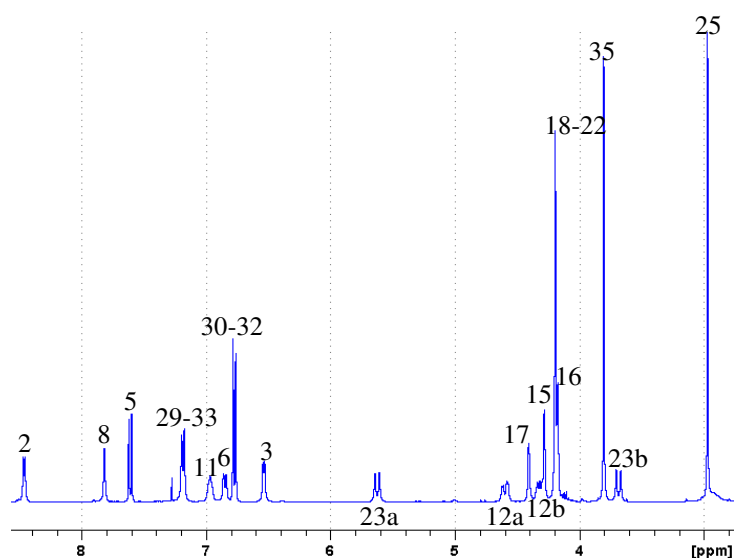
Les expériences RMN ont été enregistrées dans du chloroforme deutéré à 280 K à une fréquence 1H de 400 MHz en collaboration avec le Dr. Trivelli du Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (USTL). La concentration de la molécule **49** dans le tube RMN était de 60 mM. L'attribution complète des signaux RMN 1H , ^{13}C et ^{15}N du

dérivé **49** (table 19) a été réalisée sur la base d'expériences COSY, ^{13}C -HSQC, ^{13}C -HMBC, ^{15}N -HSQC, ^{15}N -HMBC et NOESY (voir annexe 2).

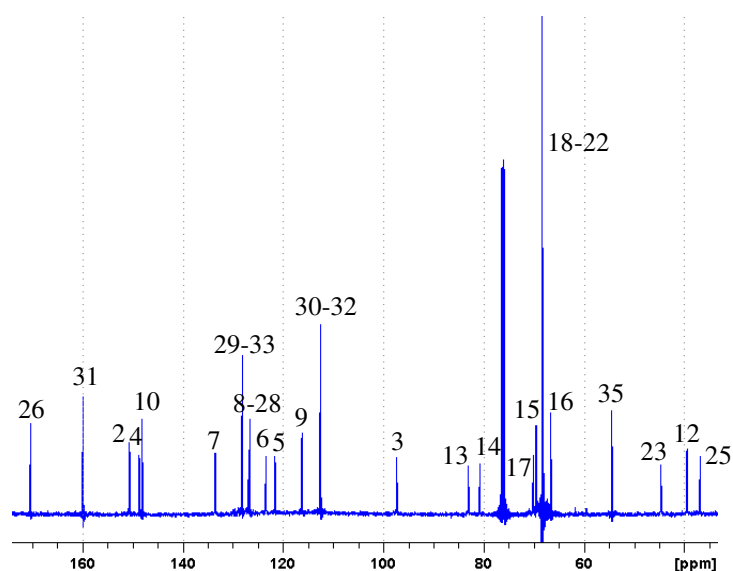


	^1H		^{13}C	^{15}N
Atom	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm)
1				261,6
2	8,46	5,3 (d)	151,5	
3	6,54	5,3 (d)	98,3	
4			149,6	
5	7,61	8,8 (d)	122,5	
6	6,85	8,8 (d)	124,3	
7			134,5	
8	7,82		127,8	
9			117,2	
10			149,0	
11	6,97			86,1
12a	4,60	4,4; 15,1 (dd)	40,4	
12b	4,33	7,6; 15,1 (dd)	40,4	
13			83,9	
14			81,7	
15	4,28		70,5	
16	4,18	2,5 (t)	67,6	
17	4,41		71,0	
18-22	4,20		69,2	
23b	3,69	14,3 (d)	45,6	
23a	5,63	14,3 (d)	45,6	
24				120,8
25	2,97		37,8	
26			171,3	
28			127,6	
29-33	7,19	8,5 (d)	129,1	
30-32	6,78	8,5 (d)	113,4	
31			160,8	
35	3,81		55,3	

Table 19 : Attribution des déplacements chimiques ^1H , ^{13}C et ^{15}N du dérivé **49** dans CDCl_3 à 280 K et à une fréquence ^1H de 400 MHz.



Spectre 20 : Spectre ^1H du dérivé **49** dans CDCl_3 à 280 K à une fréquence ^1H de 400 MHz.



Spectre 21 : Spectre ^{13}C du dérivé **49** dans CDCl_3 à une fréquence ^{13}C de 100,6 MHz à 280 K.

Une liaison amide est susceptible d'avoir deux types de conformation soit une conformation *s-cis*, soit une conformation *s-trans* (figure 22). Afin d'élucider la structure tridimensionnelle de l'analogue **49**, des expériences NOESY ont été enregistrées (Figure 23 et spectre 24).

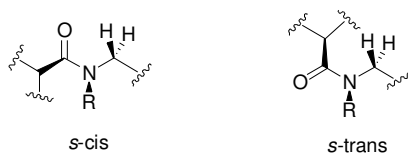


Figure 22 : Conformations *s-cis* et *s-trans* d'une liaison amide.

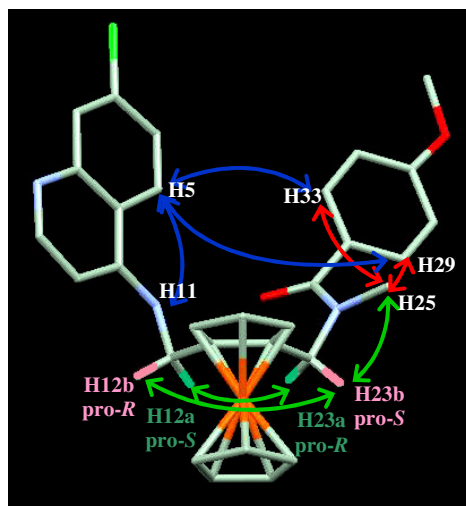
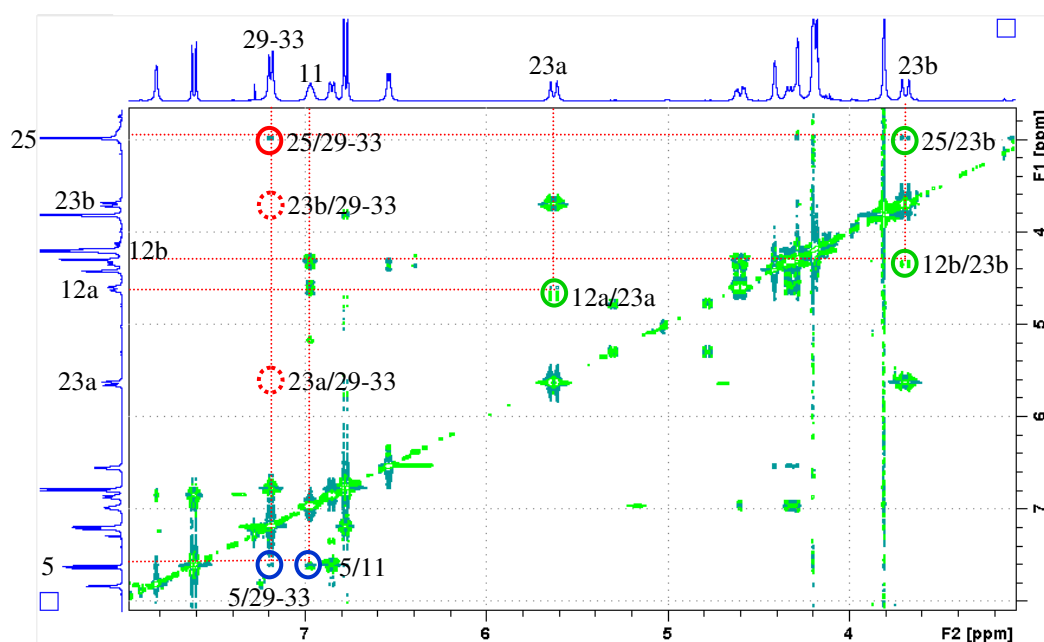


Figure 23 : NOEs observés pour le dérivé **49**. Les NOEs en rouge démontrent la conformation *s-cis*, en bleu, la proximité des cycles quinoléine et phényle et en vert, la conformation coudée de la molécule.



Spectre 24 : NOESY du dérivé **49** dans CDCl_3 à 280 K avec un temps de mélange de 0,3s.

Les NOEs (cercle plein) et l'absence de NOE (cercle en trait pointillé) démontrent la conformation *s-cis* (en rouge), la proximité des cycles quinoléine et phényle (en bleu) et la conformation coudée de la molécule (en vert).

La présence d'un NOE entre les protons H25 du groupement méthyle porté par l'atome d'azote N24 de la liaison amide et les protons aromatiques H29-H33 et l'absence d'effet NOE entre les protons méthyléniques H23 et les protons aromatiques H29-H33 montrent que la liaison amide adopte une conformation *s-cis* en solution, comme observée à l'état cristallin.

Comme pour le dérivé **6** de la FQ, la molécule adopte une conformation coudée. Des NOEs similaires à ceux observés pour le dérivé **6** ont été détectés (H12a (pro-*S*)-H23a (pro-*R*), H23b (pro-*S*)-H25, H12b-H23b). Un NOE supplémentaire entre les protons H5 et H29-H33 peut également démontrer la proximité du groupement phényle et du cycle quinoléine et suppose la présence de la liaison hydrogène intramoléculaire.

Nous pouvons également observer un fort déblindage du déplacement chimique du proton H23a de 2 ppm par rapport aux dérivés aminés de la FQ. Les déplacements chimiques dépendent des angles de torsion de la molécule. Sur la figure 25, nous pouvons constater que la molécule duale **49** a des angles de torsion différents de la molécule **6**, dérivé amine secondaire de la FQ. Les deux molécules forment une liaison hydrogène intramoléculaire. Pour la molécule **49**, la liaison hydrogène forme un pseudo-cycle à 9 centres tandis qu'un pseudo-cycle à 7 centres est formé dans la molécule **6**. Les deux conformations n'ont par conséquent pas la même rigidité et le cycle quinoléine et le ferrocène de chaque molécule s'orientent ainsi différemment dans les deux structures. Le fort déblindage du déplacement chimique du proton H23a peut également être dû, en partie, à l'effet anisotropique du groupement carbonyle de la liaison amide. Il est à noter que ce déblindage n'est pas lié à un artéfact étant donné que cet effet est rencontré pour toutes les molécules duales présentant une liaison amide quelque soit le groupement en position α de la fonction carbonyle (voir partie expérimentale).

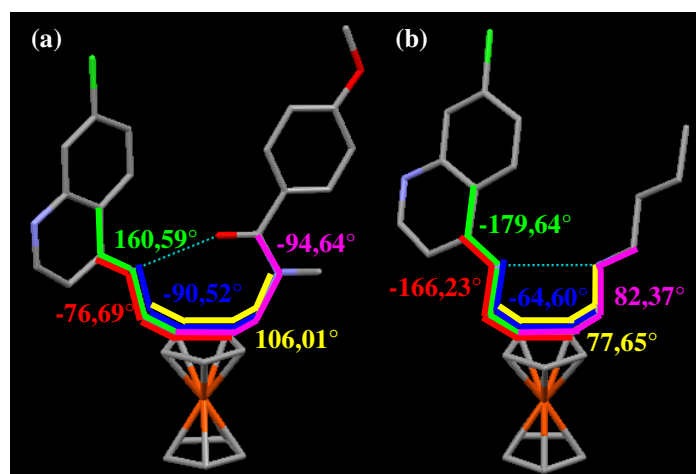


Figure 25 : Angles dièdres de la molécule duale **49** (a) et de l'analogue court de la FQ **6** (b).

II.5. Inhibition de la formation de β -hématine

	composé	inhibition max. (%) (rapport inhibiteur:hématine)	CI ₅₀
Molécules duales	33	79 (0,25:1)	0,2
	38	87 (0,75:1)	0,5
	45	86 (0,25:1)	0,2
	51	79 (0,5:1)	0,2
Référence	CQ	89 (3:1)	1,9
	AQ	100 (1,5:1)	0,7
	FQ	86 (0,75:1)	0,4

Table 26 : Inhibition *in vitro* de la β -hématine par les molécules duales **33**, **38**, **45** et **51** dans le DMSO.

Les molécules duales les plus actives de chaque série (composés **33**, **38**, **45** et **51**) ont été testées pour leur aptitude à inhiber la formation de la β -hématine, la forme synthétique de l'hémozoïne (table 26).^{47,48} Comme pour les dérivés de la FQ, nous avons utilisé une version légèrement modifiée du test du Pr. Egan (voir chapitre II).⁴⁹ Du fait de leur faible solubilité dans le méthanol, les molécules duales ont été dissoutes dans le DMSO. L'interprétation des résultats est la même que pour les dérivés de la FQ (voir chapitre II). Les meilleurs inhibiteurs sont les composés qui ont les meilleurs pourcentages d'inhibition à un rapport inhibiteur : hématine faible accompagnés d'une faible valeur de CI₅₀. Prenant en compte tous ces paramètres, nos molécules duales montrent une bonne inhibition de la formation de la β -hématine (% inhibition supérieur à 79 %, rapport inhibiteur : hématine inférieur à 1 et CI₅₀ inférieure à 0,5). Ces molécules duales ont un profil d'inhibition similaire à la FQ et ses dérivés aminés à savoir un profil en cloche. On observe un maximum d'inhibition suivi d'une diminution voire une non-inhibition de la formation de la β -hématine (figure 27). Comme pour les dérivés de la FQ, deux hypothèses peuvent être faites. Soit les molécules ont un mode d'inhibition différent de celui de l'AQ, qui présente un profil sigmoïdal, soit les molécules s'agrègent à forte concentration (voir chapitre II).⁴⁴ De telles courbes en cloche ont également été observées récemment pour ce test de la β -hématine avec des molécules duales purement organiques associant l'inhibiteur de GR M₅ et un analogue de la CQ.¹⁰

⁴⁷ Bohle et al. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 713-716.

⁴⁸ Egan, T.J.; Hempelmann, E.; Mavuso, W.W. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, 73, 101-107.

⁴⁹ Ncokazi, K.K.; Egan, T.J. *Anal. Biochem.* **2005**, 338, 306-319.

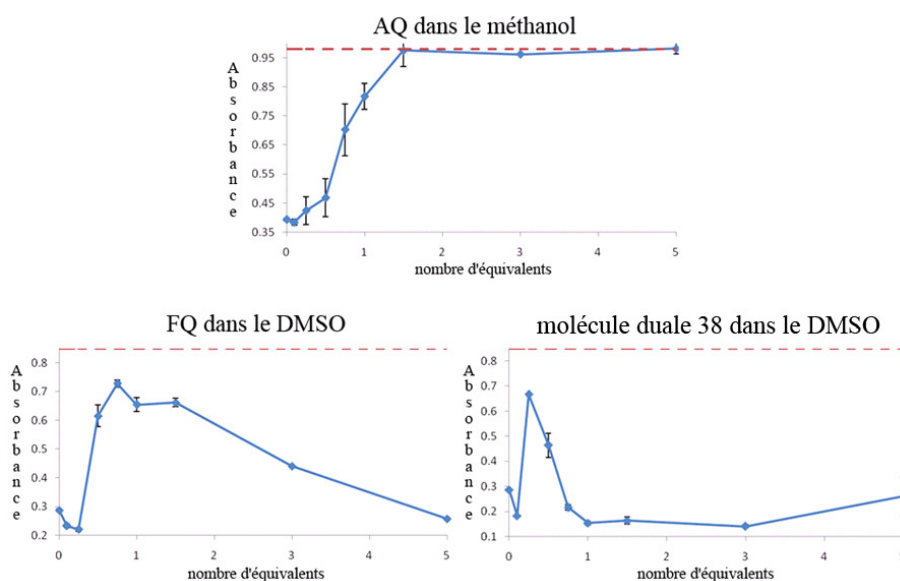


Figure 27 : Exemples de courbes d'inhibition de la β -hématine.

II.6. Inhibition de la glutathion réductase de *P. falciparum*

Etant donné que l'activité antipaludique des molécules duales est inférieure à celle des dérivés aminés de la FQ, aucune étude de déplétion en thiol chez le parasite n'a été réalisée car c'est une méthodologie lourde qui est difficile à mettre en place. Nous avons quand même testé la FQ et la molécule duale **33** pour leur aptitude à inhiber la *PfGR*. Ces tests ont été effectués au Biochemie Zentrum Heidelberg. L'inhibiteur de GR **M₅** a été pris comme référence : une valeur de CI_{50} de 4,5 μ M est obtenue dans le test de réduction de 1 mM de GSSG en présence de 100 μ M de NADPH. Pour la FQ seule, aucune inhibition n'a été observée, la valeur de CI_{50} est supérieure à 100 μ M. Pour la molécule duale **33**, une légère inhibition est observée avec une CI_{50} de 25 μ M. Il est à noter qu'à forte concentration, un problème de solubilité de cette molécule a été rencontré. Lorsque que l'inhibiteur **M₅** est couplé à un dérivé de la FQ par une liaison covalente, il perd sa capacité à établir des liaisons ioniques entre son groupement acide carboxylique et les arginines du site actif. Ces résultats sont en accord avec ce que nous pouvions prédire. En effet, nos molécules agissent comme des prodrogues. Il faut donc qu'elles soient clivées pour observer l'activité des deux parties actives. Lors du test *in vitro*, la molécule n'est pas clivée, l'inhibiteur **M₅** n'est pas libéré et par conséquent, la GR ne peut pas être inhibée.

II.7. Etude métabolique qualitative des molécules duales

Lors du test de la β -hématine avec nos molécules duales, nous avons observé la formation d'un précipité vert qui n'était pas observable avec l'AQ par exemple. Nous avons

essayé de cristalliser ce précipité afin d'identifier la structure du produit formé lors de ce test mais cela fût sans succès. Nous avons donc jugé intéressant d'analyser le surnageant du test par HPLC. Dans le surnageant, il ne reste pas uniquement la molécule duale qui n'a pas interagit avec l'hématine mais également des produits de clivage et de dégradation. Il a été alors nécessaire de caractériser les produits de clivage libérés. Nous avons par conséquent, fait une étude du métabolisme de nos molécules duales. Cette étude devrait nous aider à mieux comprendre pourquoi nos dérivés aminés de la FQ montrent une meilleure activité sur les différents clones de *P. falciparum* et pourquoi nos valeurs de CI_{50} du test de la β -hématine ne corrèlent pas avec les valeurs de CI_{50} chez le parasite. Il est à noter que le Pr. Egan ainsi que le Pr. Roepe avaient déjà observé qu'il n'y avait pas de relation entre les valeurs de CI_{50} du test de la β -hématine et celles chez le parasite.^{50,51} Cette étude métabolique a été réalisée au Biochimie Zentrum Heidelberg. Les conditions établies dans cette étude miment au mieux les conditions de la vacuole digestive : l'étude a été réalisée en présence d'hématine et de H_2O_2 à pH 5. Cette étude a été réalisée avec une molécule de chaque série (molécules duales **33** et **51**).

Afin d'observer l'influence de chaque paramètre, nous les avons introduit pas à pas dans l'étude métabolique. Nous avons tout d'abord évalué l'influence de la valeur du pH qui a été fixée à 5 comme dans la vacuole digestive du parasite. Puis, nous avons montré l'importance de la présence d'hématine comme catalyseur d'oxydation. Finalement, l'addition de H_2O_2 reproduit le plus parfaitement les conditions de la vacuole digestive du parasite.

II.7.1. Influence du pH

A pH 5, sans hématine et sans H_2O_2 , le clivage de la molécule duale **51** est observé. Après 17h d'incubation à 37°C, lorsque l'on injecte le milieu réactionnel en HPLC, on observe un pic supplémentaire sur le chromatogramme à un temps de rétention de 15,12 min, caractéristique de l'acide méthoxybenzoïque. Ce clivage et par conséquent, la libération de l'acide méthoxybenzoïque, explique probablement la diminution d'activité de cette série de molécules duales. Comme nous l'avons vu plus haut au paragraphe II.3, notre série a été conçue et synthétisée avant que le Pr. Egan montre que les acides benzoïques favorisaient la formation de β -hématine.⁴³ Les deux parties ont une activité antagoniste : la formation de la β -hématine est probablement favorisée par rapport à son inhibition.

⁵⁰ Egan et al. *J Med. Chem.* **2004**, 47, 2926-2934.

⁵¹ Natarajan et al. *J. Med. Chem.* **2008**, sous presse.

Pour la molécule duale **33**, on observe également un clivage de la molécule à pH 5 avec libération de **M₅** (temps de rétention de 18,14 min). La libération de **M₅** explique en partie la meilleure activité antipaludique de cette série de molécules duales. La diminution d'activité par rapport aux dérivés aminés de la FQ correspondants est probablement due au haut poids moléculaire de cette série (supérieur à 700 g.mol⁻¹) et à un nombre de donneurs de liaisons hydrogène trop élevé (9 au lieu de 5). Ces caractéristiques empêcheraient le bon transport de ces molécules.

II.7.2. Influence de la présence de β -hématine

La présence d'hématine seule ne semble pas avoir d'influence sur le clivage de **51** lorsque l'on maintient le pH à 5 et la température à 37°C. Nous obtenons le même clivage avec ou sans hématine. Pour le composé **33**, nous observons un effet catalytique dû à la présence d'hématine. Sans hématine, on observe le clivage de la molécule mais aucun produit de dégradation n'est observé (pic résiduel au temps de rétention de 20,10 min caractéristique du composé **33**). Avec l'hématine, il y a formation d'un précipité vert et l'injection du surnageant en HPLC montre la dégradation de cette molécule. Aucun pic résiduel de **33** n'est observé (disparition du pic à 20,10 min) et aucun nouveau produit n'a pu être détecté (pas de pic majoritaire supplémentaire)

II.7.3. Influence de la présence de H₂O₂

En présence de H₂O₂ sans hématine, on observe que le clivage de la molécule **51** est plus marqué et s'accompagne de la dégradation de la molécule. On observe une disparition totale de la molécule duale sans libération d'acide benzoïque lorsque l'on réalise l'expérience dans les conditions de la vacuole digestive (pH 5, hématine, H₂O₂, à 37°C). L'hématine semble accélérer le clivage ainsi que le processus de dégradation. Il est bien connu que les porphyrines catalysent les réactions d'oxydation. Constantino et *coll.* ont montré que les benzamides tertiaires pouvaient être oxydés par des porphyrines en présence de peroxydes.⁵² Bazin et *coll.* ont également utilisé une porphyrine pour mimer les conditions d'oxydation biologiques.⁵³ De manière plus particulière, l'hématine est connue pour catalyser la réaction de Haber-Weiss. En effet, Greene a montré l'activité catalytique et peroxydative de l'hème.⁵⁴ Différents mécanismes ont été proposés pour la réaction entre des protéines contenant de l'hème et des hydroperoxydes organiques. Van der Zee et *coll.* ont utilisé la spectroscopie à

⁵² Constantino, L.; Iley, J. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1894-1900.

⁵³ Bazin et al. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2007**, 70, 354-359.

⁵⁴ Green, M.D.; Xiao, L.; Lal, A.A. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, 83, 183-188.

résonance paramagnétique électronique (RPE) pour mettre en évidence la formation de radicaux dans un système hématine/tert-butyl hydroperoxide.⁵⁵

En ce qui concerne la molécule **33**, en présence de H₂O₂, on observe également la dégradation de la molécule duale qui est accentuée par la présence d'hématine. On observe une disparition totale de la molécule accompagnée par l'apparition d'un nouveau produit à un temps de rétention de 12,43 min.

La même réaction a été réalisée avec la FQ afin de voir si ces observations sont propres à nos molécules duales ou si elles sont dues à la présence de la partie dérivée de la FQ. En présence d'hématine uniquement, nous n'observons aucune dégradation ni oxydation de la FQ. En présence de H₂O₂ uniquement, il n'y a pas de déplacement du temps de rétention. En revanche dans les conditions de la vacuole digestive (pH 5, hématine, H₂O₂, à 37°C), on observe la disparition de la FQ (temps de rétention de 13,20 min) et la formation d'un nouveau produit (temps de rétention de 12,43 min) au bout d'une heure de réaction. Le produit formé semble être le même que lors de la réaction avec le composé **33**. La dégradation ou oxydation de la molécule duale **33** semble être due à la présence de la partie dérivée de la FQ étant donné que l'on observe un pic au même temps de rétention avec la FQ.

Afin de caractériser le composé produit lors de cette réaction de dégradation de la molécule duale **33** et de la FQ, des expériences de RMN et de spectrométrie de masse sont en cours.

II.8. Conclusion

Nous avons synthétisé 3 nouvelles séries de molécules duales associant des inhibiteurs de GR ou dépléteurs de GSH à un dérivé de la FQ par une liaison amide ou amine. Les molécules avec un lien amide présentent une bonne activité antipaludique sur les clones CQ-sensibles et CQ-résistants de *P. falciparum*. Cependant, les dérivés de la FQ correspondants restent plus actifs que ces molécules duales. En revanche, les molécules avec un lien amine sont inactives. Une étude RMN et la résolution de la structure cristalline du composé **49** montre que lorsque la molécule duale possède une fonction amide, il y a formation d'une liaison intramoléculaire entre l'oxygène de cette fonction et l'amine en position 11. La molécule se trouve sous une conformation coudée. La caractérisation du dérivé **49** montre également que seule la conformation *s-cis* de la liaison amide est synthétisée.

⁵⁵ Van der Zee, J.; Barr, D.P.; Mason, R.P. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, 20, 199-206.

Nous nous sommes intéressés à la compréhension du mécanisme d'action de ces molécules duales. Comme la FQ et ses dérivés, les molécules duales inhibent la formation de l'hémozoïne. Comme pour la FQ, nous avons obtenu des courbes d'inhibition présentant un maximum puis une diminution d'inhibition ou non-inhibition qui peut être expliqué soit par un mécanisme d'action différent de celui de l'AQ, soit par une agrégation des molécules à forte concentration. En revanche, nos molécules duales n'inhibent pas beaucoup la GR. Cela est dû au fait que la fonction carboxylique de l'inhibiteur, nécessaire pour l'activité, est impliquée dans la liaison amide. Afin d'expliquer la diminution d'activité de nos molécules duales par rapport aux dérivés de la FQ correspondants, une étude métabolique a été également réalisée dans les conditions oxydantes de la vacuole digestive (pH 5, H₂O₂, hématine, 37°C). A pH 5 uniquement, dans le cas des molécules duales de la série B mettant en jeu un acide benzoïque comme dépléteur de GSH, le clivage de ces molécules libère l'acide carboxylique ce qui explique la diminution d'activité de cette série. Dans le cas des molécules duales de la série A mettant en jeu des naphtoquinones, il y a libération de **M₅** qui est connu comme étant un bon inhibiteur de la GR. Ceci explique probablement la meilleure activité antipaludique de cette série. Lorsque l'on ajoute H₂O₂ et de l'hématine dans le milieu, on observe des produits de dégradation de nos molécules. On observe que l'hématine catalyse les réactions d'oxydation étant donné que la dégradation est plus marquée en présence d'hématine. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour identifier ces produits de dégradation/oxydation.

III. Molécules duales basées sur des bases de Mannich

III.1. Introduction

L'activité biologique des bases de Mannich a été attribuée par la libération de cétones α,β -insaturées.^{56,57} Ces cétones réagissent probablement avec les groupements thiols des organismes vivants pour donner des β -cétothioesters. Des études *in vitro* ont montrées que les bases de Mannich réagissaient avec le GSH en présence de glutathion *S*-transférase (GST).^{58,59} Dimmock et *coll.* ont montré que les bases de Mannich des cétones styryles conjuguées inhibaient une ou plusieurs des enzymes de la voie métabolique du GSH, la GST,

⁵⁶ Dimmock et al. *J. Pharm. Sci.* **1992**, 81, 1147-1152.

⁵⁷ Erciyas et al. *J. Pharm. Sci.* **1994**, 83, 545-548.

⁵⁸ Sexton et al. *Biochem. Cell. Biol.* **1993**, 71, 98-101.

⁵⁹ Dimmock et al. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 1014-1026.

la GR, la γ -glutamyle transpeptidase et la glutathion peroxydase chez *Candida albicans*.⁶⁰ Les bases de Mannich sont donc de bons inhibiteurs des thioenzymes.

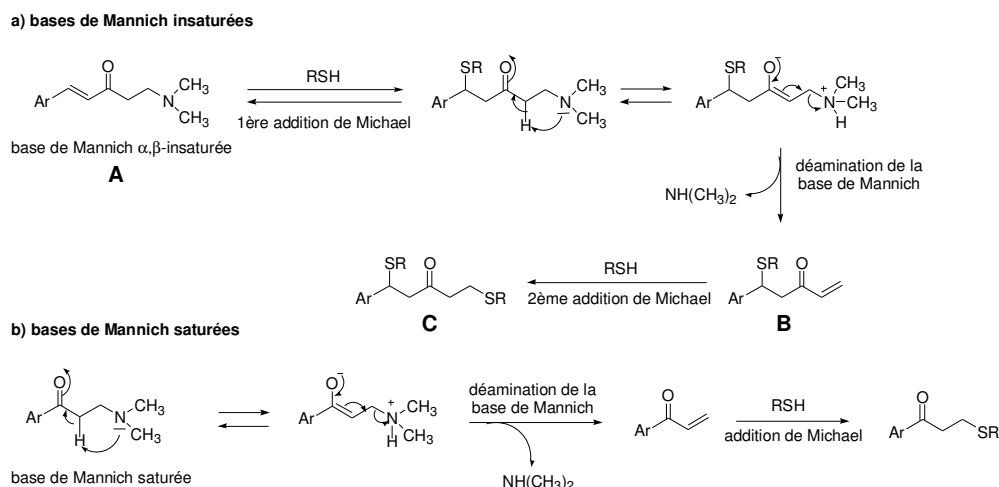


Schéma 28 : Mécanisme d'action proposé des bases de Mannich insaturée et saturée. Attaque nucléophile de thiols. (Ar = groupement aryle).

Le criblage de 350 000 molécules de la chimiothèque Parke-Davis a identifié les bases de Mannich comme nouvelle classe d'inhibiteurs de la thioredoxine réductase (TrxR) de *P. falciparum*.⁶¹ La TrxR est une flavoenzyme homodimérique qui catalyse la réduction de la thiorédoxine oxydée. Pour *P. falciparum*, la TrxR est une protéine essentielle qui est validée comme cible pharmacologique.^{62,63} Les structures de bases de Mannich insaturées (structure A, schéma 28) suggèrent qu'elles agissent comme agents bialkylants dont la structure (structure C, schéma 28) met en jeu les deux cystéines C-terminales de la TrxR. Pour confirmer cette hypothèse, Davioud-Charvet et *coll.* ont synthétisé différentes bases de Mannich possédant un ou deux centres électrophiles et dans lesquelles le pKa de l'amine partante est varié. Le mécanisme d'action de ces composés a été étudié en détail en utilisant le GSH comme modèle thiol.⁶¹ L'addition de Michael (addition en 1,4) du GSH sur la double liaison d'une base de Mannich insaturée a lieu à pH physiologique. L'élimination base-dépendante du groupement amine suite à l'énolisation de la cétone, catalysée par la présence du groupement dialkylamine en position β de la cétone, libère un nouveau centre électrophile pouvant être attaqué par un second nucléophile. L'intermédiaire formé lors de cette réaction est une cétone α,β -insaturée (structure B, schéma 28) qui peut réagir rapidement avec un

⁶⁰ Dimmock et al. *J. Pharm. Sci.* **1984**, 73, 471-477.

⁶¹ Davioud-Charvet et al. *Biochemistry*. **2003**, 42, 13319-13330.

⁶² Becker et al. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 6118-6125.

⁶³ Krnajsli et al. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 25970-25975.

second thiol. Dans le cas des bases de Mannich saturées, une seule addition de Michael a lieu (Schéma 28).

Comme nous l'avons mentionné au chapitre I, la vacuole digestive du parasite est le lieu de la digestion de l'hémoglobine de l'hôte qui conduit à la libération de grandes quantités d'hème libre. En présence d'espèces oxygénées réactives, l'hème libéré peut catalyser des réactions d'oxydation, en particulier avec les amines tertiaires. La *N*-désalkylation des molécules actives est connue pour contribuer à l'activité biologique et aux effets toxiques de ceux-ci.⁶⁴ Cette bioactivation peut être utilisée pour concevoir des molécules prodrogues.¹⁵ Basé sur ces hypothèses et le fait que les porphyrines catalysent les réactions de *N*-désalkylation,⁶⁵ le but de notre travail est de concevoir des nouvelles molécules duales basées sur des amino-4-quinoléines dont la chaîne aminée latérale est substituée par une base de Mannich aliphatique.

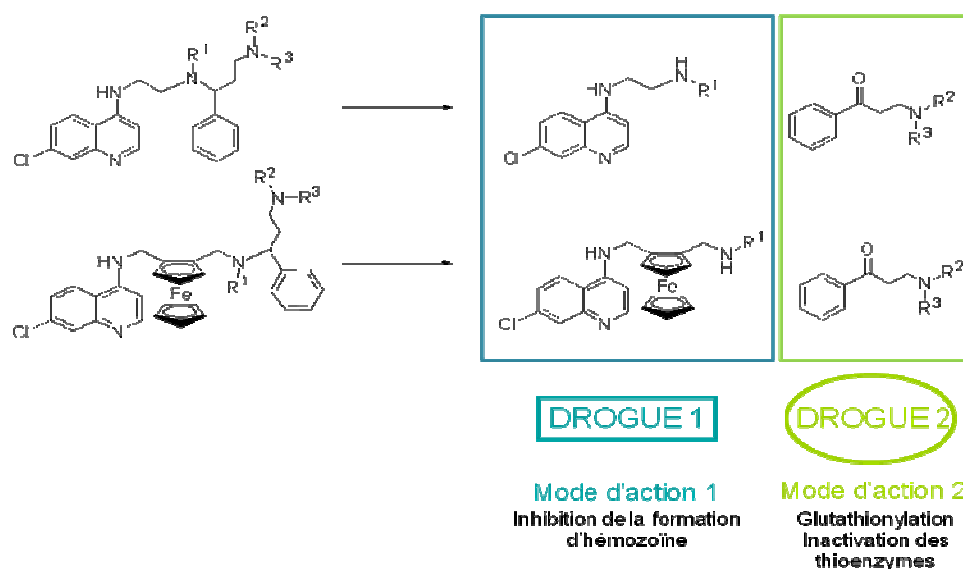


Schéma 29 : Clivage métabolique potentiel des molécules duales basées sur des bases de Mannich par *N*-désalkylation oxydative.

Pour mener à bien ce projet, une collaboration a été établie entre l'équipe du Dr. Davioud-Charvet à Heidelberg qui a initié le travail avec les bases de Mannich comme inhibiteurs de disulfure réductases et notre équipe à Lille pour ses compétences en chimie bioorganométallique et ses connaissances sur la FQ. Nos molécules duales sont supposées entrer dans la vacuole digestive du parasite par reconnaissance du motif amino-4-quinoléine. Le clivage oxydatif dans la vacuole digestive de ce type de composés devrait générer deux

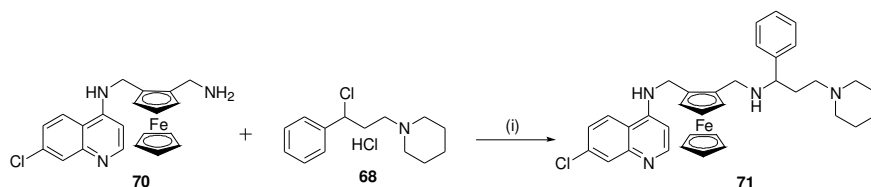
⁶⁴ Bernadou, J.; Meunier, B. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, 346, 171-184.

⁶⁵ Meunier, B.; de Visser, S. P.; Shaik, S. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 3947-3980.

composés actifs, un analogue court de la CQ ou de la FQ et une base de Mannich saturée (schéma 29). Une modulation de l'attaque du thiol, après *N*-désalkylation oxydative, peut être réalisée par modification de la valeur de *pK*_a du groupe amine de la base de Mannich en amenant de la diversité structurale sur cette amine, en variant les substituants sur le groupement phényle et en variant les substituants sur la liaison amine entre les deux parties actives.

III.2. Synthèse des molécules duales

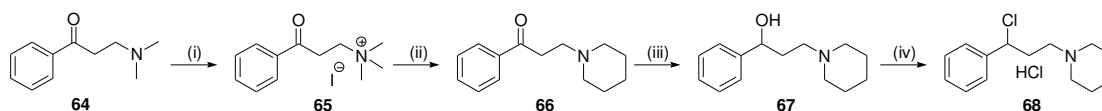
Deux séries de molécules duales basées sur les bases de Mannich ont été synthétisées : deux molécules purement organiques à Heidelberg par W. Friebolin et N. Wenzel et une molécule duale ferrocénique dans notre laboratoire. Seule la synthèse de la molécule duale ferrocénique sera décrite dans ce manuscrit.



(i) NEt₃, EtOH.

Schéma 30 : Synthèse de la molécule duale **71**.

Après avoir essayé différentes voies de synthèse (aminations réductrices, substitutions nucléophiles), la molécule duale **71** a été synthétisée avec succès en effectuant une réaction de substitution nucléophile du chlorhydrate de 1-(3-chloro-3-phénylpropyl)pipéridine **68** par la 7-chloro-4-[2-(aminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]-quinoléine **70** dans l'éthanol à température ambiante avec un rendement non optimisé de 6 % (schéma 30).

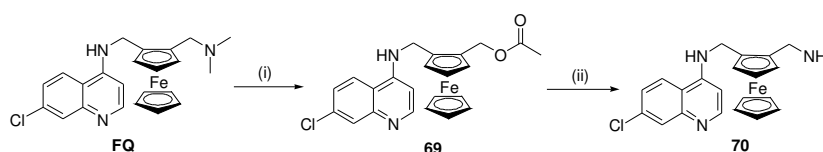


(i) CH₃I, acétone ; (ii) pipéridine, K₂CO₃, CH₃CN, reflux ; (iii) NaBH₄, MeOH ; (iv) SOCl₂, CH₂Cl₂ anh., 60°C.

Schéma 31 : Synthèse du chlorhydrate de 1-(3-chloro-3-phénylpropyl)pipéridine.

Le chlorhydrate de 1-(3-chloro-3-phénylpropyl)pipéridine **68** est synthétisé en 4 étapes à partir de la 3-diméthylamino-1-phénylpropan-1-one **64** (schéma 31). Dans un premier temps, la diméthylamine en position β de la cétone est quaternisée à l'aide d'iodure de méthyle dans

l'acétone à température ambiante. Le groupement ammonium est ensuite substitué par la pipéridine dans l'acétonitrile à reflux pour donner la 1-phényl-3-(pipéridin-1-yl)propan-1-one **66**. La cétone est réduite en alcool par le borohydrure de sodium dans le méthanol à température ambiante et finalement, l'alcool **67** est substitué par un chlore en présence de chlorure de thionyle dans le dichlorométhane anhydre durant 8 heures à 60°C pour donner le chlorhydrate de 1-(3-chloro-3-phénylpropyl)pipéridine **68** avec un rendement global non optimisé de 3 % en quatre étapes. L'étape limitante est la dernière étape. En effet, le chlorhydrate **68** n'est pas stable à haute température. Si la dernière étape est réalisée à une température légèrement supérieure à 60°C, le chlorhydrate **68** se dégrade par β -H élimination.



(i) (AcO)₂O, 90°C ; (ii) NH₄OH, CH₃CN, 60°C.

Schéma 32 : Synthèse du 7-chloro-4-[2-(aminométhyl)-N-ferrocénylméthylamino]quinoléine.

La 7-chloro-4-[2-(aminométhyl)-N-ferrocénylméthylamino]quinoléine **70** est obtenue en 2 étapes à partir de la FQ (schéma 32). La FQ est tout d'abord acétylée par l'anhydride acétique à 90°C pendant 5 minutes. L'acétate **69** formé est ensuite substitué par de l'ammoniac dans l'acétonitrile à 60°C pendant 3 heures pour donner l'amine primaire **70** avec un rendement quantitatif. Les formules chimiques des molécules duales purement organiques **72** et **73** sont données en figure 33.

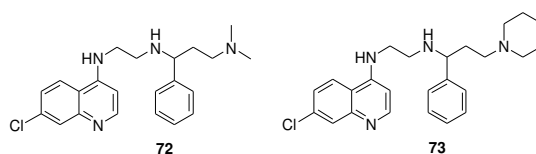
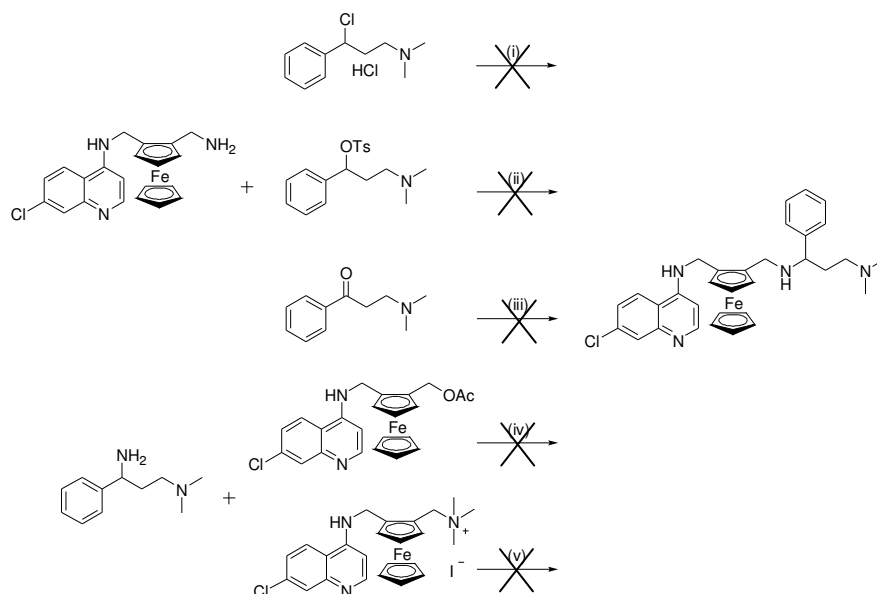


Figure 33 : Structure des molécules duales organiques **72** et **73**.

Il est à noter que de nombreuses voies de synthèse ont été explorées sans succès pour la synthèse du dérivé ferrocénique analogue de la molécule **72** présentant un groupement diméthylamine sur la partie base de Mannich. Nous avons obtenu des produits de dégradation ou récupéré les produits de départ n'ayant pas réagi. Le schéma 34 récapitule les principales tentatives que nous avons réalisées pour la synthèse de ce composé. Il est à noter également

que nous n'avons pas encore synthétisé les molécules alkylées au niveau de l'atome d'azote liant les deux parties actives. Ces synthèses sont en cours.



(i) EtOH, NEt₃, reflux ou t.a. ; (ii) EtOH, 55°C ; (iii) CH₂Cl₂, NaBH(OAc)₃, (iv) CH₃CN, 60°C ; (v) CH₃CN, K₂CO₃, 50°C.

Schéma 34 : Différentes voies de synthèse testées pour l'obtention de l'analogue ferrocénique de la molécule duale **72**.

III.3. Activité antipaludique et cytotoxicité

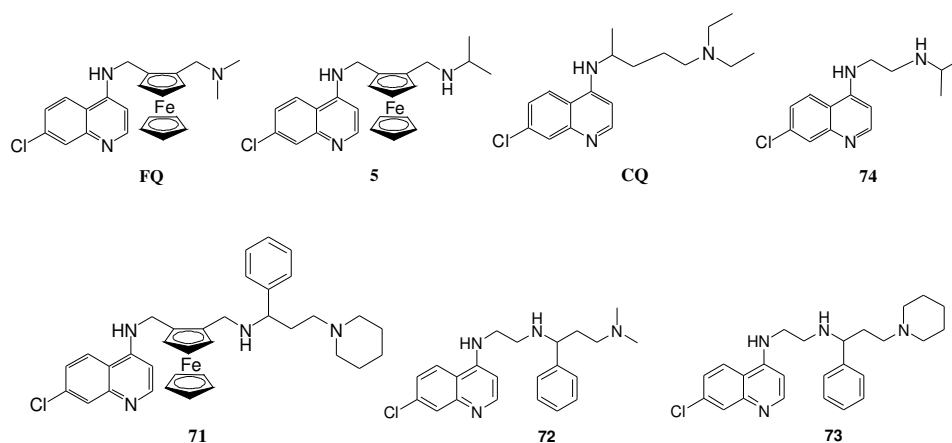


Figure 35 : Structure des molécules duales et des analogues courts testés sur *P. falciparum*.

L'activité antipaludique des composés a été testée sur des clones CQ-sensibles (NF54), légèrement CQ-résistants (K1) et CQ-résistants (Dd2) de *P. falciparum* par le Dr. Maes de l'Université d'Anvers. La cytotoxicité de ces molécules a également été testée par le Dr. Maes sur des cellules humaines de poumon MRC-5. L'activité et la cytotoxicité des molécules

duales ont été comparées avec celles de la CQ, de la FQ et des analogues courts de la CQ **74** et de la FQ **5** (toutes les structures sont données à la figure 35). Les activités et cytotoxicités sont données en table 36.

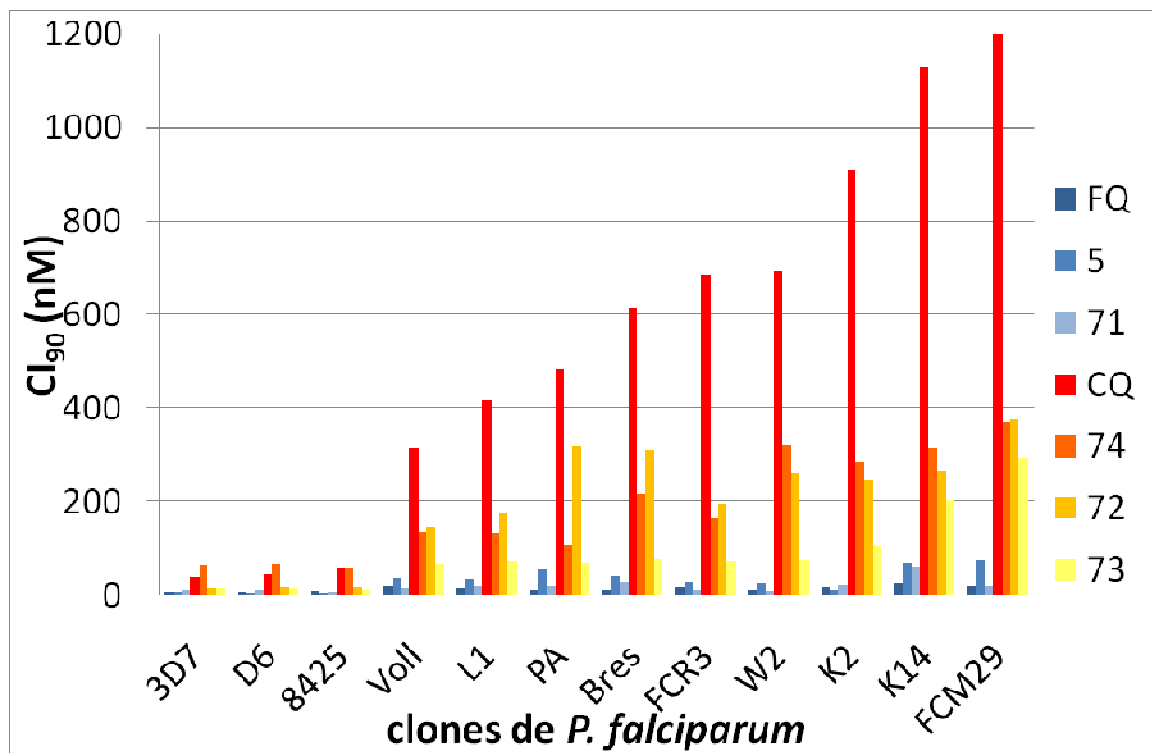
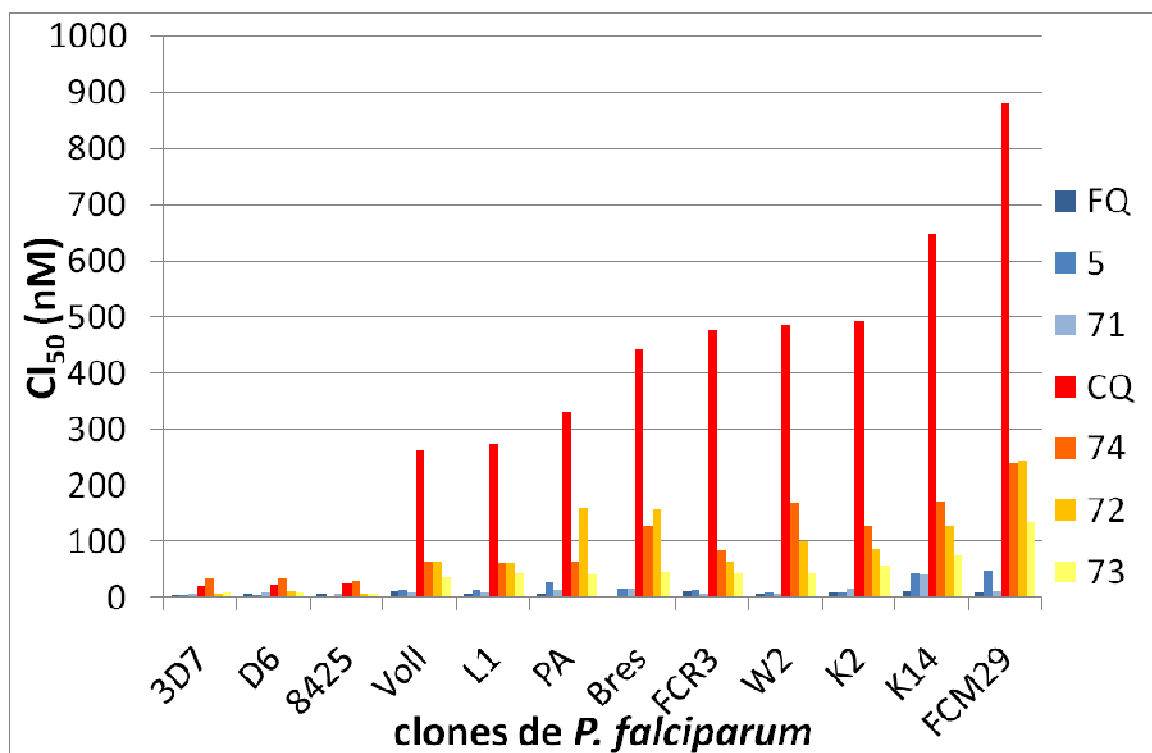
composé	CI ₅₀ NF54, nM	CI ₅₀ K1, nM	CI ₅₀ Dd2, nM	CI ₅₀ MRC-5, μ M
CQ	11,2	316,3	527,0	64,0
74	8,9	47,4	22,6	64,0
72	7,1	61,9	25,6	27,0
73	8,7	32,6	23,9	8,0
FQ	11,9	20,0	1,6	6,0
5	10,5	16,5	4,9	3,0
71	12,7	15,9	5,2	1,0

Table 36 : Activité *in vitro* sur clones de *P. falciparum* NF54, K1 et Dd2 et cytotoxicité sur cellules de poumon humaines MRC-5 des molécules duales **71-73** et des analogues courts **5** et **74**.

Toutes nos molécules présentent une bonne activité antipaludique quelle que soit la sensibilité du clone à la CQ. La série organique est légèrement plus active que la CQ sur les clones CQ-sensibles alors que la série ferrocénique a une activité du même ordre de grandeur que la CQ. En revanche, sur les clones CQ-résistants, la série ferrocénique présente une meilleure activité que la série organique, bien que cette dernière reste beaucoup plus active que la CQ (environ 5 fois plus active). Les molécules duales présentent une activité du même ordre de grandeur que leur analogue court correspondant : la molécule duale **71** présente une activité de l'ordre de 5 nM comme le dérivé aminé de la FQ **5** et les molécules duales **72** et **73** présentent une activité de l'ordre de 25 nM comme le dérivé de la CQ **74**. Bien que les activités antipaludiques soient puissantes, ces résultats suggèrent que le produit d'amination réductrice entre un analogue court de la CQ et une base de Mannich saturée n'apporte pas de gain d'activité contre *Plasmodium falciparum*.

Les molécules ont également été testées sur un large éventail de clones de *P. falciparum* plus ou moins sensibles à la CQ par le Dr. Pradines à l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées à Marseille (graphes 37). Cette étude est très intéressante car on observe que quelque soit la sensibilité du clone à la CQ, les molécules ferrocéniques (en bleu) gardent une activité constante comme la FQ. En revanche, les molécules purement organiques (en rouge), bien que restant nettement plus actives que la CQ, présentent une activité légèrement inférieure sur les clones résistants à la CQ. Une résistance croisée risque d'être développée rapidement pour les molécules purement organiques. La présence du groupement

ferrocénique semble être un caractère structural crucial pour une bonne activité sur un clone CQ-résistant (voir chapitre IV).



Graphes 37 : Représentations des valeurs de CI_{50} et CI_{90} des molécules duales **71-73** et des analogues courts **5** et **74** sur différents clones de *P. falciparum* (tableau de valeurs en annexe 3).

Bien que très actives, ces molécules présentent malheureusement une forte cytotoxicité sur les cellules MRC-5. Les molécules les plus cytotoxiques sont les molécules les plus actives sur les clones CQ-résistants à savoir les molécules ferrocéniques. Dans la série des molécules organiques, les molécules présentant la plus forte cytotoxicité sont les molécules duales et en particulier, le composé **73**, avec le groupement pipéridine, analogue organique de la molécule duale ferrocénique **71**. On observe que la cytotoxicité de la molécule augmente lorsque l'on remplace le groupement diméthylamine par un groupement pipéridine.

III.4. Inhibition de la formation de β -hématine

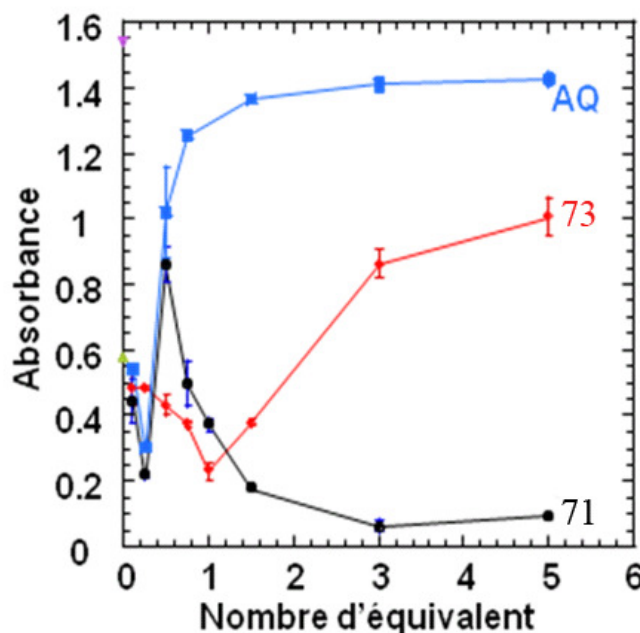
Les molécules duales **71-73** ainsi que les dérivés courts de la CQ **74** et de la FQ **5** ont été testés pour leur aptitude à inhiber la formation de β -hématine *in vitro* utilisant le protocole du Pr. Egan légèrement modifié comme décrit au chapitre II.⁴⁹

	composé	inhibition max. (%) (rapport inhibiteur:hématine)	CI ₅₀
Série organique	74	78 (3:1)	2,2
	72	68 (3:1)	2,2
	73	68 (3:1)	2,0
Série ferrocénique	5	90 (0,75:1)	0,2
	71	63 (0,5:1)	0,4
Références	CQ	73 (2:1)	1,5
	AQ	100 (1,5:1)	0,6
	FQ	72 (0,75:1)	0,3

Table 38 : Inhibition *in vitro* de la β -hématine par les molécules duales **71-73** et les analogues courts **5** et **74** dans le MeOH.

L'interprétation des résultats est la même que pour les dérivés de la FQ (voir chapitre II). Nous devons prendre en compte aussi bien les valeurs de CI₅₀ que le rapport inhibiteur : hématine nécessaire pour une inhibition maximale. Comme précédemment, nous avons pris l'AQ comme référence car elle présente la meilleure inhibition avec une CI₅₀ de 0,6 et une inhibition de 100 %. Les résultats sont donnés dans la table 38. Dans les conditions décrites précédemment, l'analogue court de la CQ **74** et la molécule duale **72** montrent un comportement d'inhibition similaire avec une valeur de CI₅₀ de 2,2 mais avec un maximum d'inhibition différent de 78 % et 68 %, respectivement. Les molécules duales avec un substituant pipéridine sur la base de Mannich (**71** et **73**) ont des valeurs de CI₅₀ de 0,4 et 2,0 avec un maximum d'inhibition de 63 % et 68 % à des rapports inhibiteur : hématine de 0,5:1 et 3:1, respectivement. La molécule duale ferrocénique semble être un meilleur inhibiteur que

la molécule purement organique. Il est à noter qu'à forte concentration, ces deux molécules n'ont pas le même profil d'inhibition. Comme pour la FQ et ses dérivés aminés (voir chapitre II), le composé ferrocénique présente une courbe d'inhibition en cloche due à une auto-aggrégation de la molécule à forte concentration⁴⁴ ou à un comportement différent de la molécule organique (graphe 39).



Grappe 39 : Courbes d'inhibition de la formation de β -hématine des composés **71** et **73** et de l'AQ.

IV. Interaction de nouvelles amino-4-quinoléines avec l'ADN

Toutes les études d'interaction de nos molécules avec l'ADN ont été réalisées au Deutsches Krebsforschungszentrum à Heidelberg sous la direction du Dr. Tóth.

IV.1. Introduction

Etant donné la forte cytotoxicité de nos composés, nous avons jugé intéressant d'étudier leur interaction avec l'ADN. Nos dérivés présentent une fonction amino-4-quinoléine susceptible de s'intercaler dans l'ADN, comme précédemment observé avec la CQ. En effet, Irvin et *coll.* ont montré en 1949 que certaines molécules antipaludiques comme les quinoléines et les acridines, interagissaient *in vitro* avec les acides nucléiques.⁶⁶ L'interaction de la CQ avec l'ADN a été montrée pour la première fois en 1952 et sa capacité à intercaler

⁶⁶ Irvin, J.L.; Irvin, E.M.; Parker, F.S. *Science*. **1949**, *110*, 426-428.

l'ADN a été largement étudiée.^{67,68,69,70,71,72} La CQ inhiberait des processus biologiques ADN-dépendants.^{73,74}

Il a été longtemps pensé que l'activité antipaludique de la CQ était due à son interaction avec l'ADN. Ce mécanisme d'action a été controversé car différentes études donnent des constantes d'association du complexe ADN-CQ différentes.^{67,68,69,70,71,72} Ces différences sont probablement dues au fait que chaque étude utilise des conditions expérimentales, des méthodes et des modèles différents. Une étude de la liaison de la CQ à l'ADN par dialyse équilibrée estime entre 0,03 et 1 % les sites de liaison de l'ADN parasite occupés par la CQ lorsque l'organisme est mis en présence de concentrations physiologiques de CQ (concentration intracellulaire de 1 à 10 μ M).⁷⁵ Une autre étude a montré que la constante de dissociation du complexe ADN-CQ varie de 27 μ M à 2,6 mM selon la force ionique de la solution tampon utilisée. La liaison de la CQ à l'ADN dépendrait donc fortement de la concentration en sel.⁷⁵

L'interaction de la CQ à l'ADN a été observée par différentes méthodes : la formation d'un complexe ADN-CQ a été détectée suite à une modification du spectre d'absorbance de la CQ,⁷⁶ sa liaison à l'ADN par dialyse équilibrée⁷⁷ et sa co-sédimentation avec l'ADN.⁷⁸ De plus, un dosage par spectrophotométrie de la CQ avec l'ADN donne 2 constantes d'association apparentes suggérant une liaison bimodale de la molécule à l'ADN.⁶⁹ La CQ augmente fortement la température de fusion T_m de l'ADN. Il a été conclu que la molécule forme un complexe avec l'ADN par une interaction ionique et stabilise l'hélice.⁷⁸ La liaison de la CQ à l'ADN mettrait en jeu des attractions électrostatiques entre le système cyclique protoné de la CQ et les groupements phosphates anioniques de l'ADN et une interaction plus spécifique mettant apparemment en jeu les cycles aromatiques de la CQ et les bases nucléotidiques.⁶⁹ Il a été montré que la CQ se lie plus préférentiellement au poly(dGdC).poly(dGdC) qu'aux autres polynucléotides synthétiques. Ces résultats suggèrent

⁶⁷ Parker, F.S.; Irvin, J.L. *J. Biol. Chem.* **1952**, *199*, 897-909.

⁶⁸ Stollar, D.; Levine, L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1963**, *101*, 335-341.

⁶⁹ Cohen, S.N.; Yielding, S.N. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 3123-3131.

⁷⁰ O'Brien, R.L.; Hahn, F.E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1965**, 315-320.

⁷¹ Blodgett, L.W.; Yielding, K.L. *Biochim. Biophys. Acta.* **1968**, *169*, 451-456.

⁷² Yielding et al. *Prog. Mol. Subcell. Biochem.* **1971**, *2*, 69-90.

⁷³ Cohen, S.N.; Yielding, K.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **1965**, *54*, 521-527.

⁷⁴ O'Brien, R.L.; Olenick, J.G.; Hahn, F.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **1966**, *55*, 1511-1517.

⁷⁵ Kwakye-Berko, F.; Meshnick, S.R. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1989**, *35*, 51-56.

⁷⁶ Parker, S.; Irvin, J.L. *J. Biol. Chem.* **1952**, *199*, 897-909.

⁷⁷ Stollar, D.; Levine, L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1963**, *101*, 335-341.

⁷⁸ Allison, J.-L.; O'Brien, R.L.; Hahn, F.E. *Science.* **1965**, *149*, 1111-1113.

que l'activité antipaludique de la CQ serait due à son effet sur l'ADN parasite.⁷⁹ Cette hypothèse a été ensuite abandonnée car l'interaction de la CQ avec l'ADN est observable uniquement à de fortes concentrations en CQ, supérieures à la dose active, et l'ADN de *P. falciparum* contient plus de 70% d'AT,⁸⁰ et devrait présenter certainement moins de sites potentiels d'interaction avec la CQ. De plus, comme il a été précédemment décrit au paragraphe II.6. du chapitre I, la CQ est connue pour s'accumuler dans la vacuole digestive et non dans le noyau.

IV.2. Evaluation de l'affinité de nouvelles amino-4-quinoléines pour l'ADN

Nos molécules duales ainsi que les analogues courts ont été évalués pour leur interaction avec l'ADN.

IV.2.1. Evaluation qualitative de l'interaction avec l'ADN

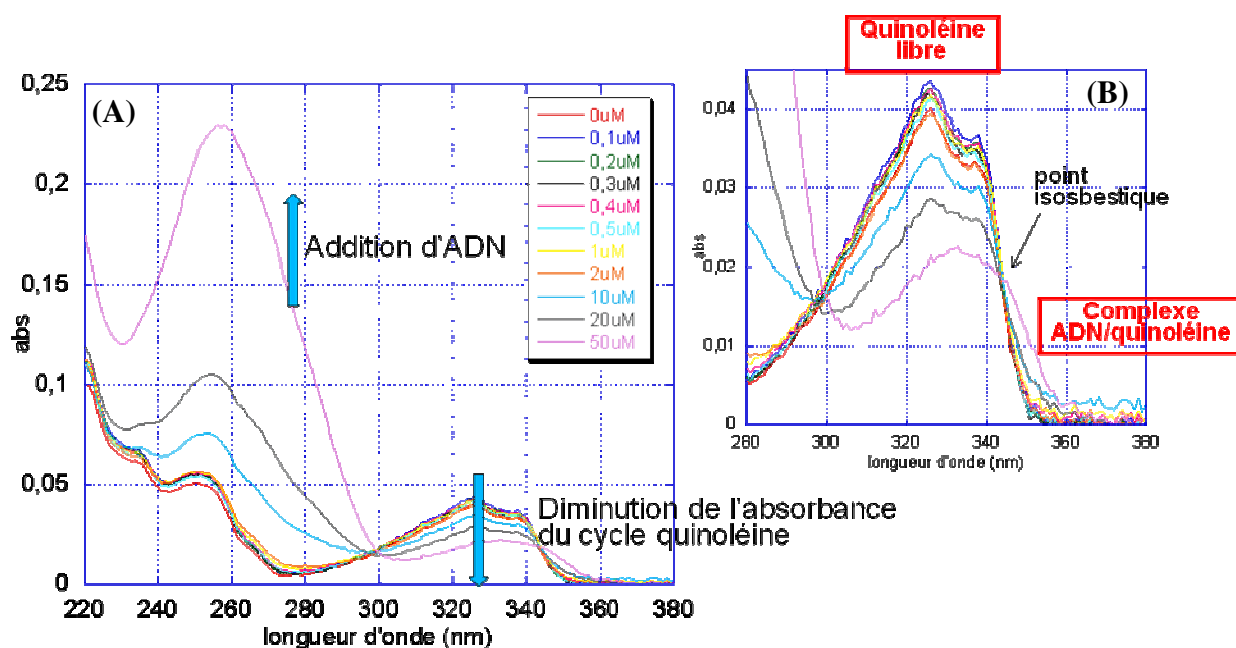


Figure 40 : (A) Spectre d'absorbance du dosage d'une solution de drogue **74** à 10 µM par une solution d'ADN, (B) zoom du spectre dans la région 280-380 nm.

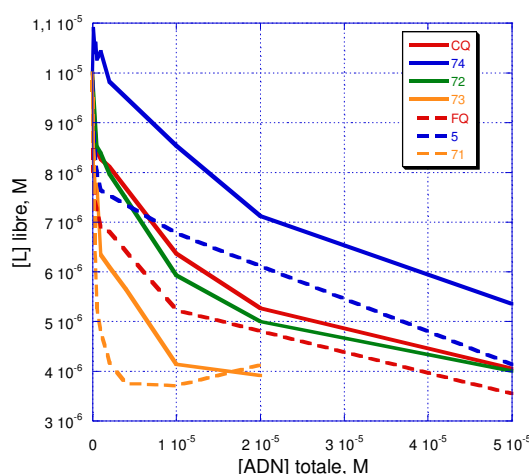
Par la suite, on considérera nos amino-4-quinoléines comme des ligands et les concentrations en ADN seront exprimées en moles de paires de base par litre. Afin d'évaluer qualitativement l'interaction de nos ligands avec l'ADN, un dosage grossier d'une solution à 10 µM de ligand par une solution d'ADN a été suivie par spectrophotométrie UV. L'ADN utilisé est de l'ADN double brin du plasmide PUC18 comprenant 2686 paires de bases et

⁷⁹ Kwakye-Berko, F.; Meshnick, S. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1990**, 39, 275-278.

⁸⁰ Pollack et al. *Nucl. Acids Res.* **1982**, 10, 539-546.

contenant 49,7 % de GC. Les mesures ont été effectuées dans une microcuvette de 50-500 μL et de trajectoire optique de 3 mm. Les solutions ont été toutes préparées dans une solution tampon de pH 7,5 contenant 10 mM de tris(-hydroxyméthyl)aminométhane et 5 mM de NaCl appelée TE. A ce pH, les ligands sont supposés être monoprotonés ou non protonés. Après chaque ajout d'ADN dans la cuvette, un spectre UV de 220 à 380 nm a été mesuré.

Lors de cet ajout progressif, nous pouvons observer une augmentation de l'absorbance de l'ADN à 260 nm, ce qui prouve bien l'ajout d'ADN. L'absorbance de la quinoléine vers 320 et 340 nm suivant la molécule diminue au fur et à mesure que l'on ajoute de l'ADN dans la cuvette (figure 40, A). Cette diminution est plus importante que la diminution d'absorbance due à l'effet de dilution. Elle est due à l'intercalation de la quinoléine avec l'ADN et s'accompagne également d'un déplacement du spectre d'absorbance de la quinoléine vers le rouge de 10 nm en moyenne (figure 40, B). Ce déplacement a déjà été observé par Cohen en 1965 pour la CQ et est caractéristique de la formation d'un complexe quinoléine/ADN.⁶⁹ Il y a formation d'un point isosbestique vers 342 nm entre le spectre d'absorbance de la quinoléine libre et celui du complexe formé entre la quinoléine et l'ADN (figure 40). A droite du point isosbestique, on observe une augmentation de l'absorbance au fur et à mesure de la formation du complexe. Toutes ces modifications spectrales ont été observées pour toutes nos amino-4-quinoléines.



Graph 41 : Concentration de ligand libre déterminée par spectrométrie UV en fonction de la concentration en ADN totale.

Afin de se rendre mieux compte de l'interaction de nos quinoléines avec l'ADN, nous avons tracé une courbe donnant la concentration en ligand libre en fonction de la concentration en ADN totale dans la cuvette. Ces courbes sont données en graphe 41.

Nous observons bien une diminution de la concentration en quinoléine libre lorsque la concentration en ADN totale dans la cuvette augmente pour toutes nos amino-4-quinoléines. Cette courbe ne permet cependant pas d'estimer la force de l'interaction. Il est donc difficile de savoir quelle molécule interagit le plus avec l'ADN. Un dosage beaucoup plus précis est utile afin de pouvoir déterminer la constante de dissociation des complexes quinoléine/ADN.

IV.2.2. Evaluation quantitative de l'interaction avec l'ADN

Pour effectuer une évaluation quantitative de l'interaction de nos amino-4-quinoléines avec l'ADN, il est nécessaire d'utiliser une technique d'analyse plus précise que la spectrophotométrie UV. La spectrofluorométrie est une technique couramment utilisée par les biophysiciens et est beaucoup plus sensible. Afin de savoir si nos molécules fluorescent suffisamment pour faire cette étude, l'émission de nos molécules à une longueur d'onde d'excitation de 320 nm (longueur d'onde à laquelle l'émission est maximale) a été mesurée. Les spectres d'émission sont donnés en figure 42. Les spectres d'émission ont été corrigés des paramètres de fluctuation de la lampe.

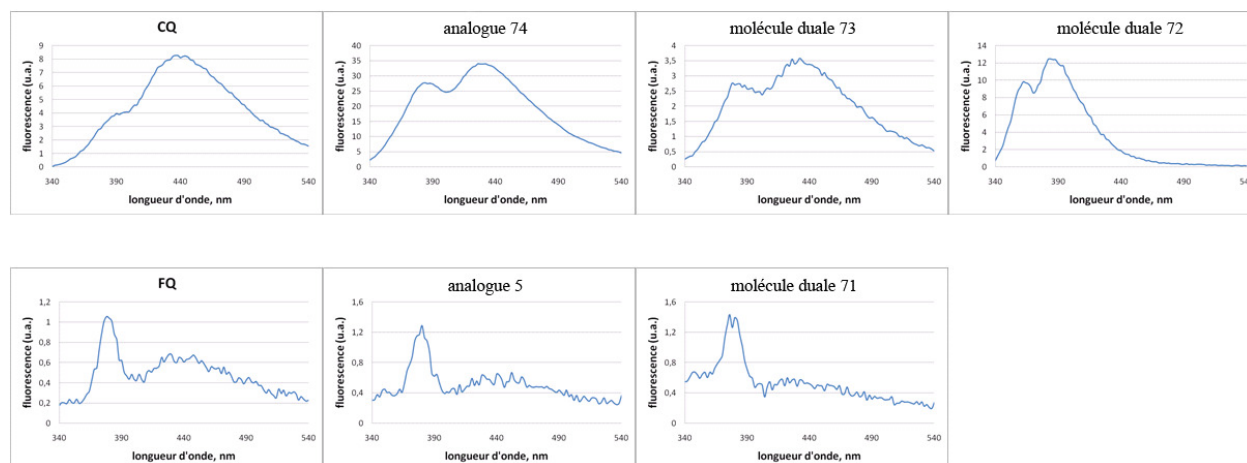


Figure 42 : Spectres d'émission des ligands (10 µM) à une longueur d'onde d'excitation de 320 nm (série organique en haut, série ferrocénique en bas).

Les molécules organiques présentent une fluorescence importante due à la présence du cycle quinoléine. Les spectres d'émission sont identiques et présentent une large bande de fluorescence autour de 430 nm et un pic autour de 380 nm qui coïncide avec la diffusion Raman de l'eau. Ce dernier dépend de la longueur d'onde d'excitation. Nous avons choisi les

conditions d'expérience (excitation à 320 nm) pour lesquelles le pic autour de 380 nm est séparé de la bande principale de fluorescence. Malheureusement, les molécules ferrocéniques ont une émission très faible, voire quasi-nulle pour la molécule duale **71**. Cette diminution de fluorescence du cycle quinoléine est probablement associée à une extinction de fluorescence (« quenching ») due à la présence du ferrocène. Du fait de cette extinction de fluorescence, un dosage plus précis par spectrofluorométrie n'est pas possible pour les dérivés ferrocéniques (figure 43). En effet, lorsque l'on introduit une solution d'ADN à une solution de ligand ferrocénique, on observe tout d'abord une augmentation de l'émission due à la relaxation de l'extinction suivie ensuite d'une diminution de l'émission due cette fois-ci, au dosage à proprement parler. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre exactement ce phénomène d'extinction de fluorescence mais cela dépasse le cadre de notre étude. Pour les dérivés organiques, en revanche, on observe une diminution progressive de l'émission avec l'ADN ajouté. Un dosage correct et précis par spectrofluorométrie est donc possible dans le cas des composés organiques (figure 43). Dans le cas des molécules ferrocéniques, nous utiliserons la spectrophotométrie UV pour évaluer quantitativement l'interaction avec l'ADN.

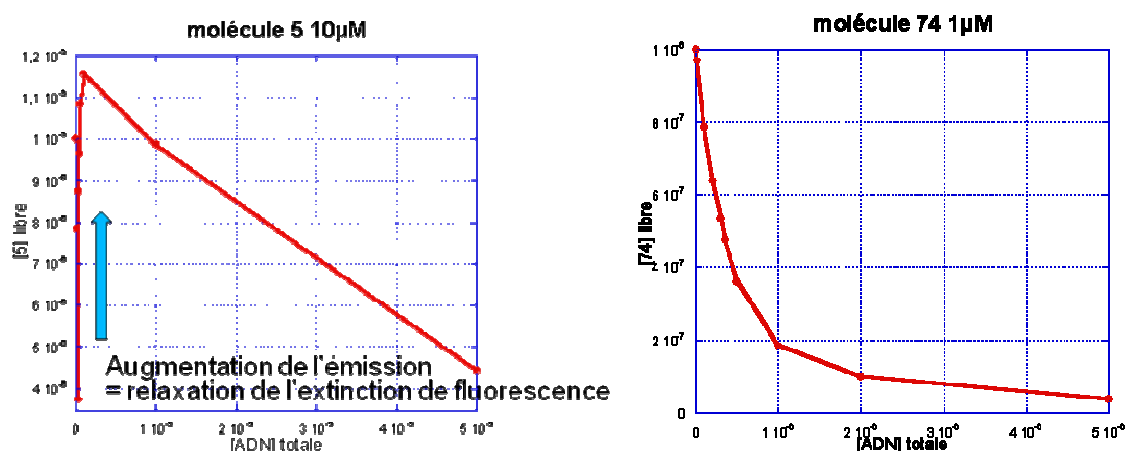


Figure 43 : Concentration en ligand libre déterminée par spectrofluorométrie en fonction de la concentration totale en ADN.

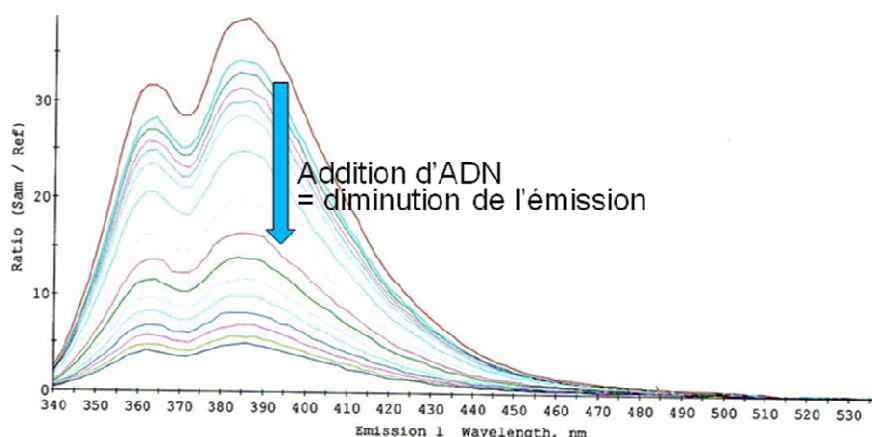


Figure 44 : Spectres d'émission du dosage d'une solution de ligand à 10 µM par une solution d'ADN.

Un dosage précis d'une solution à 10 µM de ligand par une solution d'ADN dans le tampon TE a été effectué pour tous nos ligands. Ce dosage a été suivi par spectrophotométrie UV pour les dérivés ferrocéniques et par spectrofluorométrie pour les molécules organiques. Tout comme en spectrophotométrie UV, lors de l'ajout d'ADN dans la solution de ligand, l'émission décroît (figure 44). Ceci est caractéristique d'une diminution de la quantité de ligand libre dans le milieu et par conséquent, de la formation progressive du complexe ADN/ligand.

Scatchard a développé une théorie et des méthodes d'analyse de l'interaction de grandes molécules polymériques avec des ligands.^{81,82} Lorsque $\bar{v}$ représente la quantité de ligand lié par molécule d'ADN (P) à une concentration en ligand libre de c moles par litre et n est le nombre maximum de sites de liaison par P, une constante d'association K_{ass} de l'interaction peut être exprimée par :

$$K_{ass} = \frac{\bar{v}}{(n - \bar{v}) c} \quad \text{ou} \quad \frac{\bar{v}}{c} = K_{ass} (n - \bar{v})$$

Lorsqu'un seul type de site de liaison sur l'ADN, c'est-à-dire lorsque toutes les constantes d'association intrinsèques pour tous les sites de liaison sont identiques, le tracé de $\bar{v}/c$ en fonction de $\bar{v}$ est une droite dont l'intersection avec l'axe des abscisses donne n et celle avec l'axe des ordonnées $K_{ass} \times n$. La présence de plus d'une classe de sites de liaison résulte en une incurvation du tracé $\bar{v}/c$ en fonction de $\bar{v}$ et rend la détermination de l'interaction beaucoup plus difficile. L'interaction avec des molécules de ligand liées ou l'altération des

⁸¹ Scatchard, G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1949**, 51, 660-670.

⁸² Scatchard, G.; Coleman, J.S.; Shen, A.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 12-20.

facteurs électrostatiques ou de la structure secondaire de l'ADN lors de la formation d'un complexe donne également des courbes $\bar{u}/c$ en fonction de $\bar{u}$ non linéaires. Si ces derniers facteurs ne sont pas les causes de l'incurvation, une non-linéarité peut résulter de différences d'affinité intrinsèque aux sites de liaison et une caractérisation de l'interaction peut être établie en ajustant la courbe comme décrit par Scatchard. Il est supposé que la solution obtenue n'est pas unique mais représente un set de valeurs de n et K_{ass} qui ajustent les données expérimentales.

Dans notre cas, la représentation linéaire de Scatchard n'est malheureusement pas utilisable du fait de la complexité de l'interaction de nos molécules avec l'ADN. On observe une incurvation représentant de nombreux segments de droite chacun caractéristique d'une interaction différente avec l'ADN (K_{ass} et n différents). De ce fait, partant de la définition de la constante d'association d'un ligand L à son récepteur, l'ADN dans notre cas, nous avons déterminé une relation entre la concentration en ligand libre dans la solution en fonction de la concentration totale en ADN dans cette même solution :

$$K_{ass} = \frac{[L \text{ lié}]}{[L \text{ libre}][ADN \text{ libre}]}$$

$$K_{ass}([L \text{ libre}][ADN \text{ libre}]) = [L \text{ lié}]$$

$$K_{ass}([L \text{ total}] - [L \text{ lié}])([ADN \text{ total}] - [ADN \text{ lié}]) = [L \text{ lié}]$$

$$([L \text{ total}] - [L \text{ lié}])([ADN \text{ total}] - [L \text{ lié}]) = \frac{[L \text{ lié}]}{K_{ass}}$$

$$[L \text{ total}][ADN \text{ total}] - ([L \text{ total}] + [ADN \text{ total}] + Kd)[L \text{ lié}] + [L \text{ lié}]^2 = 0$$

$$10^{-5} * \frac{[ADN \text{ total}]}{n} - \left(10^{-5} + \frac{[ADN \text{ total}]}{n} + Kd\right) [L \text{ lié}] + [L \text{ lié}]^2 = 0$$

Par résolution d'une équation de second degré, on obtient :

$$[L \text{ lié}] = \frac{1}{2} \left(\left(10^{-5} + \frac{[ADN \text{ total}]}{n} + Kd\right) \pm \left(\left(10^{-5} + \frac{[ADN \text{ total}]}{n} + Kd\right)^2 - 4 * 10^{-5} * \frac{[ADN \text{ total}]}{n} \right)^{0.5} \right)$$

Cette relation aurait dû nous permettre d'ajuster les courbes de dosage et de déterminer les constantes de dissociation Kd ainsi que le nombre de sites de liaison n . Malheureusement, l'ajustement des courbes de dosage n'est également pas simple. Nous avons pu, par

conséquent, simplement estimer les valeurs de K_d . En effet, le K_d peut être estimé en prenant la concentration totale en ADN nécessaire pour que 50 % du ligand soient intercalés (figure 45). La table 46 référence les K_d estimés par spectrophotométrie UV pour tous les ligands ainsi qu'en spectrofluorométrie pour les composés organiques.

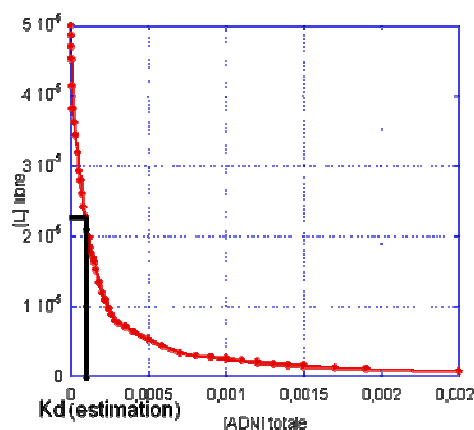


Figure 45 : Estimation graphique de la valeur de K_d .

Les valeurs de K_d indiquent que tous nos ligands ont une bonne affinité pour l'ADN. Les molécules les plus affines sont les molécules duales comprenant le groupement pipéridine **73**, **71** avec des valeurs de K_d de 1,0 et 0,2 μM respectivement. Ces résultats sont en accord avec la cytotoxicité mesurée étant donné que ces molécules duales étaient les plus cytotoxiques sur parasites et cellules humaines. Etant donné l'importance de la force ionique sur l'interaction du ligand avec l'ADN,⁶⁸ il est important de noter que nos valeurs de K_d ont été estimées à faible force ionique $\mu = 12 \text{ mM}$ à $\text{pH} = 7,5$.

Ligand	K_d par absorbance (μM)	K_d par fluorescence (μM)
CQ	7,5	9,0
74	17,5	8,0
72	7,0	8,0
73	1,0	4,0
FQ	5,0	-
5	8,0	-
71	0,2	-

Table 46 : K_d estimés par spectrophotométrie UV et spectrofluorométrie à faible force ionique ($\mu = 12 \text{ mM}$).

IV.2.3. Réversibilité de l'interaction

Nous avons souhaité observer si l'interaction de nos amino-4-quinoléines était réversible ou non. Une solution contenant 10 μM de ligand **74** ou **73** et 50 μM d'ADN a été préparée.

L'interaction du ligand avec l'ADN est immédiate. Cette solution a été ensuite dialysée. Après 1h, on observe une légère diminution de l'absorbance et de l'émission de la quinoléine qui est nulle après une nuit de dialyse. L'interaction de nos ligands avec l'ADN est réversible : nous n'observons plus que l'ADN seul après dialyse, le ligand s'étant décomplexé.

IV.3. Identification de l'intercalation comme mode d'interaction par gel d'électrophorèse

IV.3.1. Principe des gels d'électrophorèse

Etant donné que seulement deux des trois fonctions alcool du groupement phosphate sont occupées par un désoxyribose, à pH neutre, la molécule d'ADN est chargée négativement. Cette propriété est très intéressante pour réaliser des gels d'électrophorèse et ainsi séparer les brins d'ADN suivant leur taille. L'ADN migre vers la cathode du fait de sa charge nette négative. Selon la taille et la charge de l'ADN, la molécule migre plus ou moins vite sur le gel. On obtient alors des bandes pour chaque type de molécule. Les molécules les plus petites chargées négativement migrent plus vite. Le superenroulement de l'ADN donne une structure compacte à la molécule (figure 47). Plus la molécule d'ADN est superenroulée, plus elle va migrer vite sur le gel. Sur le gel d'agarose, la migration des molécules d'ADN dépend donc de la taille des monobrans mais également du degré de superenroulement de la double hélice. De ce fait, sur un gel d'agarose normal, les superenroulements négatifs et positifs ne peuvent donc pas être différenciés. Il est alors utile de faire un deuxième gel en parallèle en présence d'un intercalant d'ADN, la CQ par exemple (que l'on appellera gel de CQ par la suite), qui modifie la topologie de l'ADN et permet ainsi de différencier les superenroulements positifs et négatifs de l'ADN. La densité de superhélicité est proportionnelle à la concentration d'intercalant introduit dans le gel d'agarose. Dans le cas d'une molécule d'ADN sous forme relaxée, la présence de l'intercalant va donner un superenroulement positif à l'ADN. Lorsque l'ADN est sous forme de superhélice négative, l'introduction d'un intercalant dans le gel va désenrouler l'ADN. Lorsque l'ADN est sous forme de superhélice positive, on obtient un superenroulement positif encore plus marqué. L'intercalant, contrairement à l'ADN, a une charge positive. Lors de l'électrophorèse sur gel d'agarose, l'ADN va migrer vers la cathode alors que l'intercalant (préalablement lié à l'ADN) va migrer vers l'anode et sera de ce fait éliminé de l'ADN. Lors de l'électrophorèse sur gel de CQ, l'intercalant ne va pas être éliminé et, de ce fait, l'ADN va migrer vers le domaine relaxé (vers le haut sur la figure 48).

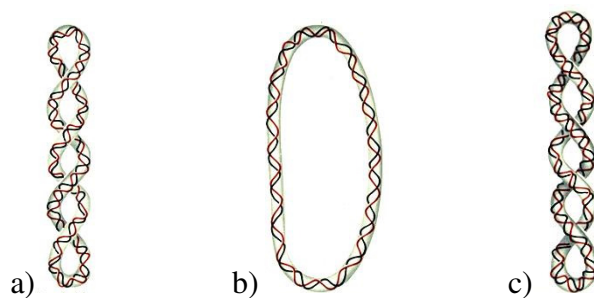


Figure 47 : a) superhélice superenroulée dans le sens opposé à la spirale de la double hélice d'ADN (superenroulement négatif) b) structure en anneau de l'ADN c) superhélice superenroulée dans le sens de la double hélice d'ADN (superenroulement positif)

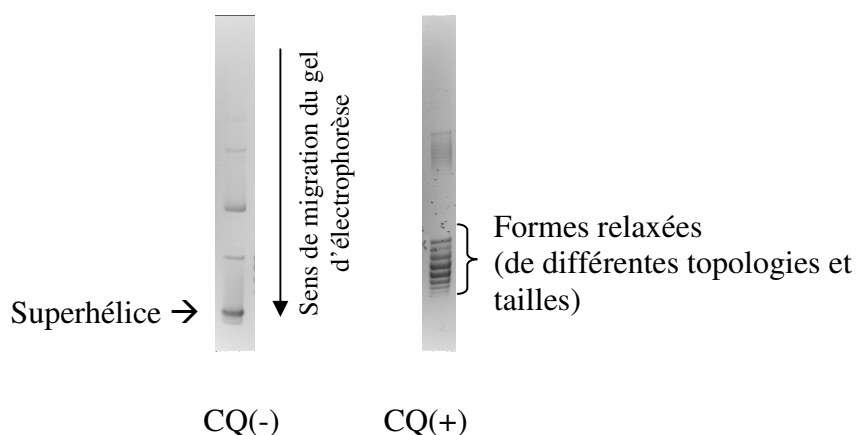


Figure 48 : Gels d'électrophorèse de l'ADN PUC18 sur agarose (0,8 %) sans CQ à gauche et avec 0,6 $\mu\text{g/mL}$ de CQ à droite (10 V/cm).

IV.3.2. La méthode de comptage des bandes (« band-counting method »)

La méthode de comptage des bandes repose sur l'action de topoisomérase-I sur les molécules d'ADN. Les ADN topoisomérases sont des enzymes qui contrôlent la structure topologique de l'ADN en générant des coupures transitoires dans l'ADN et en catalysant le passage des segments d'ADN à travers ces coupures avant de les refermer. Elles permettent notamment d'ajouter ou d'enlever des supertours dans les molécules d'ADN.

Lorsque l'on met l'ADN en présence de topoisomérase-I, on observe sur le gel d'électrophorèse que l'ADN se trouve sous sa forme relaxée, sous la forme d'anneau (bandes en haut de l'électrophorèse, schéma 49). Cette forme relaxée est maintenue même après suppression de la topoisomérase du milieu. Si une molécule s'intercale dans la molécule d'ADN, celle-ci change la topologie de l'ADN : cela diminue le nombre de surenroulements. L'ajout de topoisomérase n'a par conséquent d'influence que sur le nombre de surenroulements de l'ADN restants. De ce fait, lors de la suppression de la topoisomérase et

du ligand du milieu, l'ADN retrouve partiellement sa forme de superhélice (bandes en bas de l'électrophorèse, schéma 49).

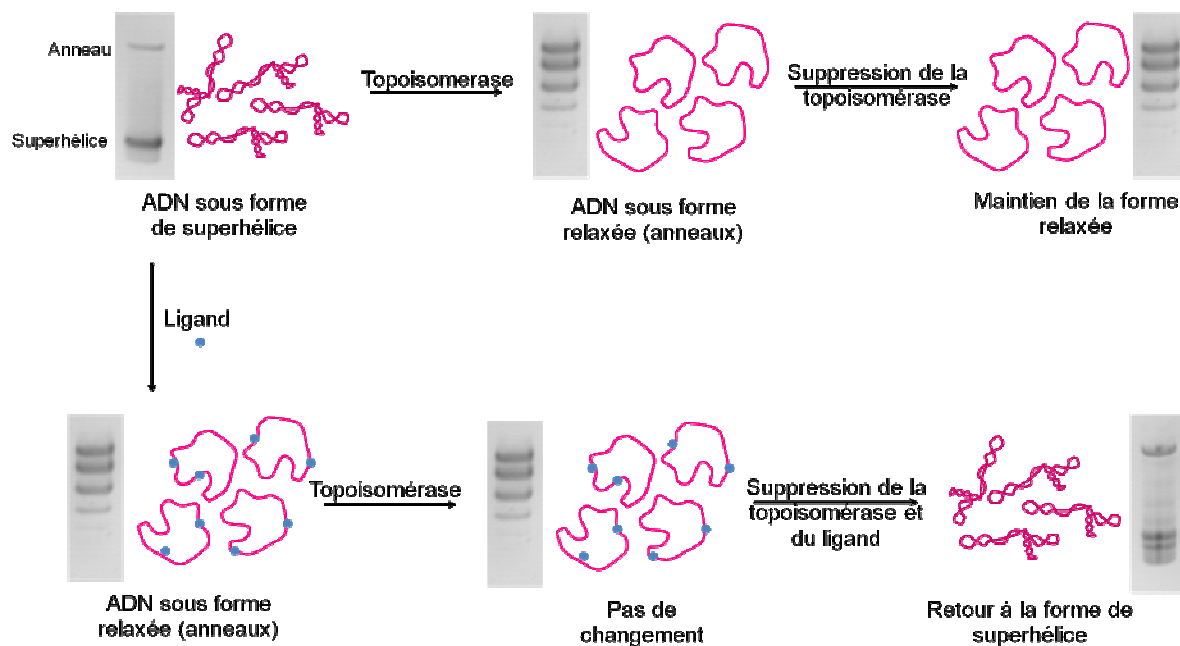


Schéma 49 : Méthode du comptage des bandes pour déterminer la superhélicité de l'ADN.

IV.3.3. Intercalation de nos amino-4-quinoléines avec l'ADN

Les manipulations ont été réalisées au Deutsches Krebsforschungszentrum à Heidelberg par Mélanie Flechsenhaar sous la direction du Pr. Langowski. Les ligands ont été préincubés avec le plasmide PUC 18 dans un tampon tris-borate (45 mM tris(-hydroxyméthyl)aminométhane, 45 mM acide borique, 1 mM EDTA, pH = 8) ayant une force ionique 10 fois plus élevée que lors des dosages par spectrophotométrie ($\mu = 120$ mM), nécessaire pour l'action enzymatique, puis déposés sur gel d'électrophorèse.

Ligand	C ($\mu\text{g/mL}$) pour une relaxation totale	C (μM) pour une relaxation totale	Endommagement de l'ADN
CQ	100	200	léger
74	30	110	léger, inhibition de la topoisomérase
72	20	40	fort
73	50	100	moyen
FQ	10-20	25-50	léger, inhibition de la topoisomérase
5	-	-	aggregation
71	< 30	< 50	moyen

Table 50 : Concentrations de ligand nécessaires pour relaxer totalement l'ADN.

Toutes nos amino-4-quinoléines s'intercalent dans l'ADN sauf le dérivé **5** de la FQ qui agrège l'ADN et pour lequel il n'est par conséquent pas possible d'estimer l'interaction (table 50). Les analogues courts de la CQ (CQ, **74**) et de la FQ (FQ, **5**) n'endommagent que légèrement l'ADN alors que les molécules duales (**71**, **72**, **73**) l'endommagent moyennement ou fortement. Les analogues courts avec un groupement isopropyle sur l'atome d'azote terminal en plus d'avoir une influence sur l'ADN, inhibent également la topoisomérase (figure 51). En effet, l'ADN n'est pas totalement relaxé, une bande en bas du gel d'électrophorèse indique la présence de l'ADN sous forme de superhélice. La table 50 récapitule les concentrations de ligand nécessaires pour relaxer totalement l'ADN. Les intercalants les plus forts sont les molécules duales et plus particulièrement le ligand **72**. Une concentration de 40 μM est suffisante pour relaxer totalement l'ADN. On observe plusieurs bandes sur le gel d'électrophorèse chacune caractéristique d'un ADN de topologie différente.

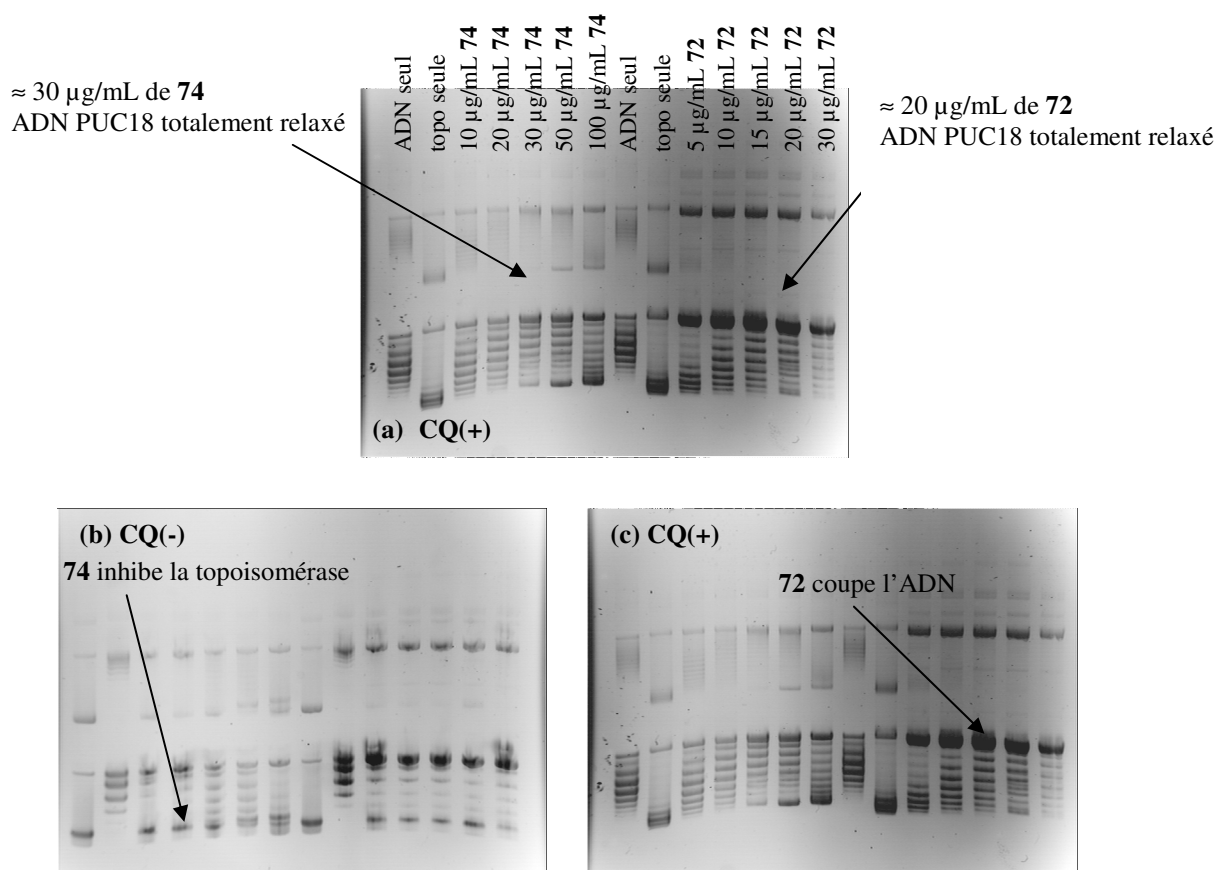


Figure 51 : Exemples de gels d'électrophorèse sur agarose (0,8 %), contenant de la CQ (0,6 $\mu\text{g/mL}$) (a) et (c) ou sans CQ (b) pour les ligands **74** et **72** à différentes concentrations. (ADN utilisé : plasmide PUC18, voltage : 10 V/cm).

IV.4. Etude de dénaturation de l'ADN en présence d'amino-4-quinoléine

Le changement de la stabilité de l'ADN en présence d'amino-4-quinoléine a été étudié par des expériences de dénaturation thermique de l'ADN au Deutsches Krebsforschungszentrum à Heidelberg sous la direction du Dr. Tóth.

IV.4.1. Fusion ou dénaturation de l'ADN

La température de fusion (ou de dénaturation) T_m (melting temperature) des acides nucléiques comme l'ADN est la température pour laquelle 50 % des brins d'ADN sont désappariés. C'est en fait, l'énergie nécessaire pour séparer les deux brins d'ADN. Cette propriété est visible par mesure de l'absorbance à 260 nm d'une solution d'ADN : la densité optique augmente au cours du désappariement (effet hyperchromique). L'absorbance UV de l'ADN monobrin est environ 40 % plus importante que celle de l'ADN double brin à toutes les longueurs d'onde. L'énergie thermique apportée devient alors suffisante pour rompre les liaisons H inter-brins. Cette température dépend donc de la quantité de liaisons hydrogène présentes et de l'empilement de type *stacking* des bases successives. Ce sont d'abord les appariements AT qui se séparent les premiers au cours de la montée en température car ils ne possèdent que deux liaisons hydrogène contrairement aux appariements GC qui en possèdent trois.

Plusieurs formules empiriques permettent de calculer la valeur de la température de fusion. Elles tiennent compte du pourcentage de paires de base GC, de la composition et de la salinité du milieu (force ionique) ainsi que de divers facteurs correctifs, tels que la présence de structures secondaires intra ou extra moléculaires (repliement de l'ADN sur lui-même, formation d'appariements entre deux brins) ou la taille de l'ADN pour les fragments courts. La température de fusion de l'ADN varie en fonction de deux facteurs principaux : la force ionique et le rapport $(A+T)/(C+G)$, appelé relation de Chargaff, donnant un indice des proportions de paires AT *versus* GC. Pour une molécule d'ADN longue et homogène, la température de fusion est donnée par la relation suivante d'après Marmur et Doty :⁸³

$$T_m = 81.5 + 41 (\%GC) + 16.6 \log \mu$$

Avec %GC : pourcentage en paires de base GC

μ : force ionique de la solution tampon

⁸³ Marmur, J.; Doty, P. *J. Mol. Biol.* **1962**, 5, 109-118.

Le T_m donne des informations sur la stabilité thermique de l'ADN. En effet, lors de la modification d'un facteur externe, comme la présence d'un intercalant, on observe une modification de la valeur du T_m . La dénaturation est coopérative comme une transition de phase car les paires de bases successives interagissent. Cette coopérativité rend la méthode sensible pour détecter les "erreurs" causées par le ligand dans l'enchaînement des paires de bases même en petite concentration.

IV.4.2. Dénaturation de l'ADN en présence d'amino-4-quinoléines

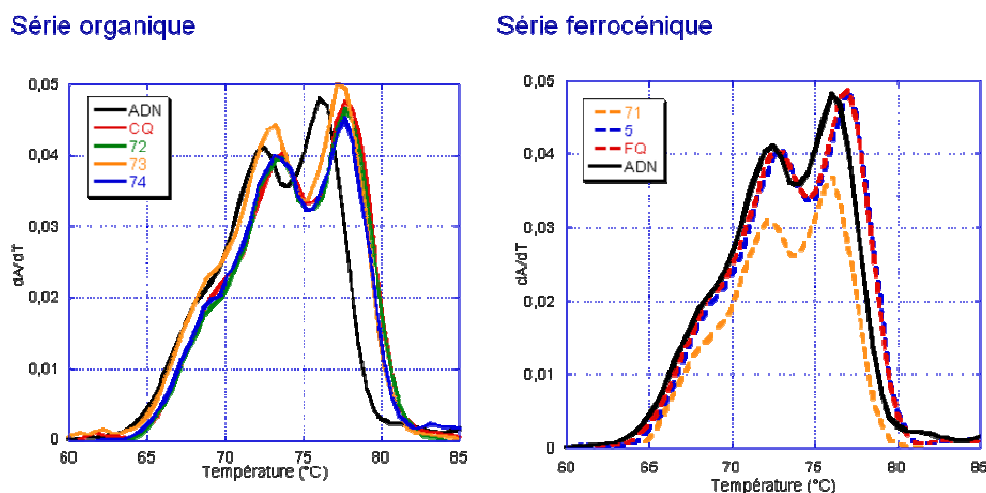


Figure 52 : Courbes de dénaturation de l'ADN PUC18 linéaire en présence d'amino-4-quinoléines.

Afin d'observer l'influence de nos molécules sur la dénaturation de l'ADN, nous avons fait des mesures de dénaturation avec l'ADN du plasmide PUC18 contenant 50,3 % d'AT. A une solution de 1 μM de ligand a été ajouté 15 μM d'ADN plasmidique. L'absorbance à 260 nm a été mesurée en fonction de la température, normalisée puis nous avons pris la dérivée de cette absorbance. Le maximum de cette dérivée donne la température de fusion T_m de l'ADN. Dans notre cas, l'ADN PUC18 possède 3 phases de dénaturation avec 2 températures caractéristiques de fusion, une première vers 72°C plus caractéristique des régions riches en paires de bases AT et une seconde vers 76°C plus caractéristique des régions riches en paires de bases GC. En présence de ligand, les deux températures de fusion de l'ADN augmentent pour tous les ligands étudiés sauf pour la molécule duale ferrocénique **71** (figure 52). Cette augmentation de température de fusion prouve l'interaction de nos molécules avec l'ADN. En effet, si un ligand s'intercale dans l'ADN, une énergie plus importante est nécessaire pour séparer les deux brins d'ADN et par conséquent, la température de fusion est plus importante.

Les molécules interagissant le plus avec l'ADN sont les molécules organiques. Dans la série ferrocénique, la molécule duale **71** n'a pas d'influence sur la température de fusion de l'ADN. Nous ne pouvons toutefois pas conclure que cette molécule n'interagit pas avec l'ADN étant donné la constante K_d estimée par spectrophotométrie UV à 0,2 μM qui indique une forte interaction. Des manipulations supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre les processus complexes d'interaction.

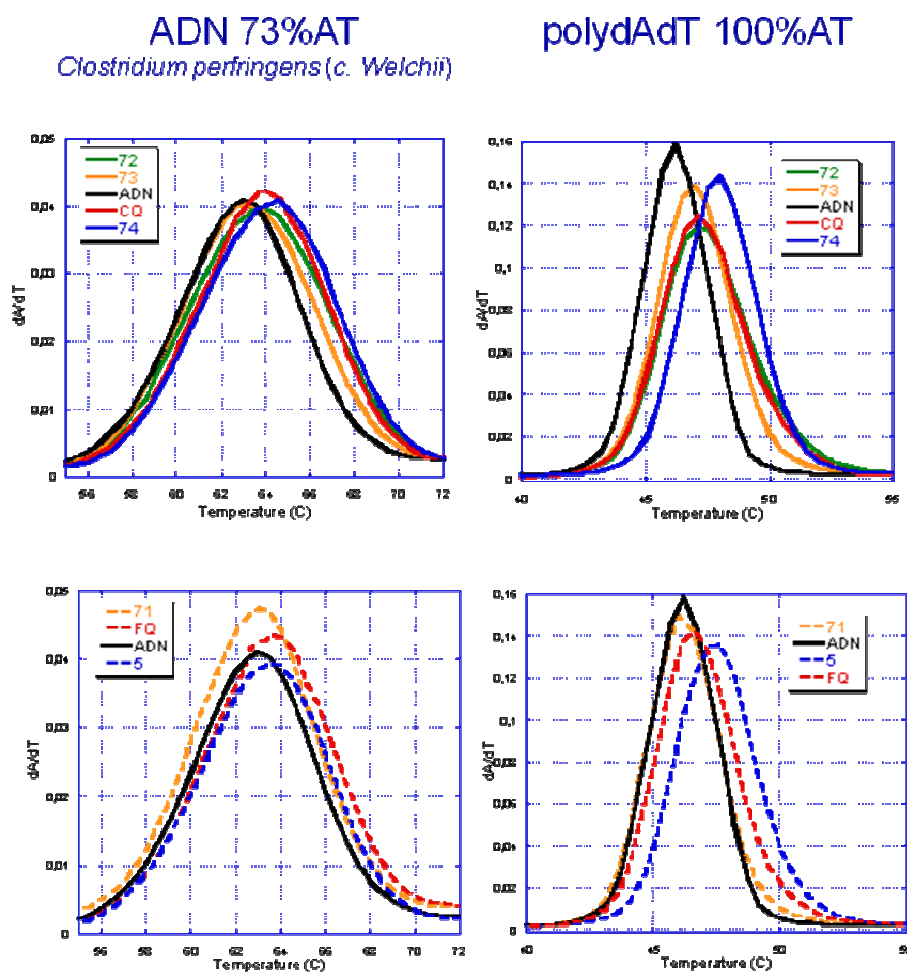
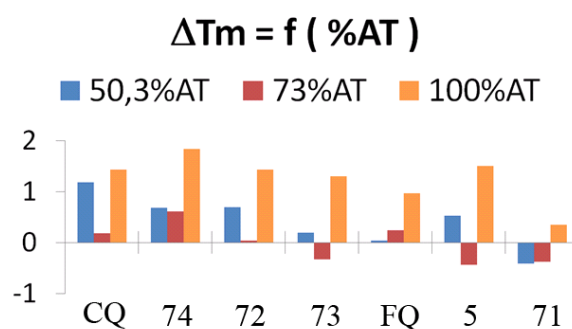


Figure 53 : Courbes de dénaturation de l'ADN extrait de *Clostridium perfringens* (*c. Welchii*) et de polydAdT.polydAdT contenant 73 % et 100 % de paires de base AT respectivement, en présence d'amino-4-quinoléines.

Etant donné que le parasite possède un ADN très enrichi en paires de bases AT (70-80 % de paires de bases AT),⁸⁰ il nous a semblé judicieux d'effectuer cette étude de dénaturation avec des ADN enrichis en paires de bases AT. Ainsi, nous avons fait les mêmes manipulations de dénaturation avec un ADN enrichi à 73 % en paires de bases AT extrait de *Clostridium perfringens* (*c. Welchii*) et avec un polydAdT.polydAdT contenant 100 % de paires de bases AT. Etant donné la concentration élevée en paires de bases AT, nous

n'observons qu'une seule température de fusion de l'ADN autour de 63°C pour l'ADN provenant de *C. perfringens* et 46°C pour le polydAdT (figure 53). Tout comme avec l'ADN PUC18 linéaire, toutes nos molécules sauf la molécule duale ferrocénique **71** ont une influence sur la température de fusion de l'ADN. Les molécules qui semblent les plus affines pour les paires de bases AT sont les petits analogues **5** et **74**, analogues de la FQ et de la CQ respectivement avec un groupement isopropyle sur l'atome d'azote terminal. Afin de mieux observer l'influence du pourcentage en paires de bases AT sur l'interaction de nos molécules avec l'ADN, nous avons tracé un graphique indiquant la différence de température de fusion de l'ADN en présence de ligand et sans ligand en fonction du pourcentage en paires de bases AT dans l'ADN (graphe 54). Toutes nos molécules présentent une bonne affinité pour les paires de bases AT sauf la molécule duale ferrocénique **71**. Cette propriété nous permet d'expliquer en partie la forte activité antipaludique de ces composés, notamment la bonne activité antipaludique de la FQ qui présente une meilleure affinité pour l'ADN enrichi en paires de base AT que pour l'ADN standard. CQ, **74**, **72** et **5** présentent également une bonne affinité pour l'ADN standard.



Graphe 54 : Différence de température de fusion de l'ADN en présence et sans amino-4-quinoléine en fonction du pourcentage en paires de bases AT dans l'ADN.

IV.5. Conclusion sur l'interaction des amino-4-quinoléines avec l'ADN

La table 55 récapitule les résultats obtenus lors de cette évaluation de l'interaction de nos molécules avec l'ADN. La cytotoxicité de nos molécules est en relation avec les valeurs de K_d estimées par les méthodes spectrophotométriques. En effet, les composés les plus cytotoxiques possèdent les constantes K_d les plus faibles montrant une plus forte interaction avec l'ADN. La molécule présentant la plus forte affinité pour l'ADN ($K_d = 0,2 \mu M$) est la molécule duale ferrocénique **71** qui est également la molécule la plus cytotoxique ($1 \mu M$ sur cellules humaines MRC-5). Sur gel d'électrophorèse, on observe que tous nos ligands

s'intercalent dans l'ADN hormis l'analogue court de la FQ **5** pour lequel il n'a pas été possible de faire l'étude car il agrège l'ADN dans les conditions expérimentales du gel. Les analogues courts de la CQ et de la FQ n'endommagent que légèrement l'ADN alors que les molécules duales l'endommagent plus fortement, en accord avec les plus fortes valeurs de cytotoxicité sur cellules humaines. Les analogues courts avec une chaîne isopropyle sur l'atome d'azote terminal ne font pas que s'insérer dans l'ADN, ils inhibent également la topoisomérase. Nous pouvons également supposer qu'ils inhibent également le système ternaire topoisomérase/ADN/ligand. Les meilleurs intercalants sont les molécules duales et en particulier la molécule **72**. Non seulement cette molécule s'insère dans l'ADN mais en plus, elle coupe celui-ci. L'étude de stabilisation de l'ADN en présence de ligand est, par contre, plus difficile à interpréter. Toutes nos molécules hormis la molécule duale ferrocénique **71** présentent une bonne affinité pour les paires de bases AT étant donné que la différence de température de fusion de l'ADN contenant 100 % de paires de bases AT en présence de 1 μ M de ces ligands est importante (entre 1 à 1,8°C). En revanche, les molécules ne présentant pas de forte cytotoxicité comme CQ, **74** et **72**, ont une plus forte affinité pour l'ADN standard (ΔT_m entre 0,7 et 1,2°C). La molécule **74** est la molécule présentant la meilleure affinité pour l'ADN car quelque soit le pourcentage de paires de bases AT dans l'ADN, ce ligand est celui qui déstabilise le plus l'ADN. L'activité antipaludique des petits analogues de la CQ est essentiellement liée à leur tropisme et leur accumulation dans la vacuole digestive des parasites. Les molécules duales ont probablement un coefficient de partition différent de celui de la CQ, entraînant leur accumulation dans des compartiments où se situe l'ADN (noyau ou mitochondrie), ce qui explique leur cytotoxicité. En revanche, la CQ et ses analogues courts ne rencontrent jamais l'ADN et s'accumulent directement dans la vacuole digestive. En effet, des études épidémiologiques montrent qu'il n'y a pas de développement de cancers dans des populations traitées à la CQ.

L'interaction de nos molécules avec l'ADN semble être un processus très complexe. Il est donc difficile de bien comprendre le mécanisme d'interaction. Nous avons pu cependant expliquer en partie la bonne activité antipaludique de nos molécules ainsi que leur cytotoxicité. La cytotoxicité de nos molécules semble être très complexe et due à plusieurs phénomènes qui ont lieu simultanément : leur interaction avec l'ADN en fait probablement partie. De plus, les concentrations utilisées lors de ces études (de l'ordre du micromolaire) sont en accord avec l'hyperconcentration en CQ et ses analogues chez le parasite. La concentration en CQ varie du nanomolaire dans le plasma au millimolaire dans la vacuole

digestive.^{84,85} Des manipulations supplémentaires sont nécessaires pour comprendre plus précisément le phénomène d'interaction.

Ligand	cytotoxicité	Interaction avec l'ADN (spectrophotométrie)	Stabilisation de l'ADN (fusion)			Intercalation avec l'ADN (gels d'électrophorèse)
	MRC-5 (μM)	K _D (μM)	ΔT (50,3% AT)	ΔT (73% AT)	ΔT (100% AT)	C (μM) pour une relaxation totale
CQ	64	9,0	1,2	0,2	1,4	200
74	64	8,0	0,7	0,6	1,8	110
72	27	8,0	0,7	0,0	1,4	40
73	8	4,0	0,2	-0,3	1,3	100
FQ	6	5,0	0,0	0,2	1,0	25-50
5	3	8,0	0,5	-0,4	1,5	-
71	1	0,2	-0,4	-0,4	0,3	< 50

Table 55 : Tableau récapitulatif (en rouge, les valeurs montrant les plus fortes cytotoxicités, les meilleures interactions ou intercalations avec l'ADN et les plus grandes différences de température de fusion).

IV.6. Activité anticancéreuse

Etant donnée la cytotoxicité et l'interaction de nos molécules avec l'ADN, nous avons jugé intéressant de tester nos molécules pour leur activité anticancéreuse. Les molécules ont été testées sur des cellules de *glioblastoma* résistantes à la carmustine (NCH89, BCNU = 1,3-bis(2-chloroéthyl)-1-nitroso urée) par le Pr. Herold-Mende à la Kopfklinik de Heidelberg (table 56).

composé	CI ₅₀ NCH89, μM	DE ₅₀ MRC-5, μM
CQ	41,2	64,0
74	30,3	64,0
72	7,4	27,0
73	5,6	8,0
FQ	4,0	6,0
5	3,5	3,0
71	1,5	1,0
Carmustine	615 ± 38	-

Table 56 : Activité sur cellules de *glioblastoma* carmustine-résistantes et cytotoxicité des molécules duales **71-73** et des analogues courts **5** et **74**.

⁸⁴ Yayon, A.; Cabantchik, I.; Ginsburg, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1985**, 82, 2784-2788.

⁸⁵ Homewood et al. *Nature*. **1972**, 235, 50-52.

Les valeurs de CI_{50} obtenues sur les cellules de *glioblastoma* résistantes à la carmustine sont en accord avec la cytotoxicité des molécules. En effet, les molécules les plus cytotoxiques sont les molécules les plus actives sur ces cellules cancéreuses. Les molécules présentant la meilleure activité anticancéreuse sont les molécules ferrocéniques ainsi que les molécules duales. L'activité augmente légèrement lorsque l'on remplace le groupement diméthylamine de la molécule duale **72** par un groupement pipéridine (composé **73**). Ces nouvelles molécules duales semblent être de nouvelles molécules anticancéreuses très prometteuses en particuliers la molécule duale ferrocénique **71** qui présente la meilleure activité ($CI_{50} = 1,5 \mu M$).

IV.7. Conclusion

Les nouvelles molécules duales amino-4-quinoléines avec une chaîne amine latérale comme produit d'amination réductrice à partir d'une base de Mannich aliphatique présentent de bonnes propriétés antipaludiques aussi bien sur les clones CQ-sensibles que CQ-résistants de *P. falciparum* (CI_{50} de l'ordre du nanomolaire). Malheureusement, cette bonne activité est associée à une forte cytotoxicité. Ces molécules ont donc été testées pour leur aptitude à interagir avec l'ADN. L'interaction de nos molécules avec l'ADN semble être très complexe. Cette étude a cependant permis d'expliquer la cytotoxicité de nos molécules et en partie l'activité antipaludique de celles-ci. Du fait de la cytotoxicité de nos molécules et de leur interaction avec l'ADN, nous avons jugé intéressant de les tester pour leur activité anticancéreuse sur cellules de *glioblastoma* résistantes à la carmustine. Ces molécules présentent une très bonne activité anticancéreuse en particulier la molécule duale ferrocénique **71**. Nous pouvons conclure qu'une nouvelle famille de molécules anticancéreuses a été découverte. Un programme de pharmacomodulation devra être entrepris par la suite afin d'explorer cette nouvelle famille (figure 57).

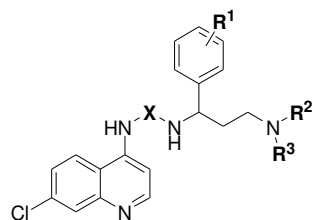


Figure 57 : Structure générale d'une nouvelle famille de molécules anticancéreuses amino-4-quinoléine avec une chaîne aminée latérale substituée par une base de Mannich aliphatique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] World Health Organisation. Guidelines for the treatment of malaria. **2006**.
- [2] Price, R.N.; Nosten, F.; Luxemburger, C.; ter Kuile, F.O.; Paiphun, L.; Chongsuphajaisiddhi, T.; White, N.J. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet*. **1996**, *347*, 1654-1658.
- [3] Targett, G.; Drakeley, C.; Jawara, M.; von Seidlein, L.; Coleman, R.; Deen, J.; Pinder, M.; Doherty, T.; Sutherland, C.; Walraven, G.; Milligan, P. Artesunate reduces but does not prevent posttreatment transmission of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *J. Infect. Dis.* **2001**, *183*, 1254-1259.
- [4] Davioud-Charvet, E.; Delarue, S.; Biot, C.; Schwöbel, B.; Boehme, C.C.; Müssigbrodt, A.; Maes, L.; Sergheraert, C.; Grellier, P.; Schirmer, R.H.; Becker, K. A prodrug Form of a *Plasmodium falciparum* Glutathione Reductase Inhibitor Conjugated with a 4-Anilinoquinoline. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4268-4276.
- [5] Burgess, S.J.; Selzer, A.; Kelly, J.X.; Smilkstein, M.J.; Riscoe, M.K.; Peyton, D.H. A Chloroquine-like Molecule Designed to Reverse Resistance in *Plasmodium falciparum*. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5623-5625.
- [6] Grellepois, F.; Grellier, P.; Bonnet-Delpon, D.; Bégué, J.-P. Design, Synthesis and Antimalarial Activity of Trifluoromethylartemisinin-Mefloquine Dual Molecules. *ChemBioChem*. **2005**, *6*, 648-652.
- [7] Dechy-Cabaret, O.; Benoit-Vical, F.; Loup, C.; Robert, A.; Gornitzka, H.; Bonhoure, A.; Vial, H.; Magnaval, J.-F.; Séguéla, J.-P.; Meunier, B. Synthesis and Antimalarial Activity of Trioxaquine Derivatives. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1625-1636.
- [8] Romeo, S.; Dell'Agli, M.; Parapini, S.; Rizzi, L.; Galli, G.; Mondani, M.; Sparatore, A.; Taramelli, D.; Bosisio, E. Plasmepsin II inhibition and antiparasitic activity of Primaquine-Statine 'double-drugs'. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2931-2934.
- [9] Salom-Roig, X.J.; Hamzé, A.; Calas, M.; Vial, H.J. Dual Molecules as New Antimalarials. *Comb. Chem. High Throughput Scree.* **2005**, *8*, 49-62.
- [10] Friebolin, W.; Jannack, B.; Wenzel, N.; Furrer, J.; Oeser, T.; Sanchez, C.P.; Lanzer, M.; Yardley, V.; Becker, K.; Davioud-Charvet, E. Antimalarial dual drugs based on potent inhibitors of glutathione reductase from *Plasmodium falciparum*. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1260-1277.
- [11] Jawahar, M.S. Current trends in chemotherapy of tuberculosis. *Indian J. Med. Res.* **2004**, *120*, 398-417.
- [12] Qian, D.Z.; Wang, X.; Kachhap, S.K.; Kato, Y.; Wei, Y.; Zhang, L.; Atadja, P.; Pili, R. The Histone Deacetylase Inhibitor NVP-LAQ824 Inhibits Angiogenesis and Has a Greater Antitumor Effect in Combination with the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor PTK787/ZK222584. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6626-6634.
- [13] Matsumoto, H.; Hamawaki, T.; Ota, H.; Kimura, T.; Goto, T.; Sano, K.; Hayashi, Y.; Kiso, Y. 'Double-Drugs' - A new Class of Prodrug Form of an HIV Protease Inhibitor Conjugated with a Reverse Transcriptase Inhibitor by a Spontaneously Cleavage Linker. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1227-1231.
- [14] Petersen, L.; Jorgensen, P.T.; Nielsen, C.; Hansen, T.H.; Nielsen, J.; Pedersen, E.B. Synthesis and Evaluation of Double-Prodrugs against HIV. Conjugation of D4T with 6-Benzyl-1-(ethoxymethyl)-5-isopropyluracil (MKC-442, Emivirine)-Type Reverse Transcriptase Inhibitors via the SATE Prodrug Approach. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1211-1220.
- [15] Meunier, B. Hybrid molecules with a dual mode of action: dream or reality? *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 69-77.

- [16] Ginsburg, H.; Famin, O.; Zhang, J.; Krugliak, M. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 1305-1313.
- [17] Müller, S. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **2004**, *53*, 1291-1305.
- [18] Schirmer, R.H.; Müller, J.G.; Krauth-Siegel, R.L. Disulfide reductase inhibitors as chemotherapeutic agents: the design of drugs for trypanosomiasis and malaria. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 141-154.
- [19] Meierjohan, S.; Walter, R.D.; Müller, S. Regulation of intracellular glutathione levels in erythrocytes infected with chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* **2002**, *368*, 761-768.
- [20] Banejee, R.; Liu, J.; Beatty, W.; Pelosof, L.; Klemba, M.; Goldberg, D.E. Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, *99*, 990-995.
- [21] Boss, C.; Richard-Bildstein, S.; Weller, T.; Fischli, W.; Meyer, S.; Binkert, C. Inhibitors of the *Plasmodium falciparum* parasite aspartic protease plasmepsin II as potential antimalarial agents. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 883-907.
- [22] Zhang, H.; Paguio, M.; Roepe, P.D. The antimalarial drug resistance protein *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter binds chloroquine. *Biochemistry.* **2004**, *43*, 8290-8296.
- [23] Bennett, T.N.; Kosar, A.D.; Ursos, L.M.; Dzekunov, S.; Singh Sidhu, A.B.; Fidock, D.A.; Roepe, P.D. Drug resistance-associated *PfCRT* mutations confer decreased *Plasmodium falciparum* digestive vacuolar pH. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, *133*, 99-114.
- [24] Martin, R.E.; Kirk, K. The malaria parasite's chloroquine resistance transporter is a member of the drug/metabolite transporter superfamily. *Mol. Biol. Evol.* **2004**, *21*, 1938-1949.
- [25] Ginsburg, H. Should chloroquine be laid to rest? *Acta Trop.* **2005**, *96*, 16-23.
- [26] Martin, S.K.; Oduola, A.M.; Milhous, W.K. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science.* **1987**, *235*, 899-901.
- [27] Krogstad, D.J.; Gluzman, I.Y.; Kyle, D.E.; Oduola, A.M.; Martin, S.K.; Milhous, W.K.; Schlesinger, P.H. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science.* **1987**, *238*, 1283-1285.
- [28] van Schalkwyk, D.A.; Walden, J.C.; Smith, P.J. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* using combinations of chemosensitizers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 3171-3174.
- [29] Millet, J.; Torrentino-Madamet, M.; Alibert, S.; Rogier, C.; Santelli-Rouvier, C.; Mosnier, J.; Baret, E.; Barbe, J.; Parzy, D.; Pradines, B. Dihydroethanoanthracene derivatives as in vitro malarial chloroquine resistance reversal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2753-2756.
- [30] Bhattacharjee, A.K.; Kyle, D.E.; Vennerstrom, J.L.; Milhous, W.K. A 3D QSAR pharmacophore model and quantum chemical structures/activity analysis of chloroquine(CQ)-resistance reversal. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 1212-1220.
- [31] Biot, C.; Daher, W.; Ndiaye, C.M.; Melnyk, P.; Pradines, B.; Chavain, N.; Pellet, A.; Fraisse, L.; Pelinski, L.; Jarry, C.; Brocard, J.; Khalife, J.; Forfar-Bares, I.; Dive, D. Probing the role of the covalent linkage of ferrocene into a chloroquine template. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4707-4714.

- [32] Salmon-Chemin, L.; Lemaire, A.; De Freitas, S.; Deprez, B.; Sergheraert, C.; Davioud-Charvet, E. Parallel synthesis of a library of 1,4-naphthoquinones and automated screening of potential inhibitors of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10:631-635.
- [33] Salmon-Chemin, L.; Buisine, E.; Yardley, V.; Kohler, S.; Debreu, M.A.; Landry, V.; Sergheraert, C.; Croft, S.L.; Krauth-Siegel, R.L.; Davioud-Charvet, E. 2- and 3-substituted-1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox-cycling activities and in vitro cytotoxicity. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 48-65.
- [34] Biot, C.; Bauer, H.; Schirmer, R.H.; Davioud-Charvet, E. 5-substituted tetrazoles as bioisosteres of carboxylic acids. Bioisosterism and mechanistic studies on glutathione reductase inhibitors as antimalarials. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 5972-5983.
- [35] Bauer, H.; Fritz-Wolf, K.; Winzer, A.; Kühner, S.; Little, S.; Yardley, V.; Vezin, H.; Palfey, B.; Schirmer, R.H.; Davioud-Charvet, E. A fluoro analogue of the menadione derivative 6-[2'-(3'-methyl)-1',4'-naphthoquinolyl]hexanoic acid is a suicide substrate of glutathione reductase. Crystal structure of the alkylated human enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10784-10794.
- [36] Comporti, M. Three models of free radical-induced cell injury. *Chem. Biol. Interact.* **1989**, 72, 1-56.
- [37] Harauchi, T.; Hirata, M. Effect of P-450 inducers on glutathione (GSH) depletion by bromobenzene primary cultures of dog hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.* **1994**, 17, 658-661.
- [38] Rietjens, I.M.C.M.; den Besten, C.; Hanzlik, R.P.; van Bladeren, P.J. Cytochrome P450-Catalyzed Oxidation of Halobenzene Derivatives. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, 629-635.
- [39] Nicolaou, K.C.; Dai, W.M. Molecular design and chemical synthesis of potent enediynes. 2. Dynemicin model systems equipped with C-3 triggering devices and evidence for quinine methide formation in the mechanism of action of dynemicin A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8908-8921.
- [40] Dai, W.-M.; Cheung, Y.K.; Tang, K.W.; Choi, P.Y.; Chung, S.L. Highly chemoselective acylation of substituted aminophenols with 3-(trimethylacetyl)-1,3-thiazolidone-2-thione. *Tetrahedron.* **1995**, 45, 12263-12276.
- [41] Solomon, V.R.; Haq, W.; Srivastava, K.; Puri, S.K.; Katti, S.B. Synthesis and Antimalarial Activity of Side Chain Modified 4-Aminoquinoline Derivatives. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 394-398.
- [42] Musonda, C.C.; Taylor, D.; Lehman, J.; Gut, J.; Rosenthal, P.J.; Chibale, K. Application of multi-component reactions to antimalarial drug discovery. Part 1: Parallel synthesis and antiplasmodial activity of new 4-aminoquinoline Ugi adducts. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3901-3905.
- [43] Egan, T.J.; Tshivhase, M.G. Kinetics of β -haematin formation from suspensions of haematin in aqueous benzoic acid. *Dalton Trans.* **2006**, 5024-5032.
- [44] Buisine, E.; de Villiers, K.; Egan, T.J.; Biot, C. Solvent-Induced Effects: Self-Association of Positively Charged π Systems. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 12122-12128.
- [45] Daher, W.; Pelinski, L.; Klieber, S.; Sadoun, F.; Meunier, V.; Bourrie, M.; Biot, C.; Guillou, F.; Fabre, G.; Brocard, J.; Fraisse, L.; Maffrand, J.P.; Khalife, J.; Dive, D. *In vitro* metabolism of ferroquine (SSR97193) in animal and human hepatic models and antimalarial activity of major metabolites on *Plasmodium falciparum*. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, 34, 667-682.
- [46] Biot, C.; Delhaes, L.; N'Diaye, C.M.; Maciejewski, L.A.; Camus, D.; Dive, D.; Brocard, J. S. Synthesis and antimalarial activity *in vitro* of potential metabolites of ferrochloroquine and related compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2843-2847.

- [47] Bohle, D.S.; Dinnebier, R.E.; Madsen, S.K.; Stephens, P.W. Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malarial late trophozoites by X-ray diffraction. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 713-716.
- [48] Egan, T.J.; Hempelmann, E.; Mavuso, W.W. Characterisation of synthetic β -haematin and effects of the antimalarial drugs quinidine, halofantrine, desbutylhalofantrine and mefloquine on its formation. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *73*, 101-107.
- [49] Ncokazi, K.K.; Egan, T.J. A colorimetric high-throughput β -hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compounds. *Anal. Biochem.* **2005**, *338*, 306-319.
- [50] Egan, T.J.; Koch, K.R.; Swan, P.L.; Clarkson, C.; Van Schalkwyk, D.A.; Smith, P.J. *In vitro* antimalarial activity of a series of cationic 2,2'-bipyridyl- and 1,10-phenanthrolineplatinum(II) benzoylthiourea complexes. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2926-2934.
- [51] Natarajan, J.K.; Alumasa, J.N.; Yearick, K.; Ekoue-Kovi, K.A.; Casabianca, L.B.; de Dios, A.C.; Wolf, C.; Roepe, P.D. 4-N-, 4-S-, and 4-O-Chloroquine Analogues: Influence of Side Chain Length and Quinolyl Nitrogen pKa on Activity vs Chloroquine Resistant Malaria. *J. Med. Chem.* **2008**, sous presse.
- [52] Constantino, L.; Iley, J. Oxidation of tertiary benzamides by 5,10,15,20-tetraphenyl-porphyrinatoiron^{III} chloride-*tert*-butylhydroperoxide. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1894-1900.
- [53] Bazin, M.J.; Shi, H.; Delaney, J.; Kline, B.; Zhu, Z.; Kuhn, C.; Berlioz, F.; Farley, K.A.; Fate, G.; Lam, W.; Walker, G.S.; Yu, L.; Pollastri, M.P. Efficient use of the iron ortho-nitrophenylporphyrin chloride to mimic biological oxidations of dimethylaminoantipyrine. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2007**, *70*, 354-359.
- [54] Green, M.D.; Xiao, L.; Lal, A.A. Formation of hydroxyeicosatetraenoic acids from hemozoin-catalyzed oxidation of arachidonic acid. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, *83*, 183-188.
- [55] Van der Zee, J.; Barr, D.P.; Mason, R.P. ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and *tert*-Butyl hydroperoxide. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 199-206.
- [56] Dimmock, J.R.; Advikolanu, K.M.; Scott, H.E.; Duffy, M.J.; Reid, R.S.; Quail, J.W.; Jia, Z.; Hickie, R.A.; Allen, T.M.; Rutledge, J.M. Evaluation of cytotoxicity of some Mannich bases of various aryl and arylidene ketones and their corresponding arylhydrazones. *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 1147-1152.
- [57] Erciyas, E.; Erkaleli, H.I.; Cosar, G. Antimicrobial evaluation of some styryl ketone derivatives and related thiol adducts. *J. Pharm. Sci.* **1994**, *83*, 545-548.
- [58] Sexton, D.J.; Dimmock, J.R.; Mutus, B. A spectrophotometric glutathione S-transferase assay displaying alpha-class selectivity utilizing 1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-5-diethylamino-1-penten-3-one hydrobromide. *Biochem. Cell. Biol.* **1993**, *71*, 98-101.
- [59] Dimmock, J.R.; Kandepu, N.M.; Hetherington, M.; Quail, J.W.; Pugazhenth, U.; Sudom, A.M.; Chamankhah, M.; Rose, P.; Pass, E.; Allen, T.M.; Halleran, S.; Szydlowski, J.; Mutus, B.; Tannous, M.; Manavathu, E.K.; Myers, T.G.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Cytotoxic activities of Mannich bases of chalcones and related compounds. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1014-1026.
- [60] Dimmock, J.R.; Shyam, K.; Logan, B.M.; Smith, P.J.; Cross, B.M. Syntheses and evaluation of some mannich bases derived from acetophenones against P388 lymphocytic leukemia and toxicological assessment of 3-dimethyl-amino-2-dimethylaminomethyl-1-(4-methoxyphenyl)-1-propanone dihydrochloride in rats. *J. Pharm. Sci.* **1984**, *73*, 471-477.
- [61] Davioud-Charvet, E.; McLeish, M.J.; Veine, D.M.; Giegel, D.; Arcsott, L.D.; Andricopulo, A.D.; Becker, K.; Müller, S.; Schirmer, R.H.; Williams, C.H. Jr.; Kenyon, G.L. Mechanism-based inactivation of thioredoxine reductase from *Plasmodium falciparum* by Mannich bases. Implication for cytotoxicity. *Biochemistry*. **2003**, *42*, 13319-13330.

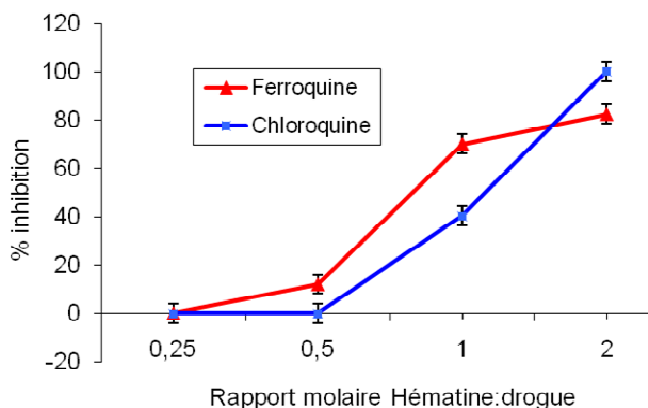
- [62] Becker, K.; Gromer, S.; Schirmer, R.H.; Müller, S. Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6118-6125.
- [63] Krnajsli, Z.; Gilberger, T.W.; Walter, R.D.; Cowman, A.F.; Müller, S. Thioredoxin reductase is essential for the survival of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25970-25975.
- [64] Bernadou, J.; Meunier, B. Biomimetic Chemical Catalysts in the Oxidative Activation of Drugs. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 171-184.
- [65] Meunier, B.; de Visser, S. P.; Shaik, S. Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P₄₅₀ Enzymes. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947-3980.
- [66] Irvin, J.L.; Irvin, E.M.; Parker, F.S. The Interaction of Antimalarials with Nucleic Acids. *Science.* **1949**, *110*, 426-428.
- [67] Parker, F.S.; Irvin, J.L. The interaction of chloroquine with nucleic acids and nucleoproteins. *J. Biol. Chem.* **1952**, *199*, 897-909.
- [68] Stollar, D.; Levine, L. Antibodies to denatured deoxyribonucleic acid in Lupus Erythematosus serum, V. Mechanism of DNA-anti-DNA inhibition by chloroquine. *Arch. Biochem. Biophys.* **1963**, *101*, 335-341.
- [69] Cohen, S.N.; Yielding, S.N. Spectrophotometric studies of the interaction of chloroquine and deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 3123-3131.
- [70] O'Brien, R.L.; Hahn, F.E. Chloroquine structural requirements for binding to deoxynucleic acid and antimalarial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1965**, 315-320.
- [71] Blodgett, L.W.; Yielding, K.L. Comparison of chloroquine binding to DNA and polyadenylic and polyguanylic acids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1968**, *169*, 451-456.
- [72] Yielding, K.L.; Blodgett, L.W.; Sternglanz, H.; Gaudin, D. Chloroquine binding to nucleic acids: characteristics, biological consequences and a proposed binding model for the interaction. *Prog. Mol. Subcell. Biochem.* **1971**, *2*, 69-90.
- [73] Cohen, S.N.; Yielding, K.L. Inhibition of DNA and RNA Polymerase Reactions by Chloroquine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **1965**, *54*, 521-527.
- [74] O'Brien, R.L.; Olenick, J.G.; Hahn, F.E. Reactions of Quinine, Chloroquine, and Quinacrine with DNA and their Effects on the DNA and RNA Polymerase Reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **1966**, *55*, 1511-1517.
- [75] Kwakye-Berko, F.; Meshnick, S.R. Binding of chloroquine to DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1989**, *35*, 51-56.
- [76] Parker, S.; Irvin, J.L. The interaction of chloroquine with nucleic acids and nucleoproteins. *J. Biol. Chem.* **1952**, *199*, 897-909.
- [77] Stollar, D.; Levine, L. Antibodies to denatured deoxyribonucleic acid in lupus erythematosus serum. V. Mechanism of DNA-anti-DNA inhibition by chloroquine. *Arch. Biochem. Biophys.* **1963**, *101*, 335-341.
- [78] Allison, J.-L.; O'Brien, R.L.; Hahn, F.E. DNA: Reaction with Chloroquine. *Science.* **1965**, *149*, 1111-1113.
- [79] Kwakye-Berko, F.; Meshnick, S. Sequence preference of chloroquine binding to DNA and prevention of Z-DNA formation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1990**, *39*, 275-278.
- [80] Pollack, Y.; Katzen, A.L.; Spira, D.T. Golenser, J. The genome of *Plasmodium falciparum*. I: DNA base composition. *Nucl. Acids Res.* **1982**, *10*, 539-546.

- [81] Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1949**, *51*, 660-670.
- [82] Scatchard, G.; Coleman, J.S.; Shen, A.L. Physical Chemistry of Protein Solutions. VII. The Binding of Some Small Anions to Serum Albumin. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 12-20.
- [83] Marmur, J.; Doty, P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* **1962**, *5*, 109-118.
- [84] Yayon, A.; Cabantchik, I.; Ginsburg, H. Susceptibility of human malaria parasites to chloroquine is pH dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1985**, *82*, 2784-2788.
- [85] Homewood, C.; Warhurst, D.; Peters, W.; Baggaley, V. Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine. *Nature.* **1972**, *235*, 50-52.

Chapitre IV

Etude du mécanisme d'action de la ferroquine

I. Mécanisme d'action de la ferroquine par comparaison avec la chloroquine



Graphique 1 : Courbes d'inhibition de la formation de la β -hématine pour la CQ et la FQ (méthode BHIA, β -hematin inhibitory activity).¹

Le mécanisme d'action de la CQ n'est pas encore élucidé mais il semble, au premier abord, évident que son action est liée à sa structure et sa localisation probable dans la vacuole digestive du parasite, et repose sur l'inhibition de la formation de l'hémozoïne (voir chapitre I).² A l'origine, comme la FQ est un analogue ferrocénique de la CQ, le mécanisme d'action de la FQ a été étudié par le Pr. Egan et le Dr. Biot en comparaison avec celui de la CQ.³ Comme la CQ, la FQ forme des complexes avec l'hématine en solution. Une molécule de FQ s'associe avec une molécule d'hématine (stœchiométrie 1:1 comme pour la CQ⁴) avec une constante d'association du même ordre de grandeur que celle pour la CQ ($\log K = 4,95 \pm 0,05$ pour la FQ, $\log K = 5,52 \pm 0,05$ pour la CQ).³ Les auteurs ont montré que la FQ est un meilleur inhibiteur de la formation de β -hématine que la CQ avec une valeur de CI_{50} de 0,78 pour la FQ contre 1,9 pour la CQ (graphe 1).³ Ceci suggère que le mécanisme d'action de la FQ ressemble à celui de la CQ et que la cible pourrait être le pigment malarique en croissance.

A l'appui de cette hypothèse, le Dr. Biot et le Pr. Egan ont également calculé les surfaces de potentiel électrostatique moléculaire pour la FQ et la CQ diprotonées par des méthodes de DFT (B3LYP / LANL2DZ) (figure 2). La FQ et la CQ montrent une analogie

¹ Parapini et al. *Exp. Parasitol.* **2000**, 96, 249-256.

² Sullivan et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1996**, 93, 11865-11870.

³ Biot et al. *Mol. Pharm.* **2005**, 2, 185-193.

⁴ Egan et al. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 283-291.

structurale au niveau de la partie quinoléine, la différence entre ces molécules provenant du groupement ferrocénique qui s'inclut dans la chaîne latérale. L'hypothèse étant que le cycle quinoléine de la molécule interagit avec l'hématine par empilement amino- π ou cation- π (figure 3), un mode d'interaction similaire entre ces molécules et l'hématine a été suggéré.³ Les mêmes observations ont été faites avec les molécules neutres mais dans ce modèle, l'interaction avec l'hématine est de type π - π *stacking* ou amino- π .

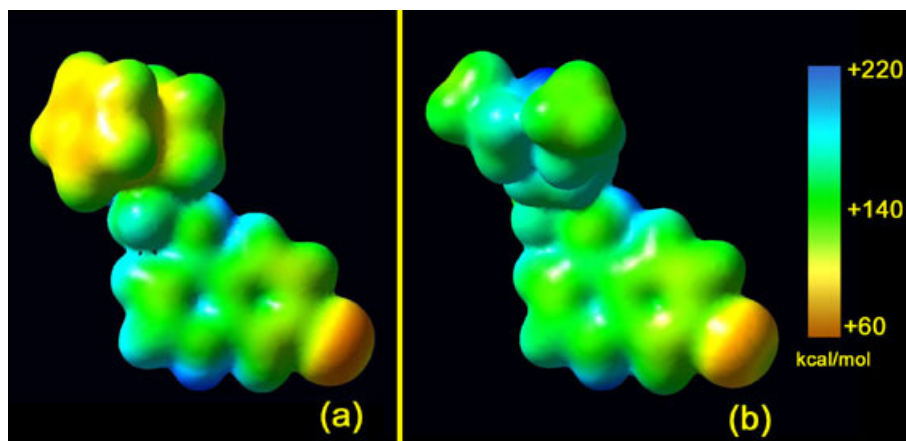


Figure 2 : Surfaces de potentiel électrostatique moléculaire par calculs DFT de la FQ (a) et de la CQ (b).



Figure 3 : Simulation d'interaction de la CQ avec l'hématine.⁵

Les auteurs ont également comparé les propriétés physicochimiques de la FQ à celles de la CQ. Les molécules de FQ et de CQ diffèrent de par leur basicité et leur lipophilie.³ La lipophilie de la FQ et de la CQ est identique lorsque les molécules sont protonées au pH 5,2 de la vacuole digestive ($\log D_{5,2} = -0,8$ et $-1,2$, respectivement) mais elle diffère remarquablement à pH cytosolique de 7,4 ($\log D_{7,4} = 2,95$ et $0,85$, respectivement).³ La FQ

⁵ Leed et al. *Biochemistry*. **2002**, *41*, 10245-10255.

est donc 100 fois plus lipophile que la CQ au pH cytosolique. Ceci contribue probablement à la forte activité de la FQ. En effet, comme nous l'avons vu au chapitre I, de récentes études ont supposé que la formation de l'hémozoïne se produirait à l'interface eau/lipide au niveau de la membrane interne du compartiment vacuolaire. Il a donc été émis l'hypothèse que la forte lipophilie de la FQ aiderait la molécule à se placer à cette interface et par conséquent, permettrait une bonne inhibition de la croissance du cristal.

Les valeurs de pKa de l'amine terminale (pK_{a2}) et de l'azote de la quinoléine (pK_{a1}) de la FQ sont également différentes de celles de la CQ, elles sont inférieures ($pK_{a1} = 8,19$ *versus* 10,03 ; $pK_{a2} = 6,99$ *versus* 7,94, respectivement).³ Cela suggère que la FQ s'accumulerait moins que la CQ dans la vacuole digestive du parasite (cette hypothèse est discutée au paragraphe IV). Une détermination cristallographique de la structure de la FQ montre la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire forte entre le groupe 4-amino et l'atome d'azote terminal. Cette configuration ainsi que les propriétés de donneur d'électron du ferrocène explique probablement la diminution du pKa de la FQ.

De ces travaux précédemment réalisés au laboratoire, l'activité de la FQ semble donc mettre en jeu plusieurs mécanismes d'action. Ils reposent en partie sur un mécanisme similaire à celui de la CQ, basé sur l'inhibition de la formation de l'hémozoïne. En plus, le métallocène altère la forme, le volume, la lipophilie, la basicité et le profil électronique de la molécule parente et par conséquent, son comportement pharmacodynamique. Jusqu'à présent, l'importance du groupement ferrocénique dans la molécule n'a jamais fait l'objet d'études plus spécifiques. L'activation redox du ferrocène en ion ferricinium est susceptible de générer des radicaux libres. Cette propriété a été étudiée au paragraphe III.

II. Tentatives d'induction de résistance de la ferroquine

Comme nous l'avons vu au chapitre I, la résistance à la CQ est liée à une mutation du gène *pfCRT* qui code pour la protéine *PfCRT* localisée sur la membrane de la vacuole digestive.⁶ Cette mutation consiste en un remplacement de la lysine 76 chargée positivement (groupement NH_3^+) par une thréonine neutre. Une interaction électrostatique répulsive aurait lieu entre le groupement NH_3^+ de la lysine du transporteur non muté et la CQ qui est chargée positivement (CQH_2^{2+}) du fait du pH acide de la vacuole digestive. Cette répulsion électrostatique permettrait le maintien de la CQ dans la vacuole digestive. La mutation de la

⁶ Cooper et al. *Mol. Pharmacol.* **2002**, 61, 35-42.

lysine chargée en thréonine neutre sur le transporteur muté empêche la répulsion stérique, l'efflux de CQ hors de la vacuole digestive serait par conséquent favorisé.⁷ Des mutations de *PfCRT* sont observées chez tous les isolats de *P. falciparum* résistants à la CQ.

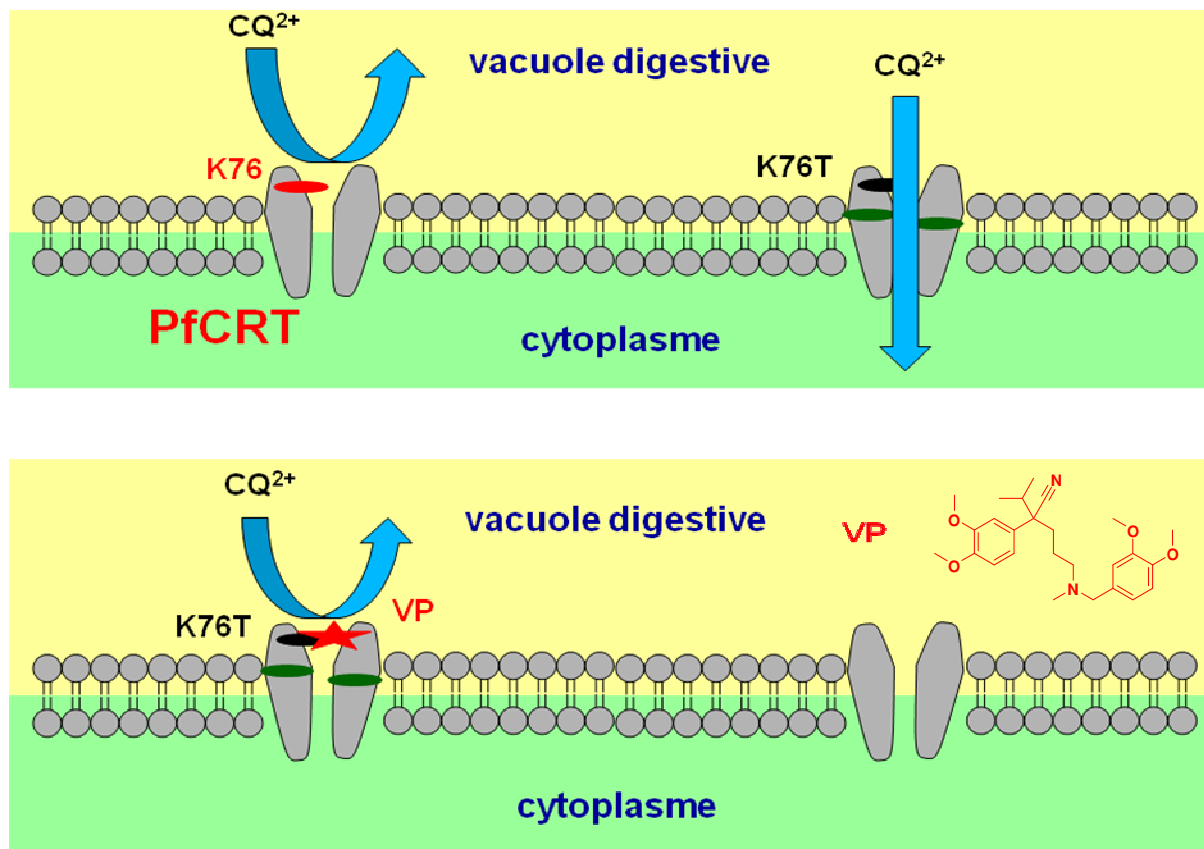


Figure 4 : Mécanisme de résistance supposé de la chloroquine (CQ^{2+}) et réversibilité de la résistance par le verapamil supposée (VP) (d'après un schéma du Dr. Biot).

Différentes études ont montré une réversibilité partielle de la résistance de *P. falciparum* à la CQ par le bloqueur de canaux calciques, le verapamil (VP).^{8,9} Un croisement génétique entre une lignée CQ-résistante (Dd2, Indochine) et une lignée CQ-sensible (HB3, Honduras) réalisé par le groupe du Dr. Fidock, a révélé que la réversibilité de la résistance à la CQ par le VP était liée aux polymorphismes de la protéine transmembranaire de la vacuole digestive *PfCRT*.¹⁰ Warhurst et coll. ont proposé que la réversibilité de la résistance serait due à une liaison hydrophobique du VP aux résidus 72-76 de la protéine *PfCRT* mutée.¹¹ Le VP est une molécule très volumineuse, très hydrophobe et chargée positivement dans la vacuole

⁷ Sanchez et al. *Biochemistry*. **2004**, 43, 16365-16373.

⁸ Krogstad et al. *Science*. **1987**, 238, 1283-1285.

⁹ Martin, S.K.; Oduola, A.M.; Milhous, W.K. *Science*. **1987**, 235, 899-901.

¹⁰ Fidock et al. *Mol. Cell*. **2000**, 6, 861-871.

¹¹ Warhurst, D.C. *Malar. J.* **2003**, 2, 1-12.

digestive (pH acide) et empêcherait l'efflux de CQ hors de la vacuole digestive du parasite par répulsion stérique du fait de sa charge positive et en bloquant partiellement le canal (figure 4).

Le Dr. Daher a réalisé des expériences d'induction de tentative de résistance à la FQ. Ces expériences montrent que le coût biologique de développement de résistance à la FQ pour *P. falciparum* est très élevé. Une exposition de 10^{10} - 10^{11} parasites à une pression continue de 100 nM de FQ durant 2 mois n'a pas abouti au développement d'un clone résistant viable. Une croissance transitoire très limitée a été observée mais les parasites n'ont pas survécus même en l'absence de FQ.¹² La sensibilité à la FQ n'est pas liée au polymorphisme de la protéine PfCRT : aucune relation entre les mutations sur le gène codant pour cette protéine et les valeurs de CI_{50} de la FQ n'est observée. La sensibilité à la FQ n'est pas liée à celle de la MF sur les isolats de terrain. Le polymorphisme et le nombre de copies du gène *pfmdr1* (codant pour la protéine Pgh2) ne sont pas impliqués dans la sensibilité à la FQ comme pour les autres antipaludiques.

III. Activité redox de la ferroquine

Le mécanisme d'action de la FQ a jusqu'alors toujours été comparé à celui de la CQ mais il semble nécessaire de comprendre l'importance du groupement ferrocénique dans la molécule. Un groupement ferrocénique a également été greffé au tamoxifène par l'équipe du Pr. Jaouen (voir chapitre I). Les hydroxyferrocifènes obtenus montrent une activité antiproliférative importante sur des cellules de cancer du sein résistantes au tamoxifène. Il a été montré que le ferrocène était un centre d'oxydation intramoléculaire qui permet la production oxydative de quinones méthylènes qui semblent être responsables de l'effet cytotoxique de ces molécules.^{13,14} Il a également été montré par Wu et coll., pour une série de chalcones ferrocéniques, que le ferrocène contribuait à l'activité antiplasmodiale par redox cycling.¹⁵

Dans la vacuole digestive du parasite, la libération d'hème libre est accompagnée de la production d'anions superoxyde qui se dismutent rapidement en H_2O_2 .¹⁶ Dans ces conditions oxydantes, nous pouvions supposer que le ferrocène présent dans la molécule de FQ peut être oxydé en ion ferriquinium, catalyser des réactions de type Haber-Weiss et par conséquent,

¹² Daher et al. *Malar. J.* **2006**, 5, 11.

¹³ Hillard et al. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, 45, 285-290.

¹⁴ Schatzschneider, U.; Metzler-Nolte, N. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, 45, 1504-1507.

¹⁵ Wu et al. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, 27, 175-187.

¹⁶ Kannan et al. *Biochem. J.* **2005**, 385, 409-418.

générer des radicaux hydroxyles. Lors de ce travail de thèse, nous avons donc mené une étude afin d'approuver la contribution du groupement ferrocénique de la FQ dans l'activité antipaludique.

III.1. Oxydation de la ferroquine en ion ferriquinium

III.1.1. Voltamétrie cyclique

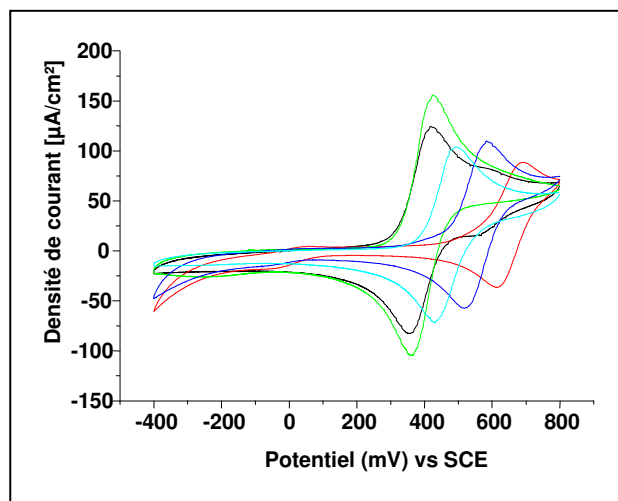
Nous avons souhaité tout d'abord voir si, comme le ferrocène, la FQ s'oxydait en ion ferriquinium. Pour cela, des expériences de voltamétrie cyclique ont été réalisées en collaboration avec le groupe du Dr. Vezin au Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (USTL). Les mesures électrochimiques ont été faites avec le ferrocène, la base libre *N,N*-diméthylaminométhylferrocène (DMAF), le chlorhydrate du DMAF (DMAF.HCl), la FQ sous forme de base libre, le dichlorhydrate de la FQ (FQ.2HCl) et la CQ diphosphate (CQ.2H₃PO₄).

composé	$E_{1/2}$, mV	ΔE_p , mV
Ferrocène	393,5	62,1
DMAF	387,5	65,0
DMAF,HCl	551,0	63,0
FQ	461,5	63,0
FQ,2HCl	651,7	75,5

Table 5 : Potentiels de demi-vague $E_{1/2}$ et différences de potentiel d'électrode ΔE_p des composés ferrocéniques testés (1 mM, 100 mV/s).

La table 5 liste les différences de potentiels mesurées (ΔE_p) ainsi que les potentiels de demi-vague $E_{1/2}$ des composés testés. La différence ΔE_p entre les potentiels d'oxydation et de réduction reflète la réversibilité de la réaction. En ce qui concerne $E_{1/2}$, une valeur élevée de ce paramètre redox indique une certaine résistance pour la perte d'électrons.

Pour tous les composés étudiés, les valeurs de ΔE_p obtenues se situent entre 62,0 et 75,5 mV indiquant que le mécanisme de transfert est réversible à un électron. Ces résultats confirment la réversibilité du processus de transfert d'électron. Le graphe 6 indique également que dans l'intervalle de potentiels étudié, tous les composés ferrocéniques montrent une oxydation à un électron.



Graphique 6 : Voltammogrammes cycliques du ferrocène (en vert), du DMAF (en noir), du DMAF.HCl (en bleu foncé), de la FQ (en bleu clair), et de la FQ.2HCl (en rouge) enregistrés à 1 mM dans l'acétonitrile (0.1 M TEAP) et à une vitesse de scan de 100 mV/s.

En comparaison avec la CQ qui est totalement dépourvue de propriétés redox, le transfert d'électron observé pour la FQ et les autres composés ferrocéniques provient spécifiquement du fer dans son état d'oxydation Fe(II) du groupement ferrocénique. La valeur de référence $E_{1/2}$ mesurée par rapport à l'électrode au calomel de référence pour le ferrocène dépourvu de substituant est de 393,5 mV. Cette valeur est très proche des 400 mV mesurés précédemment avec une électrode de platine.¹⁷ Excepté pour le DMAF, cette valeur est la plus faible, ce qui suggère que tous les autres dérivés ferrocéniques dans lesquels le ferrocène est substitué montrent une résistance plus forte à la perte de l'électron. Les mécanismes d'oxydation ont lieu à des potentiels plus élevés. De ce fait, la probabilité pour que le ferrocène perde un électron est fortement influencée par le type de substituant sur le ferrocène.^{18,19,20,21,22} La valeur de $E_{1/2}$ est de 387,5 mV pour le DMAF, valeur proche du potentiel de demi-vague standard du ferrocène, alors qu'elle augmente fortement à 461,5 mV pour la FQ. De plus, lorsque ces deux composés sont protonés, cette résistance à la perte d'un électron est exacerbée. Les valeurs de $E_{1/2}$ pour le DMAF.HCl et le FQ.2HCl augmentent considérablement à 551,0 et 651,0 mV, respectivement. Ces valeurs de $E_{1/2}$ importantes résultent de l'effet électroattracteur fort exercé par les charges positives des chaînes latérales protonées. Dans le cas de la FQ, l'effet attracteur est dû non seulement à la chaîne latérale

¹⁷ Lemoine et al. *Organometallics* **1984**, 3, 1303-1307.

¹⁸ Zanello et al. *J. Organomet. Chem.* **1994**, 471, 171-177.

¹⁹ Martinez, R.; Tiripicchio, A. *Acta Crystallogr.* **1990**, C46, 202-205.

²⁰ Pickardt, J.; Schumann, H.; Mohtachemi, R. *Acta Crystallogr.* **1990**, C46, 39-41.

²¹ Rausch et al. *Organometallics* **1989**, 8, 816-821.

²² Seiler, P.; Dunitz, J.D. *Acta Crystallogr.* **1979**, B35, 1068-1074.

aminoalkyle chargée positivement comme pour le DMAF.HCl mais également au cycle quinoléine protoné. De ce fait, la FQ diprotonée donne la valeur de $E_{1/2}$ la plus importante comparée aux autres composés.

III.1.2. Oxydation chimique de la FQ

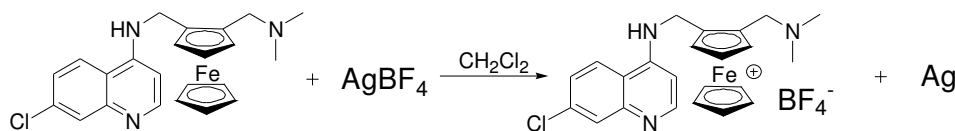


Schéma 7 : Oxydation chimique de la ferroquine par AgBF_4 .

Le sel de ferriquinium $[\text{FQ}][\text{BF}_4]$ a été préparée avec un bon rendement par oxydation chimique de la FQ avec AgBF_4 dans le dichlorométhane à température ambiante (schéma 7). $[\text{FQ}][\text{BF}_4]$ est un précipité vert qui est stable sous forme solide. AgBF_4 est l'oxydant le plus utilisé pour les réactions d'oxydation à un électron. Etant donné que le potentiel du couple redox Ag^+/Ag^0 dépend du solvant, trois solvants différents ont été testés : l'acétonitrile ($E^\circ = 0,04 \text{ V}$), l'acétone ($E^\circ = 0,18 \text{ V}$) et le dichlorométhane ($E^\circ = 0,65 \text{ V}$).²³ Bien que tous les milieux réactionnels soient devenus verts après addition de AgBF_4 , une analyse par spectroscopie RPE a montrée que seul le solide isolé de la réaction dans le dichlorométhane était le sel de ferriquinium $[\text{FQ}][\text{BF}_4]$ pur. Les précipités provenant des deux autres réactions contenaient un mélange de Fe(II) et Fe(III) . Ceci indique clairement que la FQ est relativement difficile à oxyder comme il a été montré par voltamétrie cyclique au paragraphe III.1.1.

III.1.3. Caractérisation du sel de ferriquinium par RPE et calculs théoriques

En solution aqueuse, il a été mis en évidence par RMN que le cation ferriquinium FQ^+ paramagnétique est rapidement réduit en FQ diamagnétique. En effet, lorsque l'on solubilise le cation FQ^+ dans l'eau pour l'analyser par spectroscopie RMN, on observe le spectre de la FQ et non celui de FQ^+ comme attendu. Le sel de ferriquinium n'est pas stable en solution ou alors se trouve en trop faible concentration pour être détectable par les méthodes de spectroscopie RMN. Pour caractériser complètement le sel de ferriquinium, des spectres de RPE solide ont été enregistrés par le Dr. Vezin au Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (USTL) et des calculs basés sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT, density functional theory) du ferrocène et de la FQ neutre et diprotonée ont été réalisés

²³ Connelly, N.G.; Geiger, W.E. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 877-910.

en collaboration avec le Dr. Paul de l'Unité de Catalyse et de Chimie du Solide et le Dr. Buisine du Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (USTL). Pour les calculs théoriques, les structures cristallines de la FQ déterminées par le Dr. Biot ont été utilisées comme point de départ.³ Les géométries moléculaires ont été totalement optimisées pour les deux espèces Fe(II) et Fe(III) avec les différents états de spin.

Le spectre CW-RPE du sel de ferriquinium paramagnétique présente une large bande à 150 G centré à $g = 2,01$ comme Prins et *coll.* ont décrit précédemment pour le sel de ferricinium.²⁴ Ces signaux sont caractéristiques du Fe(III) dans son état de spin doublet ($S = 1/2$). Ces résultats sont cohérents avec les calculs théoriques pour lesquels l'état doublet du Fe(III) est prédit comme étant le plus stable.

Les énergies de formation de l'état de spin doublet du Fe(III) à partir de l'état de spin singulet du Fe(II) ont également été estimées par calculs DFT et sont en accord avec les variations des valeurs de potentiel $E_{1/2}$ obtenues par voltamétrie cyclique (paragraphe III.1.1). Les différences d'énergie entre les états électroniques de Fe(III) et Fe(II) sont estimées à 152, 160 et 209 kcal/mol pour le ferrocène, la FQ neutre et diprotonée, respectivement. Ces résultats confirment que la FQ diprotonée est l'espèce la plus difficile à oxyder comme il a été mis en évidence par voltamétrie cyclique (paragraphe III.1.1).

III.2. La ferroquine : catalyseur de la réaction de Haber-Weiss

Dans des conditions oxydantes, les ions ferreux Fe(II) libre ou présent dans le ferrocène¹³ sont connus pour leur aptitude à catalyser des réactions de Haber-Weiss (réaction de type Fenton) conduisant à la formation de radicaux hydroxyles $\text{HO}^\bullet$:



Nous avons donc suggéré que la FQ pouvait également intervenir dans des réactions de type Fenton de part la présence du groupement ferrocénique dans la molécule (schéma 8).

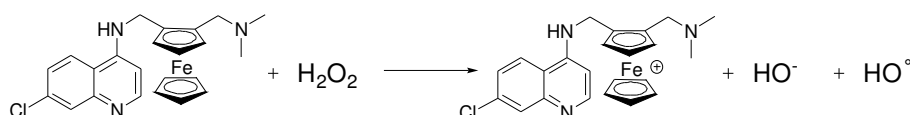


Schéma 8 : Réaction de Fenton catalysée par la ferroquine.

²⁴ Prins, R.; Reinders, F.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 4929-4931.

Afin de mettre en évidence cette réaction de catalyse, nous avons utilisé la technique de piégeage de radicaux libres (« spin-trapping »). Les manipulations ont été réalisées en collaboration avec N. Touati du Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (USTL).

III.2.1. Technique de piégeage de radicaux libres

Les radicaux libres sont des entités possédant un électron célibataire. Ces entités présentent une très grande réactivité et sont généralement instables du fait d'une durée de vie très faible. La spectroscopie RPE est utilisée pour détecter la formation de radicaux libres uniquement lorsque la durée de vie est longue. Dans le cas de radicaux à durée de vie courte, comme les radicaux hydroxyles, la mise en évidence de la formation d'espèces radicalaires transitoires nécessite l'utilisation de la technique de piégeage de radicaux libres (« spin trapping »).

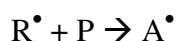


Schéma 9 : Principe de la technique de piégeage de radicaux libres.

La technique de piégeage de radicaux libres a été mise au point par le Pr. Jansen en 1968. Elle consiste à utiliser un composé diamagnétique, appelé piègeur (P) (« spin-trap »), qui piège les radicaux libres ($R^{\bullet}$) pour donner un composé paramagnétique stable et observable en spectroscopie RPE, appelé adduit ($A^{\bullet}$) (schéma 9). Il est alors possible d'identifier le radical piégé par le piègeur en analysant les constantes de couplage hyperfine A de l'adduit.

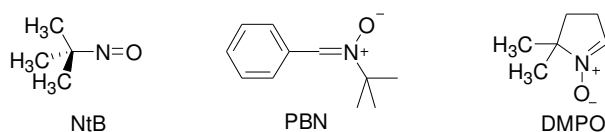


Figure 10 : Structures chimiques de quelques piègeurs de radicaux libres.

Deux types de piègeurs sont principalement employés (figure 10) :

- les dérivés nitroso dont le plus utilisé est le 2-méthyl-2-nitroso-propane (NtB)
- les nitrones dont les plus utilisés sont la α -phényl-*n*-terbutyl-nitrone (PBN) et le 5,5-diméthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (DMPO)

Les dérivés nitroso sont généralement plus sensibles que les nitrones du fait que l'atome portant l'électron célibataire de l'espèce radicalaire formée lors du piégeage du radical libre se situe plus près du noyau paramagnétique. Bien qu'étant plus sensibles, les dérivés nitroso donnent des solutions instables, sensibles à la lumière et à la température. Ils ont également tendance à se dimériser et sont par conséquent, non utilisables pour la technique de piégeage de radicaux libres. Les nitrones, quant à elles, donnent des solutions très stables, faciles à manipuler et sont de plus très adaptées pour le piégeage de radicaux oxygénés. Les adduits formés avec le PBN sont plus stables mais ceux formés avec le DMPO conduisent à des spectres plus caractéristiques de l'adduit. De plus, le DMPO est mieux adapté pour le piégeage de petits radicaux libres.

La constante de couplage hyperfine avec un proton $H\beta$ suit l'équation de Heller-McConnel :

$$A_{H\beta} = A + B.\cos^2\theta$$

Avec θ = angle dièdre entre le plan formé par l'orbitale $2p_z$ de l'azote et la liaison C-N et le plan formé par les liaisons C-H et C-N

Le piègeur de radicaux DMPO possède une conformation rigide due au cycle qui place l'hydrogène $H\beta$ pratiquement en position éclipsée avec l'orbitale $2p_z$ de l'azote (schéma 11). L'angle θ est petit et la constante de couplage hyperfine $A_{H\beta}$ est grande. Par conséquent, de petits changements stéréoélectroniques dus au radical piégé provoquent des modifications importantes de la constante de couplage hyperfine $A_{H\beta}$.

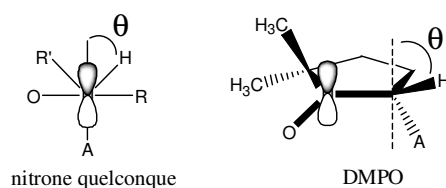
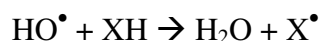


Schéma 11 : Définition du paramètre θ de l'équation de Heller-McConnel.

La détection d'un spectre de DMPO-OH ne signifie pas forcément que des radicaux $HO^\bullet$ ont été piégés par le DMPO. Différentes voies de formation de DMPO-OH, autres que celle correspondant au piégeage des radicaux $HO^\bullet$ par le DMPO sont possibles. Par exemple, l'adduit DMPO-OOH instable peut se transformer partiellement en DMPO-OH. Il est donc

possible d'obtenir l'adduit DMPO-OH sans qu'il y ait formation de $\text{HO}^\bullet$ dans le milieu. Afin de s'assurer le piégeage par le DMPO de radicaux hydroxyles formés, on ajoute dans le milieu une molécule XH comme le DMSO ou l'éthanol sur laquelle le radical hydroxyle pourra réagir suivant la réaction :



Le radical $\text{X}^\bullet$ ($\text{CH}_3^\bullet$ ou $\text{EtO}^\bullet$) ainsi formé pourra également être piégé par le DMPO, les signaux RPE des adduits formés étant différents de ceux du DMPO-OH (figure 12).

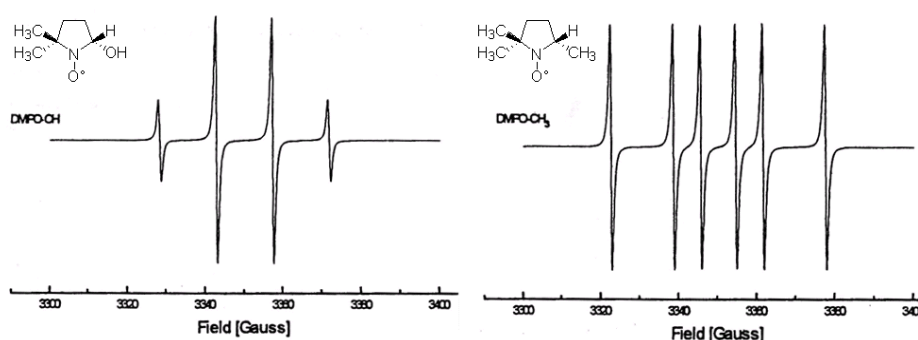


Figure 12 : Spectres RPE simulés des adduits DMPO-OH et DMPO-CH₃.

III.2.2. Mise en évidence de la formation de radicaux hydroxyles par la ferroquine (réaction de Fenton)

Le piègeur de spin utilisé pour observer la formation des radicaux $\text{HO}^\bullet$ est le DMPO. Les conditions d'oxydation ont été induites par addition de solutions de H_2O_2 à deux concentrations différentes, 1 et 15 mM, la deuxième concentration étant supposée être celle rencontrée dans la vacuole digestive du parasite.¹⁶ Etant donné que le pH de la vacuole digestive du parasite est aux environs de 5 (voir chapitre I), seule la forme protonée de la FQ a été testée pour son aptitude à former des radicaux.

Le spectre RPE est donné en figure 13. On observe un quadruplet d'intensité 1:2:2:1 avec des constantes de couplage hyperfines, $a_{\text{H}} = a_{\text{N}} = 14,9$ G, caractéristiques du piégeage de radicaux hydroxyles par le DMPO. Ces résultats mettent en évidence la formation de radicaux hydroxyles lors de cette réaction de catalyse.

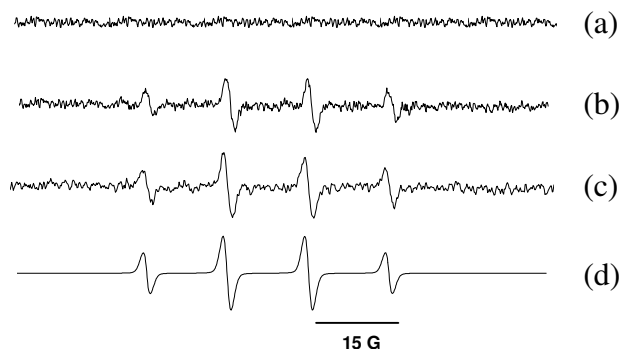


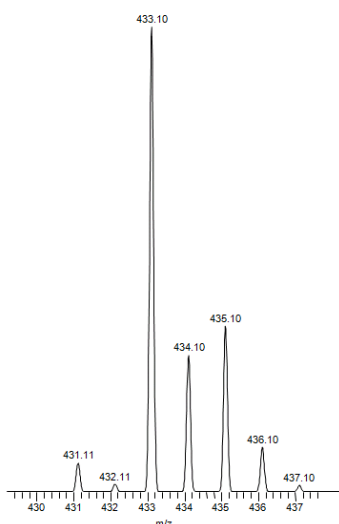
Figure 13 : Spectre RPE de piégeage de radicaux à température ambiante (a) CQ (1 mM), H_2O_2 (15 mM) (b) FQ.2HCl (1 mM), H_2O_2 (1 mM) (c) FQ.2HCl (1 mM), H_2O_2 (15 mM) (d) spectre simulé avec des constantes de couplage hyperfines de $a_{\text{H}} = a_{\text{N}} = 14,9$ G. La concentration finale en DMPO est de 0,16 M.

La quantité de radicaux $\text{HO}^\bullet$ formés lors de la réaction de Fenton catalysée par FQ.2HCl a été quantifiée par une double intégration du spectre RPE. Comme référence d'intensité, nous avons pris le 2,2,6,6-tétraméthylpipéridinyl-1-oxyle (TEMPO) à une concentration de 0,1 mM dans le méthanol. Une production de radicaux hydroxyles de 0,47 et 2,55 μM a été mesurée à des concentrations en FQ.2HCl de 1 et 15 mM, respectivement. Ces résultats confirment l'oxydation lente de la FQ diprotonée, comme il a été mis en évidence par voltamétrie cyclique (paragraphe III.1.1) et prédit par calculs théoriques (paragraphe III.1.3).

III.3. Stabilité de la ferroquine en présence de H_2O_2

La stabilité de la FQ a été étudiée dans des conditions mimant les conditions oxydantes de la vacuole digestive du parasite. Durant la phase érythrocytaire du parasite, la formation de peroxyde d'hydrogène a lieu uniquement lorsque le parasite dégrade le contenu des globules rouges de l'hôte. En effet, la dégradation de l'hémoglobine dans la vacuole digestive est accompagnée par la libération d'hème libre et par la production d'anions superoxyde qui se dismutent en H_2O_2 .

La spectrométrie de masse MALDI-TOF a été utilisée pour étudier la stabilité de la FQ dans l'eau en présence de H_2O_2 . Les manipulations ont été réalisées avec l'aide du Dr. Page du Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (USTL). Différentes concentrations en H_2O_2 ont été utilisées : 1, 10 et 100 mM. Les solutions finales contenant 1 mM de FQ en présence de H_2O_2 dans l'eau ont été déposées sur la matrice après différents temps de réaction.



Spectre 14 : Simulation du profil de distribution isotopique du pic m/z à 434 de la ferroquine.

La FQ a été détectée sur le spectre MALDI-TOF à un rapport masse sur charge m/z de 434 pour l'isotope du ^{35}Cl et 436 pour l'isotope du ^{37}Cl avec un profil de distribution isotopique correspondant à la présence de Fe et de Cl (spectre 14). Les analyses de masse montrent que l'oxydation de la FQ a lieu mais elle a été détectée uniquement après 6 h avec une concentration en H_2O_2 de 100 mM ou après 31 h avec une concentration en H_2O_2 de 10 mM. Cette oxydation lente conduit à la formation de l'oxyde de 7-chloro-4-(2-(*N,N*-diméthylamino méthyl)ferrocénylméthylaminoquinoléine détecté à m/z de 449 (^{35}Cl) et 451 (^{37}Cl) et identifié comme étant un métabolite mineur de la FQ (voir chapitre I).¹² La disparition du pic de masse attribué à la FQ est observée uniquement après 31 h d'incubation de la FQ à une concentration en H_2O_2 de 100 mM. La dégradation de la FQ est observée par la détection du fragment à m/z de 389 (^{35}Cl) et 391 (^{37}Cl) résultant de la perte du groupement diméthylamine (figure 15).

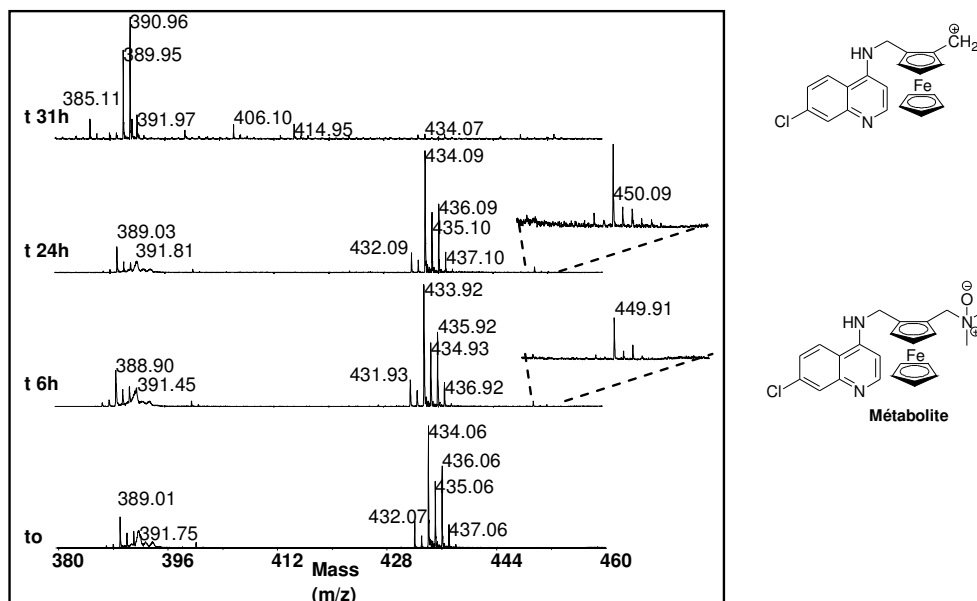


Figure 15 : Spectre MALDI-TOF de la solution de FQ à 1 mM en présence de 100 équivalents de H_2O_2 à t_0 et après 6, 24 et 31 h de réaction.

III.4. Activité redox de la FQ dans les conditions oxydantes de la vacuole digestive de *P. falciparum*

Dans les conditions oxydantes mimant les conditions de la vacuole digestive, la FQ montre une réaction redox réversible à un électron qui conduit à la formation de l'ion ferriquinium et à la génération de radicaux hydroxyles avec des cinétiques relevantes pour l'activité antipaludique sur *P. falciparum*.

Il a été montré que la CQ pouvait induire la production de ROS dans les cellules astrogliales par une voie mettant en jeu le facteur nucléaire NFκ-B.^{25,26} Dans les globules rouges, dépourvus de noyau, cette voie ne peut pas avoir lieu. Les expériences de piégeage de radicaux montrent que la CQ n'est pas capable de produire des radicaux hydroxyles en présence de peroxyde d'hydrogène au pH vacuolaire. En revanche, dans les mêmes conditions expérimentales, des radicaux hydroxyles sont produits par la FQ à des concentrations micromolaires. Cette faible production de radicaux hydroxyles devrait être suffisante pour induire des dommages significatifs chez le parasite du fait de la grande réactivité de ces radicaux.

Ces nouveaux résultats nous laissent penser que l'activité antipaludique de la FQ ne repose pas uniquement sur l'inhibition de la formation de l'hémozoïne mais également sur la

²⁵ Park et al. *J. Neurochem.* **2003**, 84, 1266-1274.

²⁶ Park et al. *Glia.* **2004**, 47, 9-20.

production de radicaux hydroxyles létaux. En effet, les radicaux sont connus pour être particulièrement agressifs envers les acides gras insaturés présents dans les phospholipides des membranes (réactions de peroxydation des membranes).²⁷ Comme nous l'avons vu au paragraphe I, de par sa grande lipophilie, la FQ est supposée se placer à l'interface eau/lipide où la croissance du cristal d'hémozoïne doit avoir lieu. Par la production de radicaux hydroxyles, la FQ induirait donc la peroxydation des lipides mis en jeu dans le mécanisme de formation de l'hémozoïne et de ce fait, accélérerait l'inhibition de cette formation.

Des expériences complémentaires seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse. L'attaque des radicaux hydroxyles sur les acides gras produit des produits secondaires comme du malonaldéhyde ou de l'hydroxynonenal qui peuvent être titrés.^{27,28} De plus, le malonaldéhyde réagit avec les fonctions amines libres des acides aminés basiques qui conduit à la formation de ponts amino-imino-propène qui peuvent être reconnus par des anticorps spécifiques^{29,30} dans les tests ELISA, Western ou dot blots et par examination indirecte de l'immunofluorescence des cellules.³¹ La comparaison de l'action de la CQ et de la FQ sur les parasites devrait amener des informations complémentaires sur l'importance du mécanisme de production de ROS que nous avons proposé pour la FQ.

Un mécanisme d'action similaire a été observé pour le clotrimazole. Trivedi et *coll.* ont démontré que le clotrimazole pouvait produire des radicaux hydroxyles par une réaction d'oxydation à un électron en présence de H₂O₂.³² En effet, en présence de H₂O₂, le clotrimazole inactive de façon irréversible l'hémopéroxydase ce qui provoque un stress oxydant chez *Plasmodium falciparum*. En effet, l'inhibition de l'hémopéroxydase augmenterait l'accumulation de H₂O₂ chez *P. falciparum*. L'inhibition de l'hémopéroxydase corrèle bien avec l'inhibition de la croissance du parasite. De plus, il a été montré que le produit d'oxydation du clotrimazole interagissait avec l'hème. La production d'espèces oxygénées réactives semble donc être un mécanisme d'action valide pour expliquer l'activité de certains composés antipaludiques.

²⁷ Cherubini et al. *Free Radical Biol. Med.* **2005**, 39, 841-852.

²⁸ Meagher, E.A.; FitzGerald, G.A. *Free Radical Biol. Med.* **2000**, 28, 1745-1750.

²⁹ Petit et al. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1995**, 36, 355-364.

³⁰ Chancerelle, Y.; Mathieu, J.; Kergonou, J.F. *Methods Mol. Biol.* **1998**, 108, 111-118.

³¹ Storme et al. *Biol. Neonate* **1998**, 73, 172-181.

³² Trivedi et al. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 41129-41136.

IV. Réévaluation de l'accumulation de la ferroquine dans la vacuole digestive du parasite

Nous avons vu au paragraphe I que la grande lipophilie de la FQ (100 fois plus lipophile que la CQ) semblait contribuer à sa forte activité antipaludique. Or, il a été montré au chapitre II, que les nouveaux dérivés de la FQ **20-24** présentant un substituant alkyle en position 11 de la FQ, sont plus lipophiles que la FQ mais possèdent une moins bonne activité antipaludique. Il semble donc nécessaire de réévaluer le comportement de la CQ et de la FQ à différents pH ainsi que leur accumulation dans la vacuole digestive du parasite.

Sullivan et *coll.* supposent que la CQ s'accumule dans la vacuole digestive du parasite avec un rapport d'environ 20 000 entre sa concentration vacuolaire et celle dans le milieu extracellulaire.² Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer cette accumulation vacuolaire de CQ. L'accumulation proviendrait de la participation d'un transporteur perméase spécifique³³ qui pourrait être un échangeur Na^+/H^+ . Ce transporteur serait stimulé par la présence de CQ chez les clones CQ-sensibles mais pas chez les clones CQ-résistants.³⁴ Cette hypothèse a été réfutée par Bray et *coll.* qui suggèrent que la pénétration de CQ dans la vacuole digestive serait due à une interaction forte de CQ avec l'hématine³⁵ mais il semble que ce mécanisme ne représenterait qu'une petite fraction de CQ accumulée.³⁶ En l'absence de transporteur spécifique, à l'heure actuelle, il semble donc que l'accumulation de la CQ dans la vacuole digestive du parasite soit due au gradient de pH entre la vacuole et le cytosol.

Ward et *coll.* ont utilisé un rapport d'accumulation vacuolaire (VAR, vacuolar accumulation ratio) pour rendre compte de l'accumulation des drogues dans la vacuole digestive du parasite.³⁷ En se basant sur les connaissances des valeurs de pKa des molécules, la distribution de la drogue dans la vacuole digestive du parasite a donc été définie par l'équation suivante (établie par Krogstad et Schlesinger)³⁸:

$$\text{VAR} = \frac{[\text{Droque}]_v}{[\text{Droque}]_e} = \frac{1 + 10^{(\text{pKa1} - \text{pH}_v)} + 10^{(\text{pKa1} + \text{pKa2} - 2\text{pH}_v)}}{1 + 10^{(\text{pKa1} - \text{pH}_e)} + 10^{(\text{pKa1} + \text{pKa2} - 2\text{pH}_e)}}$$

Avec : pH_v = pH dans la vacuole digestive et pH_e = pH du milieu extracellulaire

³³ Bray et al. *Mol. Pharmacol.* **1998**, 54, 170-179.

³⁴ Wunsch et al. *J. Cell. Biol.* **1998**, 140, 335-345.

³⁵ Bray et al. *J. Cell. Biol.* **1999**, 145, 363-376.

³⁶ Egan, T.J. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2001**, 1, 113-123.

³⁷ Hawley et al. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, 52, 723-733.

³⁸ Krogstad, D.J.; Schlesinger, P.H. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, 35, 547-552.

Cette équation suppose que (i) le gradient de proton entre le cytosol et la vacuole digestive du parasite soit de 2,4 unités de pH, (ii) les molécules chargées (protonées) soient imperméables aux membranes et (iii) il n'y ait pas de liaison intracellulaire de la drogue.

Warhurst et *coll.* suggèrent que si les $\log D$ de la molécule ont été calculées aux pHs vacuolaire et cytosolique en utilisant les $\log P$ et pK_a observés, la formule définissant le VAR peut être simplifiée :

D'après la définition du $\log D$:

$$\log D = \log P - \log[1 + 10^{(pK_{a1}-pH)} + 10^{(pK_{a1}+pK_{a2}-2pH)}]$$

On obtient :

$$VAR = 10^{(\log D_e - \log D_v)}$$

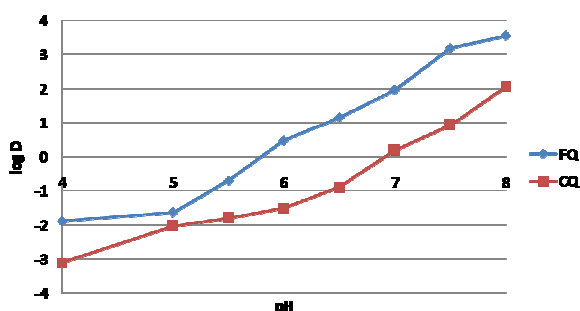
Avec : $\log D_e$ et $\log D_v$ les coefficients de distribution dans le milieu extracellulaire et la vacuole digestive, respectivement.

Les VAR de la FQ et de la CQ ont été calculés par Biot et *coll. in silico* à partir des valeurs de $\log D$ calculées à partir des pK_a ($pK_{a1} = 8,19$ versus 10,03 ; $pK_{a2} = 6,99$ versus 7,94, respectivement) et du $\log P$ (5,10 versus 4,65 respectivement).³ Un VAR de 6402 est observé pour la FQ alors qu'il est de 19521 pour la CQ. Ces valeurs laissent supposer que la FQ s'accumulerait environ 3 fois moins que la CQ dans la vacuole digestive du parasite. En revanche, lorsque l'on calcule les VAR à partir des valeurs de $\log D$ mesurées, on obtient un VAR de 5248 pour la FQ contre 112 pour la CQ. Cette méthode alternative basée sur les valeurs de $\log D$ expérimentales mène vers des résultats contradictoires : la FQ s'accumulerait environ 50 fois plus que la CQ.

Ces résultats contradictoires montrent que l'évaluation de l'accumulation des drogues dans la vacuole digestive n'est pas encore bien établie. Une détermination expérimentale serait nécessaire pour résoudre ce problème ce qui n'est pas évident. Nous pensons que la seconde méthode de calcul du VAR est la mieux adaptée pour rendre compte du phénomène. En effet, le VAR étant fonction du $\log D$, la plus grande lipophilie de la FQ par rapport à la CQ devrait induire une plus forte accumulation. De plus, en utilisant la seconde méthode de calcul, un seul paramètre ($\log D$) est mis en jeu contre deux avec la première méthode (pK_a et

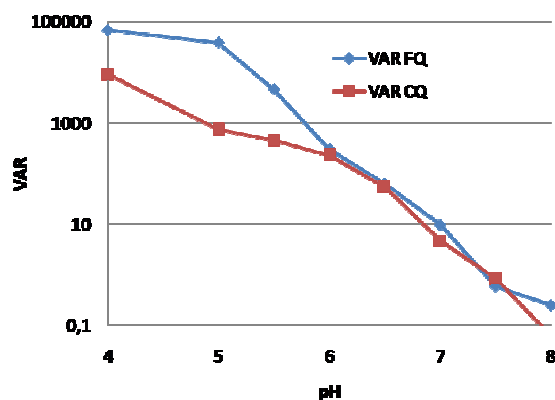
$\log P$) ce qui diminue les erreurs de détermination des VAR dues à l'expérimentation. Finalement, il est à noter que les valeurs de pK_a et de $\log P$ n'ont pas été déterminées dans les mêmes systèmes de solvant : les pK_a ont été mesurés dans le mélange dioxane/eau qui ne représente pas les conditions physiologiques et les $\log P$ ont été déterminés dans le mélange octanol/eau par Sanofi-Aventis. Les erreurs sur le calcul du VAR sont donc plus susceptibles d'exister.

Lors de ces calculs de VAR, seulement deux pH (cytosolique et vacuolaire) sont pris en compte. Ceci ne représente pas au mieux les conditions d'accumulation chez le parasite où il existe un gradient de pH entre les milieux extérieur et intérieur de la vacuole digestive. Dans le cadre de cette thèse, nous avons donc entrepris une étude plus précise du comportement de la FQ en comparaison avec la CQ en effectuant des mesures de $\log D$ à différents pH. Ces mesures ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Forfar au laboratoire de pharmacochimie de l'Université Victor Segalen de Bordeaux 2 (graphe 16).



Graphe 16 : Coefficients de partition de la ferroquine et de la chloroquine en fonction du pH.

Le graphe 16 montre que le $\log D$ varie en fonction du pH aussi bien pour la FQ que pour la CQ dans la gamme étudiée. De manière générale, la FQ est plus lipophile que la CQ d'environ 2 unités de $\log D$ en moyenne. Pour se rendre compte de manière plus significative du comportement des deux molécules en fonction du pH, les VAR correspondant à chaque valeur de $\log D$ ont été calculés et ont été reportés graphiquement en fonction du pH (graphe 17).



Graphique 17 : Rapport d'accumulation vacuolaire de la ferroquine et de la chloroquine en fonction du pH.

Entre les valeurs de pH 6 et 8, les rapports VAR de la FQ et de la CQ sont très similaires et diminuent avec l'augmentation du pH. Une différence de comportement est observée en dessous de pH 6. Aux valeurs de pH plus acides, la FQ semble s'accumuler beaucoup plus que la CQ. Les deux molécules auraient un comportement similaire hors de la vacuole digestive mais différent à l'intérieur. La FQ, de par son groupement ferrocénique hydrophobe, se maintiendrait plus facilement dans le compartiment acide où elle inhiberait la croissance du cristal d'hémozoïne. De plus, comme il a été montré au chapitre II, la FQ possède une liaison hydrogène intramoléculaire qui lui donne une conformation coudée. Cette conformation particulière rend disponible le ferrocène et permet à la FQ de se placer au niveau de la membrane vacuolaire, supposée être le lieu de formation de l'hémozoïne et d'inhiber la croissance du cristal.

V. Conclusion

Le mécanisme d'action principal supposé de la FQ a reposé longtemps sur une liaison à l'hématine et l'inhibition de la croissance du cristal d'hémozoïne, du fait de sa ressemblance avec la CQ. Dans ce chapitre, nous avons montré que les propriétés redox de la FQ peuvent également contribuer au mécanisme d'action de la FQ. En effet, la FQ est capable de générer des radicaux libres à partir de H_2O_2 par réaction de Fenton. Dans les conditions oxydantes de la vacuole digestive du parasite, cette production de radicaux hydroxyles n'est pas suffisante pour endommager la molécule de FQ mais elle est néanmoins suffisante pour provoquer des dommages importants chez le parasite. La FQ, très lipophile, est supposée se placer à l'interface eau/lipide qui est supposée catalyser la formation de l'hémozoïne. De plus, sa liaison hydrogène intramoléculaire lui donne une conformation coudée particulière qui rend le

ferrocène hydrophobe plus disponible et aiderait la molécule à se placer au niveau de la membrane de la vacuole digestive du parasite et provoquerait des réactions de peroxydation de ces membranes. De plus, les nouvelles études physicochimiques concernant la FQ laissent penser que la FQ s'accumulerait 50 fois plus que la CQ dans la vacuole digestive du parasite. Le maintien de la FQ dans la vacuole digestive est probablement dû à la présence du groupement hydrophobe ferrocénique. La figure 18 récapitule les relations structure-activité proposées pour la FQ.

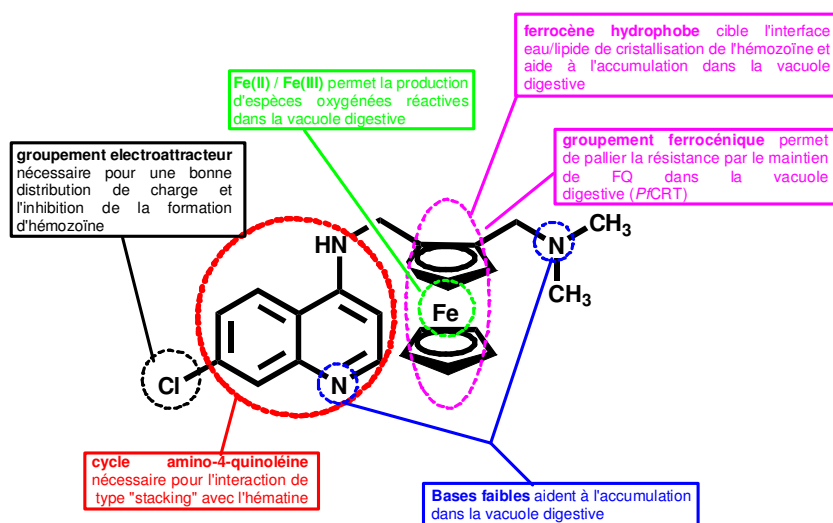


Figure 18 : Relations Structure-Activité proposées pour la FQ.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Parapini, S.; Basilico, N.; Pasini, E.; Egan, T. J.; Olliario, P.; Taramelli, D.; Monti, D. Standardization of the physico-chemical parameters to assess in vitro the β -Hematin Inhibitory Activity (BHIA) of antimalarial drugs. *Exp. Parasitol.* **2000**, *96*, 249-256.
- [2] Sullivan, D.J. Jr.; Gluzman, I.Y.; Russel, D.G.; Goldberg, D.E. On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1996**, *93*, 11865-11870.
- [3] Biot, C.; Taramelli, D.; Forfar-Bares, I.; Maciejewski, L.A.; Boyce, M.; Nowogrocki, G.; Brocard, J.S.; Basilico, N.; Olliario, P.; Egan, T.J. Insights into the mechanism of action of ferroquine. Relationship between physicochemical properties and antiplasmodial activity. *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 185-193.
- [4] Egan, T.J.; Hunter, R.; Kaschula, C.H.; Marques, H.M.; Misplon, A.; Walden, J. Structure-function relationships in aminoquinolines: effect of amino and chloro groups on quinoline-hematin complex formation, inhibition of beta-hematin formation, and antiplasmodial activity. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 283-291.
- [5] Leed, A.; DuBay, K.; Ursos, L.M.; Sears, D.; De Dios, A.C.; Roepe, P.D. Solution structures of antimalarial drug-heme complexes. *Biochemistry.* **2002**, *41*, 10245-10255.
- [6] Cooper, R.A.; Ferdig, M.T.; Su, X.Z.; Ursos, L.M.; Mu, J.; Nomura, T.; Fujioka, H.; Fidock, D.A.; Roepe, P.D.; Wellems, T.E. Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein *PfCRT* are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 35-42.
- [7] Sanchez, C.P.; McLean, J.E.; Stein, W.; Lanzer, M. Evidence for a substrate specific and inhibitable drug efflux system in chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* strains. *Biochemistry.* **2004**, *43*, 16365-16373.
- [8] Krogstad, D.J.; Gluzman, I.Y.; Kyle, D.E.; Oduola, A.M.; Martin, S.K.; Milhous, W.K.; Schlesinger, P.H. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science.* **1987**, *238*, 1283-1285.
- [9] Martin, S.K.; Oduola, A.M.; Milhous, W.K. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science.* **1987**, *235*, 899-901.
- [10] Fidock, D.A.; Nomura, T.; Talley, A.K.; Cooper, R.A.; Dzekunov, S.M.; Ferdig, M.T.; Ursos, L.M.; Sidhu, A.B.S.; Naude, B.; Deitsch, K.; Su, X.-Z.; Wootton, J.C.; Roepe, P.D.; Wellems, T.E. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *PfCRT* and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol. Cell.* **2000**, *6*, 861-871.
- [11] Warhurst, D.C. Polymorphism in the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance transporter protein links verapamil enhancement of chloroquine sensitivity with the clinical efficacy of amodiaquine. *Malar. J.* **2003**, *2*, 1-12.
- [12] Daher, W.; Biot, C.; Fandeur, T.; Jouin, H.; Pelinski, L.; Viscogliosi, E.; Fraisse, L.; Pradines, B.; Brocard, J.; Khalife, J.; Dive, D. Assessment of *Plasmodium falciparum* resistance to ferroquine (SSR97193) in field isolates and in W2 strain under pressure. *Malar. J.* **2006**, *5*, 11.
- [13] Hillard, E.; Vessieres, A.; Thouin, L.; Jaouen, G.; Amatore, C. Ferrocene-Mediated Proton-Coupled Electron Transfer in a Series of Ferrocifen-Type Breast-Cancer Drug Candidates. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 285-290.
- [14] Schatzschneider, U.; Metzler-Nolte, N. New principles in medicinal organometallic chemistry. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1504-1507.

- [15] Wu, X.; Tiekink, E.R.T.; Koteski, I.; Kocherginsky, N.; Tan, A.L.C.; Khoo, S.B.; Wilairat, P.; Go, M.-L. Antiplasmodial activity of ferrocenyl chalcones: investigations into the role of ferrocene. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *27*, 175-187.
- [16] Kannan, R.; Kumar, K.; Sahal, D.; Kukreti, S.; Chauhan, V. S. Reaction of artemisinin with hemeoglobin: implications for antimalarial activity. *Biochem. J.* **2005**, *385*, 409-418.
- [17] Lemoine, P.; Gross, M.; Braunstein, P.; Mathey, F.; Deschamps, B.; Nelson, J.H. Electrochemistry of Phosphoferrocenes. 1. Comparison of the redox properties of ferrocene diphosphaferrocene, 3,4-dimethyl-1-phosphoferrocene, and 3,3',4,4'-tetramethyl-1,1'-diphosphoferrocene. *Organometallics*. **1984**, *3*, 1303-1307.
- [18] Zanello, P.; Cinquantini, A.; Mangani, S.; Opromolla, G.; Pardi, L.; Janiak, C.; Rausch, M.D. The redox behaviour of ferrocene derivatives: VI. Benzylferrocenes. The crystal structure of decabenzylferrocenium tetrafluoroborate. *J. Organomet. Chem.* **1994**, *471*, 171-177.
- [19] Martinez, R.; Tiripicchio, A. Structure of ferrocenium hexafluorophosphate. *Acta Crystallogr.* **1990**, *C46*, 202-205.
- [20] Pickardt, J.; Schumann, H.; Mohtachemi, R. Structure of decamethylferrocenium tribromide. *Acta Crystallogr.* **1990**, *C46*, 39-41.
- [21] Rausch, M.D.; Tsai, W.M.; Chambers, J.W.; Rogers, R.D.; Alt, H.G. Synthetic and x-ray structural studies on pentabenzylcyclopentadienyl derivatives of manganese, rhenium, and iron. *Organometallics* **1989**, *8*, 816-821.
- [22] Seiler, P.; Dunitz, J.D. A new interpretation of the disordered crystal structure of ferrocene. *Acta Crystallogr.* **1979**, *B35*, 1068-1074.
- [23] Connelly, N.G.; Geiger, W.E. Chemical Redox Agents for Organometallic Chemistry. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 877-910.
- [24] Prins, R.; Reinders, F.J. Electron spin resonance of the cation of ferrocene. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 4929-4931.
- [25] Park, J.; Kwon, D.; Choi, C.; Oh, J.-W.; Benveniste, E.N. Chloroquine induces activation of nuclear factor-B and subsequent expression of pro-inflammatory cytokines by human astroglial cells. *J. Neurochem.* **2003**, *84*, 1266-1274.
- [26] Park, J.; Choi, K.; Jeong, E.; Kwon, D.; Benveniste, E.N.; Choi, C. Reactive oxygen species mediate chloroquine-induced expression of chemokines by human astroglial cells. *Glia*. **2004**, *47*, 9-20.
- [27] Cherubini, A.; Ruggiero, C.; Polidori, M.C.; Mecocci, P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biol. Med.* **2005**, *39*, 841-852.
- [28] Meagher, E.A.; FitzGerald, G.A. Indices of lipid peroxidation *in vivo*: strengths and limitations. *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *28*, 1745-1750.
- [29] Petit, E.; Chancerelle, Y.; Dumont, E.; Divoux, D.; Kergonou, F.; Nouvelot, A. Polyclonal antibodies against malondialdehydmodified proteins: characterization and application in study of *in vitro* lipid peroxidation of cellular membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1995**, *36*, 355-364.
- [30] Chancerelle, Y.; Mathieu, J.; Kergonou, J.F. Antibodies against malondialdehyde-modified proteins. Induction and ELISA measurement of specific antibodies. *Methods Mol. Biol.* **1998**, *108*, 111-118.
- [31] Storme, L.; Zerimech, F.; Riou, Y.; Martin-Ponthieu, A.; Devisme, L.; Slomianny, C.; Klosowski, S.; Dewailly, E.; Cneude, F.; Zandecki, M.; Dupuis, B.; Lequien, P. Inhaled nitric oxide neither alters oxidative

stress parameters nor induces lung inflammation in premature lambs with moderate hyaline membrane disease. *Biol. Neonate* **1998**, *73*, 172-181.

[32] Trivedi, V.; Chand, P.; Srivastava, K.; Puri, S.K.; Maulik, P.R.; Bandyopadhyay, U. Clotrimazole Inhibits Hemoperoxidase of *Plasmodium falciparum* and Induces Oxidative Stress. Proposed antimalarial mechanism of clotrimazole. *J. Biol.Chem.* **2005**, *280*, 41129-41136.

[33] Bray, P.G.; Mungthin, M.; Mungthin, M.; Ridley, R.G.; Ward, S.A. Access to hemozoin: the basis of chloroquine resistance. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 170-179.

[34] Wunsch, S.; Sanchez, C.P.; Gekle, M.; Grosse-Wortmann, L.; Wiesner, J.; Lanzer, M. Differential stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger determines chloroquine uptake in *Plasmodium falciparum*. *J. Cell. Biol.* **1998**, *140*, 335-345.

[35] Bray, P.G.; Janneh, O.; Raynes, K.J.; Mungthin, M.; Ginsburg, H.; Ward, S.A. Cellular uptake of chloroquine is dependent on binding to ferriprotoporphyrin IX and is independent of NHE activity in *Plasmodium falciparum*. *J. Cell. Biol.* **1999**, *145*, 363-376.

[36] Egan, T.J. Structure-function relationships in chloroquine and related 4-aminoquinoline antimalarials. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 113-123.

[37] Hawley, S.R.; Bray, P.G.; O'Neill, P.M.; Park, B.K.; Ward, S.A. The Role of Drug Accumulation in 4-Aminoquinoline Antimalarial Potency. The influence of structural substitution and physicochemical properties. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*, 723-733.

[38] Krogstad, D.J.; Schlesinger, P.H. A perspective on antimalarial action: effects of weak bases on *Plasmodium falciparum*. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35*, 547-552.

Investigation of the Redox Behavior of Ferroquine, a New Antimalarial

Natascha Chavain,[†] Hervé Vezin,[‡] Daniel Dive,[§] Nadia Touati,[‡]
Jean-François Paul,[†] Eric Buisine,[‡] and Christophe Biot^{*,†}

Université des Sciences et Technologies de Lille, Unité de Catalyse et Chimie du Solide—UMR CNRS 8181, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille, Bâtiment C7, B.P. 90108, 59652 Villeneuve d'Ascq cedex, France, Université des Sciences et Technologies de Lille, Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire—UMR CNRS 8009, Bâtiment C4, B.P. 90108, 59652, Villeneuve d'Ascq cedex, France, and Inserm U547, Institut Pasteur, 1 rue du Pr Calmette, B.P. 245, 59019 Lille Cedex, France

Received January 17, 2008; Revised Manuscript Received April 7, 2008; Accepted May 22, 2008

Abstract: Ferroquine (FQ or SR97193) is a unique ferrocene antimalarial drug candidate which just entered phase IIb clinical trials in autumn 2007. FQ is able to overcome the chloroquine (CQ) resistance problem, an important limit to the control of *Plasmodium falciparum*, the principal causative agent of malaria. However, as for other therapeutic agents such as chloroquine (CQ) and artemisin, its mechanism of action remains partially unknown. Most investigations have so far focused on comparing the activity of FQ to that of CQ in order to understand how the ferrocene core contributes to a stronger antiparasitic activity. Studies have already shown that the ferrocene altered the shape, volume, lipophilicity, basicity and also electronic profile of the parent molecule and, hence, its pharmacodynamic behavior. However, few investigations have been undertaken to probe the real contribution of redox properties of the ferrocene (iron(II)/ferricinium (iron(III))) system in FQ as reported in this article. In our experimental and theoretical approach, we considered the redox profile of the ferrocene core of FQ in the specific conditions (acidic and oxidizing) of the parasitic digestive vacuole as a possible discriminating property from CQ in the antimalarial activity.

Keywords: Malaria; bioorganometallics; ferroquine; redox behavior; Fenton-like chemistry

Introduction

Ferroquine (FQ, SR97193, Figure 1) is a new antimalarial drug candidate developed by Sanofi-Aventis, currently in

phase IIb of clinical trials.^{1,2} This unique ferrocenic compound is able to overcome the chloroquine (CQ) resistance problem.^{1,3–6} Drug resistance became effectively an impor-

* Corresponding author. Mailing address: Université des Sciences et Technologies de Lille, Unité de Catalyse et Chimie du Solide—UMR CNRS 8181, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille, Bâtiment C7, B.P. 90108, 59652 Villeneuve d'Ascq cedex, France. E-mail: christophe.biot@ensc-lille.fr. Tel: +33-(0)320434893. Fax: +33-(0)320436585.

[†] Université des Sciences et Technologies de Lille, Unité de Catalyse et Chimie du Solide—UMR CNRS 8181, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille.

[‡] Université des Sciences et Technologies de Lille, Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire—UMR CNRS 8009.

[§] Inserm U547, Institut Pasteur.

- (1) Dive, D.; Biot, C. Ferrocene Conjugates of Chloroquine and other Antimalarials: the Development of Ferroquine, a New Antimalarial. *ChemMedChem*. **2007**, 3, 383–391.
- (2) <http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00563914>.
- (3) Biot, C.; Glorian, G.; Maciejewski, L.; Brocard, J.; Domarle, O.; Blampain, G.; Millet, P.; Georges, A. J.; Abessolo, H.; Dive, D.; Lebibi, J. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of a new ferrocene-chloroquine analogue. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3715–3718.
- (4) Delhaes, L.; Abessolo, H.; Biot, C.; Berry, L.; Delcourt, P.; Maciejewski, L.; Brocard, J.; Camus, D.; Dive, D. In vitro and in vivo antimalarial activity of ferrochloroquine, a ferrocenyl analogue of chloroquine against chloroquine-resistant malaria parasites. *Parasitol. Res.* **2001**, 87, 239–244.

tant limit to the control of *Plasmodium falciparum*.⁷ In this respect, FQ was revealed to be equally active on CQ-sensitive and CQ-resistant *P. falciparum* laboratory strains and field isolates.^{1,4,5} Moreover FQ showed low toxicity¹ and had no cross-resistance to CQ.⁸ With regard to their primary mechanism, both FQ and CQ molecules are paradoxically assumed to act by concentrating in the parasite digestive vacuole (DV), preventing thus the formation of hemozoin and finally leading to parasite death. So, the antimalarial properties of these two drugs have been compared in an effort to understand how the presence of the ferrocene core can contribute to a stronger antiplasmodial activity.^{1,3,4,6,8,9}

The singularity of the ferrocene unit lies of course in its shape, volume, lipophilicity, and basicity but also electronic profile.¹⁰ Ferrocene unsurprisingly affects the pharmacodynamic behavior of the parent molecule in which it is inserted.⁹ The supposed lower affinity of FQ for the postulated transporter linked to CQ resistance has been recently attributed to these atypical physicochemical properties.^{1,6} The ferrocene has also been grafted to tamoxifen, an archetypical selective estrogen receptor modulator. The hydroxyferrocifen compounds obtained revealed interestingly antiproliferative activity on breast cancer cells which are normally resistant to tamoxifen. As proposed by the authors, the ferrocene could act as an intramolecular oxidation “antenna” and facilitate the oxidative production of the putative quinone methide species responsible for the cytotoxic effect.^{11,12} As also reported for a series of ferrocenyl chalcones, the ferrocene unit contributes to the antiplasmodial activity by redox

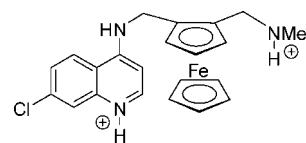


Figure 1. Chemical structure of ferroquine, diprotonated form.

cycling.¹³ More hypothetically, in the acidic parasite DV the release of free heme is accompanied by the production of superoxide anion, which rapidly dismutates to H_2O_2 .¹⁴ Under such oxidizing conditions, the ferrocenyl moiety present in FQ as iron(II) could also catalyze a Fenton-like reaction, thereby yielding hydroxyl radicals. In this context, we undertook investigations to probe the contribution of the ferrocene core to the antiplasmodial activity of FQ as a possible differentiation factor from CQ. In the present article, we report our efforts to characterize the redox profile of FQ by means of cyclic voltammetry, EPR spectroscopy, spin trapping experiments, and theoretical calculations.

Materials and Methods

Chemistry. FQ (218 mg, 0.5 mM) was diluted in dried CH_2Cl_2 (25 mL). After its complete dilution, AgBF_4 (98 mg, 0.5 mM) was added.¹⁵ The reaction mixture was stirred at room temperature during 1 h. The green precipitate of $[\text{FQ}][\text{BF}_4]$ (256 mg, 0.49 mM, 98% yield) was then filtered, and washed twice with dried diethyl ether (2×50 mL).

Cyclic Voltammetry. Electrochemical measurements were carried out on ferrocene, FQ (free base and dihydrochloride), CQ diphosphate and *N,N*-dimethylaminomethylferrocene free base (DMAF) and hydrochloride (DMAF·HCl). Ferrocene was recrystallized in ethanol–water before use, but the other compounds were used as received. DMAF·HCl was prepared in dry ether with ethanolic HCl (1 M), filtered, washed with dry ether, and dried before use. Cyclic voltammetry measurements were performed with a VoltaLab 40 system with a PGZ 301 Radiometer Analytical potentiostat. Working and auxiliary electrodes were a platinum CTV 101T and a platinum wire, respectively. The standard calomel reference electrode (SCE) was separated from the bulk of the solution by a KCl saturated solution with a glass frit. The voltammogram was recorded from a low to high potential and then reversed to the starting potential, and the scan rate in the range of 25 to 200 mV s^{-1} was measured for each compound. The electrolyte support salt was tetraethylammonium perchlorate (0.1 N). All solutions were prepared with

- (5) Biot, C. Ferroquine: A New Weapon in the Fight Against Malaria. *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents* **2004**, 3, 135–147.
- (6) Daher, W.; Biot, C.; Fandeur, T.; Jouin, H.; Pelinski, L.; Viscogliosi, E.; Fraisse, L.; Pradines, B.; Brocard, J.; Khalife, J.; Dive, D. Assessment of *Plasmodium falciparum* resistance to ferroquine (SSR97193) in field isolates and in W2 strain under pressure. *Malar. J.* **2006**, 5, 11.
- (7) World Health Organization. The World Health Report 2006, <http://www.who.int/en>.
- (8) Kreidenweiss, A.; Kremsner, P. G.; Dietz, K.; Mordmüller, B. In vitro activity of ferroquine (SAR97193) is independent of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, 75, 1178–1181.
- (9) Biot, C.; Taramelli, D.; Forfar-Bares, I.; Maciejewski, L. A.; Boyce, M.; Nowogrocki, G.; Brocard, J. S.; Basilico, N.; Oliaro, P.; Egan, T. J. Insights into the mechanism of action of ferroquine. Relationship between physicochemical properties and antiplasmodial activity. *Mol. Pharmaceutics* **2005**, 2, 185–193.
- (10) van Staveren, D. R.; Metzler-Nolte, N. Bioorganometallic chemistry of ferrocene. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 5931–5985.
- (11) Hillard, E.; Vessieres, A.; Thouin, L.; Jaouen, G.; Amatore, C. Ferrocene-Mediated Proton-Coupled Electron Transfer in a Series of Ferrocifen-Type Breast-Cancer Drug Candidates. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, 45, 285–290.
- (12) Schatzschneider, U.; Metzler-Nolte, N. New principles in medicinal organometallic chemistry. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, 45, 1504–1507.

- (13) Wu, X.; Tiekink, E. R. T.; Koteski, I.; Kocherginsky, N.; Tan, A. L. C.; Khoo, S. B.; Wilairat, P.; Go, M.-L. Antiplasmodial activity of ferrocenyl chalcones: investigations into the role of ferrocene. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, 27, 175–187.
- (14) Kannan, R.; Kumar, K.; Sahal, D.; Kukreti, S.; Chauhan, V. S. Reaction of artemisinin with hemeoglobin: implications for antimalarial activity. *Biochem. J.* **2005**, 385, 409–418.
- (15) Connelly, N. G.; Geiger, W. E. Chemical Redox Agents for Organometallic Chemistry. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 877–910.

HPLC grade acetonitrile. The compounds (1 mM) were deoxygenated by means of a stream of dry Argon.

EPR Spectroscopy. The CW X-band EPR spectra were recorded on a Bruker ELEXYS 580-FT spectrometer. The HYSCORE measurements were carried out with the sequence $\pi/2-\tau-\pi/2-t_1-\pi-t_2-\pi/2-\tau$ echo, and a four-step phase cycle. The pulse lengths of the $\pi/2$ and π pulses in these experiments were 12 and 24 ns, respectively. All the experiments have been performed at different τ values, which have been chosen to optimize the sensitivity and to minimize the blind spot effect on the shape of the ridges. Prior to Fourier transformation of the HYSCORE data, the background decay was removed by a polynomial fit and apodized with a Hamming function. 2D FT magnitude spectra were calculated and presented as contour plots.

Spin Trapping. EPR spectra were simulated by using Winsim 2002.¹⁶ EPR spin trapping measurements were carried out on a Bruker ELEXYS 580-FT spectrometer operating at room temperature under the following parameters: 8 mW microwave power and 1 G amplitude modulation. The sample solutions were analyzed in a flat quartz cell inserted in a standard cavity. 5,5-Dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) was purchased from Fluka and used after Kugelrohr vacuum distillation to remove paramagnetic impurities. H_2O_2 aqueous solutions were freshly prepared before EPR experiments with an initial H_2O_2 solution (30%) purchased from Aldrich. A stock solution of FQ dihydrochloride (1 mM) was prepared by dissolving 12.7 mg of $\text{FQ}\cdot 2\text{HCl}$ in 25 mL of water ACS reagent. Twenty microliters of 8 M DMPO was diluted in 1 mL of 1 mM $\text{FQ}\cdot 2\text{HCl}$ solution before the addition of 50 μL of H_2O_2 aqueous solution. Final H_2O_2 concentrations of 1 mM and 15 mM were obtained.

Mass Spectrometry. $\text{FQ}\cdot 2\text{HCl}$ (12.7 mg) was diluted in HPLC grade water (25 mL) with a final concentration of 1 mM. H_2O_2 stock solutions (50 mM, 500 mM, and 5 M) were prepared by diluting a commercial solution of H_2O_2 (30%) in HPLC grade water. Samples were then prepared by adding 20 μL of H_2O_2 stock solution to 1 mL of FQ solution. The final concentrations of H_2O_2 were 1 mM, 10 mM and 100 mM. Reactions between FQ and H_2O_2 were monitored up to 31 h. 0.5 μL of reaction mixture was spotted after 0, 0.5, 1, 5, 6, 7, 24 and 31 h on a MALDI target with 1 μL of 2',4',6'-trihydroxyacetophenone (THAP)/ammonium citrate 9/1 v/v matrix (THAP 10 mg/mL in H_2O /acetonitrile, v/v, and ammonium citrate 50 mg/mL in water) using the dried droplet method. Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectra were acquired using a Voyager DE-STR instrument (Applied Biosystems) equipped with a nitrogen laser operating at a wavelength of 337 nm in reflector positive ion mode. 100–125 laser shots were accumulated for each spectrum.

Computational Details. All calculations were performed with the Amsterdam Density Functional (ADF) program.^{17,18} Molecular orbitals (MOs) were expanded using a large triple- ζ (TZP) basis set,¹⁹ augmented by one set of polarization functions. Scalar relativistic corrections were included self-consistently using the zeroth order regular approximation (ZORA).²⁰ Geometries were optimized using the Perdew–Wang 1991 (PW91) correlation functionals²¹ in singlet, triplet and quintet spin states for iron(II) and in doublet, quartet and sextet spin states for iron(III).

Results and Discussion

Chemistry. The “ferriquinium salt” $[\text{FQ}][\text{BF}_4]$ was prepared in good yield by chemical oxidation of FQ with AgBF_4 in dichloromethane (DCM) at room temperature. $[\text{FQ}][\text{BF}_4]$ is green in color and is stable as a solid. AgBF_4 is among the most widely used one-electron oxidants. As the formal potential of Ag^+/Ag is solvent dependent, three different solvents were tried: acetonitrile ($E^\circ = 0.04$ V), acetone ($E^\circ = 0.18$ V) and DCM ($E^\circ = 0.65$ V).¹⁵ Whereas all solutions turned green when adding the silver (I) ion, only the solid isolated from DCM was pure $[\text{FQ}][\text{BF}_4]$. The other two contained a mixture of iron(II) and iron(III) as revealed by EPR spectroscopy (data not shown). This indicates that FQ is relatively difficult to oxidize as confirmed by the CV studies (see below).

In aqueous solution, the paramagnetic FQ^+ cation rapidly evolves toward the diamagnetic neutral FQ, as evidenced by NMR and EPR studies. To fully characterize the ferriquinium salt, solid EPR spectra were recorded.

Cyclic Voltammetry. Table 1 lists the changes in electrode potential (ΔE_p) and half-wave potential $E_{1/2}$ of the tested compounds as the difference between the oxidation and reduction potential, ΔE_p , reflects the reversibility of the reaction. With regard to $E_{1/2}$, a large value of this redox parameter indicates resistance to electron loss.

(16) Duling, D. R. Simulation of Multiple Isotropic Spin Trap EPR Spectra. *J. Magn. Reson., Ser. B* **1994**, 104, 105–110.

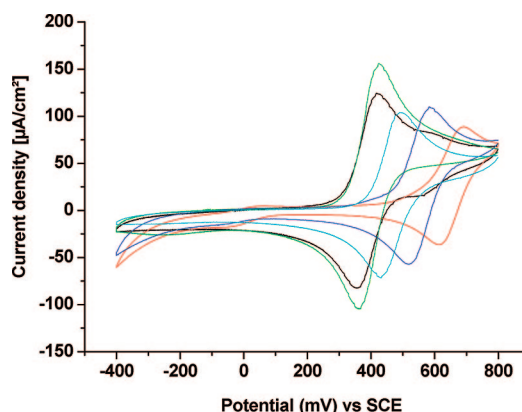
- (17) Baerends, E. J.; Autschbach, J.; Bérces, A.; Bo, C.; de Boeij, P. L.; Boerrigter, P. M.; Cavallo, L.; Chong, D. P.; Deng, L.; Dickson, R. M.; Ellis, D. E.; Fan, L.; Fischer, T. H.; Fonseca Guerra, C.; van Gisbergen, S. J. A.; Groeneveld, J. A.; Gritsenko, O. V.; Grüning, M.; Harris, F. E.; van den Hoek, P.; Jacobsen, H.; van Kessel, G.; Kootstra, F.; van Lenthe, E.; McCormack, D. A.; Michalak, A.; Osinga, V. P.; Patchkovskii, S.; Philipsen, P. H. T.; Post, D.; Pye, C. C.; Ravenek, W.; Ros, P.; Schipper, P. R. T.; Schreckenbach, G.; Snijders, J. G.; Solà, M.; Swart, M.; Swerhone, D.; te Velde, G.; Vernooijs, P.; Versluis, L.; Visser, O.; Wang, F.; van Wezenbeek, E.; Wiesenekker, G.; Wolff, S. K.; Woo, T. K.; Yakovlev, A. L.; Ziegler, T. SCM: Amsterdam, 2005.
- (18) te Velde, G.; Bickelhaupt, F. M.; Baerends, E. J.; Fonseca Guerra, C.; van Gisbergen, S. J. A.; Snijders, J. G.; Ziegler, T. Chemistry with ADF. *J. Comput. Chem.* **2001**, 22, 931–967.
- (19) van Lenthe, E.; Baerends, E. J. Optimized Slater-type basis sets for the elements 1–118. *J. Comput. Chem.* **2003**, 24, 1142–1155.
- (20) van Lenthe, E.; Baerends, E. J.; Snijders, J. G. Relativistic regular two-component Hamiltonians. *J. Chem. Phys.* **1993**, 99, 4597–4610.
- (21) Perdew, J. P.; Wang, Y. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. *Phys. Rev. B* **1992**, 45, 13244–13249.

Table 1. Reversible Half-Wave Potentials $E_{1/2}$ and Changes in Electrode Potential ΔE_p Values of Tested Ferrocenyl Compounds (1 mM, 100 mV/s)

compound	$E_{1/2}$ (mV)	ΔE_p (mV)
ferrocene	393.5	62.1
DMAF	387.5	65.0
DMAF·HCl	551.0	63.0
FQ	461.5	63.0
FQ·2HCl	651.7	75.5

The ΔE_p values obtained for all the compounds studied were in the range 62.0–75.5 mV, indicating a reversible single electron transfer mechanism. A linear dependence was moreover observed between the electrode current required for the oxidation/reduction reaction of each compound and the square root of scan rate. These results provide strong support for the reversibility of the electron transfer process.

In the potential range investigated, all ferrocenyl compounds showed the presence of one diffusion-controlled redox couple (Figure 2). In comparison with CQ which is totally devoid of redox properties, the electron transfer observed for FQ and other ferrocenyl compounds arises specifically from the iron core of the ferrocene moiety as confirmed by the DFT calculations. The reference $E_{1/2}$ value measured versus SCE for a single ferrocene unit is 393.5 mV. This value is very close to the 400 mV previously measured for ferrocene with platinum wires as working and auxiliary electrode versus SCE.²² Markedly, except for the DMAF molecule, this value is the lowest, thus suggesting that all other ferrocenyl derivatives in which ferrocene is substituted exhibit higher resistance to electron loss, e.g. oxidation mechanisms take place at higher potential. In this respect, the propensity for electron loss from ferrocene was known to be strongly influenced by the type of substituents attached to its cyclopentadienyl rings.^{23–28} The value of $E_{1/2}$

**Figure 2.** Cyclic voltammograms of ferrocene (green line), DMAF (black line), DMAF·HCl (dark blue line), FQ (blue line), and FQ·2HCl (red line) recorded at 1 mM in acetonitrile (0.1 M TEAP) and at a scan rate of 100 mV/s.

was 387.5 mV for DMAF, close to the ferrocene standard half-potential, whereas it was significantly increased to 461.5 mV for FQ. Furthermore, when these two species became protonated, their resistance to electron loss was exacerbated. The values of $E_{1/2}$ for DMAF·HCl and FQ·2HCl increased significantly to 551.0 and 651.0 mV respectively. These higher $E_{1/2}$ values result from the strong electron withdrawing effect exerted by the positive charges of protonated side chains. In the case of FQ, this withdrawing effect is due not only to the positively charged alkylamino side chain of ferrocene as in DMAF·HCl but also to the protonated quinoline ring. Hence, diprotonated FQ gave the highest $E_{1/2}$ value compared to the other compounds.

EPR Experiments. The CW-EPR spectrum of paramagnetic ferriquinium salt [FQ][BF₄] presented a broad line of 150 G centered at $g = 2.01$ as previously described.²⁹ These signals arose from the iron(III) in its doublet spin state ($S = 1/2$). These results are consistent with theoretical calculations for which the doublet state for iron(III) is predicted as the most stable (see below).

Additional pulse EPR experiments have been performed using two-dimensional four-pulse ESEEM (HYSCORE), which is a very useful sequence to measure the superhyperfine interactions between the nuclei environment coupled to the electron spin of iron(III) (Figure 3). The spectrum revealed weak coupling only in the (+,+) quadrant with essentially proton pattern cross peak ridge. These cross peaks coordinated 20.2–9.8 and 9.8–20.2 MHz and were centered at 15.2 MHz along the diagonal $\omega_1 = \omega_2$. These result from a vertical shift of 0.7 MHz from the proton Larmor frequency of 14.5 MHz. Such coupling values arise from the dipolar part of hyperfine tensor of the distributed protons of the cyclopentadienyl ring. Additional features were also observed

- (22) Lemoine, P.; Gross, M.; Braunstein, P.; Mathey, F.; Deschamps, B.; Nelson, J. H. Electrochemistry of Phosphaferrocenes. 1. Comparison of the redox properties of ferrocene diphosphaferrocene, 3,4-dimethyl-1-phosphaferrocene, and 3,3',4,4'-tetramethyl-1,1'-diphosphaferrocene. *Organometallics* **1984**, *3*, 1303–1307.
- (23) Zanello, P.; Cinquantini, A.; Mangani, S.; Opromolla, G.; Pardi, L.; Janiak, C.; Rausch, M. D. The redox behaviour of ferrocene derivatives: VI. Benzylferrocenes. The crystal structure of decabenzylferrocenium tetrafluoroborate. *J. Organomet. Chem.* **1994**, *471*, 171–177.
- (24) Martinez, R.; Tiripicchio, A. Structure of ferrocenium hexafluorophosphate. *Acta Crystallogr.* **1990**, *C46*, 202–205.
- (25) Pickardt, J.; Schumann, H.; Mohtachemi, R. Structure of decamethylferrocenium tribromide. *Acta Crystallogr.* **1990**, *C46*, 39–41.
- (26) Rausch, M. D.; Tsai, W. M.; Chambers, J. W.; Rogers, R. D.; Alt, H. G. Synthetic and x-ray structural studies on pentabenzylcyclopentadienyl derivatives of manganese, rhenium, and iron. *Organometallics* **1989**, *8*, 816–821.
- (27) Seiler, P.; Dunitz, J. D. A new interpretation of the disordered crystal structure of ferrocene. *Acta Crystallogr.* **1979**, *B35*, 1068–1074.

- (28) Freyberg, D. P.; Robbins, J. L.; Raymond, K. N.; Smart, J. C. Crystal and molecular structures of decamethylmanganocene and decamethylferrocene. Static Jahn-Teller distortion in a metalocene. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 892–897.
- (29) Prins, R.; Reinders, F. J. Electron spin resonance of the cation of ferrocene. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 4929–4931.

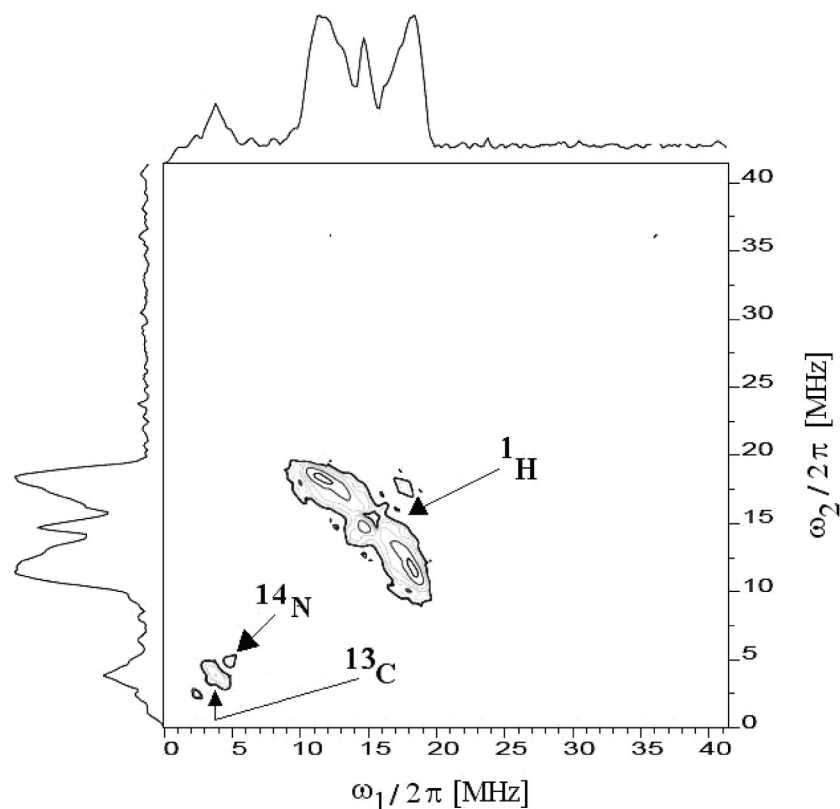


Figure 3. 2D HSCORE spectrum recorded at 4 K for $\tau = 196$ ns.

with ^{13}C Larmor nuclear frequency at 3.7 MHz and double quantum transition of ^{14}N . Both coupling constants were too small to be measured but indicated that a fraction of spin density was delocalized on the nitrogen atom.

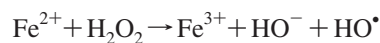
DFT Calculations. Density functional theory (DFT) calculations were performed on ferrocene, neutral and diprotonated FQ molecules. For FQ, crystal structures were used as starting point.⁹ For diprotonated FQ, the chloride ion bridging the nitrogen atom of the dimethylaminomethyl side chain and the nitrogen atom at position 4 were kept for calculations. Molecular geometries have been fully optimized for both the iron(II) and iron(III) species. The optimized structures of diprotonated FQ are given in the Supporting Information.

First, energy calculations indicated that the lowest energy spin states were always the singlet (spin multiplicity $S = 0$) for the iron(II) and the doublet ($S = 1/2$) for the iron(III). For iron(II) ferrocene and neutral FQ molecules, the energy difference between their singlet and triplet spin states was around 33 kcal/mol. For iron(III) molecules, the energy difference between their doublet and quartet spin states were around 26 and 20 kcal/mol for ferrocene and neutral FQ respectively. The energies of formation for iron(III) doublet states from their iron(II) singlet states have been also estimated and revealed to be in good agreement with the variation trends in $E_{1/2}$ potential values as obtained by cyclic voltammetry. The energy differences between the iron(III) and iron(II) electronic ground states were estimated to be 152, 160 and 209 kcal/mol for ferrocene, neutral FQ and diprotonated FQ respectively. Diprotonated FQ is here clearly

confirmed as the most difficult to oxidize as evidenced by cyclic voltammetry due to its highest $E_{1/2}$ potential value.

The calculation of the spin population on the iron(III) of diprotonated FQ gave a value of 1.09 electrons occupying mainly the d shell. This result is coherent with the increased distances between the iron(III) atom and the carbon atoms of the cyclopentadienyl rings in comparison to those observed with iron(II). Similar trends were observed for isolated ferrocene. The overlap population between the iron atom and all the hydrogen atoms of the cyclopentadienyl rings were almost equivalent. The coupling with these nuclear spins were similar and cannot be individualized. Indeed, computation of anisotropic hyperfine tensor showed a small a_{iso} Fermi contact term value of 0.45 MHz whereas the dipolar components were in the range of 2 to 5 MHz. Such values were consistent with the proton pattern observed in the HSCORE spectrum.

Spin Trapping. Under oxidizing conditions, iron(II) either free or present in ferrocene¹¹ has been reported for its ability to give a Fenton-like reaction, thereby yielding hydroxyl radicals ($\text{HO}^\bullet$):



Logically, we set out to test whether the ferrocene core present in FQ could also catalyze this kind of reaction:



In this regard, EPR spin trapping experiments were carried out. The spin trap agent used to observe the formation of

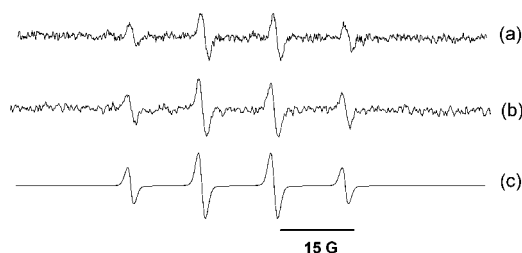


Figure 4. EPR spin trapping spectra at room temperature: (a) FQ·2HCl (1 mM), H₂O₂ (1 mM); (b) FQ·2HCl (1 mM), H₂O₂ (15 mM); (c) simulated spectrum with hyperfine coupling constants $a_H = a_N = 14.9$ G. The final DMPO concentration was 0.16 M.

hydroxyl radicals was DMPO. Oxidizing conditions were induced by adding H₂O₂ solutions at two different concentrations, 1 mM and 15 mM respectively. The latter is supposed to be the concentration at which H₂O₂ is found in the food vacuole of the parasite.¹⁴ In this respect, the pH in the food vacuole of the parasite being acidic, around 5, only the diprotonated FQ species was tested for its ability to form radicals.

The EPR spectra given in Figure 4 displayed a typical quartet with an intensity ratio of 1:2:2:1 and hyperfine splitting coupling constants, $a_H = a_N = 14.9$ G. These spectroscopic results unambiguously evidenced the formation of hydroxyl radical spin adduct DMPO–OH•.

The HO• radicals formed by FQ·2HCl during the Fenton reaction were quantified by double integration of EPR spectra. 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyl-1-oxyl (TEMPO) was used as intensity reference at a concentration of 0.1 mM in methanol. A hydroxyl production of 0.47 μ M and of 2.55 μ M was then measured for FQ·2HCl in the presence of 1 mM and 15 mM H₂O₂, respectively. These results are clearly in accordance with the low efficiency of oxidation of diprotonated FQ, as evidenced by cyclic voltammetry and also predicted by theoretical calculations.

Stability of Ferroquine in the Presence of H₂O₂. The stability of FQ was investigated in oxidizing conditions mimicking the parasite food vacuole (acidic pH and micromolar concentrations in H₂O₂). During the erythrocytic phase of the malaria parasite, the formation of hydrogen peroxide only occurs during stages when the parasite is degrading internalized red blood cell content. Indeed, the degradation of hemoglobin in the food vacuole is accompanied by the release of free heme, and then by production of superoxide anion, which dismutates into H₂O₂.

MALDI-TOF mass spectrometry has been used to investigate the stability of FQ in water in the presence of H₂O₂. The FQ degradation products were assessed at different concentrations of H₂O₂: 1 mM, 10 mM and 100 mM. Final solutions of 1 mM FQ with H₂O₂ in water were spotted after different reaction times.

FQ, the initial chemical structure, was clearly detected on the MALDI-TOF spectrum at m/z 434 (³⁵Cl) and 436 (³⁷Cl) with an isotopic distribution corresponding to the presence of Fe and Cl (Figure 5). Analyses of MS data showed then that oxidation of FQ occurred but was detected only after

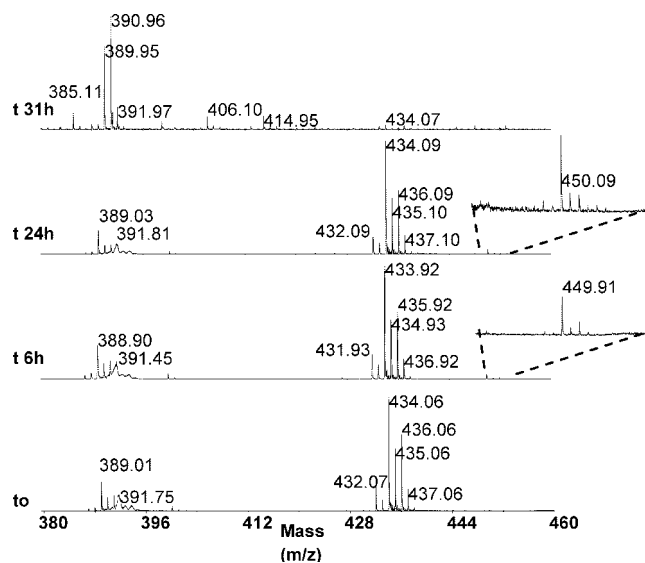


Figure 5. MALDI-TOF spectrum of the FQ solution in presence of 100 equiv of H₂O₂ at t_0 and after 6, 24 and 31 h.

6 h with an H₂O₂ concentration of 100 mM or only after 31 h with a H₂O₂ concentration of 10 mM. This slow oxidation led to the formation of 7-chloro-4-(2-(*N,N*-dimethylaminomethyl) ferrocenylmethylaminoquinoline oxide unambiguously detected at m/z 449 (³⁵Cl) and 451 (³⁷Cl) and already reported as a minor metabolite of FQ (Met D).⁶ Finally, to observe a complete disappearance of the MS peak attributed to FQ, it was necessary to incubate FQ during 31 h at the high H₂O₂ concentration of 100 mM. The degradation of FQ was linked with the detection of the fragment at m/z 389 (³⁵Cl) and 391 (³⁷Cl) resulting from the loss of the dimethylamino group (Figure 5).

Redox Activity of FQ in Chemical Conditions of *Plasmodium falciparum* Digestive Vacuole: Implications for Antimalarial Activity. Under oxidizing conditions mimicking the parasite DV, FQ shows a reversible one-electron redox reaction. This leads to the formation of ferriquinium and generation of hydroxyl radicals, with kinetics which are relevant for an antimalarial activity on *P. falciparum*. CQ has been shown to induce reactive oxygen species (ROS) production in astroglial cells via a signaling pathway involving NF- κ B.^{30,31} In the red blood cell devoid of a nucleus, such a pathway cannot occur. The present spin trapping experiments demonstrate that CQ is not able to produce OH• radicals by itself in the presence of hydrogen peroxide at the pH of the parasite DV. On the contrary, using the same experimental conditions, hydroxyl radicals are produced by FQ at micromolar concentration. Nevertheless,

(30) Park, J.; Kwon, D.; Choi, C.; Oh, J.-W.; Benveniste, E. N. Chloroquine induces activation of nuclear factor-B and subsequent expression of pro-inflammatory cytokines by human astroglial cells. *J. Neurochem.* **2003**, *84*, 1266–1274.

(31) Park, J.; Choi, K.; Jeong, E.; Kwon, D.; Benveniste, E. N.; Choi, C. Reactive oxygen species mediate chloroquine-induced expression of chemokines by human astroglial cells. *Glia* **2004**, *47*, 9–20.

this weak production of hydroxyl radicals should be sufficient to induce significant damage, due to the very high reactivity of these radicals.

According to our results, FQ might thus strike the parasite not only *via* direct inhibition of hemozoin formation but also by production of lethal hydroxyl radicals. Indeed, these radicals are known to be particularly aggressive toward unsaturated fatty acids present in membrane phospholipids and to promote an extensive chain reaction of their peroxidation products.³² The parasite DV contains lipid bodies and membrane complexes^{33,34} whose lipid/aqueous interfaces were suspected to promote a rapid sequestration of heme into hemozoin.³⁵ These interfaces are also thought to be a site of concentration of FQ which is much more lipophilic than CQ.^{1,9} The alteration or the destruction of these structures should then influence heme detoxification process(es) and could result in a complementary harmful effect on the parasite. Since the toxic action of hydroxyl radicals occurred very quickly, FQ may induce severe damages to the parasite and amplify inhibition of hemozoin formation, before intervention of resistance mechanisms. Hence, FQ could remain active on CQ resistant parasites.

Further experiments will be necessary to provide answers to these hypotheses. Hydroxyl radical attack of fatty acids results in the production of byproduct such as malonaldehyde and hydroxynonenal which can be titrated.^{32,36} Malonalde-

hyde reacts with free NH₂ functions of basic amino acids, resulting in amino-imino-propene bridges which can be recognized by specific antibodies^{37,38} in ELISA, Western or dot blots, and by indirect immunofluorescence examination of cells.³⁹ Comparison of CQ and FQ action on parasites would provide complementary information on the relevance of the complementary ROS mechanism we propose here for FQ.

Conclusion

If the major contribution to the activity of the new antimalarial FQ should maintain its effects upon heme catabolism, by binding to hemein and thus preventing its aggregation into hemozoin,^{1,9} another contribution could also arise from its redox properties. Indeed, the results described in this article reveal, that owing to its ferrocene moiety, FQ is able to generate small amounts of hydroxyl radicals from H₂O₂ *via* a Fenton-like reaction. Upon such specific oxidizing conditions (parasitic DV), this production of ROS appears not sufficient to affect the stability of FQ. On the other hand, it should be sufficient to promote significant damage on membranes of the parasite DV, also suspected to be a site of concentration of FQ. By specific *in situ* production of hydroxyl radicals, FQ might induce severe damage to the parasite before intervention of resistance mechanisms.

Acknowledgment. The authors thank Adeline Page for her generous assistance with the MS spectroscopy. A BDI fellowship from CNRS and Region Nord-Pas-de-Calais to N.C. is gratefully acknowledged. Clément Roux is acknowledged for proof-reading the manuscript.

Supporting Information Available: Cartesian coordinates of the diprotonated ferroquine (doublet spin state) whose geometry is optimized at PW91/TZP, and Cartesian coordinates of the diprotonated ferriquinium (singlet spin state) whose geometry is optimized at PW91/TZP. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

MP800007X

- (32) Cherubini, A.; Ruggiero, C.; Polidori, M. C.; Mecocci, P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biol. Med.* **2005**, *39*, 841–852.
- (33) Jackson, K. E.; Klonis, N.; Ferguson, D. J.; Adisa, A.; Dogovski, C.; Tilley, L. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **2004**, *54*, 109–122.
- (34) Pisciotto, J. M.; Coppens, I.; Tripathi, A. K.; Scholl, P. F.; Shuman, J.; Bajad, S.; Shulaev, V.; Sullivan, D. J., Jr. The role of neutral lipid nanospheres in *Plasmodium falciparum* heme crystallization. *Biochem. J.* **2007**, *402*, 197–204.
- (35) Egan, T. J.; Chen, J. Y.; de Villiers, K. A.; Mabotha, T. E.; Naidoo, K. J.; Ncokazi, K. K.; Langford, S. J.; McNaughton, D.; Pandiancherri, S.; Wood, B. R. Hemozoin (beta-hemeatin) biomineralization occurs by self-assembly near the lipid/water interface. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 5105–5110.
- (36) Meagher, E. A.; FitzGerald, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *28*, 1745–1750.
- (37) Petit, E.; Chancerelle, Y.; Dumont, E.; Divoux, D.; Kergonou, F.; Nouvelot, A. Polyclonal antibodies against malondialdehyde-modified proteins: characterization and application in study of in vitro lipid peroxidation of cellular membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1995**, *36*, 355–364.

- (38) Chancerelle, Y.; Mathieu, J.; Kergonou, J. F. Antibodies against malondialdehyde-modified proteins. Induction and ELISA measurement of specific antibodies. *Methods Mol. Biol.* **1998**, *108*, 111–118.
- (39) Storme, L.; Zerimech, F.; Riou, Y.; Martin-Ponthieu, A.; Devisme, L.; Slomianny, C.; Klosowski, S.; Dewailly, E.; Cneude, F.; Zandecki, M.; Dupuis, B.; Lequien, P. Inhaled nitric oxide neither alters oxidative stress parameters nor induces lung inflammation in premature lambs with moderate hyaline membrane disease. *Biol. Neonate* **1998**, *73*, 172–181.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse a reposé sur la conception et la synthèse de dérivés de la ferroquine, leur activité antipaludique ainsi que sur leur analyse structurale. Les mécanismes d'action de ces nouveaux dérivés d'une part, et de la ferroquine d'autre part, ont également été explorés. Tout d'abord, une modification de la ferroquine sur l'amine de la chaîne latérale ainsi que sur l'amine en position 11 a été réalisée. Ensuite, des dérivés amino-alcools analogues de l'hydroxychloroquine ont été synthétisés. Puis, des dérivés de la ferroquine ont été associés à des naphtoquinones, des groupements phényles ou des bases de Mannich afin de créer une nouvelle série de molécules duales. Finalement, le mécanisme d'action de la ferroquine a été approfondi en étudiant l'importance du groupement ferrocényle dans la molécule.

Dans le deuxième chapitre, nous avons montré que les dérivés aminés de la ferroquine (modification sur l'amine de la chaîne latérale) présentent une très bonne activité antipaludique *in vitro* aussi bien sur les clones chloroquino-sensibles que chloroquino-résistants de *P. falciparum* à des concentrations nanomolaires. Ils ont une activité comparable à celle de la ferroquine et une meilleure activité que la chloroquine sur les clones résistants de *P. falciparum*. Comme pour la ferroquine, ces dérivés présentent un caractère lipophile à pH cytosolique et un caractère hydrophile à pH vacuolaire. Cette propriété est très intéressante étant donné qu'il a été récemment proposé que la formation de l'hémozoïne s'effectue à une interface eau /lipide, au niveau de la membrane vacuolaire. Grâce à leur caractère lipophile, les dérivés aminés de la ferroquine sont supposés se placer au niveau de cette membrane et se trouverait ainsi en position idéale pour inhiber la croissance du cristal.

Bien que restants plus actifs que la chloroquine sur les parasites résistants, les dérivés de la ferroquine présentant un substituant sur l'amine en position 11 possèdent quant à eux une activité antipaludique moins bonne que la ferroquine sur *P. falciparum*. La diminution d'activité antipaludique de ces composés peut être expliquée en partie par leur grande lipophilie. Ces dérivés sont plus lipophiles que la ferroquine et ses dérivés aminés, ce qui les empêcherait probablement de se placer correctement à l'interface eau/lipide où la formation de la β -hématine se produirait.

La caractérisation par RX et RMN d'un des dérivés aminés permet d'identifier, comme pour la ferroquine, la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre N24 et H11. Cette liaison donne une conformation coudée à la molécule rendant disponible le ferrocène. Cette conformation particulière devrait permettre au groupement ferrocényle hydrophobe de

se placer au niveau de la membrane vacuolaire et rend le cycle quinoléine accessible pour son interaction avec la porphyrine. Cette liaison hydrogène intramoléculaire n'est pas observable par RMN pour la deuxième série de dérivés de la ferroquine. Cette différence de conformation des 2 séries de molécules pourrait expliquer en partie la différence d'activité antipaludique par la meilleure disponibilité du ferrocène dans la série la plus active. Ceci nous conforte dans l'hypothèse que le ferrocène contribue au mécanisme d'action de la ferroquine.

Tous les dérivés de la ferroquine synthétisés inhibent la formation de la β -hématine. On peut observer deux types de courbes d'inhibition. La première série de dérivés a un profil sigmoïdal, comme l'amodiaquine, et la deuxième série de dérivés présente une courbe en cloche avec une diminution d'inhibition à forte concentration, comme la ferroquine. Deux hypothèses ont été faites pour expliquer ce phénomène : soit les composés ont des mécanismes d'inhibition différents, soit les composés ayant le même profil que la ferroquine s'agrègent à forte concentration. Etant donné que les deux séries n'ont pas la même conformation, nous pouvons également supposer que cette conformation a une influence sur l'inhibition de la formation de β -hématine.

Les dérivés hydroxylés de la ferroquine (hydroxyferroquines) obtenus également par une modification sur l'amine de la chaîne latérale de la ferroquine, présentent aussi une bonne activité sur les clones chloroquino-résistants de *P. falciparum*. Ces dérivés apparaissent comme étant de nouvelles molécules antipaludiques prometteuses puisque leurs métabolites potentiels sont également actifs sur les clones chloroquino-résistants de *P. falciparum*. De plus, ces molécules présentent une activité anti-VIH mais surtout une activité anti-SRAS. Ces résultats montrent la potentialité des métallocènes dans la chimiothérapie dans les pays où le paludisme coexiste avec le SRAS.

Le troisième chapitre présente trois nouvelles séries de molécules duales synthétisées en associant des inhibiteurs de glutathion réductase ou dépléteurs de glutathion à des dérivés de la ferroquine par une liaison amide ou amine. Les molécules avec un lien amide présentent une bonne activité antipaludique sur les clones chloroquino-sensibles et chloroquino-résistants de *P. falciparum*. Cependant, les dérivés de la ferroquine correspondants restent plus actifs que ces molécules duales. En revanche, les molécules avec un lien amine ne sont pas actives. Une étude RMN et la structure cristalline d'une des molécules duales montrent que lorsque la molécule duale possède une fonction amide, il y a formation d'une liaison intramoléculaire entre l'oxygène de cette fonction et l'amine en position 11. La molécule se

trouve sous une conformation coudée. Cette caractérisation montre également que seule la conformation *s-cis* de la liaison amide est synthétisée.

Nous nous sommes intéressés à la compréhension du mécanisme d'action de ces molécules duales. Comme la ferroquine et ses dérivés aminés, les molécules duales inhibent la formation de la β -hématine. Nous avons obtenu des courbes d'inhibition présentant un maximum puis une diminution d'inhibition ou non-inhibition, comme avec la ferroquine. Comme nous pouvions le supposer, nos molécules duales n'inhibent pas beaucoup la glutathion réductase. Cela est dû probablement au fait que la fonction carboxylique de l'inhibiteur, nécessaire pour l'activité, est impliquée dans la liaison amide. Afin d'expliquer la diminution d'activité de nos molécules duales par rapport aux dérivés de la ferroquine correspondants, une étude métabolique a été également réalisée dans les conditions oxydantes de la vacuole digestive (pH 5, H_2O_2 , hématine, 37°C). A pH 5 uniquement, dans le cas des molécules duales mettant en jeu un acide benzoïque comme dépléteur de glutathion, le clivage de ces molécules libère l'acide carboxylique. Or, il a été récemment montré que les dérivés de l'acide carboxylique favorisaient la formation de β -hématine. Ces résultats ont été publiés après la synthèse de nos molécules qui présentent alors deux parties avec des propriétés antagonistes ce qui explique la diminution d'activité de cette série. Dans le cas des molécules duales mettant en jeu des naphtoquinones, il y a également libération de l'inhibiteur de la glutathion réductase. Ceci explique probablement la meilleure activité antipaludique de cette série. Lorsque l'on ajoute H_2O_2 et de l'hématine dans le milieu, on observe des produits de dégradation de nos molécules. On observe que l'hématine catalyse les réactions d'oxydation étant donné que la dégradation est plus marquée en présence d'hématine. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour identifier ces produits de dégradation/oxydation.

Les nouvelles molécules duales amino-4-quinoléines avec une chaîne amine latérale comme produit d'amination réductrice à partir d'une base de Mannich aliphatique présentent de bonnes propriétés antipaludiques aussi bien sur les clones chloroquino-sensibles que chloroquino-résistants de *P. falciparum* (CI_{50} de l'ordre de 10 nM). Malheureusement, cette bonne activité est associée à une forte cytotoxicité. Ces molécules ont donc été testées pour leur aptitude à interagir avec l'ADN. L'interaction de nos molécules avec l'ADN semble être très complexe. Cette étude a cependant permis de justifier la cytotoxicité de nos molécules et d'expliquer en partie l'activité antipaludique de celles-ci. Du fait de la cytotoxicité de nos molécules et de leur interaction avec l'ADN, nous avons jugé intéressant de les tester pour

leur activité anticancéreuse sur cellules de *glioblastoma* résistantes à la carmustine. Ces molécules présentent une très bonne activité anticancéreuse.

Le mécanisme d'action principal supposé de la ferroquine a reposé longtemps sur une liaison à l'hématine et l'inhibition de la croissance du cristal d'hémozoïne, du fait de sa ressemblance avec la chloroquine. Dans le dernier chapitre de ce manuscrit, nous avons montré que les propriétés redox de la ferroquine peuvent également contribuer au mécanisme d'action de celle-ci. En effet, la ferroquine serait capable de générer des radicaux libres à partir de H_2O_2 par catalyse de la réaction de Fenton. Dans les conditions oxydantes de la vacuole digestive du parasite, cette production de radicaux hydroxyles n'est pas suffisante pour endommager la molécule de ferroquine mais elle est néanmoins suffisante pour provoquer des dommages importants chez le parasite. La ferroquine étant très lipophile est supposée se placer à l'interface eau/lipide qui catalyserait la formation de l'hémozoïne. Elle se situerait par conséquent au niveau des membranes de la vacuole digestive du parasite et provoquerait des réactions de peroxydation de ces membranes. De plus, les nouvelles études physicochimiques concernant la ferroquine laissent penser qu'elle s'accumulerait 50 fois plus que la chloroquine dans la vacuole digestive du parasite. Le maintien de la ferroquine dans la vacuole digestive est probablement dû à la présence du groupement hydrophobe ferrocénique.

En résumé, si la ferroquine reste toujours la molécule la plus active de la famille d'analogues, les modifications de cette molécule nous ont permis de dégager des relations de structure-activité et d'approfondir nos connaissances sur son mécanisme d'action. Le caractère lipophile semble être crucial pour son activité antipaludique et plus particulièrement pour l'inhibition de la croissance du cristal d'hémozoïne. De plus, l'étude sur les propriétés redox du groupement ferrocénique de la ferroquine montre que celle-ci est capable de générer des radicaux libres. Ceci provoquerait un stress oxydant chez le parasite et par conséquent, sa mort.

Dans la série des molécules duales, aucune molécule ne peut encore être retenue pour ses propriétés antipaludiques. Bien que la série dérivée des bases de Mannich présente une bonne inhibition de la croissance du parasite, elle est très cytotoxique. De cette cytotoxicité, une interaction des molécules avec l'ADN a pu être observée ainsi qu'une bonne activité anticancéreuse sur des cellules de *glioblastoma* résistantes à la carmustine. Une nouvelle famille de molécules anticancéreuses a été découverte. A l'avenir, un programme de pharmacomodulation est nécessaire pour explorer cette nouvelle famille.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHIMIE

Les points de fusion ont été déterminés à l'aide d'un banc Kopfler et d'une thermoélectrode Barnstead Electrothermal IA9100.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés à température ambiante sur un spectromètre Bruker AC 300 et le tétraméthylsilane (TMS) a été utilisé comme référence interne. Les analyses ^1H ont été obtenues à 300 MHz et les analyses ^{13}C ont été obtenues à 75,4 MHz. Les déplacements chimiques δ sont donnés en parties par million par rapport au TMS ($\delta = 0,00$). Différents solvants deutérés ont été utilisés suivant la solubilité des produits. Pour les spectres ^1H , les abréviations s, d, t, q, dd et m se réfèrent à des signaux sous forme de singulet, doublet, triplet, quadruplet, doublet dédoublé et multiplet. Pour les spectres ^{13}C , les abréviations C^{IV} , CH, CH_2 et CH_3 sont utilisées pour désigner les carbones quaternaires, tertiaires, secondaires et primaires.

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre de masse Waters Micromass Quattro II triple quadrupole LC équipé d'une ionisation électrospray (ESI) et de sources d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).

Les produits ont été purifiés par colonne chromatographique sur gel de silice (Merck Kieselgel 60).

Les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince de gel de silice Macherey-Nagel Polygram Sil G/UV₂₅₄ et les produits ont été détectés sous lampe UV à 254 nm.

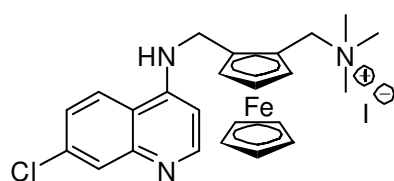
La pureté des produits a été déterminée soit par analyse élémentaire effectuée au Service Central de Microanalyse du CNRS ou au Organisch-Chemisches Institut de l'université d'Heidelberg soit par HPLC au sein du laboratoire en utilisant deux types de colonne ont été utilisés, une colonne Macherey-Nagel C18 Nucleosil (4,6 × 250 mm, 5 μm , 100 Å) et une colonne Macherey-Nagel CN-RP Nucleodur (4,6 × 250 mm, 5 μm , 100 Å). Les analyses HPLC ont été réalisées sur un chromatographe Thermo Electron corporation Spectra System SCM1000 équipé d'un détecteur UV Spectra System UV6000 à 254 nm. Les composés ont été dissous préalablement dans l'acétonitrile avant d'être injectés. Les systèmes d'éluant utilisés sont les suivants : l'éluant A est une phase aqueuse (H_2O milliQ) contenant 0,05 % d'acide trifluoroacétique et l'éluant B est de l'acétonitrile. Les temps de rétention t_R ont été

obtenus à une vitesse d'élution de 1 mL/min en utilisant les conditions d'élution suivantes : 100 % d'éluant A pendant 5 min, gradient d'éluant B pendant 5 min, 100 % d'éluant B pendant 10 min, gradient d'éluant B pendant 5 min, 100 % d'éluant A pendant 5 min.

I. Dérivés amines secondaires et tertiaires de la ferroquine

iodure de *N,N,N*-triméthyl{2-[4-*N'*-(7-chloroquinolyl)aminométhyl]}ferrocénylméthylammonium (1)

La FQ (1 mmol) est dissoute dans de l'acétone préalablement séchée sur tamis moléculaire (20 mL). De l'iodométhane (10 mmol) est ajouté à la solution et le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 2h. Le solvant est évaporé sous pression réduite.



$M = 575,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Huile orange

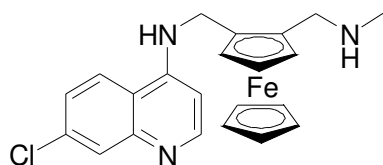
Rendement = quant.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8,47 (d, 1H, $J = 5,2 \text{ Hz}$), 8,32 (d, 1H, $J = 9,1 \text{ Hz}$), 7,80 (d, 1H, $J = 2,0 \text{ Hz}$), 7,46 (dd, 1H, $J = 2,1 ; 9,0 \text{ Hz}$), 7,21 (m, 1H), 6,72 (d, 1H, $J = 5,5 \text{ Hz}$), 4,64 (d, 1H, $J = 13,4 \text{ Hz}$), 4,60-4,29 (6H), 4,26 (s, 5H), 2,96 (s, 9H).

MS m/z 451 $\text{MH}^+ ^{37}\text{Cl}$, 450 $\text{M}^{+\bullet} ^{37}\text{Cl}$, 449 $\text{MH}^+ ^{35}\text{Cl}$, 448 $\text{M}^{+\bullet} ^{35}\text{Cl}$, 405 ($\text{M} ^{37}\text{Cl} - (\text{CH}_3)_3$) $^+$, 403 ($\text{M} ^{35}\text{Cl} - (\text{CH}_3)_3$) $^+$, 391 ($\text{M} ^{37}\text{Cl} - \text{N}(\text{CH}_3)_3$) $^+$, 389 ($\text{M} ^{35}\text{Cl} - \text{N}(\text{CH}_3)_3$) $^+$.

Procédure générale de synthèse des amines secondaires et tertiaires 2-11

Un mélange de l'amine correspondante (méthyl-, éthyl-, propyl-, isopropyl-, butyl- ou isobutylamine, 10 mmol) et de iodure de *N,N,N*-triméthyl{2-[4-*N'*-(7-chloroquinolyl)aminométhyl]}ferrocénylméthylammonium **1** préparé précédemment (1 mmol) est dissout dans de l'acétonitrile (25 mL). Du carbonate de potassium (10 mmol) est ajouté en excès et le mélange est porté à reflux pendant 3 à 7h. La solution refroidie à température ambiante est diluée avec de l'eau (25 mL). La phase aqueuse est ensuite extraite avec du dichlorométhane (3 $\times$ 50 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaCl (50 mL) et séchée sur Na_2SO_4 . Les solvants sont évaporés sous pression réduite. On obtient un solide orange. Celui-ci est purifié sur colonne chromatographique de silice en utilisant comme éluant un mélange acétate d'éthyle/triéthylamine (9/1).

7-chloro-4-[2-(*N'*-méthylaminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]quinoléine (2)M = 419,5 g.mol⁻¹

Solide jaune

F = 185 ± 1 °C

Rendement = 74%

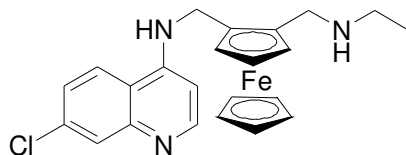
¹H NMR (CDCl₃) δ 8,52 (d, 1H, J = 5,4 Hz), 7,91 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,79 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,68 (m, 1H), 7,27 (dd, 1H, J = 2,2 ; 9,0 Hz), 6,45 (d, 1H, J = 5,4 Hz), 4,34 (d, 1H, J = 13,1 Hz), 4,26 (m, 1H), 4,19 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,14 (s, 5H), 4,09 (m, 1H), 3,68 (d, 1H, J = 12,3 Hz), 3,47 (d, 1H, J = 12,3 Hz), 2,44 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 151,0 (CH), 149,3 (C^{IV}), 148,2 (C^{IV}), 133,5 (C^{IV}), 127,3 (CH), 123,7 (CH), 121,6 (CH), 116,8 (C^{IV}), 97,8 (CH), 84,1 (C^{IV}), 82,5 (C^{IV}), 69,5 (CH), 69,3 (CH), 68,1 (5CH), 65,0 (CH), 48,9 (CH₂), 41,4 (CH₂), 35,2 (CH₃).

MS *m/z* 422 MH⁺ ³⁷Cl, 421 M⁺ ³⁷Cl, 420 MH⁺ ³⁵Cl, 419 M⁺ ³⁵Cl, 391 (M ³⁷Cl – NHCH₃)⁺, 389 (M ³⁵Cl – NHCH₃)⁺.

Analyse élémentaire (C₂₂H₂₂N₃ClFe) Calculée: C, 62,95%; H, 5,28%; N, 10,01%; Mesurée: C, 63,03%; H, 5,52%; N, 10,25%.

HPLC *t_R* C18 Nucleosil 14,4 min, CN-RP 13,3 min.

7-chloro-4-[2-(*N'*-éthylaminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]quinoléine (3)M = 433,5 g.mol⁻¹

Solide jaune

F = 207 ± 1 °C

Rendement = 26%

¹H NMR (CDCl₃) δ 8,53 (d, 1H, J = 5,4 Hz), 7,92 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,83 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,35 (m, 1H), 7,25 (dd, 1H, J = 2,1 ; 9,1 Hz), 6,47 (d, 1H, J = 5,4 Hz), 4,36 (d, 1H, J = 13,1 Hz), 4,26 (m, 1H), 4,20 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,14 (s, 5H), 4,11 (m, 1H), 4,09 (s, 1H), 3,70 (d, 1H, J = 12,2 Hz), 3,52 (d, 1H, J = 12,2 Hz), 2,70 (m, 2H), 1,13 (t, 3H, J = 7,1 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 150,8 (CH), 148,8 (C^{IV}), 148,0 (C^{IV}), 133,3 (C^{IV}), 127,1 (CH), 123,4 (CH), 121,6 (CH), 116,6 (C^{IV}), 97,7 (CH), 84,3 (C^{IV}), 82,2 (C^{IV}), 69,2 (CH), 69,0 (CH), 67,9 (5CH), 64,8 (CH), 46,6 (CH₂), 42,8 (CH₂), 41,1 (CH₂), 13,8 (CH₃).

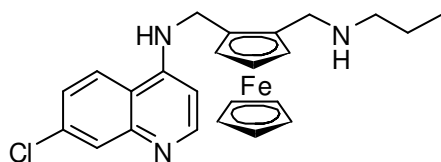
MS *m/z* 436 MH⁺ ³⁷Cl, 435 M⁺ ³⁷Cl, 434 MH⁺ ³⁵Cl, 433 M⁺ ³⁵Cl, 391 (M ³⁷Cl – NHCH₂CH₃)⁺, 389 (M ³⁵Cl – NHCH₂CH₃)⁺, 179 (NH₃C₈H₅N³⁷Cl)⁺.

Analyse élémentaire (C₂₃H₂₄N₃ClFe) Calculée: C, 63,69%; H, 5,58%; N, 9,69%; Mesurée: C,

63,35%; H, 5,83%; N, 9,37%.

HPLC t_R C18 Nucleosil 14,5 min, CN-RP 13,5 min.

7-chloro-4-[2-(*N'*-propylaminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]quinoléine (4)



$M = 447,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide jaune

$F = 135 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$

Rendement = 40%

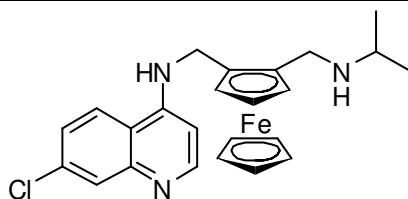
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8,51 (d, 1H, $J = 5,4 \text{ Hz}$), 7,90 (d, 1H, $J = 1,7 \text{ Hz}$), 7,84 (d, 1H, $J = 9,0 \text{ Hz}$), 7,35 (m, 1H), 7,24 (dd, 1H, $J = 2,1 ; 9,0 \text{ Hz}$), 6,46 (d, 1H, $J = 5,4 \text{ Hz}$), 4,38 (d, 1H, $J = 13,4 \text{ Hz}$), 4,28 (m, 1H), 4,22 (m, 1H), 4,17 (m, 1H), 4,15 (s, 5H), 4,10 (m, 1H), 3,75 (d, 1H, $J = 12,1 \text{ Hz}$), 3,55 (d, 1H, $J = 12,1 \text{ Hz}$), 2,64 (m, 2H), 1,56 (m, 2H), 0,90 (t, 3H, $J = 7,4 \text{ Hz}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 150,9 (CH), 149,1 (C^{IV}), 148,1 (C^{IV}), 133,6 (C^{IV}), 127,2 (CH), 123,6 (CH), 121,8 (CH), 116,7 (C^{IV}), 97,8 (CH), 84,0 (C^{IV}), 82,5 (C^{IV}), 69,5 (CH), 69,3 (CH), 68,2 (5CH), 65,2 (CH), 50,6 (CH_2), 46,7 (CH_2), 41,2 (CH_2), 21,6 (CH_2), 10,7 (CH_3).

MS m/z 450 $\text{MH}^+ ^{37}\text{Cl}$, 449 $\text{M}^{+\bullet} ^{37}\text{Cl}$, 448 $\text{MH}^+ ^{35}\text{Cl}$, 447 $\text{M}^{+\bullet} ^{35}\text{Cl}$, 391 ($\text{M} ^{37}\text{Cl} - \text{NHCH}_2\text{CH}_3$) $^+$, 389 ($\text{M} ^{35}\text{Cl} - \text{NHCH}_2\text{CH}_3$) $^+$, 179 ($\text{NH}_3\text{C}_8\text{H}_5\text{N}^{37}\text{Cl}$) $^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 14,7 min, CN-RP 13,8 min.

7-chloro-4-[2-(*N'*-isopropylaminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]quinoléine (5)



$M = 447,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide jaune

$F = 151 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$

Rendement = 35%

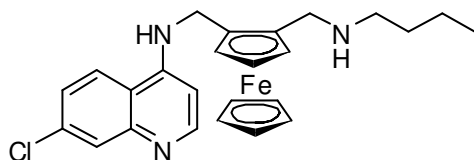
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8,54 (d, 1H, $J = 5,4 \text{ Hz}$), 7,91 (d, 1H, $J = 1,0 \text{ Hz}$), 7,85 (d, 1H, $J = 8,9 \text{ Hz}$), 7,25 (dd, 1H, $J = 2,2 ; 8,9 \text{ Hz}$), 7,16 ppm (m, 1H), 6,48 (d, 1H, $J = 5,4 \text{ Hz}$), 4,37 (d, 1H, $J = 12,9 \text{ Hz}$), 4,25 (m, 1H), 4,20 (m, 1H), 4,16 (s, 5H), 4,14 (m, 1H), 4,09 (m, 1H), 3,71 (d, 1H, $J = 12,0 \text{ Hz}$), 3,49 (d, 1H, $J = 12,0 \text{ Hz}$), 2,89 (m, 1H), 1,11 (d, 3H, $J = 6,3 \text{ Hz}$), 0,99 (d, 3H, $J = 6,2 \text{ Hz}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 152,2 (CH), 150,0 (C^{IV}), 149,3 (C^{IV}), 134,7 (C^{IV}), 128,4 (CH), 124,6 (CH), 123,1 (CH), 117,7 (C^{IV}), 99,0 (CH), 85,8 (C^{IV}), 83,5 (C^{IV}), 70,3 (CH), 70,2 (CH), 69,2 (5CH), 66,2 (CH), 49,6 (CH), 45,8 (CH_2), 42,2 (CH_2), 23,6 (CH_3), 22,0 (CH_3).

MS m/z 450 MH^+ ^{37}Cl , 449 $M^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 448 MH^+ ^{35}Cl , 447 $M^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 (M ^{37}Cl – $NHCH_2CH_3$) $^+$, 389 (M ^{35}Cl – $NHCH_2CH_3$) $^+$, 179 ($NH_3C_8H_5N^{37}Cl$) $^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 14,6 min, CN-RP 13,8 min.

7-chloro-4-[2-(*N'*-butylaminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]quinoléine (6)



$M = 461,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide jaune

$F = 132 \pm 1 \text{ } ^\circ C$

Rendement = 41%

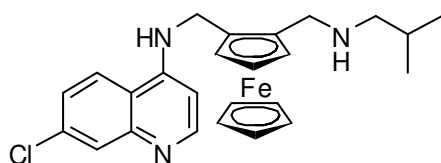
1H NMR ($CDCl_3$) δ 8,53 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz), 7,91 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz), 7,80 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 7,26 (m, 1H), 7,23 (dd, 1H, $J = 2,2$; 9,0 Hz), 6,47 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz), 4,37 (d, 1H, $J = 12,3$ Hz), 4,26 (m, 1H), 4,19 (m, 1H), 4,15 (s, 5H), 4,14 (m, 1H), 4,08 (m, 1H), 3,71 (d, 1H, $J = 11,8$ Hz), 3,52 (d, 1H, $J = 11,8$ Hz), 2,64 (m, 2H), 1,50 (m, 2H), 1,31 (m, 2H), 0,90 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 151,1 (CH), 149,2 (C^{IV}), 148,2 (C^{IV}), 133,6 (C^{IV}), 127,3 (CH), 123,5 (CH), 121,9 (CH), 116,7 (C^{IV}), 97,9 (CH), 84,3 (C^{IV}), 82,5 (C^{IV}), 69,5 (CH), 69,2 (CH), 68,1 (5CH), 65,1 (CH), 48,5 (CH_2), 46,8 (CH_2), 41,3 (CH_2), 30,8 (CH_2), 19,5 (CH_2), 13,0 (CH_3).

MS m/z 464 MH^+ ^{37}Cl , 463 $M^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 462 MH^+ ^{35}Cl , 461 $M^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 (M ^{37}Cl – $NHCH_2CH_3$) $^+$, 389 (M ^{35}Cl – $NHCH_2CH_3$) $^+$, 179 ($NH_3C_8H_5N^{37}Cl$) $^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 14,9 min, CN-RP 14,0 min.

7-chloro-4-[2-(*N'*-isobutylaminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]quinoléine (7)



$M = 461,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide jaune

$F = 114 \pm 1 \text{ } ^\circ C$

Rendement = 36%

1H NMR ($CDCl_3$) δ 8,53 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz), 7,91 (s, 1H), 7,76 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz), 7,22 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz), 7,12 (m, 1H), 6,47 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz), 4,36 (d, 1H, $J = 13,0$ Hz), 4,26 (m, 1H), 4,20 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,14 (s, 5H), 4,09 (s, 1H), 3,70 (d, 1H, $J = 12,6$ Hz), 3,50 (d, 1H, $J = 12,6$ Hz), 2,46 (m, 2H), 1,84 (m, 1H), 0,90 (d, 6H, $J = 6,5$ Hz).

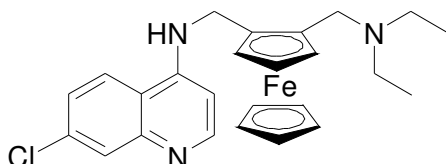
^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 151,1 (CH), 149,0 (C^{IV}), 148,3 (C^{IV}), 133,6 (C^{IV}), 127,4 (CH), 123,6 (CH), 121,6 (CH), 116,7 (C^{IV}), 97,9 (CH), 84,6 (C^{IV}), 82,5 (C^{IV}), 69,6 (CH), 69,2 (CH), 68,2

(5CH), 65,2 (CH), 56,8 (CH₂), 46,9 (CH₂), 41,2 (CH₂), 26,7 (CH), 19,6 (CH₃), 19,5 (CH₃).

MS m/z 464 $MH^+ {}^{37}Cl$, 463 $M^{+\bullet} {}^{37}Cl$, 462 $MH^+ {}^{35}Cl$, 461 $M^{+\bullet} {}^{35}Cl$, 391 ($M {}^{37}Cl - NHCH_2CH_3$)⁺, 389 ($M {}^{35}Cl - NHCH_2CH_3$)⁺.

HPLC t_R C18 Nucleosil 14,9 min, CN-RP 14,2 min.

7-chloro-4-[2-(*N',N'*-diéthylaminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]quinoléine (8)



$M = 461,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide jaune

$F = 156 \pm 1^\circ C$

Rendement = 37%

1H NMR ($CDCl_3$) δ 8,54 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz), 7,9 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz), 7,69 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 7,23 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz), 6,48 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz), 4,4 (d, 1H, $J = 13,0$ Hz), 4,27 (m, 1H), 4,20 (m, 1H), 4,15 (m, 2H), 4,14 (s, 5H), 4,08 (s, 1H), 3,83 (d, 1H, $J = 12,8$ Hz), 3,06 (d, 1H, $J = 12,8$ Hz), 2,73 (m, 2H), 2,39 (m, 2H), 0,96 (t, 6H, $J = 7,1$ Hz).

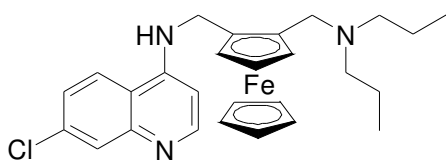
^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 152,1 (CH), 150,1 (C^{IV}), 149,2 (C^{IV}), 134,7 (C^{IV}), 128,3 (CH), 124,5 (CH), 122,7 (CH), 117,8 (C^{IV}), 99,0 (CH), 84,5 (C^{IV}), 83,8 (C^{IV}), 71,6 (CH), 70,5 (CH), 69,7 (5CH), 65,9 (CH), 51,3 (CH₂), 46,4 (2CH₂), 42,4 (CH₂), 10,6 (2CH₃).

MS m/z 464 $MH^+ {}^{37}Cl$, 463 $M^{+\bullet} {}^{37}Cl$, 462 $MH^+ {}^{35}Cl$, 461 $M^{+\bullet} {}^{35}Cl$, 391 ($M {}^{37}Cl - NHCH_2CH_3$)⁺, 389 ($M {}^{35}Cl - NHCH_2CH_3$)⁺.

Analyse élémentaire ($C_{25}H_{28}N_3ClFe$) Calculée: C, 65,01%; H, 6,07%; N, 9,10%; Mesurée: C, 65,25%; H, 6,15%; N, 9,32%.

HPLC t_R C18 Nucleosil 14,6 min, CN-RP 14,1 min.

7-chloro-4-[2-(*N',N'*-dipropylaminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]quinoléine (9)



$M = 489,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide jaune

$F =$ se décompose avant fusion

Rendement = 33%

1H NMR ($CDCl_3$) δ 8,53 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz), 7,91 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz), 7,65 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 7,25 (m, 1H), 7,14 (m, 1H), 6,47 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz), 4,34 (d, 1H, $J = 13,2$ Hz), 4,26 (m, 1H), 4,19 (m, 2H), 4,13 (s, 5H), 4,07 (s, 1H), 3,85 (d, 1H, $J = 13,0$ Hz), 3,09 (d, 1H, $J = 13,0$ Hz), 2,54 (m, 2H), 2,28 (m, 2H), 1,51 (m, 2H), 1,31 (m, 2H), 0,75 (t, 6H, $J = 6,8$ Hz).

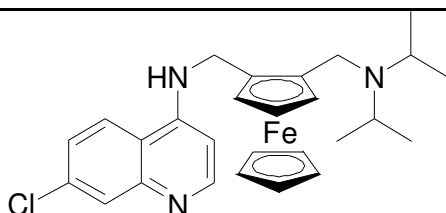
^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 152,3 (CH), 150,2 (C^{IV}), 149,5 (C^{IV}), 134,8 (C^{IV}), 128,6 (CH), 124,7

(CH), 122,7 (CH), 117,9 (C^{IV}), 99,2 (CH), 84,8 (C^{IV}), 84,1 (C^{IV}), 71,8 (CH), 70,5 (CH), 69,4 (5CH), 66,2 (CH), 56,2 (2CH₂), 52,5 (CH₂), 42,5 (CH₂), 19,1 (2CH₂), 12,2 (2CH₃).

MS m/z 492 MH⁺ ³⁷Cl, 491 M⁺ ³⁷Cl, 490 MH⁺ ³⁵Cl, 489 M⁺ ³⁵Cl, 391 (M ³⁷Cl – NHCH₂CH₃)⁺, 389 (M ³⁵Cl – NHCH₂CH₃)⁺.

HPLC t_R C18 Nucleosil 15,0 min, CN-RP 14,0 min.

7-chloro-4-[2-(N',N'-diisopropylaminométhyl)-N-ferrocénylméthylamino]quinoléine (10)



M = 489,5 g.mol⁻¹

Solide jaune

F = se décompose avant fusion

Rendement = 45%

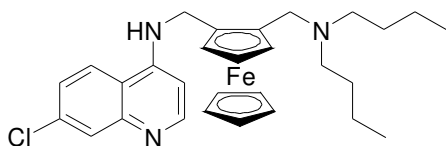
¹H NMR (CDCl₃) δ 8,56 (d, 1H, J = 5,4 Hz), 7,93 (m, 1H), 7,68 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,28 (dd, 1H, J = 2,1 ; 10,0 Hz), 6,53 ppm (d, 1H, J = 5,5 Hz), 6,20 (m, 1H), 4,30 (d, 1H, J = 12,7 Hz), 4,28 (m, 1H), 4,23 (m, 1H), 4,20 (m, 1H), 4,16 (s, 5H), 4,09 (m, 1H), 3,72 (d, 1H, J = 13,2 Hz), 3,39 (d, 1H, J = 13,2 Hz), 3,10 (q, 2H, J = 6,5 Hz), 1,00 (d, 6H, J = 3,7 Hz), 0,98 (d, 6H, J = 3,7 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 152,1 (CH), 149,7 (C^{IV}), 149,2 (C^{IV}), 134,8 (C^{IV}), 128,5 (CH), 124,8 (CH), 122,2 (CH), 117,6 (C^{IV}), 99,4 (CH), 86,2 (C^{IV}), 83,4 (C^{IV}), 72,0 (CH), 70,1 (CH), 69,2 (5CH), 66,1 (CH), 47,6 (CH₂), 42,4 (CH₂), 42,0 (2CH), 22,1 (2CH₃), 18,6 (2CH₃).

MS m/z 492 MH⁺ ³⁷Cl, 491 M⁺ ³⁷Cl, 490 MH⁺ ³⁵Cl, 489 M⁺ ³⁵Cl, 391 (M ³⁷Cl – NHCH₂CH₃)⁺, 389 (M ³⁵Cl – NHCH₂CH₃)⁺.

HPLC t_R C18 Nucleosil 14,9 min, CN-RP 14,3 min.

7-chloro-4-[2-(N',N'-dibutylaminométhyl)-N-ferrocénylméthylamino]quinoléine (11)



M = 517,5 g.mol⁻¹

Solide jaune

F = se décompose avant fusion

Rendement = 40%

¹H NMR (CDCl₃) δ 8,44 (d, 1H, J = 5,1 Hz), 7,84 (s, 1H), 7,58 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,15 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,04 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 6,38 (d, 1H, J = 5,5 Hz), 4,23 (d, 1H, J = 12,9 Hz), 4,15 (m, 1H), 4,08 (m, 2H), 4,03 (s, 5H), 3,96 (s, 1H), 3,70 (d, 1H, J = 12,4 Hz), 2,96 (d, 1H, J = 12,4 Hz), 2,48 (m, 2H), 2,18 (m, 2H), 1,37 (m, 2H), 1,16 (m, 2H), 1,03 (t, 2H, J = 6,9

Hz), 0,81 (t, 2H, J = 6,9 Hz), 0,66 (t, 6H, J = 6,9 Hz).

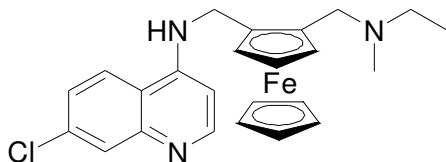
^{13}C NMR (CDCl_3) δ 151,0 (CH), 149,0 (C^{IV}), 148,2 (C^{IV}), 133,5 (C^{IV}), 127,3 (CH), 123,4 (CH), 121,6 (CH), 116,8 (C^{IV}), 98,1 (CH), 83,6 (C^{IV}), 82,7 (C^{IV}), 70,6 (CH), 69,3 (CH), 68,2 (5CH), 65,0 (CH), 52,6 (2CH₂), 51,2 (CH₂), 41,3 (CH₂), 26,9 (2CH₂), 19,8 (2CH₂), 13,0 (2CH₃).

MS m/z 520 $\text{MH}^+ {}^{37}\text{Cl}$, 519 $\text{M}^{+\bullet} {}^{37}\text{Cl}$, 518 $\text{MH}^+ {}^{35}\text{Cl}$, 517 $\text{M}^{+\bullet} {}^{35}\text{Cl}$, 391 ($\text{M} {}^{37}\text{Cl} - \text{NHCH}_2\text{CH}_3$)⁺, 389 ($\text{M} {}^{35}\text{Cl} - \text{NHCH}_2\text{CH}_3$)⁺.

HPLC t_R C18 Nucleosil 15,5 min, CN-RP 14,5 min.

7-chloro-4-[2-(*N'*-éthyl-*N'*-méthylaminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]quinoléine (13)

Un mélange de l'amine secondaire **3** (1mmol) et de formaldéhyde (solution à 37% dans l'eau, 10 mmol) est dissout dans du méthanol anhydre (10 mL). Après addition de cyanoborohydrure de sodium (1.8 mmol), le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 1h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. L'huile résultante est dissoute dans du dichlorométhane (25 mL) et la solution est filtrée sur célite. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice en utilisant comme éluant un mélange éther diéthylique/éther de pétrole/triéthylamine (6/3/1).



$M = 447,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide jaune

$F = 130 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Rendement = 65%

^1H NMR (CDCl_3) δ 8,52 (1H, d, J = 5,4 Hz), 7,91 (1H, d, J = 2,1 Hz), 7,65 (1H, d, J = 8,9 Hz), 7,27 (1H, dd, J = 2,1 ; 8,9 Hz), 6,46 (1H, d, J = 5,4 Hz), 4,35 (1H, d, J = 13,1 Hz), 4,25 (1H, m), 4,17 (3H, m), 4,13 (5H, s), 4,06 (1H, m), 3,82 (1H, d, J = 12,6 Hz), 2,90 (1H, d, J = 12,6 Hz), 2,61 (1H, m), 2,37 (1H, m), 2,15 (3H, s), 1,01 (3H, m).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 152,0 (CH), 150,1 (C^{IV}), 149,3 (C^{IV}), 134,6 (C^{IV}), 128,2 (CH), 124,5 (CH), 122,5 (CH), 117,7 (C^{IV}), 98,9 (CH), 84,1 (C^{IV}), 83,8 (C^{IV}), 71,6 (CH), 70,4 (CH), 69,2 (5CH), 65,9 (CH), 55,4 (CH₂), 51,1 (CH₂), 42,2 (CH₂), 41,3 (CH₃), 11,5 (CH₃).

MS m/z 450 $\text{MH}^+ {}^{37}\text{Cl}$, 449 $\text{M}^{+\bullet} {}^{37}\text{Cl}$, 448 $\text{MH}^+ {}^{35}\text{Cl}$, 447 $\text{M}^{+\bullet} {}^{35}\text{Cl}$, 391 ($\text{M} {}^{37}\text{Cl} - \text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$)⁺, 389 ($\text{M} {}^{35}\text{Cl} - \text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$)⁺.

Analyse élémentaire ($\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{Fe}$) Calculée: C, 64,37; H, 5,85; N, 9,38. Mesurée: C,

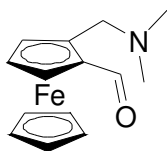
64,61; H, 5,59; N, 9,60.

HPLC t_R C18 Nucleosil 14,5 min, CN-RP 13,4 min.

II. Modification en position 11 de la ferroquine

2-(*N,N*-diméthylaminométhyl)ferrocénecarboxaldéhyde (**14**)

A une solution de *N,N*-diméthyl(ferrocénylméthyl)amine (500 mg, 1,8 mmol) dans éther diéthylique (10 mL) est ajouté du *n*-butyllitium (1,6 mL, 2,7 mmol) sous atmosphère d'azote. Le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 1h. Au milieu réactionnel est ensuite ajouté du DMF (1,1 mL, 14,3 mmol) et le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 15 minutes. Le milieu réactionnel est ensuite dilué avec de l'eau distillée (25 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (3 × 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur Na₂SO₄. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. On obtient une huile marron. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice en utilisant comme éluant un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole/triéthylamine (5/4/1).



$M = 271,0 \text{ g.mol}^{-1}$

Huile marron

Rendement = 94 %

¹H NMR (CDCl₃) δ 10,10 (s, 1H), 4,81 (m, 1H), 4,61 (m, 1H), 4,56 (m, 1H), 4,21 (s, 5H), 3,85 (d, 1H, $J = 13,1 \text{ Hz}$), 3,35 (d, 1H, $J = 13,1 \text{ Hz}$), 2,23 (s, 6H).

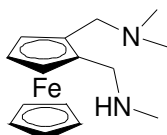
MS m/z 271 $M^{+\bullet}$, 256 ($M - \text{CH}_3$)⁺, 242 ($M - \text{CHO}$)⁺, 227 ($M - \text{N}(\text{CH}_3)_2$)⁺, 189 ($M - (\text{N}(\text{CH}_3)_2 + \text{CHO})$)⁺.

Procédure générale de synthèse des amines 15-19

A une solution de 2-(*N,N*-diméthylaminométhyl)ferrocénecarboxaldéhyde **14** (316 mg, 1 mmol) dans le THF anhydre (10 mL) est ajoutée l'amine correspondante (NH₂Me, NH₂Et, NH₂Pr, NH₂Bu ou NH₂iBu, 7 mmol). Le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 1h30. Le THF est évaporé sous pression réduite et le résidu est dissout dans

du méthanol anhydre (10 mL). A 0°C, du tétrahydroborate de sodium (380 mg, 10 mmol) est ajouté. La solution rouge devient jaune. Le produit est extrait à l'éther diéthylique. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice en utilisant comme éluant un mélange acétate d'éthyle/triéthylamine (9/1).

***N'*-méthyl-[2-(*N,N*-diméthylaminométhyl)ferrocényl]méthylamine (15)**



$M = 286,0 \text{ g.mol}^{-1}$

Huile marron.

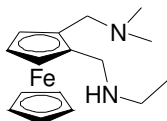
Rendement = 70%

¹H NMR (CDCl₃) δ 4,22 (s, 1H), 4,14 (s, 1H), 4,07 (s, 5H), 4,06 (s, 1H), 3,80 (d, 1H, $J = 13,2$ Hz), 3,65 (d, 1H, $J = 12,3$ Hz), 3,34 (d, 1H, $J = 13,4$ Hz), 2,85 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz), 2,38 (s, 3H), 2,14 (s, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃) 85,0 (C^{IV}), 83,6 (C^{IV}), 71,0 (CH), 70,1 (CH), 69,0 (5CH), 66,1 (CH), 58,0 (CH₂), 49,5 (CH₂), 44,9 (2CH₃), 35,1 (CH₃).

MS m/z 287 MH⁺.

***N'*-éthyl-[2-(*N,N*-diméthylaminométhyl)ferrocényl]méthylamine (16)**



$M = 300,0 \text{ g.mol}^{-1}$

Huile marron.

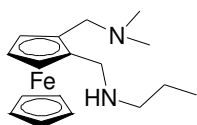
Rendement = 59%

¹H NMR (CDCl₃) δ 4,18 (s, 1H), 4,09 (s, 1H), 4,03 (s, 5H), 4,03 (s, 1H), 3,79 (d, 1H, $J = 13,0$ Hz), 3,65 (d, 1H, $J = 12,6$ Hz), 3,39 (d, 1H, $J = 13,0$ Hz), 2,84 (d, 1H, $J = 12,6$ Hz), 2,62 (m, 2H), 2,14 (s, 6H), 1,09 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) 85,6 (C^{IV}), 83,5 (C^{IV}), 70,9 (CH), 70,0 (CH), 68,9 (5CH), 65,9 (CH), 57,9 (CH₂), 47,3 (CH₂), 44,7 (2CH₃), 42,9 (CH₂), 14,8 (CH₃).

MS m/z 301 MH⁺.

***N'*-propyl-[2-(*N,N*-diméthylaminométhyl)ferrocényl]méthylamine (17)**



$M = 314,0 \text{ g.mol}^{-1}$

Huile marron.

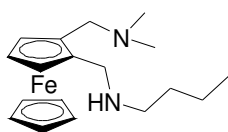
Rendement = 50%

^1H NMR (CDCl_3) δ 4,18 (s, 1H), 4,10 (s, 1H), 4,04 (s, 6H), 3,76 (d, 1H, $J = 12,8$ Hz), 3,65 (d, 1H, $J = 12,4$ Hz), 3,35 (d, 1H, $J = 13,0$ Hz), 2,82 (d, 1H, $J = 12,6$ Hz), 2,51 (m, 2H), 2,13 (s, 6H), 1,48 (m, 2H), 0,88 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) 86,1 (C^{IV}), 83,7 (C^{IV}), 70,9 (CH), 70,1 (CH), 68,9 (5CH), 65,8 (CH), 58,0 (2CH_2), 51,0 (CH_2), 47,9 (CH_2), 44,9 (2CH_3), 22,9 (CH_2), 11,8 (CH_3).

MS m/z 315 MH^+ .

***N'*-butyl-[2-(*N,N*-diméthylaminométhyl)ferrocényl]méthylamine (18)**



$M = 328,0 \text{ g.mol}^{-1}$

Huile marron.

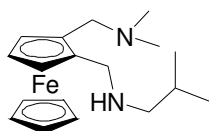
Rendement = 42%

^1H NMR (CDCl_3) δ 4,18 (s, 1H), 4,09 (s, 1H), 4,04 (s, 5H), 4,01 (m, 1H), 3,73 (d, 1H, $J = 13,1$ Hz), 3,63 (d, 1H, $J = 12,5$ Hz), 3,32 (d, 1H, $J = 13,1$ Hz), 2,82 (d, 1H, $J = 12,5$ Hz), 2,54 (m, 2H), 2,12 (s, 6H), 1,43 (m, 2H), 1,31 (m, 2H), 0,89 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) 85,8 (C^{IV}), 83,9 (C^{IV}), 71,8 (CH), 71,5 (CH), 69,6 (5CH), 67,0 (CH), 57,8 (CH_2), 46,4 (CH_2), 45,3 (CH_2), 44,3 (2CH_3), 28,9 (CH_2), 20,0 (CH_2), 13,6 (CH_3).

MS m/z 329 MH^+ .

***N'*-isobutyl-[2-(*N,N*-diméthylaminométhyl)ferrocényl]méthylamine (19)**



$M = 328,0 \text{ g.mol}^{-1}$

Huile marron.

Rendement = 42%

^1H NMR (CDCl_3) δ 4,16 (s, 1H), 4,07 (s, 1H), 4,01 (s, 5H), 3,99 (s, 1H), 3,70 (d, 1H, $J = 12,8$ Hz), 3,60 (d, 1H, $J = 12,4$ Hz), 3,30 (d, 1H, $J = 13,0$ Hz), 2,80 (d, 1H, $J = 12,4$ Hz), 2,30 (m, 2H), 2,10 (s, 6H), 1,71 (m, 1H), 0,87 (d, 3H, $J = 3,0$ Hz), 0,84 (d, 3H, $J = 3,0$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 86,6 (C^{IV}), 83,7 (C^{IV}), 70,8 (CH), 70,1 (CH), 68,7 (5CH), 65,6 (CH), 58,0 (CH_2), 57,6 (CH_2), 48,2 (CH_2), 45,0 (2CH_3), 28,3 (CH), 20,7 (2CH_3).

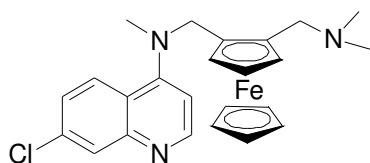
MS m/z 329 MH^+ .

Procédure générale de synthèse des dérivés 20-24 de la ferroquine

Une solution contenant l'amine correspondante **15-19** (260 mg, 0.82 mmol), la 4,7-dichloroquinoléine (816 mg, 4.1 mmol), du carbonate de potassium (227 mg, 1.6 mmol) et de la triéthylamine (1,1 mL, 7.9 mmol) dans du *N*-methyl-2-pyrrolidinone (4 mL) est portée à

135°C sous atmosphère d'azote pendant 4 h. Le milieu réactionnel est ensuite extrait avec du dichlorométhane (3 × 25 mL). Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec de l'eau saturée en NaCl (8 × 25 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et les solvants sont évaporés sous pression réduite. On obtient un solide marron. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice en utilisant comme éluant un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole/triéthylamine (4.5/5/0.5).

7-chloro-4-{*N*-méthyl-[2-(*N*',*N*'-diméthylaminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]}-quinoléine (20)



$M = 447,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Huile marron

Rendement = 60%

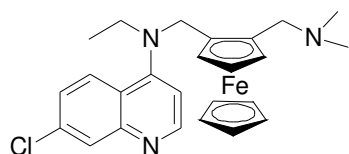
¹H NMR (CDCl₃) δ 8,63 (d, 1H, J = 5,2 Hz), 8,05 (d, 1H, J = 9,1 Hz), 8,02 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 7,38 (dd, 1H, J = 2,2 ; 8,9 Hz), 6,79 ppm (d, 1H, J = 5,3 Hz), 4,39 (m, 2H), 4,22 (m, 2H), 4,11 (m, 1H), 4,05 (s, 5H), 3,31 (d, 1H, J = 12,9 Hz), 3,10 (d, 1H, J = 12,9 Hz), 2,91 (s, 3H), 2,08 (m, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 157,3 (C^{IV}), 151,6 (CH), 150,6 (C^{IV}), 134,8 (C^{IV}), 128,8 (CH), 126,1 (CH), 125,4 (CH), 121,9 (C^{IV}), 108,8 (CH), 83,4 (C^{IV}), 83,2 (C^{IV}), 71,1 (CH), 70,1 (CH), 69,6 (5CH), 67,1 (CH), 57,7 (CH₂), 54,1 (CH₂), 45,2 (2CH₃), 40,5 (CH₃).

MS m/z 450 MH⁺ ³⁷Cl, 448 MH⁺ ³⁵Cl, 405 (M ³⁷Cl – NMe₂)⁺, 403 (M ³⁷Cl – NMe₂)⁺.

HPLC t_R C18 Nucleosil 14,5 min, CN-RP 13,5 min.

7-chloro-4-{*N*-éthyl-[2-(*N*',*N*'-diméthylaminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]}-quinoléine (21)



$M = 461,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Huile marron

Rendement = 58%

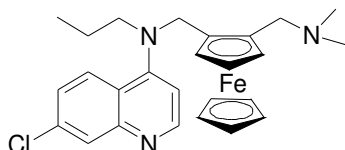
¹H NMR (CDCl₃) δ 8,62 (d, 1H, J = 5,2 Hz), 8,07 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 8,02 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 7,38 (dd, 1H, J = 2,2 ; 9,0 Hz), 6,89 ppm (d, 1H, J = 5,2 Hz), 4,43 (d, 1H, J = 14,7 Hz), 4,32 (d, 1H, J = 14,7 Hz), 4,18 (m, 2H), 4,04 (m, 1H), 4,03 (s, 5H), 3,41 (q, 2H, J = 7,0 Hz), 3,33 (d, 1H, J = 12,8 Hz), 3,03 (d, 1H, J = 12,8 Hz), 2,08 (s, 6H), 1,09 (t, 3H, J = 7,0 Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 155,9 (C^{IV}), 151,3 (CH), 150,5 (C^{IV}), 134,6 (C^{IV}), 128,6 (CH), 125,9 (CH), 125,5 (CH), 122,9 (C^{IV}), 111,0 (CH), 83,7 (C^{IV}), 83,5 (C^{IV}), 70,6 (CH), 69,7 (CH), 69,4 (5CH), 66,5 (CH), 57,7 (CH_2), 50,6 (CH_2), 46,4 (CH_2), 45,2 (2CH_3), 11,8 (CH_3).

MS m/z 464 $\text{MH}^+ {}^{37}\text{Cl}$, 462 $\text{MH}^+ {}^{35}\text{Cl}$, 419 ($\text{M} {}^{37}\text{Cl} - \text{NMe}_2$) $^+$, 417 ($\text{M} {}^{37}\text{Cl} - \text{NMe}_2$) $^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 14,6 min, CN-RP 13,5 min.

7-chloro-4-{*N*-propyl-[2-(*N*',*N*'-diméthylaminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]}-quinoléine (22)



$M = 475,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Huile marron

Rendement = 40%

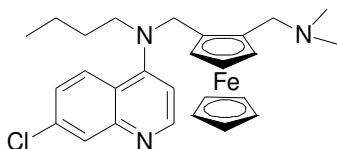
^1H NMR (CDCl_3) δ 8,61 (d, 1H, $J = 5,1 \text{ Hz}$), 8,09 (d, 1H, $J = 9,1 \text{ Hz}$), 8,02 (d, 1H, $J = 2,2 \text{ Hz}$), 7,39 (dd, 1H, $J = 2,2 ; 9,1 \text{ Hz}$), 6,85 ppm (d, 1H, $J = 5,1 \text{ Hz}$), 4,46 (d, 1H, $J = 14,6 \text{ Hz}$), 4,34 (d, 1H, $J = 14,6 \text{ Hz}$), 4,16 (m, 2H), 4,13 (m, 1H), 4,01 (s, 5H), 3,30 (d, 1H, $J = 12,5 \text{ Hz}$), 3,29 (t, 2H, $J = 7,5 \text{ Hz}$), 2,98 (d, 1H, $J = 12,7 \text{ Hz}$), 2,06 (s, 6H), 1,56 (m, 2H), 0,82 (t, 3H, $J = 7,4 \text{ Hz}$).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 156,1 (C^{IV}), 151,3 (CH), 150,6 (C^{IV}), 134,6 (C^{IV}), 128,6 (CH), 125,9 (CH), 125,4 (CH), 122,9 (C^{IV}), 111,0 (CH), 83,6 (2C^{IV}), 70,6 (CH), 69,7 (CH), 69,3 (5CH), 66,5 (CH), 57,7 (CH_2), 53,3 (CH_2), 51,5 (CH_2), 45,2 (2CH_3), 19,8 (CH_2), 11,5 (CH_3).

MS m/z 478 $\text{MH}^+ {}^{37}\text{Cl}$, 476 $\text{MH}^+ {}^{35}\text{Cl}$, 433 ($\text{M} {}^{37}\text{Cl} - \text{NMe}_2$) $^+$, 431 ($\text{M} {}^{37}\text{Cl} - \text{NMe}_2$) $^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 15,0 min, CN-RP 13,9 min.

7-chloro-4-{*N*-butyl-[2-(*N*',*N*'-diméthylaminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]}-quinoléine (23)



$M = 489,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Huile marron

Rendement = 56%

^1H NMR (CDCl_3) δ 8,62 (d, 1H, $J = 5,2 \text{ Hz}$), 8,08 (d, 1H, $J = 9,1 \text{ Hz}$), 8,02 (d, 1H, $J = 1,9 \text{ Hz}$), 7,39 (dd, 1H, $J = 1,9 ; 8,9 \text{ Hz}$), 6,85 ppm (d, 1H, $J = 5,1 \text{ Hz}$), 4,53 (d, 1H, $J = 14,4 \text{ Hz}$), 4,38 (d, 1H, $J = 14,4 \text{ Hz}$), 4,16 (m, 1H), 4,12 (m, 1H), 4,03 (m, 1H), 4,01 (s, 5H), 3,30 (m, 3H), 2,96 (d, 1H, $J = 12,9 \text{ Hz}$), 2,07 (s, 6H), 1,50 (m, 2H), 1,24 (m, 2H), 0,85 (t, 3H, $J = 7,3$).

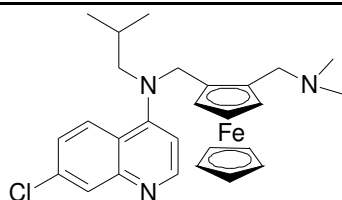
Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 156,1 (C^{IV}), 151,3 (CH), 150,7 (C^{IV}), 134,9 (C^{IV}), 128,7 (CH), 125,9 (CH), 125,4 (CH), 122,9 (C^{IV}), 111,1 (CH), 83,6 (2C^{IV}), 70,6 (CH), 69,7 (CH), 69,3 (5CH), 66,6 (CH), 57,7 (CH_2), 51,7 (CH_2), 51,2 (CH_2), 45,2 (2CH_3), 28,7 (CH_2), 20,3 (CH_2), 13,9 (CH_3).

MS m/z 492 $\text{MH}^+ {}^{37}\text{Cl}$, 490 $\text{MH}^+ {}^{35}\text{Cl}$, 447 ($\text{M} {}^{37}\text{Cl} - \text{NMe}_2$) $^+$, 445 ($\text{M} {}^{37}\text{Cl} - \text{NMe}_2$) $^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 15,3 min, CN-RP 14,2 min.

7-chloro-4-{*N*-isobutyl-[2-(*N*',*N*'-diméthylaminométhyl)-*N*-ferrocénylméthylamino]}-quinoléine (24)



$M = 489,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Huile marron

Rendement = 36%

^1H NMR (CDCl_3) δ 8,62 (d, 1H, $J = 5,2 \text{ Hz}$), 8,16 (d, 1H, $J = 8,9 \text{ Hz}$), 8,04 (d, 1H, $J = 2,1 \text{ Hz}$), 7,44 (dd, 1H, $J = 2,1, 9,0 \text{ Hz}$), 6,80 ppm (d, 1H, $J = 5,2 \text{ Hz}$), 4,54 (d, 1H, $J = 14,4 \text{ Hz}$), 4,37 (d, 1H, $J = 14,4 \text{ Hz}$), 4,15 (m, 1H), 4,12 (m, 1H), 4,05 (m, 1H), 3,97 (s, 5H), 3,25 (d, 1H, $J = 13,0 \text{ Hz}$), 3,12 (m, 1H), 2,93 (m, 1H), 2,88 (d, 1H, $J = 13,0 \text{ Hz}$), 2,02 (s, 6H), 1,03 (m, 1H), 0,86 (d, 3H, $J = 4,6 \text{ Hz}$), 0,83 (d, 3H, $J = 4,6 \text{ Hz}$).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 156,3 (C^{IV}), 151,2 (CH), 150,7 (C^{IV}), 134,6 (C^{IV}), 128,7 (CH), 126,0 (CH), 125,4 (CH), 123,1 (C^{IV}), 111,4 (CH), 83,8 (C^{IV}), 83,3 (C^{IV}), 70,6 (CH), 69,7 (CH), 69,3 (5CH), 66,7 (CH), 57,7 (CH_2), 57,6 (CH_2), 53,3 (CH_2), 45,1 (2CH_3), 26,0 (CH), 20,6 (CH_3), 20,5 (CH_3).

MS m/z 492 $\text{MH}^+ {}^{37}\text{Cl}$, 490 $\text{MH}^+ {}^{35}\text{Cl}$, 447 ($\text{M} {}^{37}\text{Cl} - \text{NMe}_2$) $^+$, 445 ($\text{M} {}^{37}\text{Cl} - \text{NMe}_2$) $^+$.

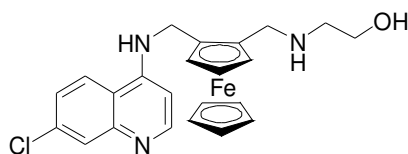
HPLC t_R C18 Nucleosil 15,2 min, CN-RP 14,1 min.

III. Les hydroxyferroquines

Procédure générale de synthèse des hydroxyferroquines 25-27 de la ferroquine

Un mélange de l'amino-alcool correspondant (éthanolamine, 2-(méthylamino)éthanol, ou 2-(éthylamino)éthanol, 10 mmol) et d'iodure de *N,N,N*-triméthyl{2-[4-*N'*-(7-chloroquinolyl)aminométhyl]}ferrocénylméthyl-ammonium préparé précédemment (1 mmol) est dissout dans de l'acétonitrile (25 mL). Du carbonate de potassium (10 mmol) est ajouté en excès et le mélange est porté à reflux pendant 3 à 7h. La solution refroidie à température ambiante est diluée avec de l'eau (25 mL). La phase aqueuse est ensuite extraite avec du dichlorométhane (3 × 50 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaCl (50 mL) et séchée sur Na₂SO₄. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. On obtient un solide orange. Celui-ci est purifié sur colonne chromatographique de silice en utilisant comme éluant un mélange acétate d'éthyle/triéthylamine (9/1).

2-[*N*-(2-[[7-Chloro-4-quinolyl)amino]méthyl]ferrocénylméthyl)amino]éthan-1-ol (25)



$M = 449,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide jaune

Rendement = 46%

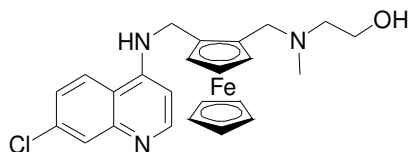
F = se décompose avant fusion

¹H NMR (CDCl₃) δ 8,41 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz), 7,79 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz), 7,68 (d, 1H, $J = 9,1$ Hz), 7,11 (dd, 1H, $J = 2,0$; 9,8 Hz), 6,89 (m, 1H), 6,38 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz), 4,28 (d, 1H, $J = 13,0$ Hz), 4,19 (m, 1H), 4,14 (m, 1H), 4,09 (s, 5H), 4,03 (m, 2H), 3,67 (m, 3H), 3,49 (d, 1H, $J = 12,4$ Hz), 2,73 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 150,7 (CH), 149,0 (C^{IV}), 147,8 (C^{IV}), 133,7 (C^{IV}), 126,9 (CH), 123,7 (CH), 121,5 (CH), 116,5 (C^{IV}), 97,8 (CH), 84,3 (C^{IV}), 82,2 (C^{IV}), 69,5 (CH), 69,2 (CH), 68,2 (5CH), 65,4 (CH), 59,8 (CH₂), 50,1 (CH₂), 46,6 (CH₂), 41,1 (CH₂).

MS m/z 452 (MH⁺ ³⁷Cl), 451 (M^{•+} ³⁷Cl), 450 MH⁺ ³⁵Cl, 449 (M^{•+} ³⁵Cl), 391 (M ³⁷Cl - NHCH₂CH₂OH)⁺, 389 (M ³⁵Cl - NHCH₂CH₂OH)⁺.

Analyse élémentaire (C₂₃H₂₄ON₃FeCl) Calculée: C, 61,42%; H, 5,38%; N, 9,34%; Mesurée: C, 61,53%; H, 5,17%; N, 9,56%.

2-[N-méthyl-N-(2-[[7-Chloro-4-quinolyl]amino]méthyl]ferrocénylméthyl)amino]éthan-1-ol (26)
M = 463,5 g.mol⁻¹

Solide jaune

Rendement = 46%

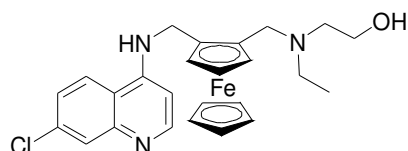
F = 164 ± 1°C

¹H NMR (CDCl₃) δ 8,45 (d, 1H, J = 5,5 Hz), 7,86 (d, 1H, J = 2,2 Hz), 7,71 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 7,23 (d, 1H, J = 2,2 Hz), 6,77 (m, 1H), 6,46 (d, 1H, J = 5,5 Hz), 4,32 (m, 2H), 4,20 (m, 2H), 4,15 (s, 5H), 4,11 (m, 1H), 3,88 (d, 1H, J = 12,9 Hz), 3,67 (m, 2H), 3,07 (d, 1H, J = 12,9 Hz), 2,74 (m, 1H), 2,48 (m, 1H), 2,19 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 151,4 (CH), 150,1 (C^{IV}), 148,5 (C^{IV}), 134,8 (C^{IV}), 127,6 (CH), 124,8 (CH), 122,4 (CH), 117,4 (C^{IV}), 98,8 (CH), 84,0 (C^{IV}), 83,8 (C^{IV}), 71,5 (CH), 70,3 (CH), 69,3 (5CH), 66,4 (CH), 59,2 (CH₂), 59,1 (CH₂), 56,4 (CH₂), 42,4 (CH₂), 41,9 (CH₃).

MS *m/z* 466 (MH⁺ ³⁷Cl), 465 (M^{•+} ³⁷Cl), 464 MH⁺ ³⁵Cl, 463 (M^{•+} ³⁵Cl), 391 (M ³⁷Cl - NHCH₂CH₂OH)⁺, 389 (M ³⁵Cl - NHCH₂CH₂OH)⁺.

Analyse élémentaire (C₂₄H₂₆ON₃FeCl) Calculée: C, 62,15%; H, 5,65%; N, 9,06%; Mesurée: C, 62,26%; H, 5,57%; N, 9,16%.

2-[N-éthyl-N-(2-[[7-Chloro-4-quinolyl]amino]méthyl]ferrocénylméthyl)amino]éthan-1-ol (27)
M = 477,5 g.mol⁻¹

Solide jaune

Rendement = 51%

F = 180 ± 1°C

¹H NMR (CDCl₃) δ 8,43 (d, 1H, J = 5,5 Hz), 7,82 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,70 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 7,21 (dd, 1H, J = 8,9 ; 2,1 Hz), 6,42 (d, 1H, J = 5,5 Hz), 4,25 (m, 1H), 4,20 (s, 1H), 4,16 (m, 1H), 4,09 (s, 5H), 4,07 (m, 2H), 3,78 (d, 1H, J = 13,0 Hz), 3,50 (m, 2H), 3,13 (d, 1H, J = 13,0 Hz), 2,71 (m, 1H), 2,58 (m, 1H), 2,40 (m, 2H), 0,88 (t, 3H, J = 7,2 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 151,2 (CH), 149,0 (C^{IV}), 148,4 (C^{IV}), 134,1 (C^{IV}), 127,4 (CH), 124,3 (CH), 121,6 (CH), 116,7 (C^{IV}), 98,6 (CH), 83,8 (C^{IV}), 82,9 (C^{IV}), 70,9 (CH), 69,4 (CH), 68,6 (5CH), 65,9 (CH), 58,5 (CH₂), 53,8 (CH₂), 51,8 (CH₂), 47,2 (CH₂), 40,9 (CH₂), 10,1 (CH₃).

MS *m/z* 480 (MH⁺ ³⁷Cl), 479 (M^{•+} ³⁷Cl), 478 MH⁺ ³⁵Cl, 477 (M^{•+} ³⁵Cl), 391 (M ³⁷Cl - NHCH₂CH₂OH)⁺, 389 (M ³⁵Cl - NHCH₂CH₂OH)⁺.

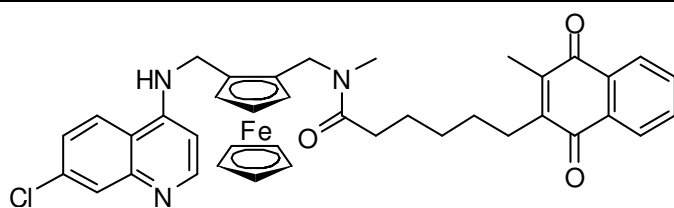
Analyse élémentaire (C₂₅H₂₈ON₃FeCl) Calculée: C, 62,84%; H, 5,91%; N, 8,79%; Mesurée: C, 62,79%; H, 5,86%; N, 8,85%.

IV. Molécules duales ferroquine-inhibiteurs de GR ou dépléteurs de GSH avec un lien amide

Procédure générale de synthèse des molécules duales 31-54

Un mélange de l'amine correspondante **2-7** (1 mmol) et de l'acide carboxylique correspondant (**M₅**, BJ137, l'acide 4-bromobenzoïque ou l'acide 4-méthoxybenzoïque, 1 mmol) est dissout dans du dichlorométhane préalablement séché sur tamis moléculaire (10 mL). Du chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDCI, 1 mmol) est ajouté et le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 3 à 5h. La solution est ensuite diluée avec du dichlorométhane (20 mL), la phase organique est lavée avec une solution saturée en NaHCO₃ (2 × 15 mL) puis avec une solution saturée en NaCl (15 mL) et séchée sur Na₂SO₄. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. On obtient un solide marron ou jaune selon le produit synthétisé. Celui-ci est purifié sur colonne chromatographique de silice en utilisant comme éluant un mélange acétate d'éthyle/triéthylamine (97,5/2,5).

N-(2-[[**(7-chloro-4-quinolyl)amino**]méthyl]ferrocényle)méthyl)-*N*-méthyl-6-(3-méthyl-1,4-naphtoquinolyl)hexanamide (**31**)



M = 685,5 g.mol⁻¹

Solide marron

F = 56 ± 1 °C

Rendement = 42%

¹H NMR (CDCl₃) δ 8,48 (d, 1H, J = 5,6 Hz), 8,07 (m, 2H), 7,89 (d, 1H, J = 9,1 Hz), 7,86 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,69 (dd, 2H, J = 3,4 ; 5,8 Hz), 7,25 (dd, 1H, J = 2,1 ; 8,9 Hz), 6,96 (m, 1H), 6,53 (d, 1H, J = 5,6 Hz), 5,35 (d, 1H, J = 14,3 Hz), 4,50 (dd, 1H, J = 4,5, 14,7 Hz), 4,35 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,17 (s, 5H), 4,14 (t, 1H, J = 2,6 Hz), 3,59 (d, 1H, J = 14,3 Hz), 2,98 (s, 3H), 2,62 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 2,31 (m, 2H), 2,18 (s, 3H), 1,67 (m, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,43 (m, 2H).

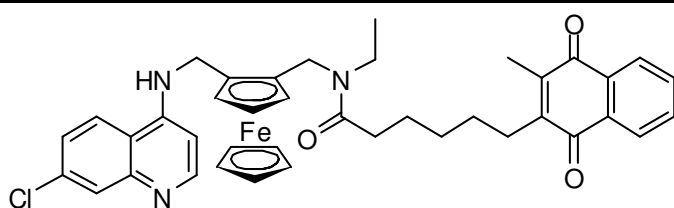
¹³C NMR (CDCl₃) δ 184,3 (C^{IV}), 183,7 (C^{IV}), 172,1 (C^{IV}), 149,8 (CH), 149,1 (C^{IV}), 147,3 (C^{IV}), 146,0 (C^{IV}), 142,3 (C^{IV}), 134,1 (C^{IV}), 132,4 (2CH), 131,1 (2C^{IV}), 126,4 (CH), 125,3

(CH), 125,2 (CH), 123,9 (CH), 121,7 (CH), 116,2 (C^{IV}), 97,2 (CH), 82,6 (C^{IV}), 81,2 (C^{IV}), 69,5 (CH), 68,9 (CH), 68,3 (5CH), 66,7 (CH), 44,6 (CH₂), 39,4 (CH₂), 34,6 (CH₃), 32,5 (CH₂), 28,6 (CH₂), 27,5 (CH₂), 25,9 (CH₂), 23,7 (CH₂), 11,8 (CH₃).

MS m/z 690 MH⁺ ³⁷Cl, 689 M^{+•} ³⁷Cl, 688 MH⁺ ³⁵Cl, 687 M^{+•} ³⁵Cl, 391 (C₉H₅N³⁷ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺, 389 (C₉H₅N³⁵ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺.

HPLC t_R C18 Nucleosil 20,3 min, CN-RP 17,0 min.

***N*-(2-[[*(7-chloro-4-quinolyl)amino*]méthyl}ferrocénylméthyl)-*N*-éthyl-6-(3-méthyl-1,4-naphtoquinolyl)hexanamide (32)**



$M = 699,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide marron

$F = 84 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Rendement = 50%

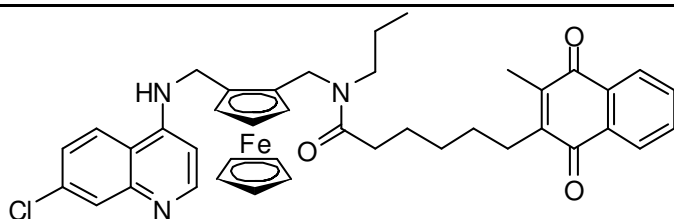
¹H NMR (CDCl₃) δ 8,49 (d, 1H, $J = 5,4 \text{ Hz}$), 8,07 (m, 2H), 7,88 (d, 1H, $J = 9,0 \text{ Hz}$), 7,86 (d, 1H, $J = 2,1 \text{ Hz}$), 7,68 (dd, 2H, $J = 3,4 ; 5,7 \text{ Hz}$), 7,21 (dd, 1H, $J = 2,2 ; 8,9 \text{ Hz}$), 6,93 (m, 1H), 6,52 (d, 1H, $J = 5,4 \text{ Hz}$), 5,20 (d, 1H, $J = 14,3 \text{ Hz}$), 4,49 (dd, 1H, $J = 4,4 ; 14,3 \text{ Hz}$), 4,34 (m, 1H), 4,28 (m, 1H), 4,24 (m, 1H), 4,17 (s, 5H), 4,13 (m, 1H), 3,70 (d, 1H, $J = 14,3 \text{ Hz}$), 3,31 (m, 2H), 2,62 (t, 2H, $J = 7,4 \text{ Hz}$), 2,27 (m, 2H), 2,18 (s, 3H), 1,68 (m, 2H), 1,47 (m, 2H), 1,38 (m, 2H), 1,16 (t, 3H, $J = 7,01 \text{ Hz}$).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 185,6 (C^{IV}), 185,0 (C^{IV}), 173,0 (C^{IV}), 150,9 (CH), 150,5 (C^{IV}), 148,3 (C^{IV}), 147,3 (C^{IV}), 143,6 (C^{IV}), 135,5 (C^{IV}), 133,6 (2CH), 132,3 (2C^{IV}), 126,5 (CH), 125,3 (CH), 125,2 (CH), 122,9 (CH), 122,1 (CH), 117,5 (C^{IV}), 98,5 (CH), 83,7 (C^{IV}), 83,1 (C^{IV}), 70,7 (CH), 70,2 (CH), 69,5 (5CH), 67,8 (CH), 42,8 (CH₂), 42,2 (CH₂), 40,9 (CH₂), 33,1 (CH₂), 29,8 (CH₂), 28,7 (CH₂), 27,1 (CH₂), 25,1 (CH₂), 13,9 (CH₃), 12,9 (CH₃).

MS m/z 704 MH⁺ ³⁷Cl, 703 M^{+•} ³⁷Cl, 702 MH⁺ ³⁵Cl, 701 M^{+•} ³⁵Cl, 391 (C₉H₅N³⁷ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺, 389 (C₉H₅N³⁵ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺.

HPLC t_R C18 Nucleosil 20,6 min, CN-RP 16,9 min.

***N*-(2-[[*(*7-chloro-4-quinolyl)amino]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-propyl-6-(3-méthyl-1,4-naphtoquinolyl)hexanamide (33)**



$M = 713,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide marron

F = se décompose avant fusion

Rendement = 27%

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8,50 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz), 8,06 (m, 2H), 7,92 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 7,89 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz), 7,68 (dd, 2H, $J = 3,3$; 5,8 Hz), 7,22 (dd, 1H, $J = 2,0$; 9,0 Hz), 7,01 (m, 1H), 6,53 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz), 5,19 (d, 1H, $J = 14,7$ Hz), 4,50 (dd, 1H, $J = 4,9$; 14,7 Hz), 4,33 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,24 (m, 1H), 4,18 (s, 5H), 4,14 (t, 1H, $J = 2,5$ Hz), 3,72 (d, 1H, $J = 14,7$ Hz), 3,20 (m, 2H), 2,62 (m, 2H), 2,30 (m, 2H), 2,17 (s, 3H), 1,67 (m, 2H), 1,58 (m, 2H), 1,49 (m, 2H), 1,27 (m, 2H), 0,92 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz).

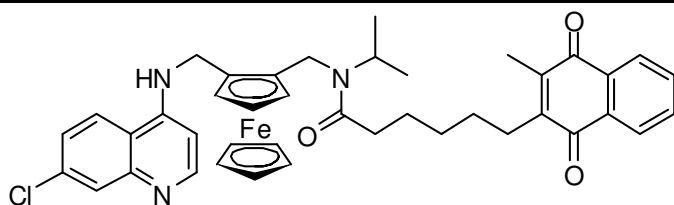
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 185,3 (C^{IV}), 184,7 (C^{IV}), 172,9 (C^{IV}), 151,1 (CH), 150,1 (C^{IV}), 148,6 (C^{IV}), 147,0 (C^{IV}), 143,3 (C^{IV}), 135,0 (C^{IV}), 133,3 (2CH), 132,1 (2 C^{IV}), 127,6 (CH), 126,3 (CH), 126,2 (CH), 124,8 (CH), 122,6 (CH), 117,3 (C^{IV}), 98,3 (CH), 83,6 (C^{IV}), 82,9 (C^{IV}), 70,4 (CH), 70,0 (CH), 69,3 (5CH), 67,5 (CH), 49,1 (CH_2), 43,0 (CH_2), 40,7 (CH_2), 32,9 (CH_2), 29,6 (CH_2), 28,5 (CH_2), 26,9 (CH_2), 25,0 (CH_2), 21,7 (CH_2), 12,7 (CH_3), 11,3 (CH_3).

MS m/z 718 MH^+ ^{37}Cl , 717 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 716 MH^+ ^{35}Cl , 715 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$, 389 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$.

HR-MS m/z 714,2336, 716,2347, 718,2369, 719,2363, 720,2402.

HPLC t_R C18 Nucleosil 21,3 min, CN-RP 17,0 min.

***N*-(2-[[*(*7-chloro-4-quinolyl)amino]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-isopropyl-6-(3-méthyl-1,4-naphtoquinolyl)hexanamide (34)**



$M = 713,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide marron

F = se décompose avant fusion

Rendement = 23%

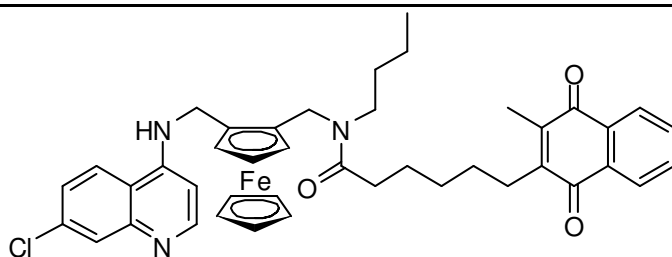
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8,43 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz), 8,11 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz), 7,99 (m, 2H), 7,86 (t, 1H, $J = 2,6$ Hz), 7,61 (dd, 2H, $J = 3,9$; 5,7 Hz), 7,19 (dd, 1H, $J = 2,1$; 8,9 Hz), 6,46 (d, 1H, $J = 5,8$ Hz), 4,38 (d, 1H, $J = 14,4$ Hz), 4,19 (m, 2H), 4,16 (m, 2H), 4,10 (s, 5H), 4,05 (m, 1H), 3,96 (d, 1H, $J = 14,4$ Hz), 2,55 (m, 2H), 2,21 (m, 2H), 2,09 (s, 3H), 1,60 (m, 2H), 1,39 (m, 2H), 1,31 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz), 1,16 (dd, 6H, $J = 4,4$; 7,3 Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 185,4 (C^{IV}), 184,8 (C^{IV}), 172,3 (C^{IV}), 151,8 (CH), 150,3 (C^{IV}), 149,2 (C^{IV}), 147,3 (C^{IV}), 143,4 (C^{IV}), 134,8 (C^{IV}), 133,5 (2CH), 132,2 (2 C^{IV}), 128,0 (CH), 126,3 (CH), 126,2 (CH), 124,8 (CH), 123,4 (CH), 117,7 (C^{IV}), 98,5 (CH), 85,1 (C^{IV}), 82,7 (C^{IV}), 69,9 (CH), 69,7 (CH), 69,4 (5CH), 67,4 (CH), 48,5 (CH), 41,6 (CH_2), 39,1 (CH_2), 33,7 (CH_2), 29,6 (CH_2), 28,6 (CH_2), 27,0 (CH_2), 25,6 (CH_2), 22,6 (CH_3), 21,5 (CH_3), 12,9 (CH_3).

MS m/z 718 MH^+ ^{37}Cl , 717 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 716 MH^+ ^{35}Cl , 715 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$, 389 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 22,4 min, CN-RP 17,1 min.

***N*-(2-[[*(7-chloro-4-quinolyl)amino*]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-butyl-6-(3-méthyl-1,4-naphtoquinolyl)hexanamide (35)**



$M = 727,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide marron

F = se décompose avant fusion

Rendement = 29%

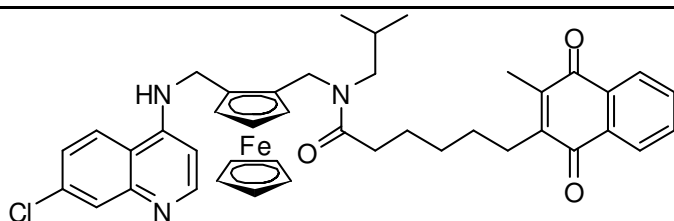
^1H NMR (CDCl_3) δ 8,48 (d, 1H, $J = 5,9$ Hz), 8,06 (m, 2H), 7,90 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz), 7,87 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz), 7,68 (dd, 1H, $J = 3,4$; 5,7 Hz), 7,25 (dd, 1H, $J = 2,0$; 9,0 Hz), 6,98 (m, 1H), 6,53 (d, 1H, $J = 5,9$ Hz), 5,20 (d, 1H, $J = 14,3$ Hz), 4,49 (dd, 1H, $J = 4,5$; 14,4 Hz), 4,34 (m, 1H), 4,28 (m, 1H), 4,23 (m, 1H), 4,17 (s, 5H), 4,13 (m, 1H), 3,70 (d, 1H, $J = 14,3$ Hz), 3,21 (m, 2H), 2,61 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz), 2,25 (m, 2H), 2,18 (s, 3H), 1,67 (m, 2H), 1,55 (m, 2H), 1,46 (m, 2H), 1,43 (m, 2H), 1,32 (m, 2H), 0,93 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 185,4 (C^{IV}), 184,8 (C^{IV}), 172,3 (C^{IV}), 151,8 (CH), 150,3 (C^{IV}), 149,2 (C^{IV}), 147,3 (C^{IV}), 143,4 (C^{IV}), 134,8 (C^{IV}), 133,5 (2CH), 132,2 (2 C^{IV}), 128,0 (CH), 126,3 (CH), 126,2 (CH), 124,8 (CH), 123,4 (CH), 117,7 (C^{IV}), 98,5 (CH), 85,1 (C^{IV}), 82,7 (C^{IV}), 69,9 (CH), 69,7 (CH), 69,4 (5CH), 67,4 (CH), 48,5 (CH), 41,6 (CH_2), 39,1 (CH_2), 33,7 (CH_2), 29,6 (CH_2), 28,6 (CH_2), 27,0 (CH_2), 25,6 (CH_2), 22,6 (CH_3), 21,5 (CH_3), 12,9 (CH_3).

MS m/z 732 MH^+ ^{37}Cl , 731 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 730 MH^+ ^{35}Cl , 729 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$, 389 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 22,2 min, CN-RP 17,5 min.

***N*-(2-[[*(*7-chloro-4-quinolyl)amino]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-isobutyl-6-(3-méthyl-1,4-naphtoquinolyl)hexanamide (36)**



$M = 727,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide marron

F = se décompose avant fusion

Rendement = 32%

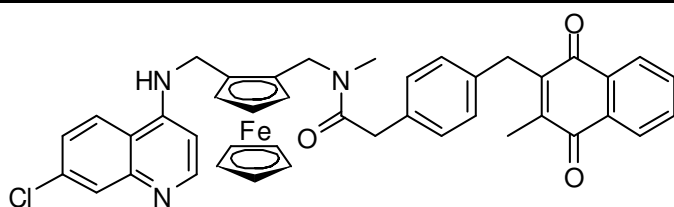
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8,49 (d, 1H, $J = 5,3 \text{ Hz}$), 8,06 (m, 2H), 7,91 (d, 1H, $J = 9,0 \text{ Hz}$), 7,87 (d, 1H, $J = 2,0 \text{ Hz}$), 7,68 (dd, 2H, $J = 3,4 ; 5,6 \text{ Hz}$), 7,25 (dd, 1H, $J = 2,2 ; 9,0 \text{ Hz}$), 6,92 (m, 1H), 6,52 (d, 1H, $J = 5,3 \text{ Hz}$), 5,17 (d, 1H, $J = 14,4 \text{ Hz}$), 4,46 (dd, 1H, $J = 4,2 ; 15,0 \text{ Hz}$), 4,32 (m, 1H), 4,28 (m, 1H), 4,22 (m, 1H), 4,17 (s, 5H), 4,13 (m, 1H), 3,76 (d, 1H, $J = 14,4 \text{ Hz}$), 3,08 (m, 2H), 2,59 (t, 2H, $J = 7,4 \text{ Hz}$), 2,24 (m, 2H), 2,16 (s, 3H), 2,00 (m, 1H), 1,65 (m, 2H), 1,43 (m, 2H), 1,31 (m, 2H), 0,90 (d, 3H, $J = 6,5 \text{ Hz}$), 0,84 (d, 3H, $J = 6,6 \text{ Hz}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 184,3 (C^{IV}), 183,6 (C^{IV}), 172,1 (C^{IV}), 150,7 (CH), 148,8 (C^{IV}), 148,1 (C^{IV}), 146,0 (C^{IV}), 142,3 (C^{IV}), 133,7 (C^{IV}), 132,3 (2CH), 131,1 (2 C^{IV}), 127,1 (CH), 125,2 (CH), 125,1 (CH), 123,7 (CH), 121,5 (CH), 116,5 (C^{IV}), 97,4 (CH), 82,7 (C^{IV}), 81,8 (C^{IV}), 69,3 (CH), 68,9 (CH), 68,2 (5CH), 66,5 (CH), 53,2 (CH_2), 52,4 (CH_2), 41,8 (CH_2), 39,8 (CH_2), 32,1 (CH_2), 28,6 (CH_2), 27,5 (CH_2), 26,2 (CH), 25,9 (CH_2), 23,9 (CH_2), 19,3 (CH_3), 18,8 (CH_3), 11,7 (CH_3).

MS m/z 732 MH^+ ^{37}Cl , 731 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 730 MH^+ ^{35}Cl , 729 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$, 389 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 22,9 min, CN-RP 17,5 min.

***N*-(2-[[*(*7-chloro-4-quinolyl)amino]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-méthyl-2-{4-[(3-méthyl-1,4-naphtoquinolyl)méthyl]phényl}acétamide (37)**



$M = 721,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide marron

F = $103 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Rendement = 50%

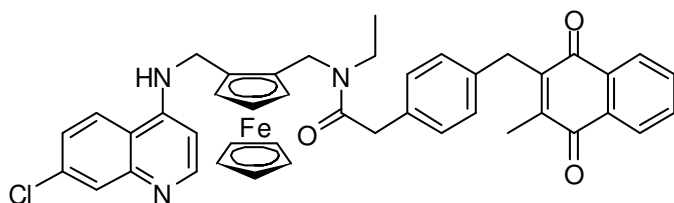
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8,47 (d, 1H, $J = 5,3 \text{ Hz}$), 8,07 (m, 2H), 7,84 (d, 1H, $J = 1,8 \text{ Hz}$), 7,68 (m, 2H), 7,66 (d, 1H, $J = 6,1 \text{ Hz}$), 7,15 (d, 2H, $J = 8,0 \text{ Hz}$), 7,05 (d, 2H, $J = 8,0 \text{ Hz}$), 7,04 (m, 1H), 6,91 (m, 1H), 6,51 (d, 1H, $J = 5,3 \text{ Hz}$), 5,33 (d, 1H, $J = 14,2 \text{ Hz}$), 4,47 (dd, 1H, $J = 4,9 ; 14,6 \text{ Hz}$), 4,36 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,25 (m, 1H), 4,15 (s, 5H), 4,14 (m, 1H), 4,00 (s, 2H), 3,63 (dd, 2H, $J = 4,8 ; 15,6 \text{ Hz}$), 3,53 (d, 1H, $J = 15,3 \text{ Hz}$), 2,98 (s, 3H), 2,24 (s, 3H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 184,3 (C^{IV}), 183,6 (C^{IV}), 170,3 (C^{IV}), 150,4 (CH), 148,7 (C^{IV}), 148,0 (C^{IV}), 144,1 (C^{IV}), 143,4 (C^{IV}), 135,8 (C^{IV}), 133,6 (C^{IV}), 132,5 (2CH), 131,5 (C^{IV}), 131,1 (2 C^{IV}), 128,2 (2CH), 127,9 (2CH), 126,8 (CH), 125,4 (CH), 125,2 (CH), 123,8 (CH), 121,4 (CH), 116,3 (C^{IV}), 97,2 (CH), 82,9 (C^{IV}), 81,0 (C^{IV}), 69,5 (CH), 68,8 (CH), 68,2 (5CH), 66,7 (CH), 44,9 (CH_2), 39,5 (CH_2), 39,4 (CH_2), 35,0 (CH_3), 31,1 (CH_2), 12,3 (CH_3).

MS m/z 724 MH^+ ^{37}Cl , 723 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 722 MH^+ ^{35}Cl , 721 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$, 389 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 19,8 min, CN-RP 16,9 min.

***N*-(2-[[*(7-chloro-4-quinolyl)amino*]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-éthyl-2-{4-[(3-méthyl-1,4-naphtoquinolyl)méthyl]phényl}acétamide (38)**



$M = 735,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide marron

$F = 86 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Rendement = 67%

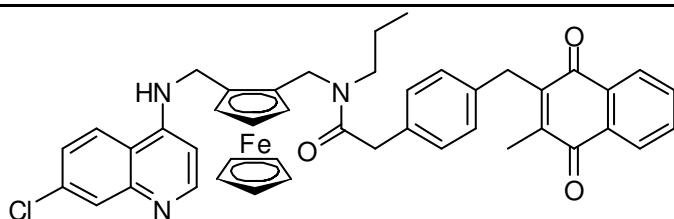
^1H NMR (CDCl_3) δ 8,38 (d, 1H, $J = 5,4 \text{ Hz}$), 7,99 (m, 2H), 7,75 (d, 1H, $J = 2,1 \text{ Hz}$), 7,59 (m, 2H), 7,00 (dd, 1H, $J = 8,0 ; 19,9 \text{ Hz}$), 6,78 (m, 1H), 6,41 (d, 1H, $J = 5,6 \text{ Hz}$), 5,08 (d, 1H, $J = 14,2 \text{ Hz}$), 4,38 (dd, 1H, $J = 4,3 ; 14,1 \text{ Hz}$), 4,27 (m, 1H), 4,16 (m, 2H), 4,07 m (s, 5H), 4,05 (m, 2H), 3,90 (s, 2H), 3,66 (d, 1H, $J = 14,2 \text{ Hz}$), 3,50 (m, 2H), 3,27 (m, 2H), 2,13 (s, 3H), 1,17 (m, 2H), 1,01 (t, 3H, $J = 7,3 \text{ Hz}$).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 184,2 (C^{IV}), 183,5 (C^{IV}), 169,9 (C^{IV}), 149,7 (CH), 149,1 (C^{IV}), 147,1 (C^{IV}), 144,0 (C^{IV}), 143,3 (C^{IV}), 135,7 (C^{IV}), 133,8 (C^{IV}), 132,4 (2CH), 131,9 (C^{IV}), 130,9 (C^{IV}), 130,8 (C^{IV}), 128,2 (2CH), 127,8 (2CH), 126,1 (CH), 125,3 (CH), 125,2 (CH), 123,9 (CH), 121,6 (CH), 116,2 (C^{IV}), 97,2 (CH), 82,5 (C^{IV}), 81,6 (C^{IV}), 69,3 (CH), 68,9 (CH), 68,3 (5CH), 66,6 (CH), 41,8 (CH_2), 41,5 (CH_2), 39,6 (CH_2), 38,8 (CH_2), 31,0 (CH_2), 12,7 (CH_3), 12,3 (CH_3).

MS m/z 738 MH^+ ^{37}Cl , 737 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 736 MH^+ ^{35}Cl , 735 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$, 389 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 20,2 min, CN-RP 17,0 min.

***N*-(2-[[*(7-chloro-4-quinolyl)amino*]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-propyl-2-{4-[(3-méthyl-1,4-naphtoquinolyl)méthyl]phényl}acétamide (39)**



$M = 749,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide marron

F = se décompose avant fusion

Rendement = 64%

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8,47 (d, 1H, $J = 4,8 \text{ Hz}$), 8,06 (m, 2H), 7,85 (s, 1H), 7,67 (m, 2H), 7,64 (m, 1H), 7,11 (d, 2H, $J = 7,2 \text{ Hz}$), 7,06 (m, 1H), 7,02 (d, 2H, $J = 7,1 \text{ Hz}$), 6,90 (m, 1H), 6,50 (d, 1H, $J = 5,3 \text{ Hz}$), 5,15 (d, 1H, $J = 14,4 \text{ Hz}$), 4,45 (dd, 1H, $J = 3,8 ; 14,3 \text{ Hz}$), 4,34 (m, 1H), 4,28 (m, 1H), 4,23 (m, 1H), 4,16 (s, 5H), 4,14 (m, 1H), 3,97 (s, 2H), 3,76 (d, 1H, $J = 14,4 \text{ Hz}$), 3,58 (q, 2H, $J = 14,7 \text{ Hz}$), 3,22 (m, 2H), 2,22 (s, 3H), 1,52 (m, 2H), 0,85 (t, 3H, $J = 6,9 \text{ Hz}$).

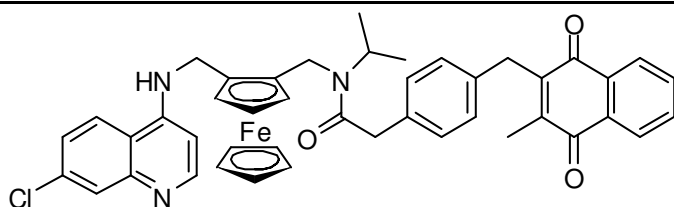
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 185,5 (C^{IV}), 184,7 (C^{IV}), 171,2 (C^{IV}), 151,3 (CH), 150,0 (C^{IV}), 148,8 (C^{IV}), 145,3 (C^{IV}), 144,5 (C^{IV}), 136,9 (C^{IV}), 134,9 (C^{IV}), 133,6 (2CH), 133,1 (C^{IV}), 132,2 (C^{IV}), 132,1 (C^{IV}), 129,2 (CH), 129,0 (CH), 127,8 (2CH), 126,5 (CH), 126,4 (CH), 125,0 (CH), 122,5 (CH), 119,1 (CH), 117,4 (C^{IV}), 98,4 (CH), 83,8 (C^{IV}), 82,8 (C^{IV}), 70,5 (CH), 70,0 (CH), 69,4 (5CH), 67,8 (CH), 49,7 (CH_2), 43,2 (CH_2), 40,8 (CH_2), 40,2 (CH_2), 32,2 (CH_2), 21,9 (CH_2), 13,4 (CH_3), 11,3 (CH_3).

MS m/z 752 MH^+ ^{37}Cl , 751 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 750 MH^+ ^{35}Cl , 749 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$, 389 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$.

HR-MS m/z 748,2153, 750,2172, 752,2172, 753,2191, 754,2202, 756,2303.

HPLC t_R C18 Nucleosil 21,2 min, CN-RP 17,1 min.

***N*-(2-[[*(7-chloro-4-quinolyl)amino*]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-isopropyl-2-{4-[(3-méthyl-1,4-naphtoquinolyl)méthyl]phényl}acétamide (40)**



$M = 749,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide marron

F = $105 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Rendement = 55%

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8,47 (d, 1H, $J = 5,2 \text{ Hz}$), 8,05 (m, 2H), 7,83 (m, 1H), 7,67 (m, 2H), 7,64 (m, 1H), 7,11 (d, 2H, $J = 7,9 \text{ Hz}$), 7,07 (m, 1H), 7,02 (d, 2H, $J = 6,8 \text{ Hz}$), 6,84 (m, 1H), 6,49 (d, 1H, $J = 5,2 \text{ Hz}$), 5,15 (d, 1H, $J = 14,6 \text{ Hz}$), 4,43 (dd, 1H, $J = 3,8 ; 14,4 \text{ Hz}$), 4,34 (m, 1H), 4,27 (m, 1H), 4,22 (m, 1H), 4,15 (s, 5H), 4,13 (m, 1H), 3,96 (s, 2H), 3,75 (d, 1H, $J = 14,6$

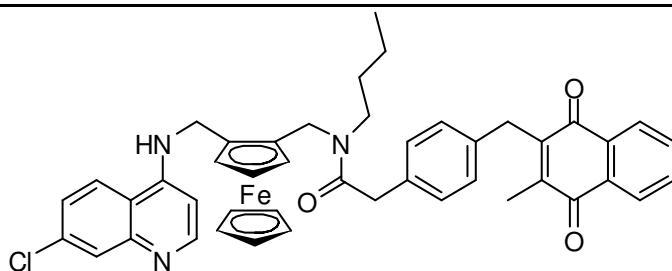
Hz), 3,58 (q, 2H, J = 13,8 Hz), 3,23 (m, 1H), 2,21 (s, 3H), 1,25 (t, 3H, J = 6,8 Hz), 0,86 (t, 3H, J = 6,8 Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 185,3 (C^{IV}), 184,5 (C^{IV}), 171,0 (C^{IV}), 151,7 (CH), 149,7 (C^{IV}), 149,2 (C^{IV}), 145,1 (C^{IV}), 144,3 (C^{IV}), 136,7 (C^{IV}), 134,5 (C^{IV}), 133,5 (2CH), 133,0 (C^{IV}), 132,1 (C^{IV}), 132,0 (C^{IV}), 129,1 (2CH), 128,9 (2CH), 128,0 (CH), 126,4 (CH), 126,2 (CH), 124,7 (CH), 122,4 (CH), 117,4 (C^{IV}), 98,4 (CH), 83,8 (C^{IV}), 82,7 (C^{IV}), 70,4 (CH), 70,0 (CH), 69,3 (5CH), 67,6 (CH), 47,7 (CH), 43,1 (CH_2), 40,7 (CH_2), 40,1 (CH_2), 32,0 (CH_2), 21,1 (CH_3), 20,0 (CH_3), 14,2 (CH_3).

MS m/z 752 MH^+ ^{37}Cl , 751 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 750 MH^+ ^{35}Cl , 749 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$, 389 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 21,4 min, CN-RP 17,2 min.

***N*-(2-[[*(7-chloro-4-quinolyl)amino*]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-butyl-2-[4-[(3-méthyl-1,4-naphtoquinolyl)méthyl]phényl]acétamide (41)**



$M = 763,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide marron

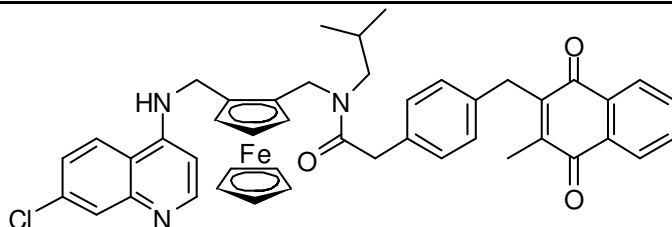
$F = 94 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Rendement = 52%

^1H NMR (CDCl_3) δ 8,48 (d, 1H, J = 5,7 Hz), 8,06 (m, 2H), 7,84 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,68 (m, 2H), 7,64 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,11 (d, 2H, J = 8,2 Hz), 7,06 (dd, 1H, J = 2,2 ; 8,5 Hz), 7,03 (d, 2H, J = 8,2 Hz), 6,84 (m, 1H), 6,50 (d, 1H, J = 5,7 Hz), 5,16 (d, 1H, J = 14,2 Hz), 4,45 (dd, 1H, J = 4,7 ; 14,2 Hz), 4,35 (s, 1H), 4,27 (m, 1H), 4,23 (s, 1H), 4,16 (s, 5H), 4,15 (s, 1H), 3,97 (s, 2H), 3,76 (d, 1H, J = 14,2 Hz), 3,58 (dd, 2H, J = 15,4 ; 25,3 Hz), 3,23 (m, 2H), 2,22 (s, 3H), 1,56 (m, 2H), 1,35 (m, 2H), 0,87 (t, 3H, J = 7,0 Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 184,3 (C^{IV}), 183,5 (C^{IV}), 170,0 (C^{IV}), 150,4 (CH), 148,8 (C^{IV}), 147,9 (C^{IV}), 144,1 (C^{IV}), 143,3 (C^{IV}), 135,7 (C^{IV}), 133,6 (C^{IV}), 132,5 (2CH), 131,9 (C^{IV}), 131,0 (2 C^{IV}), 128,1 (2CH), 127,8 (2CH), 126,7 (CH), 125,3 (CH), 125,2 (CH), 123,7 (CH), 121,4 (CH), 116,3 (C^{IV}), 97,3 (CH), 82,7 (C^{IV}), 81,6 (C^{IV}), 69,4 (CH), 68,9 (CH), 68,3 (5CH), 66,6 (CH), 46,7 (CH_2), 42,1 (CH_2), 39,6 (CH_2), 39,0 (CH_2), 31,0 (CH_2), 29,5 (CH_2), 19,0 (CH_2), 12,8 (CH_3), 12,3 (CH_3).

MS m/z 766 MH^+ ^{37}Cl , 765 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 764 MH^+ ^{35}Cl , 763 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$, 389 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 22,1 min, CN-RP 17,6 min.***N*-(2-[[*(7-chloro-4-quinolyl)amino*]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-isobutyl-2-{4-[(3-méthyl-1,4-naphtoquinolyl)méthyl]phényl}acétamide (42)** $M = 763,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide marron

 $F = 80 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$

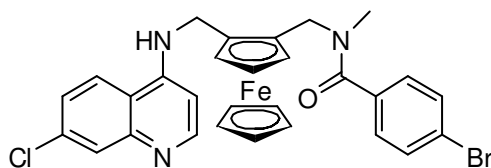
Rendement = 36%

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8,40 (d, 1H, $J = 5,3 \text{ Hz}$), 7,98 (m, 2H), 7,80 (d, 1H, $J = 2,0 \text{ Hz}$), 7,60 (m, 2H), 7,53 (d, 1H, $J = 8,6 \text{ Hz}$), 6,95 (dd, 1H, $J = 8,1 ; 32,3 \text{ Hz}$), 6,44 (d, 1H, $J = 5,3 \text{ Hz}$), 5,07 (d, 1H, $J = 14,2 \text{ Hz}$), 4,35 (dd, 1H, $J = 3,9 ; 14,2 \text{ Hz}$), 4,26 (m, 1H), 4,16 (m, 2H), 4,09 (s, 5H), 4,05 (d, 2H, $J = 7,1 \text{ Hz}$), 3,88 (s, 2H), 3,75 (d, 1H, $J = 14,2 \text{ Hz}$), 3,53 (d, 2H, $J = 16,0 \text{ Hz}$), 3,05 (m, 2H), 2,14 (s, 3H), 1,19 (t, 2H, $J = 7,1 \text{ Hz}$), 0,88 (t, 3H, $J = 6,6 \text{ Hz}$), 0,79 (t, 3H, $J = 6,6 \text{ Hz}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 185,5 (C^{IV}), 184,7 (C^{IV}), 171,6 (C^{IV}), 151,3 (CH), 150,1 (C^{IV}), 148,7 (C^{IV}), 145,3 (C^{IV}), 144,5 (C^{IV}), 136,8 (C^{IV}), 134,9 (C^{IV}), 133,6 (CH), 133,2 (CH), 132,2 (C^{IV}), 132,1 (2C^{IV}), 129,2 (2CH), 129,0 (2CH), 127,7 (CH), 126,5 (CH), 126,4 (CH), 125,0 (CH), 122,6 (CH), 117,4 (C^{IV}), 98,4 (CH), 83,7 (C^{IV}), 82,7 (C^{IV}), 70,3 (CH), 70,0 (CH), 69,5 (5CH), 67,8 (CH), 54,9 (CH_2), 43,3 (CH_2), 40,9 (CH_2), 32,2 (CH_2), 27,5 (CH), 20,5 (CH_3), 19,9 (CH_3), 13,5 (CH_3).

MS m/z 766 MH^+ ^{37}Cl , 765 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 764 MH^+ ^{35}Cl , 763 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$, 389 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$.

HR-MS m/z 762,2386, 763,2422, 764,2337, 765,2370, 766,2293, 767,2336, 768,2355.

HPLC t_R C18 Nucleosil 21,9 min, CN-RP 17,5 min.**4-bromo-*N*-(2-[[*(7-chloro-4-quinolyl)amino*]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-méthylbenzamide (43)** $M = 602,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide marron

 $F = 194 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Rendement = 58%

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8,41 (d, 1H, $J = 5,3 \text{ Hz}$), 7,77 (d, 1H, $J = 1,7 \text{ Hz}$), 7,54 (d, 1H, $J = 9,0 \text{ Hz}$), 7,35 (d, 2H, $J = 8,5 \text{ Hz}$), 7,00 (d, 2H, $J = 8,3 \text{ Hz}$), 6,87 (dd, 1H, $J = 1,7 ; 8,9 \text{ Hz}$), 6,68

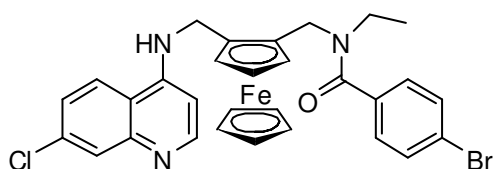
(m, 1H), 6,47 (d, 1H, J = 5,4 Hz), 5,49 (d, 1H, J = 14,2 Hz), 4,50 (dd, 1H, J = 5,3 ; 15,7 Hz), 4,35 (m, 1H), 4,27 (d, 1H, J = 6,5 Hz), 4,22 (m, 1H), 4,13 (s, 5H), 4,11 (m, 1H), 3,67 (d, 1H, J = 14,2 Hz), 2,84 (s, 3H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 170,4 (C^{IV}), 151,8 (CH), 149,6 (C^{IV}), 149,3 (C^{IV}), 134,7 (C^{IV}), 134,5 (C^{IV}), 131,6 (2CH), 128,6 (2CH), 128,2 (CH), 124,6 (CH), 124,3 (C^{IV}), 122,3 (CH), 117,3 (C^{IV}), 98,5 (CH), 84,3 (C^{IV}), 81,5 (C^{IV}), 71,0 (CH), 70,5 (CH), 69,3 (5CH), 67,7 (CH), 45,6 (CH_2), 40,6 (CH_2), 37,5 (CH_3).

MS m/z 605 MH^+ ^{37}Cl , 604 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 603 MH^+ ^{35}Cl , 602 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 $(\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2)^+$, 389 $(\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2)^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 18,4 min, CN-RP 16,3 min.

4-bromo-N-(2-[[[(7-chloro-4-quinolyl)amino]méthyl]ferrocénylméthyl]-N-éthylbenzamide (44)



$M = 616,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide jaune

$F = 184 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

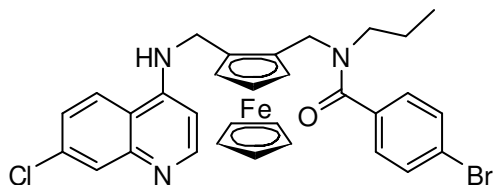
Rendement = 42%

^1H NMR (CDCl_3) δ 8,43 (d, 1H, J = 5,3 Hz), 7,80 (d, 1H, J = 1,4 Hz), 7,61 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,37 (td, 2H, J = 2,1 ; 8,4 Hz), 6,99 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 6,68 (m, 1H), 6,48 (d, 1H, J = 5,4 Hz), 5,26 (d, 1H, J = 14,0 Hz), 4,48 (dd, 1H, J = 4,1 ; 14,3 Hz), 4,33 (m, 1H), 4,26 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 4,21 (m, 1H), 4,13 (s, 5H), 4,12 (m, 1H), 3,85 (d, 1H, J = 14,0 Hz), 3,16 (d, 2H, J = 6,3 Hz), 1,03 (t, 3H, J = 7,1 Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 170,9 (C^{IV}), 151,9 (CH), 149,6 (C^{IV}), 149,4 (C^{IV}), 135,1 (C^{IV}), 134,7 (C^{IV}), 131,7 (2CH), 128,4 (2CH), 127,9 (CH), 124,7 (CH), 123,9 (C^{IV}), 122,3 (CH), 117,3 (C^{IV}), 98,5 (CH), 84,3 (C^{IV}), 82,2 (C^{IV}), 70,7 (CH), 70,3 (CH), 69,4 (5CH), 67,7 (CH), 43,0 (CH_2), 41,5 (CH_2), 40,8 (CH_2), 13,6 (CH_3).

MS m/z 619 MH^+ ^{37}Cl , 618 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 617 MH^+ ^{35}Cl , 616 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 $(\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2)^+$, 389 $(\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2)^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 18,9 min, CN-RP 16,5 min.

4-bromo-N-(2-[[7-chloro-4-quinolyl]amino]méthyl}ferrocénylméthyl)-N-propylbenzamide (45)
M = 630,5 g.mol⁻¹

Solide jaune

F = 150 ± 1 °C

Rendement = 42%

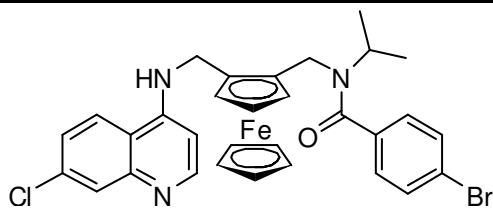
¹H NMR (CDCl₃) δ 8,43 (d, 1H, J = 5,3 Hz), 7,80 (m, 1H), 7,56 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 7,37 (d, 2H, J = 8,3 Hz), 6,96 (d, 2H, J = 8,3 Hz), 6,91 (m, 1H), 6,64 (m, 1H), 6,47 (d, 1H, J = 5,2 Hz), 5,29 (d, 1H, J = 15,2 Hz), 4,47 (dd, 1H, J = 4,3 ; 14,5 Hz), 4,32 (m, 1H), 4,25 (d, 1H, J = 7,3 Hz), 4,20 (m, 1H), 4,13 (s, 5H), 4,11 (m, 1H), 3,83 (d, 1H, J = 15,2 Hz), 3,06 (t, 2H, J = 7,3 Hz), 1,48 (m, 2H), 0,67 (t, 3H, J = 7,3 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171,1 (C^{IV}), 151,8 (CH), 149,6 (C^{IV}), 149,3 (C^{IV}), 135,1 (C^{IV}), 134,8 (C^{IV}), 131,6 (2CH), 128,3 (2CH), 128,2 (CH), 124,7 (CH), 123,9 (C^{IV}), 122,3 (CH), 117,3 (C^{IV}), 98,5 (CH), 84,0 (C^{IV}), 82,2 (C^{IV}), 70,7 (CH), 70,3 (CH), 69,4 (5CH), 67,7 (CH), 49,9 (CH₂), 41,7 (CH₂), 40,8 (CH₂), 21,3 (CH₂), 11,0 (CH₃).

MS *m/z* 633 MH⁺ ³⁷Cl, 632 M⁺ ³⁷Cl, 631 MH⁺ ³⁵Cl, 630 M⁺ ³⁵Cl, 391 (C₉H₅N³⁷ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺, 389 (C₉H₅N³⁵ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺.

HR-MS *m/z* 630,0610, 631,0625, 632,0583, 633,0625, 634,0579, 635,0588, 636,0613.

HPLC *t_R* C18 Nucleosil 19,3 min, CN-RP 16,6 min.

4-bromo-N-(2-[[7-chloro-4-quinolyl]amino]méthyl}ferrocénylméthyl)-N-isopropylbenzamide (46)
M = 630,5 g.mol⁻¹

Solide jaune

F = 81 ± 1 °C

Rendement = 27 %

¹H NMR (CDCl₃) δ 8,53 (d, 1H, J = 5,4 Hz), 7,93 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,88 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,53 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,19 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 7,12 (dd, 1H, J = 2,0 ; 9,2 Hz), 6,53 (d, 1H, J = 5,5 Hz), 4,62 (d, 1H, J = 14,2 Hz), 4,45 (d, 1H, J = 13,9 Hz), 4,34 (m, 1H), 4,28 (m, 2H), 4,20 (s, 5H), 4,16 (t, 1H, J = 2,5 Hz), 4,12 (d, 1H, J = 14,2 Hz), 4,03 (m, 1H), 1,36 (d, 1H, J = 6,7 Hz), 1,14 (d, 1H, J = 6,6 Hz).

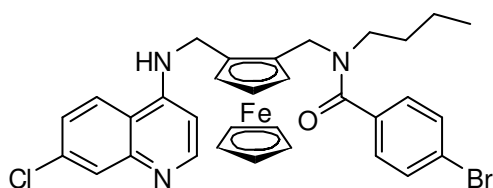
¹³C NMR (CDCl₃) δ 170,6 (C^{IV}), 151,9 (CH), 150,0 (C^{IV}), 149,3 (C^{IV}), 135,4 (C^{IV}), 134,7 (C^{IV}), 131,8 (2CH), 128,1 (3CH), 124,7 (CH), 124,1 (C^{IV}), 122,9 (CH), 117,6 (C^{IV}), 98,5

(CH), 84,3 (C^{IV}), 82,9 (C^{IV}), 69,8 (CH), 69,5 (CH), 69,4 (5CH), 67,6 (CH), 53,5 (CH₂), 50,8 (CH₂), 41,5 (CH), 22,0 (CH₃), 21,3 (CH₃).

MS m/z 633 MH⁺ ³⁷Cl, 632 M⁺ ³⁷Cl, 631 MH⁺ ³⁵Cl, 630 M⁺ ³⁵Cl, 391 (C₉H₅N³⁷ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺, 389 (C₉H₅N³⁵ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺.

HPLC t_R C18 Nucleosil 20,1 min, CN-RP 16,7 min.

4-bromo-N-(2-[[7-chloro-4-quinolyl]amino]méthyl}ferrocénylméthyl)-N-butylbenzamide (47)



M = 644,5 g.mol⁻¹

Solide jaune

F = 170 ± 1 °C

Rendement = 64 %

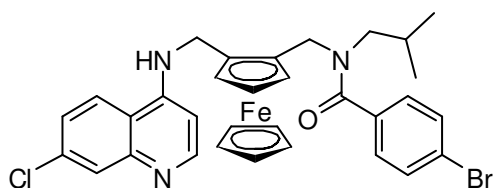
¹H NMR (CDCl₃) δ 8,50 (d, 1H, J = 5,3 Hz), 7,87 (m, 1H), 7,63 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,42 (d, 2H, J = 6,7 Hz), 7,03 (d, 2H, J = 8,2 Hz), 6,98 (m, 1H), 6,70 (m, 1H), 6,55 (d, 1H, J = 5,2 Hz), 5,36 (d, 1H, J = 14,0 Hz), 4,55 (dd, 1H, J = 4,6 ; 14,5 Hz), 4,40 (m, 1H), 4,33 (d, 1H, J = 7,7 Hz), 4,27 (m, 1H), 4,21 (s, 5H), 4,18 (m, 1H), 3,90 (d, 1H, J = 14,0 Hz), 3,17 (m, 2H), 2,33 (m, 1H), 1,50 (m, 2H), 1,13 (m, 2H), 0,80 (t, 3H, J = 7,3 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 170,9 (C^{IV}), 151,8 (CH), 149,5 (C^{IV}), 149,3 (C^{IV}), 135,1 (C^{IV}), 134,8 (C^{IV}), 131,6 (2CH), 128,3 (2CH), 128,1 (CH), 124,7 (CH), 123,8 (C^{IV}), 122,3 (CH), 117,2 (C^{IV}), 98,5 (CH), 84,0 (C^{IV}), 82,2 (C^{IV}), 70,7 (CH), 70,4 (CH), 69,4 (5CH), 67,7 (CH), 48,0 (CH₂), 41,8 (CH₂), 40,8 (CH₂), 30,2 (CH₂), 19,7 (CH₂), 13,6 (CH₃).

MS m/z 647 MH⁺ ³⁷Cl, 646 M⁺ ³⁷Cl, 645 MH⁺ ³⁵Cl, 644 M⁺ ³⁵Cl, 391 (C₉H₅N³⁷ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺, 389 (C₉H₅N³⁵ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺.

HPLC t_R C18 Nucleosil 19,7 min, CN-RP 16,8 min.

4-bromo-N-(2-[[7-chloro-4-quinolyl]amino]méthyl}ferrocénylméthyl)-N-isobutylbenzamide (48)



M = 644,5 g.mol⁻¹

Solide jaune

F = 142 ± 1 °C

Rendement = 31 %

¹H NMR (CDCl₃) δ 8,40 (d, 1H, J = 4,0 Hz), 7,77 (m, 1H), 7,43 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,29 (d, 2H, J = 7,1 Hz), 6,90 (d, 2H, J = 7,2 Hz), 6,80 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 6,52 (m, 1H), 6,45 (d, 1H,

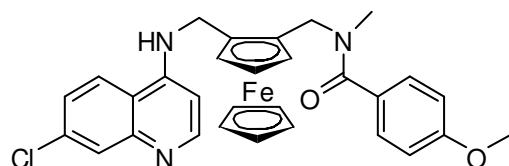
$J = 4,1$ Hz), 5,35 (d, 1H, $J = 14,4$ Hz), 4,45 (dd, 1H, $J = 3,0 ; 14,3$ Hz), 4,32 (m, 1H), 4,23 (d, 1H, $J = 6,7$ Hz), 4,17 (m, 1H), 4,12 (s, 6H), 3,80 (d, 1H, $J = 14,3$ Hz), 2,96 (m, 2H), 1,88 (m, 1H), 0,71 (d, 3H, $J = 5,8$ Hz), 0,64 (t, 3H, $J = 5,6$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171,6 (C^{IV}), 151,8 (CH), 149,5 (C^{IV}), 149,2 (C^{IV}), 135,1 (C^{IV}), 134,7 (C^{IV}), 131,5 (2CH), 128,6 (2CH), 128,2 (CH), 124,6 (CH), 123,7 (C^{IV}), 122,2 (CH), 117,1 (C^{IV}), 98,5 (CH), 83,9 (C^{IV}), 82,1 (C^{IV}), 70,8 (CH), 70,3 (CH), 69,4 (5CH), 67,7 (CH), 55,2 (CH_2), 41,3 (CH_2), 40,79 (CH_2), 26,4 (CH), 20,1 (CH_3), 19,4 (CH_3).

MS m/z 647 MH^+ ^{37}Cl , 646 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 645 MH^+ ^{35}Cl , 644 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 $(\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2)^+$, 389 $(\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2)^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 19,5 min, CN-RP 16,7 min.

4-méthoxy-*N*-(2-[(7-chloro-4-quinolyl)amino]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-méthylbenzamide (49)



$M = 553,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide jaune

$F = 212 \pm 1^\circ\text{C}$

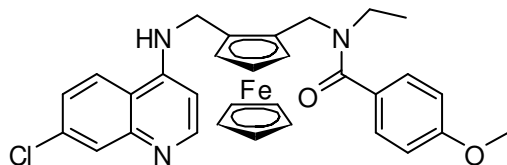
Rendement = 33 %

^1H NMR (CDCl_3) δ 8,40 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz), 7,75 (m, 1H), 7,54 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 7,12 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 6,82 (m, 1H), 6,70 (td, 2H, $J = 2,3 ; 8,7$ Hz), 6,46 (d, 1H, $J = 6,5$ Hz), 5,53 (d, 1H, $J = 15,2$ Hz), 4,51 (d, 1H, $J = 13,0$ Hz), 4,32 (m, 1H), 4,21 (m, 2H), 4,12 (s, 5H), 4,09 (m, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,63 (d, 1H, $J = 15,2$ Hz), 2,89 (s, 3H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171,3 (C^{IV}), 160,8 (C^{IV}), 151,5 (CH), 149,6 (C^{IV}), 149,0 (C^{IV}), 134,5 (C^{IV}), 129,1 (2CH), 127,8 (CH), 127,6 (CH), 124,3 (C^{IV}), 122,5 (CH), 117,2 (C^{IV}), 113,4 (2CH), 98,3 (CH), 83,9 (C^{IV}), 81,7 (C^{IV}), 71,0 (CH), 70,5 (CH), 69,2 (5CH), 67,6 (CH), 55,3 (CH_3), 45,6 (CH_2), 40,4 (CH_2), 37,8 (CH_3).

MS m/z 556 MH^+ ^{37}Cl , 555 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 554 MH^+ ^{35}Cl , 553 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 $(\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2)^+$, 389 $(\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2)^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 17,9 min, CN-RP 16,1 min.

4-méthoxy-*N*-(2-[[7-chloro-4-quinolyl]amino]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-éthylbenzamide (50)
M = 567,5 g.mol⁻¹

Solide jaune

F = 158 ± 1 °C

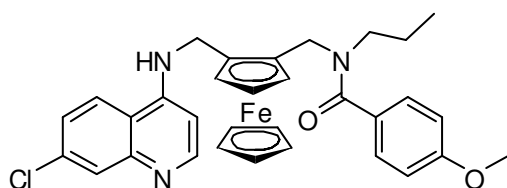
Rendement = 34 %

¹H NMR (CDCl₃) δ 8,42 (d, 1H, J = 4,5 Hz), 7,79 (m, 1H), 7,62 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,53 (d, 2H, J = 7,5 Hz), 6,92 (d, 2H, J = 9,3 Hz), 6,85 (m, 1H), 6,72 (d, 2H, J = 6,9 Hz), 6,47 (d, 1H, J = 4,6 Hz), 5,29 (d, 1H, J = 15,5 Hz), 4,49 (m, 1H), 4,31 (m, 1H), 4,21 (m, 2H), 4,12 (s, 5H), 4,10 (m, 1H), 3,83 (d, 1H, J = 15,5 Hz), 3,73 (s, 3H), 3,25 (m, 2H), 1,06 (t, 3H, J = 6,5 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 172,0 (C^{IV}), 160,7 (C^{IV}), 151,7 (CH), 149,7 (C^{IV}), 149,2 (C^{IV}), 134,6 (C^{IV}), 128,3 (2CH), 128,2 (CH), 128,0 (CH), 124,7 (C^{IV}), 122,6 (CH), 117,3 (C^{IV}), 113,7 (2CH), 98,4 (CH), 84,0 (C^{IV}), 82,5 (C^{IV}), 70,7 (CH), 70,4 (CH), 69,3 (5CH), 67,6 (CH), 55,4 (CH₃), 45,9 (CH₂), 41,6 (CH₂), 40,8 (CH₂), 13,7 (CH₃).

MS *m/z* 570 MH⁺ ³⁷Cl, 569 M^{•+} ³⁷Cl, 568 MH⁺ ³⁵Cl, 567 M^{•+} ³⁵Cl, 391 (C₉H₅N³⁷ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺, 389 (C₉H₅N³⁵ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺.

HPLC t_R C18 Nucleosil 18,3 min, CN-RP 16,1 min.

4-méthoxy-*N*-(2-[[7-chloro-4-quinolyl]amino]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-propylbenzamide (51)
M = 581,5 g.mol⁻¹

Solide jaune

F = 150 ± 1 °C

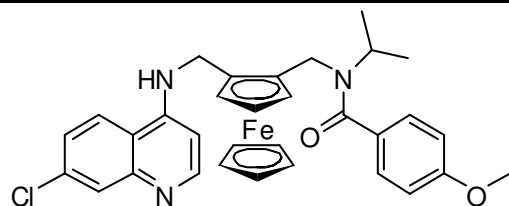
Rendement = 35 %

¹H NMR (CDCl₃) δ 8,41 (d, 1H, J = 5,0 Hz), 7,77 (m, 1H), 7,56 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 7,06 (d, 2H, J = 7,7 Hz), 6,86 (d, 1H, J = 6,7 Hz), 6,80 (m, 1H), 6,69 (d, 1H, J = 7,7 Hz), 6,45 (d, 1H, J = 4,8 Hz), 5,32 (d, 1H, J = 14,6 Hz), 4,48 (m, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 4,19 (m, 2H), 4,11 (s, 6H), 3,80 (m, 1H), 3,72 (s, 3H), 3,13 (m, 2H), 1,49 (m, 2H), 0,68 (t, 3H, J = 7,1 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171,2 (C^{IV}), 159,7 (C^{IV}), 150,7 (CH), 148,6 (C^{IV}), 148,2 (C^{IV}), 133,5 (C^{IV}), 127,4 (2CH), 127,3 (CH), 127,0 (CH), 123,5 (C^{IV}), 121,5 (CH), 116,3 (C^{IV}), 112,6 (2CH), 97,4 (CH), 82,9 (C^{IV}), 81,5 (C^{IV}), 69,7 (CH), 69,3 (CH), 68,3 (5CH), 66,5 (CH), 59,4 (CH₃), 54,3 (CH₂), 39,7 (CH₂), 20,3 (CH₂), 13,4 (CH₂), 10,0 (CH₃).

MS m/z 584 MH^+ ^{37}Cl , 583 $M^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 582 MH^+ ^{35}Cl , 581 $M^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 $(C_9H_5N^{37}ClNHCH_2C_{10}H_8FeCH_2)^+$, 389 $(C_9H_5N^{35}ClNHCH_2C_{10}H_8FeCH_2)^+$.
 HR-MS m/z 580,1603, 582,1595, 583,1621, 584,1572, 585,1583, 586,1592, 587,5518.
 HPLC t_R C18 Nucleosil 18,7 min, CN-RP 16,4 min.

4-méthoxy-*N*-(2-[[7-chloro-4-quinolyl]amino]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-isopropylbenzamide (52)



$M = 581,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide jaune

$F = 203 \pm 1 \text{ }^\circ C$

Rendement = 42 %

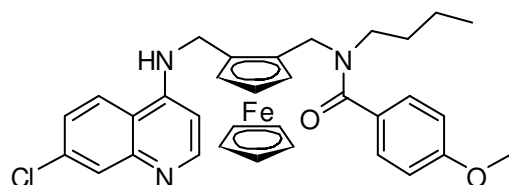
1H NMR ($CDCl_3$) δ 8,46 (s, 1H), 7,93 (d, 1H, $J = 9,2 \text{ Hz}$), 7,82 (s, 1H), 7,46 (m, 1H), 7,24 (m, 2H), 7,03 (d, 1H, $J = 8,2 \text{ Hz}$), 6,82 (m, 2H), 6,45 (s, 1H), 4,55 (dd, 1H, $J = 3,5 ; 14,6 \text{ Hz}$), 4,38 (d, 1H, $J = 12,8 \text{ Hz}$), 4,26 (m, 1H), 4,21 (m, 1H), 4,17 (m, 1H), 4,11 (s, 6H), 4,04 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 1,31 (d, 3H, $J = 7,5 \text{ Hz}$), 1,18 (m, 1H), 1,05 (d, 3H, $J = 7,5 \text{ Hz}$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 170,5 (C^{IV}), 159,9 (C^{IV}), 150,5 (CH), 149,3 (C^{IV}), 147,8 (C^{IV}), 133,7 (C^{IV}), 127,6 (2CH), 127,5 (CH), 126,6 (CH), 123,6 (C^{IV}), 122,3 (CH), 116,5 (C^{IV}), 112,8 (2CH), 97,3 (CH), 83,6 (C^{IV}), 81,8 (C^{IV}), 68,7 (CH), 68,5 (CH), 68,3 (5CH), 66,4 (CH), 54,3 (CH_3), 49,9 (CH_2), 40,5 (CH_2), 39,5 (CH), 21,0 (CH_3), 20,2 (CH_3).

MS m/z 584 MH^+ ^{37}Cl , 583 $M^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 582 MH^+ ^{35}Cl , 581 $M^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 $(C_9H_5N^{37}ClNHCH_2C_{10}H_8FeCH_2)^+$, 389 $(C_9H_5N^{35}ClNHCH_2C_{10}H_8FeCH_2)^+$.

HPLC t_R C18 Nucleosil 19,2 min, CN-RP 16,5 min.

4-méthoxy-*N*-(2-[[7-chloro-4-quinolyl]amino]méthyl]ferrocénylméthyl)-*N*-butylbenzamide (53)



$M = 595,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide jaune

$F = 108 \pm 1 \text{ }^\circ C$

Rendement = 77 %

1H NMR ($CDCl_3$) δ 8,42 (d, 1H, $J = 5,4 \text{ Hz}$), 7,78 (d, 1H, $J = 1,4 \text{ Hz}$), 7,56 (d, 1H, $J = 9,0 \text{ Hz}$), 7,06 (d, 2H, $J = 8,3 \text{ Hz}$), 6,86 (d, 1H, $J = 7,4 \text{ Hz}$), 6,79 (m, 1H), 6,70 (td, 2H, $J = 2,3 ; 8,7 \text{ Hz}$), 6,46 (d, 1H, $J = 5,5 \text{ Hz}$), 5,31 (d, 1H, $J = 14,2 \text{ Hz}$), 4,48 (m, 1H), 4,31 (m, 1H), 4,19 (m, 2H), 4,12 (s, 5H), 4,09 (m, 1H), 3,80 (d, 1H, $J = 14,2 \text{ Hz}$), 3,72 (s, 3H), 3,17 (m, 2H), 1,44

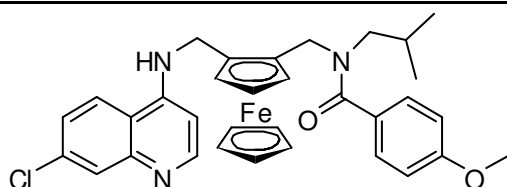
(m, 2H), 1,13 (m, 2H), 0,73 (t, 3H, J = 7,3 Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171,0 (C^{IV}), 159,5 (C^{IV}), 150,7 (CH), 148,6 (C^{IV}), 148,2 (C^{IV}), 133,5 (C^{IV}), 127,5 (2CH), 127,3 (CH), 127,0 (CH), 123,6 (C^{IV}), 121,5 (CH), 116,3 (C^{IV}), 112,5 (2CH), 97,4 (CH), 82,9 (C^{IV}), 81,6 (C^{IV}), 69,7 (CH), 69,3 (CH), 68,3 (5CH), 66,5 (CH), 54,3 (CH₃), 47,2 (CH₂), 40,9 (CH₂), 39,7 (CH), 29,1 (CH₃), 18,7 (CH₂), 12,6 (CH₃).

MS m/z 598 MH^+ ^{37}Cl , 597 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 596 MH^+ ^{35}Cl , 595 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$)⁺, 389 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$)⁺.

HPLC t_R C18 Nucleosil 19,1 min, CN-RP 16,4 min.

4-méthoxy-N-(2-[[7-chloro-4-quinolyl]amino]méthyl]ferrocényméthyl)-N-isobutylbenzamide (54)



$M = 595,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide jaune

$F = 191 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Rendement = 35 %

^1H NMR (CDCl_3) δ 8,41 (d, 1H, J = 4,9 Hz), 7,76 (m, 1H), 7,43 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 6,99 (d, 2H, J = 5,9 Hz), 6,73 (m, 1H), 6,64 (d, 2H, J = 8,3 Hz), 6,44 (d, 1H, J = 3,6 Hz), 5,41 (d, 1H, J = 14,3 Hz), 4,54 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 4,17 (m, 2H), 4,11 (s, 6H), 3,76 (d, 1H, J = 14,3 Hz), 3,71 (s, 3H), 3,05 (m, 2H), 1,90 (m, 1H), 0,72 (d, 3H, J = 6,5 Hz), 0,65 (t, 3H, J = 5,6 Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 172,5 (C^{IV}), 160,5 (C^{IV}), 151,4 (CH), 149,8 (C^{IV}), 148,8 (C^{IV}), 134,6 (C^{IV}), 128,9 (2CH), 128,3 (CH), 127,6 (CH), 124,5 (C^{IV}), 122,5 (CH), 117,1 (C^{IV}), 113,5 (2CH), 98,4 (CH), 83,8 (C^{IV}), 82,5 (C^{IV}), 70,8 (CH), 70,3 (CH), 69,3 (5CH), 67,5 (CH), 60,4 (CH₃), 55,3 (CH₂), 41,5 (CH₂), 40,8 (CH), 26,4 (CH₂), 20,1 (CH₃), 19,4 (CH₃).

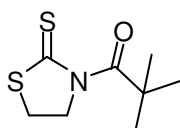
MS m/z 598 MH^+ ^{37}Cl , 597 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 596 MH^+ ^{35}Cl , 595 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$)⁺, 389 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$)⁺.

HPLC t_R C18 Nucleosil 18,9 min, CN-RP 16,4 min.

V. Molécules duales ferroquine-dépléteurs de GSH avec un lien aminde

2,2-diméthyl-1-(2-thioxothiazolidin-3-yl)propan-1-one (56)¹

Une suspension de NaH à 70% (377 mg, 11 mmol) dans le THF anhydre (10 mL) est ajoutée à une solution de 2-mercaptothiazoline (1 g, 8.4 mmol) dans le THF anhydre (5 mL) sous atmosphère d'azote à 0°C. Le mélange est maintenu sous agitation à 0°C pendant 10 minutes puis du chlorure de triméthylacétyle (1 mL, 8.5 mmol) est ajouté au milieu réactionnel. Le mélange est porté à reflux pendant 3h sous atmosphère d'azote. Le milieu réactionnel est ensuite dilué avec de l'eau distillée (25 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 × 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur Na₂SO₄. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. On obtient un liquide jaune qui devient un solide beige en séchant. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice en utilisant comme éluant un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole (1/1).



M = 203,0 g.mol⁻¹

Solide jaune

F = 100 ± 1 °C

Rendement = 93 %

¹H NMR (CDCl₃) δ 4,21 ppm (t, 2H, J = 7,4 Hz), 3,51 ppm (t, 2H, J = 7,4 Hz), 1,41 ppm (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 187,8 (C=O), 57,3 (CH₂), 44,5 (CH), 31,6 (CH₂), 27,8 (3CH₃).

MS m/z 204 MH⁺, 120 (M – COCH(CH₃)₃).

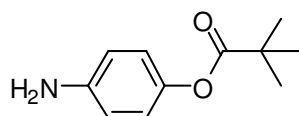
4-aminophénylpivalate (58)²

A une suspension contenant du NaH à 70% (900 mg, 26.2 mmol) dans le THF anhydre (5 mL) est ajoutée une solution de 4-aminophénol (2,4 g, 22 mmol) dans le THF anhydre (5 mL) à 0°C sous atmosphère d'azote. Le mélange est maintenu sous agitation à 0°C pendant 10 minutes sous atmosphère d'azote puis du 2,2-diméthyl-1-(2-thioxothiazolidin-3-yl)propan-1-

¹ Nicolaou, K.C.; Dai, W.M. Molecular design and chemical synthesis of potent enediynes. 2. Dynemicin model systems equipped with C-3 triggering devices and evidence for quinine methide formation in the mechanism of action of dynemicin A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8908-8921.

² Dai, W.-M.; Cheung, Y.K.; Tang, K.W.; Choi, P.Y.; Chung, S.L. Highly chemoselective acylation of substituted aminophenols with 3-(trimethylacetyl)-1,3-thiazolidone-2-thione. *Tetrahedron*. **1995**, *45*, 12263-12276.

one **59** (4.5 g, 22 mmol) est ajouté et le milieu réactionnel est porté à 25°C pendant 30 minutes sous atmosphère d'azote. Après 30 minutes, on ajoute 25 mL d'une solution saturée en NH₄Cl. Un précipité beige se forme et la solution devient violette. De l'eau distillée est ajoutée pour dissoudre le précipité. La solution est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 × 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées et sont lavées avec une solution saturée en NaCl (2 × 25 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et les solvants sont évaporés sous pression réduite. On obtient un solide jaune pâle. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice en utilisant comme éluant l'acétate d'éthyle.



$$M = 193,0 \text{ g.mol}^{-1}$$

Solide jaune

$$F = 53 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$\text{Rendement} = 82 \%$$

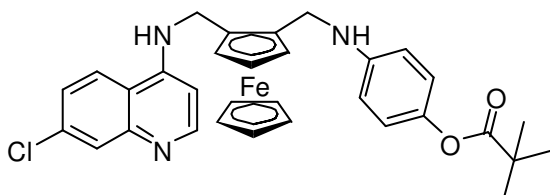
¹H NMR (CDCl₃) δ 6,83 ppm (d, 2H, J = 8,7 Hz), 6,65 ppm (d, 2H, J = 8,7 Hz), 3,59 ppm (m, 2H), 1,34 ppm (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 177,7 (^{IV}C), 144,0 (^{IV}C), 143,2 (^{IV}C), 122,0 (2CH), 115,6 (2CH), 39,0 (CH), 27,2 (3CH₃).

MS m/z 194 MH⁺, 110 (M – COCH(CH₃)₃).

Procédure générale de synthèse des molécules duales 61-63

Un mélange de l'amine correspondante (4-bromoaniline, 4-methoxyaniline ou 4-aminophénylpivalate, 10 mmol) et d'iodure de *N,N,N*-triméthyl{2-[4-*N'*-(7-chloroquinolyl)aminométhyl]}ferrocénylméthyl-ammonium préparé précédemment (1 mmol) est dissout dans de l'acétonitrile (25 mL). Du carbonate de potassium (10 mmol) est ajouté en excès et le mélange est porté à reflux pendant 3 à 7h. La solution refroidie à température ambiante est diluée avec de l'eau (25 mL). La phase aqueuse est ensuite extraite avec du dichlorométhane (3 × 50 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaCl (50 mL) et séchée sur Na₂SO₄. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. On obtient un solide orange. Celui-ci est purifié sur colonne chromatographique de silice en utilisant comme éluant un mélange acétate d'éthyle/triéthylamine (9/1).

7-chloro-4-{2-[N'-(4-pivalatephényl)aminométhyl]-N-ferrocénylméthylamino}quinoléine (61)


MW = 581,5 g/mol

Solide jaune

F = 169 ± 1 °C

Rendement = 19 %

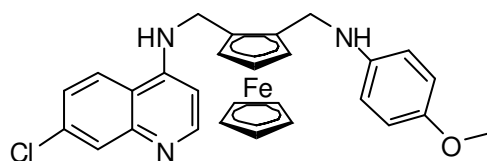
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8,42 (d, 1H, J = 2,8 Hz), 7,83 (s, 1H), 7,37 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 7,07 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 6,80 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 6,56 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 6,39 (dd, 1H, J = 1,7 ; 5,1 Hz), 5,75 (m, 1H), 4,25 (m, 3H), 4,14 (s, 6H), 4,09 (m, 2H), 3,87 (d, 1H, J = 12,4 Hz), 1,26 (s, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 177,9 (C^{IV}), 151,9 (C^{IV}), 149,6 (C^{IV}), 149,0 (C^{IV}), 145,6 (C^{IV}), 143,5 (C^{IV}), 135,2 (C^{IV}), 128,5 (CH), 126,5 (CH), 122,5 (2CH), 122,2 (CH), 121,6 (CH), 117,3 (C^{IV}), 111,1 (2CH), 99,2 (CH), 85,0 (C^{IV}), 83,4 (C^{IV}), 70,4 (CH), 70,2 (CH), 69,5 (5CH), 67,2 (CH), 43,3 (CH_2), 41,9 (CH_2), 39,2 (C^{IV}), 27,3 (3 CH_3).

MS m/z 585 MH^+ ^{37}Cl , 584 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{37}Cl , 583 MH^+ ^{35}Cl , 582 $\text{M}^{+\bullet}$ ^{35}Cl , 391 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$, 389 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{ClNHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$.

HR-MS m/z 580,1562, 582,1636, 583,1678, 584,1629, 585,1616, 586,1648.

HPLC t_R C18 Nucleosil 18,3 min, CN-RP 15,9 min.

7-chloro-4-{2-[N'-(4-méthoxyphényl)aminométhyl]-N-ferrocénylméthylamino}-quinoléine (62)
M = 511,5 g.mol $^{-1}$

Solide jaune

F = 128 ± 1 °C

Rendement = 23 %

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8,38 ppm (d, 1H, J = 5,4 Hz), 7,78 ppm (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,35 ppm (d, 1H, J = 9,0 Hz), 6,94 ppm (dd, 2H, J = 2,8 ; 8,9 Hz), 6,68 ppm (d, 2H, J = 8,9 Hz), 6,55 ppm (d, 2H, J = 8,9 Hz), 6,33 ppm (d, 1H, J = 5,4 Hz), 6,07 ppm (m, 1H), 4,25 ppm (dd, 1H, J = 3,2 ; 13,2 Hz), 4,20 ppm (m, 1H), 4,18 ppm (m, 1H), 4,17 ppm (m, 2H), 4,11 ppm (s, 6H), 3,76 ppm (d, 1H, J = 14,3 Hz), 3,71 ppm (s, 3H), 3,05 ppm (m, 2H), 1,90 ppm (m, 1H), 0,72 ppm (d, 3H, J = 6,5 Hz), 0,65 ppm (t, 3H, J = 5,6 Hz).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 153,1 (C^{IV}), 151,9 (CH), 149,5 (C^{IV}), 149,0 (C^{IV}), 141,8 (C^{IV}), 134,7

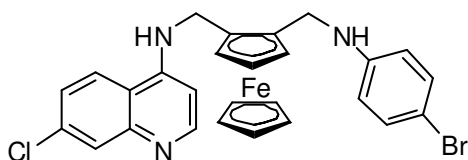
(C^{IV}), 128,3 (CH), 125,0 (CH), 121,8 (CH), 117,2 (C^{IV}), 115,2 (2CH), 114,9 (2CH), 99,0 (CH), 85,0 (C^{IV}), 83,2 (C^{IV}), 70,2 (CH), 70,1 (CH), 69,3 (5CH), 66,8 (CH), 55,8 (CH₃), 43,9 (CH₂), 41,9 (CH₂).

MS m/z 515 MH⁺ ³⁷Cl, 514 M^{+•} ³⁷Cl, 513 MH⁺ ³⁵Cl, 512 M^{+•} ³⁵Cl, 391 (C₉H₅N³⁷ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺, 389 (C₉H₅N³⁵ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺.

HR-MS m/z 510,1101, 512,1182, 513,1222, 514,1184, 515,1198, 516,1211.

HPLC t_R C18 Nucleosil 15,1 min, CN-RP 13,9 min.

7-chloro-4-{2-[N'-(4-bromophényl)aminométhyl]-N-ferrocénylméthylamino}quinoléine (63)



M = 560,5 g.mol⁻¹

Solide jaune

F = 151 ± 1 °C

Rendement = 32 %

¹H NMR (CDCl₃) δ 8,42 (d, 1H, J = 5,1 Hz), 7,87 (s, 1H), 7,42 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 7,20 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 7,10 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 6,48 (d, 2H, J = 8,6 Hz), 6,41 (d, 1H, J = 5,2 Hz), 5,78 (m, 1H), 4,30 (m, 3H), 4,19 (s, 5H), 4,13 (m, 2H), 4,09 (m, 1H), 3,92 (m, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 150,6 (CH), 148,3 (C^{IV}), 147,7 (C^{IV}), 145,8 (C^{IV}), 133,8 (C^{IV}), 130,9 (2CH), 127,1 (CH), 124,1 (CH), 120,5 (CH), 116,0 (C^{IV}), 113,8 (2CH), 108,8 (C^{IV}), 98,0 (CH), 83,5 (C^{IV}), 82,0 (C^{IV}), 69,0 (CH), 68,5 (CH), 68,3 (5CH), 66,0 (CH), 52,9 (CH₂), 41,5 (CH₂).

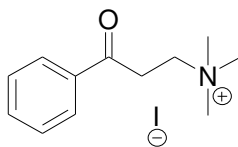
MS m/z 563 MH⁺ ³⁷Cl, 562 M^{+•} ³⁷Cl, 561 MH⁺ ³⁵Cl, 560 M^{+•} ³⁵Cl, 391 (C₉H₅N³⁷ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺, 389 (C₉H₅N³⁵ClNHCH₂C₁₀H₈FeCH₂)⁺.

HR-MS m/z 558,0116, 560,0162, 561,0203, 562,0175, 563,0201, 564,0151, 565,0142.

HPLC t_R C18 Nucleosil 18,3 min, CN-RP 16,4 min.

VI. Molécule duale ferrocénique basée sur les bases de Mannich

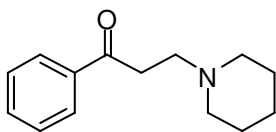
iodure de *N,N,N*-triméthyl-3-oxo-3-phénylpropan-1-ammonium (65)



La 3-diméthylamino-1-phényl-propan-1-one (1 mmol) est dissoute dans de l'acétone préalablement séchée sur tamis moléculaire (20 mL). De l'iodométhane (10 mmol) est ajouté à la solution et le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 2h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est engagé dans la réaction suivante sans purification.

1-phényl-3-(pipéridin-1-yl)propan-1-one (66)

Un mélange de pipéridine (10 mmol) et d'iodure *N,N,N*-triméthyl-3-oxo-3-phénylpropan-1-ammonium préparé précédemment (1 mmol) est dissout dans de l'acétonitrile (25 mL). Du carbonate de potassium (10 mmol) est ajouté en excès et le mélange est porté à reflux pendant 3 à 7h. La solution refroidie à température ambiante est diluée avec de l'eau (25 mL). La phase aqueuse est ensuite extraite avec du dichlorométhane (3 × 50 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaCl (50 mL) et séchée sur Na₂SO₄. Les solvants sont évaporés sous pression réduite.



$$M = 218,0 \text{ g.mol}^{-1}$$

huile orange

Rendement = 94 %

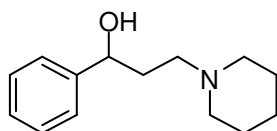
¹H NMR (CDCl₃) δ 7,97 (d, 2H, J = 7,0 Hz), 7,56 (t, 1H, J = 7,0 Hz), 7,45 (d, 2H, J = 7,4 Hz), 3,22 (t, 2H, J = 7,4 Hz), 2,81 (t, 2H, J = 7,4 Hz), 2,47 (m, 4H), 1,61 (quint., 4H, J = 5,4 Hz), 1,45 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 198,3 (C^{IV}), 132,0 (CH), 127,6 (2CH), 127,0 (2CH), 53,5 (2CH₂), 52,8 (CH₂), 35,2 (CH₂), 24,8 (2CH₂), 23,2 (CH₂).

MS m/z 218 M⁺.

1-phényl-3-(pipéridin-1-yl)propan-1-ol (67)

A une solution de 1-phényl-3-(pipéridin-1-yl)propan-1-one (298 mg, 1.37 mmol) dans le méthanol anhydre (20 mL) est ajouté du borohydrure de sodium (158 μ L, 4.16 mmol). Le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 2 h. Le méthanol est évaporé sous pression réduite.



$$M = 219,0 \text{ g.mol}^{-1}$$

Solide blanc

F = se décompose avant fusion

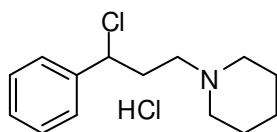
Rendement = 24 %

^1H NMR (CDCl_3) δ 7,20 (m, 5H), 6,63 (m, 1H), 4,82 (t, 1H, $J = 5,9$ Hz), 2,47 (m, 6H), 1,74 (m, 2H), 1,53 (quint., 4H, $J = 5,6$ Hz), 1,38 (m, 2H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 144,6 (C^{IV}), 128,3 (2CH), 127,1 (CH), 125,6 (2CH), 74,0 (CH), 56,8 (CH_2), 54,3 (2 CH_2), 33,4 (CH_2), 25,0 (2 CH_2), 23,6 (CH_2).

MS m/z 220 MH^+ .**Chlorhydrate de 1-(3-chloro-3-phénylpropyl)pipéridine (68)**

A une solution de 1-phényl-3-(pipéridin-1-yl)propan-1-ol (300 mg, 1.37 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (20 mL) est ajouté du chlorure de thionyle (600 μ L). Le mélange est porté à 60°C pendant 8 h. Le dichlorométhane est évaporé sous pression réduite.



$$M = 274,0 \text{ g.mol}^{-1}$$

Solide blanc

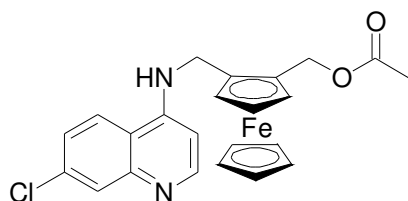
F = se décompose avant fusion

Rendement = 12 %

^1H NMR (CDCl_3) δ 7,37 (m, 5H), 5,05 (s, 1H), 3,54 (m, 2H), 3,15 (m, 2H), 2,69 (m, 4H), 2,03 (m, 2H), 1,86 (m, 2H), 1,42 (m, 2H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 139,0 (C^{IV}), 128,1 (2CH), 127,9 (2CH), 125,9 (CH), 59,7 (CH), 54,5 (CH_2), 53,5 (CH_2), 52,1 (CH_2), 32,7 (CH_2), 21,7 (CH_2), 21,6 (CH_2), 21,1 (CH_2).

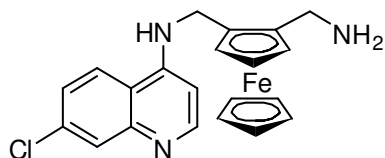
MS m/z 274 $\text{M}^{+\bullet} {}^{35}\text{Cl}$, H^{35}Cl , 238 $\text{M}^{+\bullet} {}^{35}\text{Cl}$, 202 $\text{M} - \text{HCl}$.

Acétate de 7-chloro-[4-(2-méthylferrocényl)aminométhyl]quinoléine (69)

De la FQ (250 mg, 0.58 mmol) est solubilisée dans de l'anhydride acétique (1,4 mL, 14,8 mmol). Le mélange est porté à 90°C pendant 5 minutes. Le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau distillée (25 mL) et l'acide formé est neutralisé avec du bicarbonate de sodium. La solution aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (3 × 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur Na₂SO₄. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le produit est engagé dans la réaction suivante sans purification.

7-chloro-4-[2-(aminométhyl)-N-ferrocénylméthylamino]quinoléine (70)

A une solution contenant de acétate de 7-chloro-[4-(2-méthylferrocényl)aminométhyl]quinoléine (255 mg, 0,57 mmol) dans l'acétonitrile (20 mL) est ajouté une solution d'ammoniaque à 66 % (5 mL). Le mélange est porté à 60°C pendant 3 h. Le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau distillée (25 mL). La phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (3 × 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur Na₂SO₄. Les solvants sont évaporés sous pression réduite.

M = 405,5 g.mol⁻¹

Solide orange

F = 140 ± 1 °C

Rendement = quant.

¹H NMR (CDCl₃) δ 8,58 (d, 1H, J = 5,3 Hz), 7,91 (d, 1H, J = 1,5 Hz), 7,81 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,25 (m, 1H), 6,47 (d, 1H, J = 5,3 Hz), 4,35 (d, 1H, J = 13,1 Hz), 4,28 (m, 1H), 4,21 (m, 1H), 4,13 (m, 1H), 4,12 (s, 5H), 4,10 (s, 1H), 3,74 (s, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 170,7 (CH), 152,0 (CH), 149,2 (C^{IV}), 134,5 (C^{IV}), 128,2 (CH), 124,8 (CH), 122,7 (CH), 117,7 (C^{IV}), 98,8 (CH), 87,8 (C^{IV}), 83,1 (C^{IV}), 79,9 (CH), 70,2 (CH), 69,1 (5CH), 66,1 (CH), 42,1 (CH₂), 35,2 (CH₂).

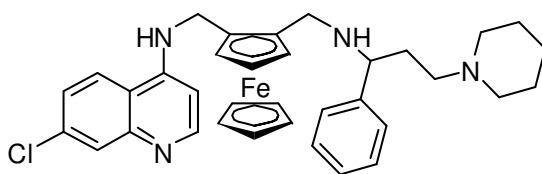
MS *m/z* 408 MH⁺ ³⁷Cl, 407 M⁺• ³⁷Cl, 406 MH⁺ ³⁵Cl, 405 M⁺• ³⁵Cl, 391 (M ³⁷Cl – NH₂)⁺, 389 (M ³⁵Cl – NH₂)⁺.

Analyse élémentaire (C₂₁H₂₀N₃FeCl) Calculée: C, 62,17%; H, 4,97%; N, 10,36%; Mesurée:

C, 62,25%; H, 5,23%; N, 10,12%.

7-chloro-4-[[N'-(1-phényl-3-pipéridinylpropyl)aminométhyl]-N-ferrocénylméthyl-amino]quinoléine (71)

A une solution contenant de la 7-chloro-4-[2-(aminométhyl)-N-ferrocénylméthylamino]quinoléine (234 mg, 0.58 mmol) dans l'éthanol (10 mL) sont ajoutés de la triéthylamine (350 μ L) puis du chlorhydrate de 1-(3-chloro-3-phénylpropyl)pipéridine (134 mg, 0.52 mmol). Le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante. Après 5 h de réaction, du chlorhydrate de 1-(3-chloro-3-phénylpropyl)pipéridine (28 mg, 0.11 mmol) est ajouté au milieu réactionnel. Le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 3 h 30. L'éthanol est évaporé sous pression réduite. On obtient un solide blanc. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice en utilisant comme éluant un mélange acétate d'éthyle/triéthylamine (97,5/2,5).



$M = 606,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide marron

$F = 61 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Rendement = 6%

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 8,49 (d, 1H, $J = 3,9 \text{ Hz}$), 7,87 (d, 1H, $J = 4,2 \text{ Hz}$), 7,79 (d, 0,5H, $J = 9,0 \text{ Hz}$), 7,64 (d, 0,5H, $J = 9,0 \text{ Hz}$), 7,18-7,04 (m, 6H), 6,59 (m, 0,5H), 6,43 (d, 1H, $J = 5,9 \text{ Hz}$), 6,25 (m, 0,5H), 4,24 (d, 2H, $J = 12,9 \text{ Hz}$), 4,18 (m, 1H), 4,12 (m, 1H), 4,01 (s, 5H), 4,00 (m, 1H), 3,63 (t, 0,5H, $J = 6,4 \text{ Hz}$), 3,57 (t, 0,5H, $J = 6,4 \text{ Hz}$), 3,49 (d, 0,5H, $J = 12,3 \text{ Hz}$), 3,37 (d, 0,5H, $J = 12,3 \text{ Hz}$), 3,30 (d, 0,5H, $J = 12,3 \text{ Hz}$), 3,22 (d, 0,5H, $J = 12,3 \text{ Hz}$), 2,22 (m, 6H), 2,02 (m, 2H), 1,39 (m, 4H), 1,28 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 152,1 (CH), 149,6 (C^{IV}), 149,2 (C^{IV}), 146,7 (C^{IV}), 134,8 (C^{IV}), 128,6 (2CH), 128,5 (2CH), 127,3 (CH), 127,0 (CH), 125,1 (CH), 123,5 (CH), 118,5 (CIV), 99,7 (CH), 85,9 (C^{IV}), 84,3 (C^{IV}), 70,0 (CH), 69,1 (5CH), 66,5 (CH), 64,2 (CH), 61,7 (CH), 56,2 (CH_2), 54,5 (2 CH_2), 45,8 (CH_2), 42,0 (CH_2), 34,3 (CH_2), 25,9 (2 CH_2), 24,3 (CH_2).

MS m/z 563 $\text{MH}^+ \text{ }^{37}\text{Cl}$, 609 $\text{M}^{+\bullet} \text{ }^{37}\text{Cl}$, 608 $\text{MH}^+ \text{ }^{35}\text{Cl}$, 607 $\text{M}^{+\bullet} \text{ }^{35}\text{Cl}$, 391 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{CINHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$, 390 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{37}\text{CINHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}$) $^{2+}$, 389 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{CINHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}_2$) $^+$, 388 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}^{35}\text{CINHCH}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FeCH}$) $^{2+}$.

Analyse élémentaire ($\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{ClN}_4\text{Fe} \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$) Calculée: C, 69,37%; H, 6,32%; N, 9,25%; Mesurée: C, 69,37%; H, 6,32%; N, 9,25%.

VII. Oxydation chimique de la ferroquine

218 mg de FQ (0,5 mM) sont dissous dans 25 mL de dichlorométhane anhydre. Après solubilisation complète de la FQ, 98 mg de AgBF_4 (0,5 mM) sont ajoutés à la solution.³ Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 1 heure. Un précipité vert de $[\text{FQ}][\text{BF}_4]$ se forme. Il est filtré, lavé deux fois avec 50 mL d'éther diéthylique anhydre puis séché. On obtient 256 mg de $[\text{FQ}][\text{BF}_4]$ (0,49 mM, Rdt = 98 %).

VIII. Caractérisation RMN des dérivés 6, 23 et 49 de la ferroquine

Les spectres RMN ont été enregistrés à température ambiante dans le CDCl_3 sur le spectromètre Bruker Avance 300 MHz et à 280 K dans le CDCl_3 sur le spectromètre Bruker Avance 400 MHz. Une goutte de H_2O a été ajoutée à la surface de l'échantillon pour éviter l'évaporation du solvant et par conséquent, la dégradation de l'homogénéité du champ durant l'acquisition.⁴ Du TMS ou les signaux des protons résiduels du solvant deutéré ($\delta(^1\text{H}) = 7,24$ ppm and $\delta(^{13}\text{C}) = 77,2$ ppm) ont été utilisés comme références internes pour les spectres ^1H et ^{13}C . Les spectres ^{15}N ont été calibrés de manière indirecte comme décrit par Wishart et coll.⁵ L'acquisition des expériences COSY, ^{13}C -HSQC, ^{13}C -HMBC, ^{15}N -HSQC et ^{15}N -HMBC a été réalisée en utilisant les séquences standard. Pour les expériences HMBC, une constante de couplage de l'ordre de 8 Hz a été utilisée. Un temps de mélange de 300 ms a été utilisé pour les expériences en deux dimensions NOESY. Les expériences UDEFT ont été enregistrées comme décrit par Lippens et coll.⁶

³ Connelly, N. G.; Geiger, W. E. Chemical Redox Agents for Organometallic Chemistry. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 877-910.

⁴ Wieruszkeski, J. M.; Landrieu, I.; Hanouille, X.; Lippens, G. ELISE NMR: experimental liquid sealing of NMR samples. *J. Magn. Reson.* **2006**, 181, 199-202.

⁵ Wishart, D. S.; Bigam, C. G.; Yao, J.; Abildgaard, F.; Dyson, H. J.; Oldfield, E.; Markley, J. L.; Sykes, B. D. ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR.* **1995**, 6, 135-140.

⁶ Piotto, M.; Bourdonneau, M.; Elbayed, K.; Wieruszkeski, J.-M.; Lippens, G. New DEFT sequences for the acquisition of one-dimensional carbon NMR spectra of small unlabelled molecules. *Magn. Reson. Chem.* **2006**, 44, 943-947.

BIOCHIMIE

I. Inhibition de la formation de la β -hématine

Les valeurs de CI_{50} d'inhibition de la formation de β -hématine ont été déterminées en utilisant le protocole du Pr. T. Egan¹ légèrement modifié. Des solutions d'inhibiteurs (89,1 mM, 53,5 mM, 26,7 mM, 17,8 mM, 13,4 mM, 8,9 mM, 4,5 mM, 1,8 mM et 0 mM) sont préparées en solubilisant les inhibiteurs dans du méthanol, une solution de HCl à 1M ou du DMSO suivant la solubilité des composés. Une solution mère d'hématine (1,68 mM) est préparée en solubilisant de l'hémine d'origine bovine (0,64 mg) dans une solution à 0,1 M de NaOH (980 μ L). La solution est ensuite incubée à température ambiante pendant 60 minutes. Dans une série d'Eppendorfs, 2 μ L de solution de HCl 1M et 2 μ L de solution d'inhibiteur (ou de solvant pour le blanc) sont introduits. Les Eppendorfs sont placés dans un incubateur à 60°C puis 11,7 μ L d'une solution d'acétate de sodium à 12,9 M préincubée à 60°C sont ajoutés. Si les inhibiteurs ne sont pas solubles dans la solution de HCl 1M, 2 μ L de MeOH ou de DMSO, suivant les cas, sont introduits à la place de la solution de HCl 1M. Le processus de formation de β -hématine est initialisé par l'addition de 20,2 μ L de solution mère d'hématine préparée précédemment. La concentration finale en hématine est de 1 mM, les concentrations finales en inhibiteur sont 5 mM, 3 mM, 1,5 mM, 1 mM, 0,75 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,1 mM et 0 mM et le pH final du milieu réactionnel est de 4,5. Les Eppendorfs sont finalement incubés à 60°C pendant 60 minutes. Après incubation, la réaction est stoppée à température ambiante par ajout de 900 μ L d'une solution de HEPES à 200 mM contenant 5 % de pyridine de pH 8,2 qui ajuste le pH du milieu réactionnel entre 7,2 et 7,5. 1100 μ L d'une solution de HEPES à 20 mM contenant 5 % de pyridine de pH 7,5 sont ensuite ajoutés. Les Eppendorfs sont agités et le précipité de β -hématine est gratté des parois des Eppendorfs pour s'assurer la dissolution totale de l'hématine. Les Eppendorfs sont laissés durant 15 minutes au repos afin que le précipité de β -hématine ait le temps de décanter. Le surnageant est alors transféré avec précautions dans une cuvette en essayant de ne pas prélever de précipité et l'absorbance est mesurée à 405 nm sur un spectrophotomètre UV-visible Varian Cary 50.

¹ Ncokazi, K. K.; Egan, T. J. A colorimetric high-throughput beta-hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compounds. *Anal. Biochem.* **2005**, 338, 306-319.

II. Inhibition de la glutathion réductase de *P. falciparum*

Des solutions d'inhibiteurs (10 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,1 mM, 0,05 mM et 0,01 mM) sont préparées en solubilisant les inhibiteurs dans le DMSO. Une solution tampon de pH 6,9 est préparée en solubilisant 2,79 g de KH_2PO_4 , 6,04 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,372 g d'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) et 14,91 g de KCl dans 1 L d'eau. Le pH de la solution tampon est ajusté à pH 6,9 par ajout goutte à goutte d'une solution de KOH à 5M. Une solution de PfGR (dilution 1:1000) a été préparée par dissolution de 1 μL de PfGR dans une solution d'albumine à 50 mg/mL dans le tampon. 10 μL de solution de PfGR sont ajoutés dans une cuvette de 1 mL contenant 910 μL de solution tampon, 10 μL de solution d'inhibiteur (ou de DMSO pour le blanc), 50 μL de solution de GSSG à 20 mM et 25 μL de solution NADPH à 4 mM. L'absorbance est mesurée immédiatement à 340 nm. Dans la cuvette, les concentrations finales en inhibiteur sont 100 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1 μM , 0,5 μM et 0,1 μM , la concentration finale en GSSG est de 1 mM, celle en NADPH est de 100 μM et la dilution finale de PfGR est de 5:100000.

III. Etude métabolique des molécules duales

Préparation des solutions

Les solutions d'inhibiteurs (89,1 mM) sont préparées en solubilisant les inhibiteurs dans du méthanol, une solution de HCl à 1M ou du DMSO suivant la solubilité des composés. Une solution mère d'hématine (1,68 mM) est préparée en solubilisant de l'hème d'origine bovine (0,64 mg) dans une solution à 0,1 M de NaOH (980 μL). La solution est ensuite incubée à température ambiante pendant 60 minutes.

Influence du pH

Dans des Eppendorfs, une solution d'inhibiteur à 89,1 mM est incubée à 37°C dans une solution tampon phosphate de pH 5. Le milieu réactionnel est injecté en HPLC après 1h, 17h et 24h de réaction.

Influence de la présence de β -hématine

Dans des Eppendorfs, 10 μL de solution de HCl 1M sont incubés à 37°C puis 58,5 μL d'une solution d'acétate de sodium à 12,9 M préincubée à 60°C sont ajoutés. Finalement, 100 μL de solution mère d'hématine (ou de solution de NaOH 0,1M pour le blanc) ainsi que 10

μL de solution d'inhibiteur sont ajoutés. Le milieu réactionnel est placé dans un incubateur à 37°C puis le surnageant est injecté en HPLC après 1h et 17h de réaction.

Influence de la présence de H₂O₂

Dans des Eppendorfs, 10 μL de solution de HCl 1M sont incubés à 37°C puis 58,5 μL d'une solution d'acétate de sodium à 12,9 M préincubée à 60°C sont ajoutés. Finalement, 100 μL de solution mère d'hématine (ou de solution de NaOH 0,1M pour le blanc), 10 μL de solution d'inhibiteur ainsi que 2,5 μL de solution de H₂O₂ à 5 M sont ajoutés. Le milieu réactionnel est placé dans un incubateur à 37°C puis le surnageant est injecté en HPLC après 1h.

IV. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

12,7 mg de FQ.2HCl sont dissous dans 25 mL d'eau HPLC. La solution finale en FQ.2HCl est de 1 mM. Des solutions mères de H₂O₂ (50 mM, 500 mM et 5 M) sont préparées par dilution d'une solution commerciale de H₂O₂ (30 %) dans de l'eau HPLC. Les échantillons sont préparés en ajoutant 20 μL de solution mère de H₂O₂ à 1 mL de solution de FQ.2HCl. Les concentrations finales en H₂O₂ sont 1 mM, 10 mM et 100 mM. Les réactions entre la FQ et H₂O₂ sont suivies pendant 31 heures. 0,5 μL du milieu réactionnel est déposé après 0, 0,5, 1, 5, 6, 7, 24 et 31 heures sur une cible MALDI avec 1 μL de matrice 2',4',6'-trihydroxyacétophénone (THAP)/citrate d'ammonium 9/1 v/v (THAP 10 mg/mL dans H₂O/acétonitrile, v/v, et citrate d'ammonium 50 mg/mL dans H₂O) en utilisant la méthode de la goutte sèche. Les spectres MALDI-TOF sont acquis par un instrument Voyager DE-STR équipé d'un laser azote qui fonctionne à une longueur d'onde de 337 nm en mode de réflexion ion positif. Entre 100 et 125 tirs de laser ont été accumulés pour chaque spectre.

BIOPHYSIQUE

I. Interaction des ligands avec l'ADN

Préparation des solutions de ligand

Une solution tampon de Tris(-hydroxyméthyl)aminométhane, appelée TE, de pH 7,4 est préparée en solubilisant 243,8 mg de Tris(-hydroxyméthyl)aminométhane, 8,6 mg d'EDTA et 64,8 mg de NaCl dans 200 mL d'eau. Le pH est ajusté par ajout goutte à goutte d'une solution de HCl 1N. Les solutions de ligand de 10 μ M sont préparées en solubilisant le ligand dans le méthanol ou l'eau suivant la lipophilie de la molécule.

Expériences de spectrophotométrie UV

Les expériences de spectrophotométrie UV-visible ont été réalisées sur un spectrophotomètre Cary 4E dans des cellules de trajectoire optique de 3 mm. Les expériences d'interaction avec l'ADN sont réalisées par dosage d'une solution à 10 μ M de ligand par une solution d'ADN PUC18 linéaire de 2686 paires de base de synthèse à température ambiante. Les concentrations finales en ADN dans la cellule varient entre 0,1 et 50 μ moles de paires de bases par litre. Les spectres d'absorbance ont été mesurés entre 220 et 380 nm après chaque addition de solution d'ADN dans la cellule.

Dosage fluorométrique

Les spectres d'émission ont été mesurés par pas de 2 nm en utilisant un spectrofluorimètre SLM -Aminco 8100 avec une lampe au Xénon de 450 W. Pour toutes les études de fluorescence, l'absorbance des échantillons à la longueur d'onde d'excitation est inférieure à 0,1 afin d'éviter les effets de filtre interne. Les dosages fluorométriques sont effectués à température ambiante. De petites quantités de solution d'ADN PUC18 linéaire de 2686 paires de base de synthèse sont ajoutées petit à petit à une solution de 10 μ M de ligand. Un spectre d'émission est mesuré après chaque ajout d'ADN. Les spectres d'émission sont mesurés à une longueur d'onde d'excitation de 320 nm qui a été déterminée comme étant la longueur d'onde à laquelle l'émission est maximale. Les concentrations finales en ADN dans la cellule varient entre 0,1 et 50 μ moles de paires de bases par litre.

Réversibilité de l'interaction

Dans une cuvette sont introduits 100 μL de solution de ligand à 10 μM ainsi que 1,7 μL de solution d'ADN à 3 mM. Les concentrations finales dans la cuvette sont 10 μM pour le ligand et 50 μM pour l'ADN. L'absorbance et l'émission sont mesurées au temps t_0 . 100 μL de la solution présente dans la cuvette sont introduits dans un Eppendorf à membrane qui est placé dans un erlenmeyer contenant 500 mL de solution tampon TE dans une chambre froide. L'absorbance et l'émission du contenu de l'Eppendorf sont mesurées après 1h et 17h de dialyse.

II. Mesures optiques des points de fusion de l'ADN

Les courbes de dénaturation thermique de l'ADN ont été enregistrées par spectrophotométrie UV-visible à 260 nm sur un spectrophotomètre Varian Cary 4E équipé d'un thermorégulateur Peltier et d'un passeur d'échantillons automatique. L'absorbance initiale des échantillons est ajustée approximativement à 0,2 à 260 nm dans des cellules en quartz de trajectoire optique de 1 cm. Dans une cuvette contenant 1 mL de solution de ligand à 1 μM sont ajoutés 5 μL de solution d'ADN à 15 μmoles de paires de bases par litre. La vitesse de chauffe est de 0,5°C par minute et l'absorbance est mesurée tous les 0,5°C de 25 à 97°C. Les données sont traitées en utilisant le programme KaleidaGraph. Les courbes sont normalisées par l'absorbance à température ambiante et lissées par intervalles de 5 points. La courbe de dénaturation est calculée en prenant la fonction dérivée des données lissées et est également lissée par intervalles de 5 points. Le maximum de la courbe de dénaturation dérivée correspond à la température de fusion (T_m). Différents types d'ADN ont été utilisés pour cette étude : un ADN PUC18 linéaire de synthèse contenant 50,3 % de paires de bases AT, un ADN commercial de *Clostridium perfringens* (Sigma) contenant 73 % de paires de bases AT et un polydAdT.polydAdT de synthèse (Pharmacia Biotech).

III. Expérience de piégeage de radicaux libres

Les expériences de piégeage de radicaux libres ont été réalisées sur un spectromètre Bruker ELEXYS 580-FT à température ambiante avec une puissance microondes de 8 mW et une modulation d'amplitude de 1 G. Les solutions sont analysées dans une cellule plate en quartz insérée dans une cavité standard. Le *N*-oxide de 5,5-diméthyl-1-pyrroline (DMPO) a été acheté chez Fluka et est utilisé après distillation sous pression réduite Kugelrohr pour retirer les impuretés paramagnétiques. Les solutions aqueuses de H_2O_2 sont fraîchement

préparées avec les expériences RPE avec une solution initiale de H_2O_2 (30 %) achetée chez Aldrich. Une solution mère de FQ.2HCl à 1 mM est préparée en solubilisant 12,7 mg de FQ.2HCl dans 25 mL d'eau pure. 20 μL de DMPO à 8 M sont dilués dans 1 mL de FQ.2HCl à 1 mM avant d'ajouter 50 μL de solution de H_2O_2 . Les concentrations finales en H_2O_2 sont 1 mM et 15 mM. Les spectres RPE théoriques ont été simulés en utilisant le logiciel Winsim 2002.¹

¹ Duling, D. R. Simulation of Multiple Isotropic Spin Trap EPR Spectra. *J. Magn. Reson., Ser. B* **1994**, 104, 105-110.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Détermination des CI_{50} et CI_{90}

Dans une relation typique dose-réponse, on obtient une sigmoïde (figure 1). Les concentrations inhibitrices à 50% et à 90% sont les concentrations médianes en drogue nécessaires pour inhiber la croissance maximale du parasite de 50% et 90%, respectivement. Les concentrations sont exprimées en nmol/L.

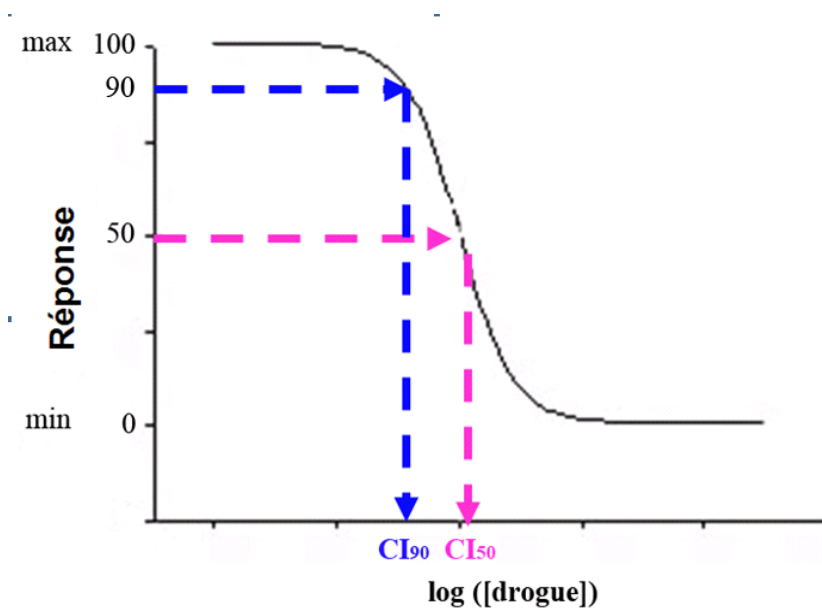


Figure 1 : Détermination graphique des CI_{50} (en rose) et CI_{90} (en bleu).

ANNEXE 2 : La spectroscopie RMN

I. Séquence ^{13}C UDEFT (Uniform Driven Equilibrium Fourier Transform)

Cette séquence permet de forcer les aimantations à revenir plus rapidement à l'état d'équilibre et de faciliter ainsi leur relaxation longitudinale notamment celle des carbones quaternaires qui est la plus problématique. Par conséquent, le temps de retour à l'équilibre entre chaque scan est diminué, ce qui accélère le processus d'acquisition du spectre 1D ^{13}C découplé ^1H par rapport aux séquences classiques. La séquence UDEFT est surtout efficace pour tous les noyaux qui relaxent lentement. Elle permet aussi d'obtenir un spectre quantitatif.

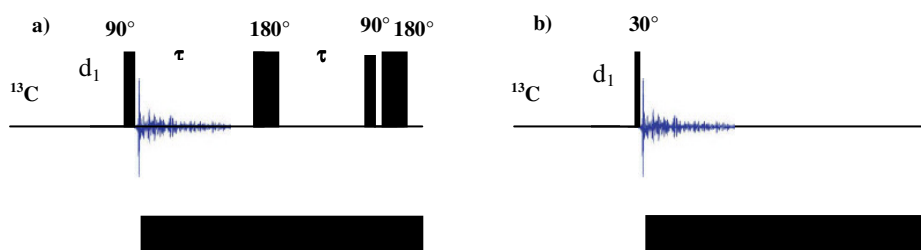


Schéma 1 : Séquences d'impulsion UDEFT (a) et zgig30 (b).

II. La spectroscopie RMN 2D

L'interprétation des spectres 1D RMN est la plupart du temps complexe à cause de la superposition des signaux. Par l'introduction d'autres dimensions spectrales, il est possible d'obtenir des informations supplémentaires.

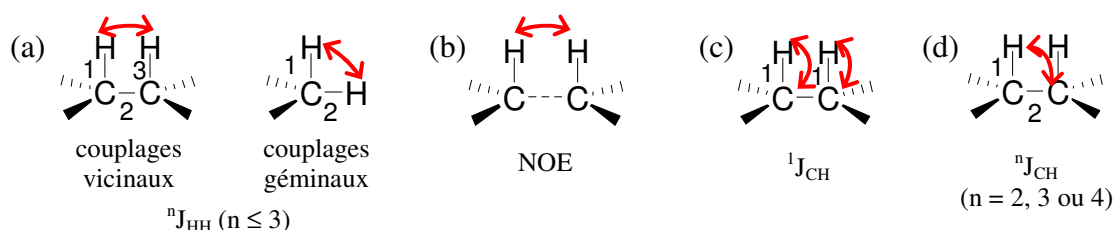


Schéma 2 : Représentation schématique des différents couplages et interactions entre les noyaux observés sur des spectres RMN COSY (a), NOESY (b), HSQC (c) et HMBC (d).

II.1. Expériences RMN 2D homonucléaires

II.1.1. COSY (CORrelation SpectroscopY, schéma 2a)

Dans l'expérience COSY, la magnétisation est transférée par couplage scalaire. Les protons qui sont séparés de plus de 4 liaisons chimiques ne donnent pas de signal de couplage car les constantes de couplage 5J sont proches de 0. Seuls les signaux des protons qui sont séparés par 2, 3 ou 4 liaisons sont visibles sur les spectres COSY.

II.1.2. NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY, schéma 2b)

L'expérience NOESY permet de visualiser l'interaction dipolaire entre protons (nuclear overhauser effect, NOE). L'intensité des NOEs est proportionnelle à $1/r^6$ où r désigne la distance entre les protons. La corrélation entre deux protons dépend de la distance qui les sépare. En pratique, un signal NOE est observé si la distance entre les protons est inférieure à 5Å. L'expérience NOESY corréle tous les protons qui sont proches l'un de l'autre. On peut alors observer une corrélation entre des protons qui sont distants d'un point de vue scalaire mais proches dans l'espace.

II.2. Expériences RMN 2D hétéronucléaires

Pour la détermination structurale des molécules, il est également utile de s'intéresser à d'autres noyaux comme le ^{13}C et le ^{15}N par exemple, qui permettent de donner des informations supplémentaires sur la conformation des molécules. L'abondance naturelle du ^{13}C et du ^{15}N est très faible (1,11 % et 0,36 %, respectivement) et leur rapport gyromagnétique ($6,73.10^7$ et $-2,71.10^7 \text{ rad.s}^{-1}.\text{T}^{-1}$, respectivement) est très inférieur à celui du ^1H ($26,7.10^7 \text{ rad.s}^{-1}.\text{T}^{-1}$). C'est pourquoi, deux stratégies sont utilisées pour augmenter la faible sensibilité de ces noyaux : (1) un enrichissement isotopique de ces noyaux ; (2) une augmentation du rapport signal sur bruit en utilisant des expériences RMN inverses dans lesquelles la magnétisation est transférée des ^1H aux hétéronoyaux.

II.2.1. HSQC (Hétéronuclear Single Quantum Correlation, schéma 2c)

L'expérience RMN inverse la plus importante est l'HSQC. Elle permet de visualiser le couplage scalaire d'un hétéronoyau avec le ^1H qui lui est directement attaché. Chaque signal sur le spectre HSQC correspond à un ^1H lié directement à un hétéronoyau.

II.2.2. HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation, schéma 2d)

L'expérience HMBC diffère de l'expérience HSQC par la nature des couplages. Les signaux observés sur un spectre HMBC représentent des couplages scalaires à travers 2, 3 ou 4 liaisons. Chaque signal correspond à la corrélation entre un ^1H et un hétéroatome séparés par 2, 3 ou 4 liaisons.

ANNEXE 3 : CI_{50} et CI_{90} (nM) des dérivés de la FQ 20-24, des analogues courts de la FQ 5 et de la CQ 74 et des molécules duales 71-73

	3D7		D6		IMT8425		Voll		L1		PA		Bres		PCR3		W2		K2		K14		FCM29	
	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}
20	99,8	227,5	81,9	193,2	52,8	84,5	198,2	339,6	211,4	345,1	69,3	118	201,4	336,5	148,3	309	200,9	347,5	200,9	343,6	200	335,7	230,1	365,6
21	188,8	338,8	165,2	319,2	134	289,7	189,7	335	199,1	343,6	194,5	340,4	220,8	354	185,4	336,5	218,3	255,6	212,8	355,6	213,8	354,8	241,6	369,8
22	162,2	319,9	115,6	264,9	123,6	263	180,3	334,2	171,4	322,1	181,6	333,4	173,4	328,1	157,8	314,1	208	350,8	189,2	339,6	169	322,9	157	309
23	51,2	86,7	41,6	74,1	41,4	74,3	51,9	111,7	49,3	83,6	48,6	84,5	49,8	89,1	44,7	68,7	62,7	105,7	53,2	93,1	52,8	104	65,5	124,7
24	176,6	319,2	200,5	343,6	121,1	265,5	185,8	336,5	213,8	349,1	126,8	255,9	143,9	258,2	193,6	335,7	204,6	347,5	237,1	370,7	184,1	328,1	124,7	265,5
CQ	21,3	40,4	23	44,4	25,5	59,2	262,4	316,2	273,5	417,8	330,4	483,1	442,6	613,8	477,5	685,5	485,3	693,4	493,2	912	648,6	1129,8	879	1241,7
RQ	3,5	6,5	5,6	8	6,5	9,4	11	18,8	8	13,8	7	13	1,2	13,7	11,5	16,9	7,1	12,6	9	16,3	12,6	25,6	10	19,3

	3D7		D6		IMT8425		Voll		L1		PA		Bres		PCR3		W2		K2		K14		FCM29	
	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}
RQ	3,5	6,5	5,6	8	6,5	9,4	11	18,8	8	13,8	7	13	1,2	13,7	11,5	16,9	7,1	12,6	9	16,3	12,6	25,6	10	19,3
5	5	7,6	4,2	6,1	3,1	5,4	14,4	37,4	15,4	36	26,1	54,8	17,4	41,9	13,8	29,2	10,2	25,4	10,1	13,7	43,1	70,8	47,2	75,3
71	9,3	12,9	9,9	12,9	6,4	8,7	10,5	16,1	9,6	18,9	14,6	21,2	15,9	29,6	9,1	12,8	7,2	9,7	16,3	23	40,7	61,4	12,6	19,6
CQ	21,3	40,4	23	44,4	25,5	59,2	262,4	316,2	273,5	417,8	330,4	483,1	442,6	613,8	477,5	685,5	485,3	693,4	493,2	912	648,6	1129,8	879	1241,7
74	35,2	65,6	35,6	67,8	29	59,4	63,7	134,6	63,2	132,4	64	107,2	129,1	217,8	86,1	164,4	168,7	319,9	129,7	285,1	171	316,2	238,8	369
72	8,1	14,4	12,2	16,7	8,8	16,9	65,2	144,5	61,7	176,6	161,1	317,7	158,1	310,5	64,4	195,9	99,8	260	87,1	247,2	129,1	267,3	244,3	375,8
73	9,9	15,8	10,9	16	8	12,8	38,5	68,4	43,9	73,5	41,2	68,9	46,5	76,7	44,2	73,1	44	74,6	58,1	104,7	76	204,6	134,9	295,8

RESUME

La chimie bioorganométallique constitue une alternative intéressante pour faire face aux problèmes de chimiorésistance chez *P. falciparum*, agent principal du paludisme. Ce travail de recherche est centré sur la conception, la synthèse, l'analyse structurale et l'activité antipaludique de nouveaux dérivés de la ferroquine.

A partir du squelette de la ferroquine, nous avons établi un programme de synthèse d'un grand nombre de dérivés à des fins de pharmacomodulation. L'analyse structurale conformationnelle des dérivés obtenus est décrite. Les résultats des études biologiques d'inhibition de la croissance parasitaire sont très prometteurs et des relations structure-activité ont pu être dégagées. Des investigations plus complexes alliant des méthodes biochimiques et biophysiques concernant le mécanisme d'action de ces nouvelles molécules ont été réalisées et permettent de mieux comprendre le mécanisme d'action de la ferroquine.

Mots clés : chimie bioorganométallique, paludisme, ferroquine, conception de médicaments, mécanisme d'action, redox, molécule duale.

SUMMARY

Bioorganometallic chemistry has shown to be an interesting alternative to face the problems of drug resistance in *P. falciparum*, the main causative agent of malaria. This research work is based on the design, synthesis, structural characterisation and antimalarial activity of new ferroquine derivatives.

Starting from the ferroquine skeleton, in order to make a pharmacomodulation, we have synthesized a large array of structurally various FQ derivatives. Structural characterisation of these derivatives is described. The results of the biological studies on the inhibition of the parasite growth are very promising and structure-activity relationships have been brought out. Additional investigations using biochemical and biophysical methods have been done concerning the mechanism of action of these new compounds. This allows us to have a better understanding of the mechanism of action of ferroquine.

Keywords : bioorganometallic chemistry, malaria, ferroquine, drug design, mechanism of action, redox, dual drugs.