



**UNIVERSITE LILLE 1 – SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE MASUKU**

**CENTRE INTERNATIONAL DE RECHERCHES MEDICALES DE  
FRANCEVILLE**

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA MATIERE, DU RAYONEMENT ET DE  
L'ENVIRONNEMENT

**Thèse de Doctorat**

**Molécules et Matière Condensée**

**Gabin MWANDE – MAGUENE**

**CONCEPTION, SYNTHÈSE ET ACTIVITÉ  
ANTIPLASMODIALE DE NOUVEAUX COMPOSÉS  
FERROCENIQUES**

---

*Thèse dirigée par le Pr. Lydie PELINSKI et le Pr. Jacques LEBIBI*

**Soutenue le 28 juin 2011 devant la commission d'examen  
Pour obtenir le grade de Docteur d'Université**

**Président du jury :**

Philippe Grellier,

Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris

**Rapporteurs :**

Anne Robert,

Directeur CNRS, LCC Toulouse

Philippe Belmont,

Chargé de recherche UMR 176 CNRS, Institut Curie Paris

**Examineurs :**

Jean-Bernard Lekana-Douki,

Maître Assistant CAMES, CIRMF Gabon

**Directeurs de thèse**

Lydie Pélineski,

Professeur, UCCS UMR CNRS 8181

Jacques Lebibi,

Professeur, USTM Gabon





# Remerciements

Ce travail de thèse, a été réalisé en cotutelle

entre l'équipe de Catalyse, Chiralité et Chimie Fine, dirigée par Madame le Docteur Francine Agbossou, Directeur de Recherche CNRS à l'Unité de Catalyse et de Chimie du Solide (UCCS, UMR 8181), dirigée par Monsieur le Professeur Lionel Montagne,

l'Unité de Recherches de Chimie et Biochimie, du département de Chimie de l'Université des Sciences et Techniques de Masuku à Franceville au Gabon, dirigée par le Professeur Jacques Lebibi, et

l'Unité de Parasitologie Médicale dirigée par Monsieur le Docteur Touré Fousseyni du Centre International de Recherches Médicales de Franceville sous la direction de Monsieur Jean-Paul Gonzalez.

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse, le Professeur Lydie Pelinski, pour m'avoir fait l'honneur de travailler avec elle durant toutes ses années de recherches. Ses compétences, sa gentillesse, son intérêt pour le sujet et ses conseils (scientifiques et professionnels) m'ont fortement aidé au cours de ma thèse. Le Professeur Jacques Lebibi, pour avoir accepté de codiriger cette thèse, me permettant ainsi de faire le lien entre les deux pays. Sa simplicité, ses compétences et sa motivation pour le sujet m'ont permis de bien réaliser mes travaux au Gabon.

J'adresse un grand remerciement au Docteur Touré Fousseyni, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser une partie de mes travaux au sein de l'UPARAM au CIRMF et d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour la bonne marches des ses derniers.

De tout cœur, je remercie le Docteur Jean-Bernard Lekana-Douki, pour m'avoir fait découvrir la parasitologie. Son encadrement, ses conseils et sa disponibilité m'ont été d'une aide précieuse durant mes deux déplacements au CIRMF.

Je remercie également le Docteur Élisabeth Mouray, ingénieur de recherche au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, pour sa sympathie, sa grande disponibilité et le Professeur Philippe Grellier, pour m'avoir permis de compléter mes travaux de recherche et mes compétences en parasitologie au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, pour son professionnalisme, ses conseils scientifiques et aussi pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de soutenance.

Merci aux Docteurs Sylvain Pellegrini et Till Bousquet, Maitres de Conférences à l'UCCS, pour leurs discussions scientifiques, leurs aides et conseils dans la rédaction du manuscrit.

## Remerciements

---

Je tiens très particulièrement à remercier le Dr Philippe Belmont, Chargé de recherche CNRS au sein de l'UMR 176 CNRS de l'Institut Curie de Paris et le Dr Anne Robert, Directeur CNRS, LCC Toulouse d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

Pour leur assistance, leurs encouragements, et leurs sympathies, qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions, je remercie chaudement Claudine Buttica, les Docteurs Christophe Biot, Sophie Picart, Natascha Chavain et Christophe Michon.

Je souhaiterais remercier, la Direction Générale des Bourses et Stages du gouvernement gabonais pour avoir financé mes quatre années de thèse par une bourse du troisième cycle, mais également la Direction Régionale du Nord Pas-de-Calais et l'Université de Lille1, Sciences et Technologies pour avoir financé la collaboration France-Gabon par une bourse de mobilité Nord-Sud.

Recevez chers collègues et amis des Laboratoires de l'UCCS, et de l'UPARAM ma profonde sympathie. Je tenais à vous remercier pour ces bons moments passés ensemble et je vous souhaite une bonne continuation.

J'adresse un grand merci à tous mes amis et connaissances, toute ma famille à tous ceux et celles qui ont cru en moi et qui n'ont cessé de me soutenir, de m'encourager et de prier pour moi. Merci à ma maman Moutsinga Marie-Claire, à ma chérie Magalie et ses parents, à ma famille de cœur les Hennion, à ma famille spirituelle la Source, Fives, le Renouveau, à Armel, Julius et Léonie d'avoir toujours été là.

Enfin, je tenais à dédier ce manuscrit à la mémoire de mon père André Boubala Maguena, avec qui j'aurai aimé partager ce moment très important de ma vie. Puisse Dieu, te garder au chaud là-haut car je sais que tu veilles sur moi.

Que Dieu bénisse abondamment et puissamment tous ceux et celles qui liront ce manuscrit.

Dr. Gabin MWANDE-MAGUENE

# **TABLE DES MATIERES**



# Table des matières

INTRODUCTION GENERALE .....	13
PLAN DU MANUSCRIT.....	18
CHAPITRE I : LA CHIMIE BIOORGANOMETALLIQUE DANS LE TRAITEMENT DU PALUDISME.....	19
I. LE PALUDISME .....	21
I.1. situation mondiale.....	21
I.1.1. L’Afrique .....	21
I.1.2. Continent américain.....	22
I.1.3. Asie-Pacifique .....	23
I.1.4. Moyen-Orient et Eurasie .....	23
I.2. L’agent causal .....	24
I.2.1. <i>Plasmodium falciparum</i> .....	24
I.2.2. <i>Plasmodium vivax</i> .....	25
I.2.3. <i>Plasmodium ovale</i> .....	25
I.2.4. <i>Plasmodium malariae</i> .....	25
I.2.5. <i>Plasmodium knowlesi</i> .....	26
I.3. Cycle de vie de <i>Plasmodium</i> .....	26
I.4. Différents types de paludisme .....	28
I.4.1. Accès palustre simple .....	28
I.4.2. Accès palustres graves à <i>Plasmodium falciparum</i> .....	29
I.4.3. Autres types de paludisme .....	30
I.5. Cycle érythrocytaire, digestion de l’hémoglobine et formation du pigment malarique .....	31
I.6. Traitement du paludisme .....	34
I.6.1. Principe général du traitement .....	35
I.6.2. Principaux médicaments .....	36
I.6.3. Quelques antipaludiques en phases cliniques .....	52
I.6.4. Les vaccins dans le traitement du paludisme.....	54
II. LA CHIMIE BIOORGANOMETALLIQUE .....	55
II.1. Introduction.....	55
II.2. Les complexes organométalliques .....	56
II.3. Les métallocènes .....	57
II.3.1. Chiralité des métallocènes .....	58
II.3.2. Le ferrocène.....	58
II.4. Les molécules organométalliques biologiquement actives .....	60
II.4.1. Les premiers médicaments organométalliques .....	60
II.4.2. Les complexes métalliques et les métallocènes dans la conception du médicament ..	61
II.4.3. Conception et synthèse des nouveaux composés métallocéniques.....	68
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	69
CHAPITRE II : SYNTHÈSE ET ACTIVITÉS BIOLOGIQUES ANTIPLASMODIALE ET ANTI-TOXOPLASMIQUE DES 4-AMINO-2-HYDROXYNAPHTHOQUINONES FERROCENIQUES .....	81
I. INTRODUCTION : Développement des 2-hydroxynaphtoquinones .....	83
II. L’ATOVAQUONE ET LA TOXOPLASMOSE.....	84
II.1. Le cycle de reproduction .....	85
II.2. Le traitement de la toxoplasmose.....	86
III. LES HYDROXYNAPHTHOQUINONES DE SYNTHÈSE .....	88
IV. SYNTHÈSE DES HYDROXYNAPHTHOQUINONES FERROCENIQUES.....	91
IV.1. Objectif du travail.....	91
IV.2. Synthèse des aminohydroxynaphtoquinones ferrocéniques.....	92
IV.2.1. Analyse rétrosynthétique de la synthèse des aminohydroxynaphtoquinones ferrocéniques .....	92
IV.2.2. Synthèse des amines ferrocéniques.....	92

## Table des matières

IV.2.3. Synthèse des aminohydroxynaphtoquinones ferrocéniques 22-31 .....	96
V. ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES AMINOHYDROXYNAPHTOQUINONES FERROCENIQUES .....	98
V.1. Activité antipaludique .....	98
V.1.1. Activité antipaludique des AHNQFc 22 - 31 sur W2 .....	98
V.1.2. Activité antipaludique des AHNQFc 22-31 sur des isolats cliniques gabonais .....	100
V.1.3. Activité anti-toxoplasmique .....	106
V.1.4. Activité cytotoxique.....	107
VI. CONCLUSION .....	109
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE .....	110
CHAPITRE III : SYNTHÈSE, ACTIVITÉS ANTIPLASMODIALE ET ANTITUBERCULEUSE IN VITRO DES HYDRAZONES QUINOLEIQUES ET ACRIDINIQUES FERROCENIQUES.....	113
I. INTRODUCTION .....	115
I.1. Etude des dérivés de l'acridine dans le traitement du paludisme .....	115
II. SYNTHÈSE DES HYDRAZONES QUINOLÉIQUES ET ACRIDINIQUES FERROCENIQUES DANS LE TRAITEMENT DU PALUDISME.....	117
II.1. Synthèse des hydrazones ferrocéniques.....	118
II.1.1. Objectif de synthèse.....	118
II.1.2. Synthèse des hydrazones acridiniques et quinoléiques ferrocéniques .....	119
III. ACTIVITÉ ANTIPALUDIQUE <i>IN-VITRO</i> DES HYDRAZONES FERROCÉNIQUES (HFc).....	124
III.1. Résultat des tests effectués sur les souches de <i>P. falciparum</i> .....	124
III.2. Résultat des tests effectués sur des isolats cliniques infectés par <i>P. falciparum</i> ...	126
III.3. Analyse des résultats.....	127
III.4. Conclusion .....	128
IV. LES HYDRAZONES FERROCENIQUES DANS LE TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE.....	129
IV.1. La tuberculose .....	129
IV.2. La tuberculose dans le monde .....	129
IV.3. Le traitement de la tuberculose .....	130
IV.3.1. Antibiotiques antituberculeux essentiels.....	130
IV.3.2. Quelques hydrazones de synthèse dans le traitement de la tuberculose .....	131
IV.4. Activité antituberculeuse des HFCs 50 – 62 .....	132
V. CONCLUSION .....	133
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	134
CHAPITRE IV : SYNTHÈSE ET ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE IN-VITRO DES 4-AMINOQUINOLEINES FERROCENIQUES .....	145
I. INTRODUCTION .....	147
II. LES COMPLEXES METAL-CQ DANS LE TRAITEMENT DU PALUDISME.....	148
III. SYNTHÈSE DES 4-AMINOQUINOLEINES FERROCENIQUES .....	150
III.1. Objectif de travail .....	150
III.1.1. Synthèse des nouveaux 4-aminoquinoléines ferrocéniques (série 1).....	150
III.1.2. Synthèse des 4-aminoquinoléines ferrocéniques de la série 2.....	152
IV. ACTIVITÉ ANTIPALUDIQUE ET CYTOTOXICITÉ IN-VITRO DES 4-AMINOQUINOLÉINES FERROCÉNIQUES .....	155
IV.1. Activité antipaludique <i>in vitro</i> .....	155
IV.1.1. Activité antipaludique des AQFc 68-72 et 81-85 sur des souches de <i>P. falciparum</i> .	155
IV.1.2. Activité antipaludique des AQFc 68-72 et 81-85 sur des isolats cliniques gabonais .	159
IV.2. Activité Cytotoxique .....	160
V. CONCLUSION .....	162
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	163
CHAPITRE V : SYNTHÈSE ET ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE IN-VITRO DES BENZODIAZEPINES FERROCENIQUES .....	165

# Table des matières

I. INTRODUCTION .....	167
I.1. Les benzodiazépines.....	167
I.2. Objectif du travail.....	170
II. SYNTHÈSE DES BENZODIAZÉPINES FERROCENIQUES.....	171
II.1. Méthode classique (M1).....	171
II.1.1. Réaction de couplage .....	171
II.1.2. Réaction de déprotection et cyclisation.....	172
II.1.3. Condensation du dérivé ferrocénique.....	174
II.2. Méthode 2 : Réactions sous irradiation micro-onde.....	175
II.2.1. Réaction de couplage-déprotection-cyclisation « one-pot » .....	175
II.2.2. Réaction de condensation des BZDs avec le composé ferrocéniques .....	177
III. ACTIVITÉ ANTIPALUDIQUE ET CYTOTOXICITÉ DES BENZODIAZÉPINES FERROCENIQUES.....	178
IV. CONCLUSION .....	178
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	180
CONCLUSION GÉNÉRALE .....	187
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	191
A. CHIMIE.....	193
I. DÉRIVÉS FERROCENIQUES D'ATOVAQUONE.....	194
I.1. Synthèse des amines ferrocéniques 2 - 5.....	194
I.2. Synthèse des amines ferrocéniques 10 a et b.....	195
I.3. Condensation des amines ferrocéniques sur la 2-hydroxynaphtoquinone : composés 22 - 27 .....	196
II. DÉRIVÉS D'HYDRAZONES FERROCENIQUES .....	198
II.1. Synthèse des aldéhydes ferrocéniques.....	198
II.1.1. Synthèse des précurseurs ferrocéniques .....	198
II.1.2. Synthèse des amines ferrocéniques 32 - 34.....	199
II.1.3. Réaction d'ortholithiation des amines ferrocéniques.....	200
II.2. Synthèse des hydrazines .....	201
II.3. Synthèse des hydrazones .....	201
III. DÉRIVÉS 4-AMINOQUINOLÉINES FERROCENIQUES .....	205
III.1. Synthèse des amines quinoléines.....	205
III.1.1. Synthèse des diamines quinoléines.....	205
III.1.2. Synthèse des triamines quinoléines.....	207
a. Synthèse des tert-butyle alcane carbamates .....	207
b. Synthèses des tert-butyl aminoquinoléïnes carbamates .....	208
c. Synthèse des triamines quinoléines.....	208
III.2. Synthèse des amines quinoléines ferrocéniques .....	209
III.2.1. Synthèse diamines quinoléines ferrocéniques.....	209
III.2.2. Synthèse des triamines ferrocéniques .....	211
IV. DÉRIVÉS BENZODIAZÉPINES FERROCENIQUES.....	213
IV.1. Synthèse des benzodiazépines par la méthode conventionnelle 1 .....	213
IV.1.1. Réaction de couplage .....	213
IV.1.2. déprotection et cyclisation des 88, 91 et 92 .....	214
IV.2. Synthèse des benzodiazépines par irradiation micro-onde .....	215
IV.3. Synthèse des benzodiazépines ferrocéniques .....	215
IV.3.1. Méthode classique 1 .....	215
IV.3.2. Méthode par irradiation micro-onde .....	217
B. PARASITOLOGIE.....	217
RESUME .....	219
SUMMARY .....	219



## ABREVIATIONS

AcOH : Acide acétique  
ACT : Association médicamenteuse à base d' Artémisinine  
ADN: Acide désoxyribonucléique  
Ala : Alanine (A)  
AP: Atovaquone-Proguanil (Malarone ®)  
AQ : Amodiaquine  
Arg : Arginine (R)  
Art: Artémisinine  
ARM: Artéméther  
ARS: Artésunate  
Asn : Asparagine (N)  
Asp: Acide Aspartique (D)  
Atn: Atovaquone (ATV)  
ATP : Adénosine triphosphate  
BCG : Basile Calmette Guérin  
BZD : Benzodiazépine  
CDA : Association Chlorproguanil-Dapsone-Artésunate (LapDap+)  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : Dichlorométhane  
CIM : Concentration inhibitrice minimale  
CQ : Chloroquine  
Cys : Cystéine (C)  
DCC : N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide  
DHFR : Dihydrofolate réductase  
DHOD : Dihydroorotate deshydrogénase  
DIEA : N,N-Diisopropylethylamine  
DMF: N,N-diméthylformylamide  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
DO: Densité optique  
ED50 : Potentiel membranaire  
EDCI : 1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide  
EMB : Etambutol  
EP : Ether de pétrole  
Et<sub>2</sub>O : Ether diéthylique  
EtOH : Ethanol  
Euartekine ® : Association Pipéraquline-Dihydroartémisinine  
FB : Formule brut  
FP-FE(II) : Ferroprotoporphyrine IX (l'hème)  
FP-Fe(III) : Ferroprotoporphyrine IX (hématine)  
FRP : Faire reculer le paludisme  
Fc : Ferrocène  
FQ: Ferroquine  
Gln : Glutamine (Q)  
Glu : Acide Glutamique (E)  
Hf : Halofantrine  
His : Histidine (H)  
HI: Hydrolapachol  
Hz : Hémozoïne

Ile : Isoleucine (I)  
INH : Isoniazide  
K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : Carbonate de potassium  
Leu: Leucine (L)  
LF : Luméfantrine  
Ln : Lapinone  
Lys : Lysine (K)  
MCR : Réactions multicomposants  
Me : Méthyl  
MeOH : Méthanol  
Met : Méthionine (M)  
MF : Méfloquine  
MM : Masse moléculaire  
Mn : Ménoctone  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Sulfate de sodium  
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide hydrogénase  
Nu : Nucléophile  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
PANDA : Association Pyronaridine-Artésunate  
PCl<sub>5</sub> : Pentachlorure de phosphore  
*P. f.* : *Plasmodium falciparum*  
*Pf*GAPDH : *P. falciparum* glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase  
Pgh1 : P-glycoprotéine homologue  
*Pfmdr* : *P. falciparum* multidrug resistance  
*Pf*NHE : *Plasmodium falciparum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger  
*Pf*ert : *P. falciparum* chloroquine résistance transporter  
Phe : Phénylalanine (F)  
PIB : Produit intérieur brut  
pLDH : *Plasmodium* lactate dehydrogenase  
Pn : Parvaquone  
PPM : Membrane Plasmique Parasitaire  
PVM : Membrane Parasitophore Vacuolaire  
QN : Quinine  
RBC : Globule Rouge du Cytosol  
Rdt : Rendement  
RE : Réticulum endoplasmique  
Ser : Sérine (S)  
SERCA : Sarcoplasmique/réticulum endoplasmique Ca<sup>2+</sup>  
SOCl<sub>2</sub> : Chlorure de thionyle  
*t*-BuLi : Tertiobutylolithium  
TFA : Acide trifluoroacétique  
THF : Tétrahydrofurane  
Thr : Thréonine (T)  
Tyr : Tyrosine (Y)  
Val : Valine (V)  
VD : Vacuole Digestive  
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine  
VP : Vacuole parasitophore

# **INTRODUCTION GENERALE**



## Introduction générale

---

Le paludisme demeure jusqu'à présent, un problème de santé publique majeur dans le monde. En effet, plus de la moitié de la population mondiale est exposée au risque de contracter la maladie. Le paludisme est causé par un parasite, le *Plasmodium*, et transmis à l'homme par la pique d'un moustique (anophèle femelle). C'est en Afrique Subsaharienne, qu'est enregistré le maximum de décès, soit près de 89% de la population mondiale à risque. La mortalité palustre, actuellement estimée à plus d'un million de décès par an, touche surtout les enfants de moins de 5 ans, les femmes enceintes et les adultes non immuns. *Plasmodium falciparum* est l'espèce parasitaire responsable des mortalités liées au paludisme. Le Gabon, situé dans la partie Centre-Ouest de l'Afrique, de par son climat tropical chaud et humide, regroupe les conditions propices au développement du parasite. Ainsi, les cinq espèces infectant l'homme sont présentes dans tout le pays, mais *P. falciparum* est majoritairement rencontré. Depuis la découverte des premières souches résistantes aux antipaludiques, dans les années 1960, *P. falciparum* ne cesse de développer d'autres formes de résistances, voire même des multirésistances, par des mutations de certains de ces génomes, rendant ainsi difficile le traitement du paludisme. En effet, la chloroquine, premier antipaludique de synthèse le plus utilisé et plus actif, a connu des échecs thérapeutiques repartis dans le monde entier.<sup>1</sup>

La toxoplasmose, une autre maladie parasitaire affectant l'homme, est due à un protozoaire du genre *Toxoplasma gondii*. Ce protozoaire est rencontré à presque tous les stades de la chaîne alimentaire, mais son hôte définitif est le chat ainsi que tous les félinés. L'homme s'infecte en mangeant de la viande mal/non cuite, des légumes mal lavés, en buvant de l'eau souillée et du lait non pasteurisé, mais surtout au contact des excréments présents dans la litière du chat. La toxoplasmose est en soit une maladie asymptomatique. Cependant, elle est très dangereuse pour les femmes enceintes, plus précisément pour l'enfant qu'elle porte. En effet, lorsqu'il est transmis à l'enfant, *T. gondii* peut entraîner des malformations et donc l'enfant naîtra avec des séquelles ; mais son action peut aussi être plus grave et aller jusqu'à la mort du fœtus. La toxoplasmose constitue une maladie majeure opportuniste pour les sujets immunodéprimés (VIH, greffés), mais également un problème de santé majeur surtout chez les sidéens des pays en voie de développement. Le traitement de la maladie repose sur l'administration d'antibiotiques ou d'autres molécules à action antiparasitaire. Et pour des patients allergiques aux sulfamides, l'atovaquone apparaît comme étant le médicament de choix.<sup>2</sup> L'effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* de l'atovaquone sur *T. gondii* a bien été démontré à de très faibles concentrations.<sup>3,4</sup> De plus, l'utilisation de l'atovaquone comme simple agent, dans le traitement des infections dues à *P. falciparum*, présentait une forte efficacité. Cependant, très rapidement, il a été associé à un taux trop important de rechute.<sup>5,6</sup> En association avec le proguanil, l'atovaquone demeure très actif.<sup>7</sup> Cette association (AP), est commercialisée sous le nom de Malarone®. Ce dernier est actuellement le meilleur médicament antipaludique utilisé dans le traitement prophylactique du paludisme. Cependant, son utilisation profite uniquement aux voyageurs et non aux populations autochtones car non seulement son prix est très élevé, mais aussi et surtout qu'il n'est utilisé que pour des séjours de courtes durées (trois mois maximum).

---

<sup>1</sup> Spencer, H. C. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1985**, 79, 748 – 758.

<sup>2</sup> Meneceur, P. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 1269 – 1277.

<sup>3</sup> Araujo, F. G.; Huskinson, J.; Remington, J. S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, 35, 293 – 299.

<sup>4</sup> Romand, S.; Pudney, M.; Derouin, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37, 2371 – 2378.

<sup>5</sup> Chiodini, P. L. et al. *J. Antimicrob. Chemother.* **1995**, 36, 1073 – 1078.

<sup>6</sup> Looareesuwan, S. et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1996**, 54, 62 – 66.

<sup>7</sup> Watt, G. J. *Infect. Dis.* **2000**, 181, 405.

## Introduction générale

---

Suite à la recrudescence des résistances aux antiparasitaires (*Plasmodium* et *Toxoplasma*), plusieurs chercheurs, chimistes et parasitologues, travaillent en collaboration pour tenter de trouver des molécules très efficaces et accessibles à tous.

La pharmacomodulation des molécules biologiquement actives par l'introduction d'une entité organométallique apparaît comme une alternative très intéressante capable de pallier ces problèmes. En effet, la Ferroquine (introduction du ferrocène dans la chaîne alkyle latérale de la molécule de la chloroquine) et le Ferrocifène (analogue ferrocénique du tamoxifène) illustrent bien l'apport important de la chimie bioorganométallique.

Suite au succès rencontré par la chimie bioorganométallique, à l'apparition d'éventuelles souches de résistance et au coût trop élevé des molécules antipaludiques, nos travaux ont ainsi été orientés vers la synthèse de nouveaux dérivés ferrocéniques. Notre choix a aussi été de réaliser des synthèses simples comportant peu d'étapes.

Une première étude s'est portée sur les dérivés de l'atovaquone avec pour but de se rapprocher de la structure chimique de l'atovaquone afin d'améliorer son efficacité antiplasmodiale et antitoxoplasmique par la synthèse des dérivés aminohydroxynaphtoquinones ferrocéniques. Une première série de ces dérivés avait déjà été synthétisée dans notre laboratoire et leur activité biologique antiparasitaire étudiée. En effet, parmi les aminohydroxynaphtoquinones précédemment synthétisées et testées sur des souches de *P. falciparum* et *T. gondii*, trois d'entre elles étaient très actives sur des souches résistantes de *T. gondii*, mais moins actives que l'atovaquone sur *P. falciparum*. En conservant la partie aminohydroxynaphtoquinone ferrocénique (communes aux molécules précédentes), nous avons modifié la nature des substituants sur l'azote tertiaire permettant ainsi un rapprochement de la structure de l'atovaquone. L'étude de leur activité biologique sur des souches de laboratoire et cliniques de *P. falciparum*, de *T. gondii* et sur des lignées cellulaires a également été menée.

La seconde étude concernait les hydrazones quinoléiques (HQ) et acridiniques (HA). L'équipe de Campiani,<sup>8,9</sup> obtinrent des résultats très satisfaisants de l'action d'hydrazones sur des souches chloroquino-résistantes de *P. falciparum*. Les HQ et HA se sont effectivement montrées plus actives que la CQ. Ainsi, en combinant les squelettes hydrazines quinoléiques et acridiniques et le ferrocène carboxaldéhyde substitué par une fonction amine, nous avons synthétisé des hydrazones ferrocéniques acridiniques (HFcAs) et quinoléiques (HQFcs). Une variation des groupements aminés a été apportée sur le squelette ferrocénique. Ces hydrazones ferrocéniques ont été par la suite testées *in vitro* sur des souches de laboratoire et des isolats cliniques infectés par *P. falciparum*.

Sachant que les hydrazones constituent une importante classe de composés dans le développement de médicament. Savini et al.<sup>10</sup> publient des résultats de l'étude des hydrazones quinoléiques et acridiniques en traitement antituberculeux. C'est dans cette même optique que nous avons également réalisé des tests d'activités des HQFcs et HAFcs sur une souche de tuberculose (*M. tuberculosis*).

Les analyses des résultats obtenus pour les hydrazones ferrocéniques précédemment synthétisés nous ont orientés vers la synthèse de nouveaux dérivés 4-aminoquinoléiques ferrocéniques (AQFcs). L'originalité de ces molécules repose sur la présence d'un hétérocycle azotée saturée et d'un ferrocène en bout de chaîne. Une chaîne carbonée linéaire de longueur variable a été également insérée entre le cycle quinoléique et l'hétérocycle. Les activités de ses molécules ont été également étudiées sur des isolats cliniques gabonais infectés par *P.*

---

<sup>8</sup> Gemma, S. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5384 – 5388.

<sup>9</sup> Fattorusso, C. et al. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1333 – 1343.

<sup>10</sup> Savini, L. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2193 – 2198

## Introduction générale

---

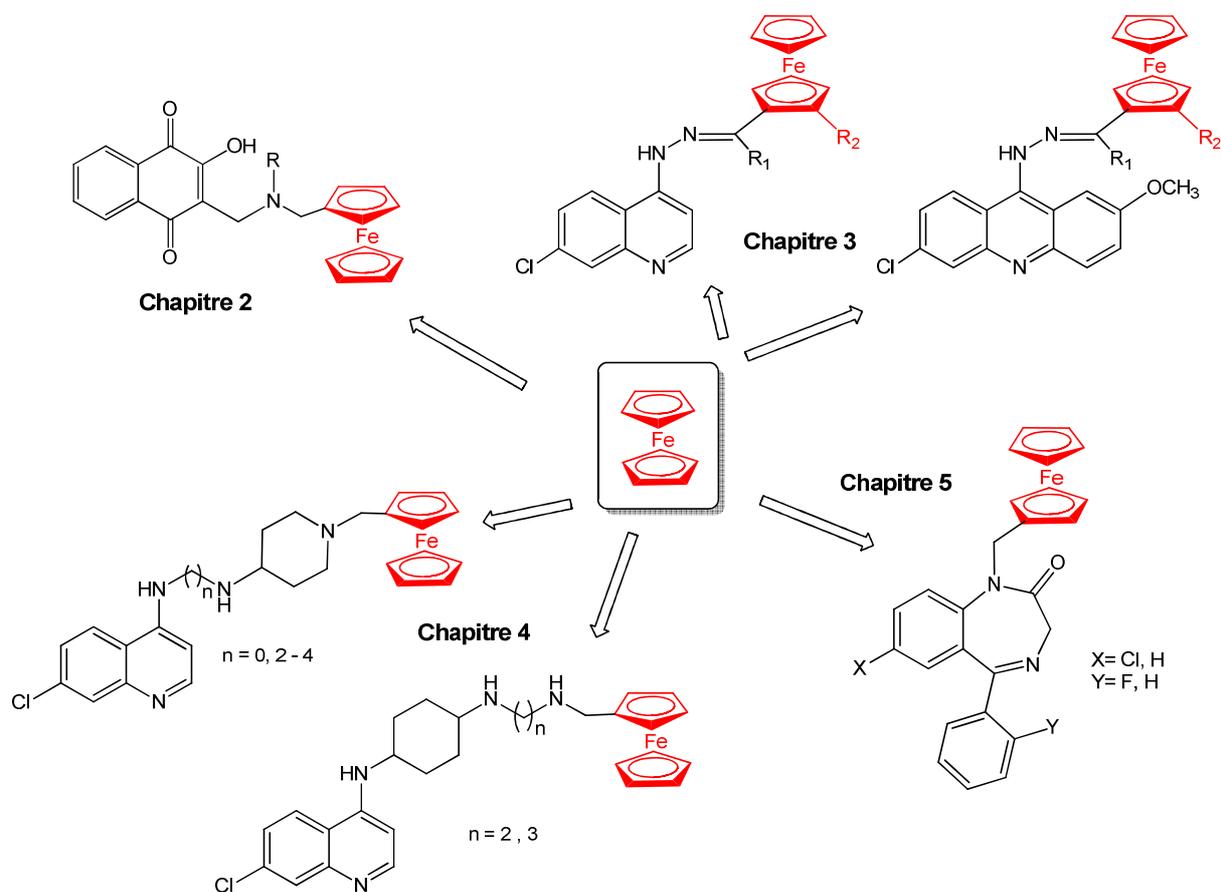
*falciparum* et sur des souches de laboratoire de *P. falciparum*. L'effet cytotoxique de ces AQFCs a été analysé sur des cellules épithéliales de rein de singe Véro.

Suite à la récente découverte de l'activité antiplasmodiale des benzodiazépines, plus précisément du flurazepam, nous nous sommes intéressés à cette classe de composés. Tout en conservant le motif benzodiazépine du Flurazepam, nous avons modifié la partie aminoéthyle par l'introduction du motif ferrocénique. Une première partie de cette étude s'est limitée à l'optimisation de leur synthèse du squelette benzodiazépine. Deux méthodes ont alors été exploitées dont la première s'est effectuée par synthèse multi-étape et la seconde par irradiation micro-onde. Comme les précédentes molécules, l'activité antiplasmodiale de ces benzodiazépines ferrocéniques a été réalisée.

# PLAN DU MANUSCRIT

Le travail de cette thèse se divise en cinq chapitres :

Dans le premier chapitre, est présenté le paludisme dans sa généralité incluant l'apport considérable de la chimie bioorganometallique dans la lutte contre les souches résistantes. Les quatre chapitres suivants traitent des travaux propres à cette thèse. Ainsi, dans le chapitre deux est abordée la synthèse des aminohydroxynaphtoquinones dans le traitement du paludisme et de la toxoplasmose. L'étude des hydrazones quinoléiques et acridiniques ferrocéniques dans le traitement du paludisme et de la tuberculose est abordée dans le chapitre trois. Le quatrième chapitre présente les nouveaux dérivés 4-aminoquinoléines ferrocéniques antiplasmodiales. Enfin, le dernier chapitre traite de la synthèse des benzodiazépines ferrocéniques par irradiation micro-onde et leur activité antiplasmodiale.



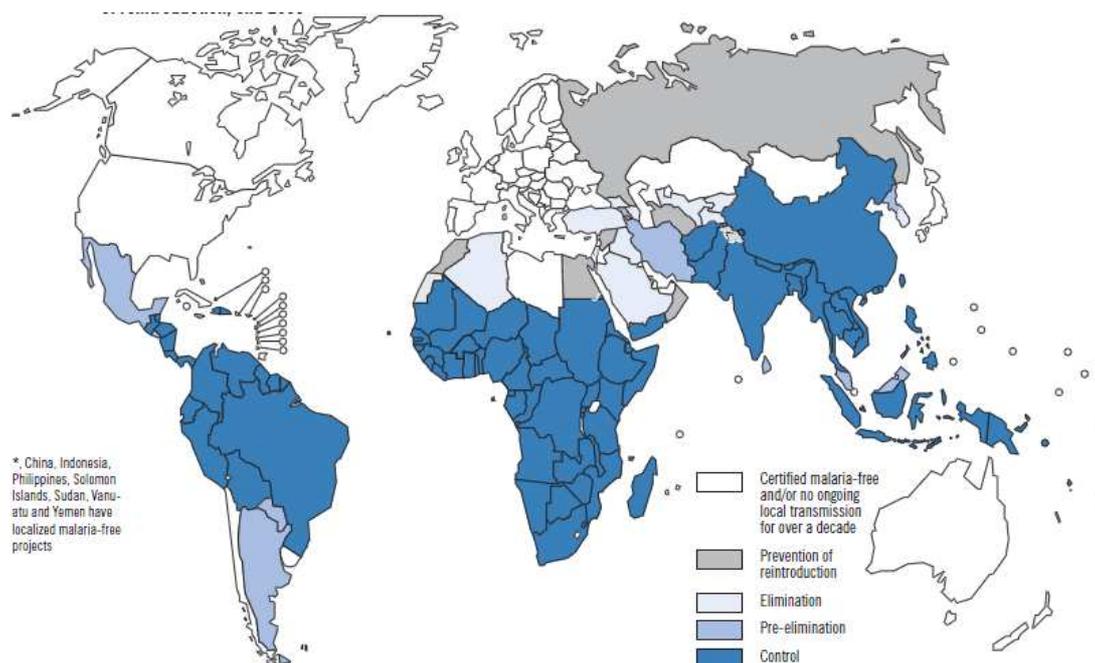
**CHAPITRE I : LA CHIMIE  
BIOORGANOMETALLIQUE DANS LE TRAITEMENT  
DU PALUDISME**



## I. LE PALUDISME

Le paludisme ou malaria (de l'italien mal'aria, mauvais air), est une parasitose due à un protozoaire transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique (l'anophèle), provoquant des fièvres intermittentes.

### I.1. situation mondiale



**Figure 1 :** Paludisme, répartition mondiale actuelle, OMS 2009.<sup>1</sup>

Le paludisme est à la fois, l'une des principales maladies mortelles, touchant particulièrement les enfants et également un important facteur de pauvreté dans le monde. Quasiment 50% de la population mondiale est menacée par le paludisme : 3,3 milliards de personnes réparties dans 109 pays (Figure 1). En 2008, le paludisme a touché entre 231 millions de personnes et provoqué la mort d'environ 826 000 personnes dont 89 % en Afrique, 6 % en Méditerranée orientale et 5 % en Asie du Sud-Est.<sup>2</sup> En 2008, le paludisme était présent dans 108 pays ou territoires. Parmi tous ces décès, les enfants de moins de 5 ans ainsi que les femmes enceintes et les adultes non immuns sont les plus touchés.

#### I.1.1. L'Afrique

En Afrique, il y a 50 pays en zones impaludées, dont quarante-sept sont situés en Afrique subsaharienne où se trouve la plus grande partie du fardeau mondial du paludisme et

<sup>1</sup> World malaria report 2009. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901_eng.pdf). Consulté le 25 avril 2011.

<sup>2</sup> Organisation Mondiale de la Santé (OMS), <http://www.who.int/topics/malaria/fr/index.html>. Consulté le 25 avril 2011.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

---

les trois autres sont dans la partie Nord. Ils n'ont qu'une transmission résiduelle du paludisme et des rares cas d'importation. Ainsi, sensiblement 694 millions de personnes sont susceptibles d'avoir le paludisme dans les pays africains, ce qui représente 21% de la population mondiale à risque. Le Nigeria et la République Démocratique du Congo représentent 30% de la population totale à risque dans cette région.<sup>1</sup> En Afrique Subsaharienne, certaines parties à risque où l'infection est fréquente sont à transmission élevée (environ 86%). La population, dans ces zones, développe une prémunition. De ce fait, les enfants et les femmes enceintes ont un risque élevé de développer des symptômes sévères ou de mourir du paludisme. Tous les ans, près de 25 millions de femmes africaines en tombant enceintes risquent de contracter un paludisme dû à *Plasmodium falciparum* durant leur grossesse.<sup>3</sup> D'autres parties de l'Afrique subsaharienne ont plutôt un paludisme instable et faible. Dans ce contexte, peu d'individus développent une prémunition, de sorte que les adultes aussi bien que les enfants ont un risque élevé de contracter le paludisme. Le moustique *Anophèle gambiae*, hautement efficace en tant que vecteur principal de *P. falciparum* est prédominant en Afrique. Bien que la transmission de *P. vivax* ne doive pas être négligée, on estime qu'environ 98 % des cas en Afrique sont dus à *P. falciparum*.

L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) estime que le nombre de cas a augmenté de 173 millions en 2000 à 188 millions en 2005, et de 2005 à 2009, il a diminué à 176 millions.<sup>4</sup> Par contre, le nombre de décès continue de baisser de 900 000 en 2000 à 709 000 en 2009.<sup>4</sup> Aussi, un enfant sur cinq de moins de 5 ans décède à cause du paludisme en Afrique. Le paludisme pendant la grossesse est souvent responsable d'anémie maternelle, d'accouchement prématuré et de faible poids de naissance chez l'enfant, contribuant ainsi à accroître la mortalité infantile. L'infection maternelle sévère contribue de façon significative aux décès maternels en Afrique subsaharienne. Les pays d'Afrique du Nord n'ont que quelques cas importés de paludisme et aucun décès.

## I.1.2. Continent américain

En Amérique, 22 pays sont dit impaludés. Ces pays se situent en Amérique centrale, autour de la forêt amazonienne, dans les Caraïbes, et au sud de l'Amérique du Sud. Environ 137 millions de personnes vivent dans des zones à risque de paludisme. Au niveau mondial, ce chiffre est estimé à environ 4% de la population à risque. On note sensiblement 77 millions de personnes à risque vivant dans des zones de faible transmission et le reste dans des zones où les cas dépassent 1 pour 1 000 habitants. C'est *Plasmodium vivax* qui est l'espèce dominante car elle représente 75% de tous les cas. En effet, Au Mexique et en Amérique centrale, *P. vivax* représente 94% des cas. En outre, *P. falciparum* est présent dans le bouclier guyanais (Guyane française, Guyana et Suriname, soit 40 à 60% des cas), en République Dominicaine et Haïti (près de 100% des cas). Les Amériques ont connu environ 3 millions de cas de paludisme en 2000 (environ 1% de l'incidence mondiale) et 2 400 décès (soit 0,2% des décès mondiaux). Aujourd'hui ces chiffres ont baissé (soit 1 100 cas et 1 300 décès en 2009).<sup>4</sup> Les pays du bassin amazonien supportent l'essentiel du fardeau avec environ 40% des décès en Amérique se produisant au Brésil.

---

<sup>3</sup> Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé 1999, 77, 624 – 640

<sup>4</sup> World malaria report 2010: [http://www.reliefweb.int/rw/lib.nsf/db900sid/EGUA-8C5MGM/\\$file/who\\_world\\_malaria\\_report\\_2010.pdf](http://www.reliefweb.int/rw/lib.nsf/db900sid/EGUA-8C5MGM/$file/who_world_malaria_report_2010.pdf). Consulté le 25 avril 2011.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

---

## I.1.3. Asie-Pacifique

20 pays en Asie du Sud-Est et dans le Pacifique Occidental sont impaludés. Environ 67% de la population mondiale à risque se trouvent dans la région Asie-Pacifique soit 2,2 milliards de personnes susceptibles d'avoir le paludisme. L'Inde, la Chine, l'Indonésie, le Bangladesh, le Vietnam et les Philippines, qui détiennent les plus grandes populations à risque, sont situées dans cette région à risque. En Inde, Indonésie, Birmanie, au Vietnam et au Bangladesh, environ 91% de la population à risque vit dans des zones de forte transmission de *P. vivax* et *P. falciparum*. Des épidémies se produisent fréquemment dans ces pays et sont souvent causées par de grands événements climatiques saisonniers. *P. falciparum* est présent dans tous les pays sauf dans les deux Corée. *P. vivax* par contre, est endémique uniquement dans les 20 pays. En dehors de la Birmanie, de certaines parties de la Papouasie-Nouvelle-Guinée, de l'Indonésie, du Vanuatu, de la République Démocratique du Timor-Leste, des Îles Salomon, du Cambodge, de la République démocratique populaire lao et de certains états de l'Inde où *P. falciparum* continue de sévir, la proportion de paludisme à *P. falciparum* a baissé en Asie du Sud-Est depuis la fin des années 1970.

## I.1.4. Moyen-Orient et Eurasie

En Asie Centrale, Transcaucasie, au Moyen-Orient et sur la frontière Europe-Asie, près de 270 millions de personnes sont à risque de paludisme soit environ 8% de la population mondiale à risque. Cette population est répartie dans 17 pays ou zones impaludés. Seulement 21% de la population à risque sont situés dans des zones de transmission élevée, les 79% restants sont dans des zones de faible transmission. Depuis le début des années 1990, suite à l'affaiblissement des programmes de prévention et de contrôle du paludisme, aux problèmes politiques et socio-économiques, de la migration massive de population et de vastes projets de développement, la transmission a augmenté dans la région. Ainsi, les pays de la région sont classés selon les groupes suivants :

- Du paludisme modéré à élevé en Afghanistan, au Pakistan et au Yémen.
- Du paludisme faible et limité à certaines zones en Iran, Irak et Arabie Saoudite.
- Du paludisme très limité, uniquement dans des foyers résiduels en Azerbaïdjan, Géorgie, Kirghizistan, Tadjikistan, Turquie, Ouzbékistan et en Fédération de Russie.
- Du paludisme inexistant. En effet, depuis 2005, aucun cas de paludisme autochtone (c.-à-d. contracté localement) n'a été rapporté dans la République arabe syrienne. En Arménie et au Turkménistan c'était à partir de 2006. Par contre le Sultanat d'Oman a rapporté ses derniers cas autochtones en 2003 et était exempt de paludisme jusqu'à ce qu'il ait à faire face à une flambée de paludisme en 2007, à partir de cas importés.

L'espèce la plus prévalente est *P. vivax*. Elle se rencontre dans tous les pays impaludés, ce qui n'est pas le cas de *P. falciparum* dont la prévalence varie considérablement d'un pays à l'autre. Effectivement, il est prédominant au Yémen (98% des cas) et en Arabie Saoudite (77%), commun au Pakistan (30-40%) et représente encore une faible part décroissante des cas en Iran, Afghanistan et dans le sud du Tadjikistan.

Au-delà des souffrances que le paludisme cause aux individus, aux familles et aux communautés, la maladie accentue également la pauvreté dans quelques unes des régions les plus pauvres du monde. A elle seule, l'Afrique perd chaque année 12 milliards US\$ en coût

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

---

direct et bien davantage encore en pertes économiques annuelles.<sup>5</sup> Cette maladie, autrefois inéluctable, bat aujourd'hui en retraite. Grâce aux actions concertées et coordonnées des membres du FRP (Faire Reculer le Paludisme), l'accès à la prévention et aux soins ont été facilités de manière significative, réduisant ainsi la maladie dans de nombreux pays. En effet, dans les pays qui sont parvenus à un taux élevé de couverture par l'usage de moustiquaires imprégnées et le recours aux associations médicamenteuses comportant de l'artémisinine (ACT), les cas de paludisme et les décès en découlant ont reculé de 50 %. Ces résultats ont été observés dans des contextes insulaires (Sao Tomé-et-Principe et Zanzibar en République-Unie de Tanzanie) mais également dans certains pays d'Afrique continentale, notamment l'Érythrée, le Rwanda et la Zambie.

## I.2. L'agent causal

Le Paludisme est véhiculé par un moustique du genre Anophèle dont on dénombre 60 espèces vectrices. La survie de l'Anophèle dépend des zones humides pour la phase larvaire du moustique. *Plasmodium* est sensible à la température quand il parasite l'Anophèle. Ainsi, pour se développer normalement le parasite a besoin d'être dans un milieu à température comprise entre 27 et 37°C. Les *Plasmodiums* infectent tous les animaux à sang chaud (oiseaux, reptiles, singes, chimpanzés et rongeurs). Cependant, seules cinq espèces sont pathogènes pour l'homme à savoir : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. knowlesi*.

### I.2.1. *Plasmodium falciparum*

Essentiellement retrouvé en Afrique tropicale, en Asie du Sud-Est, en Amérique centrale et du Sud, il s'agit de l'espèce la plus pathogène puisque le paludisme qu'elle occasionne est en général le seul qui puisse entraîner une mortalité importante. Etant l'espèce la plus répandue, elle sévit surtout dans les zones tropicales et sub-tropicales. Il peut être aussi résistant aux médicaments antipaludiques ce qui entraîne une difficulté supplémentaire pour le traitement. Cependant on n'observe pas de rechute lorsque le malade survit et qu'il n'est pas de nouveau infecté.

- *Phase hépatique* : d'une durée de 6 jours, elle se caractérise par l'absence d'hypnozoïtes et donc de reviviscence schizogonique.
- *Phase érythrocytaire* : l'incubation est de 7 à 15 jours, sa durée de vie est de 12 mois maximum. *P. falciparum* parasite toutes les hématies. La schizogonie érythrocytaire dure habituellement 48 heures et s'effectue dans les capillaires profonds (viscéraux, encéphaliques) où les érythrocytes infestés sont séquestrés du fait de leur adhérence à l'endothélium. Cette séquestration protège le parasite du passage dans la rate, site majeur de destruction. Contrairement aux autres espèces, les gamétocytes n'apparaissent jamais avant le 10<sup>ème</sup> jour de parasitémie.

---

<sup>5</sup> <http://www.rollbackmalaria.org/gmap/part1-fr.pdf>. Consulté le 25 avril 2011

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

---

## I.2.2. *Plasmodium vivax*

Les études qui lui sont consacrées sont de moindre ampleur que celles consacrées à *P. falciparum* : à cause de son manque de létalité, mais également de l'impossibilité de maintenir en culture continue ses stades érythrocytaires. Des études récentes ont montré que *P. vivax* n'est pas si anodin. En effet, des formes graves, voire mortelles ont été rapportées récemment en Inde et en Amazonie.<sup>6</sup>

- *Phase hépatique* : il existe deux types de schizogonies tissulaires, l'une immédiate de 8 jours, l'autre retardée et à déclenchement périodique, due à l'existence d'hypnozoïtes. La persistance du parasite au niveau hépatique est à l'origine de rechutes plusieurs années après l'inoculation du sporozoïte. La latence étant fonction de la souche, la longévité de *P. vivax* peut atteindre ou dépasser 2 ans.
- *Phase érythrocytaire* : *P. vivax* parasite surtout les globules rouges jeunes et la parasitémie dépasse rarement 2%. Il induit une altération de la membrane des globules rouges infectés. Cependant, contrairement à *P. falciparum*, ces modifications n'entraînent pas de propriétés de cytoadhérence. La schizogonie dure 48 heures, ce qui correspond au rythme des accès tierces.

## I.2.3. *Plasmodium ovale*

Moins courant que les deux autres et moins dangereux que *Plasmodium falciparum*, il est responsable de la fièvre tierce bénigne. Très proche de *P. vivax* avec lequel on l'a longtemps confondu, ses caractéristiques en font une espèce à part entière qui parasite l'homme dans les régions où *P. vivax* est rare ou absent. Il est endémique principalement en Afrique de l'Ouest, aux Philippines, en Indonésie orientale, et en Papouasie-Nouvelle-Guinée.<sup>7</sup>

- *Phase hépatique* : la période de prépatence, de 9 jours, est sensiblement la même que celle de *P. vivax*. De plus, comme chez *P. vivax*, c'est l'existence d'hypnozoïtes qui explique les accès à distance d'une piqûre infectante.
- *Phase érythrocytaire* : comme pour *P. vivax*, la schizogonie dure 48 heures, et ce sont préférentiellement les hématies jeunes qui sont parasitées.

## I.2.4. *Plasmodium malariae*

En dépit de sa large répartition sur toute la planète, *P. malariae* ne provoque que des « accès paludiques bénins ». Il est moins dangereux que les autres espèces de *Plasmodium*. *P. malariae* cause une infection durable et chronique qui, dans certains cas, peut durer la vie entière. Il arrive parfois qu'il soit responsable de complications sérieuses telles que le syndrome néphrotique.

- *Phase hépatique* : le développement hépatique est lent, de 15 jours. Des rechutes existent 20 ans et même plus après le départ d'une zones d'endémie. Elles seraient le fait de formes érythrocytaires latentes, s'exprimant à l'occasion d'une agression, telle une splénectomie.

---

<sup>6</sup> Daniel-Ribeiro, C. T.; Lacerda, M. V.; Oliveira-Ferreira, J. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **2008**, *101*, 243 – 248.

<sup>7</sup> Baird, J. K.; Offman, S. L. *Clinical Infectious Diseases*, **2004**, *39*, 1336 – 1345.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

- *Phase érythrocytaire* : la schizogonie dure 72 heures, d'où le nom de fièvre quarte des accès intermittents. Dans cette espèce, ce sont les vieilles hématies qui sont parasitées (parasitémie généralement de 1 à 2 %).

## I.2.5. *Plasmodium knowlesi*

Une cinquième espèce appelée *P. knowlesi* a été retrouvée comme infection humaine à fièvre quarte à Bornéo. Ce parasite est à l'origine responsable d'infection chez le singe. Son évolution est potentiellement grave ; de ce fait, elle doit être traitée comme *P. falciparum*.

Tout dernièrement, des cas sporadiques de paludisme à *P. knowlesi* ont été signalés chez des voyageurs revenant de zones forestières de l'Asie du Sud-Est. Ce sont les moustiques du groupe *Anophèles leucosphyrus* qui transmettent ce type de « paludisme simien ». C'est un paludisme qui touche normalement le macaque crabier (ou macaque à longue queue), le macaque à queue de cochon et le semnopithèque malais. Des personnes peuvent être infectées lorsqu'elles séjournent dans les forêts humides de l'Asie du Sud-Est (ou à la lisière de ces forêts), à la portée des singes hôtes et du moustique vecteur de l'infection. Le risque d'infection concerne principalement le Cambodge, la Chine, l'Indonésie, le Laos, la Malaisie, le Myanmar, les Philippines, Singapour, la Thaïlande et le Vietnam. *P. knowlesi* a un cycle de vie de 24 h. Il peut entraîner des pics de fièvre quotidiens 9 à 12 jours après l'infection et ses symptômes sont parfois atypiques. Des défaillances organiques peuvent survenir et des cas mortels sporadiques ont été décrits. Il n'existe ni formes hépatiques persistantes ni risque de rechute pour *P. knowlesi*.

## I.3. Cycle de vie de *Plasmodium*

Le cycle de vie du parasite nécessite deux hôtes (Figure 2) : l'être humain (hôte intermédiaire) où a lieu la multiplication asexuée et l'anophèle femelle (hôte définitif) où se produit la fécondation.

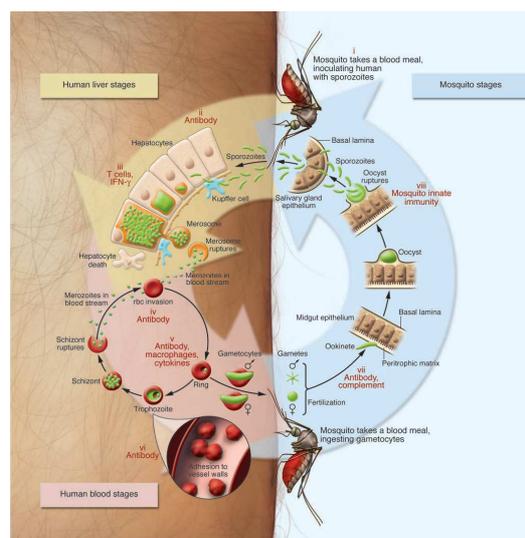


Figure 2 : Cycles de vie sexuée et asexuée de Plasmodium.<sup>8</sup>

<sup>8</sup> Greenwood, B. M. et al. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 1266 – 1276.

## Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

---

Lors de son repas sanguin, le moustique anophèle femelle infecté par *Plasmodium*, l'injecte à l'homme sous forme de sporozoïtes. En moins de 30 minutes, ce dernier va atteindre le foie via la circulation sanguine et envahir les cellules hépatiques.<sup>9</sup> Le sporozoïte s'y multiplie par schizogonie pendant 5 à 7 jours pour donner un schizonte hépatique contenant des milliers de cellules infectantes, les mérozoïtes. C'est la phase pré-érythrocytaire ou exo-érythrocytaire. C'est durant cette phase que certaines espèces telles que *P. vivax* et *P. ovale* vont survivre sous une forme de latence dans l'organisme sans pourtant révéler de gouttes épaisses positives.

En effet, chez *P. vivax* et *P. ovale*, il existe une phase appelée dormante. Elle est due au fait qu'un certain nombre de sporozoïtes ayant colonisés parfaitement l'hépatocyte, ne se développent pas immédiatement pour former le schizonte hépatique.<sup>8</sup> Durant cette phase, 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, vont entrer en développement pour provoquer des accès récurrents de paludisme. Bien que *P. malariae* puisse persister pendant des dizaines d'années sous forme d'une infection asymptomatique, lors de l'étape sanguine asexuée, il ne donne pas d'hypnozoïtes.<sup>8</sup>

Après maturation (8 à 10 jours), le schizonte hépatique éclate pour libérer plus de 10 000 mérozoïtes dans la circulation sanguine. Ces derniers vont envahir les globules rouges et initier un cycle érythrocytaire de 48 heures. Certains mérozoïtes hépatiques sont contenus dans des mérosomes permettant leur transport dans le sang.<sup>10</sup> Les mérosomes s'accumuleraient dans les capillaires pulmonaires où la circulation sanguine est ralentie. Dans l'hématie colonisée, un mérozoïte va se différencier en anneau, puis en trophozoïte. Le trophozoïte va subir plusieurs divisions nucléaires et donner un schizonte érythrocytaire contenant un nombre variable de mérozoïtes selon les espèces : c'est le cycle intraérythrocytaire. L'hématie éclate ensuite et les mérozoïtes (parasites infectieux) sont libérés dans le sang où ils peuvent envahir de nouveaux érythrocytes. C'est l'éclatement des hématies infectées qui est responsable des symptômes de la maladie : fièvre, frissons, puis anémie progressive. Lors d'une infection à *P. falciparum*, 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. Lorsqu'une femme enceinte primipare est infectée, la grossesse est à haut risque pour l'enfant (mort prématurée, retard de croissance).

Après 9 à 11 jours, certains mérozoïtes envahissent les globules rouges, puis au bout de 24 h, sont séquestrés dans la moelle osseuse ou la rate où ils vont se différencier en formes sexuées, les gamétocytes mâles et femelles.<sup>11</sup> Les parasites restent vivants sous cette forme pendant une vingtaine de jours. Renaud Lacroix a montré en 2005, suivant un mécanisme qui n'est pas encore élucidé, que la présence de gamétocytes dans le sang de l'hôte pouvait attirer encore plus le moustique.<sup>12</sup>

L'anophèle femelle en piquant à nouveau l'homme pour se nourrir, ingère les gamétocytes mâles et femelles où ils vont se différencier dans l'estomac en 8 gamètes mâles et un gamète femelle. Une demi-heure après la pique, les gamètes mâles et femelles vont donner naissance à un zygote : c'est la fécondation. Le zygote formé va se transformer en un

---

<sup>9</sup> Yuda, M.; Ishino, T. *Cell. Microbiol.* **2004**, *6*, 1119 – 1125.

<sup>10</sup> Baer, K. et al. *Plos. Pathog.* **2007**, *3*, 1651 – 1668.

<sup>11</sup> Diebner, H. H. et al. *J. Theor. Biol.* **2000**, *202*, 113 – 127.

<sup>12</sup> Lacroix et al. *Plos. Biol.* **2005**, *3*, 1550 – 1553.

ookinète mobile. Environ une heure après le repas sanguin, l'ookinète va traverser l'épithélium endoplasmique en envahissant les cellules épithéliales. Celles-ci deviennent apoptotiques et sont expulsées de l'épithélium endoplasmique.<sup>13</sup> L'ookinète va ainsi s'installer sous la lame basale de l'épithélium et se développer en oocyste jeune. A l'intérieur de cet oocyste, des milliers de sporozoïtes se forment par sporulation pour donner un oocyste mature (Figure 3). Ces sporozoïtes vont perforer la coque de l'oocyste et migrer vers les glandes salivaires par chimiotactisme. Ils sont ainsi prêts à être transmis au prochain individu lors du prochain repas sanguin.

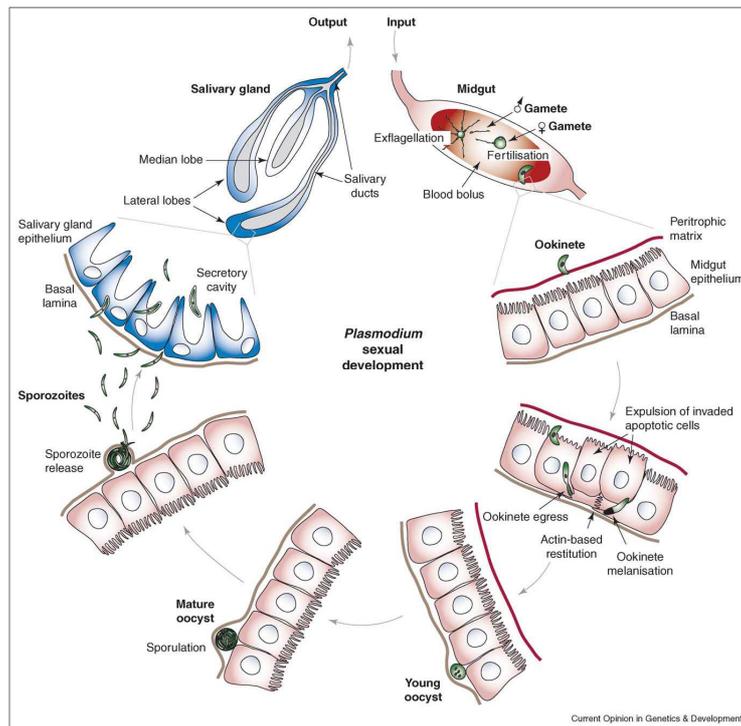


Figure 3 : Cycle de vie sexué du *plasmodium* dans l'anophèle femelle.<sup>13</sup>

## I.4. Différents types de paludisme

En général, seul *Plasmodium falciparum* est responsable des complications graves.

### I.4.1. Accès palustre simple

Juste après le retour d'une zone d'endémie, la « crise de paludisme » ou « accès palustre », peut être suspectée. Elle est caractérisée par des accès fébriles dont une fièvre à plus de 40°C, des frissons, suivis d'une chute de température accompagnée de sueurs abondantes et d'une sensation de froid. On distingue la fièvre tierce (survenant tous les trois jours) de la fièvre quarte (survenant tous les quatre jours). *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale* sont responsables de la fièvre tierce bénigne, *Plasmodium falciparum* de la fièvre tierce maligne et *Plasmodium malariae* de la fièvre quarte. La néphrite quartane survient après des

<sup>13</sup> Vlachou et al. *Cur. Opin. Genet. Develop.* **2006**, 16, 384 – 391.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

---

années d'infection chronique par l'espèce *Plasmodium malariae*. Elle ne répond pas toujours aux traitements antipaludiques ni aux corticoïdes ainsi qu'aux médicaments cytotoxiques. En effet, *P. malariae*, qui est susceptible d'entraîner une infection à répétition (ou chronique) attaquant les glomérules, est à l'origine du syndrome néphrotique par la dissolution de complexes immunitaires (associations anticorps-antigène). Par contre, tous les sujets présentant une infection répétée par *Plasmodium malariae* ne présentent pas une atteinte rénale.

## I.4.2. Accès palustres graves à *Plasmodium falciparum*

Le neuropaludisme, l'anémie grave et la détresse respiratoire sont les trois formes prédominantes. Les facteurs de gravité sont le neuropaludisme (profondeur du coma, convulsions répétées, âge < 3 ans) et l'hypoglycémie attribuée au paludisme. En zone d'endémie, plus de 90 % des décès sont observés chez des enfants.

### a. Paludisme cérébral ou neuropaludisme

Le neuropaludisme est aussi appelé paludisme cérébral à cause de l'obstruction des capillaires du cerveau par les hématies parasitées. Il est associé à une élévation importante de la température (40°C) et un coma (d'une durée souvent supérieure à 30 minutes). Il est de mauvais pronostic malgré le traitement. La mortalité s'élève parfois à 20 % chez les adultes et 15 % chez les enfants. L'apparition d'un tel paludisme sévère peut être soit progressive soit brutale.

### b. Le paludisme chez la femme enceinte

Une mère peut transmettre le parasite à l'enfant qu'elle porte. Ainsi, cette infection du placenta par *P. falciparum* se traduit par un faible poids de naissance, tout particulièrement chez les primipares (premier accouchement). Il peut arriver que les femmes enceintes ne présentent pas de signes alors que les parasites qui envahissent les globules rouges de la circulation, et plus précisément de la petite circulation du placenta, sont présents. Cela est dû à la faible parasitémie. Dans les zones d'hypo ou de méso-endémie (transmission instable), les femmes enceintes présentent des infections sévères associées à de fortes parasitémies avec une anémie, une hypoglycémie et des œdèmes des poumons. La grossesse est alors émaillée de problèmes tels que des contractions prématurées, d'avortement spontané et de mortalité au moment de l'accouchement.

### c. Le paludisme transfusionnel

C'est un paludisme transmis par l'intermédiaire d'une transfusion sanguine ou après échange d'aiguilles entre individus drogués. *P. malariae* et *P. falciparum* sont le plus souvent mis en cause. Dans ce cas, la période d'incubation est courte car il n'existe pas de cycle pré-érythrocytaire (se déroulant avant l'envahissement des globules rouges). Le paludisme transfusionnel se traduit par les mêmes signes que ceux que l'on observe par le *Plasmodium* en cause. Néanmoins, *P. falciparum* est le plus souvent sévère chez les toxicomanes.

## Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

---

### d. Le paludisme de l'enfant dû à *P. falciparum*

À l'origine d'environ 1 à 3 millions de décès chaque année, cette variété de paludisme touche essentiellement les Africains et s'accompagne de troubles neurologiques avec des convulsions pouvant aller jusqu'au coma, d'hypoglycémie, d'une augmentation du taux d'acidité du sang (acidose métabolique) et d'anémie sévère. Contrairement aux autres formes, le paludisme de l'enfant ne s'accompagne pas ou peu souvent d'une insuffisance rénale ou d'œdème pulmonaire aigu.

### e. Le paludisme et l'infection à VIH/SIDA

Une élévation de la réplication du VIH en cas d'accès palustre concomitant augmente la prévalence de l'infection par le VIH. En cas de traitement, les prévalences de ces deux infections sont diminuées, avec un effet plus important pour le paludisme. Cette synergie néfaste entre ces 2 infections peut en partie expliquer l'importance de la pandémie du VIH en Afrique Subsaharienne et l'extension de plus en plus importante du paludisme. Le caractère opportuniste du paludisme est maintenant reconnu. Il y a en particulier une nette augmentation de la prévalence et de la densité parasitaire moyenne de *P. falciparum* chez les femmes infectées par le VIH par rapport aux femmes séronégatives. La co-infection paludisme/VIH a un effet particulièrement marqué sur le poids de naissance de l'enfant.

### I.4.3. Autres types de paludisme

#### a. Le paludisme grave à *P. vivax*

L'OMS estime le paludisme de *P. vivax* à environ 130 à 390 millions de cas chaque année. Il est retrouvé essentiellement en Asie du Sud-Est (52%), dans les pays de l'Est Méditerranéen (15%), et en Amérique du Sud (13%). Les symptômes sont classiques : frissons, fièvre, malaise, céphalées, myalgies comme pour les autres espèces, mais la fièvre est souvent plus élevée qu'avec *P. falciparum*. L'évolution chronique de *P. vivax* peut durer plusieurs années entraînant une hypoprotidémie (diminution du taux de protéines sériques dans l'albumine), des œdèmes et une perte de poids importante. Une évolution mortelle est possible par anémie sévère, troubles respiratoires, malnutrition, voire coma. Chez la femme enceinte, *P. vivax* est une cause fréquente d'anémie et de réduction du poids de naissance. Comme pour les autres espèces de *plasmodium*, de rares ruptures de rate ont été signalées avec *P. vivax*.

#### b. Le paludisme d'importation

Il existe près de 6 000 cas annuels de paludisme en France métropolitaine, chiffre le plus élevé de toutes les nations industrialisées. Le paludisme d'importation est en constante augmentation chez le voyageur, en grande partie liée aux voyages de personnes issues de l'immigration ayant visité leur pays d'origine (70% des cas). Plus de 90% des paludismes d'importation surviennent chez des voyageurs n'ayant pas observé ou ayant mal suivi les deux groupes de mesures préventives efficaces et complémentaires que sont la protection contre les piqûres de moustiques et la chimioprophylaxie. 90% des cas proviennent d'Afrique subsaharienne, 83% sont dus à *P. falciparum*. Il y a chez l'adulte environ 200 cas

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

de paludismes graves par an en France, avec ictère, troubles de la conscience, hyper parasitémie, défaillance respiratoire. Chez l'enfant, il a été noté dans une étude faite entre 1996 et 2005, 421 formes graves sur 4 150 enfants impaludés avec anémie sévère, coma, prostration, convulsions multiples et troubles de la conscience. L'hyper parasitémie > 4% n'a pas chez l'enfant de valeur pronostique. La mortalité globale est de 4,5 pour mille, la mortalité des formes graves est de 10,5%.

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

Pendant le développement et la reproduction asexuée du *plasmodium* dans l'érythrocyte, près de 65-75 % de l'hémoglobine érythrocytaire sont digérés par le parasite (Figure 4).<sup>14</sup> La question qui se posait était : pourquoi le parasite devait dégrader une telle proportion d'hémoglobine érythrocytaire ? Plusieurs hypothèses ont été proposées.<sup>15, 16</sup> Il avait été démontré que pour la synthèse de ses protéines et son développement, *Plasmodium* a besoin des acides aminés issus de la dégradation de l'hémoglobine.<sup>16</sup> Cependant, des études récentes suggèrent que la fraction d'hémoglobine digérée et utilisée à cette fin est beaucoup moins importante que ce que l'on pensait (environ 16 %).<sup>17</sup> En effet, le parasite acquiert des acides aminés du milieu extracellulaire et les incorpore dans ses protéines.<sup>17, 18</sup> Il expulse en même temps des acides aminés inutiles par de nouvelles voies de perméabilité dans la membrane du globule rouge infecté dont la nature biochimique reste encore mal connue.<sup>19</sup> On peut aussi noter que la digestion en excès d'hémoglobine est nécessaire pour réduire la pression osmotique dans l'érythrocyte infecté et empêcher ainsi la lyse prématurée de la cellule.<sup>20</sup> En plus de contribuer à la régulation de la pression osmotique interne, le phénomène d'échange transmembranaire d'acides aminés, permet d'assurer une provision suffisante de chaque acide aminé, particulièrement ceux qui sont rares dans l'hémoglobine (isoleucine, cystéine, glutamine, méthionine et glutamate).<sup>15, 18</sup>

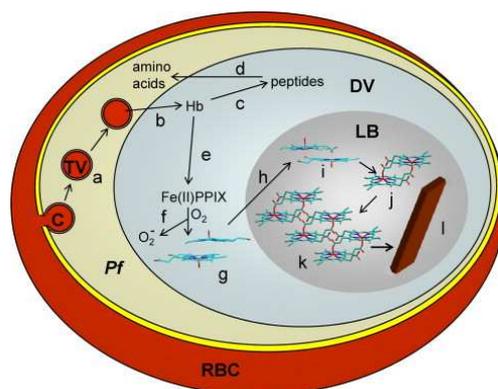


Figure 4 : formation du pigment malarique.<sup>21</sup>

<sup>14</sup> Rosenthal, P. J. *Int. J. Parasitol.* **2004**, *34*, 1489 – 1499.

<sup>15</sup> Francis, S. E. et al. *EMBO J.* **1994**, *13*, 306 – 317.

<sup>16</sup> Rosenthal, P. J. *Curr. Opin. Hematol.* **2002**, *9*, 140 – 145.

<sup>17</sup> Krugliak, M. ; Zhang, J.; Ginsburg. H. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *119*, 249 – 256.

<sup>18</sup> Divo, A. A. et al. *J. Protozool.* **1985**, *32*, 59 – 64.

<sup>19</sup> Kirk, K. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 495 – 537.

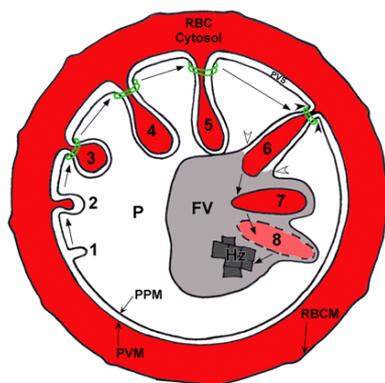
<sup>20</sup> Lew, V. L. et al. *Blood Cells Mol. Dis.* **2004**, *32*, 353 – 359.

<sup>21</sup> Egan, T. J. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, *155*, 127 – 136.

## Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

Durant son cycle intra-érythrocytaire, le parasite est entouré de 3 membranes : la membrane de la vacuole parasitophore (PVM = Parasitophorous Vacuolar Membrane) provenant en partie de l'invagination de la membrane érythrocytaire de l'hôte, de la membrane plasmique parasitaire (PPM = Parasite Plasma Membrane) et de la membrane érythrocytaire. Une fois dans le globule rouge, des cytostomes, formés de l'invagination des membranes plasmique parasitaire et vacuolaire permettent d'ingérer des petites portions d'hémoglobine du cytoplasme érythrocytaire. Les vésicules formées contenant l'hémoglobine sont ensuite transportées vers la vacuole digestive avec laquelle ils fusionnent et où l'hémoglobine est digérée par des protéases parasitaires.<sup>22</sup> La caractérisation biochimique des cytostomes et des vésicules d'endocytose est limitée. Mais l'actine semble jouer un rôle prépondérant. Le transport de l'hémoglobine présenterait des similarités avec la voie endocytique des eucaryotes.<sup>23, 24</sup> Ce nouveau modèle de transport de l'hémoglobine vers la vacuole digestive est illustré dans la Figure 5.

La formation des cytostomes se fait en 3 étapes (Figure 5): (1) invagination de la PVM, (2) suivie de celle de la PPM, (3) formation d'une constriction dense aux électrons autour du cytostome. Les étapes 4 à 6 correspondent à la maturation du cytostome. Ainsi, le cytostome continue à se remplir du cytosol des globules rouges et s'allonge jusqu'à entrer en contact avec la vacuole digestive. La fusion de la membrane de la vacuole digestive et de la membrane externe (plasmique) de la vacuole d'endocytose permet la libération de son contenu dans la vacuole digestive où il peut être digéré après lyse de la membrane interne (parasitophore) (étapes 6 à 8).



**Figure 5** : Nouveau modèle de transport de l'hémoglobine vers la vacuole digestive.<sup>23</sup>

Il est à noter qu'un autre modèle de transport indépendant des vésicules a été proposé par Elliot et al. impliquant quatre processus d'invagination de l'hémoglobine indépendants temporellement, morphologiquement et dont la sensibilité pharmacologique est spécifique.<sup>25</sup>

Une fois dans la vacuole digestive qui est un compartiment acide, l'hémoglobine est digérée par l'action d'une série de protéases parasitaires.<sup>26, 27, 28, 29</sup>

<sup>22</sup> Rosenthal, P. J. ; Meshnick, S. R. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, *83*, 131 – 139.

<sup>23</sup> Lazarus, M. D. ; Schneider, T. G. ; Taraschi, T. F. *J. Cell. Science.* **2008**, *128*, 1937 – 1949.

<sup>24</sup> Hoppe, H. C. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2370 – 2378.

<sup>25</sup> Elliot et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 2463 – 2468.

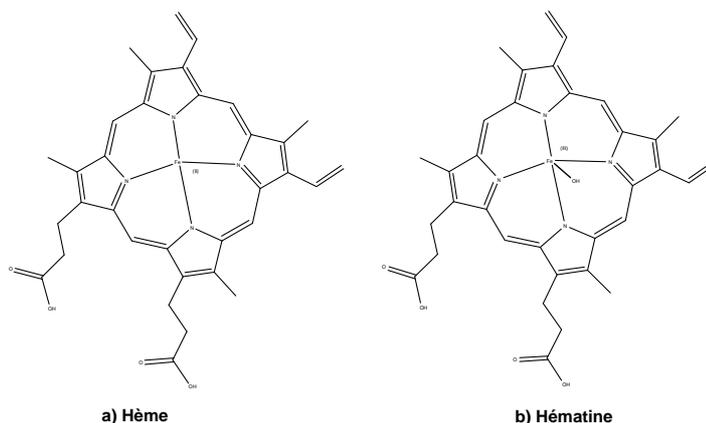
<sup>26</sup> Slomianny, C. *Blood cells*, **1990**, *16*, 369 – 378.

<sup>27</sup> Abu Bakar, N. et al. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 441 – 450.

<sup>28</sup> Rosenthal, P. J.; Meshnick, S. R. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, *83*, 131 – 139.

## Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

Le groupe prothétique, l'hème [ferroprotoporphyrine IX, FP-Fe(II)] est oxydé en hématine [ferriprotoporphyrine IX, FP-Fe(III)] avant de subir un processus de biocrystallisation pour former le pigment malarique (Figure 6). La FP-Fe(III) est une molécule toxique pour le parasite, qui peut catalyser des dégâts oxydatifs aux lipides et protéines.<sup>30, 31</sup> La génération de l'hémozoïne permet au parasite de séquestrer plus de 95% de FP-Fe(III) sous une forme non toxique : c'est la détoxification.<sup>32</sup> Néanmoins, la dégradation de l'hémoglobine et la production de l'hémozoïne représente une vulnérabilité critique pour le parasite.<sup>33, 34</sup>



**Figure 6** : Structures chimiques de l'hème (a) et de l'hématine (b).

Plusieurs techniques spectroscopiques ont été utilisées pour caractériser l'hémozoïne.<sup>35, 36, 37, 38</sup> Ainsi, l'hémozoïne apparaît comme étant chimiquement et spectroscopiquement identique à la  $\beta$ -hématine, formée en chauffant la FP-Fe(III) dans de l'acide acétique à 60°C<sup>35, 39, 40, 41</sup> ou à des températures physiologiques, si une interface appropriée lipide-eau est fournie.<sup>42</sup> La structure de la  $\beta$ -hématine a été étudiée par diffraction radiographique aux rayons X.<sup>43</sup> Ces études ont révélé des motifs de répétitions de dimère FP-Fe(III) avec le fer III de chaque monomère lié au groupement propionate de l'autre.<sup>44</sup> Les études structurales ont également mis en évidence des liaisons hydrogènes, impliquant le maintien des chaînes au niveau des extrémités des groupements propionates avec le cristal. Ces liaisons hydrogènes lient le dimère dans une matrice bidimensionnelle (Figure 7).

<sup>29</sup> Banerjee, R. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 990 – 995.

<sup>30</sup> Becker, K. et al. *Int. J. Parasitol.* **2004**, 34, 163 – 189.

<sup>31</sup> Kumar, S.; Bandyopadhyay, U. *Toxicol. Lett.* **2005**, 157, 175 – 188.

<sup>32</sup> Egan, T. J. et al. *Biochem. J.* **2002**, 365, 343 – 347.

<sup>33</sup> Sullivan, D. J. *Int. J. Parasitol.* **2002**, 32, 1645 – 1653.

<sup>34</sup> Foley, M.; Tilley, L. *Pharmacol. Ther.* **1998**, 79, 55 – 87.

<sup>35</sup> Slater, A. F. G. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, 88, 325 – 329.

<sup>36</sup> Bohle, D. S. et al. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 713 – 716.

<sup>37</sup> Adams, P. A. et al. *J. Inorg. Biochem.* **1996**, 63, 69 – 77.

<sup>38</sup> Webster, G. T. et al. *FEBS Lett.* **2008**, 582, 1087 – 1092.

<sup>39</sup> Fitch, C. D.; Kanjanangulpan, P. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 15552 – 15555.

<sup>40</sup> Sienkiewicz, A. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4534 – 4535.

<sup>41</sup> Wood, B. R. et al. *FEBS Lett.* **2003**, 554, 247 – 252.

<sup>42</sup> Egan, T. J. et al. *FEBS Lett.* **2006**, 580, 5105 – 5110.

<sup>43</sup> Pagola, S. et al. *Nature.* **2000**, 404, 307 – 310.

<sup>44</sup> Klonis, N. et al. *Biochemistry.* **2010**, 49, 6804 – 6811.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

Les interactions qui stabilisent le cristal dans une structure tridimensionnelle ne sont pas encore bien établies.<sup>44</sup>

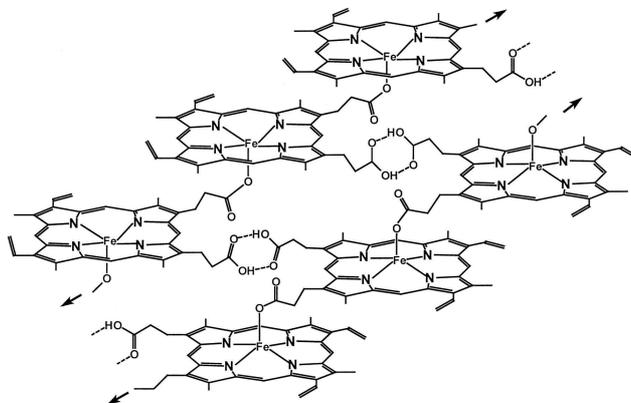


Figure 7 : Structure chimique de la  $\beta$ -hématine.<sup>36</sup>

## I.6. Traitement du paludisme

Le traitement du paludisme est une nécessité pour enrayer l'extension de la pandémie et sauver les populations atteintes et notamment les enfants qui sont les plus touchés. Malheureusement, jusqu'ici, la diversité des schémas thérapeutiques, préventifs ou curatifs, et les méthodes de lutte anti-vectorielle proposées ont rendu difficile l'adoption d'une stratégie de lutte efficace.

Une première stratégie d'éradication, définie par l'OMS de 1955 à 1969 s'est avérée inefficace en dépit des moyens considérables mobilisés et les 10 années qui suivirent furent marquées par l'extension de la résistance des anophèles aux insecticides, par l'apparition de chimio-résistance de *Plasmodium* à la chloroquine, par l'impossibilité de mettre en place un programme d'éradication dans les zones de haute endémie, et même par la résurgence de la maladie dans des zones considérées comme contrôlées.

Depuis 1985, tous les organismes nationaux et internationaux sont en quête d'une nouvelle politique antipaludique. L'OMS a alors proposé une réévaluation de la situation mondiale, jusqu'ici difficile, afin d'assurer le diagnostic et le traitement du paludisme symptomatique, d'abandonner la chimio-prophylaxie de masse et de contrôler, voire d'interrompre la transmission vectorielle.

Actuellement, la lutte contre la maladie repose sur trois principes :

- la lutte contre les piqûres de moustiques :  
par l'utilisation d'insecticides en zones d'endémie, par la distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticides associée à l'information et la sensibilisation des populations les plus touchées
- la recherche et le développement de vaccins,<sup>45, 46, 47</sup> qui se heurtent :  
aux stratégies de *Plasmodium falciparum* pour contourner le système immunitaire,  
à l'existence de différents stades parasitaires au sein du même hôte et la complexité du génome du parasite,  
à l'absence de modèle animal adéquat.

<sup>45</sup> Good M. F.; Doolan D. L. *Immunity* **2010**, *33*, 555 – 566.

<sup>46</sup> Pichyangkul, S. et al. *Vaccine* **2004**, *22*, 3831 – 3840.

<sup>47</sup> Dauvillé, D. et al. *PLoS One*, **2010**, *5*, e15424.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

---

- La recherche et le développement de nouvelles molécules antipaludiques ainsi que l'utilisation de poly-chimiothérapies.

Depuis la découverte du parasite en 1880 par A. Laveran et les premières découvertes empiriques de l'écorce de quinquina en Amérique du Sud ou la découverte de l'artémisinine tirée d'une armoise chinoise, plusieurs centaines de molécules antipaludiques ont été découvertes. Ces molécules peuvent être utilisées soit en prophylaxie soit en curatif mais quasiment toutes rencontrent actuellement des résistances développées par *Plasmodium falciparum*.

L'OMS met actuellement l'accent sur les efforts à mener dans le renforcement des capacités locales et l'utilisation des ressources existantes. Selon elle, en 2003, la médecine traditionnelle est toujours répandue dans les pays en développement.<sup>48</sup>

Les insuffisances d'accès aux soins de la médecine moderne actuelle et les comportements socioculturels font que les populations de ces zones ont toujours recours aux remèdes traditionnels, souvent issus de plantes, pour soigner les infections les plus courantes. Mais, cette médecine se répand également dans les pays industrialisés, avec par exemple l'usage de l'artémisinine et de la quinine dans le cas du traitement du paludisme.

## I.6.1. Principe général du traitement

Un traitement antipaludique doit, en premier lieu, reposer sur des molécules peu onéreuses car elles sont destinées avant tout au traitement de populations pauvres pour qui l'accès au soin n'est pas évident.

Ensuite, le choix du traitement dépend surtout de l'évaluation de la gravité clinique de la maladie, d'où la nécessité d'un diagnostic rapide et pertinent. Le traitement curatif de l'accès palustre doit tenir compte de plusieurs principes :

- Il doit être le plus précoce possible afin de prévenir, lors d'infection à *Plasmodium falciparum*, l'évolution vers un paludisme grave,
- Il doit mettre en balance la toxicité des molécules disponibles et leur efficacité vis-à-vis du parasite, compte tenu de la résistance possible de certains clones.

Il est important de noter qu'en général, les traitements antipaludiques sont plus toxiques que les antibiotiques. L'index thérapeutique est plus étroit mais les effets secondaires sévères restent tout de même rares. Enfin, rappelons que le traitement du paludisme doit nécessairement respecter certaines règles dans le but d'éviter l'émergence des résistances. Il ne faut ainsi traiter que les paludismes clairement diagnostiqués, de façon rapide, en utilisant des doses efficaces. L'OMS préconise actuellement l'utilisation de l'artémisinine et de ses dérivés en association avec d'autres molécules antipaludiques (ACT, Artemisinin based Combination Therapy).

---

<sup>48</sup> OMS, Médecine traditionnelle : <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs134/fr/>, consulté le 29.09.10

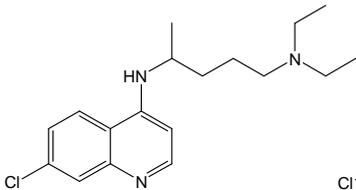
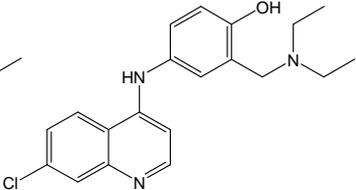
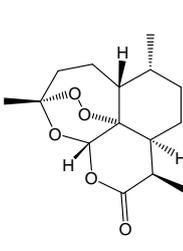
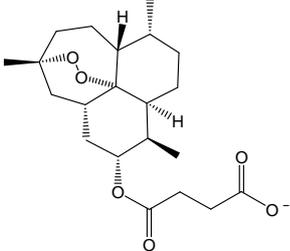
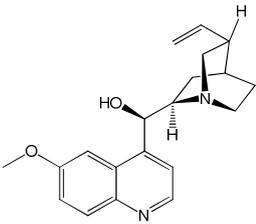
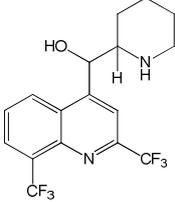
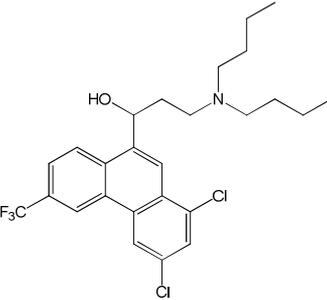
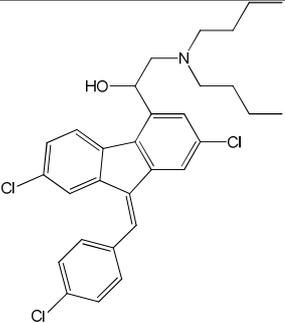
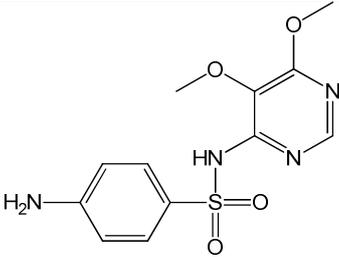
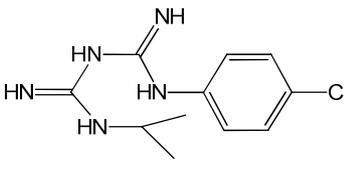
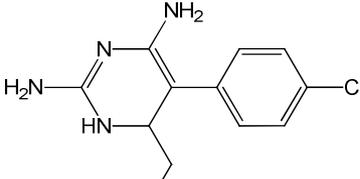
# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

## I.6.2. Principaux médicaments

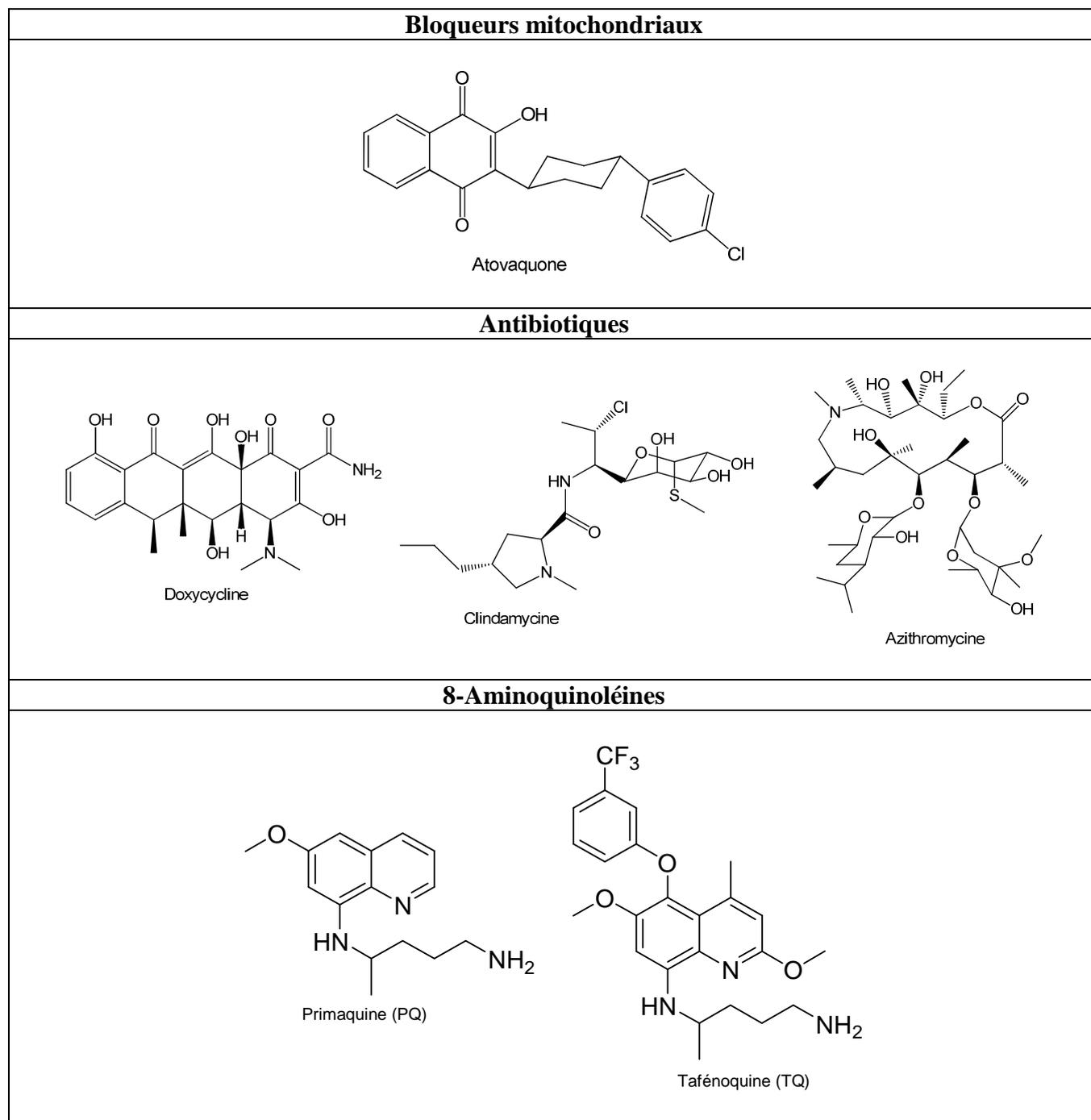
Les médicaments antipaludiques sont classés en fonction de leur mode d'action (Tableau 1).

Les schizonticides, qui regroupent les dérivés quinoléiques et ceux de l'artémisinine, agissent sur la forme érythrocytaire asexuée de tous les plasmodiums. Les antifolates, les bloqueurs mitochondriaux et les antibiotiques, agissent à la fois sur les stades érythrocytaires et sur les stades hépatiques. Les gamétocytocides, regroupant les 8-aminoquinoléines, l'artémisinine et ses dérivés, inhibent la formation des gamètes. Certains sont également actifs sur les stades hépatiques.

Tableau 1 : Principaux antipaludiques.

4-Aminoquinoléines		Dérivés de l'artémisinine	
 Chloroquine (CQ)	 Amodiaquine (AQ)	 Artémisinine (ART)	 Artésunate (ARS)
Arylaminoalcools			
 Quinine (QN)	 Méfloquine (MF)	 Halofantrine (HF)	 Luméfántrine (LF)
Antifolates			
 Sulfadoxine	 Proguanil	 Pyriméthamine	

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme



La Figure 8 représentent les différents compartiments cellulaires où agiraient les antipaludiques actuellement utilisés et ceux en cours de développement (en rouge) et les nouvelles cibles en cours d'étude (en vert). Les 4-aminoquinoléines (ex : CQ et AQ) et les arylaminoalcools (ex : QN et MF) se concentrent dans le compartiment acide de la vacuole digestive, où ils inhiberaient la formation de l'hémozoïne et interfèreraient avec la détoxification de l'hème. Les antibiotiques tels que l'azithromycine,<sup>49</sup> la doxycycline,

<sup>49</sup> Noedl, H. et al. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, 43, 1264 – 1271.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

et la clindamycine agissent à l'intérieur de l'apicoplaste où ils inhibent la traduction des protéines entraînant la mort du parasite. L'atovaquone et la tafénoquine inhibent le transport d'électrons dans la mitochondrie, tandis que les antifolates perturbent la biosynthèse *de novo* du folate dans le cytosol.

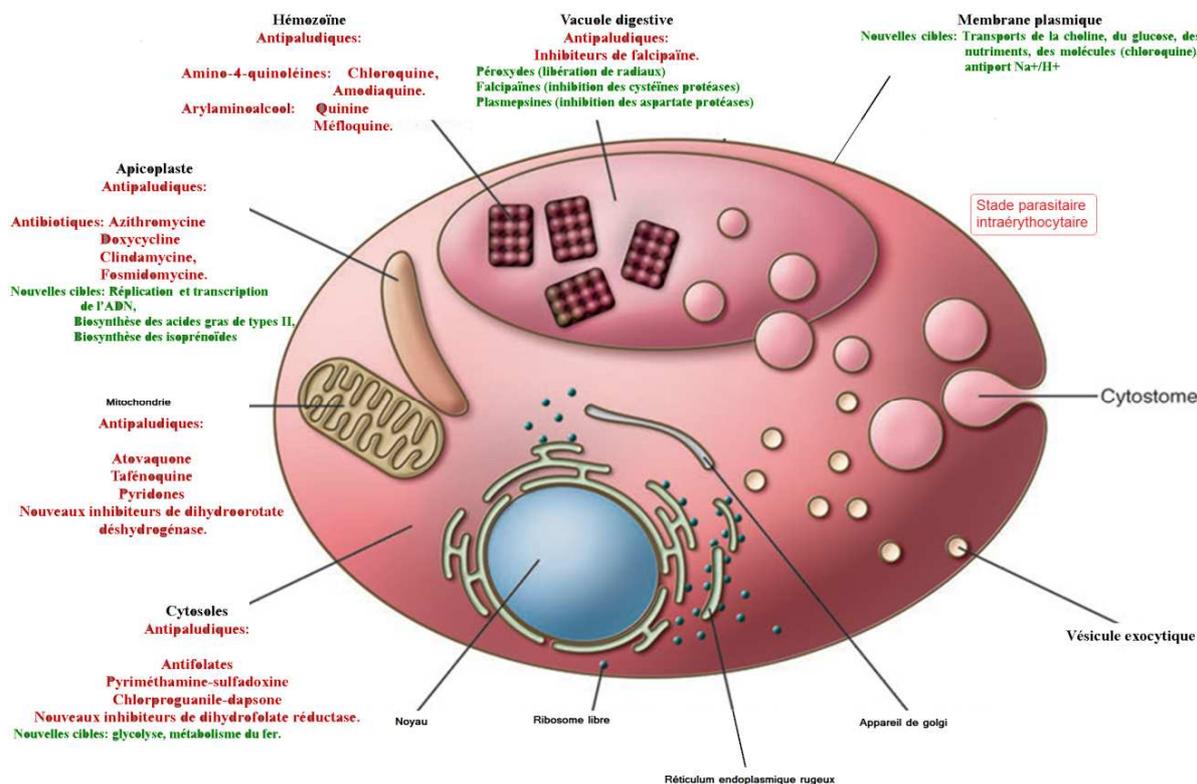


Figure 8 : Cibles potentielles identifiées chez *P. falciparum*.<sup>8</sup>

Pour illustrer les mécanismes d'actions et de résistances des antipaludiques, nous nous sommes uniquement intéressés aux 4-aminoquinoléines (CQ et AQ), aux arylaminoalcools (QN et MF), aux bloqueurs mitochondriaux (Atovaquone) et aux dérivés de l'artémisinine (ACT).

## a. Les 4-aminoquinoléines

Les 4-aminoquinoléines représentent les premières molécules antipaludiques de synthèse, isolées entre 1938 et 1941. Elles ont en commun un noyau quinoléique, une chaîne latérale aminée en 4 et un atome de chlore en position 7 du cycle quinoléique.

### a.1. La chloroquine

La chloroquine (CQ, Tableau 1) est une 4-aminoquinoléine qui a été découverte en 1934 et développée en 1944. De par son efficacité, son action rapide et son faible coût, la CQ s'est imposée comme un antipaludique de premier choix. Malheureusement, à partir des années 1957, on note les premiers cas de résistance en Asie et en Amérique du Sud.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

Cette résistance s'est ensuite étendue dans les deux continents, puis en Afrique et elle touche actuellement la totalité des zones d'endémie. Pendant plus de 30 ans, la CQ fut le médicament de première lignée antipaludique tant en prophylaxie qu'en traitement curatif. Bien qu'elle ne soit plus utilisée en monothérapie, les chercheurs s'attachent à mieux comprendre son mécanisme d'action.<sup>50, 51</sup>

## a.1.1. Mécanisme d'action de la chloroquine

Diverses théories sur le mécanisme d'action de la chloroquine ont été proposées.<sup>51</sup> À l'heure actuelle, un consensus sur son mécanisme d'action se dégage. Son activité est liée à ses propriétés d'accumulation sélective dans l'hématie parasitée et sa localisation préférentielle dans la vacuole digestive où elle s'accumulerait de part ses propriétés de base faible. La CQ, dont le mécanisme d'action est le plus documenté, est active exclusivement sur les formes érythrocytaires du parasite.

Durant sa phase érythrocytaire, le parasite digère une grande quantité de l'hémoglobine de son hôte, dans le but de s'approvisionner en acide aminé ou simplement de créer de l'espace à l'intérieur de l'érythrocyte (§ I.5). L'hémoglobine est transportée par des vésicules dans un compartiment spécialisé appelé vacuole digestive (VD). Déjà, dans les vésicules de transport, les composantes des protéines de l'hémoglobine sont digérées par l'action successive de divers enzymes protéolytiques : premièrement par les plasmepsines I-IV (protéases spécifiques de *Plasmodium falciparum*), suivies par les falcipaines (protéases à cystéines) et enfin les protéases à zinc, les falcilysines. Les petits peptides résultant de cette dégradation et probablement des acides aminés libres sont transportés à travers la membrane vacuolaire dans le cytoplasme. Les peptides seraient dégradés par des aminopeptidases parasitaires.

Une hypothèse propose l'existence d'un transporteur permettant l'entrée de la CQ dans la vacuole digestive. Des études ont mis en évidence le lien entre l'altération du pH et l'accumulation de la CQ. Par exemple l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (*P. falciparum*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger : PfNHE) localisé dans la membrane plasmique, inhiberait l'accumulation de la CQ.<sup>52</sup> Cependant, d'autres études n'ont pu confirmer l'implication de cette pompe dans l'action de la CQ.<sup>53</sup> Le mécanisme d'action de la CQ n'est toujours pas déterminé avec précision mais serait en relation avec l'inhibition de la cristallisation de l'hème en hémozoïne, processus permettant au parasite de se protéger de la toxicité de l'hème qu'il libère en digérant l'hémoglobine.

La CQ, un composé dibasique (pKa 8.1 et 10.2), est prise au piège dans la vacuole digestive qui est acide (pH 5.0 – 5.4). En effet, en tant que base soluble, la CQ traverse les différentes membranes de l'érythrocyte et du parasite et s'accumule dans la vacuole digestive, suivant le gradient de pH. A l'intérieur de la vacuole, elle est protonée et ne peut plus traverser librement la membrane vacuolaire. Prise au piège dans la vacuole, elle y exerce son action létale pour le parasite. Selon ce mécanisme, l'entrée de la CQ dans la vacuole serait directement dépendante du pH.

<sup>50</sup> Egan, T. J. *Targets*, **2003**, 2, 115 – 124.

<sup>51</sup> Tilley, L.; Loria, P.; Foley, M.: Chloroquine and other quinoline antimalarials, dans *Antimalarial Chemotherapy* (Ed, Rosenthal, P. J.) Humana Press, Totowa, NJ, **2001**, pp. 87-121.

<sup>52</sup> Wünsch, S. et al. *J. Cell. Biol.* **1998**, 140, 335 – 345.

<sup>53</sup> Bray, P. G.; Ward, S. A.; Ginsburd, H. *Parasitol. Today*. **1999**, 15, 360 – 363.

## Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

Comme toutes les 4-aminoquinoléines, la CQ forme un complexe avec la ferriprotoporphyrine IX et empêche ainsi sa polymérisation en hémotoïne. Cela a été récemment confirmé par microscopie « spinning-disk confocal » lors de la phase intraérythrocytaire du parasite.<sup>54</sup> Les informations de la structure cristallographique du complexe CQ-FP n'est pas disponible. Très récemment, la détermination structurale par RMN a montré que quatre monomères FPIX des sous-unités lient deux molécules de CQ (Figure 9).

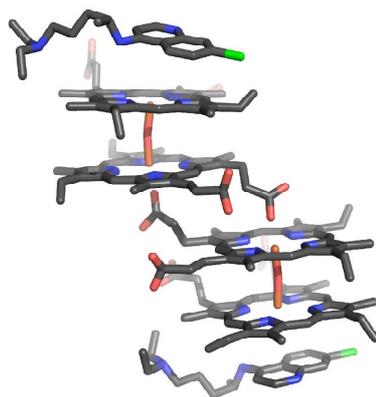


Figure 9 : Complexe FPIX-CQ 4/2.

Il a été également proposé que la CQ pourrait agir dans le cytoplasme parasitaire en inhibant la dégradation de FPIX par le glutathion.<sup>55</sup> Le mécanisme précis de la toxicité de FPIX libre ou complexée à la CQ reste à être élucidé.<sup>50</sup> Selon une théorie, le complexe FPIX-CQ agirait sur une cible membranaire non encore définie, ce qui pourrait porter atteinte directement à la fonction de la membrane et déclencher la libération d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , résultant en une fusion prématurée des vésicules d'endocytose de l'hémoglobine dans la vacuole digestive. Lors de cette fusion prématurée, l'hémoglobine ne serait pas correctement dégradée.<sup>56</sup> Cette hypothèse est soutenue par une étude menée indépendamment<sup>57</sup> montrant l'inhibition de plus de 40% de macromolécules endocytoses et l'accumulation des vésicules de transport dans le cytosol du parasite lors de l'addition de la CQ au dernier stade de la forme anneau du parasite.

A contrario, il a été montré que le complexe FPIX-CQ peut quitter la vacuole digestive et se lier à diverses enzymes cytosoliques et les inhiber. En effet, la *P. falciparum* glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*PfGAPDH*) est particulièrement sensible ( $K_i = 0,2\mu\text{M}$ ).<sup>58</sup> Très récemment, FPIX a été modélisée avec succès dans la structure cristalline de *pfgapdh*.<sup>59</sup>

<sup>54</sup> Gligorijevic, B. et al. *Biochem.* **2006**, *45*, 12411 – 12423.

<sup>55</sup> Famin, O.; Krugliak, M.; Ginsburg, H. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 59 – 68.

<sup>56</sup> Fitch, C. D. *Life Sci.* **2004**, *74*, 1957 – 1972.

<sup>57</sup> Hoppe, H. C. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2370 – 2378.

<sup>58</sup> Campanale, N. et al. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 27354 – 27361.

<sup>59</sup> Satchell, J. F. et al. *Acta Cryst.* **2005**, *D61*, 1213 – 1221.

## a.1.2. Résistance à la chloroquine

En raison de l'utilisation massive de la chloroquine, des souches résistantes de *Plasmodium falciparum* ont été sélectionnées indépendamment dans 4 régions différentes, et se sont successivement étendues dans tous les territoires où sévissait le paludisme.<sup>60, 61</sup> De nos jours, plus de 80% des isolats sont résistants à la chloroquine.<sup>62</sup> Le mécanisme moléculaire de résistance a été un sujet intense de recherche et de débat. La résistance à la CQ s'est accompagnée d'une augmentation importante de la mortalité due au paludisme.<sup>63</sup> Dans les souches chloroquino-résistantes, le médicament est apparemment refoulé de son site d'action, la vacuole digestive (Figure 10).

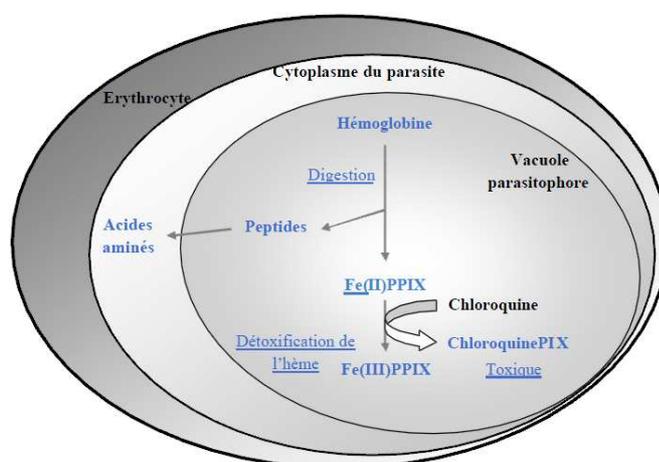


Figure 10 : Mécanisme d'action de la CQ.<sup>64</sup>

La CQ est également la molécule qui a été la plus étudiée au niveau des marqueurs moléculaires de résistances. De nombreux travaux suggèrent que différents gènes, codant des protéines de transports, sont impliqués dans la résistance à la CQ.<sup>65,66,67,68</sup>

De nombreuses études établissant une association entre le génotypage d'isolats et leur phénotype<sup>69,70</sup> ont mis en évidence l'implication directe du gène *pfert* (*P. falciparum* chloroquine résistance transporter) (chromosome 7) dans le phénomène de résistance à la CQ. Il existe plusieurs hypothèses concernant la fonction de *PfCRT*, la protéine de transport de la membrane de la vacuole digestive codée par *pfert*. *PfCRT* pourrait expulser activement la CQ

<sup>60</sup> Hastings, I. M. *Trends Parasitol.* **2004**, *20*, 512 – 518.

<sup>61</sup> Wellem, T. E. ; Plowe, C. V. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 770 – 776.

<sup>62</sup> Ginsburg, H. *Acta Tropica.* **2005**, *95*, 16 – 23.

<sup>63</sup> Trape, J. F. et al. *Life Sci.* **1998**, *218*, 689 – 697.

<sup>64</sup> Schlitzer, M. *ChemMedChem.* **2007**, *2*, 944 – 986.

<sup>65</sup> Pradines, B. ; Pages, J.M. ; Barbe, J. *Curr Drug Targets - Infect Disorders.* **2005**, *5*, 411 – 431.

<sup>66</sup> Henry, M. et al. *Curr Drug Targets.* **2006**, *7*, 935 – 948.

<sup>67</sup> Henry, M. et al. *Curr. Topics Med. Chem.* **2008**, *8*, 563 – 578.

<sup>68</sup> Alibert-Franco, S. et al. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 301 – 317.

<sup>69</sup> Chun, N. et al. *J. Infect. Dis.* **2001**, *183*, 1543 – 1545.

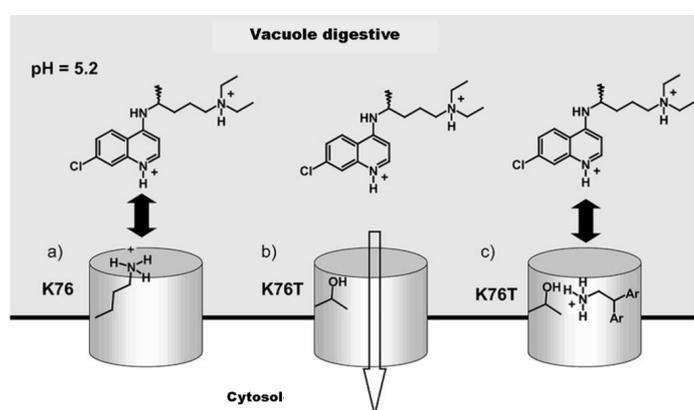
<sup>70</sup> Basko, L. K. ; Ringwald, P. *J. Infect. Dis.* **2001**, *183*, 1828 – 1831.

## Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

de la vacuole digestive,<sup>71</sup> et altérer le pH. La CQ diprotonée pourrait être transportée à l'extérieur de la vacuole par *PfCRT* muté.<sup>72</sup>

Un point commun de toutes les souches résistantes à la CQ est la mutation Lys76Thr (Figure 11) du gène *pfCRT* (la lysine est remplacée par une thréonine au niveau du codon 76). La présence de cette mutation multiplie le risque de résistance *in vivo* à la CQ par 7.2 sur un suivi de 28 jours et par 2.1 sur un suivi de 14 jours.<sup>73</sup> Elle est souvent associée à d'autres mutations du même gène (Cys72Ser, Met74Ile, Asn75Glu, Ala220Ser, Gln271Glu, Asn326Ser, Ile356Thr, Arg371Ile) dont les rôles ne sont pas clairement connus. Ces autres mutations pourraient compenser l'effet de la mutation en position 76 sur la capacité du parasite à se multiplier. On dénombre aujourd'hui, plus de 20 points de mutation de *pfCRT* décrits dans la littérature.<sup>72, 74, 75, 76</sup> Les mutations qui sont associées aux phénotypes de résistance à la CQ et à la QN sont localisées au niveau des domaines transmembranaires 1.4 et 9 de *PfCRT*.<sup>77</sup>

C'est en cherchant à comprendre la base moléculaire de la résistance à la CQ, que le gène *pfmdr1* (chromosome 5) fut découvert. Ce gène code pour la P-glycoprotéine homologue (Pgh1). La mutation Asn86Tyr a aussi été associée à la résistance à la chloroquine dans certaines études. La présence de cette mutation est associée à une multiplication du risque de résistance *in vivo* à la chloroquine par 2.2 sur un suivi de 14 jours et par 1.8 sur un suivi de 28 à 42 jours.<sup>73</sup> Deux mutations His191Tyr et Ser437Ala semblent être associées à une diminution de sensibilité *in vitro* à la CQ.<sup>78, 79, 80, 81</sup>



**Figure 11** : Mutation de la lysine 76 par la thréonine : Résistance à la CQ.<sup>64</sup>

<sup>71</sup> Sanchez, C. P. et al. *Biochemistry*. **2004**, 43, 16365 – 16373.

<sup>72</sup> Johnson, D. J. et al. *Mol. Cell*. **2004**, 15, 867 – 877.

<sup>73</sup> Picot, S. et al. *Malar. J.* **2009**, 8, 89.

<sup>74</sup> Chen, N. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 3500 – 3505.

<sup>75</sup> Durrand, V. et al. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, 136, 273 – 285.

<sup>76</sup> Cooper, R. A.; Hartwig, C. L.; Ferdig, M. T. et al. *Acta Tropica*. **2005**, 94, 170 – 180.

<sup>77</sup> Cooper, R. A. et al. *Mol. Microbiol.* **2007**, 63, 270 – 282.

<sup>78</sup> Mu, J. et al. *Mol. Microbiol.* **2003**, 49, 977 – 989.

<sup>79</sup> Henry, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 2755 – 2759.

<sup>80</sup> Parquet, V. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53, 2248 – 2252.

<sup>81</sup> Ursing, J. et al. *Acta Tropica*. **2006**, 97, 352 – 356.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

## a.2. L'amodiaquine

L'amodiaquine (AQ, Tableau 1), semble plus efficace que la CQ dans des zones où la choroquino-résistance est élevée.<sup>82</sup> Son mode d'action serait similaire à celui de la CQ. De ce fait, son accumulation est corrélée à celle de la CQ et donc, est aussi diminuée chez les isolats chloroquino-résistants.<sup>83</sup> L'AQ a récemment connu un regain d'intérêt, dans le traitement de l'accès simple, en association avec les dérivés de l'artémisinine (ACT) et plus particulièrement en association avec l'artésunate. Leur combinaison a un pouvoir synergique puissant. Björkman et al.<sup>84</sup> observent en 1990, des résistances croisées à la CQ et à l'AQ *in vivo* et *in vitro*. Cependant il existe des souches qui ne présentent pas de résistance croisée *in vitro*.<sup>85</sup> Les taux d'échecs parasitologiques et cliniques à l'AQ sont plus faibles que ceux à la CQ, dans le traitement d'enfants en Gambie,<sup>86</sup> au Sénégal, au Cameroun, au Gabon et au Congo.<sup>87,88</sup> Du fait de sa toxicité pour le foie et la moelle osseuse dans les traitements de longue durée, elle n'est pas recommandée en prophylaxie. Peu d'études ont exploré les bases moléculaires de la résistance à l'AQ. Les études réalisées font l'hypothèse de certains points communs entre l'AQ et la CQ. La résistance à l'AQ semble être liée aux gènes *pfcr1*<sup>89</sup> et *pfmdr1*.<sup>90,91,92</sup> La présence de la mutation Asn86Tyr sur *pfmdr1* multiplie le risque de résistance *in vivo* à l'amodiaquine par 5.4<sup>73</sup> et par 7.9 le risque d'échec thérapeutique par la combinaison amodiaquine plus sulfadoxine-pyriméthamine.<sup>93</sup>

## b. Les arylaminoalcools

Les arylaminoalcools, molécules monoprotonables, peuvent comme les 4-aminoquinoléines, s'accumuler dans la vacuole digestive du parasite et inhiber la formation de l'hémozoïne.<sup>94</sup> Cependant, leur mécanisme d'action n'est pas encore clairement établi.

### b.1. Propriété

#### b1.1. La quinine (QN)

L'écorce d'arbre de quinquina a été utilisée pour le traitement du paludisme pendant plus de 350 ans.<sup>95</sup> Les principes actifs antipaludiques sont la quinine (1, Figure 12) et son diastéréoisomère quinidine (2, Figure 12). Depuis qu'elle fut isolée en 1820, la quinine (QN)

<sup>82</sup> Olliaro, P. et al. *Lancet*, **1996**, 348, 1196 – 1201.

<sup>83</sup> Bray, P. G. ; Hawley, S. R. ; Ward, S. A. *Mol. Pharmacol.* **1996**, 50, 1551 – 1558.

<sup>84</sup> Björkman, A.; Phillips-Howard, P. A. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1990**, 84, 323 – 324.

<sup>85</sup> Geary, T. G.; Jensen, J. B. *J. Parasitol.* **1983**, 69, 97 – 105.

<sup>86</sup> Muller, O. et al. *Trop. Med. Int. Health.* **1996**, 1, 124 – 132.

<sup>87</sup> Brasseur, P. et al. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1995**, 89, 528 – 530.

<sup>88</sup> Brasseur, P. et al. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1999**, 93, 645 – 650.

<sup>89</sup> Gushimana, Y. et al. *Biophys. Chem.* **1993**, 47, 153 – 162.

<sup>90</sup> Happi, C. T. et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, 75, 155 – 161.

<sup>91</sup> Holmgren, G. et al. *Infect., Genetics Evol.* **2006**, 6, 309 – 314.

<sup>92</sup> Humphreys, G. S. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 51, 991 – 997.

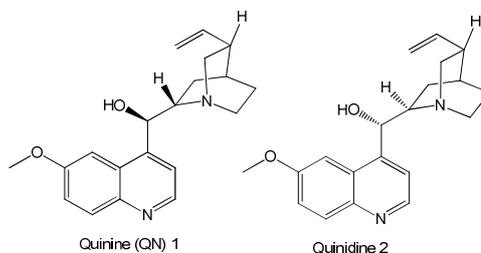
<sup>93</sup> Marfurt, J. et al. *Malar. J.* **2008**, 7, 61.

<sup>94</sup> Egan, T. J.; Ncokazi, K. K. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99, 1532 – 1539.

<sup>95</sup> Meshnick, S. R. *Parasitol. Today.* **1997**, 13, 89 – 90.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

a toujours été utilisée, en particulier pour le traitement du paludisme simple.<sup>96, 97</sup> Une cure de 7 jours est recommandée pour empêcher la recrudescence de la maladie et les effets secondaires du traitement. La quinine est souvent la seule option thérapeutique pour le traitement du paludisme sévère parce que les préparations intraveineuses sont disponibles.<sup>98</sup>



**Figure 12 :** Structures chimiques de la Quinine 1, et de la Quinidine 2.

Une résistance clinique à la QN en monothérapie est observée sporadiquement dans l'Asie du Sud-Est et l'Océanie Occidentale. La résistance est moins fréquente en Amérique du Sud et en Afrique.<sup>99</sup> Généralement, il est recommandé d'utiliser la QN en combinaison avec la tétracycline, la doxycycline (Tableau 1) ou la clindamycine.<sup>100, 96, 97</sup> Le chinchonisme, un ensemble d'effets secondaires incluant la nausée, le mal de tête, des bourdonnements d'oreille, la déficience auditive, la dysphorie et la vision floue est éprouvé par presque chaque patient ayant été traité avec la quinine. Plus important encore, sont son potentiel arrhythmogénique et la sécrétion d'insuline, aboutissant à une hypoglycémie sévère. Cette sécrétion d'insuline est amplifiée pendant la grossesse. L'hypoglycémie résultant du traitement à la quinine, pour le paludisme sévère, chez les femmes enceintes est particulièrement difficile à traiter.<sup>101</sup>

La quinidine est 2-3 fois plus active que la QN.<sup>102</sup> En particulier aux Etats-Unis, où la quinine intraveineuse est indisponible, la quinidine est utilisée pour le traitement du paludisme sévère.

## b.1.2. La méfloquine

La méfloquine (MF, Tableau 1), a été développée pendant la seconde guerre mondiale à partir des analogues de la quinine,<sup>103</sup> En 1963, un Programme de Recherche sur le Paludisme a été rétabli à l'Institut de Recherche d'Armée de Walter Reed. Fort de son efficacité, la MF fut choisie parmi presque 300 dérivés quinoléiques hydroxylés.<sup>104</sup> La MF a été mise sur le marché pour un usage antipaludique en 1985, commercialisée sous le nom de Lariam®. Elle est très active contre la plupart des souches de *Plasmodium* chloroquino-résistantes (CI<sub>50</sub>s de 3 à 10 nM).<sup>105, 106</sup> La MF a été largement utilisée, particulièrement en

<sup>96</sup> Baird, J. K. N. *Engl. J. Med.* **2005**, 352, 1565 – 1577.

<sup>97</sup> Suh, K. N.; Kain, K. C.; Keystone, J. S. *Can. Med. Assoc. J.* **2004**, 170, 1693 – 1702.

<sup>98</sup> Pasvol, G. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2005**, 19, 211 – 240.

<sup>99</sup> Wongsrichanalai, C. et al. *Lancet* **2002**, 2, 209 – 218.

<sup>100</sup> <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241547925/en/index.html>. Consulté le 25 avril 2011.

<sup>101</sup> Taylor, W. R. J.; White, N. J. *Drug Safety.* **2004**, 27, 25 – 61.

<sup>102</sup> Karle, J. M. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, 36, 1538 – 1544.

<sup>103</sup> Shanks, G. D. *Mil. Med.* **1994**, 159, 275 – 281.

<sup>104</sup> Castel, D. A. Vol. 5 (Ed.: D. J. Abraham), 6th ed. *Wiley, New York*, **2003**, 5, p 943.

<sup>105</sup> Bhattacharjee, A. K.; Karle, J. M. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1927 – 1933

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

---

Asie, où un degré considérable de résistance s'est développé au cours des années. En 2003, l'efficacité en monothérapie de la méfloquine était seulement de 62 % dans certains secteurs de la Thaïlande.<sup>107</sup> La valeur moyenne des  $CI_{50}$ , de près de 300 isolats collectés en Thaïlande dans la fin des années 90 était de 71 nM.<sup>108</sup> Suite à ce phénomène de résistance, la combinaison avec l'artésunate fut recommandée.<sup>109</sup> Cependant, parce que les deux médicaments ont une pharmacocinétique différente, leur utilisation en combinaison a soulevé des problèmes. En effet, l'exposition à long terme des parasites à des concentrations basses de la méfloquine (la demi-vie d'élimination est de 21 jours)<sup>110</sup> peut mener à la sélection de souches résistantes.<sup>111</sup>

Un taux de recrudescence de 17 % a été annoncé pour un traitement thérapeutique à base de la combinaison méfloquine-artésunate.<sup>112</sup> L'utilisation prophylactique de la MF est associée aux effets secondaires neuropsychiatriques comme l'insomnie, la dépression et des attaques de panique. De tels effets secondaires peuvent être éprouvés chez 5 à 29 % des patients. À cause de ces effets secondaires, l'utilisation prophylactique de la MF est interdite pour les gens comme les membres d'équipage de l'air qui exigent des capacités psychomotrices.<sup>113, 114</sup>

Le mécanisme d'action de la méfloquine ainsi que d'autres arylaminoalcools reste peu clair. Il est probablement différent de celui des 4-aminoquinoléines. Récemment, il a été proposé que les arylaminoalcools agiraient sur la même cible membranaire (non identifiée) que celle des 4-aminoquinoléines. Mais cette action se ferait de manière antagoniste à celle des 4-aminoquinolines, en interdisant la sortie des ions  $Ca^{2+}$  et empêchant ainsi la fusion de vésicules de transport de l'hémoglobine avec la vacuole digestive.<sup>56</sup>

## b.2. Mécanisme de résistance aux arylaminoalcools

La protéine de transport membranaire *PfMDR1* joue un rôle central dans la sensibilité des parasites aux arylaminoalcools (Figure 13). Une mutation simple N86Y du gène *pfmdr1* est co-choisi avec la mutation K76T. Cette mutation *pfmdr1* est responsable de l'accroissement de la sensibilité des parasites à la MF, l'HF, la LF et à la dihydroartémisinine.<sup>112, 115</sup>

---

<sup>106</sup> Ringwald, P. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1525 – 1527.

<sup>107</sup> Vijaykadga, S. et al. *Trop. Med. Inter. Health.* **2006**, *11*, 211 – 219.

<sup>108</sup> Brockmann, A et al. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2000**, *94*, 537 – 544.

<sup>109</sup> Adjuik, M. et al. *Lancet.* **2002**, *359*, 1365 – 1372.

<sup>110</sup> Martindale, S. *Royal Pharmaceutical Society of Great Britain*, **2005**, *34*, 453 – 456.

<sup>111</sup> Kremsner, P. G.; Krishna, S. *Lancet.* **2004**, *364*, 285 – 294.

<sup>112</sup> Price, R. N. et al. *Lancet.* **2004**, *364*, 438 – 447.

<sup>113</sup> Connor, B. A. *J. Travel Med.* **2001**, *8* (Suppl 3) : S57 – S64.

<sup>114</sup> Franco-Paredes, C.; Santos-Preciado, J. I. *Lancet*, **2006**, *6*, 139 – 149.

<sup>115</sup> Durainsingh, M. T. et al. *Mol. biochem. Parasitol.* **2000**, *108*, 13 – 23.

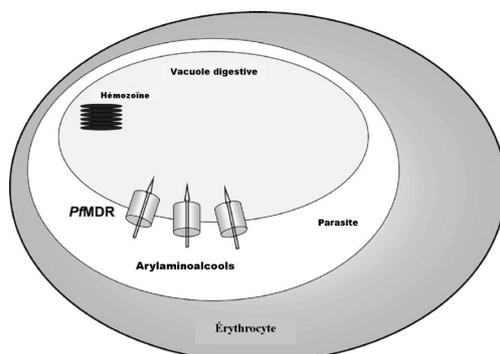


Figure 13 : Résistance aux arylaminoalcools.<sup>64</sup>

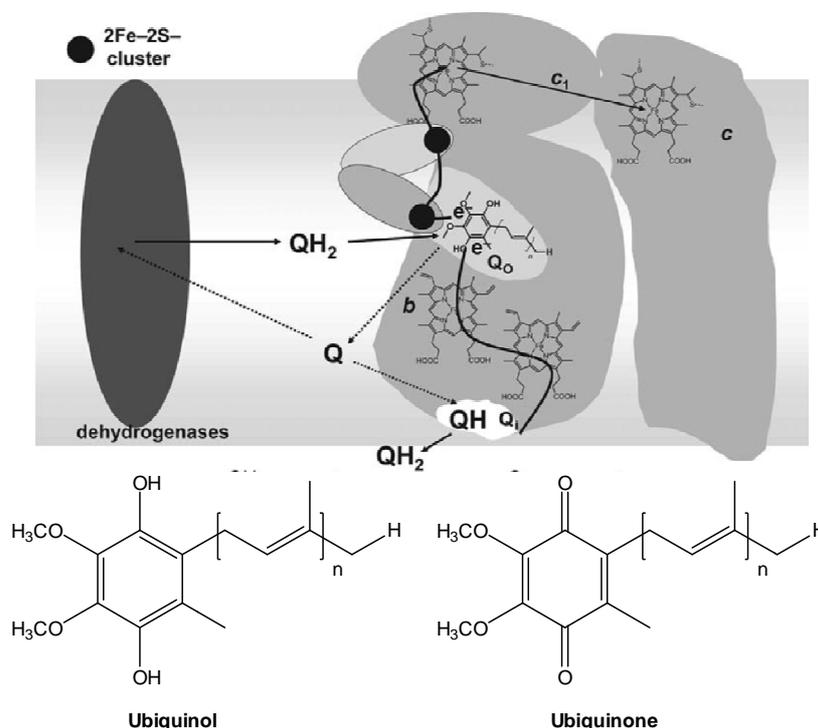
## c. L'atovaquone et les bloqueurs mitochondriaux

### c.1. Transporteur mitochondrial d'électrons de *P. falciparum*

Contrairement à d'autres organismes eucaryotes, les transports mitochondriaux d'électrons de *P. falciparum* semblent ne pas être couplés à la synthèse d'ATP. La principale source d'ATP pour *P. falciparum* est la glycolyse anaérobie. Le cycle d'acide citrique ou cycle de Krebs est incomplet chez *Plasmodium*. Les déshydrogénases, sources d'électrons, parmi lesquelles la dihydroorotate déshydrogénase est la plus importante. Elle catalyse la réduction de la dihydroorotate en orotate, l'intermédiaire clef de la biosynthèse de la pyrimidine. Fournir un réservoir d'électrons pour cette réaction semble être la fonction la plus importante des transporteurs mitochondriaux d'électrons. Les parasites dépendent de cette voie parce qu'ils ne peuvent digérer les bases de pyrimidine utilisées. Des électrons sont transférés à partir de différentes déshydrogénases à l'ubiquinone (coenzyme Q). Sa forme réduite, l'ubiquinol, se lie au site du récepteur Q<sub>0</sub> du complexe cytochrome bc<sub>1</sub>, où il est oxydé en ubiquinone (Schéma 1). Les deux électrons prennent alors différents chemins. Un électron est transféré au centre fer-soufre du récepteur de la protéine Rieske. Le mouvement de l'ensemble des protéines transfère l'électron à un C-type de l'hème du cytochrome c<sub>1</sub>. Par la suite, le cytochrome c<sub>1</sub> est oxydé par un complexe cytochrome d'oxydase, semblable au processus dans des organismes eucaryotes plus élevés. Le deuxième électron est transféré par deux molécules b-type de l'hème au site Q<sub>i</sub> du cytochrome b, dans lequel l'ubiquinone est réduit, via un intermédiaire sémiquinone dans un processus à deux étapes, en ubiquinol.<sup>116,117</sup>

<sup>116</sup> Vaidya, A. B. *Curr. Drug. Targets Infect. Disord.* **2004**, 5, 11 – 23.

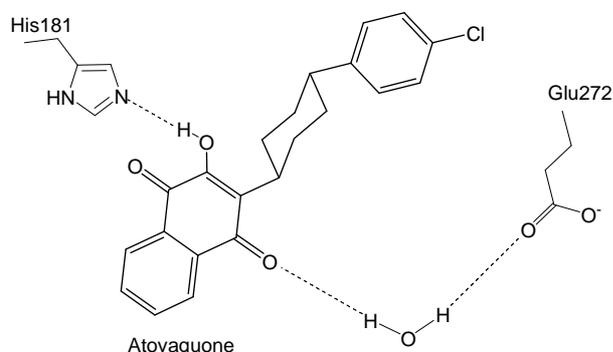
<sup>117</sup> Vaidya, A. B.; Mather, M. W. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2005**, 295, 233 – 250.



**Schéma 1** : Représentation du flux électronique par le complexe du cytochrome *bc1* dans la chaîne respiratoire du parasite.

### c.2. Mécanisme d'action et de résistance

L'Atovaquone (Tableau 1) se lie au site  $Q_0$  du complexe cytochrome *bc1* et empêche la translocation du domaine fer-soufre. L'ensemble des études, utilisant la structure du complexe cytochrome *bc1* de la levure, a fourni une explication raisonnable de cet effet de l'atovaquone au niveau moléculaire.<sup>118</sup> Le groupe 2-hydroxy forme une liaison hydrogène avec le résidu d'imidazole de His181 (numérotation de la levure) qui coordonne le complexe fer-soufre. Tandis que, du côté opposé de la molécule, une liaison hydrogène-eau est formée entre l'atome d'oxygène du groupe 4-carbonyle et la chaîne latérale de Glu272 ().



**Figure 14** : l'atovaquone formant simultanément un pont hydrogène avec le domaine du complexe fer-soufre et le cytochrome *b*.

<sup>118</sup> Kessl, J. J. et al. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 31312 – 31318.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

---

L'interruption du transport d'électrons mène à un effondrement rapide du potentiel membranaire de la mitochondrie ( $ED_{50} = 15 \text{ nM}$ ) causant ainsi, un arrêt complet du métabolisme et du transport membranaire de la mitochondrie.<sup>119</sup> Ce processus entraîne ainsi la mort du parasite. Cet effet a été observé dans des souches de laboratoire avec des valeurs de  $CI_{50}$  comprises entre 0.56 et 4.53 nM<sup>120</sup> Et de 1 à 6 nM sur des isolats de terrain.<sup>108, 121</sup> Le complexe cytochrome des cellules de mammifères est jusqu'à 1000 fois moins sensible à l'atovaquone. L'utilisation de l'atovaquone en monothérapie a montré une sélection rapide de souches résistantes, aboutissant à un taux d'échec thérapeutique de 30%.<sup>122</sup> Ces souches résistantes possèdent un complexe cytochrome *bc1* dans lequel le site  $Q_O$  a été altéré par l'échange d'un acide aminé. Ces mutations (L271V, K272R, I258M, F267I, Y268S/C chez *P. falciparum*) diminuent la sensibilité du complexe cytochrome *bc1* à l'atovaquone de plus de 1000 fois ( $IC_{50}$  comprises entre 10 et 25  $\mu\text{M}$ ).<sup>119</sup> En utilisant la structure cristalline connue du complexe cytochrome *bc1* de la levure, les conséquences de ces changements en acides aminés peuvent être élucidées au niveau moléculaire.<sup>123</sup> L'échange de l'Ile258 par la méthionine diminue l'espace disponible pour le squelette naphthoquinone de l'atovaquone. Échanger la chaîne latérale aromatique de Tyr268 avec une sérine ou une cystéine nucléophile mène à une interaction hydrophobe diminuée du résidu cyclohexyle. Un autre acide aminé affecté est le résidu d'histidine de la protéine Rieske, qui forme la liaison hydrogène décisive avec l'atovaquone. Il est intéressant de noter que, certaines de ces mutations se produisent naturellement chez les mammifères, sans pour autant affecté le bon fonctionnement du complexe cytochrome *bc1*, expliquant ainsi l'activité sélective de l'atovaquone sur *Plasmodium*.

### c.3. Association Atovaquone – Proguanil

L'atovaquone montre un large spectre d'activités antiprotozoaires. Il est utilisé contre *Pneumocystis jiroveci pneumonia* (autrefois appelé *Pneumocystis carinii*), *toxoplasma gondii*, et *human babesiosis*. En raison du développement rapide de la résistance comme décrit ci-dessus, son utilisation en monothérapie est proscrite pour la thérapie et la prophylaxie du paludisme.<sup>124</sup>

Heureusement, il existe une forte synergie *in vitro* entre l'atovaquone et le proguanil (Tableau 1), et également, mais dans une moindre mesure, avec la doxycycline (Tableau 1). En outre, il n'y a aucune synergie entre l'atovaquone et d'autres inhibiteurs de DHFR tels que la pyriméthamine (Tableau 1). Le proguanil non-métabolisé est responsable de la synergie avec l'atovaquone. Le proguanil seul n'a aucun effet mesurable sur le potentiel membranaire de la mitochondrie, mais il diminue la concentration de l'atovaquone nécessaire pour l'écroulement du potentiel membranaire. Le mécanisme responsable de cet effet est inconnu.<sup>125</sup> Par cette synergie, la sélection de souches résistantes à l'atovaquone est diminuée. Mais, une fois qu'une souche est devenue résistante à l'atovaquone, elle devient également

---

<sup>119</sup> Srivastava, I. K. et al. *Mol. Microbiol.* **1999**, 33, 704 – 711.

<sup>120</sup> Fivelman, Q. L. Adagu, I. S. Warhurst, D. C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 4097 – 4102.

<sup>121</sup> Pradines, B. et al. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, 57, 1093 – 1099.

<sup>122</sup> Looareesuwan, S. et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, 60, 533 – 541.

<sup>123</sup> Kessl, J. J. et al. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 17142 – 17148.

<sup>124</sup> Baggish, A. L. Hill, D. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 1163 – 1173.

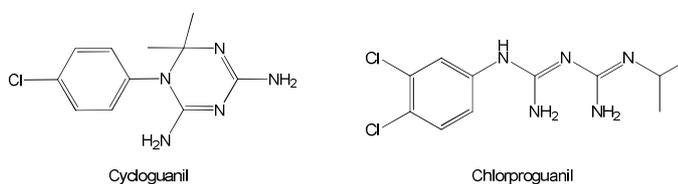
<sup>125</sup> Srivastava, I. K.; Vaidya, A. B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 1334 – 1339.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

résistante à la combinaison avec le proguanil.<sup>120</sup> La même synergie qu'avec le proguanil, est aussi observée avec le chlorproguanil (Figure 15).

Depuis le milieu des années 90, la combinaison Atovaquone-Proguanil est utilisée, sous le nom commercial de Malarone®, pour le traitement du paludisme simple en prophylaxie et en thérapie.<sup>122, 124</sup> L'utilisation de la Malarone® est limitée à cause de son prix très élevé.

Quelques échecs thérapeutiques ont été rapportés.<sup>126, 127</sup> Cependant, la résistance ne semble pas être un problème de nos jours car, la prédominance des mutations du gène de cytochrome b qui confèrent la résistance à cette combinaison dans des isolats primaires semble être inférieure à 1%.<sup>128, 129, 130</sup> Pour protéger cette combinaison atovaquone/proguanil des résistances naissantes, elle a été combinée avec succès à l'artésunate, pour le traitement du paludisme simple.<sup>131</sup> Cette combinaison a été également employée pour le traitement du paludisme aussi bien simple que multiple-résistant pendant la grossesse.<sup>132, 133</sup>



**Figure 15** : Structures chimiques de la cycloguanil et de la chlorproguanil.

## d. L'artémisinine et ses dérivés

Depuis plus de 2000 ans, des extraits de plantes, connus sous le nom d'absinthe douce, ont été utilisés en Chine pour le traitement de la fièvre. En 1971, le principe actif, une lactone de sesquiterpène, l'artémisinine (ART, Figure 16) fut isolé. Son utilisation pour le traitement du paludisme a été répandue en Chine depuis 1972.<sup>134</sup>

L'artémisinine est un agent antipaludique fortement actif. Des analyses effectuées sur 40 isolats cliniques du Nord-Ouest de la Thaïlande, montrent des  $CI_{50}$  de 8.2 à 17.9 nM.<sup>135</sup> Lors d'une étude différente, des valeurs légèrement plus hautes, de 15.5 à 28.3 nM, ont été observées.<sup>136</sup>

<sup>126</sup> Kuhn, S.; Gill, M. J.; Kain, K. C. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, 72, 407 – 409.

<sup>127</sup> Schwartz, E.; Bujanover, S.; Kain, K. C. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, 37, 450 – 451.

<sup>128</sup> Wichmann, O. et al. *J. Infect. Dis.* **2004**, 190, 1541 – 1546.

<sup>129</sup> Pimentel, S. et al. *Malar. J.* **2006**, 5:30.

<sup>130</sup> Gebru, T. et al. *Malar. J.* **2006**, 5:112.

<sup>131</sup> Vugt, M. V. et al. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, 35, 1498 – 1504.

<sup>132</sup> McGready, R. et al. *J. Infect. Dis.* **2005**, 192, 846 – 853.

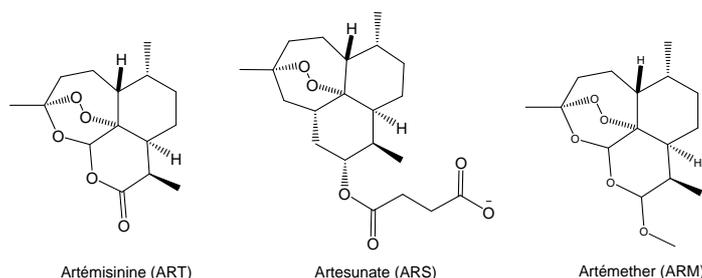
<sup>133</sup> McGready, R. et al. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2003**, 97, 592 – 594.

<sup>134</sup> Haynes, R. K.; Vonwiller, S. C. *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 73 – 79.

<sup>135</sup> Ramharther, M. et al. *Am. J. Med. Hyg.* **2002**, 67, 39 – 43.

<sup>136</sup> Tanariya, P. et al. *J. Clin. Pharmacol.* **2000**, 49, 437 – 444.

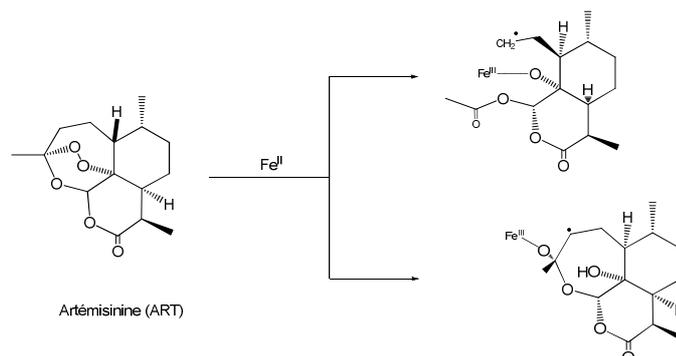
# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme



**Figure 16 :** Structures chimiques de l'artémisinine (ART), l'artésunate (ARS) et l'artéméthér (ARM).

## d.1. Mécanisme d'action, résistances possibles et activité

Une caractéristique structurelle clé de l'ART et ses dérivés est l'infrastructure 1,2,4-trioxane ou, plus précisément, l'endopéroxyde, qui est obligatoire pour l'activité antipaludique. En dépit de l'importance croissante des ACT, leur mécanisme d'action fait l'objet d'intenses débats. Il a été proposé que le clivage de l'endopéroxyde médié par le Fe(II) mène à la formation de radicaux carbonés pouvant être de nature primaire ou secondaire (Schéma 2). Il se pourrait que les deux ou un seul de ces radicaux soient l'espèce active.



**Schéma 2 :** Formation des radicaux carbonés primaire ou secondaire de l'artémisinine par médiation au Fe<sup>II</sup>.

Il est considéré que la formation des radicaux carbonés a lieu dans la vacuole digestive, et que la Ferroprotoporphyrine IX en est l'espèce active. Les radicaux réactifs, sont susceptibles de réagir, plus ou moins aléatoirement, avec différentes cibles de protéines, aussi bien qu'avec la ferroprotoporphyrine IX elle-même et ainsi empêcher la désintoxication de l'hème et inhiber une multitude d'enzymes.<sup>137, 138, 139, 140</sup>

O'Neill et Posner ont formulé un mécanisme de l'ART et ses dérivés comme étant « The “iron-triggered cluster bomb” » (Figure 17).<sup>141</sup>

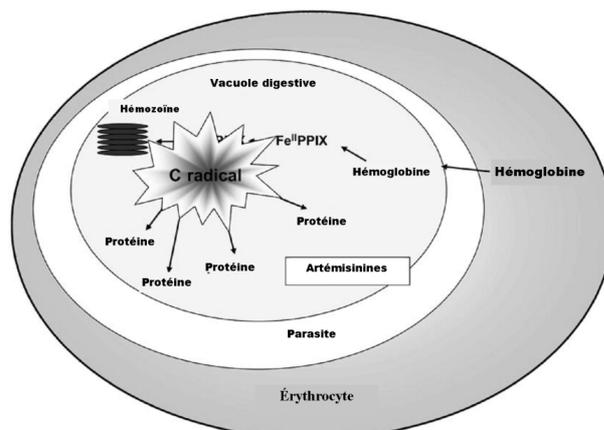
<sup>137</sup> Posner, G. H.; O'Neill, P. M. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 397 – 404.

<sup>138</sup> Meshnick S. R. *Artemisinin and its derivatives dans Antimalarial Chemotherapy*, Ed. P. J. Rosenthal, Humana Press, Totowa, **2001**, 191 – 201.

<sup>139</sup> Haynes, R. K.; Krishna, S. *Microbes Infect.* **2004**, *6*, 1339 – 1346.

<sup>140</sup> Krishna, S.; Uhlemann, A.-C.; Haynes, R. K. *Drug Resist. Updates*, **2004**, *7*, 233 – 244.

<sup>141</sup> O'Neill, P. M.; Posner, G. H. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2945 – 2964.



**Figure 17 :** The “iron-triggered cluster bomb”.

Le développement de résistance contre un médicament agissant non spécifiquement contre des cibles multiples est peu probable. Ce concept a été mis en doute suite à plusieurs observations : les artémisinines agissent sur toutes les étapes développementales du parasite, y compris celles qui ne produisent pas d'hémozoïne. Des expériences de détection par marquage ont permis de localiser l'Art et ses dérivés non pas dedans, mais seulement à l'extérieur de la vacuole digestive.<sup>142</sup> De plus, des dérivés de l'artémisinine fortement actifs sont plus ou moins sensibles au clivage par la médiation au Fe(II).<sup>143</sup>

Récemment, Krishna et ses collaborateurs ont proposé une autre hypothèse : le clivage de l'endopéroxyde s'effectuerait dans le cytoplasme catalysé par une source cytoplasmique de Fe(II). L'espèce réactive résultante inhiberait alors spécifiquement une pompe Ca<sup>2+</sup> ATP-dépendante localisée dans le réticulum endoplasmique (Figure 18). La pompe, appelée *PfATP6*, est l'homologue de l'ATPase Ca<sup>2+</sup> sarcoplasmique/réticulum endoplasmique des cellules de mammifères (SERCA).<sup>144</sup> SERCA est une protéine membranaire qui pompe le calcium à l'intérieur du réticulum. Un modèle de *PfATP6* a été préparé, et un certain nombre de dérivés d'artémisinine ont été assemblés informatiquement dans le site de liaison de la thapsigargine de ce modèle. La thapsigargine est un composé terpénique isolé de la racine de *Thapsia garganica* (utilisée traditionnellement comme anti-irritant). C'est un inhibiteur spécifique des ATPases-Ca<sup>2+</sup> SERCA. L'interaction des dérivés de l'ART avec *PfATP6* semble être surtout de nature hydrophobe. L'endopéroxyde est exposé au solvant. Par conséquent, il a été suggéré que la liaison de l'artémisinine à la protéine cible précéderait l'activation du peroxyde obtenu par la médiation au Fe(II).<sup>145</sup>

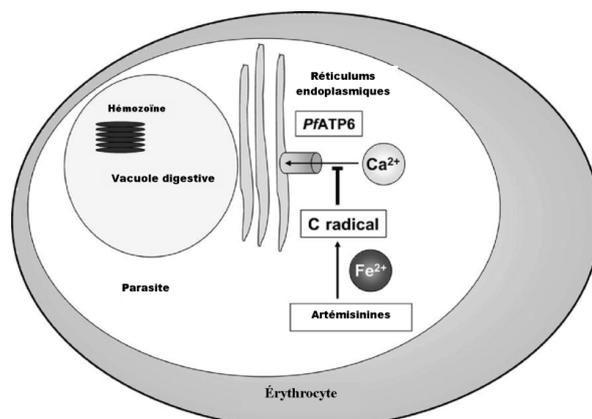
<sup>142</sup> Krishna, S. et al. *Trends Mol. Med.* **2006**, *12*, 200 – 205.

<sup>143</sup> Haynes, R. K. et al. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1405 – 1409.

<sup>144</sup> Eckstein-Ludwig, U. et al. *Nature*, **2003**, *424*, 957 – 961.

<sup>145</sup> Jung, M. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2994 – 2997.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme



**Figure 18 :** Inhibition de la pompe  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA) appelée *PfATP6* par des radicaux issus de la médiation au  $\text{Fe(II)}$ .

Le mécanisme, par lequel l'inhibition du *PfATP6* mène à la mort rapide du parasite, reste inconnu. Cependant, ces découvertes remettent en cause le concept que si Art agit de manière plus ou moins aléatoire sur des cibles multiples de protéines, le risque de résistance est minimisé.<sup>142</sup> En effet, il a été possible de créer un mutant de *PfATP* résistant à l'artémisinine par juste l'échange d'un acide aminé (L263E).<sup>146</sup> De plus, des mutations de *PfATP6* ont été trouvées dans des isolats montrant de manière significative la diminution de la sensibilité à l'artéméter (ARM, Figure 16).<sup>147</sup> En outre, une résistance stable à l'artémisinine pourrait être introduite dans des parasites de rongeur par des mutations ponctuelles dans les gènes *atp6* et *mdr1*.<sup>148</sup> L'ART et ses dérivés sont très actifs, ils abaissent la biomasse du parasite de 10 000 fois dans un seul cycle asexué.<sup>149, 150</sup> Ils représentent donc les antipaludiques les plus actifs de nos jours.

### I.6.3 Quelques antipaludiques en phases cliniques

La recherche sur les antipaludiques mobilise un grand nombre d'équipes de recherche. La Figure 19 reprend certaines molécules de synthèse qui sont entrées en développement préclinique ou clinique très récemment.<sup>151, 152, 153, 154, 155, 156, 157</sup>

<sup>146</sup> Uhlemann, A.-C. et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, 12, 628 – 629.

<sup>147</sup> Jambou, R. et al. *Lancet*, **2005**, 366, 1960 – 1963.

<sup>148</sup> Afonso, A. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 480 – 489.

<sup>149</sup> White, N. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 1413 – 1422.

<sup>150</sup> Woodrow, C. J. ; Haynes, R. K. ; Krishna, S. *Postgrad. Med. J.* **2005**, 81, 71 – 78.

<sup>151</sup> Borrmann, S. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 2713 – 2718.

<sup>152</sup> Karunajeewa, H. A. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 237 – 243.

<sup>153</sup> Nyunt, M. M. et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2009**, 80, 528 – 535.

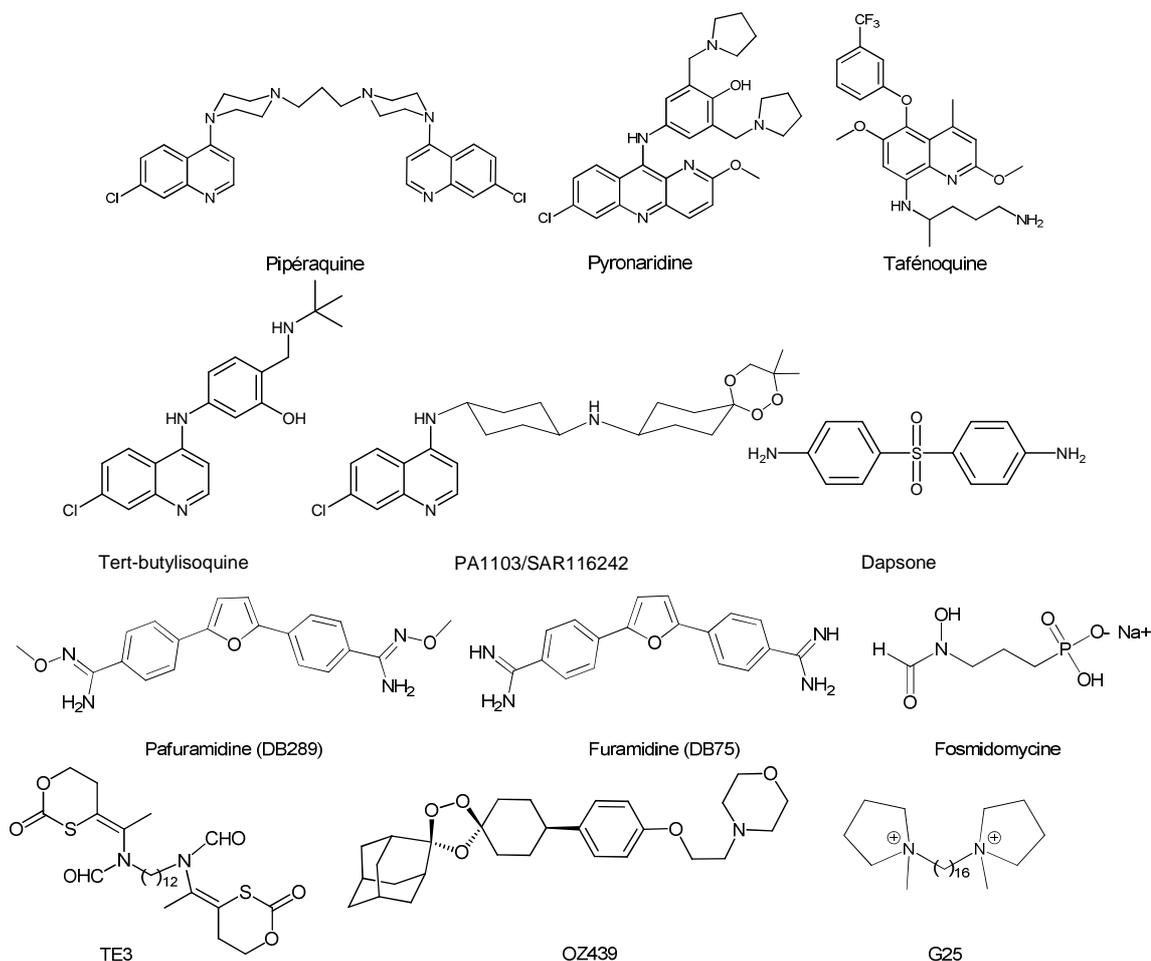
<sup>154</sup> Tiono, A. B. et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2009**, 81, 969 – 978.

<sup>155</sup> Nasveld, P. E. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54, 792 – 798.

<sup>156</sup> Tshefu, A. K. et al. *Lancet*, **2010**, 375, 1457 – 1467.

<sup>157</sup> Charman, S. A. et al. *PNAS*. **2011**, 108, 4400 – 4405.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme



**Figure 19 :** Quelques antipaludiques en développement.

La pipéraquline (Figure 19), une bis-4-aminoquinoléine en combinaison avec la dihydroartémisinine (Eurartesim®),<sup>158, 159</sup> et la pyronaridine (Figure 19) en association avec l'artésunate (Pyramax, Figure 16),<sup>156</sup> sont très bien tolérées et ont montré leur efficacité dans des études cliniques en Afrique. Eurartesim® et Pyramax sont en phase III clinique. En outre, l'étude de Pyramax est actuellement en développement sous forme intraveineuse pour le traitement du paludisme sévère.<sup>159</sup>

La dapsonne (Figure 19) est en triple combinaison avec le chlorproguanil (Figure 15) et l'artésunate (CDA, LapDap+, Figure 16) dans le but d'étendre la durée de vie de l'utilisation de la combinaison aux antifolates. Son étude est en phase III clinique.<sup>159, 154</sup>

La tafénoquine (Figure 19), une 8-aminoquinoléine, agit également sur les étapes érythrocytaires des parasites.<sup>135</sup> Elle a une longue durée de vie et baisse apparemment le risque d'effets secondaires sévères contrairement à la méfloquine. D'après les résultats de l'étude en phase IIIa, la tafénoquine pourrait probablement devenir un médicament prophylactique.<sup>155</sup>

La Pafuramidine (DB289, Figure 19), une prodrogue de la Furamidine (DB75) oralement biodisponible, est une diamine qui a donné des résultats prometteurs lors d'une

<sup>158</sup> Karema, C. et al. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *100*, 1105 – 1111.

<sup>159</sup> Bathurst, I.; Hentschel, C. *TRENDS Parasitol.* **2006**, *22*, 301 – 307.

étude clinique initiale. Malheureusement lors d'études prophylactiques en phase I/II pour une dose de 100 mg, la pafuramidine s'est montrée inefficace.<sup>153</sup>

La TE3 (Figure 19), une prodrogue de composé bis-ammonium, inhibe probablement la biosynthèse de la choline. De par ses propriétés bicationiques, elle interagit également avec l'hème.<sup>160</sup> Elle a montré des résultats précliniques prometteurs.

La fosmidomycine (Figure 19), un inhibiteur de la 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate réductoisomérase, a montré une bonne tolérance et une haute efficacité en association avec la clindamycine<sup>151</sup> et l'artesunate<sup>161</sup> (Figure 16) dans plusieurs études cliniques.

OZ439 (Figure 19), une ozonide, actuellement en phase IIa, agit très rapidement sur toutes les étapes de la phase asexuée érythrocytique de *P. falciparum*.<sup>157</sup>

G25 (Figure 19), est un puissant antipaludique *in vitro* et *in vivo*, qui agit à de très faibles doses (18nM).<sup>162</sup> En plus de son action sur *P. falciparum* et *P. vivax*, des singes infectés par *P. falciparum* et *P. cynomolgi* furent complètement guéris après traitement à ce dernier.<sup>163</sup>

PA1103/SAR116242 (Figure 19), une trioxaquine (molécule hybride), est fortement active *in vitro* sur plusieurs souches sensibles et résistantes de *Plasmodium falciparum* aux concentrations nanomolaires (CI<sub>50</sub> = 10 nM obtenue sur FcM29, souche chloroquino-résistante)<sup>164</sup> et sur des isolats cliniques multirésistants gabonais. Cette molécule est très efficace par voie orale avec une élimination complète des parasites chez des souris infectées des souches de *Plasmodium* de rongeur chloroquino-sensibles ou chloroquino-résistantes à des doses de 26-32 mg/kg.<sup>164</sup> Ce composé est aussi fortement efficace sur des souris infectées par *P. falciparum*. Combiné avec un bon profil médicamenteux (l'absorption préliminaire, le métabolisme et des paramètres de sécurité), PA1103/SAR116242 a été sélectionné en janvier 2007 comme étant un potentiel médicament antipaludique.<sup>165, 164</sup>

### I.6.4. Les vaccins dans le traitement du paludisme

La mise au point de vaccins contre le paludisme a connu une accélération marquée au cours des dix dernières années. Le nombre d'essais cliniques a augmenté et quelques antigènes ont été essayés en zone d'endémie. Les essais ont également montré sans ambiguïté qu'un certain niveau d'immunité clinique antipalustre pouvait être induit par vaccination, dans des conditions expérimentales ou sur le terrain.

Ainsi, les recherches ont permis la mise au point d'un vaccin antipaludique dénommé RTS,S préparé à partir des systèmes adjuvants AS02 et AS01<sup>166</sup> qui cible spécifiquement le stade pré-érythrocytaire de *Plasmodium falciparum*.<sup>167</sup> Jusque-là, l'efficacité n'avait été prouvée qu'au stade expérimental avec une protection partielle, voire totale dans certains cas. Réalisée en Afrique sur plus de 200 enfants, une étude randomisée en double aveugle a testé l'immunogénicité, l'efficacité et l'innocuité de ce vaccin lors d'essais cliniques de phase I et

---

<sup>160</sup> Biagini, G. A. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2584 – 2589.

<sup>161</sup> Borrmann, S. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 3749 – 3754.

<sup>162</sup> Roggero, R. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2816 – 2824.

<sup>163</sup> Wengelnik, K. et al. *Science* **2002**, *295*, 1311 – 1314.

<sup>164</sup> Coslédan, F. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 17579 – 17584.

<sup>165</sup> Meunier, B. *Acc. Chem Res.* **2008**, *41*, 69 – 77.

<sup>166</sup> Bejon, P. et al. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 2521 – 2532.

<sup>167</sup> Aide, P. et al. *PLoS One.* **2010**, *5*, e13838.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

II.<sup>168, 169, 170</sup> Ces nourrissons ont reçu soit 3 doses du vaccin antipaludique RTS,S/AS02D, soit 3 doses de vaccin contre l'hépatite B à l'âge de 10, 14 ou 18 semaines. Différents paramètres ont été mesurés : innocuité du vaccin durant les 6 premiers mois de l'étude, immunogénicité ou encore apparition de nouvelles infections à *Plasmodium falciparum* dans les 3 mois suivant l'arrêt du protocole vaccinal. Les résultats montrent des effets secondaires sérieux chez 16 % des enfants dans chacun des deux groupes. Durant la période de suivi, il y a eu 4 décès, tous en rapport avec une infection.

En conclusion, l'efficacité de ce vaccin est globalement estimée à 66 %. Il est considéré comme dénué d'effets secondaires nuisibles, bien toléré et hautement immunogénique chez les jeunes enfants vivant dans les régions rurales du sud du Mozambique. Ces données encourageantes ont permis le passage de ce vaccin en phase III.<sup>171</sup> La résultante des études lors de cette phase, permettrait d'envisager la mise à disposition prochaine d'un vaccin antipaludique efficace et une diminution du nombre de décès imputés à cette maladie infectieuse.<sup>171</sup>

## II. LA CHIMIE BIOORGANOMETALLIQUE

### II.1. Introduction

La chimie bioorganométallique consiste en la synthèse et l'étude d'espèces organométalliques d'intérêt biologique et médical. Au début de la chimie organométallique, toutes les molécules organométalliques considéraient uniquement une liaison  $\sigma$  entre le carbone et le métal.<sup>172</sup> Après la découverte du ferrocène,<sup>173</sup> de nouvelles liaisons métal-carbone ont été élucidées : les liaisons  $\pi$  et  $\delta$ . Cette diversité structurale a permis le développement de la chimie organométallique des métaux de transition puis de la chimie bioorganométallique.<sup>174,175,176,177</sup>

C'est aux alentours de la seconde moitié du 20<sup>ème</sup> siècle que débute la chimie organométallique des métaux de transition. Les domaines exploités furent la catalyse, plus particulièrement la polymérisation de Ziegler-Natta, la synthèse asymétrique et la métathèse des oléfines. Ce n'est que peu de temps après, qu'est née la chimie bioorganométallique. Effectivement, c'est en 1985 que ce terme fut utilisé pour la 1<sup>ère</sup> fois pour la synthèse et

<sup>168</sup> Aponte, J. J. et al. *Lancet*, **2007**, 370, 1543 – 1551.

<sup>169</sup> Alonso, P. L. et al. *Lancet*, **2005**, 366, 2012 – 2018.

<sup>170</sup> Alonso, P. L. et al. *Lancet*, **2004**, 364, 1411 – 1420.

<sup>171</sup> Casares, S.; Brumeanu, T-D.; Richie, T. L. *Vaccine*, **2010**, 28, 4880 – 4894.

<sup>172</sup> Kaim W, Schwederski B. *Bioinorganic Chemistry: Inorganic. Elements in the Chemistry of Life: An Introduction and Guide*. John Wiley: New York, **1994**, 267 – 286.

<sup>173</sup> Wilkinson, G. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 2125 – 2126.

<sup>174</sup> Cotton, F. A. ; Wilkinson, G.: *Advanced Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, **1962**.

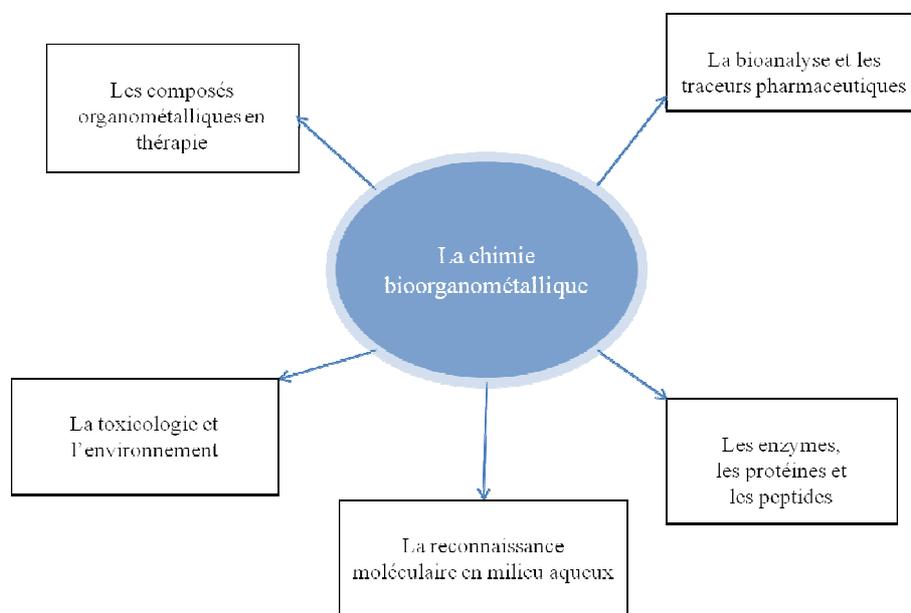
<sup>175</sup> Crabtree, R. H. *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*. Chap. 16, 2<sup>nd</sup> edition, J. Wiley and Sons, New York, **1994**.

<sup>176</sup> Elschenbroich, C.; Salzer, A.: *Organometallics - a Concise Introduction*. VCH Publishers, Weinheim. **1989**, pp 86 – 89.

<sup>177</sup> Chavain, N. ; Biot, C. *Curr. Med. Chem.* **2010**, 17, 2729 – 2745.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

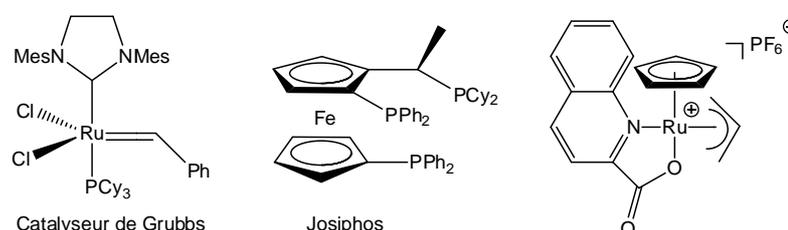
l'étude des espèces organométalliques ayant un intérêt biologique et médical.<sup>178,179</sup> La chimie bioorganométallique a connu très rapidement un essor considérable et aujourd'hui elle se subdivise en 5 grands domaines (Figure 20).<sup>180</sup>



**Figure 20** : Les 5 grands domaines d'application de la chimie bioorganométallique.<sup>180</sup>

## II.2. Les complexes organométalliques

On peut définir les complexes organométalliques comme étant des molécules dans lesquelles se trouve une liaison métal-carbone (M-C). Aussi, des doubles et triples liaisons métal-carbone sont également observées. Parmi les ligands couramment étudiés, on trouve le monoxyde de carbone, des molécules organiques telles que des alcènes, des alcynes, des arènes ou des groupes alkyles, des halogénures ou encore des phosphines. Sur la Figure 21 sont représentés quelques complexes organométalliques.



**Figure 21** : Complexes organométalliques.

Il est possible de déterminer le nombre d'électrons donnés par un ligand à l'aide d'une simple approche d'électrons de valence. Pour cela, le complexe organométallique doit

<sup>178</sup> Jaouen, G.; Vessières, A. *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57*, 1865 – 1874.

<sup>179</sup> Top, S. et al. *Organometallics.* **1985**, *4*, 2143 – 2150.

<sup>180</sup> Jaouen G, Beck W, McGlinchey MJ: *A Novel Field of Research: Bioorganometallic Chemistry, Origins, and Founding Principles.* Weinheim, Wiley-VCH, **2006**, pp 1–37.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

respecter la règle de 16 ou 18 électrons, qui correspond simplement à la règle d'octet appliquée aux complexes organométalliques.

## II.3. Les métallocènes<sup>181</sup>

Les métallocènes sont des complexes ayant comme formule générale  $Cp_2M$ , qui consistent en l'association de deux anions cyclopentadiényles liés à un métal de transition (bloc *d*) central dans son état d'oxydation II. Le nom métallocène dérive du ferrocène.<sup>173</sup> On dit de ces complexes qu'ils possèdent une structure sandwich. En effet, les deux anions cyclopentadiényles sont parallèles avec des longueurs et des forces de liaison égales.

Seuls les métallocènes des groupes 1 et 2 présentent une structure sandwich. Par contre, ceux du groupe 3 et la majorité des composés métallocéniques des groupes 4 et 5 ont une structure sandwich pliée. Effectivement les deux cycles cyclopentadiényles font un angle de  $130^\circ$  et sont accompagnés d'autres ligands dont le nombre peut aller jusqu'à trois, en particulier pour le groupe 5 (Figure 22).

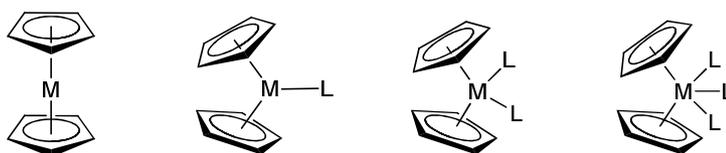


Figure 22 : Les différentes structures sandwichs des métallocènes.

Il existe des complexes demi-sandwich dont la structure comporte un cycle cyclopentadiényle ou benzénique et un à quatre autres ligands. Ce sont des complexes très stables, surtout lorsque les ligands sont de bons acides  $\pi$ , tels que CO et NO. Des exemples de complexes demi-sandwichs sont donnés sur la Figure 23.

Il existe également d'autres complexes cyclopentadiényles qui n'obéissent pas à la règle des 18 électrons. C'est le cas des complexes organométalliques paramagnétiques [ $M = V$  ( $n = 3e^-$ ),  $Cr$  ( $n = 4e^-$ ),  $Mn$  ( $n = 5e^-$ ),  $Co$  ( $n = 7e^-$ ),  $Ni$  ( $n = 8e^-$ )]. Ces complexes, très réactifs et difficiles à isoler ont tendance à former des liaisons covalentes différentes.

Les métallocènes possèdent des propriétés redox, c'est-à-dire qu'ils peuvent exister sous différents degrés d'oxydation. Ces différents états redox se caractérisent par méthode électrochimique en utilisant la voltamétrie cyclique, chaque vague correspondant à un changement d'un degré d'oxydation.

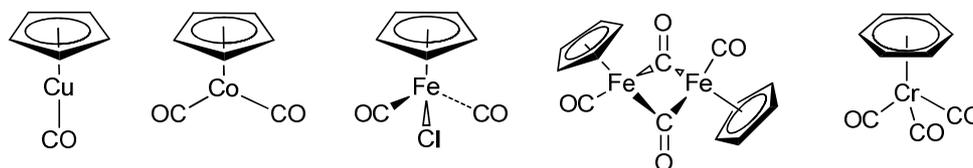
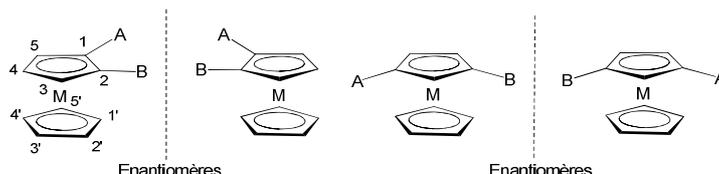


Figure 23 : Exemples de complexes demi-sandwichs.

<sup>181</sup> Astruc, D.: Chimie Organométallique : Les métaux-carbènes et carbynes. *EDP Sciences*, 2000, chapitre 10.

## II.3.1. Chiralité des métallocènes

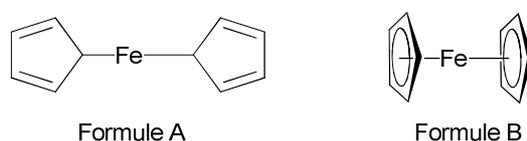
Les métallocènes peuvent présenter une chiralité lorsque deux substituants différents se trouvent sur le même cycle cyclopentadiényle. Cette chiralité s'appelle : « Chiralité plane ou métallocénique ». Elle n'est possible que lorsque le métallocène est hétérodisubstitué en 1,2 ou en 1,3 (Figure 23). Par contre, du fait de la libre rotation des cyclopentadiényles, les dérivés hétérosubstitués en 1,1' ne présentent aucune chiralité.



**Figure 24 :** Chiralité métallocénique ou plane des dérivés hétérodisubstitués en 1,2 ou 1,3.

## II.3.2. Le ferrocène

Le ferrocène (Fc) est un solide diamagnétique (bas spin) orangé, thermiquement stable ayant un moment dipolaire nul. C'est l'un des métallocènes le plus connu, qui fut découvert pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1951.<sup>182, 183</sup> Toutefois, la structure proposée était celle d'un complexe  $\sigma$  (Formule A : fer lié à un seul carbone de chaque cycle, Figure 25). Ce n'est que l'année suivante que la structure correcte de complexe  $\pi$  (Formule B : fer lié aux cinq carbones de chaque cycle, Figure 25) avait été proposée indépendamment et simultanément par Wilkinson<sup>173</sup> et Fischer.<sup>184</sup>



**Figure 25 :** 1<sup>ères</sup> structures du ferrocène.

La structure du ferrocène fut ensuite confirmée par spectroscopie RMN et cristallographie Rayons X.<sup>185, 186</sup> Sa structure distinctive mena à un engouement sans précédent pour la chimie des métaux du « bloc d » avec les hydrocarbures. Du fait de la libre rotation des cyclopentadiényles, le ferrocène possède deux conformations : la conformation prismatique (ou éclipsée) et la conformation antiprismatique (ou décalée) (Figure 26). Rosenblum et Woodward<sup>187</sup> ont montré qu'un équilibre s'établit entre ces deux conformations (Figure 26).

<sup>182</sup> Kealy, T. J.; Pauson, P. L. *Nature* **1951**, 168, 1039.

<sup>183</sup> Miller, S. A.; Tebboth, J. A.; Tremaine, J. F. *J. Chem. Soc.* **1952**, 632 – 635.

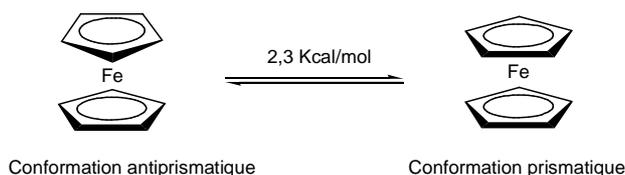
<sup>184</sup> Fischer, E. O.; Pfab, W. *Z. Naturforsch.* **1952**, 7b, 377.

<sup>185</sup> Dunitz, J. D.; Orgel, L. E.; Rich, A. *Acta Gryst.* **1956**, 9, 373 – 375.

<sup>186</sup> Laszlo, P.; Hoffmann, R. *Angew. Chem. Int. Ed Eng.* **2000**, 39, 123 – 124.

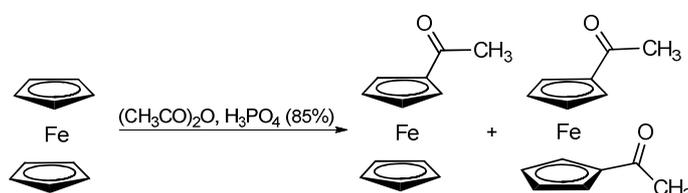
<sup>187</sup> Rosenblum, M.; Woodward, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 5443.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme



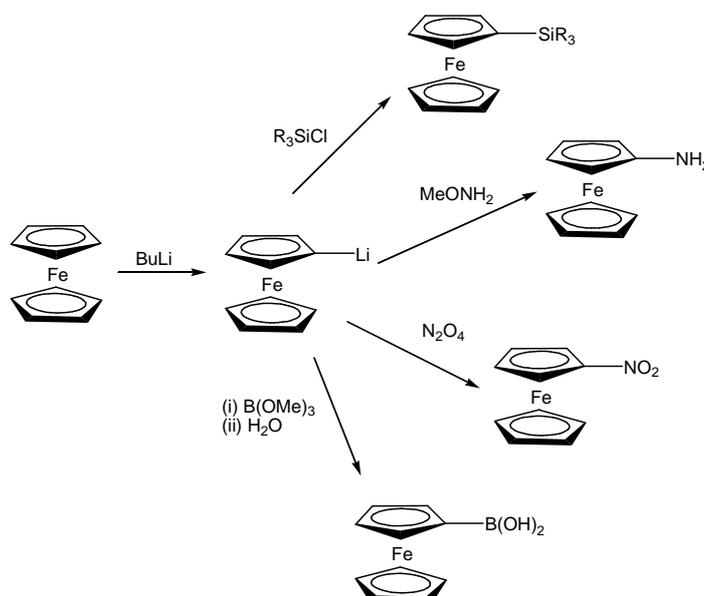
**Figure 26 :** Les deux conformations du ferrocène.

Le ferrocène est un complexe aromatique car les deux anions cyclopentadiényles ( $C_5H_5^-$ ) sont plans et possèdent 6 électrons  $\pi$ . On qualifie le ferrocène d'aromatique activé car il possède une réactivité plus grande qu'un composé aromatique ordinaire. La réaction d'acylation de Friedel et Crafts est un bon exemple. Elle ne requiert pas de catalyseur élaboré, seul l'acide phosphorique concentré suffit. Lorsque la réaction est chauffée à plus de  $60^\circ C$ , l'on obtient également une petite quantité de produit diacétylé sur l'autre cycle (Schéma 3).



**Schéma 3 :** Acétylation du ferrocène.

En synthèse organométallique, l'une des réactions couramment utilisées est la métallation. Un cyclopentadiényle du ferrocène peut réagir avec le butyllithium (BuLi) et former un nouveau complexe utilisable dans la préparation d'une série de nouveaux composés (Schéma 4).

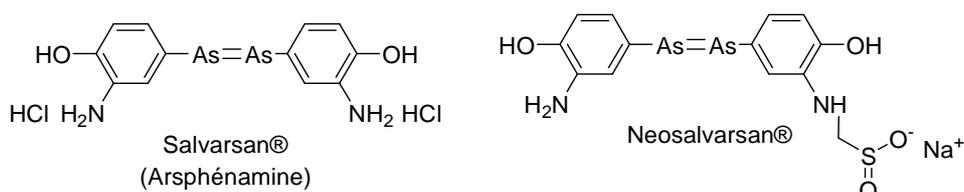


**Schéma 4 :** La métallation du ferrocène.

## II.4. Les molécules organométalliques biologiquement actives

### II.4.1. Les premiers médicaments organométalliques

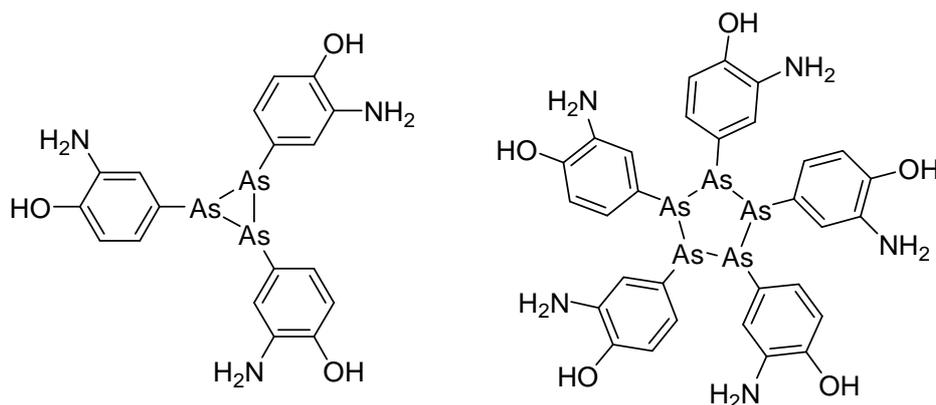
Par ses effets toxiques, l'arsenic a fait des ravages dans l'histoire. Au milieu du 17<sup>ème</sup> siècle en France, l'arsenic blanc,  $As_2O_3$ , fut appelé « poudre de succession ». Les avancés en chimie inorganique ont permis à Ehrlich (1854-1915) et d'autres de se rendre compte que les composés organométalliques d'arsenic pourraient être moins toxiques et plus faciles à manipuler, que leurs homologues inorganiques.



**Figure 27** : Structure chimique du Salvarsan® et du Neosalvarsan®.

En 1909, Paul Ehrlich (prix Nobel de médecine en 1908) met au point un dérivé de l'arsenic efficace contre la syphilis, le Salvarsan® (Figure 27). Ce fut le premier médicament de synthèse qu'il perfectionne par la suite sous le nom de Néosalvarsan® (Figure 27), utilisé jusqu'en 1945 et remplacé alors par la pénicilline. Le Salvarsan® n'est pas très soluble dans l'eau et sous sa forme d'hydrochlorure, il est très toxique. Par contre, le Neosalvarsan® est soluble dans l'eau.

Jusqu'à présent, le mécanisme d'action du Salvarsan n'est pas connu. Ce n'est que depuis peu que des études de spectrométrie de masse ont permis de proposer une structure convenable. Le Salvarsan® serait alors, un mélange d'oligomères dont les produits principaux seraient des cycles à 3 ou à 5 motifs d'arsénobenzol (Figure 28).<sup>188</sup>

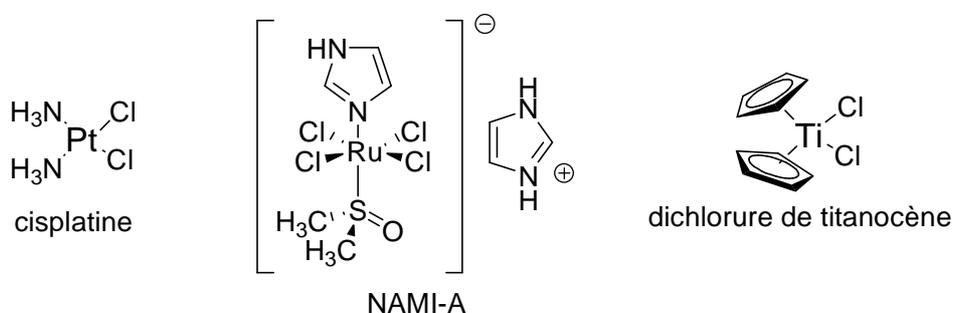


**Figure 28** : Structures cycliques du Salvarsan®.

<sup>188</sup> Lloyd, N. C., et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 941 – 944.

## II.4.2. Les complexes métalliques et les métallocènes dans la conception du médicament

Le cisplatine (Figure 29) qui est synthétisé pour la première fois par Peyronne en 1844, est présenté comme antitumoral par Rosenberg en 1965.<sup>189</sup> Le cisplatine est particulièrement actif contre le cancer des testicules. De par son activité limitée sur certains cancers, ses effets toxiques et le développement d'une résistance cellulaire au platine, les chercheurs se sont lancés dans la synthèse d'autres molécules anticancéreuses. L'utilisation du ruthénium semble une bonne alternative. En effet, un sel de ruthénium, le trans-imidazole(diméthylsulfoxyde)tétrachlororuthénate d'imidazolium (NAMI-A, Figure 29) est intéressant pour son activité anti-métastatique et sa faible toxicité *in vivo*.<sup>190, 191</sup> Tout dernièrement, des études *in vitro* de NAMI-A en combinaison thérapeutique avec l'électroporation ont été faites sur des cellules tumorales de B16F1 en Slovénie.<sup>192</sup>



**Figure 29** : Structure chimique du cisplatine, du NAMI-A et du chlorure de titanocène.

Suite aux résultats intéressants obtenus avec le sel de ruthénium, la recherche de médicaments s'est orientée vers les complexes métallocéniques. Ainsi, le dichlorure de titanocène (Figure 29), analogue du cisplatine, a été synthétisé. Ce métallocène aux propriétés antiprolifératives était en phase II d'essais cliniques.<sup>193</sup> Mais, les tests cliniques ont été récemment arrêtés du fait de son activité insuffisante. Une récente approche consiste à modifier des bio-ligands connus *via* la chimie organométallique dans le but d'optimiser leurs effets. Par la présence d'une entité organométallique, les chercheurs souhaitent observer une augmentation de l'efficacité et peut-être la formation d'espèces oxydées près du site actif.<sup>194, 195, 196, 197</sup> L'utilisation de cette stratégie a conduit à la naissance de deux familles de molécules : les ferrocifènes et la ferroquine (FQ).

<sup>189</sup> Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. *Nature*. **1965**, *205*, 698 – 699.

<sup>190</sup> Carmona, D.; P. Lamata, M.; Oro, L. A. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 2239 – 2251.

<sup>191</sup> Velders, A. H., et al. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1110 – 1121.

<sup>192</sup> Bicek, A.; Turel, I.; Kanduser, M.; Miklavcic, D. *Bioelectrochemistry* **2007**, *71*, 113 – 117.

<sup>193</sup> Mross, K., et al. *onkologie*. **2000**, *23*, 576 – 579.

<sup>194</sup> Brocard, J.; Lebibi, J.; Maciejewski, L. *French Patent 2733985-A1*, **1996**.

<sup>195</sup> Jaouen, G., et al. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2505 – 2517.

<sup>196</sup> Biot, C. et al. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3715 – 3718.

<sup>197</sup> Biot, C. et al. *J. Organomet. Chem.* **1999**, *589*, 59 – 65.

## a. Le ferrocifène

Dans les pays économiquement développés, une femme sur huit est atteinte du cancer du sein. Ainsi, le Tamoxifène (Figure 30), qui est un modulateur sélectif des récepteurs des œstrogènes, est utilisé sous forme orale dans le cancer du sein. Il est pour l'instant le traitement le plus vendu dans le cadre du traitement de ce cancer. Il est utilisé dans le traitement de cancers du sein en phase précoce ou avancée chez les femmes pré- et post-ménopausées. Cependant, le Tamoxifène n'est efficace que contre les cancers dits "hormono-dépendants".<sup>198, 199</sup>

D'une manière générale, les cancers du sein peuvent être classés en deux groupes qui se distinguent par la présence [ER(+)] ou l'absence [ER(-)] de récepteurs d'œstrogènes.<sup>200</sup> Environ deux tiers des cas sont ER(+), il s'agit d'une surexpression du récepteur œstrogène qui peut être traité par une hormono-thérapie par des modulateurs sélectifs des récepteurs d'œstrogènes (SERMs = Selective Estrogen Receptor Modulators) tel que le tamoxifène. Dans la lignée des cellules ER(+), il existe deux sous types de récepteurs : ER $\alpha$  et ER $\beta$ .<sup>200</sup>

La forme active du tamoxifène est son métabolite : le 4-hydroxytamoxifène (OHT).<sup>201</sup> Cependant, pour des raisons de biodisponibilité, c'est le tamoxifène qui est administré (Figure 30). L'action antiproliférative de l'hydroxytamoxifène est due à une liaison compétitive aux ERs. La transcription de l'ADN œstradio-médiatée est alors réprimée dans les tissus tumoraux.<sup>202</sup>

Malheureusement, les cellules tumorales peuvent changer sous la thérapie et l'expression des ER $\alpha$  peut être diminuée de telle sorte que la prise de Tamoxifène n'a plus d'effet comme chez les patientes à ER(-). Il semblait donc important de trouver de nouvelles molécules. C'est ainsi que Gérard Jaouen et son équipe ont eu l'idée de remplacer un benzène par un ferrocène dans la molécule d'hydroxytamoxifène. Cette pharmacomodulation a donné naissance à des hydroxyferrocifènes (Figure 30). Sur des cellules MCF-7, lignée de cellules du cancer du sein hormono-dépendant (ER+), les effets des hydroxyferrocifènes sont très similaires à ceux de l'hydroxytamoxifène. Les deux catégories de molécules ont le même effet antiprolifératif, mais l'activité anti-œstrogène des hydroxyferrocifènes est meilleure.<sup>203</sup> Par contre, sur des cellules MDA-MB231, lignée de cellules du cancer du sein hormono-indépendant (ER-), les effets des hydroxyferrocifènes sont spectaculairement différents. En effet, les analogues hydroxyferrocifènes sont antiprolifératifs là où les hydroxytamoxifènes ne le sont pas complètement. En somme, les hydroxyferrocifènes sont actives sur les deux types de cancer du sein hormono-dépendant et hormono-indépendant.<sup>203</sup>

---

<sup>198</sup> Jordan, C. V. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 883 – 908.

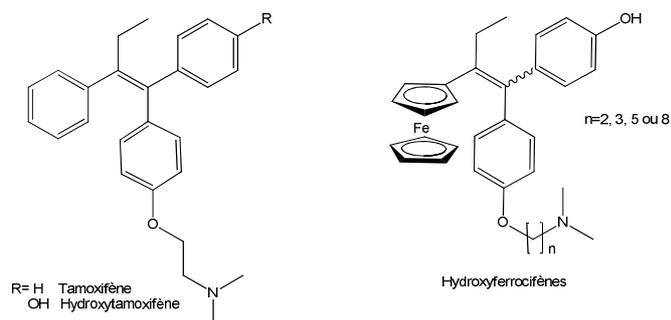
<sup>199</sup> Jordan, C. V. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1081 – 1111.

<sup>200</sup> Schatzschneider, U.; Metzler-N. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1504 – 1507.

<sup>201</sup> Grainger, D. J.; Metcalfe, J. C. *Nature Medicine*, **1996**, *2*, 381 – 385.

<sup>202</sup> Shiau, A. K, et al. *Cell.* **1998**, *95*, 927 – 937.

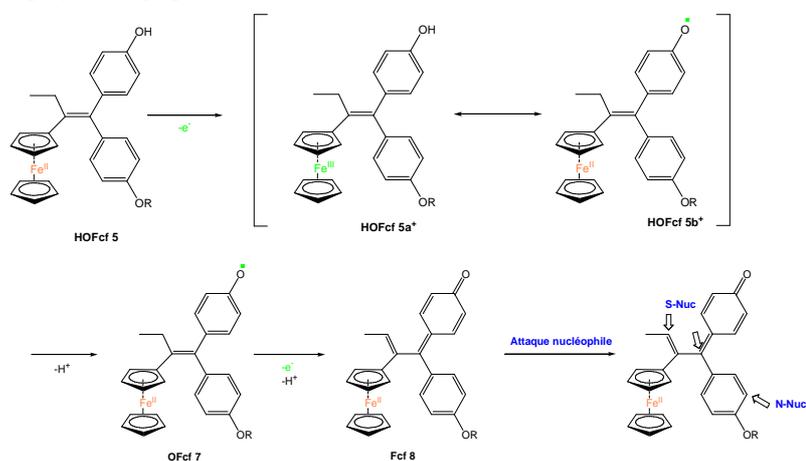
<sup>203</sup> Top, S. ; Jaouen, G., et al. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5223 – 5236.



**Figure 30** : Structures chimiques du Tamoxifène, de l'Hydroxytamoxifène et des Hydroxyferrocifènes.

L'équipe du Pr. G. Jaouen a également exploré l'influence du potentiel redox  $Fe^{II/III}$  et du pH de la solution sur les propriétés cytotoxiques à l'aide d'expériences électrochimiques.<sup>204</sup> L'électrochimie du couple  $[Fe(Cp)_2]^+/[Fe(Cp)_2]$  est une réaction réversible à un électron.

Le processus d'activation redox des hydroxyferrocifènes est représenté dans le Schéma 5. Lors de l'oxydation du ferrocène, la charge positive est partiellement délocalisée en para sur le groupement hydroxyle au travers du système  $\pi$  conjugué rendant le proton acide et accessible à une base (HOFcf 5a<sup>+</sup> et HOFcf 5b<sup>+</sup>). Cette délocalisation du radical a été montrée par calculs DFT. Dans une seconde étape d'oxydation, la perte du proton forme une quinone méthylène (Fcf 8). Les quinones méthylènes des hydroxytamoxifènes sont connues comme étant exceptionnellement stables avec une durée de demi-vie de 3 heures sous certaines conditions physiologiques.



**Schéma 5** : Activation redox des hydroxyferrocifènes (5).<sup>200</sup>

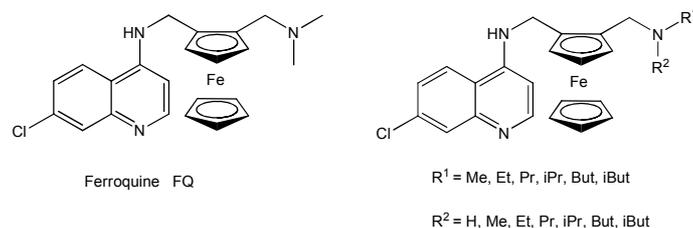
## b. La Ferroquine

Il a été montré précédemment que le paludisme demeure jusqu'aujourd'hui l'une des maladies parasitaires la plus répandue dans le monde. Le parasite, *Plasmodium falciparum*, a su développer une forte résistance à bon nombre de médicaments notamment à la

<sup>204</sup> Hillard, E., et al. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 291 – 296.

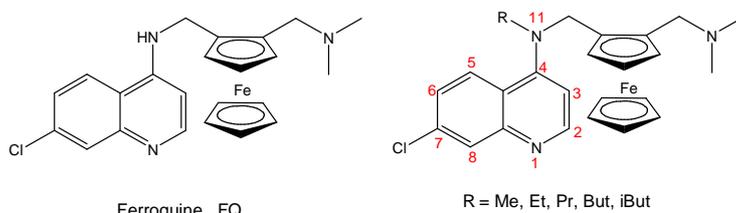


# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme



**Figure 32** : Modification de la Ferroquine sur l'azote *N*-terminal.

Dans un premier temps, elle a modifié l'amine terminale par la synthèse d'amines secondaires et tertiaires de la FQ par l'ajout des groupements alkyles (Figure 32). Ces composés ont sensiblement la même activité que la FQ, donc plus actifs que la CQ, que ce soit sur des clones chloroquino-résistants ou chloroquino-sensibles. Elle s'est également intéressée à l'étude de leurs propriétés physicochimiques ( $\log D$ ). De ce fait, il en ressort que : (i) la légère modification sur l'amine basique terminale de la FQ n'affecte pas son activité si les substituants ne sont pas trop volumineux ;<sup>214</sup> (ii) quel que soit le choix des substituants sur la position amine terminale de la FQ, la molécule possède un caractère hydrophile ( $-0.80 \leq \log D \leq 1.44$ ) à pH vacuolaire et lipophile ( $3.04 \leq \log D \leq 4.73$ ) à pH cytosolique comme pour la FQ. Ainsi, il semble que ce profil de lipophilie est fondamental pour l'activité antipaludique *in vitro* des molécules de 10 nM. Lors de leurs récentes découvertes sur le mécanisme de formation de l'hémozoïne, Egan<sup>215</sup> et Sullivan<sup>216,217</sup> suggèrent que ce phénomène se produit à l'interface eau/lipide et expliquent en partie la plus forte activité antipaludique de la FQ et de ses dérivés par rapport à la CQ. En effet, puisque la FQ est plus lipophile que la CQ, elle 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.



**Figure 33** : Analogues de la FQ modifiée en position 11.

Une seconde étude visait la modification de l'azote en position 4 du cycle quinoléique en greffant également des groupements alkyles (Figure 33). Le but ici était de comprendre l'influence des valeurs de  $pK_a$  dans le mécanisme d'action de la FQ. Avec un substituant en cette position, le transfert de proton de la position 1 à la 11<sup>ème</sup> n'est plus possible sur la forme neutre (Schéma 6). Après avoir testé également ses composés, ils se sont avérés être moins actifs que la CQ sur des clones chloroquino-sensibles, mais plus actifs sur des clones chloroquino-résistants. Par contre, par rapport à la FQ elle-même, ces composés ont perdu en

<sup>214</sup> Biot et al. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4707 – 4714.

<sup>215</sup> Egan, T. J. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1288 – 1299.

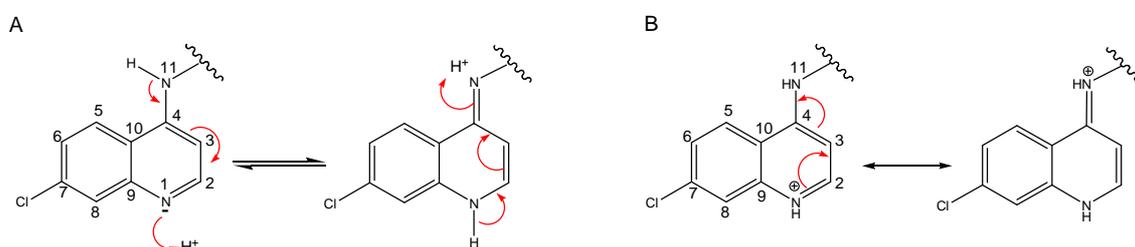
<sup>216</sup> Pisciotta, J. M. et al. *Biochem. J.* **2007**, *402*, 197 – 204.

<sup>217</sup> Pisciotta, J. M. ; Sullivan, D. *Parasitol. Inter.* **2008**, *57*, 89 – 96.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

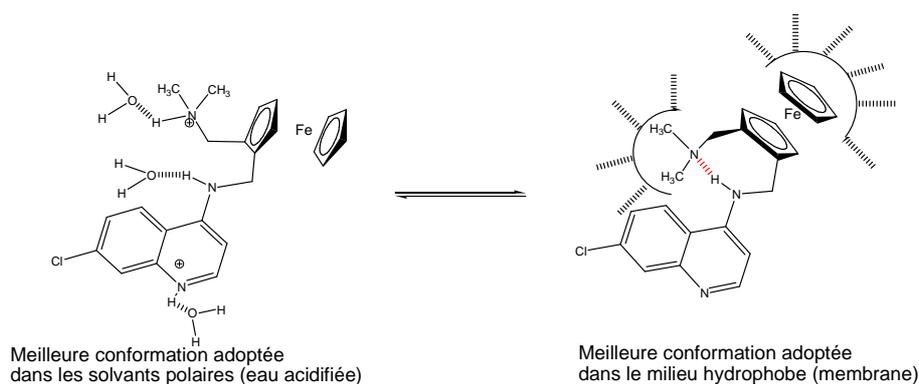
activité antiplasmodiale. Cette étude a permis de conclure que l'introduction d'un groupement alkyle en position 11 de la FQ n'est pas favorable à l'activité antipaludique.

Tout comme pour les premières molécules modifiées, l'étude des propriétés physicochimiques a été réalisée. Il en ressort que l'introduction d'une chaîne alkyle en position 11 rend la molécule plus lipophile à pH vacuolaire. Plus le substituant en cette position est encombrant, plus la molécule devient lipophile. La décroissance de l'activité antipaludique de cette série de dérivés de la FQ, s'expliquerait par l'augmentation de la lipophilie au pH vacuolaire. Ainsi, ces molécules, seraient peut-être trop lipophiles, et donc, 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.



**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).

Au terme de leurs travaux, Biot et coll. ont pu démontrer 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 coudée qui, non seulement permettrait au groupement hydrophobe ferrocénique de se placer au niveau des lipides de la membrane vacuolaire là où est supposée cristalliser l'hémozoïne, mais également rendrait accessible le cycle quinoléine pour son interaction avec la porphyrine (Figure 34).



**Figure 34 :** Proposition d'interactions de la FQ avec les lipides de la membrane vacuolaire et la porphyrine.<sup>218</sup>

<sup>218</sup> Biot, C., et al. *J. Organomet. Chem.* **2009**, 694, 845 – 854.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

En 2005, après avoir fait des études comparatives des propriétés physicochimiques entre la FQ et la CQ, Biot et coll. proposent des relations structure-activité de la FQ qui sont reprises sur la Figure 35.<sup>219</sup>

En somme, tout comme la CQ, la FQ forme un complexe avec l'hématine en solution ( $\log K = 4.95 \pm 0.05$ ). La FQ est le meilleur inhibiteur de la formation de la  $\beta$ -hématine contrairement à la CQ ( $CI_{50} = 0.78$  contre 1.9 pour CQ). La FQ est plus lipophile que la CQ quand elle est protonée dans la vacuole digestive du parasite  $pH = 5.2$  ( $\log D = -0.77$  contre -1.2 pour CQ), la différence est significative à  $pH = 7.4$  dans le cytosol ( $\log D = 2.95$  et 0.85 respectivement) où la FQ est plus hydrophile que la CQ. Aussi, les valeurs de  $pK_a$  sont faibles ( $pK_{a1} = 8.19$  et  $pK_{a2} = 6.99$ ) par rapport à celles de la CQ (10.03 et 7.94 respectivement). La structure cristalline de la FQ met en évidence la présence d'une importante liaison hydrogène interne entre le groupe 4-amino et l'azote terminal. Ceci, en plus de la propriété donneur d'électron du groupement ferrocénique, expliquerait la baisse des valeurs de  $pK_a$ . D'une manière intéressante, la baisse d'accumulation dans la vacuole digestive du parasite provenant de la faible basicité de ce composé, expliquerait la forte inhibition de la  $\beta$ -hématine. L'augmentation de la lipophilie, les différences de structures géométriques et électroniques, les changements de distance N-N dans la ferroquine comparés à la chloroquine, expliqueraient probablement son activité antipaludique sur des parasites chloroquino-résistants.

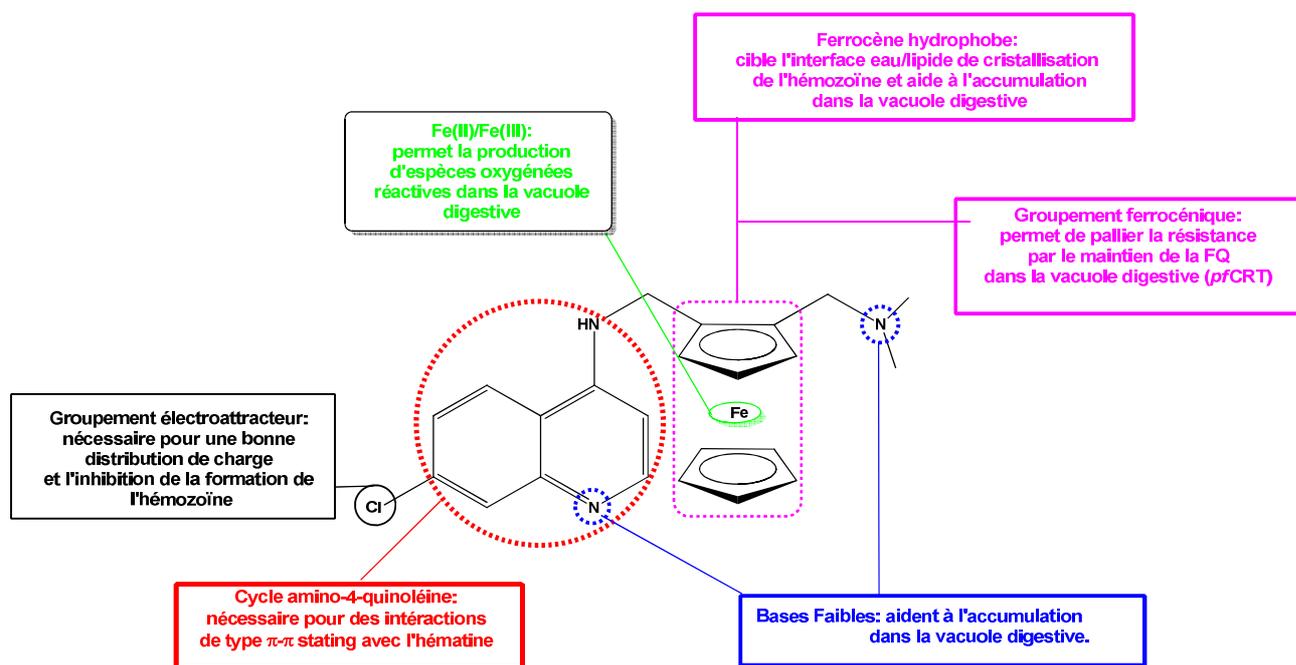


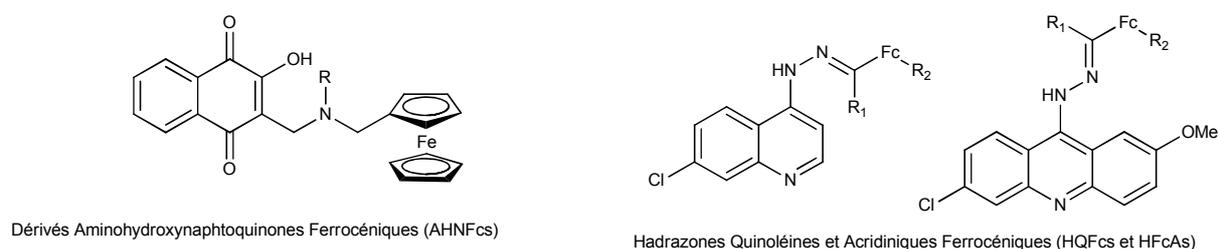
Figure 35 : Relations Structure-Activité proposée pour FQ.<sup>219</sup>

<sup>219</sup> Biot, C., et al. *Mol. Pharm.* **2005**, 3, 185 – 193.

## II.4.3. Conception et synthèse des nouveaux composés métallocéniques

Dans la continuité du progrès de la chimie bioorganométallique, nous nous sommes orientés vers la synthèse d'autres composés métallocéniques, ayant en commun un motif ferrocénique, en nous basant sur la pharmacomodulation des molécules biologiquement actives.

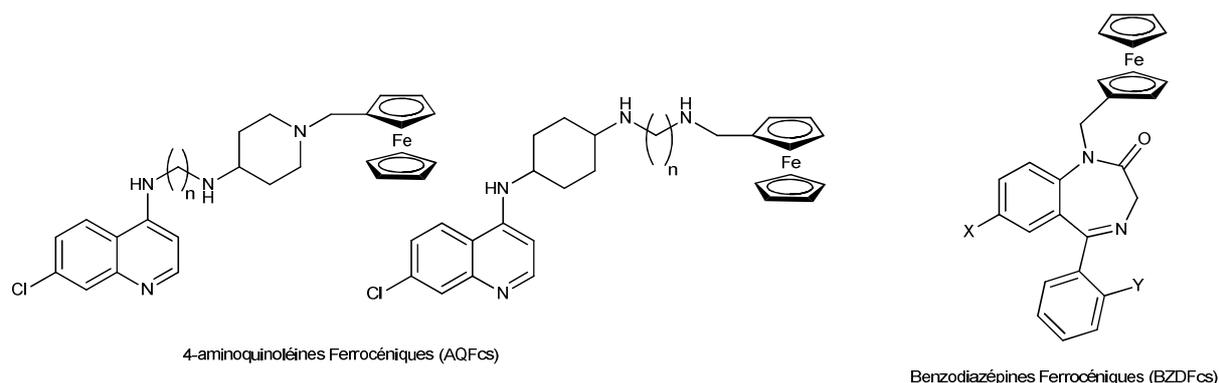
Ainsi, les dérivés d'hydroxynaphtoquinones ferrocéniques (Figure 36) dans le traitement du paludisme et de la toxoplasmose (§ chap. II), les hydrazones quinoléiques et acridiniques ferrocéniques (Figure 36, § chap. III) en paludisme et tuberculose furent étudiés.



**Figure 36 :** Schéma général des AHNFCs, des HQFcS et des HFcAs.

Suite aux premiers résultats obtenus, notamment des hydrazones quinoléines, nous avons continué notre étude par la synthèse des 4-aminoquinoléines ferrocéniques (Figure 37, § chap IV). Les activités antiplasmodiale et cytotoxique de ces dernières furent étudiées.

Les composés antipaludiques ne se limitant pas uniquement aux quinoléines, nous nous sommes enfin intéressés à la famille des benzodiazépines (Figure 37). Par une technique microonde, nous avons réussi à optimiser leurs synthèses afin d'étudier leurs activités sur *P. falciparum* (§ chap V).



**Figure 37 :** Schéma général des AQFcS et BZDFcS.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. World malaria report 2009. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901_eng.pdf). Consulté le 25 avril 2011
2. Organisation Mondiale de la Santé (OMS), <http://www.who.int/topics/malaria/fr/index.html>. Consulté le 25 avril 2011
3. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé **1999**, 77, 624 – 640.
4. World malaria repport 2010: [http://www.reliefweb.int/rw/lib.nsf/db900sid/EGUA-8C5MGM/\\$file/who\\_world\\_malaria\\_report\\_2010.pdf](http://www.reliefweb.int/rw/lib.nsf/db900sid/EGUA-8C5MGM/$file/who_world_malaria_report_2010.pdf). Consulté le 25 avril 2011
5. <http://www.rollbackmalaria.org/gmap/part1-fr.pdf>. Consulté le 25 avril 2011
6. Daniel-Ribeiro, C. T.; Lacerda M. V.; Oliveira-Ferreira, J.: *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: some aspects of its epidemiology, clinical spectrum and naturally induced immune responses. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **2008**, 101, 243 – 248.
7. Baird, J. K.; Hoffman, S. L. : Primaquine Therapy for Malaria. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, 39, 1336 – 1345.
8. 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.
9. Yuda, M. ; Ishino, T.: Liver invasion by malarial parasites – how do malarial parasites break through the host barrier? *Cellular Microbiology.* **2004**, 6, 1119 –1125.
10. Baer, K.; Klotz, C.; Kappe, Stefan, H.I.; Schnieder, T.; Frevvert, U. : Release of Hepatic Plasmodium yoelii Merozoites into the Pulmonary Microvasculature. *PLoS Pathogens.* **2007**, 3, 1651 – 1668.
11. Diebner, H. H.; Eichner, M.; Molineaux, L. ; Collins, W. E.; JEFFERY, G. M.; Detz, K.: Modelling the Transition of Asexual Blood Stages of *Plasmodium falciparum* to Gametocytes. . *J. Theor. Biol.* **2000**, 202, 113 – 127.
12. Lacroix, R.; Mukabana, W. R. ; Gouagna, L. C.; Koella, J. C.: Malaria Infection Increases Attractiveness of Humans to Mosquitoes. *PLoS Biol.* **2005**, 3, 1550 – 1553.
13. Vlachou, D.; Schlegelmilch, T.; Runn, E.; Mendes, A.; Kafatos, F. C.: The developmental migration of Plasmodium in mosquitoes. *Current Opinion in Genetics & Development.* **2006**, 16, 384 – 391.
14. Rosenthal, P. J.: Cysteine proteases of malaria parasites. *International Journal for Parasitology.* **2004**, 34, 1489 – 1499.
15. Francis, S. E.; Gluzman, I. Y.; Oksman, A.; Knickerbocker, A.; Mueller, R.; Bryant, M. L.; Sherman, D. R.; Russell, D. G.; Goldberg, D. E.: Molecular characterization and inhibition of a Plasmodium falciparum aspartic hemoglobinase. *Journal of the European Molecular Biology Organization.* **1994**, 13, 306 – 317.
16. Rosenthal, P. J.: Hydrolysis of erythrocyte proteins by proteases of malaria parasites. *Current Opinion in Hematology.* **2002**, 9, 140 – 145.
17. 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.
18. Divo A. A.; Geary T. G.; Davis N. L.; Jensen J. B.: Nutritional requirements of Plasmodium falciparum in culture. I. Exogenously supplied dialyzable components necessary for continuous growth. *J. Protozool.* **1985**, 32, 59 – 64.
19. Kirk, Kiaran: Membrane Transport in the Malaria-Infected Erythrocyte. *Physiological Reviews.* **2001**, 81, 495 – 537.
20. Lew, V. L.; Macdonald, L.; Ginsburg, H.; Krugliak, M.; Tifferta, T.: Excess haemoglobin digestion by malaria parasites: a strategy to prevent premature host cell lysis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* **2004**, 32, 353 – 359.
21. Egan, T. J.: Haemozoin formation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, 155, 127 – 136.
22. Rosenthal, P. J.; Meshnick, S. R.: Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, 83, 131 – 139.
23. Lazarus, M. D. ; Schneider, T. G. ; Taraschi, T. F.: A new model for hemoglobin ingestion and transport by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Cell Science.* **2008**, 128, 1937 – 1949.
24. Hoppe, H. C.; van Schalkwyk, D. A.; Wiehart, U. I. M.; Meredith, S.A.; Egan, J.; Weber, B. W.: Antimalarial Quinolines and Artemisinin Inhibit Endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 2370 – 2378.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

25. Elliot, D. A.; McIntosh, M. T.; Hosgood III, H. D.; Chen, S.; Zhang, G.; Baevova, P.; Joiner, K. A.: Four distinct pathways of hemoglobin uptake in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 2463 – 2468.
26. Slomianny, C.: Three-dimensional reconstruction of the feeding process of the malaria parasite. *Blood cells*, **1990**, *16*, 369 – 378.
27. Abu Bakar, N.; Klonis, N.; Hanssen, E.; Chan, C.; Tilley, L.: Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Cell. Sci.* **2010**, *123*, 441 – 450.
28. Rosenthal, P. J.; Meshnick, S. R.: Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, *83*, 131 – 139.
29. 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.* **2002**, *99*, 990 – 995.
30. Becker, k.; Tilley, L.; Vennerstrom, J. L.; Roberts, D.; Rogersone, S.; Ginsburg, H. : Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host–parasite interactions. *Int. J. Parasitol.* **2004**, *34*, 163 – 189.
31. Kumar, S.; Bandyopadhyay, U.: Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol. Lett.* **2005**, *157*, 175 – 188.
32. 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 Schalkwijk, D. A.; Walden, J. C.: Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* **2002**, *365*, 343 – 347.
33. Sullivan, D. J.: Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *J. parasitol.* **2002**, *32*, 1645 – 1653.
34. Foley, M.; Tilley, L.: Quinoline Antimalarials: Mechanisms of Action and Resistance and Prospects for New Agents. *Pharmacol. Ther.* **1998**, *79*, 55 – 87.
35. 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.* **1991**, *88*, 325 – 329.
36. 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.
37. Adams, P. A.; Berman, P. A. M.; Egan, T. J.; Marsh, P. J.; Silver, J.: The Iron Environment in Heme and Heme-Antimalarial Complexes of Pharmacological Interest. *J. Inorg. Biochem.* **1996**, *63*, 69 – 77.
38. Webster, G. T.; Tilley, L.; Deed, S.; McNaughtona, D.; Wood, B. R.: Resonance Raman spectroscopy can detect structural changes in haemozoin (malaria pigment) following incubation with chloroquine in infected erythrocytes. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 1087 – 1092.
39. Fitch, C. D.; Kanjanangulpan, P.: The State of Ferriprotoporphyrin IX in Malaria Pigment. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 15552 – 15555.
40. Sienkiewicz, A.; Krzystek, J.; Vileno, B.; Chatain, G.; Kosar, A. J.; Bohle, D. S.; Forro, L.: Multi-Frequency High-Field EPR Study of Iron Centers in Malarial Pigments. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4534 – 4535.
41. Wood, B. R.; Langforda, S. J.; Cooke, B. M.; Glenister, F. K.; Lima, J.; McNaughtona, D. : Raman imaging of hemozoin within the food vacuole of *Plasmodium falciparum* trophozoites. *FEBS Lett.* **2003**, *554*, 247 – 252.
42. Egan, T. J.; Chena, J. Y.-J.; de Villiers, K. A.; Mabothe, T. E.; Naidoo, K. J.; Ncokazi, K. K.; Langford, S. J.; McNaughton, D.: Haemozoin (b-haematin) biomineralization occurs by self-assembly near the lipid/water interface. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 5105 – 5110.
43. Pagola, S.; Stephens, P. W.; Bohle, D. S.; Kosar, A. D.; Madsen, S. K.: The structure of malaria pigment b-haematin. *Nature.* **2000**, *404*, 307 – 310.
44. Klonis, N.; Dilanian, R.; Hanssen, E.; Darmanin, C.; Streltsov, V.; Deed, S.; Quiney, H.; Tilley, L.: Hematin-Hematin Self-Association States Involved in the Formation and Reactivity of the Malaria Parasite Pigment, Hemozoin. *Biochemistry.* **2010**, *49*, 6804 – 6811.
45. Good M. F.; Doolan D. L. Malaria Vaccine Design: Immunological Considerations. *Immunity*, **2010**, *33*, 555 – 566.
46. Pichyangkul, S.; Gettayacamin, M.; Miller, R. S.; Lyon, J. A.; Angov, E.; Tongtawe, P.; Ruble, D. L.; Heppner Jr., D. G.; Kester, K. E.; Balloud, W. R.; Diggs, C. L.; Voss, G.; Cohen, J. D.; Walsh, D. S.; Pre-clinical evaluation of the malaria vaccine candidate *P. falciparum* MSP142 formulated with novel adjuvants or with alum. *Vaccine* **2004**, *22*, 3831 – 3840.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

47. Dauvillé, D.; Delhay, S.; Gruyer, S.; Slomianny, C.; Moretz, S. E.; d'Hulst, C.; Long, C. A.; Ball, S. G.; Tomavo, S. : Engineering the Chloroplast Targeted Malarial Vaccine Antigens in *Chlamydomonas* Starch Granules. *PLoS One*, **2010**, *5*, e15424.
48. OMS, Médecine traditionnelle : <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs134/fr/>, consulté le 29.09.10
49. Noedl, H.; Krudsood, S.; Chalermratana, K.; Silachamroon, U.; Leowattana, W.; Tangpukdee, N.; Looareesuwan, S.; Miller, R. S.; Fukuda, M.; Jongsakul, K.; Sriwichai, S.; Rowan, J.; Bhattacharyya, H.; Ohrt, C.; Knirsch, C. : Azithromycin Combination Therapy with Artesunate or Quinine for the Treatment of Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Adults : A Randomized, Phase 2 Clinical Trial in Thailand. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *43*, 1264 – 1271.
50. Egan, T. J.: Haemozoin (malaria pigment): a unique crystalline drug target. *Targets*, **2003**, *2*, 115 – 124.
51. Telley, L.; Loria, P.; Foley, M.: Chloroquine and Other Quinoline Antimalarials, dans *Antimalarial Chemotherapy* (Ed. Rosenthal, P. J.), Humana press, Totowa, NJ, **2001**, pp. 87 – 121.
52. Wunsch, S.; Sanchez, C. P.; Gekle, M.; Große-Wortmann, L.; Wiesner, J.; Lanzer, M.: Differential Stimulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Determines Chloroquine Uptake in *Plasmodium falciparum*. *J. Cell. Biol.* **1998**, *140*, 335 – 345.
53. Bray, P. G.; Ward, S. A.; Ginsburg, H.: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter, Chloroquine Uptake and Drug Resistance: Inconsistencies in a Newly Proposed Model. *Parasitol. Today*. **1999**, *15*, 360 – 363.
54. Gligorićević, B.; Bennett, T.; McAllister, R.; Urbach, J. S.; Roepe, P. D.: Spinning Disk Confocal Microscopy of Live, Intraerythrocytic Malarial Parasites. 2. Altered Vacuolar Volume Regulation in Drug Resistant Malaria. *Biochem.* **2006**, *45*, 12411 – 12423.
55. 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.
56. Fitch, C. D.: Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci.* **2004**, *74*, 1957 – 1972.
57. Hoppe, H. C. van Schalkwyk, D. A.; Wiehart, U. I. M.; Meredith, S. A.; Egan, J.; Weber, B. W.: Antimalarial Quinolines and Artemisinin Inhibit Endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2370 – 2378.
58. Campanale, N.; Nickel, C.; Daubenberger, C. A.; Wehlan, D. A.; Gorman, J. J.; Klonis, N.; Becker, K.; Tilley, L.: Identification and Characterization of Heme-interacting Proteins in the Malaria Parasite, *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 27354 – 27361.
59. Satchell, J. F.; Malby, R. L.; Luo, C. S.; Adisa, A.; Alpyurek, A. E.; Klonis, N.; Smith, B. J.; Tilley, L.; Colman, P. M.: Structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*. *Acta Crystallographica*. **2005**, *D61*, 1213 – 1221.
60. Hastings, I. M.: The origins of antimalarial drug resistance. *TRENDS Parasitol.* **2004**, *20*, 512 – 518.
61. Wellem, T. E. ; Plowe, C. V.: Chloroquine-Resistant Malaria. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 770 – 776.
62. Ginsburg, H.: Should chloroquine be laid to rest? *Acta Tropica*. **2005**, *95*, 16 – 23.
63. Trape, J. F.; Pison, G.; Preziosi, M.-P. ; Enel, C.; du Lôu, A. D.; Delaunay, V.; Samb, B.; Lagarde, E.; Molez, J-F.: Impact of chloroquine resistance on malaria mortality. *Life Sci.* **1998**, *218*, 689 – 697.
64. Schlitzer, M.: Malaria Chemotherapeutics Part I: History of Antimalarial Drug Development, Currently Used Therapeutics, and Drugs in Clinical Development. *ChemMedChem*. **2007**, *2*, 944 – 986.
65. Pradines B.; Pages, J. M.; Barbe, J.: Chemosensitizers in drug transport mechanisms involved in protozoan resistance. *Curr. Drug Targets – Infect. Disorders*. **2005**, *5*, 411 – 431.
66. Henry, M.; Alibert, S.; Orlandi-Pradines, E.; Bogreau, H.; Fusai, T.; Rogier, C.; Barbe, J.; Pradines, B.: Chloroquine resistance reversal agents as promising antimalarial drugs. *Curr Drug Targets*. **2006**, *7*, 935 – 948.
67. Henry, M.; Alibert, S.; Rogier, C.; Barbe, J.; Pradines, B.: Inhibition of efflux of quinolines as new therapeutic strategy in malaria. *Curr. Topics Med. Chem.* **2008**, *8*, 563 – 578.
68. Alibert-Franco, S.; Pradines, B.; Mahamoud, A.; Davin-Regli, A.; Pagès, J. M. : Efflux mechanism, an attractive target to combat multidrug resistant *Plasmodium falciparum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 301 – 317.
69. Chun, N.; Russell, B.; Staley, J.; Kotecka, B.; Nasveld, P.; Cheng, Q.: Sequence Polymorphisms in *pfprt* Are Strongly Associated with Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum*. *J. Infect. Dis.* **2001**, *183*, 1543 – 1545.
70. Basko, L. K.; Ringwalda, P. : Analysis of the Key *pfprt* Point Mutation and In Vitro and In Vivo Response to Chloroquine in Yaoundé, Cameroon. *J. Infect. Dis.* **2001**, *183*, 1828 – 1831.
71. 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.

## Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

72. Johnson, D. J.; Fidock, D. A.; Mungthin, M.; Lakshmanan, V.; Sidhu, A. B. S.; Bray, P. G.; Ward, S. A.: Evidence for a Central Role for PfCRT in Conferring *Plasmodium falciparum* Resistance to Diverse Antimalarial Agents. *Mol. Cell.* **2004**, *15*, 867 – 877.
73. Picot, S.; Olliaro, P.; de Monbrison, F.; Bienvenu, A-L.; Price, R. N.; Ringwald, P.: A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria. *Malar. J.* **2009**, *8*: 89.
74. Chen, N.; Kyle, D. E.; Pasay, C.; Fowler, E. V.; Baker, J.; Peters, J. M.; Cheng, Q.: *pfert* Allelic Types with Two Novel Amino Acid Mutations in Chloroquine-Resistant *Plasmodium falciparum* Isolates from the Philippines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3500 – 3505.
75. Durrand, V.; Berry, A.; Sema, 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.
76. Cooper, R. A.; Hartwig, C. L.; Ferdig, M. T.: *pfert* is more than the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance gene: a functional and evolutionary perspective. *Acta Tropica.* **2005**, *94*, 170 – 180.
77. Cooper, R. A.; Lane, K. D.; Deng, B.; Mu, J.; Patel, J. J.; Wellem, T. E.; Xinzhuan Su, Ferdig, M. T.: Mutations in transmembrane domains 1, 4 and 9 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter alter susceptibility to chloroquine, quinine and quinidine. *Mol. Microbiol.* **2007**, *63*, 270 – 282.
78. Mu, J.; Ferdig, M. T.; Feng, X.; Joy, D. A.; Duan, J.; Furuya, T.; Subramanian, G.; Aravind, L.; Cooper, R. A.; Wootton, J. C.; Xiong, M.; Su, X.-Z.: Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Mol. Microbiol.* **2003**, *49*, 977 – 989.
79. Henry, M.; Briolant, S.; Fonatine, A.; Mosnier, J.; Baret, E.; Amalvict, R.; Fusai, T.; Fraisse, L.; Rogier, C.; Pradines, B.: In Vitro Activity of Ferroquine Is Independent of Polymorphisms in Transport Protein Genes Implicated in Quinoline Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 2755 – 2759.
80. Parquet, V.; Briolant, S.; Torrentino-Madamet, M.; Henry, M.; Almeras, L.; Amalvict, R.; Baret, E.; Fusai, T.; Rogier, C.; Pradines, B.: Atorvastatin Is a Promising Partner for Antimalarial Drugs in Treatment of *Plasmodium falciparum* Malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 2248 – 2252.
81. Ursing, J.; Zakeri, S.; Gil, J. P.; Björkman, A.: Quinoline resistance associated polymorphisms in the *pfert*, *pfmdr1* and *pfmrp* genes of *Plasmodium falciparum* in Iran. *Acta Tropica.* **2006**, *97*, 352 – 356.
82. Olliaro, P.; Nevill, C.; LeBras, J.; Ringwald, P.; Mussano, P.; Garner, P.; Brasseur, P.: *Lancet* **1996**, *348*, 1196 – 1201.
83. Bray, P. G.; Hawley, S. R.; Ward, S. A.: 4-Aminoquinoline resistance of *Plasmodium falciparum*: insights from the study of amodiaquine uptake. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *50*, 1551 – 1558.
84. Björkman, A.; Phillips-Howard, P. A.: Drug-resistant malaria: mechanisms of development and inferences for malaria control. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1990**, *84*, 323 – 324.
85. Geary, T. G.; Jensen, J. B.: Lack of cross-resistance to 4-aminoquinolines in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *J. Parasitol.* **1983**, *69*, 97 – 105.
86. Muller, O.; van Hensbroek, M. B.; Jaffar, S.; Drakeley, C.; Okorie, C.; Joof, D.; Pinder, M.; Greenwood, B.: A randomized trial of chloroquine, amodiaquine and pyrimethamine-sulphadoxine in Gambian children with uncomplicated malaria. *Trop. Med. Int. Health.* **1996**, *1*, 124 – 132.
87. Brasseur, P.; Agnamey, P.; Ekobo, A. S.; Samba, G.; Favennec, L.; Kouamouo, J.: Sensitivity of *Plasmodium falciparum* to amodiaquine and chloroquine in central Africa: a comparative study in vivo and in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1995**, *89*, 528 – 530.
88. Brasseur, P.; Guiguemde, R.; Diallo, S.; Guiyedi, V.; Kombila, M.; Ringwald, P.; Olliaro, P.: Amodiaquine remains effective for treating uncomplicated malaria in West and Central Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *93*, 645 – 650.
89. Gushimana, Y.; Doepner, B.; Martinez-Hackert, E.; Ilgenfritz, G.: Kinetics of quinine-deuterohemin binding. *Biophys. Chem.* **1993**, *47*, 153 – 162.
90. Happi, C. T.; Gbotosho, G. O.; Folarin, O. A.; Bolaji, O. M.; Sowunmi, A.; Kyle, D. E.; Milhous, W.; Wirth, D. F.; Oduola, A. M. J.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *75*, 155 – 161.
91. Holmgren, G.; Gil, J. P.; Ferreira, P. M.; Veiga, M. I.; Obonyo, C. O.; Björkman, A.: Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in vivo is associated with selection of *pfert* 76T and *pfmdr1* 86Y. *Infection Genetics and Evolution.* **2006**, *6*, 309 – 314.
92. Humphreys, G. S.; Merinopoulos, I.; Ahmed, J.; Whitty, C. J. M.; Mutabingwa, T. K.; Sutherland, C. J.; Hallett, R. L.: Amodiaquine and Artemether-Lumefantrine Select Distinct Alleles of the *Plasmodium falciparum* *mdr1* Gene in Tanzanian Children Treated for Uncomplicated Malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 991 – 997.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

93. Marfurt, J.; Müller, I.; Sie, A.; Oa, O.; Reeder, J. C.; Smith, T. A.; Beck, H.-P.; Genton, B.: The usefulness of twenty-four molecular markers in predicting treatment outcome with combination therapy of amodiaquine plus sulphadoxine-pyrimethamine against *falciparum* malaria in Papua New Guinea. *Malar. J.* **2008**, *7*, 61.
94. Egan, T. J.; Ncokazi, K. K.: Quinoline antimalarials decrease the rate of b-hematin formation. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1532 – 1539.
95. Meshnick, S. R.: Why Does Quinine Still Work After 350 Years of Use?. *Parasitol. Today.* **1997**, *13*, 89 – 90.
96. Baird, J. K.: Effectiveness of Antimalarial Drugs. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 1565 – 1577.
97. Suh, K. N.; Kain, K. C.; Keystone, J. S.: Malaria. *Can. Med. Assoc. J.* **2004**, *170*, 1693 – 1702.
98. Pasvol, G.: Management of severe malaria: interventions and controversies. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2005**, *19*, 211 – 240.
99. Wongsrichanalai, C.; Pickard, A. L.; Wernsdorfer, W. H.; Meshnick, S. R.: Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet* **2002**, *2*, 209 – 218.
100. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241547925/en/index.html>. Consulté le 25 avril 2011.
101. Taylor, W. R. J.; White, N. J.: Antimalarial Drug Toxicity: A Review. *Drug Safety.* **2004**, *27*, 25 – 61.
102. Karle, J. M.; Karle, I. L.; GERENA, L.; MILHOUS, W. K.: Stereochemical Evaluation of the Relative Activities of the Cinchona Alkaloids against *Plasmodium falciparum*. *antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 1538 – 1544.
103. Shanks, G. D.: The rise and fall of mefloquine as an antimalarial drug in South East Asia. *Mil. Med.* **1994**, *159*, 275 – 281.
104. Castel, D. A. Vol. 5 (Ed. Abraham, D. J.), 6th ed. Wiley, New York, **2003**, 5, p 943.
105. Bhattacharjee, A. K.; Karle, J. M.: Functional Correlation of Molecular Electronic Properties with Potency of Synthetic Carbinolamine Antimalarial Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1927 – 1933.
106. Ringwald, P.; Moukoko-Eboumbou, E. C.; Bickii, J.; BASCO, L. K.: In Vitro Activities of Pyronaridine, Alone and in Combination with Other Antimalarial Drugs, against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1525 – 1527.
107. 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. Inter. Health.* **2006**, *11*, 211 – 219.
108. Brockmann, A.; Price, R. N.; van Vugt, M.; Heppner, D. G.; Walsh, D.; Sookto, P.; Wimonwattawatee, T.; Looareesuwan, S.; White, N. J.; Nesten, F.: *Plasmodium falciparum* antimalarial drug susceptibility on the north-western border of thailand during five years of existensive use of artesunate-mefloquine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2000**, *94*, 537 – 544.
109. Adjuk, M.; Agnamey, P.; Babiker, A.; Borrmann, S.; Brasseur, P.; Cisse, M.; Cobelens, F.; Diallo, S.; Faucher, J. F.; Garner, P.; Gikunda, S.; Kreamsner, 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.
110. Martindale, *Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London*, **2005**, *34*, 453 – 456.
111. Kreamsner, P. G.; Krishna, S.: Antimalarial combinations. *Lancet.* **2004**, *364*, 285 – 294.
112. Price, R. N.; Uhlemann, A.-C.; Brockman, 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.
113. Connor, B. A.: Expert Recommendations for Antimalarial Prophylaxis. *J. Travel Med.* **2001**, *8*(Suppl 3): S57 – S64.
114. Franco-Paredes, C.; Santos-Preciado, J. I.: Problem pathogens: prevention of malaria in travellers. *Lancet*, **2006**, *6*, 139 – 149.
115. Durainsingh, 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.
116. Vaidya, A. B.: Mitochondrial and plastid functions as antimalarial drug targets. *Curr. Drug. Targets Infect. Disord.* **2004**, *5*, 11 – 23.
117. Vaidya, A. B.; Mather, M. W.: A post-genomic view of the mitochondrion in malaria parasites. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2005**, *295*, 233 – 250.

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

118. Kessl, J. J.; Lange, B. B.; Merbitz-Zahradnik, T.; Zwicker, K.; Hill, P.; Meunier, B.; Palsdottir, H.; Hunte, C.; Meshnick, S.; Trumppower, B. L.: Molecular Basis for Atovaquone Binding to the Cytochrome *bc1* Complex. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31312 – 31318.
119. Srivastava, I. K.; Morrisey, J. M.; Darrouzet, E.; Dalda, F.; Vaidya, A. B.: Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome *b* in malaria parasites. *Mol. Microbiol.* **1999**, *33*, 704 – 711.
120. Fivelman, Q. L.; Adagu, I. S.; Warhurst, D. C.: Modified Fixed-Ratio Isobologram Method for Studying In Vitro Interactions between Atovaquone and Proguanil or Dihydroartemisinin against Drug-Resistant Strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 4097 – 4102.
121. Pradines, B.; Tall, A.; Ramiandrasoa, F.; Spiegel, A.; Sokhna, C.; Fusai, T.; Mosnier, J.; Daries, W.; Trape, J. F.; Kunesch, G.; Parzy, D.; Rogier, C.: In vitro activity of iron-binding compounds against Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57*, 1093 – 1099.
122. Looareesuwan, S.; Chulay, J. D.; Canfield, C. J.; Htchinson, B. A.: Malarone™ (Atovaquone and Proguanil Hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *60*, 533 – 541.
123. Kessl, J. J.; Ha, K. H.; Merritt, A. K.; Lange, B. B.; Hill, P.; Meunier, B.; Meshnick, S. R.; Trumppower, B. L.: Cytochrome *b* Mutations That Modify the Ubiquinol-binding Pocket of the Cytochrome *bc1* Complex and Confer Anti-malarial Drug Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 17142 – 17148.
124. Baggish, A. L. Hill, D. R.: Minireview: Antiparasitic Agent Atovaquone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1163 – 1173.
125. Srivastava, I. K.; Vaidya, A. B.: A Mechanism for the Synergistic Antimalarial Action of Atovaquone and Proguanil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1334 – 1339.
126. Kuhn, S.; Gill, M. J.; Kain, K. C.: Emergence of Atovaquone-Proguanil resistance during treatment of *Plasmodium falciparum* malaria acquired by a non-immune American traveler to west Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, *72*, 407 – 409.
127. Schwartz, E.; Bujanover, S.; Kain, K. C.: Genetic Confirmation of Atovaquone-Proguanil-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria Acquired by a Nonimmune Traveler to East Africa. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, *37*, 450 – 451.
128. Wichmann, O.; Muehlberger, N.; Jelinek, T.; Alifrangis, M.; Peyerl-Hoffmann, G.; Mühlen, M.; Grobusch, M. P.; Gascon, J.; Matteelli, A.; Laferl, H.; Bisoffi, Z.; Ehrhardt, S.; Cuadros, J.; Hatz, C.; Gjørup, I.; McWhinney, P.; Beran, J.; da Cunha, S.; Schulze, M.; Kollaritsch, H.; Kern, P.; Fry, G.; Richter, J.: Screening for Mutations Related to Atovaquone/Proguanil Resistance in Treatment Failures and Other Imported Isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe. *J. Infect. Dis.* **2004**, *190*, 1541 – 1546.
129. Pimentel, S.; Nogueira, F.; Benchimol, C.; Quinhentos, V.; Boml, J.; Varandas, L.; do Rosário, V.; Bernardino, L.: Detection of atovaquone-proguanil resistance conferring mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome *b* gene in Luanda, Angola. *Malar. J.* **2006**, *5*:30.
130. Gebru, T.; Hailu, A.; Kremsner, P. G.; Kun, J. F. J.; Grobusch, M. P.: Molecular surveillance of mutations in the cytochrome *b* gene of *Plasmodium falciparum* in Gabon and Ethiopia. *Malar. J.* **2006**, *5*:112.
131. Vugt, M. V.; Leonardi, E.; Phaipun, L.; Slight, T.; Thway, K. L.; McGready, R.; Brockman, A.; Villegas, L.; Looareesuwan, S.; White, N. J.; Nosten, F.: Treatment of Uncomplicated Multidrug-Resistant *Falciparum* Malaria with Artesunate-Atovaquone-Proguanil. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *35*, 1498 – 1504.
132. McGready, R.; Ashley, E. A.; Moo, E.; Cho, T.; Barends, M.; Hutagalung, R.; Looareesuwan, S.; White, N. J.; Nosten, F.: A Randomized Comparison of Artesunate-Atovaquone-Proguanil versus Quinine in Treatment for Uncomplicated *Falciparum* Malaria during Pregnancy. *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 846 – 853.
133. McGready, R.; Keo, N. K.; Villegas, L.; White, N. J.; Looareesuwan, S.; Nosten, F.: Artesunate-atovaquone-proguanil rescue treatment of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy: a preliminary report. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2003**, *97*, 592 – 594.
134. Haynes, R. K.; Vonwiller, S. C.: From Qinghao, Marvelous Herb of Antiquity, to the Antimalarial Trioxane Qinghaosusand Some Remarkable New Chemistry. *ACcounts of Chemical Research.* **1997**, *30*, 73 – 79.
135. Ramharter, M.; Noedl, H.; Thimasarn, K.; Wiedermann, G.; Wernsdorfer, G.; Wernsdorfer, W. H.: In Vitro Acivity of Tafenoquine alone and in Combination with Artemisinin against *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Med. Hyg.* **2002**, *67*, 39 – 43.

## Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

136. Tanariya, P.; Tippawangko, P.; Karbwang, J.; Na-Bangchang, K.; Wernsdorfer, W. H.: In vitro sensitivity of *Plasmodium falciparum* and clinical response to lumefantrine (benflumetol) and artemether. *J. Clin. Pharmacol.* **2000**, *49*, 437 – 444.
137. 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.
138. Meshnick S. R.: Artemisinin and Its Derivatives, dans *Antimalarial Chemotherapy* (Ed. Rosenthal, P. J.), Humana, Totowa. **2001**, pp 191 – 201.
139. Haynes, R. K.; Krishna, S.: Artemisinins: activities and actions. *Microbes Infect.* **2004**, *6*, 1339 – 1346.
140. Krishna, S.; Uhlemann, A.-C.; Haynes, R. K.: Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resistance Updates*, **2004**, *7*, 233 – 244.
141. O'Neill, P. M.; Posner, G. H.: A Medicinal Chemistry Perspective on Artemisinin and Related Endoperoxides. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2945 – 2964.
142. 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.
143. Haynes, R. K.; Ho, W.-Y.; Chan, H.-W.; Fugmann, B.; Stetter, J.; Croft, S. L.; Vivas, L.; Peters, W.; Robinson, B. L.: Highly Antimalaria-Active Artemisinin Derivatives: Biological Activity Does Not Correlate with Chemical Reactivity. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1405 – 1409.
144. Eckstein-Ludwig, U.; Webb, J.; van Goethem, I. D. A.; 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.
145. Jung, M.; Kim, H.; Nam, K. Y.; No, K. T.: Three-dimensional structure of *Plasmodium falciparum* Ca<sup>2+</sup>-ATPase (*PfATP6*) and docking of artemisinin derivatives to *PfATP6*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2994 – 2997.
146. 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.
147. 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.
148. Afonso, A.; Hunt, P.; Cheesman, S.; Alves, A. C.; Cunha, C. V.; do Rosario, V.; Cravo, P.: Malaria Parasites Can Develop Stable Resistance to Artemisinin but Lack Mutations in Candidate Genes *atp6* (Encoding the Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 480 – 489.
149. White, N. J.: Assessment of the Pharmacodynamic Properties of Antimalarial Drugs *In Vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1413 – 1422.
150. Woodrow, C. J.; Haynes, R. K.; Krishna, S.: Artemisinins. *Postgraduate Medical Journal*, 2005, *81*, 71-78.
151. Borrmann, S.; Lundgren, I.; Oyakhirome, S.; Impouma, B.; Matsiegui, P.-B.; Adegnika, A. A.; Issifou, S.; Kun, J. F. J.; Hutchinson, D.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Kreamsner, P. G.: Fosmidomycin plus Clindamycin for Treatment of Pediatric Patients Aged 1 to 14 Years with *Plasmodium falciparum* Malaria. *Antimicrob. AGENTS Chemother.* **2006**, *50*, 2713 – 2718.
152. Karunajeewa, H. A.; Ilett, K. F.; Mueller, I.; Siba, P.; Law, I.; Page-Sharp, M.; Lin, E.; Lammey, J.; Batty, K. T.; Davis, T. M. E.: Pharmacokinetics and Efficacy of Piperaquine and Chloroquine in Melanesian Children with Uncomplicated Malaria. *Antimicrob. AGENTS Chemother.* **2008**, *52*, 237 – 243.
153. Nyunt, M. M.; Hendrix, C. W.; Bakshi, R. P.; Kumar, N.; Shapiro, T. A.: Phase I/II Evaluation of the Prophylactic Antimalarial Activity of Pafuramidine in Healthy Volunteers Challenged with *Plasmodium falciparum* Sporozoites. *J. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *80*, 528 – 535.
154. Tiono, A. B.; Dicko, A.; Ndububa, D. A.; Agbenyega, T.; Pitmang, S.; Awobusuyi, J.; Pamba, A.; Duparc, S.; Goh, L.-E.; Harrell, E.; Carter, N.; Ward, S. A.; Greenwood, B.; Winstanley, P. A.: Chlorproguanil–Dapsone–Artesunate versus Chlorproguanil–Dapsone: A Randomized, Double-Blind, Phase III Trial in African Children, Adolescents, and Adults with Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *81*, 969 – 978.
155. Nasveld, P. E.; Edstein, M. D.; Reid, M.; Brennan, L.; Harris, I. E.; Kitchener, S. J.; 5 Leggat, P. A.; Pickford, P.; Kerr, C.; Ohrt, C.; Prescott, W.; and the Tafenoquine Study Team.: Randomized, Double-

# Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

- Blind Study of the Safety, Tolerability, and Efficacy of Tafenoquine versus Mefloquine for Malaria Prophylaxis in Nonimmune Subjects. *Antimicrob. AGENTS Chemother.* **2010**, *54*, 792 – 798.
156. Tshetu, A. K.; Gaye, O.; Kayentao, K.; Thompson, R.; Bhatt, K. M.; Sesay, S. S. S.; Bustos, D. G.; Tjitra, E.; Bedu-Addo, G.; Borghini-Fuhrer, I.; Duparc, S.; Shin, C. S.; Fleckenstein, L.; and the Pyronaridine-artesunate Study Team.: Efficacy and safety of a fixed-dose oral combination of pyronaridine-artesunate compared with artemether-lumefantrine in children and adults with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: a randomised non-inferiority trial. *Lancet*, **2010**, *375*, 1457 – 1467.
157. Charman, S. A.; Arbe-Barnes, S.; Bathurst, I. C.; Brund, R.; Campbella, M.; Charmana, W. N.; Chiua, F. C. K.; Cholletd, J.; Craft, J. C.; Creek, D. J.; Dong, Y.; Matile, H.; Maurerd, M.; Morizzi, J.; Nguyen, T.; Papastogiannidis, P.; Scheurerd, C.; Shackelford, D. M.; Sriraghavan, K.; Stingelin, L.; Tang, Y.; Urwyler, H.; Wang, X.; White, K. L.; Wittlind, S.; Zhou, L.; Vennerstrom, J. L.: Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *PNAS*. **2011**, *108*, 4400 – 4405.
158. Karema, C.; Fanello, C. I.; Overmeir, C. V.; Van geertruyden, J.-P.; van Doren, W.; Ngamiye, D.; D'Alessandro, U.: Safety and efficacy of dihydroartemisinin/piperaquine (Artekin®) for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Rwandan children. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *100*, 1105 – 1111.
159. Bathurst, I.; Hentschel, C.: Medicines for Malaria Venture: sustaining antimalarial drug development. *Trends Parasitol.* **2006**, *22*, 301 – 307.
160. Biagini, G. A.; Richier, E.; Bray, P. G.; Calas, M.; Vial, H.; Ward, S. A.: Heme Binding Contributes to Antimalarial Activity of Bis-Quaternary Ammoniums. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2584 – 2589.
161. Borrmann, S.; Adegnik, A. A.; Moussavou, F.; Oyakhrome, S.; Esser, G.; Matsiegui, P.-B.; Ramharter, M.; Lundgren, I.; Kombila, M.; Issifou, S.; Hutchinson, D.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Kremsner, P. G.: *Antimicrob. AGENTS Chemother.* **2005**, *49*, 3749 – 3754.
162. Roggero, R.; Zufferey, R.; Minca, M.; Richier, E.; Calas, M.; Vial, H.; Mamoun, C. B.: Unraveling the Mode of Action of the Antimalarial Choline Analog G25 in *Plasmodium falciparum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2816 – 2824.
163. Wengelnik, K.; Vidal, V.; Ancelin, M. L.; Cathiard, A.-M.; Morgat, J. L.; Kocken, C. H.; Calas, M.; Herrera, S.; Thomas, A. W.; Vial, H. J.: A Class of Potent Antimalarials and Their Specific Accumulation in Infected Erythrocytes. *Science* **2002**, *295*, 1311 – 1314.
164. Coslédan, F.; Fraisse, L.; Pellet, A.; Guillou, F.; Mordmüller, B.; Kremsner, P. G.; Morenó, A.; Mazier, D.; Maffrand, J.-P.; Meunier, B.: Selection of a trioxaquine as an antimalarial drug candidate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2008**, *105*, 17579 – 17584.
165. Meunier, B.: Hybrid Molecules with a Dual Mode of Action Dream or Reality? *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 69 – 77.
166. Bejon, P.; Lusingu, J.; Olotu, A.; Leach, A.; Lievens, M.; Vekemans, J.; Mshamu, S.; Lang, T.; Gould, J.; Dubois, M.-C.; Demoitié, M.-A.; Stallaert, J.-F.; Vansadia, P.; Carter, T.; Njuguna, P.; Awuondo, K. O.; Malabeja, A.; Abdul, O.; Gesase, S.; Mturi, N.; Drakeley, C. J.; Savarese, B.; Villafana, T.; Ballou, W. R.; Cohen, J.; Riley, E. M.; Lemnge, M. M.; Marsh, K.; von Seidlein, L.: Efficacy of RTS,S/AS01E Vaccine against Malaria in Children 5 to 17 Months of Age. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 2521 – 2532.
167. Aide, P.; Aponte, J. J.; Renom, M.; Nhampossa, T.; Sacarla, J.; Mandomando, I.; Bassat, Q.; Manaca, M. N.; Leach, A.; Lievens, M.; Vekemans, J.; Dubois, M.-C.; Loucq, C.; Ballou, W. R.; Cohen, J.; Alonso, P. L.: Safety, Immunogenicity and Duration of Protection of the RTS,S/AS02D Malaria Vaccine: One Year Follow-Up of a Randomized Controlled Phase I/IIb Trial. *PLoS One*. **2010**, *5*, e13838.
168. Aponte, J. J.; Aide, P.; Renom, M.; Mandomando, I.; Bassat, Q.; Sacarlal, J.; Manaca, M. N.; Lafuente, S.; Barbosa, A.; Leach, A.; Lievens, M.; Vekemans, J.; Sigauque, B.; Dubois, M.-C.; Demoitié, M.-A.; Sillman, M.; McNeil, Savarese, B.; J. G.; Macete, E.; Ballou, W. R.; Cohen, J.; Alonso, P. L.: Safety of the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in a highly endemic area of Mozambique: a double blind randomised controlled phase I/IIb trial. *Lancet*, **2007**, *370*, 1543 – 1551.
169. Alonso, P. L.; Sacarla, J.; Aponte, J. J.; Leach, A.; Macete, E.; Aide, P.; Sigauque, B.; Milman, J.; Mandomando, Bassat, Q.; Guinovart, C.; Espasa, M.; Corachan, S.; Lievens, M.; Navia, M. M.; Dubois, M.-C.; Menéndez, C.; Dubovsky, F.; Cohen, J.; Thompson, R.; Ballou, W. R.: Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet*, **2005**, *366*, 2012 – 2018.

## Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

170. Alonso, P. L.; Sacarla, J.; Aponte, J. J.; Leach, A.; Macete, E.; Milman, J.; Mandomando, I.; Spiessens, B.; Guinovart, C.; Espasa, M.; Bassat, Q.; Aide, P.; Ofori-Anyinam, O.; Navia, M. M.; Corachan, S.; Ceuppens, M.; Dubois, M.-C.; Demoitié, M.-A. Dubovsky, F.; Menéndez, C.; Tornieporth, N.; Ballou, W. R.; Thompson, R.; Cohen, J.: Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*, **2004**, *364*, 1411 – 1420.
171. Casares, S.; Brumeanu, T.-D.; Richie, T. L.: The RTS,S malaria vaccine. *Vaccine*, **2010**, *28*, 4880 – 4894.
172. Kaim W, Schwederski B. Bioinorganic Chemistry: Inorganic. *Elements in the Chemistry of Life: An Introduction and Guide*. John Wiley: New York, **1994**, 267 – 286.
173. Wilkinson, G.; Rosenblum, M.; Whiting, M. C.; Woodward, R. B.: The Structure of Iron Bis-Cyclopentadienyl. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 2125 – 2126.
174. Cotton, F. A.; Wilkinson, G.: *Advanced Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, **1962**.
175. Crabtree, R. H. *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*. Chap. 16, 2<sup>nd</sup> edition, J. Wiley and Sons, New York, **1994**.
176. Elschenbroich, C.; Salzer, A.: *Organometallics - a Concise Introduction*. VCH Publishers, Weinheim. 1989, pp 86 – 89.
177. Chavain, N.; Bio, C.: Organometallic complexes: new tools for chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2729 – 2745.
178. Jaouen, G.; Vessières, A.: Transition metal carbonyl oestrogen receptor assay. *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57*, 1865 – 1874.
179. Top, S.; Jaouen, G.; Vessières, A.; Abjean, J.-P.; Davoust, D.; Rodger, C. A.; Sayer, B. G.; McGlinchey, M. J.: Chromium Tricarbonyl Complexes of Estradiol Derivatives: Differentiation of *a*- and *,&*Diastereoisomers Using One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy at 500 MHz. *Organometallics*. **1985**, *4*, 2143 – 2150.
180. Jaouen, G.; Beck, W.; McGlinchey, M. J.: *A Novel Field of Research: Bioorganometallic Chemistry, Origins, and Founding Principles*. Weinheim, Wiley-VCH, **2006**, pp 1–37.
181. Astruc, D.: Chimie Organométallique : Les métaux-carbènes et carbynes. *EDP Sciences*, **2000**, chapitre 10.
182. Kealy, T. J.; Pauson, P. L.: A New Type of Organo-Iron Compound. *Nature* **1951**, *168*, 1039 – 1040.
183. Miller, S. A.; Tebboth, J. A.; Tremaine, J. F. *J. Chem. Soc.* **1952**, 632 – 635.
184. Fischer, E. O.; Pfab, W. *Z. Naturforsch.* **1952**, *7b*, 377.
185. Dunitz, J. D.; Orgel, L. E. ; Rich, A. : The Crystal Structure of Ferrocene. *Acta Gryst.* **1956**, *9*, 373 – 375.
186. Laszlo, P.; Hoffmann, R.: Ferrocene: Ironclad History or Rashomon Tale? *Angew. Chem. Int. Ed Eng.* **2000**, *39*, 123 – 124.
187. Rosenblum, M.; Woodward, R. B.: The Structure and Chemistry of Ferrocene. 111. Evidence Pertaining to the Ring Rotational Barrier. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 5443.
188. 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.* **2005**, *44*, 941 – 944.
189. 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.
190. Carmona, D.; P. Lamata, M.; Oro, L.: Half-Sandwich Complexes with Aminocarboxylate Ligands and Their Use as Enantioselective Hydrogen Transfer Catalysts. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 2239 – 2251.
191. Velders, A. H.; Bergamo, A.; Alessio, E.; Zangrando, E.; Haasnoot, J. G.; Casarsa, C.; Cocchietto, M.; Zorzet, S.; Sava, G.: Synthesis and Chemical-Pharmacological Characterization of the Antimetastatic NAMI-A-Type Ru(III) Complexes (Hdmtp)[*trans*-RuCl<sub>4</sub>(dmsO-S)(dmtp)], (Na)[*trans*-RuCl<sub>4</sub>(dmsO-S)(dmtp)], and [*mer*-RuCl<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)(dmsO-S)(dmtp)] (dmtp ) 5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidine). *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1110 – 1121.
192. Bicek, A.; Turel, I.; Kanduser, M.; Miklavcic, D.: Combined therapy of the antimetastatic compound NAMI-A and electroporation on B16F1 tumour cells in vitro. *Bioelectrochemistry* 2007, *71*, 113 – 117.
193. 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.
194. Brocard, J.; Lebibi, J.; Maciejewski, L.: *French Patent 2733985-A1*, **1996**.

## Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

195. Jaouen, G.; Top, S.; Vessieres, 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.
196. Biot, C.; Glorian, G.; Maciejewski, L. A.; Brocard, J. S.: Synthesis and Antimalarial Activity in Vitro and in Vivo of a New Ferrocene-Chloroquine Analogue. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3715 – 3718.
197. Biot, C.; Delhaes, L.; Abessolo, H.; Domarle, O.; Maciejewski, L. A.; Mortuaire, M.; Delcourt, P.; Deloron, P.; Camus, D.; Dive, D.; Brocard, J. S.: Novel metallocenic compounds as antimalarial agents. Study of the position of ferrocene in chloroquine. *J. Organomet. Chem.* **1999**, *589*, 59 – 65.
198. Jordan, C. V.: Antiestrogens and Selective Estrogen Receptor Modulators as Multifunctional Medicines. 1. Receptor Interactions. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 883 – 908.
199. Jordan, C. V.: Antiestrogens and Selective Estrogen Receptor Modulators as Multifunctional Medicines. 2. Clinical Considerations and New Agents. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1081 – 1111.
200. Schatzschneider, U.; Metzler-N. N.: New Principles in Medicinal Organometallic Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1504 – 1507.
201. Grainger, D. J.; Metcalfe, J. C.: Tamoxifen: Teaching an old drug new tricks? *Nature Medicine*, **1996**, *2*, 381 – 385.
202. Shiau, A. K.; Barstad, D.; Loria, P. M.; Cheng, L.; Kushner, P. J.; Agard, D. A.; Greene, G. L.: The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen. *Cell.* **1998**, *95*, 927 – 937.
203. Top, S.; Vessieres, A.; Leclercq, G.; Quivy, J.; Tang, J.; Vaissermann, J.; Huche, M.; Jaouen, G.: Synthesis, Biochemical Properties and Molecular Modelling Studies of Organometallic Specific Estrogen Receptor Modulators (SERMs), the Ferrocifens and Hydroxyferrocifens: Evidence for an Antiproliferative Effect of Hydroxyferrocifens on both Hormone-Dependent and Hormone-Independent Breast Cancer Cell Lines. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5223 – 5236.
204. Hillard, E.; Vessières, 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.
205. Ridley, R. G.: Malaria: Dissecting chloroquine resistance. *Curr. Biol.* **1998**, *8*, R346 – 349.
206. Sullivan, D. J.; 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.
207. Winstanley, P. A.: Chemotherapy for Falciparum Malaria: The Armoury, the Problems and the Prospects. *Parasitol. Today.* **2000**, *16*, 146 – 153.
208. 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.
209. 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.
210. Domarle, O.; Blampin, 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.
211. Atteke1, C.; Ndong, J. M. M.; Aubouy, A.; Maciejewski, L.; Brocard, J.; Lébib, J.; Deloron, P.: In vitro susceptibility to a new antimalarial organometallic analogue, ferroquine, of *Plasmodium falciparum* isolates from the Haut-Ogooué region of Gabon. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 1021 – 1024.
212. 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. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2002**, *7*, 265 – 270.
213. Barends, M.; Jaidee, A.; Khaohirun, N.; Singhasivanon, P.; Nosten, F.: In vitro activity of ferroquine (SSR 97193) against *Plasmodium falciparum* isolates from the Thai-Burmese border. *Malar. J.* **2007**, *6*: 81.
214. 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.
215. Egan, T. J.: Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1288 – 1299.

## Chapitre I : La chimie bioorganométallique dans le traitement du paludisme

---

216. Pisciotta, J. M.; Coppens, I.; Tripathi, K. A.; Scholl, P. F.; Shuman, J.; Bajad, S.; Shulaev V.; SULLIVAN, D. J.: The role of neutral lipid nanospheres in *Plasmodium falciparum* haem crystallization. *Biochem. J.* **2007**, *402*, 197 – 204.
217. Pisciotta, J. M. ; Sullivan, D.: Hemozoin: Oil Versus Water. *Parasitol. Inter.* **2008**, *57*, 89 – 96.
218. Biot, C.; Chavain, N.; Dubar, F.; Pradines, B.; Trivelli, X.; Brocard, J.; Forfar, I.; Dive, D.: Structure–activity relationships of 4-*N*-substituted ferroquine analogues: Time to re-evaluate the mechanism of action of ferroquine. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 845 – 854.
219. Biot, C.; Taramelli, D.; Forfar-Bares, I.; Maciejewski, L. A.; Boyce, M.; Nowogrocki, G.; Brocard, J. S.; Basilico, N.; Olliaro, P.; Egan, T. J.: Insights into the Mechanism of Action of Ferroquine. Relationship between Physicochemical Properties and Antiplasmodial Activity. *Mol. Pharm.* **2005**, *3*, 185 – 193.



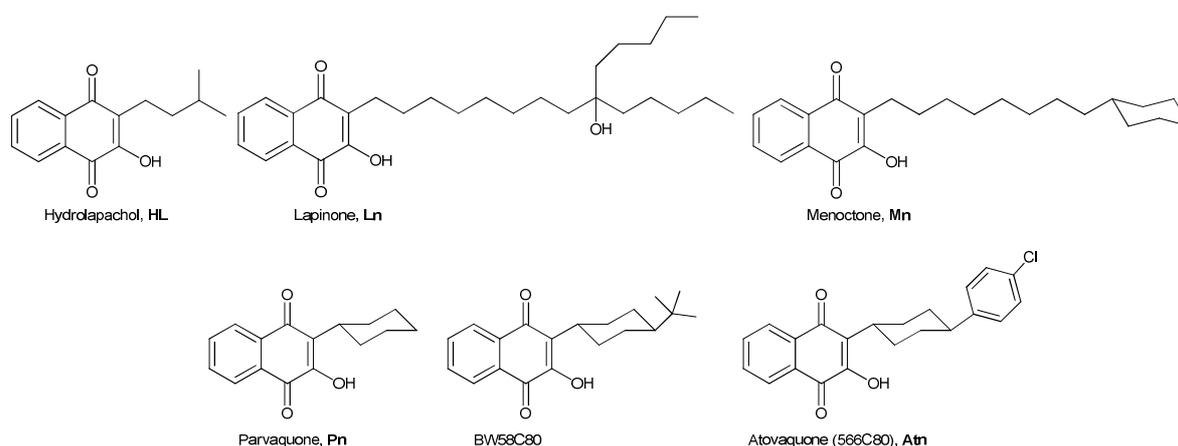
**CHAPITRE II : SYNTHÈSE ET ACTIVITÉS  
BIOLOGIQUES ANTIPLASMODIALE ET ANTI-  
TOXOPLASMIQUE DES 4-AMINO-2-  
HYDROXYNAPHTOQUINONES FERROCENIQUES**



# CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

## I. INTRODUCTION : Développement des 2-hydroxynaphtoquinones

Les composés avec des sous-structures de quinone ont des activités biologiques différentes. L'activité antiplasmodiale des naphthoquinones tels que l'hydrolapachol (HL, Figure 38) est connue depuis les années 40.<sup>1</sup> Le groupe de recherche de Fieser avait préparé plus de 300 dérivés naphthoquinones en tant que molécules thérapeutiques potentielles du paludisme.<sup>1</sup> Ces premières études avaient abouti à un composé nommé lapinone (Ln, Figure 38). Des infections à *P. vivax* pouvaient être traitées par le lapinone chez des patients, mais ce dernier devait être administré à de fortes doses.<sup>1</sup> Dans le même temps, la disponibilité de la chloroquine (CQ), bon marché et efficace, a été à l'origine du manque d'intérêt de cette classe de composés. L'émergence et l'expansion de la résistance à la CQ a permis un regain d'intérêt pour les hydroxynaphtoquinones dans les années 1960. La ménoctone (Mn, Figure 38) montre déjà les deux dispositifs structuraux essentiels pour l'activité antiplasmodiale, à savoir le squelette 2-hydroxynaphtoquinone et le résidu cyclohexyle en bout de chaîne.



**Figure 38** : Dérivés naphthoquinones possédant une activité antiparasitaire.

La Ménoctone subit une vaste biotransformation. Ainsi, les effets thérapeutiques sont obtenus uniquement avec des doses très élevées. Par conséquent, l'utilisation de la ménoctone n'a plus été poursuivie comme médicament antipaludique.<sup>2</sup> De façon intéressante, l'activité de la ménoctone observée contre des infections par *Theileria parva* chez le bétail a conduit à une variation structurale très étendue, aboutissant ainsi à la parvaquone (**Pn**, Figure 38). Un composé thérapeutique fortement efficace dans l'infection par *Theileria parva*.<sup>3</sup> Par la suite, le résidu cyclohexyle de la parvaquone a été largement exploré, menant au composé BW58C80 (Figure 38), qui possède un large spectre d'activité antiprotozoaire.<sup>4</sup> Cependant, chez l'homme, le résidu tert-butyle est rapidement hydroxylé en son métabolite 1000 fois moins actif. Le développement de ce composé a donc été interrompu. La variation du substituant en position 4 du cyclohexyle a permis d'aboutir au composé métaboliquement

<sup>1</sup> Porter, T. H. and Folkers, K. *Angew. Chem.* **1974**, *86*, 635 – 645.

<sup>2</sup> Vaidya, A. B. (Ed.: P. J. Rosenthal), *Humana, Totowa.* **2001**, 203 – 218.

<sup>3</sup> Boehm, P. et al. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 295 – 299.

<sup>4</sup> Hudson, A. T. et al. *Parasitology* **1985**, *90*, 45 – 55.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphthoquinones Ferrocéniques

---

stable 566C80 (Atn, Figure 38), présentant une excellente activité antipaludique.<sup>5</sup> Ce composé 566C80, actuellement appelé atovaquone, est commercialisé sous le nom de Mepron.

L'Atovaquone est un agent anti-protozoaire qui appartient à une nouvelle classe thérapeutique, douée d'un nouveau mécanisme d'action. Comme décrit précédemment (Chapitre I, paragraphe 6.2.3), cette hydroxynaphthoquinone est un homologue structural de l'ubiquinone (ou coenzyme Q), une molécule mitochondriale impliquée dans le transfert des électrons de la chaîne respiratoire. La conséquence de l'action de l'atovaquone entraîne une diminution de la synthèse d'ATP par la mitochondrie. Cette molécule inhibe également l'activité de la dihydroorotate deshydrogénase plasmodiale (DHOD) impliquée dans la voie de biosynthèse des pyrimidines et donc de l'ADN. L'Atovaquone agit spécifiquement sur les parasites lorsque des concentrations de l'ordre du micromolaire ou du nanomolaire sont utilisées.<sup>6</sup>

### II. L'ATOVAQUONE ET LA TOXOPLASMOSE

La toxoplasmose est une maladie parasitaire dont l'agent pathogène est le protozoaire *Toxoplasma gondii*. Le parasite contamine tous les animaux à sang chaud, y compris l'être humain, mais a pour seuls hôtes définitifs les félinés.

Ce parasite, largement répandu dans le monde, affecte entre 15 et 85% de la population mondiale. En France, où il est fréquent, environ 50% de la population adulte est infectée et on estime que 200 000 à 300 000 nouvelles infections surviennent chaque année dont 2700 cas chez les femmes enceintes. Il est estimé que 600 enfants naissent avec une toxoplasmose congénitale chaque année, dont 175 auront des séquelles. La gravité de la toxoplasmose est également liée au risque différé de réactivation d'une infection antérieurement acquise, sous l'effet d'une immunodépression. Le nombre de cas de toxoplasmoses cérébrales survenant chez les patients infectés par le VIH est encore actuellement proche de 200 par an. L'infection chez les adultes est généralement asymptomatique, sauf chez les sujets immunodéprimés (VIH, greffés)<sup>7</sup> pour lesquels la toxoplasmose constitue une maladie opportuniste majeure. En dépit de l'avènement de la trithérapie anti-VIH, la toxoplasmose cérébrale demeure une complication importante et un problème de santé majeur surtout chez les sidéens des pays en voie de développement.

La toxoplasmose peut être transmise par la mère à son fœtus. Une enquête menée en France en 2003 par le Réseau National de Santé Publique évaluait la séroprévalence à 44% parmi les femmes enceintes.<sup>8</sup> Le risque de transmission et la gravité des atteintes fœtales évoluent de manière inverse au cours de la grossesse. Le risque est inférieur à 2% avant deux mois de grossesse mais dans ce cas l'atteinte fœtale est grave. Il atteint 70% en fin de grossesse et le fœtus est généralement asymptomatique. Le parasite se distingue sous trois formes infestantes : tachyzoïtes (forme de multiplication rapide dans les phases aiguës de

---

<sup>5</sup> Hudson, A. T. et al. *Drugs Exp. Clin. Res.* **1991**, 17, 427 – 435.

<sup>6</sup> Hudson, A. T. *Parasitol. Today*, **1993**, 9, 66 – 68.

<sup>7</sup> Luft, B. J. ; Remington, J. S. *J. Infect. Dis.* **1988**, 157, 1 – 6.

<sup>8</sup> Berger, F. ; Goulet, V. ; Le Strat, Y. ; de Valk, H. ; Désenclos, J. C. : La toxoplasmose en France chez la femme enceinte en 2003: séroprévalence et facteur associés. Institut de veille sanitaire **2007**, 1 – 42.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

l'infection), bradyzoïtes (au sein de kystes latents dans les tissus) et sporozoïtes au sein des oocystes (les oocystes sont le résultat de la reproduction sexuée du parasite dans l'intestin du chat).<sup>9</sup>

### II.1. Le cycle de reproduction

*T. gondii* a cette particularité d'infecter plusieurs hôtes. Son hôte définitif est principalement le chat, mais les autres félinés sont aussi concernés. Les hôtes intermédiaires sont tous les homéothermes (mammifères comme oiseaux). Tout comme *P. falciparum*, le développement de *T. gondii*, nécessite deux phases : une phase asexuée et une phase sexuée.

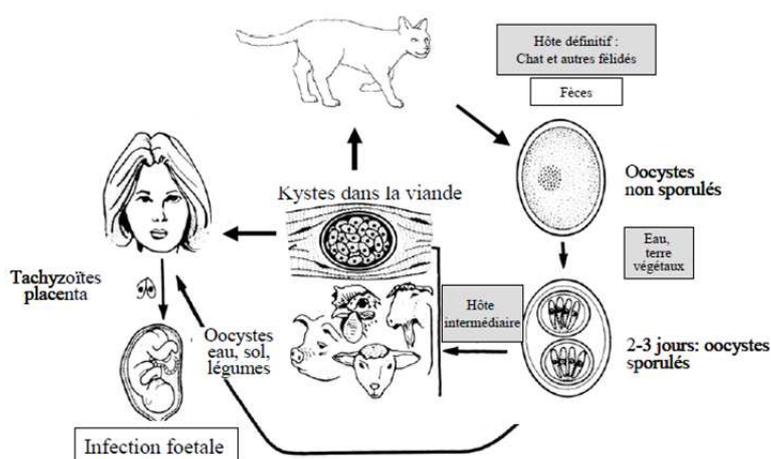


Figure 39 : cycle de vie de *T. gondii*.<sup>9</sup>

#### a. Le cycle asexué

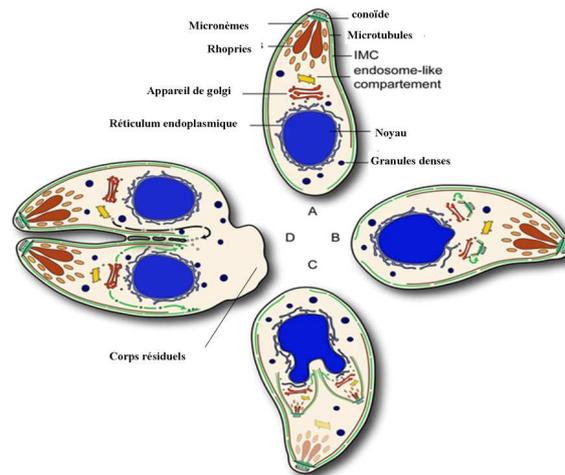
Le cycle sexué a lieu chez tous les hôtes intermédiaires. C'est par voie orale que se transmet l'infection. En effet, le parasite est d'abord ingéré sous forme d'oocystes provenant des aliments souillés ou de kystes contenus dans les viandes infectés non/mal cuites. Dans l'estomac et le duodénum, les formes infestantes (sporozoïtes ou bradyzoïtes) vont être libérées après digestion de la paroi du parasite (des oocystes ou des kystes). Ces sporozoïtes ou bradyzoïtes vont immédiatement se transformer en tachyzoïtes, qui vont se disséminer dans l'organisme par voie sanguine et lymphatique, et infecter tout type de cellules. C'est ce disséminement qui est à l'origine de la phase aiguë de la maladie. Durant la phase aiguë, la vacuole parasitophore (VP) va se former. À l'intérieur des cellules, le parasite va se multiplier à nouveau par endodyogénie (processus au cours duquel l'intérieur d'une cellule mère va se subdiviser en deux cellules filles).<sup>10</sup> En effet, la cellule mère va augmenter de volume pour laisser le parasite se diviser (A). La division se produit autour du noyau où l'appareil de Golgi, les micronèmes, les rhoptries, les conoïdes se subdivisent (B). Le noyau et le réticulum endoplasmique (RE) vont ensuite s'étendre vers les échafaudages des deux cellules filles, puis la mitochondrie va se diviser en dernier (C). A la fin du processus d'endodyogénie, les deux

<sup>9</sup> Dubey, J. P.; Beattie, C. P. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton : CRC Press, Florida, **1988**, 220.

<sup>10</sup> Agop-Nersesian, C. et al. *PLoS Pathog.* **2010**, 6: e1001029.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

cellules filles restent attachées à la cellule mère par un corps résiduel de division contenant les restes de la mitochondrie, du RE, des micronèmes et des rhoptries de la cellule mère (D). La cellule mère va ensuite être lysée et libérer une nouvelle forme de tachyzoïtes. En cas de première contamination d'une femme enceinte, cette forme va être également capable d'infecter le fœtus.



**Figure 40 :** Processus de division des tachyzoïtes par endodyogonie.<sup>10</sup>

### b. Le cycle sexué

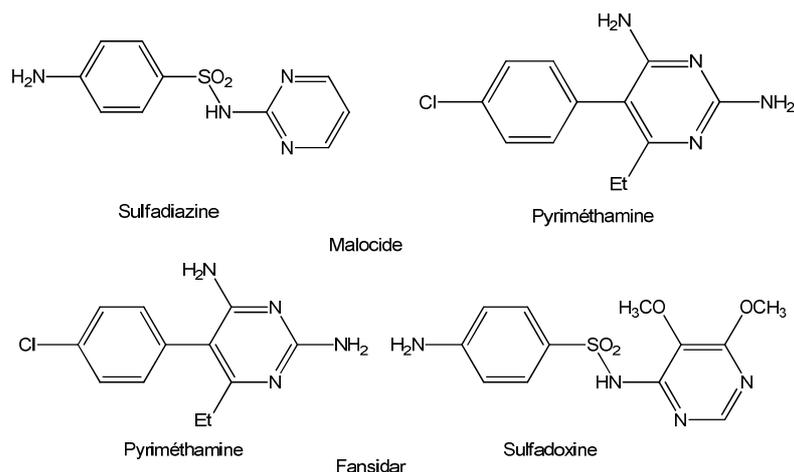
L'hôte définitif (le chat ou les félinés) va s'infecter en ingérant des oocystes matures contenus dans la terre, les végétaux ou l'eau douce. Le chat s'infecte également en dévorant des petits rongeurs ou des oiseaux contenant des kystes (on parle de carnivorisme). Ensuite, les formes infestantes (sporozoïtes ou bradyzoïtes) vont évoluer en tachyzoïtes, et se différencier en mérozoïtes dans une partie de l'intestin grêle (l'épithélium de l'iléon) où elles vont se reproduire par schizogonie (multiplication asexuée). Cette schizogonie se termine par une libération de plusieurs mérozoïtes qui vont se différencier en gamontes (pré-gamètes : microgamètes mâles mobiles et macrogamète femelle fixes). À l'aide de leurs flagelles, les microgamètes vont aller féconder les macrogamètes matures et donner naissance à des oocystes immatures. Ces oocystes, contenus dans les excréments du chat, vont être éliminés dans la nature et contaminer d'autres milieux.

## II.2. Le traitement de la toxoplasmose

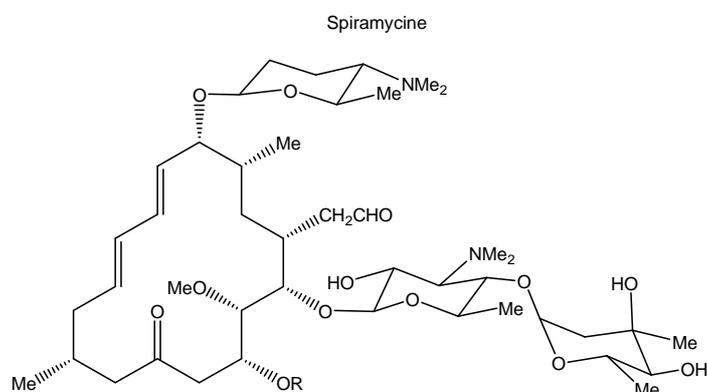
La toxoplasmose est généralement asymptomatique. Cependant, en cas de grossesse, les parasites peuvent traverser le placenta, plus perméable en fin de grossesse, et peut provoquer chez le fœtus une toxoplasmose latente susceptible de se révéler plusieurs mois après la naissance par des atteintes oculaires (choriorétinite). C'est la raison pour laquelle les femmes enceintes séronégatives font l'objet de sérologie régulièrement. Chez les malades atteints de sida, les parasites peuvent entraîner la formation d'abcès cérébraux à l'origine de troubles neurologiques sévères (paralysies, épilepsie etc.), voire entraînant une encéphalite mortelle.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

Le traitement de la toxoplasmose repose sur l'administration d'antibiotiques ou d'autres molécules à action antiparasitaire. Chez les sujets immunodéprimés, les associations sulfadiazine - pyriméthamine (Malocide®, Figure 41) et pyriméthamine – sulfadoxine (Fansidar®, Figure 41) sont efficaces. Chez la femme enceinte, la spiramycine est administrée seule sous le nom commercial de Rovamycine® (Figure 42).<sup>11</sup>



**Figure 41** : Structures chimiques de la sulfadiazine, sulfadoxine et pyriméthamine dans les associations Malocide ® et Fansidar ®.



**Figure 42** : Structure chimique de la spiramycine (Rovamycine ®).

Pour des patients allergiques aux sulfamides, l'atovaquone apparaît comme étant le médicament de choix.<sup>12</sup> En effet, l'atovaquone est actif contre *T. gondii* en inhibant la chaîne mitochondriale de transport des électrons par compétition avec l'ubiquinone.<sup>13, 14</sup>

L'effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* de l'atovaquone sur *T. gondii* est bien démontré à de très faibles concentrations.<sup>15, 16</sup> De plus, l'atovaquone est actif sur les kystes tissulaires.<sup>17</sup>

<sup>11</sup> Petersen, E.; Schmidt, D. R. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2003**, *1*, 175 – 182.

<sup>12</sup> Meneceur, P. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 1269 – 1277.

<sup>13</sup> McFadden, D. C. et al. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *108*, 1 – 12.

<sup>14</sup> Tomavo, S. Boothroyd, J. C. *Int. J. Parasitol.* **1995**, *25*, 1293 – 1299.

<sup>15</sup> Araujo, F. G.; Huskinson, J.; Remington, J. S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, *35*, 293 – 299.

<sup>16</sup> Romand, S.; Pudney, M.; Derouin, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 2371 – 2378.

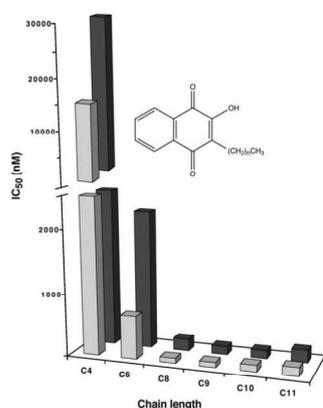
## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

### III. LES HYDROXYNAPHTOQUINONES DE SYNTHÈSE

Les hydroxynaphtoquinones sont des inhibiteurs compétitifs du complexe cytochrome *bc1*, qui se lie au site d'oxydation de l'ubiquinol entre le cytochrome *b* et la protéine soufre-fer et l'atovaquone en est le plus actif. Cependant, des microorganismes pathogènes ont développé des résistances à ce dernier.

Afin de pouvoir synthétiser de nouvelles molécules, il était important de comprendre la base moléculaire de ces résistances. C'est dans cette optique que Kessl et al. ont mis en place des algorithmes permettant de déterminer l'efficacité relative des inhibiteurs hydroxynaphtoquinone sur le complexe cytochrome *bc1*.<sup>18</sup>

Ainsi, des modèles expérimentaux mimant les complexes *bc1* ont été développés *in vitro* (dans la levure) et *in vivo* (bovin) afin d'étudier l'interaction de l'atovaquone avec les complexes *bc1*. Ces modèles ont permis un screening des dérivés 2-hydroxynaphtoquinones sur lesquels étaient greffés sur le carbone 3 du noyau hydroxyquinone, des chaînes alkyles non cycliques, cycliques et aromatiques. L'étude de l'inhibition enzymatique de ces naphthoquinones sur les deux modèles ont permis la sélection du composé ayant pour alkyle, une chaîne linéaire à 8 atomes de carbones ( $CI_{50} = 100$  nM, Figure 43). Les meilleures valeurs  $CI_{50}$  obtenues avec l'enzyme de levure sont celles de chaînes latérales C8/C9 tandis que les chaînes latérales C9/C10 étaient les plus efficaces sur le complexe *bc1* du bovin. Pour les deux espèces, une légère diminution de fixation est observée lorsque la chaîne devenait plus longue que 10 C (Figure 43).



Légende :

- En gris, l'activité des hydroxynaphtoquinones sur l'enzyme de la levure
- En noir, l'activité des hydroxynaphtoquinones sur l'enzyme de bovin.

**Figure 43 :** Les effets de la longueur de la chaîne des 2-hydroxynaphtoquinones sur l'inhibition des complexes *bc1* du bovin et de la levure.

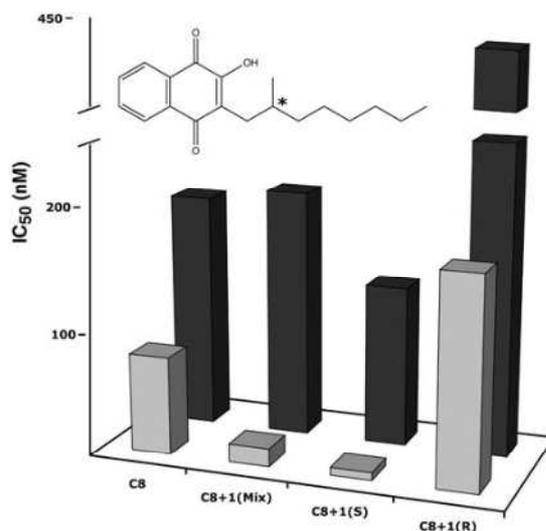
Après s'être fixé sur la longueur de la chaîne, ils ont synthétisé une autre série d'hydroxynaphtoquinones avec des ramifications sur la chaîne C8 alkyle. Les molécules qui en résultent ont également été testées sur ces deux complexes *bc1* en comparaison de l'hydroxynaphtoquinone C8. La meilleure inhibition a été observée pour le composé **S10576**, un isomère où C8 est méthylé en position 2 (Figure 44). Effectivement, le fait d'avoir mis un

<sup>17</sup> Araujo, F. G. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, 36, 326 – 330.

<sup>18</sup> Kessl, J. J. et al. *Biochim. et Biophys. Acta.* **2007**, 1767, 319 – 326.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

méthyle en cette position 2 a fait baisser la  $CI_{50}$  de 80 nM à 15 nM en comparaison du C8 simple sur l'enzyme de levure.



**Figure 44** : Inhibition des enzymes de la levure et du bovin par les hydroxynaphtoquinones C8 et C8-méthyle 1(R, S).

Ces premiers résultats furent pour eux, un point de départ pour synthétiser de nouveaux inhibiteurs hydroxynaphtoquinone du complexe *bc1* ayant des utilisations thérapeutiques potentielles (cf données supplémentaires de la ref. 18).

Malgré son excellente activité antipaludique, l'atovaquone présente des propriétés pharmaceutiques faibles telles qu'une faible biodisponibilité et une forte attache sur la protéine plasmatique.<sup>19</sup> Afin d'essayer d'améliorer la biodisponibilité de l'atovaquone, El Hage et al.<sup>20</sup> ont synthétisé deux séries de molécules dérivés de l'atovaquone. En effet, ils ont transformé le groupement hydroxylé de l'atovaquone en esters (Figure 45) et d'éthers (Figure 45) au groupe 3-hydroxy de l'atovaquone.

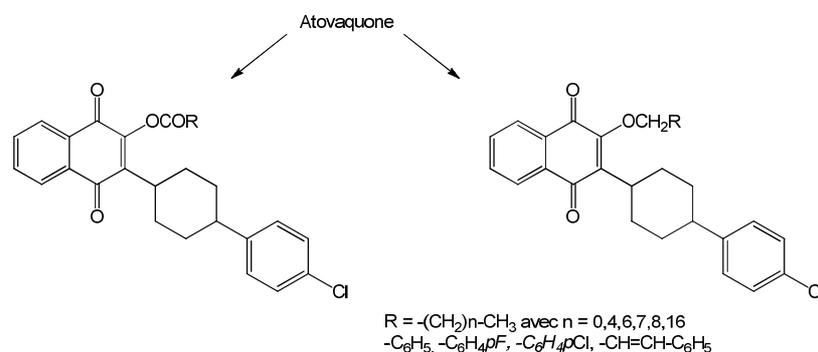
La lipophilie et les propriétés physico-chimiques de ces composés ont été modulées par l'introduction : (i) de chaînes de carbonées saturées ou insaturées de différentes longueurs ( $R = CH_3-(CH_2)_n$ ,  $n = 0, 4, 6, 7, 8, 16$ ) et (ii) de groupe phényle, substitué en para par des atomes d'halogènes (Cl, F), comme représenté sur la Figure 45. La plupart de ces composés ont montré une activité élevée contre la croissance de *P. falciparum* avec des  $CI_{50}$  inférieures à 10 nM. Les dérivés d'esters montraient des activités semblables à celles de l'atovaquone, mais supérieures à celles de la chloroquine et de la quinine (1.5 nM contre 0.79, 125 et 180 nM).

D'après le choix des substituants, les composés les plus actifs sont ceux dont la chaîne carbonée variait entre 1 et 8 méthylènes ou encore avec un groupement phényle.

<sup>19</sup> Srivastava, I. K.; Rottenberg, H.; Vaidya, A. B. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 3961 – 3966.

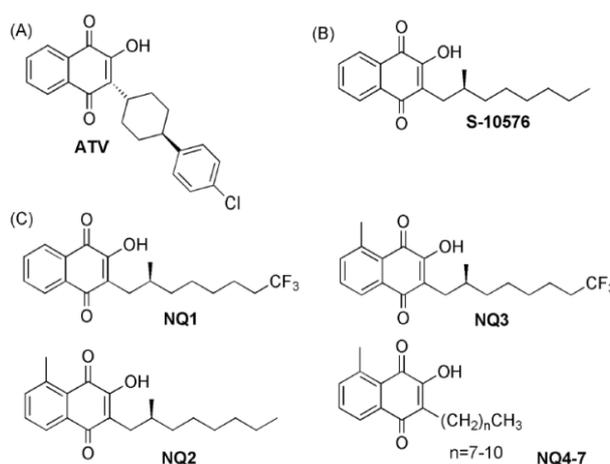
<sup>20</sup> El Hage, S. et al. *Euro. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 4778 – 4782.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques



**Figure 45** : Analogues d'esters et d'éthers de l'atovaquone.<sup>20</sup>

Malgré cette activité antipaludique élevée, le but d'améliorer la biodisponibilité n'a pas été atteint. C'est ainsi que Hughes et al.<sup>21</sup> ont exploré une autre stratégie de remplacement de l'atovaquone. Ils sont partis sur la base d'un potentiel inhibiteur hydroxynaphtoquinone, la **S-10576** (Figure 46) synthétisée par Kessl.<sup>18</sup> La **S-10576** est en effet, une 2-hydroxynaphtoquinone qui est structurellement semblable à l'atovaquone (Figure 46) et qui cible aussi le complexe du cytochrome *bc1*.<sup>18</sup> Cependant, il a été montré *in vivo* que les deux carbones terminaux de la chaîne latérale sont modifiés par oxydation, ce qui aurait pour conséquence une augmentation de l'hydrosolubilité de la molécule. La stabilité métabolique de la **S-10576** fut améliorée par substitution d'un fluor sur le carbone terminal de la chaîne latérale et/ou en méthylant le squelette naphtoquinone en position 8 (Figure 46).<sup>21</sup>



**Figure 46** : Nouveaux dérivés 2-hydroxynaphtoquinones de la **S-10576**.

Considérant les propriétés intéressantes de l'atovaquone, notre laboratoire s'est intéressé à l'étude de l'activité antiparasitaire des dérivés organométalliques des hydroxynaphtoquinones. Nous nous sommes principalement intéressés aux amino-hydroxynaphtoquinones ferrocéniques.

<sup>21</sup> Hughes, L. M. et al. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, 1797, 38 – 43.

# CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

## IV. SYNTHÈSE DES HYDROXYNAPHTOQUINONES FERROCÉNIQUES

### IV.1. Objectif du travail

La synthèse d'aminohydroxynaphtoquinones ferrocéniques a déjà été réalisée au sein du laboratoire (Figure 47). L'activité *in vitro* de ces nouveaux composés a été évaluée sur des souches *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum*, incluant des souches résistantes à l'Atovaquone. Trois de ces composés (n = 6, 7 et 8) se sont révélés très actifs en particulier sur les souches résistantes à l'atovaquone de *T. gondii* (troisième ligne du Tableau 2).<sup>22</sup> Par contre, leur activité antipaludique s'est avérée moins bonne que l'atovaquone (quatrième et cinquième lignes du Tableau 2).

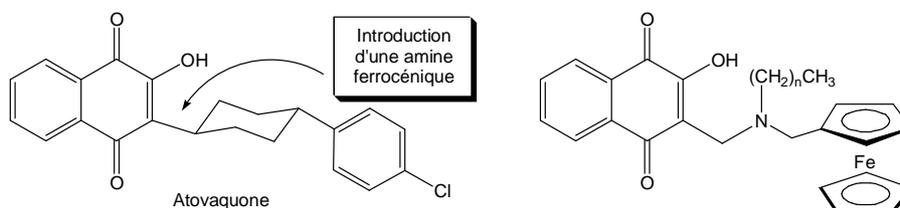


Figure 47 : Schéma général de la modification de l'Atovaquone.

Tableau 2 : Activités biologiques des Aminohydroxynaphtoquinones sur *T. gondii* et *P. falciparum*.

Composés	Activité Antitoxoplasmique (CI <sub>50</sub> μM)		Activité Antipaludique (CI <sub>50</sub> μM)	
Atovaquone	0.5 ± 0.1	15 ± 2	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.35
n = 6	1.2 ± 0.37	1.4 ± 0.27	5 ± 0.4	2.5 ± 0.3
n = 7	2.1 ± 0.5	1.1 ± 0.35	2.5 ± 0.3	5.0 ± 0.4
n = 8	3.0 ± 0.4	1.2 ± 0.15	6.25 ± 1.5	6.0 ± 1.25

Dans le but de nous approcher de la structure de l'atovaquone et ainsi d'évaluer l'influence des différents substituants R sur l'activité biologique, nous avons donc envisagé de synthétiser d'autres analogues de l'Atovaquone en conservant le noyau aminohydroxynaphtoquinone ferrocénique et en faisant varier la chaîne greffée sur le groupement amine. Les molécules cibles sont représentées sur la Figure 48.

<sup>22</sup> Baramee, A. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1294 – 1302.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

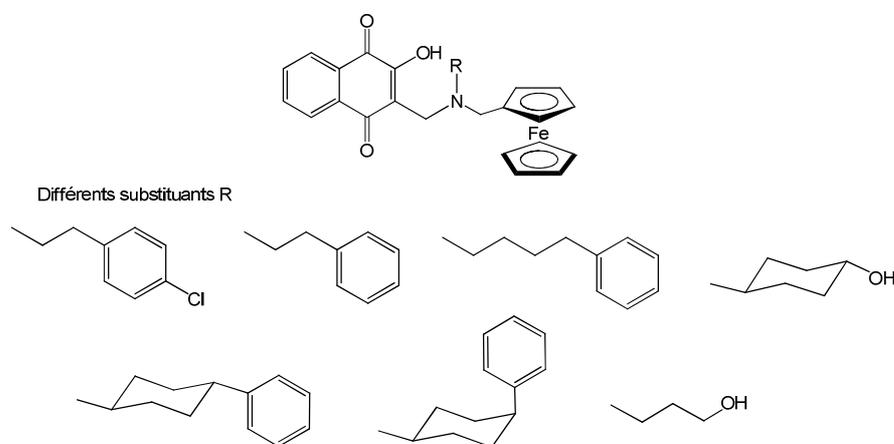


Figure 48 : Les dérivés hydroxynaphtoquinones ferrocéniques.

### IV.2. Synthèse des aminohydroxynaphtoquinones ferrocéniques

#### IV.2.1. Analyse rétrosynthétique de la synthèse des aminohydroxynaphtoquinones ferrocéniques

L'obtention des aminohydroxynaphtoquinones ferrocéniques nécessite la condensation d'une amine ferrocénique primaire ou secondaire avec l'hydroxynaphtoquinone en présence du méthanal par une réaction de Mannich (Schéma 7). Ces amines ferrocéniques ont été préalablement synthétisées à partir d'amines commerciales telles que la pipérazine, l'aminopyrrolidine etc...

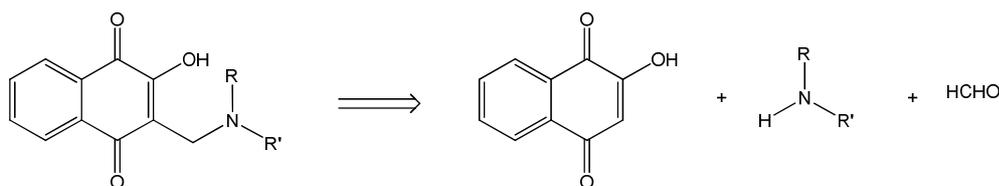


Schéma 7 : Analyse rétrosynthétique de la synthèse des aminohydroxynaphtoquinones ferrocéniques.

#### IV.2.2. Synthèse des amines ferrocéniques

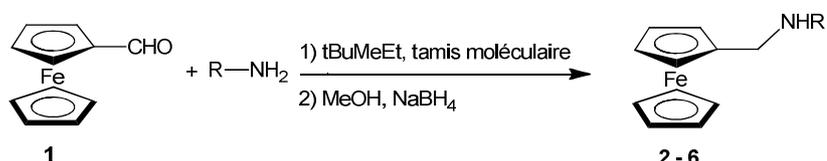
Trois séries différentes d'amines ferrocéniques ont été synthétisées. Elles sont regroupées par méthode de synthèse.

##### a. Synthèse des amines ferrocéniques 2-6

La synthèse de ces amines ferrocéniques se fait en deux étapes. En effet, la condensation de l'amine sur le ferrocénecarbaldéhyde **1** dans le tertiobutylméthyléther en présence de tamis moléculaire conduit à la formation d'une imine. Après 4 heures de réaction,

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

la réduction par le borohydrure de sodium de l'imine formée permet d'accéder aux amines **2-6** avec des rendements variant de 82 à 99 % (Schéma 8, Tableau 3).



**Schéma 8** : Synthèse des amines ferrocéniques **2-6**.

**Tableau 3** : Amines ferrocéniques **2-6**.

Produits	R	Rendement (%)
<b>2</b>		97
<b>3</b>		96
<b>4</b>		95
<b>5</b>		96
<b>6</b>		82

### *b. Synthèse de la N-(4-phénylcyclohexyl)ferrocénylméthylamine **10 a et b***

La 4-phénylcyclohexanone **7** constitue le produit de départ d'une amine qui comportera à la fois un groupement phényle et un groupement cyclohexyle.

La première étape de la synthèse de l'amine consiste en l'obtention de l'oxime **8**. Celle-ci est formée par l'action du chlorhydrate d'hydroxylamine sur la cétone **7** en présence de soude dans l'éthanol. L'oxime est obtenue avec un rendement de 99 % (Schéma 9). Elle est ensuite réduite par l'hydrure de lithium et d'aluminium pour donner l'amine **9a** et **9b** avec un rendement quantitatif. Cette amine est obtenue sous la forme de deux diastéréoisomères non séparables par chromatographie sur colonne de gel de silice. La proportion 65/35 des isomères *trans* et *cis* a été déterminée par RMN du proton.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

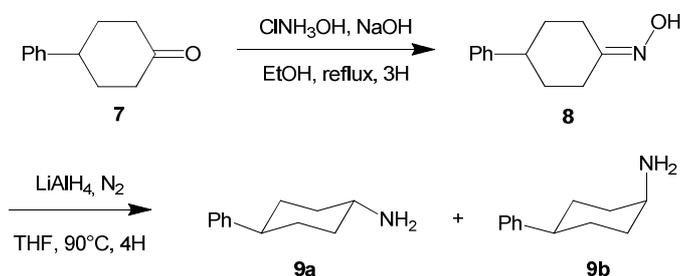


Schéma 9 : Synthèse du 4-phénylcyclohexane 9.

Le mélange des amines *cis-trans* 9a et 9b est ensuite condensé au ferrocénecarbaldéhyde pour donner un mélange d'imines qui est réduite en présence de  $\text{NaBH}_4$ . Le rendement est de 95 %. Cette fois-ci, le mélange des deux diastéréoisomères *trans* et *cis* 10a et 10b a été séparé par chromatographie sur colonne de gel de silice. La proportion 65/35 des isomères *trans* et *cis* a ainsi été confirmée lors de cette étape (Schéma 10).

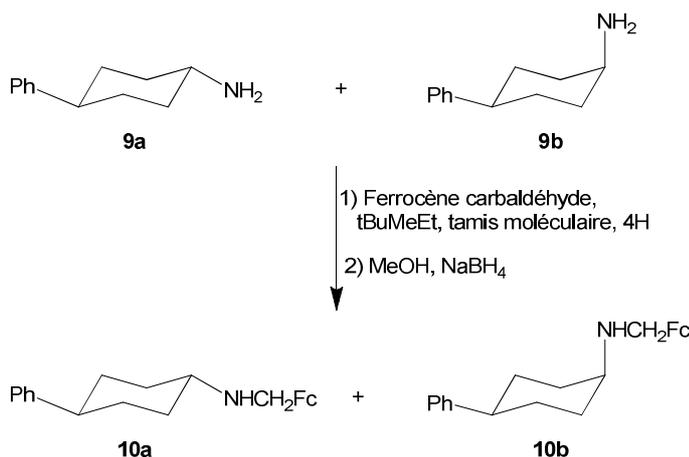


Schéma 10 : Synthèse des 4-phénylcyclohexylamines ferrocéniques 10a et 10b.

### c. Synthèse des amines ferrocéniques 14, 17 et 21

#### 1. Synthèse de la pipérazine ferrocénique 14

La première étape de la synthèse consiste en une substitution nucléophile entre le doublet non liant de l'azote d'une amine tertiaire et de l'iodure de méthyle. La réaction s'effectue en présence d'un excès d'iodure de méthyle dans l'acétone, à température ambiante, sous agitation magnétique pendant 1h (Schéma 11). L'ammonium ferrocénique est obtenu avec un rendement de 99%.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

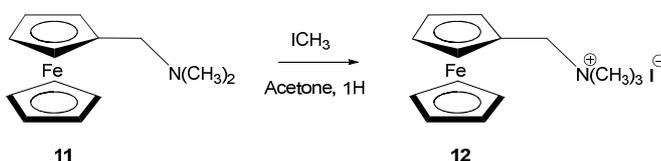


Schéma 11 : Synthèse du précurseur ferrocénique 12.

L'ammonium quaternaire du composé 12 constitue un très bon nucléofuge dans la série des composés ferrocéniques et peut ainsi être substitué par la pipérazine au cours de la seconde étape. Cette substitution est réalisée en présence de carbonate de potassium à reflux pendant une nuit. Afin d'éviter la formation du produit de disubstitution, un excès de pipérazine est utilisé. Après purification par colonne chromatographique sur colonne de gel de silice, le produit monosubstitué est obtenu avec un rendement de 59% (Schéma 12).

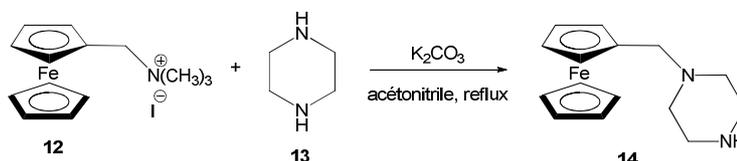


Schéma 12 : Synthèse de la pipérazine ferrocénique 14.

### 2. Synthèse de la (R)-3-amino-1-ferrocénylméthylpyrrolidine 17

La substitution de l'ammonium ferrocénique 12 par la (3-Boc-amino)pyrrolidine 15 conduit à la formation du composé ferrocénique 16 avec un rendement de 90 % après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (Schéma 13). La déprotection du groupement Boc s'effectue en présence d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane pendant 4 h. L'amine déprotégée 17 est obtenue avec un rendement de 29 %. Une dégradation du composé ferrocénique a eu lieu au cours de cette réaction.

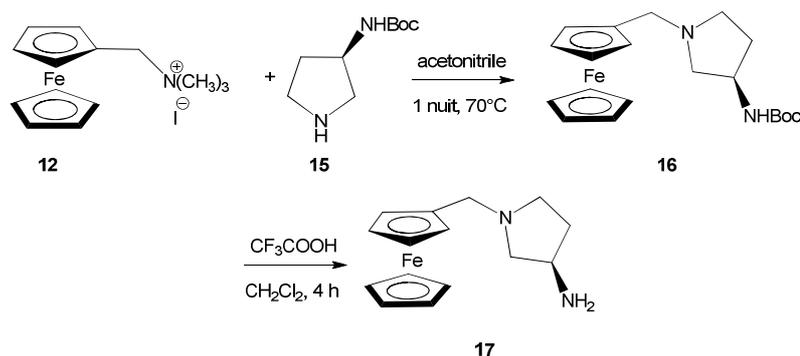


Schéma 13 : Synthèse de la (R)-3-amino-1-ferrocénylméthylpyrrolidine 17.

### 3. Synthèse de la (S)-3-(N-ferrocénylméthyl-N-méthyl)aminopyrrolidine 21

Dans ce cas particulier, l'obtention de l'amine ferrocénique nécessite plusieurs étapes. Premièrement, une condensation entre la (S)-3-amino-1-boc-pyrrolidine 18 et le

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

ferrocèncarbaldéhyde forme une imine qui est ensuite réduite par le borohydrure de sodium. L'amine ferrocénique **19** est obtenue avec un rendement de 78 % après purification. Cette amine est soumise à une seconde amination réductrice en présence de formaldéhyde et de borohydrure de sodium pour conduire au composé **20** (Schéma 14).

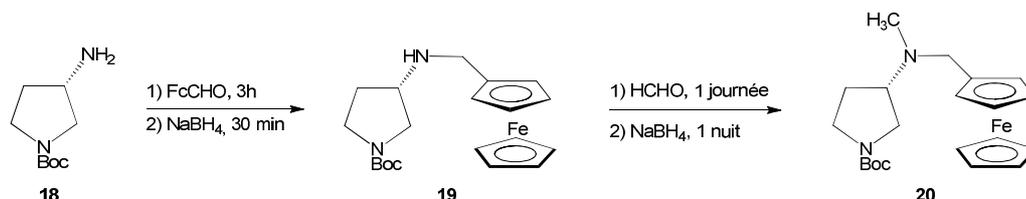


Schéma 14 : Synthèse du Boc-pyrrolidine ferrocénique **20**.

La dernière étape consiste en la déprotection du groupement Boc dans des conditions douces (Schéma 15). En effet, la déprotection du Boc en présence d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane, conduit à une dégradation du produit. Le composé **20** a été mis en présence d'acide chlorhydrique 5M dans l'isopropanol pendant 4 h. L'amine déprotégée **21** est obtenue avec un rendement de 89 %.

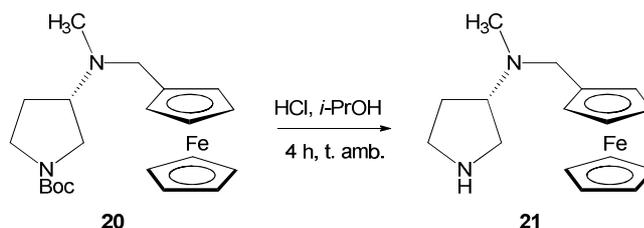


Schéma 15 : Synthèse de la (S)-3-(N-ferrocénylméthyl-N-méthyl)aminopyrrolidine **21**.

### IV.2.3. Synthèse des aminohydroxynaphtoquinones ferrocéniques 22-31

Dans la dernière étape de la synthèse, les amines ferrocéniques sont condensées avec la 2-hydroxynaphtoquinone en présence de formaldéhyde dans de l'éthanol selon une réaction de Mannich. Au bout de quatre heures de réaction en température ambiante (Schéma 16, Tableau 4), les hydroxynaphtoquinones ferrocéniques sont obtenues avec des rendements de 68 à 99 %.

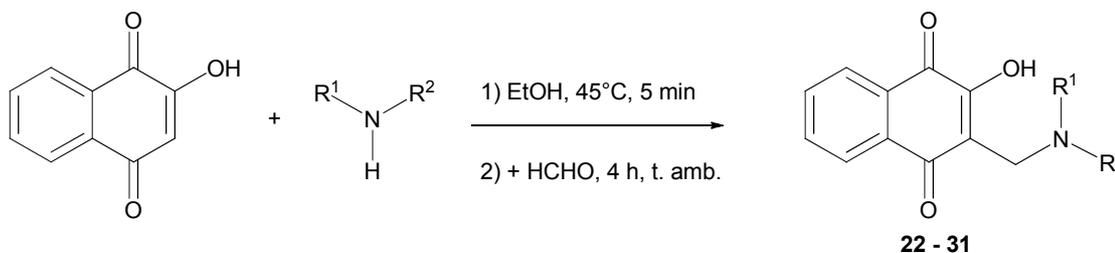
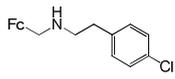
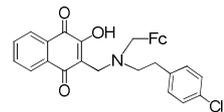
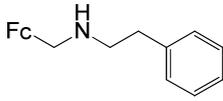
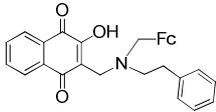
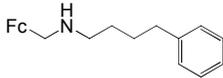
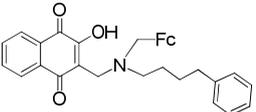
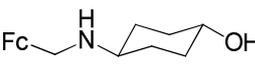
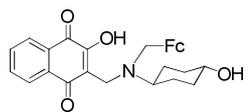
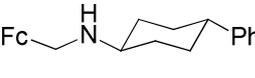
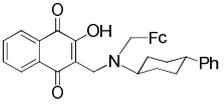
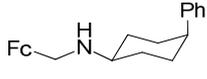
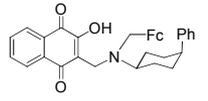
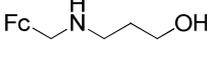
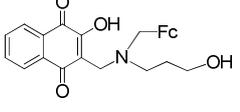
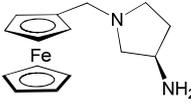
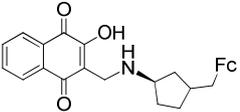
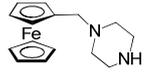
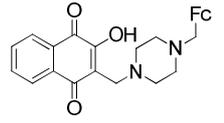
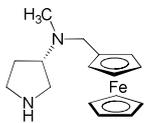
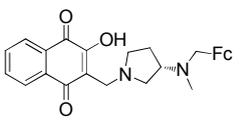


Schéma 16 : Synthèse des aminohydroxynaphtoquinones ferrocéniques **22-31**.

*CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et  
Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones  
Ferrocéniques*

**Tableau 4 : Aminohydroxynaphtoquinones ferrocéniques 22-31.**

Amines	Produits		Rdts (%)
	<b>22</b>		99
	<b>23</b>		99
	<b>24</b>		97
	<b>25</b>		96
	<b>26</b>		96
	<b>27</b>		96
	<b>28</b>		70
	<b>29</b>		74
	<b>30</b>		68
	<b>31</b>		70

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

---

Nous avons donc pu synthétiser 10 dérivés amino-hydroxynaphtoquinones ferrocéniques **22-31**. L'étape suivante a été d'étudier leur cytotoxicité, leur activité biologique *in-vitro* sur des souches de *Plasmodium falciparum* et celles de *Toxoplasma gondii*.

### V. ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES AMINOHYDROXYNAPHTOQUINONES FERROCENIQUES

#### V.1. Activité antipaludique

L'activité antipaludique des dérivés amino-hydroxynaphtoquinones ferrocéniques (AHNQFc) a été réalisée *in vitro* sur la souche de *P. falciparum* chloroquino-résistant W2 par l'UMR MD3 Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale de la faculté de Pharmacie de Marseille (Nadine Azas, Aurélien Dumètre) et sur des isolats cliniques au Centre International de Recherches Médicales de Franceville au Gabon.

##### V.1.1. Activité antipaludique des AHNQFc 22 - 31 sur W2

Les tests biologiques des composés AHNQFc **22-31** ont été effectués sur la souche chloroquino-résistante W2, en un point de concentration. L'Atovaquone, qui a été isolée de la Malarone® par l'équipe des chimistes de Marseille (Pierre Verhaeghe, LCP UMR CNRS 6264), était prise comme molécule de référence ainsi que la chloroquine. Au bout de 72 H d'incubation, la prolifération du parasite a été évaluée par le test du SYBR green.<sup>23</sup> Le solvant de dilution était le DMSO. Malheureusement, certaines molécules telles que la **24**, **26** et **27** se sont montrées insolubles dans ce solvant ainsi que dans le méthanol. Par conséquent, l'activité antiplasmodiale a été étudiée uniquement pour les molécules **22-23**, **25** et **28-31** (Tableau 5).

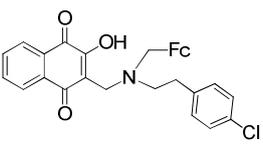
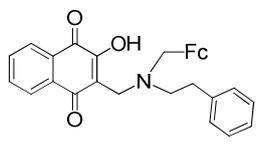
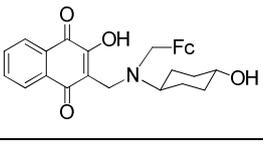
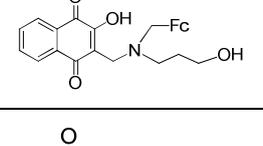
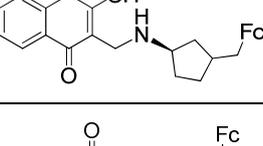
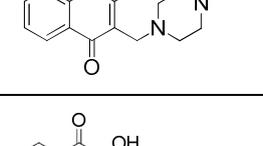
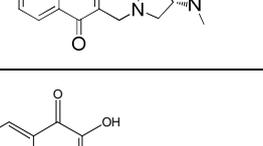
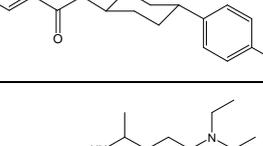
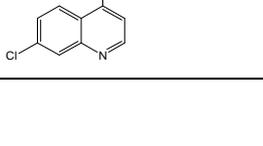
Malheureusement d'après le Tableau 5, les AHNQFc présentent des activités antiplasmodiales inférieures à celles de l'atovaquone sur la souche W2. En effet, elles ont toutes des  $CI_{50} > 5\mu M$  contre  $0.04\mu M$  (Tableau 5).

---

<sup>23</sup> Guigembe, W. et al. *Nature*. **2010**, 465, 311 – 315.

*CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et  
Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones  
Ferrocéniques*

**Tableau 5** : Résultat du test de sensibilité antipaludique des AHNQFc **22, 23, 25, 28-31** sur W2 (souche chloroquino-résistante).

Molécules		CI <sub>50</sub> (μM)
Nom	Structure	
<b>22</b>		>5
<b>23</b>		>5
<b>25</b>		>5
<b>28</b>		>5
<b>29</b>		>5
<b>30</b>		>5
<b>31</b>		>5
<b>Atovaquone</b>		0.04
<b>Chloroquine</b>		0.40

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

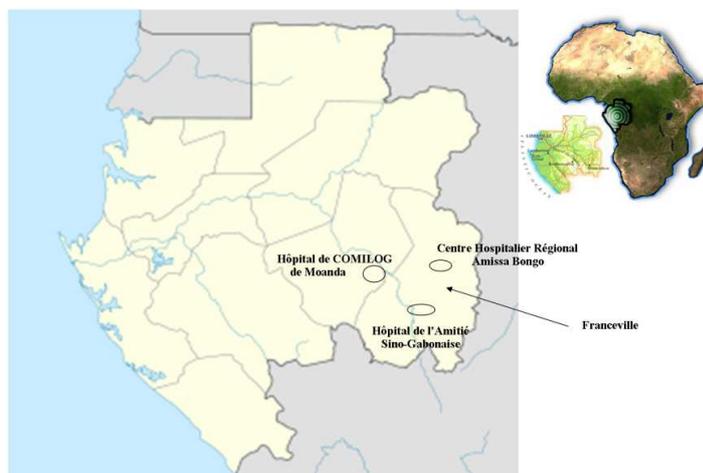
### V.1.2. Activité antipaludique des AHNQFc 22-31 sur des isolats cliniques gabonais

Dans le cadre de ma thèse en cotutelle avec le Gabon, j'ai effectué des stages au Centre International de Recherches Médicales de Franceville au Gabon (CIRMF) pour réaliser les tests de sensibilité des amino-hydroxynaphtoquinones ferrocéniques synthétisées sur des isolats cliniques.

#### a. Le paludisme au Gabon

Le Gabon est situé dans le centre-ouest de l'Afrique (Figure 49). Avec une superficie de 267 700 km<sup>2</sup>, il ne compte que 1.014 976 habitants dont 50% vivent en milieu urbain et 50% en milieu rural. Libreville en est la capitale. De par sa position géographique, sur la ligne de l'équateur, le Gabon bénéficie d'un climat tropical chaud et humide en permanence : sa température varie constamment entre 20 et 30°C maximum.

Le paludisme au Gabon est de type équatorial stable : la transmission anophélienne est intense et permanente. Aussi, bien que les 4 principales espèces affectant l'homme soient présentes au Gabon, *P. falciparum* qui est le plus mortel est également le plus fréquemment rencontré.<sup>24, 25, 26</sup> *P. knowlesi* n'a pas encore été rencontré chez l'homme au Gabon, mais, très récemment, il a été découvert chez le singe.<sup>27</sup>



**Figure 49** : Localisation des sites de prélèvement des échantillons sanguins au Gabon/Afrique.<sup>28</sup>

Franceville, qui fait partie des principales villes du Gabon, est situé dans le Sud-Est du Gabon, dans la région du Haut-Ogooué. C'est au sein de l'Unité de Parasitologie Médicale UPARAM du CIRMF, sous l'encadrement du Dr. Lekana que j'ai pu déterminer les activités antipaludiques des AHNQFc 22-31 à l'aide de la méthode ELISA (méthode enzymatique en sandwich qui permet d'identifier la pLDH présente dans les hématies parasité).

<sup>24</sup> Richard-Lenoble, D. et al. *Arch. Fr. Pediatr.* **1985**, 42, Suppl 2, 977 – 981.

<sup>25</sup> Poirriez, J. et al. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **1991**, 66, 149 – 154.

<sup>26</sup> Richard-Lenoble, D. et al. *Bull. Soc. Path. Ex.* **1987**, 80, 532 – 542.

<sup>27</sup> Ollomo, B. et al. *PLOS Pathogens.* **2009**, 5, 1 – 5.

<sup>28</sup> [http://encyclo.voila.fr/wiki/Fichier:Gabon\\_location\\_map.svg](http://encyclo.voila.fr/wiki/Fichier:Gabon_location_map.svg). Consulté le 25 juillet 2011.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphthoquinones Ferrocéniques

---

### b. Le test d'activité antiplasmodiale

L'activité antiplasmodiale des dérivés synthétisés a été analysée en mesurant l'inhibition de la croissance parasitaire après hémoculture en présence de concentrations croissantes de molécules. Le test colorimétrique de DELI-microtest (Double-Site Enzyme Linked LDH Immunodetection) qui utilise la lactate déshydrogénase de *P. falciparum* (LDHPf) a été utilisé.<sup>29</sup> L'analyse de l'activité antiplasmodiale s'est effectuée en 3 étapes :

- La culture des isolats cliniques,
- Le test préliminaire et
- Le test d'activité.

#### 1. Culture des isolats cliniques infectés par *P. falciparum*

Les échantillons sanguins étaient récoltés à l'Hôpital de l'Amitié Sinogabonaise de Franceville, au Centre Hospitalier Régional Amissa BONGO de Franceville et à l'Hôpital de COMILOG à Moanda. Avant de prendre les échantillons des patients, ces derniers répondaient à un questionnaire et bénéficiaient d'un allègement dans la réalisation des examens (exemple : la Numération de Formule Sanguine était faite gratuitement par le CIRMF).

Le test DELI est une méthode immuno-enzymatique en sandwich conçue pour détecter des antigènes plasmodiaux dans des échantillons sanguins. L'antigène détecté est une enzyme métabolique intracellulaire spécifique, la lactate déshydrogénase plasmodiale (pLDH), présente dans les hématies parasitées.<sup>30</sup> Le test est utilisé avec des échantillons de culture de *P. falciparum* pour mesurer l'inhibition métabolique lors d'un test in vitro de sensibilité aux médicaments.<sup>31</sup> La mise en culture d'isolats de *P. falciparum* du patient était réalisée dans des microplaques conformément aux procédures en vigueur :

L'isolat est lavé avec 2 à 3 mL du milieu de culture, du RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) par centrifugation (1500 tours/mn pendant 10 mn) pendant 3 fois. Le choix des échantillons à tester était très strict : ils devaient être frais, c'est-à-dire datés de moins de 24H,) et la parasitémie pour l'hémoculture devait être comprise entre 0.005% et 0.5%. Lorsque la parasitémie initiale était supérieure, elle était diluée avec des hématies fraîches O<sup>+</sup> afin d'obtenir un taux inférieur à 0.5%.

L'hémoculture est réalisée dans 200 µL de suspension parasitaire à un taux d'hématocrite de 1,5% avec une gamme de concentrations appropriées des molécules. Deux puits supplémentaires sont réservés comme contrôle positif. Un puits sans médicament (avec uniquement du RPMI) et un autre avec du DMSO sont mis également au contact de l'isolat. La plaque est ensuite incubée à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> pendant 42-46H.<sup>32</sup> La culture est enfin interrompue en congelant la plaque à -20 °C durant au moins 3H.

---

<sup>29</sup> Brasseur, P.; Agnamey, P.; Moreno, A.; Druilhe, P. *Med. Trop.* **2001**, *61*, 545 – 547.

<sup>30</sup> Druilhe, P. et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2001**, *64*, 233 – 241.

<sup>31</sup> Tritten, L. et al. *Malar. J.* **2009**, *8*, 226.

<sup>32</sup> Lekana-Douki, J. B. et al. *Blood.* **2002**, *100*, 1478 – 1483.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphthoquinones Ferrocéniques

La plaque est décongelée à température ambiante (12 – 25°C) pendant 30 à 40 mn avant de procéder au test d'activité.

L'analyse de l'activité se fait en 2 étapes : une étape de test préliminaire permettant de déterminer le volume nécessaire pour doser la croissance parasitaire suivie d'une étape de dosage de celle-ci.

### 2. Test Préliminaire

Le test préliminaire précède le test d'activité. Il est réalisé dans le but d'évaluer la réussite du test in vitro de sensibilité aux médicaments et apprécier le volume d'échantillon à utiliser pour l'ensemble de la microculture. Le test préliminaire dépend de la parasitémie initiale car le volume du lysat à prélever est fonction de cette dernière (Tableau 6).

**Tableau 6 :** Volume de lysat à prélever en fonction de la parasitémie initiale.

Plage de parasitémie (%)	Volume de lysat pour le test préliminaire (µL)
0.005 – 0.010	50 – 140
0.01 – 0.05	25 – 50 – 100
0.05 – 0.2	10 – 20 – 50
0.2 – 0.5	2 – 5 – 15

#### ➤ Procédure du test Préliminaire

Selon la parasitémie initiale, le test préliminaire nécessitait 8 puits par isolat (y compris 2 puits pour les contrôles positif et négatif).

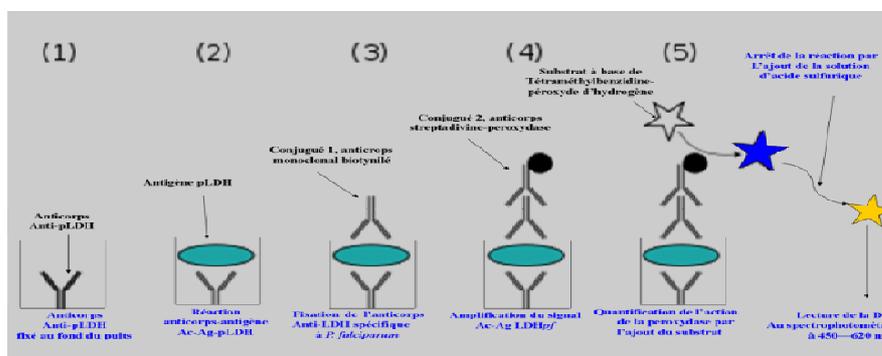
Un plan de plaque est également préparé. Ainsi, pour chaque plage de parasitémie initiale (première colonne du Tableau 6), les volumes correspondants de lysat (seconde colonne du Tableau 6) testés sont prélevés dans deux puits de culture : un puits sans médicament (puits de contrôle) et un puits contenant la concentration maximale du médicament (puits d'inhibition).

#### ➤ Réalisation du test préliminaire

Nous pouvons résumer en 5 étapes la réalisation du test ELISA (Figure 50).

L'anticorps monoclonal Mab17E4 spécifique de la pLDH de *Plasmodium falciparum*, préalablement fixé dans les puits d'une microplaque pour ELISA (1), va capter la pLDH libérée au cours de la culture du parasite (2). L'addition d'un second anticorps monoclonal Mab 19G7 biotinylé va assurer sa fixation sur un second site de la pLDH (3). L'addition d'une streptavidine marquée à la peroxydase (4) permet d'évaluer l'activité enzymatique par addition de son substrat (3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine) en présence de peroxyde d'hydrogène (5). La réaction enzymatique est ensuite bloquée par l'acide phosphorique et l'intensité de la coloration jaune développée est évaluée en DO (densité optique) au spectrophotomètre à 450 nm. La DO obtenue est directement proportionnelle à la concentration de la pLDH contenue dans l'échantillon.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques



**Figure 50** : Test de sensibilité Elisa-sandwich.

➤ **Interprétation des résultats et validation du test préliminaire**

Le test préliminaire est validé lorsque :

- La densité optique du contrôle positif, DOPos, est supérieure à 0.500 et celle du contrôle négatif, DOneg, comprise entre 0.05 et 0.200.
- La densité optique moyenne du puits de contrôle sans médicament (DOMax) doit être comprise entre 0.5 et 2.5 et doit être au moins 1.7 fois supérieure à la valeur de la densité optique minimale du puits d'inhibition contenant la concentration maximale du médicament (DODomin).

$$DOPos > 0.500 \text{ et } 0.050 < DOneg < 0.200$$

$$0.5 < DOMax < 2.5 \text{ et } DOMax/DODomin \geq 1.7$$

Si l'une de ces caractéristiques n'est pas respectée, les résultats sont invalides et la série de tests doit être réitérée. Par contre si le test préliminaire est bon, nous pouvons ainsi poursuivre en réalisant le test de sensibilité proprement dit. Le volume d'échantillon que nous prélevions était souvent celui dont la DOMax était comprise entre 1.2 et 2.5 afin d'obtenir des résultats situés sur la partie linéaire de la courbe correspondant à la réaction Antigène-Anticorps (Ag-Ac).

### 3. Test de sensibilité aux antipaludiques

Après avoir réalisé, analysé les résultats et validé le test préliminaire, nous pouvons ainsi poursuivre avec le test de sensibilité des molécules synthétisées. La procédure de réalisation du test d'activité est identique à celle du test préliminaire. Par contre, le volume d'hémoculture prélevé est bien déterminé grâce au test préliminaire et le test est réalisé sur l'ensemble des concentrations des molécules mises en culture y compris la chloroquine qui sert de médicament de référence afin de savoir si l'isolat est CQ-résistant ou CQ-sensible.

#### c. Résultat du test de sensibilité des AHNQ 22 – 31.

Au Gabon, nous avons pu mettre en culture et tester les 10 molécules AHNQFc **22–31** sur trois isolats différents : les isolats 6675 et 6790 sont chloroquino-résistants et 7075 est chloroquino-sensible. Pour un même isolat, le test était réalisé en duplicate ou en triplicate.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphthoquinones Ferrocéniques

Le Tableau 7 fait état des valeurs des  $CI_{50}$  obtenues pour chaque AHNQFc lors du test de sensibilité sur ces isolats.

**Tableau 7 :** Sensibilité *in vitro* des 3 isolats infectés par *P. falciparum* aux dérivés HNQFc **22** – **31** ( $CI_{50}$  en  $\mu M$ ).

Molécules		Isolat 6775	Isolat 6790	Isolat 7075
Nom	Structure			
<b>CQ</b>		0.222	0.127	0.056
<b>22</b>		19.4	5.8	0.37
<b>23</b>		15.52	3.8	0.76
<b>24</b>		2.04	3.6	0.203
<b>25</b>		19.77	3.7	1.9
<b>26</b>		1.42	3.4	0.705
<b>27</b>		2.34	7.8	1.5
<b>28</b>		6.06	19.7	2.01
<b>29</b>			10	
<b>30</b>			2.4	
<b>31</b>			1.3	

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

### d. Interprétation des résultats

Parmi les trois isolats, les isolats **6775** et **6790** sont chloroquino-résistants (la  $CI_{50}$  de la chloroquine est supérieure à 100 nM, Tableau 7) et l'isolat **7075** est chloroquino-sensible (la  $CI_{50}$  de la chloroquine est inférieure à 100 nM, Tableau 7).

Tout d'abord, on notera ici que les molécules **29**, **30** et **31** n'ont pas été testées sur les isolats **6775** et **7075**. Cela est dû à la petite quantité de volume sanguin prélevé au départ. En effet, les infirmiers étaient confrontés à un problème de prélèvement lorsque les patients étaient des enfants (âgés de moins de 5 ans). Ainsi, le volume prélevé lors de la prise de sang, était limité, voire insuffisant pour tester toutes les molécules sur un même isolat.

Dans l'ensemble des résultats, les AHNQFc que nous avons testés ont toutes des  $CI_{50}$  de l'ordre du  $\mu\text{M}$  et sont toutes moins actives que la CQ.

En comparant l'activité *in-vitro* des AHNQFc entre elles sur chaque isolat, on note que :

- Pour l'isolat très chloroquino-résistant **6775** ( $CI_{50}$  de la CQ = 0.222  $\mu\text{M}$ ), les composés **26**, **24** et **27** s'avèrent les plus actifs (respectivement ils ont des  $CI_{50}$  de 1.42, 2.04 et 2.34  $\mu\text{M}$ ).
- Pour l'isolat **6790**, les molécules **22** à **27** ont toutes une activité du même ordre de grandeur ( $3 < CI_{50} < 8$ ). Les composés les plus actifs sont AHNQFc **31** et AHNQFc **30** ( $CI_{50} = 1.3 \mu\text{M}$  et 2.4  $\mu\text{M}$ ).
- Sur l'isolat chloroquino-sensible **7075** ( $CI_{50}$  CQ = 0.056  $\mu\text{M}$ ), les AHNQFc **24** et **22** sont les plus actives avec des  $CI_{50}$  de l'ordre du nM respectivement 203 nM et 370 nM.

Aussi, pour certaines molécules telles que les AHNQFc **22**, **23** et **25**, on constate que la diminution de leur activité antipaludique est proportionnelle à l'augmentation de la chloroquino-résistance (Figure 51). En effet, pour le composé **22** par exemple, sa concentration inhibitrice est de 0.37  $\mu\text{M}$  sur l'isolat **7075**, chloroquino-sensible. Sur l'isolat **6790** moyennement chloroquino-résistant, son activité antipaludique diminue d'un facteur 10 ( $CI_{50} = 5.8 \mu\text{M}$ ). Et enfin, sur l'isolat très chloroquino-résistant **6775**, il affiche une  $CI_{50}$  de 20  $\mu\text{M}$ . Pour ces trois molécules, nous pouvons conclure que leur activité varie dans le même sens que celle de la chloroquine.

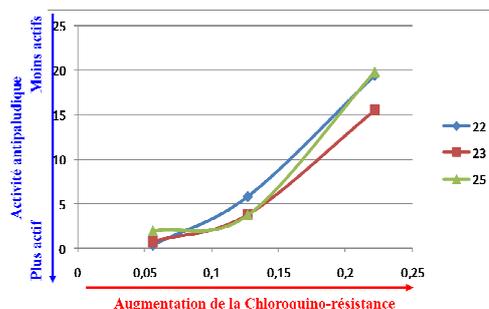


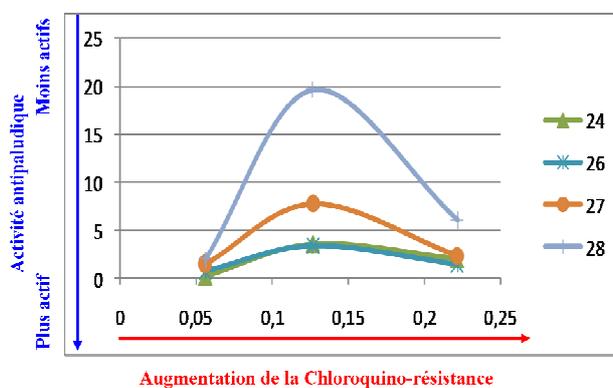
Figure 51 : L'activité antipaludique des HNQFc **22**, **23** et **25** en fonction de la chloroquino-résistance.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

Les molécules **24**, **26**, **27** et **28**, bien que n'ayant pas la même activité antipaludique entre elles, affichent sensiblement un même profil (Figure 52). On constate d'abord une diminution de l'activité antipaludique entre l'isolat **6775** et l'isolat **6790**, puis une augmentation de l'activité antipaludique lorsque l'isolat devient de moins en moins sensible à la chloroquine (Figure 52).

Par exemple avec le composé **28**, pour un isolat sensible à la CQ, il affiche une  $CI_{50}$  de 2  $\mu$ M. Lorsqu'il est testé sur un isolat moins sensible, on constate une diminution de son activité ( $CI_{50} = 19 \mu$ M). En outre, sur l'isolat pas du tout sensible à la chloroquine, on note un gain d'activité (avec une  $CI_{50}$  de 6  $\mu$ M contrairement à 19  $\mu$ M au départ) (Figure 52).

Il est aussi important de noter que sur les isolats chloroquino-résistants, les composés **24** et **26** ont une activité antipaludique sensiblement stable (Figure 52).



**Figure 52 :** Activité antipaludique des AHNQFc **24**, **26**, **27** et **28** en fonction de la chloroquino-résistance.

### V.1.3. Activité anti-toxoplasmique

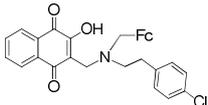
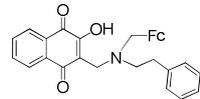
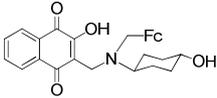
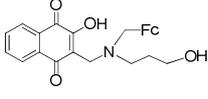
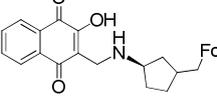
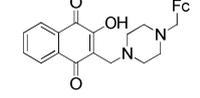
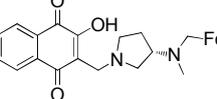
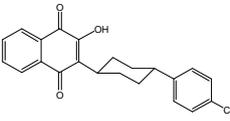
Le test d'activité anti-toxoplasmique a également été réalisé par Aurélien Dumètre au Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale de Marseille. Ainsi, les effets des hydroxynaphtoquinones ferrocéniques étaient évalués sur la croissance *in vitro* des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* de la souche PRU- $\beta$ -Gal exprimant la  $\beta$ -galactosidase d'*Escherichia coli* selon une méthode colorimétrique adaptée de celle de McFadden et al. (1997).<sup>33</sup>

Le résultat du test des AHNQFc **22**, **23**, **25** et **28-31** sur la souche PRU- $\beta$ -Gal reporté dans le Tableau 8, nous montre qu'aucune de ces dernières n'a d'activité anti-toxoplasmique. En effet, en comparaison avec l'ATQ, les AHNQFc ont toutes des  $CI_{50}$  de l'ordre du  $\mu$ M. Elles sont 1000 fois moins actives. ( $CI_{50} = 86$  nM pour l'ATQ contre  $CI_{50} > 25 \mu$ M pour les AHNQFc).

<sup>33</sup> McFadden, D. C.; Seeber, F.; Boothroyd, J. C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1849 – 1953.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

**Tableau 8 :** Résultat du test anti-toxoplasmique sur la souche Tg Pru-β-Gal co-culture macrophages J774, lecture absorbance 570/630 nm.

Molécules		CI <sub>50</sub> (μM)
Nom	Structure	
<b>22</b>		43.6
<b>23</b>		24.5
<b>25</b>		46.4
<b>28</b>		>50
<b>29</b>		>50
<b>30</b>		>50
<b>31</b>		>50
<b>Atovaquone</b>		0.086

### V.1.4. Activité cytotoxique

L'étude cytotoxique des Aminohydroxynaphtoquinones Ferrocéniques a été réalisée sur plusieurs lignées cellulaires selon la méthode du MTT test (Mosmann, 1983),<sup>34</sup> au Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale de Marseille. Ces AHNQFc ont été testés sur deux lignées de cellules à savoir : la lignée J774 A.1 (monocytes macrophages

<sup>34</sup> Mosmann, T. J. *Immunol. Methode.* **1983**, 65, 55 – 63.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

murins adhérents (ECACC)) et la lignée HepG2 (hépatocytes humains adhérents (ATCC-LGC)). La Doxorubicine a été prise comme molécule de référence à cause de son effet cytotoxique. La toxicité de l'atovaquone a également été étudiée. Le temps d'incubation était de 72 heures et la lecture des plaques s'est faite au spectrophotomètre à 570 nm et 630 nm (Biotek microtiter plate reader).

**Tableau 9** : Résultat du test de cytotoxicité des AHNQFcs sur J774 A.1 et HepG2.

Molécules		J774 A.1	HepG2
Nom	Structure	CC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
<b>22</b>		23.0	21.0
<b>23</b>		30.0	34.0
<b>25</b>		46.6	64.2
<b>28</b>		88.7	>125
<b>29</b>		33.4	50.2
<b>30</b>		35.1	50.0
<b>31</b>		25.8	78.4
<b>Atovaquone</b>		17.6	>15.6
<b>Doxorubicine</b>		0.03	0.02

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphtoquinones Ferrocéniques

---

En comparaison avec la doxorubicine, molécule de référence, les AHNQFc ne sont pas toxiques pour la cellule en culture. En effet, pour qu'elles puissent inhiber la croissance de la cellule, leur utilisation à de très fortes concentrations est nécessaire. D'après le Tableau 9, elles sont également moins toxiques que l'Atovaquone.

### VI. CONCLUSION

Pour cette première famille de molécules, 10 aminohydroxynaphtoquinones ferrocéniques **22-31** ont été synthétisées. Certains de ces composés présentaient un cyclohexane sur lequel était greffé un phényle et permettaient d'identifier des structures proches de l'Atovaquone. Nous avons étudié leurs activités antipaludique, antitoxoplasmique et cytotoxique sur :

- Un clone de *P. falciparum* chloroquino-résistant (W2) et sur 3 isolats cliniques infectés par *P. falciparum*,
- Un clone de *T. gondii*, Pru- $\beta$ -Gal co-culture macrophages J774, et
- Deux lignées cellulaires, J774 A.1 et HepG2.

D'une manière générale, ces AHNQFc n'ont pas donné des activités recherchées car elles agissent toutes à de fortes concentrations inhibitrices (de l'ordre du micromolaire). Par contre, nous savons qu'elles ne sont pas toxiques *in vitro* sur la cellule en culture. Ainsi, une utilisation de ces dernières pourrait être exploitée dans d'autres domaines.

Pour l'activité antipaludique, des meilleurs résultats ont été observés pour les composés **24** et **26** sur des isolats cliniques. Ces deux molécules sont plus proches de l'Atovaquone structuralement.

En ce qui concerne l'activité anti-toxoplasmique, nous notons une perte d'activité de nos molécules en comparaison de celles obtenues pour les 3 aminohydroxynaphtoquinones (n = 6, 7 et 8, Tableau 2) précédemment synthétisées au laboratoire.<sup>22</sup>

Pour des raisons de synthèse, la jonction entre la partie hydroxynaphtoquinone et l'alkyl ferrocénique s'est faite à l'aide d'une amine. Cette amine permet une libre rotation sur l'ensemble de la molécule contrairement à l'atovaquone qui a une structure figée en trans. Pour comprendre le rôle exact joué par la partie alkylaminoferrocénique dans l'activité inhibitrice de ces AHNQFc, il serait intéressant de réaliser des études de géométrie spatiale de ces derniers, notamment sur les plus actifs (**24** et **26**).

# CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphthoquinones Ferrocéniques

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. Porter, V. T. H.; Folked, K.: Antimetaboliten des Coenzym Q. Möglichkeiten ihrer Anwendung als Antimalaria-Mittel. *Angew. Chem.* **1974**, *86*, 635 – 645.
2. Vaidya, A. B.: Atovaquone–Proguanil Combination, dans Antimalarial Chemotherapy (Ed. by P. J. Rosenthal), *Humana, Totowa* . **2001**, pp: 203 – 218.
3. Boehm, P.; Cooper, K.; Hudson, A. T.; Elphick, J. P.; McHardy, N.: In Vitro Activity of 2-Alkyl-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone against *Theileria parva*. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 295 – 299.
4. Hudson, A. T.; Randall, A. W.; Fry, M.; Ginger, C. D.; Hill, B.; Latter, V. S.; McHardy, N.; Williams, R. B.: Novel anti-malarial hydroxynaphthoquinones with potent broad spectrum anti-protozoal activity. *Parasitology* **1985**, *90*, 45 – 55.
5. Hudson, A. T.; Dicking, M.; Ginger, C. D.; Hill, B.; McHardy, N.; Williams, R. B. Randall, A. W.; Latter, V. S.: 566C80: a potent broad spectrum anti-infective agent with activity against malaria and opportunistic infections in AIDS patients. *Drugs Exp. Clin. Res.* **1991**, *17*, 427 – 435.
6. Hudson, A. T.: Atovaquone — a novel broad-spectrum anti-infective drug. *Parasitol. Today*, **1993**, *9*, 66 – 68.
7. Luft, B. J.; Remington, J. S.: Aids commentary: Toxoplasmic Encephalitis. *J. Infect. Dis.* **1988**, *157*, 1 – 6.
8. Berger, F. ; Goulet, V. ; Le Strat, Y. ; de Valk, H. ; Désenclos, J. C. : La toxoplasmose en France chez la femme enceinte en 2003: séroprévalence et facteur associés. Institut de veille sanitaire **2007**, 1 – 42.
9. Dubey, J. P.; Beattie, C. P.: Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton: CDC Press, Florida, 1988, 220.
10. Agop-Nersesian, C.; Egarter, S.; Langsley, G.; Foth, B. J.; Ferguson, D. J. P.; Meissner, M.: Biogenesis of the Inner Membrane Complex Is Dependent on Vesicular Transport by the Alveolate Specific GTPase Rab11B. *PLoS Pathog.* 2010, *6*, e1001029.
11. Petersen, E.; Schmidt, D. R.: Sulfadiazine and pyrimethamine in the postnatal treatment of congenital toxoplasmosis: what are the options? *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2003**, *1*, 175 – 182.
12. Meneceur, P.; Bouldouyre, M.-A.; Aubert, D.; Villena, I.; Menotti, J.; Sauvage, V.; Garin, J.-F.; Derouin, F.: In Vitro Susceptibility of Various Genotypic Strains of *Toxoplasma gondii* to Pyrimethamine, Sulfadiazine, and Atovaquone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 1269 – 1277.
13. McFadden, D. C.: Tomavo, S.; Berry, E. A.; Boothroyd, J. C.: Characterization of cytochrome *b* from *Toxoplasma gondii* and Qo domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *108*, 1 – 12.
14. Tomavo, S.; Boothroyd, J. C.: Interconnection between Organellar Functions, Development and Drug Resistance in the Protozoan Parasite, *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* **1995**, *25*, 1293 – 1299.
15. Araujo, F. G.; Huskinson, J.; Remington, J. S.: Remarkable *In Vitro* and *In Vivo* Activities of the Hydroxynaphthoquinone 566C80 against Tachyzoites and Tissue Cysts of *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, *35*, 293 – 299.
16. Romand, S.; Pudney, M.; Derouin, F.: *In Vitro* and *In Vivo* Activities of the Hydroxynaphthoquinone Atovaquone Alone or Combined with Pyrimethamine, Sulfadiazine, Clarithromycin, or Minocycline against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 2371 – 2378.
17. Araujo, F. G.; Huskinson-Mark, J.; Gutteridge, W. E.; Remington, J. S.: *In Vitro* and *In Vivo* Activities of the Hydroxynaphthoquinone 566C80 against the Cyst Form of *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 326 – 330.
18. Kessl, J. J.; Moskalev, N. V.; Gribble, G. W.; Nasr, M.; Meshnick, S. R.; Trumpower, B. L.: Parameters determining the relative efficacy of hydroxy-naphthoquinone inhibitors of the cytochrome *bc1* complex. *Biochim. et Biophys. Acta.* **2007**, *1767*, 319 – 326.
19. Srivastava, I. K.; Rottenberg, H. ; Vaidya, A. B.: Atovaquone, a Broad Spectrum Antiparasitic Drug, Collapses Mitochondrial Membrane Potential in a Malarial Parasite. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3961 – 3966.
20. El Hage, S.; Ane, M.; Stigliani, J.-L.; Marjorie, M.; Vial, H.; Baziard-Mouysset, G.; Payard, M.: Synthesis and antimalarial activity of new atovaquone derivatives. *J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4778 – 4782.

## CHAPITRE II : Synthèses et Activités Biologiques Antipaludique et Anti-toxoplasmique d'Amino-Hydroxynaphthoquinones Ferrocéniques

---

21. Hughes, L. M.; Covian, R.; Gribble, G. W.; Trumpower, B. L.: Probing binding determinants in center P of the cytochrome *bc1* complex using novel hydroxy-naphthoquinones. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**; *1797*, 38 – 43.
22. Baramee, A.; Coppin, A.; Mortuaire, M.; Pelinski, L.; Tomavo, S.; Brocard, J.: Synthesis and in vitro activities of ferrocenic aminohydroxynaphthoquinones against *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1294 – 1302.
23. Guiguemde, W.; Shelat, A. A.; Bouck, D.; Duffy, S.; Crowther, G. J.; Davis, P. H.; Smithson, D. C.; Connelly, M.; Clark, J.; Zhu, F.; Jimenez-Dias, M. B.; Martinez, M. S.; Wilson, E. B.; Tripathi, A. K.; Gut, J.; Sharlow, E. R.; Bathurst, I.; El Mazouni, F.; Fowble, J. W.; Forquer, I.; McGinley, P. L.; Castro, S.; Angulo-Barturen, I.; Ferrer, S.; Rosenthal, P. J.; DeRisi, J. L.; Sullivan Jr D. J.; Lazo, J. S.; Ross, D. S.; Riscoe, M. K.; Phillips, M. A.; Rathod, P. K.; Van Voorhis, W. C.; Avery, V. M.; Kiplin Guy, R. *Nature* **2010**, *465*, 311 – 315.
24. Richard-Lenoble, D.; Kombila, M.; Nguembi-Mbina, C.; Gendrel, D. : Antiparasitic therapy of children in Equatorial Africa. *Arch. Fr. Pediatr.* **1985**, *42*, Suppl 2, 977 – 981.
25. Poirriez, J.; Landau, I.; Verhaeghe, A.; Savage, A.; Dei-Cas, E.: Atypical forms of *Plasmodium vivax*. Apropos of a case. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **1991**, *66*, 149 – 154.
26. Richard-Lenoble, D.; Kombila, M.; Chandénier, J.; Gay, F.; Billiault, X.; Nguri, C.; Martz, M.; Boyer, F.; Bauzou, M.: Le paludisme au Gabon. II: Evaluation des prévalences parasitaires qualitatives et quantitatives sur l'ensemble du pays en milieu scolaire et préscolaires = Malaria in Gabon. 2. Valuation of qualitative prevalences all over the country in the pre-school and school circle. *Bull. Soc. Path. Ex.* **1987**, *80*, 532 – 542.
27. Ollomo, B.; Durand, P.; Prugnolle, F.; Douzery, E.; Arnathau, C.; Nkoghe, D.; Leroy, E.; Renaud, F.: A New Malaria Agent in African Hominids. *PLOS Pathogens.* **2009**, *5*, 1 – 5.
28. [http://encyclo.voila.fr/wiki/Fichier:Gabon\\_location\\_map.svg](http://encyclo.voila.fr/wiki/Fichier:Gabon_location_map.svg). Consulté le 25 juillet 2011.
29. Brasseur, P.; Agnamey, P.; Moreno, A.; Druilhe, P.: Évaluation de la sensibilité in vitro de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques par un test colorimétrique (DELI-microtest). *Med. Trop.* **2001**, *61*, 545 – 547.
30. Druilhe, P.; Moreno, A.; Blanc, C.; Brasseur, P. H.; Jacquier, P. : A Colorimetric *In Vitro* Drug Sensitivity Assay for *Plasmodium falciparum* Based on a Highly Sensitive Double-Site Lactate Dehydrogenase Antigen-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2001**, *64*, 233 – 241.
31. Tritten, L.; Matile, H.; Brun, R.; Wittlin, S.: A new double-antibody sandwich ELISA targeting *Plasmodium falciparum* aldolase to evaluate anti-malarial drug sensitivity. *Malar. J.* **2009**, *8*, 226.
32. Lekana-Douki, J.-B.; Traore, B.; Costa, F. T. M.; Fusai, T.; Pouvelle, B.; Sterkers, Y.; Scherf A.; Gysin, J.: Sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A, a receptor for maternal malaria: monoclonal antibodies against the native parasite ligand reveal pan-reactive epitopes in placental isolates. *Blood.* **2002**, *100*, 1478 – 1483.
33. McFadden, D. C.; Seeber, F.; Boothroyd, J. C.: Use of *Toxoplasma gondii* expressing beta-galactosidase for colorimetric assessment of drug activity in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1849 – 1953.
34. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methode.* **1983**, *65*, 55 – 63.



**CHAPITRE III : SYNTHÈSE, ACTIVITÉS  
ANTIPLASMODIALE ET ANTITUBERCULEUSE IN  
VITRO DES HYDRAZONES QUINOLEIQUES ET  
ACRIDINIQUES FERROCENIQUES**

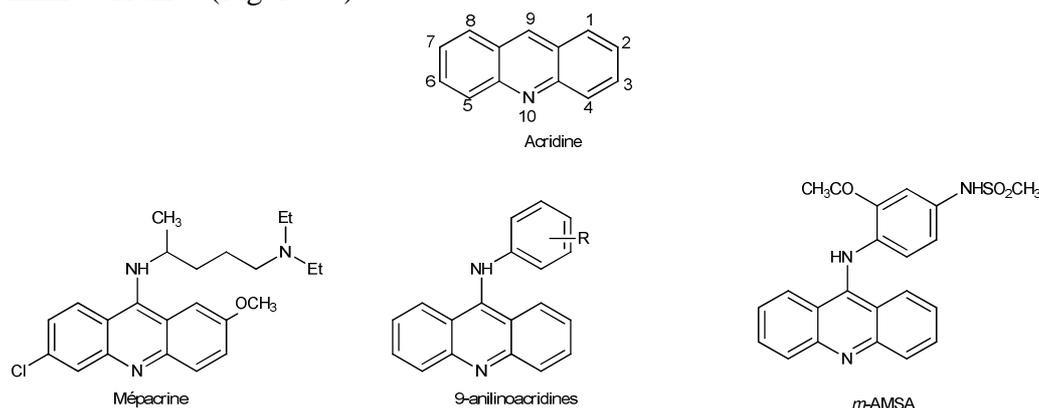


# Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

## I. INTRODUCTION

L'utilisation des acridines en tant qu'agents antimicrobiens a été proposée la première fois par Ehrlich et Benda en 1913.<sup>1</sup> Beaucoup de composés ayant le chromophore « acridine » ont été synthétisés et évalués d'un point de vue biologique. Ce sont les aminoacridines qui ont montré une utilisation la plus large, en tant qu'agents antibactériens et comme antipaludiques, pendant la deuxième guerre mondiale. En 1974, Cain et al.<sup>2</sup> élaborèrent l'amsacrine (*m*-AMSA, Figure 53), dérivé anilino-acridine doté de propriétés antitumorales remarquables. L'apparition des pénicillines a éclipsé l'utilisation des acridines dans l'antiseptie par leurs efficacités thérapeutiques plus grandes. Cependant, avec l'augmentation massive des résistances des infections bactériennes aux médicaments, on observe un regain d'intérêt pour les dérivés de l'acridine.<sup>3</sup>

Les dérivés de l'acridine, connus pour leur activité antipaludique, sont essentiellement des composés substitués par un groupe aminé en position 9 du noyau tels que la mépacrine et des 9-anilinoacridines (Figure 53).<sup>4,5</sup>



**Figure 53** : Structures chimiques de la mépacrine et des 9-anilinoacridines.

### I.1. Etude des dérivés de l'acridine dans le traitement du paludisme

Plusieurs études ont déjà été menées autour de nouveaux antipaludiques acridiniques. Dans un premier temps, Guetzoyan, et al,<sup>6</sup> ont réalisé la synthèse de deux séries de dérivés de l'acridine. Une première série est constituée d'acridiniums diprotonés dont les charges positives sont réparties comme suit : une sur l'azote terminale de la chaîne latérale greffée en 9 et une seconde sur l'azote du noyau acridinique. Et une seconde série, uniquement chargée positivement sur la chaîne peptidique, greffée sur le squelette d'acridine comme le montre la Figure 54. Les molécules ont été testées sur des souches chloroquino-résistantes de *P. falciparum* et donnaient des  $CI_{50} \leq 0,20 \mu M$ . Le composé **a**, de structure proche de la mépacrine, a montré la meilleure activité antipaludique (Tableau 10).

<sup>1</sup> Ehrlich, P.; Benda, L. *Chem. Ber.* **1913**, *46*,1913.

<sup>2</sup> Louie, A. C.; Issell, B. F. *J. Clin. Oncol.* **1985**, *3*, 562 – 592.

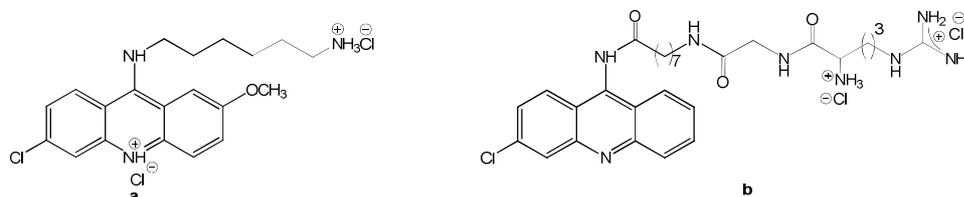
<sup>3</sup> Wainwright, M. J. *Antimicrob. Chemother.* **2001**, *47*, 1 – 13.

<sup>4</sup> Chavalitshewinkoon, P. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 403 – 406.

<sup>5</sup> Elueze, E. I.; Croft, S. L.; Warhurst, D. C. *J. Antimicrob. Chemother.* **1996**, *37*, 511 – 518.

<sup>6</sup> Guetzoyan, L. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3278 – 3289.

## Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

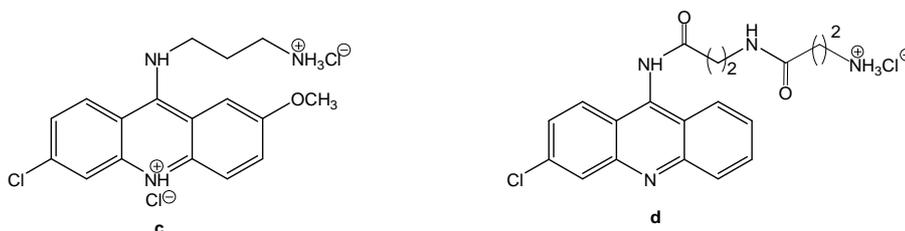


**Figure 54** : Structures de quelques acridines synthétisées par Guetzoyan et al.

**Tableau 10** : Résultats des tests *in-vitro* des acridines étudiées par Guetzoyan, et al. sur 3 souches chloroquino-résistantes de *P. falciparum*.

Molécules	W2 (CI <sub>50</sub> μM)	FCR3 ( CI <sub>50</sub> μM)	Bre1 ( CI <sub>50</sub> μM)
a	0.18	0.20	0.17
b	30.5	27.2	29
CQ	0.44	0.50	0.52

Deux ans plus tard, Guetzoyan et al.<sup>7</sup> synthétisèrent d'autres analogues acridiniques possédant une chaîne alkyle moins longue (n = 1 à 3). Après tests, ils confirment les hypothèses selon lesquelles, pour les dérivés acridiniques, la présence de la double charge positive joue un important rôle dans l'activité antipaludique. Cependant la longueur de la chaîne n'influence pas l'activité biologique car **a** et **c** (Figure 55) possèdent les mêmes CI<sub>50</sub> (Tableau 11).<sup>7</sup>



**Figure 55** : Nouveaux analogues acridiniques antipaludiques.

**Tableau 11** : Résultats des tests de sensibilité des nouveaux dérivés de l'acridine **c** et **d** sur des souches chloroquino-résistantes de *P. falciparum* étudiés par Guetzoyan et al.<sup>7</sup>

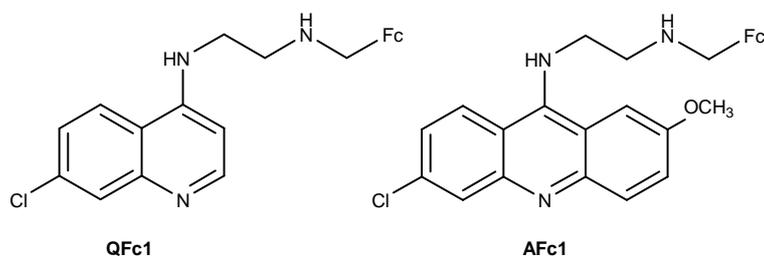
Molécules	W2 ( CI <sub>50</sub> μM)	FCR3 ( CI <sub>50</sub> μM)	Bre1 ( CI <sub>50</sub> μM)
c	0.18	0.20	0.17
d	21	18	22
CQ	0.44	0.50	0.52

Au laboratoire, la synthèse d'une grande variété d'acridines telles que la molécule AFc1 (Figure 56) avait également été réalisée par l'équipe de Brocard. Des dérivés quinoléiques possédant la même chaîne latérale telle que la molécule QFc1 permis de

<sup>7</sup> Guetzoyan, L. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 8032 – 8039.

# Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

comparer l'influence du noyau aromatique (acridine vs quinoléine) (Figure 56). Les résultats des tests biologiques sur W2, obtenus sont regroupés dans le Tableau 12 ci-dessous.



**Figure 56** : Structures chimiques de QFc1 et AFc1.

**Tableau 12** : Résultats des activités biologiques de QFc1 et AFc1 sur la souche chloroquino-résistante W2 de *P. falciparum* en comparaison à la CQ et la FQ.

Produits	CI <sub>50</sub> (nM)
Chloroquine (CQ)	149
Ferroquine (FQ)	13,2
QFc1	63,5
AFc2	116

Ces résultats montrent une bonne activité antipaludique uniquement pour le composé QFc1, qui reste deux fois moins actif que la FQ. La molécule AFc1 a une activité du même ordre de grandeur que celle de la CQ. De ce fait, la nature de l'hétérocycle (acridine vs quinoléine) semble influencer l'activité de ces molécules (résultats non publiés).

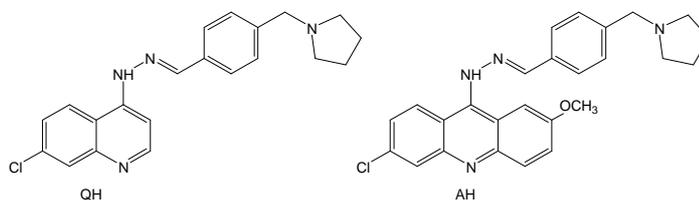
## II. SYNTHÈSE DES HYDRAZONES QUINOLÉIQUES ET ACRIDINIQUES FERROCENIQUES DANS LE TRAITEMENT DU PALUDISME

Très récemment, la synthèse de quinolinylhydrazones et d'acridinylhydrazones<sup>8,9</sup> a conduit à une série de molécules présentant des résultats satisfaisants sur les souches chloroquino-résistantes de *P. falciparum*. En effet, les hydrazones telles que la (*E*)-7-chloro-4-(2-(4-(pyrrolidin-1-ylméthyl)-benzylidène)hydrazinyl)quinoline (QH, Figure 57) et la (*E*)-6-chloro-2-méthoxy-9-(2-(4-(pyrrolidin-1-ylméthyl)benzylidène)hydrazinyl)acridine (AH, Figure 57) présentent de bonnes activités antipaludiques en comparaison à celles de la CQ (Tableau 13).

<sup>8</sup> Gemma, S. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5384 – 5388.

<sup>9</sup> Fattorusso, C. et al. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1333 – 1343.

# Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléiques et Acridines Ferrocéniques



**Figure 57** : Structures chimiques de QH et AH.

**Tableau 13** : Résultats des activités biologiques de QH, AH et CQ sur la souche chloroquinorésistante W2 de *P. falciparum*.

Produits	Activité $CI_{50}$ (nM)
QH	58,3
AH	137
Chloroquine (CQ)	149

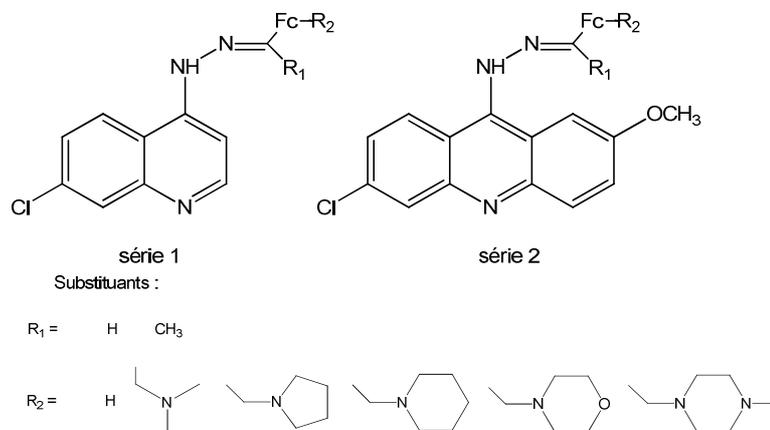
Ces résultats intéressants ont permis d'orienter nos travaux dans la synthèse des analogues hydrazones quinoléiques et acridiniques ferrocéniques.

## II.1. Synthèse des hydrazones ferrocéniques

### II.1.1. Objectif de synthèse

Dans cette partie, l'objectif réside en la synthèse de nouvelles hydrazones tout en conservant l'idée d'incorporer un ferrocène dans la molécule. De ce fait, en se basant sur les résultats présentés précédemment,<sup>8, 9</sup> nous avons axé nos travaux sur la synthèse de deux séries d'hydrazones ferrocéniques : des dérivés quinoléiques (Figure 58) et des dérivés acridiniques (Figure 58) où le cycle aromatique condensé à l'hydrazine sera remplacé par le ferrocène. Ce dernier sera substitué ou non par une fonction latérale amine.

Les substituants  $R_1$  et  $R_2$  ont été choisis en fonction des résultats biologiques obtenus pour les hydrazones acridiniques et quinoléiques décrits précédemment dans la littérature (Figure 58).<sup>8, 9</sup>



**Figure 58** : Hydrazones ferrocéniques des dérivés quinoléiques (série 1) et acridiniques (série 2).

# Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

## II.1.2. Synthèse des hydrazones acridiniques et quinoléiques ferrocéniques

La synthèse des hydrazones ferrocéniques s'effectue en 3 grandes étapes qui sont la synthèse des aldéhydes ferrocéniques, suivie de celle des hydrazines et enfin la condensation des aldéhydes et des hydrazines.

### a. Synthèse des aldéhydes ferrocéniques

Pour y parvenir, la première étape consiste en la synthèse des amines ferrocéniques monosubstitués, qui sont obtenues par substitution nucléophile de l'ion ammonium ferrocénique par des amines. Ensuite, l'ortholithiation suivie d'une condensation sur le DMF (*N,N*-diméthylformylamide) permet d'accéder aux aldéhydes ferrocéniques disubstitués.

#### 1. Substitution nucléophile de l'ammonium ferrocénique

Sur l'ammonium quaternaire ferrocénique **12**, dont la synthèse a été décrite précédemment (Chapitre II), une réaction de substitution est réalisée par des amines secondaires. En effet, le  $N^+(CH_3)_3$  substitué en position  $\alpha$  du ferrocène, constitue un très bon nucléofuge. Ainsi, il subit une attaque nucléophile donnant accès à une grande variété de dérivés ferrocéniques (Schéma 17).

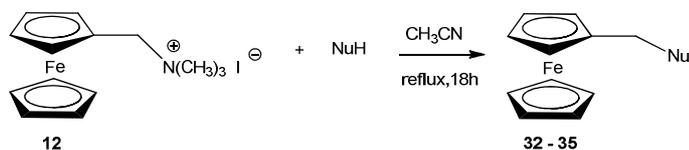


Schéma 17 : Réaction de substitution en  $\alpha$  du ferrocène.

Les amines **32 - 35** sont obtenues avec des rendements de 57 à 98 % après purification par extraction en milieu acide. Les résultats sont regroupés sur le Tableau 14.

Tableau 14 : Résultats de substitution nucléophile en  $\alpha$  du ferrocène.

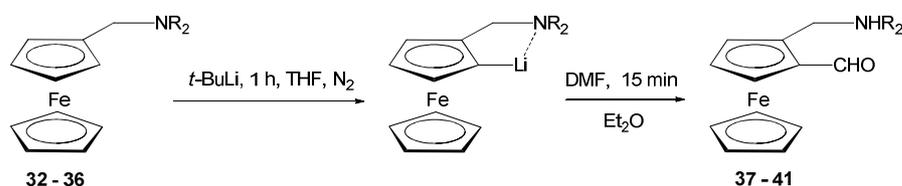
Produits	NuH	Rdt (%)
<b>32</b>		98
<b>33</b>		57
<b>34</b>		68
<b>35</b>		69

# Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

## 2. Synthèse des aldéhydes ferrocéniques

Cette étape consiste en l'ortholithiation des amines ferrocéniques préalablement synthétisés.

Les atomes d'hydrogène portés par les cycles cyclopentadiényles présentent une certaine acidité et sont labiles. Par conséquent, ils peuvent être arrachés par des alkylolithiens tels que le tertiobutyllithium.<sup>10</sup> Les dérivés lithiés ainsi obtenus, par métallation pendant une heure à température ambiante, sous atmosphère N<sub>2</sub>, peuvent alors réagir avec un électrophile, ici le DMF. La lithiation des dérivés ferrocéniques s'effectue de façon régiosélective en position 2 grâce à la complexation de l'atome de lithium par le doublet non liant de l'atome d'azote (Schéma 18).<sup>11</sup> Par contre, en raison de la chiralité métallocénique, l'aminoaldéhyde ferrocénique est obtenu sous forme d'un mélange racémique. Sur le schéma un seul des énantiomères est représenté.



**Schéma 18** : Ortholithiation des amines ferrocéniques.

Les aldéhydes ferrocéniques **37 - 41** ont été obtenus avec des rendements de 58 à 95 % (Tableau 15) après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice.

**Tableau 15** : Résultats de la synthèse des aldéhydes ferrocéniques.

Produits	NR <sub>2</sub>	Rdt (%)
<b>37</b>		95
<b>38</b>		94
<b>39</b>		88
<b>40</b>		58
<b>41</b>		83

<sup>10</sup> Slocum, D. W. ; Sugarman, D. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *12*, 222 – 247.

<sup>11</sup> Picart-Goetgheluck, S. et al. *Synthesis*, **2000**, *31*, 1421 – 1426.

# Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

## b. Synthèse des hydrazines

L'obtention des hydrazines est issue d'une substitution de l'atome de chlore en position 7 pour le cycle quinoléique et en position 9 pour le cycle acridinique, par un excès d'hydrazine. Ainsi, l'hydrazine réagit sur la 4,7-dichloroquinoléine **42** et sur la 6,9-dichloro-2-méthoxyacridine **44** dans l'éthanol à reflux pendant 4 heures. Les composés **43** et **45** sont ainsi obtenus avec des rendements respectifs de 100 % et 89 % (Schéma 19).

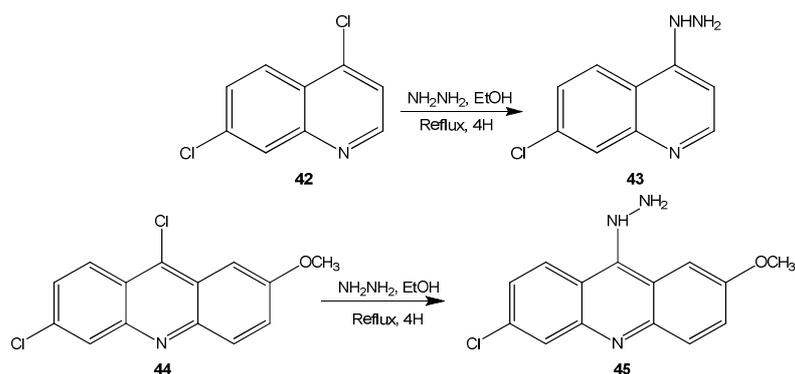


Schéma 19 : Synthèse des hydrazines quinoléiques et acridiniques **43 – 45**.

## c. Synthèse des hydrazones ferrocéniques

La dernière étape pour l'obtention de cette famille de molécules est la formation des hydrazones. Elle consiste en la condensation des hydrazines **43** et **45** avec la cétone ou les aldéhydes ferrocéniques dans le méthanol, en présence de tamis moléculaire et pendant 4h de reflux. Les deux séries d'hydrazones sont purifiées par colonne chromatographique sur gel de silice suivie d'une cristallisation.

### 1. Hydrazones quinoléines ferrocéniques, série 1

Dans cette série, l'hydrazine quinoléique **43** est condensée au ferrocénecarbaldéhyde, aux aminoaldéhydes ferrocéniques ainsi qu'à l'acétylferrocène (Schéma 20).

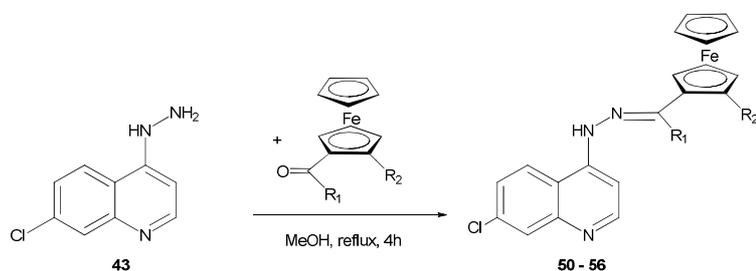
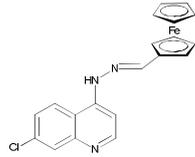
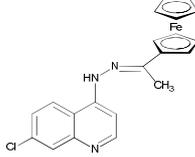
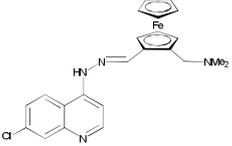
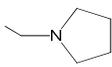
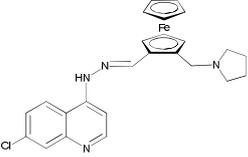
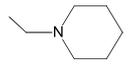
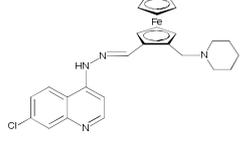
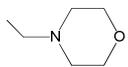
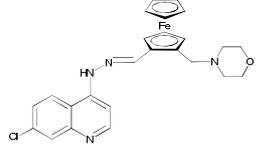
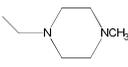
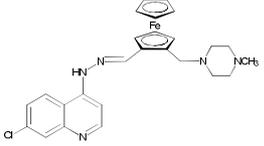


Schéma 20 : Synthèse des hydrazones quinoléiques ferrocéniques HQFc **50 – 56**.

Les hydrazones quinoléiques ferrocéniques **50-56** ont été obtenues avec des rendements de 61 à 95 % (Tableau 16).

*Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques*

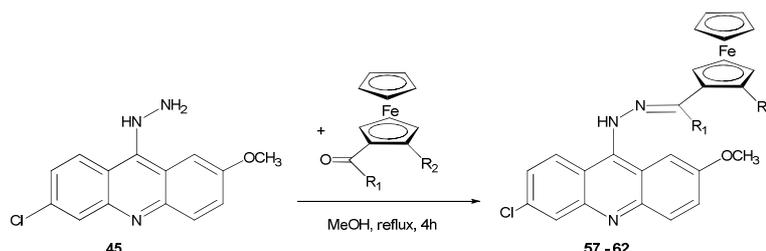
**Tableau 16** : Résultats de synthèse des HQFc 50 – 56 de la série 1.

Amines		Produits		
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Numéros	Formules	Rdt. (%)
H	H	<b>50</b>		89
CH <sub>3</sub>	H	<b>51</b>		90
H		<b>52</b>		61
H		<b>53</b>		95
H		<b>54</b>		91
H		<b>55</b>		74
H		<b>56</b>		74

## Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

### 2. Hydrazones acridiniques ferrocéniques, série 2

Selon un protocole expérimental identique à celui décrit précédemment, les analogues acridiniques sont synthétisés par condensation de l'hydrazine acridinique aux dérivés ferrocéniques cétoniques et aldéhydiques substitués (Schéma 21).



**Schéma 21** : Synthèse des hydrazones ferrocéniques acridiniques HFCAs 57 – 62.

Les hydrazones ferrocéniques acridiniques sont obtenues avec des rendements compris entre 64 et 94% (Tableau 17).

**Tableau 17** : Résultats de synthèse des HFCAs 57 – 62.

Amines		Produits		
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Numéros	Formules	Rdt. (%)
R <sub>1</sub>	H	<b>57</b>		90
H	H	<b>58</b>		90
CH <sub>3</sub>		<b>59</b>		80
H		<b>60</b>		94
H		<b>61</b>		64
H		<b>62</b>		94

# Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

---

## III. ACTIVITE ANTIPALUDIQUE IN-VITRO DES HYDRAZONES FERROCÉNIQUES (HFc)

Nous avons étudié l'activité antiplasmodiale des HQFcS **50-56** et des HFcAs **57-62** sur des souches F32, FcB1 et K1 de *P. falciparum* au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, dans le laboratoire de Parasitologie du Pr. Philippe Grellier et sur des isolats cliniques de *P. falciparum* au CIRMF au Gabon.

### III.1. Résultat des tests effectués sur les souches de *P. falciparum*

En collaboration avec Élisabeth Mouray de l'équipe du Pr. Philippe Grellier, nous avons effectué les tests de sensibilité en utilisant la méthode radioisotopique par marquage à l'hypoxanthine [<sup>3</sup>H]. Les souches de *P. falciparum* F32 (en provenance de la Tanzanie), FcB1 (de la Colombie) et K1 (de la Thaïlande) sont cultivées en continu dans des érythrocytes humains.<sup>12</sup> Les solutions stock de chloroquine diphosphate, d'artémisine, de la ferroquine et des HFcs **50-62** à tester, ont été préparées respectivement dans de l'eau distillée et du DMSO. Ces solutions ont été ensuite diluées en série avec du milieu de culture et introduites dans des plaques de 96 puits contenant les cultures asynchrones de parasites (présence de toutes les formes du parasite : rings, trophozoïtes, schizontes). Le test a été réalisé avec un taux final d'hématocrite de 1% et une parasitémie de 1%. Les plaques ont été ensuite incubées, une première fois, pendant 24h à 37°C, sous une atmosphère réduite en oxygène (cloche à bougie). Puis, après rajout de l'hypoxanthine [<sup>3</sup>H] (0.5 µCi par puits, 1 – 5 Ci/mol), elles ont été de nouveau mises à incuber pendant 24h.

L'activité antiplasmodiale est déterminée en fonction de l'incorporation de l'hypoxanthine [<sup>3</sup>H] par le parasite.<sup>13</sup> Ainsi, la radioactivité incorporée par des parasites en contact avec les molécules est comparée à celle des parasites maintenus en absence de médicament (puits de contrôle). Les concentrations inhibitrices 50% (CI<sub>50</sub>) et 90% (CI<sub>90</sub>) sont déterminées en traçant la courbe d'inhibition en fonction des concentrations médicamenteuses.

Ainsi, j'ai réalisé les tests en procédant à la mise en culture des molécules aux contact des hématies parasitées suivis de l'incubation, trois fois sur FcB1, deux fois sur F32 et une fois sur K1. Le Dr. Élisabeth se chargeait de l'ajout de l'hypoxanthine, solution radioactive, manipulable sous autorisations et compétences. Les résultats de ces tests sont regroupés dans le Tableau 18.

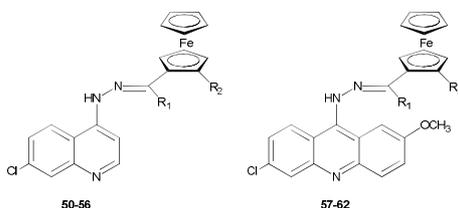
---

<sup>12</sup> Trager, W.; Jensen, J. B. *Science* **1976**, *193*, 673 – 677.

<sup>13</sup> Schrével, J.; Sinou, V.; Grellier, P.; Frappier, F.; Guénard, D.; Potier, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8472 – 8476.

## Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

**Tableau 18 :** Tableau de résultats des tests *in-vitro* des HFCs sur les souches de *P. falciparum* (CI<sub>50</sub> et CI<sub>90</sub> en µM).



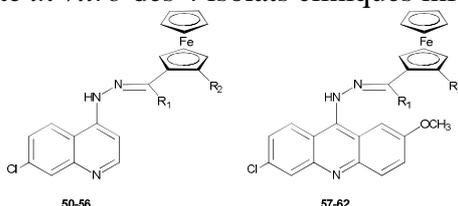
Molécules	Substituants		F32		FcB1		K1	
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>90</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>90</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>90</sub>
<b>50</b>	H	H	0.30	0.47	0.34	0.54	0.35	0.54
<b>51</b>	CH <sub>3</sub>	H	26	46	13	23	13	25
<b>52</b>	H		1.16	4	2.7	4.6	2.6	4.6
<b>53</b>	H		0.32	0.47	0.32	0.52	1.6	2.9
<b>54</b>	H		0.06	0.09	0.07	0.13	0.18	0.32
<b>55</b>	H		0.39	0.66	0.17	0.41	0.29	0.50
<b>56</b>	H		0.26	0.47	0.14	0.25	0.15	0.28
<b>57</b>	H	H	6.6	11.5	9.5	17.7	6.2	10.1
<b>58</b>	CH <sub>3</sub>	H	15	27	11	19,5	15	28
<b>59</b>	H		0.25	0.43	0.39	0.63	1.35	2.45
<b>60</b>	H		6.3	12	1.7	3.9	2.7	4.4
<b>61</b>	H		1.9	3.5	1.5	2.7	1.3	2.3
<b>62</b>	H		3	5.6	0.8	1.5	1.6	3
<b>CQ</b>			0.02	0.03	0.11	0.21	0.16	0.23
<b>Art</b>			0.03	0.05	0.02	0.03	0.03	0.04
<b>FQ</b>			0.03	0.05	0.02	0.04	0.03	0.05
<b>ACRIFC</b>			0.03	0.05	0.03	0.05	0.03	0.05

## Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

### III.2. Résultat des tests effectués sur des isolats cliniques infectés par *P. falciparum*

Au CIRMF, j'ai effectué les tests de sensibilité des HFcs **50-62** sur quatre isolats cliniques issus des malades souffrant du paludisme dû à *P. falciparum*. Tout comme les hydroxynaphtoquinones, la méthode utilisée était celle du test ÉliSa détaillée dans le chapitre précédent. Parmi ces quatre isolats, deux étaient chloroquino-sensibles et deux autres chloroquino-résistants. Pour chaque isolat, la manipulation était faite en duplicate. Le Tableau 19 récapitule les  $CI_{50}$  obtenues pour chacune des hydrazones ferrocéniques testées.

**Tableau 19 :** Sensibilité *in vitro* des 4 isolats cliniques infectés par *P. falciparum*.



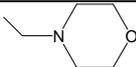
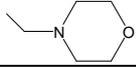
Molécules	Substituant		Isolat 11775	Isolat 6790	Isolat 7075	Isolat 11776
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>
50	H	H	0.5	0.3	0.003	0.003
51	CH <sub>3</sub>	H	21.3	12.4	NT	3.1
52	H		3.2	NT	NT	3.6
53	H		3.2	2.4	0.3	NT
54	H		1.7	0.7	0.3	0.6
55	H		0.5	0.3	0.003	NT
56	H		NT	NT	NT	NT
57	H	H	1.6	0.3	0.005	0.1
58	CH <sub>3</sub>	H	3	3	NT	3.1
59	H		28.3	NT	NT	6.5
60	H		4	2.1	0.003	NT
61	H		3	3	0.3	NT
62			1.4	0.3	0.003	NT
CQ			0.2	0.1	0.06	0.08

Isolat 11775 et isolat 6790 sont chloroquino-résistants, isolat 7075 et isolat 11776 sont chloroquino-sensibles. NT = non testés.

## *Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques*

Des tests de cytotoxicité ont été également réalisés sur certains des composés ferrocéniques. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 20.

**Tableau 20** : Résultats du test de cytotoxicité de quelques hydrazones ferrocéniques.

Molécules	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Cytotoxicité CC <sub>50</sub> (μM)
50	H	H	0.552
55	H		0.072
57	H	H	0.448
62	H		8.965

### III.3. Analyse des résultats

L'analyse du Tableau 18 montre que les hydrazones ferrocéniques présentent des CI<sub>50</sub> comprises entre 0,06 et 26 μM pour la souche chloroquino-sensible F32 (CI<sub>50</sub>CQ = 0,02 μM), entre 0,073 et 13 μM pour FcB1 (CI<sub>50</sub>CQ = 0,11 μM) et entre 0,15 et 13 μM pour K1 (CI<sub>50</sub>CQ = 0,16 μM), les deux souches chloroquino-résistantes. D'une manière générale, pour un même substituant R<sub>2</sub>, les hydrazones quinoléiques ferrocéniques sont plus actives que leurs analogues acridiniques. En effet, prenons par exemple l'HQFc **50** et l'HQFcA **57** (R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H) : Sur la souche K1 et sur l'isolat 11775, chloroquino-résistantes, les CI<sub>50</sub> de l'HQFc **50** sont plus basses que celle de l'HFcA **57** (0,35 et 0,50 versus 6,2 μM et 1,6 μM, respectivement).

On peut noter aussi que les valeurs des CI<sub>50</sub> obtenues pour les hydrazones ferrocéniques restent du même ordre de grandeur quelle que soit la sensibilité à la chloroquine de la souche testée. En effet, le résultat des tests réalisés sur des souches de référence bien caractérisées F32, FcB1 et K1 (Tableau 18) nous montre que pour le composé **58** par exemple, la concentration inhibitrice reste la même (15, 11 et 15 μM) tandis que celle de la chloroquine varie (0.02, 0.11 et 0.16 μM). Cette observation est aussi confirmée pour les isolats cliniques. Toujours pour le même composé **58**, sa CI<sub>50</sub> est la même sur tous les isolats cliniques (3.01, 3.01 et 3.14 μM, Tableau 19).

Certaines molécules ont donné des activités antiplasmodiales intéressantes comme on peut le voir dans le Tableau 18, où les HQFcs **50**, **54**, **55** et **56** présentent toutes des CI<sub>50</sub> comprises en 50 et 400 nM. L'HQFc **54**, la molécule la plus active, présente une activité du même ordre que celle de la CQ sur les souches F32, K1 et FcB1 (60 contre 20 nM, 180 contre 160 nM et 70 contre 111 nM, respectivement).

Sur les isolats cliniques (Tableau 19), en revanche, ce sont les molécules **50** et **55** qui sont les plus actives, avec des CI<sub>50</sub> comprises entre 3 et 500 nM. Sur les isolats 7075 et 11776, elles sont 10 fois plus actives que la CQ (3 nM contre 60 et 80 nM, Tableau 19). Sur les isolats 11775 et 6970, elles sont moins actives que la CQ, elles ont des CI<sub>50</sub> de 500 et 300 nM contre 200 et 100 nM pour CQ, Tableau 19.

Des résultats très surprenants ont été enregistrés pour les composés **50** et **55** sur des souches cliniques 7075 et 11776. Ils ont donné des CI<sub>50</sub> 10 fois plus actives que la CQ (3/60).

# Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

---

Il en est de même pour les composés **57**, **60** et **62**. Deux hypothèses sont à prévoir, soit le patient avait pris un antipaludique au départ et dans ce cas il pourrait avoir un effet synergique avec ces hydrazones. La deuxième hypothèse serait le polymorphisme de l'isolat. Celui-ci pourrait posséder des particularités génétiques (mutations sur le gène codant pour la(les) protéine(s) ciblée(s) par exemple) qui lui confèreraient un phénotype d'hypersensibilité aux hydrazones ferrocéniques.

## III.4. Conclusion

Nous avons pu réaliser la synthèse de 13 hydrazones ferrocéniques. L'activité antipaludique de ces dernières a été évaluée sur des souches de référence F32, FcB1 et K1 et également sur des souches cliniques infectées par *P. falciparum* (isolat 11775, 6790, 7075 et 11776). Ces HFcs ont peut-être des cibles différentes de celles de la chloroquine. D'une manière générale, les hydrazones quinoléiques ferrocéniques sont plus actives que les hydrazones ferrocéniques acridiniques. Parmi ces 13 molécules, quatre d'entre elles présentent de bons résultats antipaludiques avec des  $CI_{50}$  de l'ordre du nanomolaire (HQFc **50**, **54**, **55** et **56**). L'hydrazone quinoléique ferrocénique **54** avec des  $CI_{50}$  de 50, 70 et 179 nM est la plus active et se présente comme un potentiel antipaludique dont il serait important d'approfondir son étude.

En outre, nous n'avons pas obtenu les mêmes résultats sur les souches de laboratoire et les isolats cliniques. Plusieurs explications peuvent être envisagées, mais la plus plausible demeure celle de la différence des deux méthodes utilisées pour la réalisation des tests de sensibilité. En effet, sur les isolats cliniques, nous avons utilisé la méthode colorimétrique Deli-test, qui permet de détecter la pLDH présente dans les hématies parasitées. Par contre sur les souches de laboratoire, c'est la méthode radioisotopique par marquage à l'hypoxanthine [ $^3H$ ] qui fut utilisée.

Les dérivés d'hydrazones, constituent une importante classe de composés pour le développement de nouveaux médicaments car ils possèdent un large panel de domaine d'action.<sup>14</sup> Les hydrazones sont ainsi également utilisées dans le traitement de la tuberculose.<sup>15</sup> À la suite des travaux de Savini et coll., nous nous sommes intéressés à l'activité antituberculeuse des hydrazones ferrocéniques **50** – **62**.

---

<sup>14</sup> Rollas Sevim et Küçükgül Güneş, *Molecules*. **2007**, *12*, 1910 – 1939.

<sup>15</sup> Savini, L. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2193 – 2198.

# Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

---

## IV. LES HYDRAZONES FERROCENIQUES DANS LE TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE

### IV.1. La tuberculose

La tuberculose est causée par un micro-organisme aérobie à croissance lente de la famille des mycobactériacées, qui comprend des formes pathogènes pour l'homme et l'animal, des formes occasionnellement pathogènes et des formes saprophytes non pathogènes. La mycobactérie la plus souvent à l'origine de la tuberculose humaine est *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis* ou bacille de Koch ou BK), qui fait partie des mycobactéries du complexe *tuberculosis* comprenant également *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* et *Mycobacterium canetti*.<sup>16, 17</sup>

La tuberculose est transmise par voie aérogène, c'est-à-dire d'une personne atteinte de tuberculose pulmonaire à une autre personne non infectée. L'infection se transmet à travers un aérosol de très petites gouttelettes de sécrétions bronchiques («droplet nuclei»), qui sont dispersées dans l'air lors de quintes de toux et inhalées par la personne saine en contact. Le risque de contamination dépend de la concentration des mycobactéries dans l'air ambiant, de la virulence des micro-organismes, de la durée d'exposition et de la réceptivité individuelle de la personne en contact. Dans la pratique, cela signifie que seules les personnes atteintes de tuberculose des voies aériennes (poumons, bronches, larynx) peuvent transmettre la maladie, pour autant que leurs expectorations contiennent des bactéries tuberculeuses en quantité suffisante et que ces expectorations atteignent l'air ambiant sous forme d'aérosol.<sup>18</sup> Les mycobactéries peuvent aussi être aérosolisées en laboratoire et lors d'autopsies. On admet qu'un séjour de plusieurs heures dans un espace insuffisamment aéré est nécessaire pour qu'une transmission puisse avoir lieu. Chez les personnes immunodéprimées, il est possible que l'infection puisse avoir lieu après un contact de courte durée avec un malade. Aussi, il existe quatre formes de tuberculose: la tuberculose primaire, la tuberculose pulmonaire, la tuberculose chez l'enfant et la tuberculose extra-pulmonaire.

### IV.2. La tuberculose dans le monde

L'OMS estime que c'est dans la Région de l'Asie du Sud-Est que les cas ont été les plus nombreux en 2008, avec 35% de l'incidence mondiale. Toutefois, le taux estimatif d'incidence par habitant est presque deux fois plus élevé en Afrique subsaharienne qu'en Asie du Sud-Est, avec près de 350 cas pour 100 000 habitants.

---

<sup>16</sup> Mostowy, S. ; Behr, M. A. *Clin. Chest. Med.* **2005**, 26, 207 – 216, v-vi.

<sup>17</sup> Bloom, B. A.; Small, P. M. *N. Engl. J. Med.* **1998**, 338, 677 – 678.

<sup>18</sup> Rouillon, A.; Perdrizet, S.; Parrot, R. *Rev. Fr. Mal. Resp.* **1976**, 4, 241 – 272.

## Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

En 2009, 1,7 millions de décès dus à la tuberculose ont été enregistrés dont 380 000 femmes, ce qui équivaut à 4700 morts par jour.<sup>19</sup> La tuberculose figure parmi les trois plus importantes causes de décès chez la femme entre 15 et 44 ans.

Toujours en 2009, l'OMS a dénombré 9,4 millions de nouveaux cas de tuberculose, dont 1,1 millions chez des personnes vivant avec le VIH.<sup>19</sup> La Région africaine compte le nombre de décès le plus important. Depuis 1990, le taux de mortalité dû à la tuberculose a chuté de 35%. Tandis que l'incidence estimative de la tuberculose par habitant était stable ou en diminution, en 2008, dans les six régions de l'OMS (l'Afrique, l'Amérique, l'Asie du Sud-Est, la Méditerranée orientale et le Pacifique occidental). C'est en 2004 qu'il avait atteint son plus haut point (142/100 000 habitant). Très récemment, en 2009, le taux d'incidence mondiale est retombé à 137 cas pour 100 000 (Figure 59).

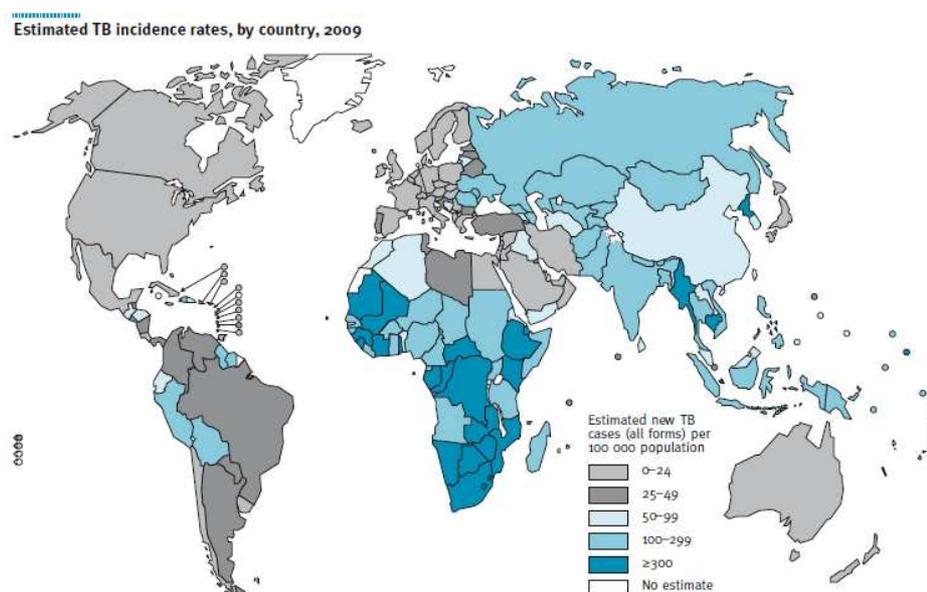


Figure 59 : Répartition mondiale de la tuberculose.<sup>19</sup>

### IV.3. Le traitement de la tuberculose

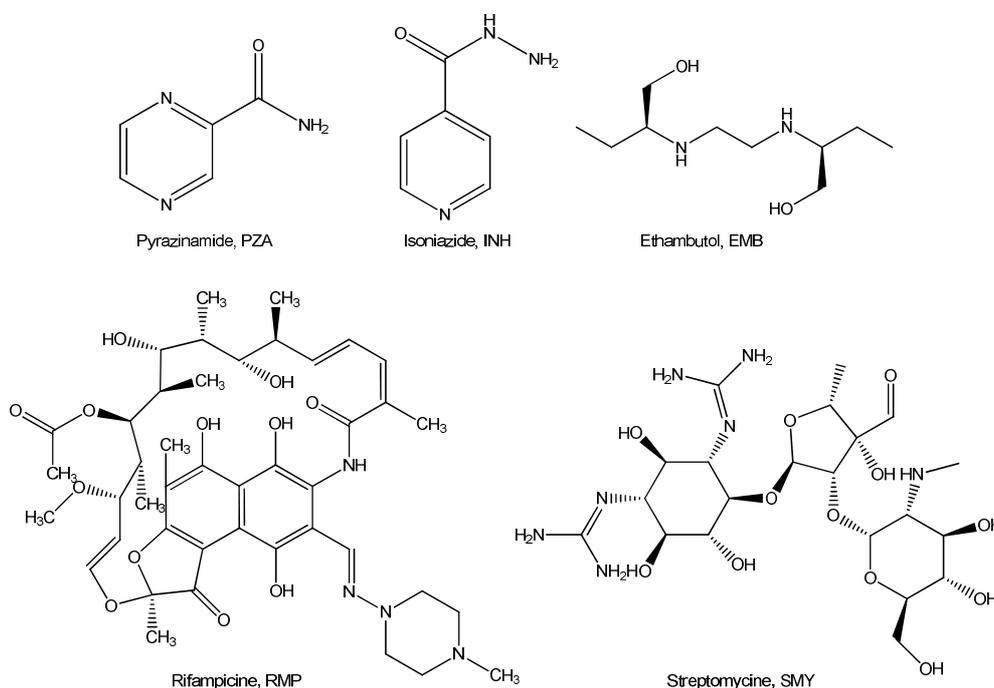
#### IV.3.1. Antibiotiques antituberculeux essentiels

Bien qu'il existe un vaccin contre la tuberculose, le BCG (Basile Calmette Guérin), quatre antibiotiques sont essentiels dans le traitement curatif de la tuberculose, qui sont des antituberculeux de 1<sup>ère</sup> ligne (Figure 60). À ces antibiotiques, s'ajoute l'éthambutol, un bactériostatique permettant d'éviter l'apparition des résistances (Figure 60).<sup>20</sup>

<sup>19</sup> WHO report : Global tuberculosis control 2010. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf). Consulté le 4 mai 2011

<sup>20</sup> [http://www.refbooks.msf.org/MSF\\_Docs/Fr/Tuberculosis/Tuberculosis\\_fr.pdf](http://www.refbooks.msf.org/MSF_Docs/Fr/Tuberculosis/Tuberculosis_fr.pdf). Consulté le 4 mai 2011.

# Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

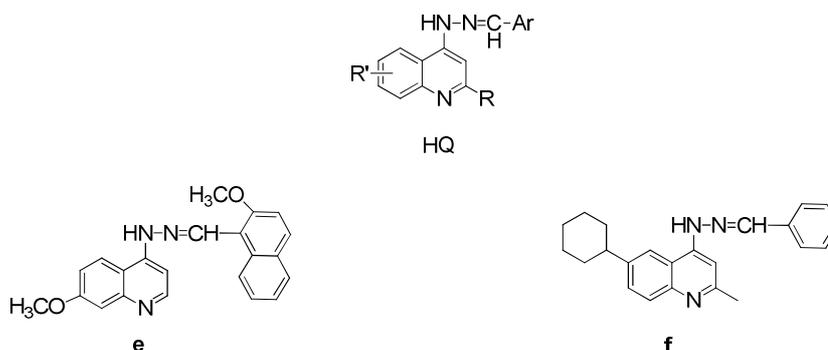


**Figure 60 :** Structures chimiques des antibiotiques antituberculeux.

Cependant, l'apparition de souches multirésistantes est de plus en plus fréquente et s'explique par un mauvais suivi du traitement par le patient ou la prescription d'un traitement mal adapté. Ainsi, Il est donc nécessaire de continuer à développer de nouvelles molécules antituberculeuses.

## IV.3.2. Quelques hydrazones de synthèse dans le traitement de la tuberculose

Plusieurs équipes de recherches se sont également intéressées à l'étude des hydrazones dans le traitement de la tuberculose. C'est le cas de Savini et al.,<sup>15</sup> qui ont synthétisé, en 2002, des hydrazones quinoléiques et les ont testées sur des souches de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv ainsi que sur *Mycobacterium avium* (Figure 61). De plus, deux des hydrazones quinoléiques les plus actives sur *M. tuberculosis* (HQ e et HQ f, Figure 61) possèdent de faibles cytotoxicités.<sup>15</sup>



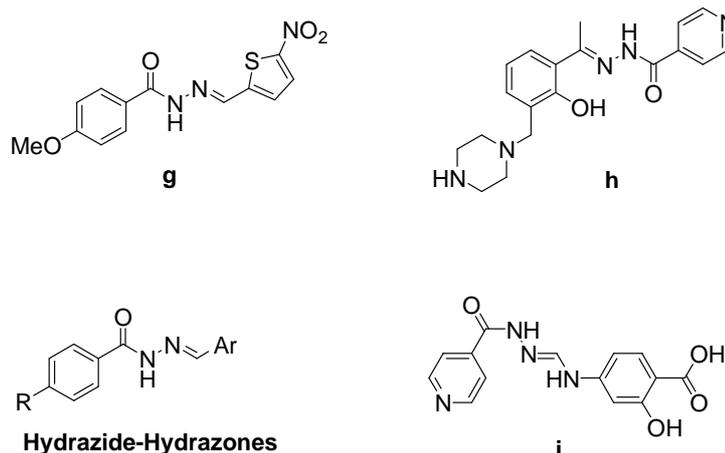
**Figure 61 :** Structures chimiques des hydrazones quinoléines synthétisées par Savini et al.<sup>15</sup>

### Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

La même année, Rando et al. synthétisèrent d'autres hydrazones parmi lesquelles le composé **g** (Figure 62) représentait la molécule la plus active avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 2.0 µg/mL.<sup>21</sup> La valeur de CMI correspond à la concentration minimale qui inhibe 99 % des souches de *M. tuberculosis*.

Très récemment, des hydrazones issues de la famille des isoniazides furent synthétisées par Sriram et al. Le composé le plus actif présentait une CMI de 0.56 µM (**h**, Figure 62).<sup>22</sup> Badia et al.<sup>23</sup> s'intéressèrent à la famille des hydrazide-hydrazones (Figure 62).

Dans une toute autre démarche, la condensation de deux molécules biologiquement actives reliées par un carbone a été exploitée par Imramovský et al.<sup>24</sup> Ils se sont basés sur les dérivés d'isonicotinoyl hydrazide, de pyrazinamide, d'acide *p*-aminosalicylique (PAS), d'éthambutol et de ciprofloxacine. Ainsi, la molécule issue de la condensation de l'isonicotinoyl hydrazide et de l'acide *p*-aminosalicylique ressort comme étant la plus active sur *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv avec une CMI de 0.37µg/mL (**i**, Figure 62).<sup>24</sup>



**Figure 62** : Structures de quelques hydrazones de synthèse contre *M. tuberculose* H<sub>37</sub>Rv.

#### IV.4. Activité antituberculeuse des HFCs 50 – 62

L'activité antituberculeuse des hydrazones ferrocéniques synthétisées a été étudiée *in vitro* sur la souche de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. Les tests ont été réalisés dans le laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux par le Docteur Jeanne Maugein en utilisant le système de tube d'indicateur de croissance des mycobactéries (TICM). L'éthambutol (EMB, Figure 60) et l'isoniazide (INH, Figure 60) ont été pris comme antituberculeux de référence. La concentration minimale inhibitrice (CMI, µmol/L) de chaque HFc a été déterminée par BACTEC 960.<sup>25</sup>

<sup>21</sup> Rando, D. G., et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 557 – 560.

<sup>22</sup> Sriram, D.; Yogeewari, P.; Madhu, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4502 – 4505.

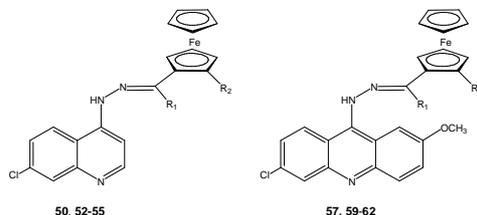
<sup>23</sup> Kaymakçioğlu, K. B. et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1253 – 1261.

<sup>24</sup> Imramovský, A. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2551 – 2559.

<sup>25</sup> G. M. Magueue et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 31 – 38.

## Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

**Tableau 21** : Résultats du test d'inhibition des HFcs sur *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.



Molécules	Substituant R	CMI H37Rv	CMI H37Rv
		( $\mu\text{mol/L}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>50</b>	H	20.5	8
<b>52</b>		28.6	12.8
<b>53</b>		67.7	32
<b>54</b>		263	128
<b>55</b>		137	64
<b>57</b>	H	17	8
<b>59</b>		242.2	128
<b>60</b>		23.1	12.8
<b>61</b>		56.5	32
<b>62</b>		22.5	12.8
<b>EMB</b>		9.8	2
<b>INH</b>		>0.43	>0.06

L'analyse du Tableau 21 montre que les hydrazones ferrocéniques présentent des CMI comprises entre 8 et 128  $\mu\text{g/mL}$  (17 et 263  $\mu\text{M}$ ). Elles s'avèrent être moins actives que l'isoniazide et l'éthambutol. Par contre, certaines molécules telles que les HQFc **50** et **52**, les HFcA **57**, **60** et **62** se distinguent des autres par leurs activités intéressantes. En effet, elles ont des CMI comprises entre 8 et 12,8  $\mu\text{g/mL}$ . Les molécules les plus actives **50** et **57** sont celles qui ne possèdent pas de substituants sur le ferrocène.

### V. CONCLUSION

Au terme de cette étude, une série d'hydrazones ferrocéniques acridiniques et quinoléiques a été synthétisée. Leurs activités antiparasitaire et antituberculeuse ont également été étudiées. Ainsi, d'après les résultats des tests obtenus (Tableau 18, Tableau 19), les molécules HQFc **50**, **54** - **56** sont plus actives que les autres sur *P. falciparum*. De ce fait, les dérivés quinoléiques restent le meilleur choix de squelette aromatique en comparaison avec les acridiniques dans la conception de nouveaux antipaludiques. Par contre pour l'activité antimycobactériale (Tableau 21), ce sont les HQFc **50** et HFcA **57** qui demeurent plus actives que toutes les autres. Ce qui nous amène à conclure que pour ces hydrazones ferrocéniques, l'ajout d'un groupement alkyle au niveau du ferrocène, n'est pas nécessaire car il diminue l'effet antituberculeux de ces dernières.

# Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ehrlich, P.; Benda, L. *Chem. Ber.* **46**, **1931**, 1913.
2. Louie, A. C.; Issell, B. F.: Amsacrine (AMSA) a clinical review. *J. Clin. Oncol.* **1985**, *3*, 562 – 592.
3. Wainwright, M.: Acridine – a neglected antibacterial chromophore. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *47*, 1 – 13.
4. Chavalitshewinkoon, P.; Wilairat, P.; Gamage, S.; Denny, W.; Figgitt, D.; Ralph, R.: Structure-Activity Relationships and Modes of Action of 9-Anilinoacridines against Chloroquine-Resistant Plasmodium falciparum In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 403 – 406.
5. Elueze, E. I.; Croft, S. L.; Warhurst, D. C: Activity of pyronaridine and mepacrine against twelve strains of *Plasmodium falciparum* in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* **1996**, *37*, 511 – 518.
6. Guetzoyan, L.; Ramiandrasoa, F.; Dorizon, H.; Desprez, C.; Bridoux, A.; Rogier, C.; Pradines, B.; Perrée-Fauvet, M.: In vitro efficiency of new acridyl derivatives against *Plasmodium falciparum*. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3278 – 3289.
7. Guetzoyan, L.; Yu, X.-M.; Ramiandrasoa, F.; Pethe, S.; Rogier, C.; Pradines, B.; Cresteil, T.; Perrée-Fauvet, M.; Mahy, J.-P.: Antimalarial acridines: Synthesis, in vitro activity against *P. falciparum* and interaction with hemozoin. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 8032 – 8039.
8. Gemma, S.; Kukreja, G.; Fattorusso, C.; Persico, M.; Romano, M. P.; Altarelli, M.; Savini, L.; Campiani, G.; Fattorusso, E.; Basilico, N.; Taramelli, D.; Yardley, V.; Butini, S.: Synthesis of N1-arylidene-N2-quinolyl- and N2-acrydinylhydrazones as potent antimalarial agents active against CQ-resistant *P. falciparum* strains. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5384 – 5388.
9. Fattorusso, C.; Campiani, G.; Kukreja, G.; Persico, M.; Butini, S.; Romano, M. P.; Altarelli, M.; Ros, S.; Brindisi, M.; Savini, L.; Novellino, E.; Nacci, V.; Fattorusso, E.; Parapini, S.; Basilico, N.; Taramelli, D.; Yardley, V.; Croft, S.; Borriello, M.; Gemma, S.: Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationship Studies of 4-Quinolyl- and 9-Acrydinylhydrazones as Potent Antimalarial Agents. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1333 – 1343.
10. Slocum, D. W. ; Sugarman, D. I.: Polyamine-Chelated Alkali Metal Compounds. *Advances in Chemistry, J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *chapter 12*, pp 222 – 247.
11. Picart-Goetgheluck, S.; Delacroix, O.; Maciejewski, L.; Brocard, J.: High Yield Synthesis of 2-Substituted (*N,N*-Dimethylaminomethyl)ferrocenes. *Synthesis*, **2000**, *31*, 1421 – 1426.
12. Trager, W.; Jensen, J. B. : Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **1976**, *193*, 673 – 677.
13. Schrével, J.; Sinou, V.; Grellier, P.; Frappier, F.; Guénard, D.; Potier, P. : Interactions between docetaxel (Taxotere) and Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8472 – 8476.
14. Rollas, S.; Küçükgül, G.: Biological Activities of Hydrazone Derivatives. *Molecules*. **2007**, *12*, 1910 – 1939.
15. Savini, L.; Chiasserini, L.; Gaeta A.; Pellerano, C.: Synthesis and anti-tubercular evaluation of 4-quinolylhydrazones. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2193 – 2198.
16. Mostowy, S. ; Behr, M. A.: The origin and evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Clin. Chest. Med.* **2005**, *26*, 207 – 216, v-vi.
17. Bloom, B. A.; Small, P. M.: The Evolving Relation between Humans and *Mycobacterium tuberculosis*. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *338*, 677 – 678.
18. Rouillon, A.; Perdrizet, S.; Parrot, R.: Transmission of tuberculous bacillus. Action of antibiotics. *Rev. Fr. Mal. Resp.* **1976**, *4*, 241 – 272.
19. WHO report : Global tuberculosis control 2010. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf). Consulté le 4 mai 2011.
20. [http://www.refbooks.msf.org/MSF\\_Docs/Fr/Tuberculosis/Tuberculosis\\_fr.pdf](http://www.refbooks.msf.org/MSF_Docs/Fr/Tuberculosis/Tuberculosis_fr.pdf). Consulté le 4 mai 2011.
21. Rando, D. G.; Sato, D. N.; Siqueira, L.; Malvezzi, A.; Leite, C. Q. F.; do\_Amaral, A. T.; Ferreira, E. I.; Tavares, L. C.: Potential Tuberculostatic Agents. Topical Application on Benzoic Acid [(5-Nitrothiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide Series. Rando, D. G., et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 557 – 560.
22. Sriram, D.; Yogeewari, P.; Madhu, K.: Synthesis and in vitro and in vivo antimycobacterial activity of isonicotinoyl hydrazones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4502 – 4505.

### *Chapitre III : Synthèse, Activités Antiplasmodiale et Antituberculeuse In Vitro des Hydrazones Quinoléines et Acridines Ferrocéniques*

---

23. Badia K.-K.; Oruç, E. E.; Unsalan, S.; Kandemirli, F.; Shvets, N.; Rollas, S.; Anatholy, D.: Synthesis and characterization of novel hydrazide-hydrazones and the study of their structureantituberculosis activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1253 – 1261.
24. Imramovský, A. ; Polanc, S. ; Vinsová, J. ; Kocevar, M. ; Jampílek, J. ; Recková, Z. ; Kaustová, J. : A new modification of anti-tubercular active molecules. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2551 – 2559.
25. Mwande-Maguene, G.; Jakhlal, J.; Ladyman, M.; Vallin, A.; Ralambomanana, D. A.; Bousquet, T.; Maugein, J.; Lebibi, J.; Pélinski, L.: Synthesis and antimycobacterial activity of a series of ferrocenyl derivatives. *Euro. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 31 – 38.



## Original article

## Synthesis and antimycobacterial activity of a series of ferrocenyl derivatives

Gabin Mwande Maguene<sup>a</sup>, Jouda Jakhla<sup>a</sup>, Melissa Ladyman<sup>a</sup>, Aurélie Vallin<sup>a</sup>,  
Dimby Andrianina Ralambomanana<sup>a</sup>, Till Bousquet<sup>a</sup>, Jeanne Maugein<sup>b</sup>, Jacques Lebibi<sup>c,\*\*</sup>,  
Lydie Pélinski<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université Lille Grand Nord, Université de Lille 1, Unité de Catalyse et de Chimie du Solide, UMR CNRS 8181, ENSCL, B.P. 108, 59652 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Bactériologie, CHU de Bordeaux, Hôpital du Haut-Lévêque, Avenue de Magellan, 33604 Pessac, France

<sup>c</sup> Université des Sciences et Techniques de Masuku, Franceville, Gabon

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 July 2010

Received in revised form

30 September 2010

Accepted 1 October 2010

Available online 20 November 2010

## Keywords:

Ferrocene

Synthesis

Antitubercular activity

*Mycobacterium tuberculosis*

## ABSTRACT

In this work we reported the synthesis and evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* activities *in vitro* of a series of twenty five ferrocenyl derivatives: ferrocenyl amides derived from nicotinamide and pyrazinamide, ferrocenyl pyridinyl, quinolyl and acridinylhydrazones. In particular ferrocenyl acylhydrazones **7** and **8** and ferrocenylquinoxaline amide **57** showed interesting antimycobacterial activities.

© 2010 Published by Elsevier Masson SAS.

## 1. Introduction

Tuberculosis (TB) represents a highly contagious, airborne disease that is caused by infection with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and is the leading cause of infectious disease mortality in the world. World health organization (WHO) estimates about 8 million new active cases of tuberculosis per year and nearly 2 million deaths each year. Even though improved methods of prevention, detection, diagnosis and treatment have greatly reduced the number of people who contract the disease and die from it, the emergence of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) tuberculosis resulted in a major setback in the global fight against TB [1,2]. Currently, TB chemotherapy is made up of a cocktail of first-line drugs, isoniazid (INH), rifampin (RIF), pyrazinamide (PZA) and ethambutol (EMB), given for six months. This is a major barrier to full patient compliance and has contributed to the development of drug-resistant strains [3]. The increasing problem of MDR-TB and XDR-TB has focused attention on developing new drugs that are not only active against drug-resistant TB, but also shorten the lengthy therapy [4–6]. There is urgent need and significant interest in developing new TB drugs.

Over the past few years, bioorganometallic chemistry has developed as a rapidly growing and maturing area which links

classical organometallic chemistry to biology, medicine, and molecular biotechnology [7]. Among metallocenes, ferrocene has attracted special attention since it is a neutral, chemically stable and nontoxic molecule. Many ferrocenyl compounds display interesting cytotoxic [8,9], antimalarial [10–12], antifungal [13], antitoxoplasmic [14] and DNA-cleaving activity [15].

In spite of toxicity, isoniazid (INH) is still considered to be first-line drug for chemotherapy of tuberculosis. Various isonicotinoylhydrazones have been synthesized because of the development of isoniazid-resistant *M. tuberculosis* strains [16–18]. More recently, the antitubercular activity of quinolylhydrazones has been also reported [19–22]. In previous studies, we reported the synthesis of ferrocenyl diamines and the evaluation of their antimycobacterial activity. These novel derivatives have been based on the modification of ethambutol by incorporating ferrocenyl moiety [23]. To pursue this goal, our effort has been focused on ferrocenyl pyridinyl and quinolylhydrazones. A second series of the ferrocenyl amides derived from nicotinamide and pyrazinamide has also been presented.

## 2. Chemistry

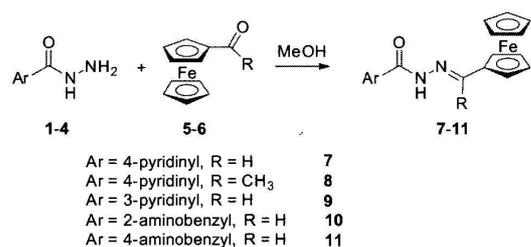
## 2.1. Synthesis of ferrocenyl hydrazones

The ferrocenyl acylhydrazones **7–11** were synthesized according to the reported procedure (Scheme 1). The hydrazides **1–4** were

\* Corresponding author. Tel.: +33 320 43 65 01; fax: +33 320 43 65 85.

\*\* Corresponding author.

E-mail address: [lydie.pelinski@ensclille.fr](mailto:lydie.pelinski@ensclille.fr) (L. Pélinski).



Scheme 1. Synthesis of ferrocenyl hydrazones 7–11.

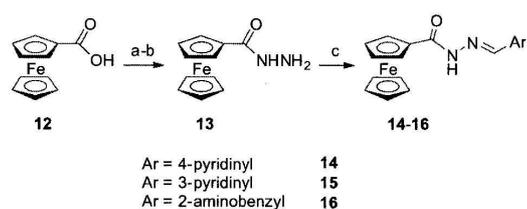
reacted with equimolar amounts of commercially ferrocene carboxaldehyde **5** or acetylferrocene **6** to give **7–11** in 52–93% yields (Scheme 1, Table 1) [24–26].

The ferrocenyl hydrazones **14–16** were obtained in three steps. First, ferrocene hydrazide **13** was obtained by condensation of ferrocene carboxylic acid with *tert*-butyl hydrazinocarboxylate in the presence of EDCI followed by deprotection of the Boc group by trifluoroacetic acid in 65 % global yield [27]. The ferrocenyl hydrazide was reacted with pyridine-4-carboxaldehyde, pyridine-3-carboxaldehyde and ortho-aminobenzaldehyde to give respectively hydrazones **14–16** in 37–80 % yields (Scheme 2).

Table 1

Structure, yield and antimycobacterial *in vitro* activity against *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv and three clinical isolates of ferrocenyl acylhydrazones **7–11**.

Compound	Ar	R	Yield (%)	MIC H <sub>37</sub> Rv (μmol/L)	Clinical isolates V	Clinical isolates M	Clinical isolates G
7		H	93	0.75	0.15	12	48
8		CH <sub>3</sub>	92	0.72	2.88	11.5	>46
9		H	83	>384	–	–	–
10		H	89	368	–	–	–
11		H	52	184	–	–	–
EMB	–	–	–	9.8	–	–	–
INH	–	–	–	<0.43	0.87	3.6	29

Scheme 2. Synthesis of ferrocenyl hydrazones **14–16**: (a) NH<sub>2</sub>NHBoc, EDCI, rt; 24 h (b) trifluoroacetic acid, rt, 1 h; (c) ArCHO, rt, 4 h.

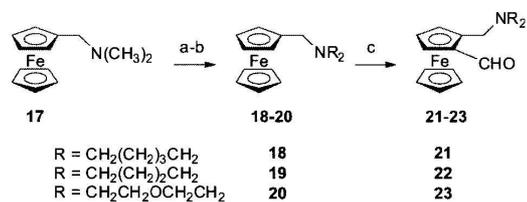
The ferrocenyl amino aldehydes were then obtained in three steps. First, *N,N*-dimethylaminomethylferrocene **17** was reacted in acetonitrile with methyl iodide giving the corresponding ammonium. Then, a substitution of the ammonium group with pyrroline, piperidine and morpholine in acetonitrile in the presence of potassium carbonate provided respectively the ferrocenyl amines **18**, **19** and **20** in 57–98% overall yields [28]. The ortholithiation of ferrocenyl amines **18–20** by *tert*butyllithium followed by addition of DMF led to aldehydes **21–23** in 81–98 % yields (Scheme 3). The hydrazines **24** and **25** were condensed with ferrocene carboxaldehyde, 2-(*N,N*-dimethylaminomethylferrocene)carboxaldehyde and ferrocenyl aldehydes **21–23** to furnish hydrazones **26–35** in 61–98% yields (Scheme 4, Table 2).

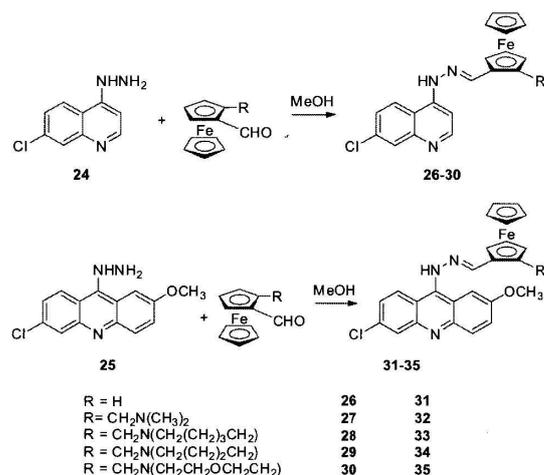
## 2.2. Synthesis of ferrocenyl amides

The synthesis of ferrocenyl amides and esters was achieved by a reaction between aryl carboxylic acid and ferrocenyl amines or alcohols.

Following the procedure of the literature, ferrocenylmethylamine **37** was first synthesized in 93% global yield by condensation of hydroxylamine on ferrocene carboxaldehyde **36** followed by a reduction with LiAlH<sub>4</sub> [14,29]. The ferrocenyl derivative **39** were then prepared with 60% yield by condensation of a large excess of piperazine with the ferrocenyl ammonium **38** in presence of potassium carbonate in CH<sub>3</sub>CN (Scheme 5) [10,30].

Esterification of 2-pyrazinecarboxylic acid, 2-quinoxaline acid and 3-nicotinic acid with ferrocenyl methanol in the presence of DCC/DMAP gave esters **43–45** in 70–96 % yield (Scheme 6). The ferrocenyl amides **54–60** were obtained by condensation of aryl aromatic carboxylic acid with amines **37** and **39** in presence of bromo-tris-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBroP) or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI). Compounds **54–60** were obtained in 31 to 68 % yields (Scheme 7). Yields and chemical structures have been reported in Table 3.

Scheme 3. Synthesis of ferrocenyl aldehydes **18–20**: (a) ICH<sub>3</sub>, MeCN, rt; 1 h (b) secondary amine, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeCN; reflux, 12 h (c) *tert*-BuLi, rt, 1 h then DMF.



Scheme 4. Synthesis of ferrocenyl hydrazones 26–30 and 31–35.

### 3. Biological activity

The antimycobacterial *in vitro* activity of ferrocenyl derivatives for tuberculosis inhibition against *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv strain was carried out using the Mycobacteria Growth Indicator Tube system (MGIT) at a concentration of 2 µg/mL. The minimum inhibitory concentration (MIC, µmol/L) was detected by BACTEC 960. The MIC, defined as the lowest concentration of compound inhibiting 90% of the inoculum relative controls, is summarized in Tables 1–3. Isoniazid (INH), ethambutol (EMB) and pyrazinamide (PZA) were included as standard drugs, for comparison.

Hydrazone 7–11 derived from isoniazid, nicotinohydrazide and anilinohydrazide exhibit modest to promising anti-TB activity (Table 1). For example, analogs 7 and 8 were found to be the most potent compounds (MIC 0.75 µM). Subsequently, these ferrocenyl acylhydrazones were evaluated against clinical isolates with various degrees of resistance. However, when compared with isoniazid, compounds 7 and 8 were less potent. Contrary to the results of the literature with hydrazones of isoniazid derived from benzaldehyde or acetophenone, the replacement of a hydrogen (7) by a methyl group (8) does not modify the biological activities [31]. Surprisingly, hydrazone derived from nicotinohydrazide exhibits no activity with MIC superior to 384 µM. It is also to be mentioned that the position of the aromatic group (pyridine or anilinophenyl) with regard to the acylhydrazone is essential for the anti-TB activity. Indeed, compounds 14–16 do not have any biological activity.

In the second series (Table 2), the most active 4-quinolylhydrazone and 1-acridinylhydrazone derived from ferrocene carboxaldehyde were 26 and 31 with MIC of 20.5 and 17 µM respectively. The presence of a substituent on the ferrocene moiety such as amino groups in 27–30 and 32–35 could be responsible for a light or significant decrease of the biological activity. In general, a better activity has been obtained from acridinylhydrazones. Moreover, the influence of substituents on the ferrocenyl moiety seems to be different between the quinolyl and acridinyl derivatives.

The Table 3 summarizes biological activities obtained for ferrocenyl esters 43–45 and amides 54–60. The MICs were determined at pH 6 with Bactec MGIT 960 PZA. When compared to pyrazinamide (MIC 64 µg/mL or 520 µM), compounds 55, 56 and 59

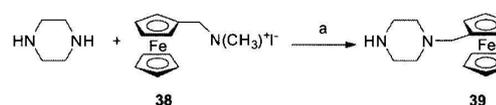
**Table 2**  
Structure, yield and antimycobacterial *in vitro* activity against *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv of ferrocenyl hydrazones 26–35.

Compound	R	Yield (%)	MIC H <sub>37</sub> Rv (µmol/L)
26	H	89	20.5
27	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	61	28.6
28	$\text{N}(\text{CH}_2)_3$	91	67.7
29	$\text{N}(\text{CH}_2)_2$	95	263
30	$\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{O}$	74	131
31	H	90	17
32	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	80	242.2
33	$\text{N}(\text{CH}_2)_3$	94	23.1
34	$\text{N}(\text{CH}_2)_2$	64	56.5
35	$\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{O}$	94	22.5
EMB	—	—	9.8
INH	—	—	>0.43

were a little more active (MIC 120–172 µM). Contrary to the literature results [32,33], structural modifications of the pyrazine nucleus and the presence of ester functionality have failed to increase the biological activity compared to pyrazinamide. Only compound 57 (MIC 86 µM) with a quinoxaline nucleus presented a higher activity compared to PZA.

### 4. Conclusion

In summary, a series of novel ferrocenyl derivatives has been synthesized. We explored the antimycobacterial activity for these

Scheme 5. Synthesis of ferrocenyl amines 37 and 39: (a) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeCN, 60 °C, 12 h.



for  $C_{17}H_{15}FeN_3O$ : C, 61.29; H, 4.54; N, 12.61. Found: C, 61.52; H, 4.65; N, 12.70.

#### 5.2.2. *N'*-(1-Ferrocenylethylidene)isonicotinohydrazide **8**

Orange solid. Yield 92%. M.p. 183 °C.  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.93 (s, 1H), 8.82 (d, 2H,  $J = 5.4$  Hz), 7.86 (d, 2H,  $J = 5.4$  Hz), 4.78 (m, 2H), 4.49 (m, 2H), 4.29 (s, 5H), 2.30 (s, 3H).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162.1, 161.2, 150.0, 141.4, 121.7, 82.3, 70.1, 69.2, 67.4, 16.0. MS ( $m/z$ ): 347.20 ( $M^+$ ). Anal. Calcd for  $C_{18}H_{17}FeN_3O$ : C, 62.27; H, 4.94; N, 12.10. Found: C, 62.54; H, 4.92; N, 12.20.

#### 5.2.3. *N'*-(Ferrocenylmethylene)nicotinohydrazide **9**

Red solid. Yield 83%. M.p. 212 °C.  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.74 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.75 (d, 1H,  $J = 3.5$  Hz), 8.31 (s, 1H), 8.25 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.56 (t, 1H,  $J = 4.7$  Hz), 4.68 (m, 2H), 4.47 (m, 2H), 4.25 (s, 5H).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  161.4, 152.5, 150.3, 148.9, 135.7, 129.9, 124.1, 79.2, 71.0, 69.4, 67.9. MS ( $m/z$ ): 333.17 ( $M^+$ ). Anal. Calcd for  $C_{17}H_{15}FeN_3O$ : C, 61.29; H, 4.54; N, 12.61. Found: C, 61.11; H, 4.32; N, 12.81.

#### 5.2.4. 2-Amino-*N'*-(ferrocenylmethylene)benzohydrazide **10**

Red crystals. Yield 89%. M.p. 159–160 °C.  $^1H$  NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.98 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.44 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.26 (m, 1H), 6.7 (m, 2H), 5.5 (br, s), 4.70 (m, 2H), 4.41 (m, 2H), 4.22 (s, 5H).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  165.3, 150.5, 140.4, 132.1, 128.3, 117.1, 115.6, 113.2, 79.4, 70.0, 69.5, 68.5. HRMS, calcd for  $C_{18}H_{17}FeN_3O$ : 347.0721 [ $M^+$ ]; found 347.0730.

#### 5.2.5. 4-Amino-*N'*-(ferrocenylmethylene)benzohydrazide **11**

Brown solid. Yield 52%. M.p. 163–164 °C.  $^1H$  NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.88 (br, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.64 (d, 2H,  $J = 3.8$  Hz), 7.49 (d, 2H,  $J = 3.9$  Hz), 4.73 (s, 2H), 4.54 (m, 2H), 4.21 (s, 5H), 4.19 (s, 2H).  $^{13}C$  NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  167.7, 162.1, 150.8, 131.0, 128.9, 120.5, 69.7, 69.4, 69.2. HRMS, calcd for  $C_{18}H_{17}FeN_3O$ : 347.0721 [ $M^+$ ]; found 347.0718.

#### 5.3. Ferrocenylcarbohydrazide **13**

To a solution of ferrocene carboxylic acid **12** (346 mg, 1.5 mmol) in dichloromethane (40 mL) were added *tert*-butylcarbazate (204 mg, 1.5 mmol) and EDCI (295 mg, 1.5 mmol). After stirring for 24 h at room temperature, the solution was hydrolyzed by water (20 mL) and extracted with dichloromethane (3  $\times$  15 mL). The organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum. The residue was purified by column chromatography (eluent: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ethyl acetate: 6/4) to give ferrocenyl-*tert*butyloxy)carbohydrazide (273 mg, 84%) as orange solid.  $^1H$  NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.64 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 4.74 (t, 2H,  $J = 2$  Hz), 4.38 (t, 2H,  $J = 1.9$  Hz), 4.29 (s, 5H), 1.52 (s, 9H). To a solution of ferrocenyl-*tert*butyloxy)carbohydrazide (0.173 g, 0.488 mmol) in dichloromethane (2 mL) was added trifluoroacetic acid (1 mL) at 0 °C. After stirring for 1 h at 20 °C, the mixture is neutralized by a saturated Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3  $\times$  15 mL). The organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum. The residue was purified by column chromatography (eluent: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ethyl acetate/TEA:9/1/1) to give ferrocenylcarbohydrazide **13** (78 mg, 66%) as orange solid. M.p. 174 °C.  $^1H$  NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.96 (1H, s); 4.65 (2H, s); 4.35 (2H, s); 4.21 (5H, s); 4.10 (2H, br).  $^{13}C$  NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  167.7, 71.8, 69.8, 69.3. MS ( $m/z$ ): 244.08 ( $M^+$ ).

#### 5.4. *N*-(Pyridin-4-ylmethylene)ferrocenylhydrazide **14**

To ferrocenylcarbohydrazide **13** (119 mg, 0.488 mmol) in ethanol (30 mL) was added pyridine-4-carboxaldehyde (52 mg, 0.488 mmol). After stirring for 4 h in the presence of molecular sieves (3 Å) at room temperature, the solution was evaporated

under reduced pressure to give a brown oil. The product was purified using column chromatography with methanol and ethyl acetate (2/8) as eluent and crystallised with diethyl ether. Compound was obtained as brown crystals (100 mg, 62%). M.p. 220 °C.  $^1H$  NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.22 (s, 1H), 8.72 (d, 2H,  $J = 5.3$  Hz), 7.64 (d, 2H,  $J = 5.9$  Hz), 5.04 (br, 1H), 4.53 (m, 2H), 4.29 (m, 2H), 4.31 (s, 5H).  $^{13}C$  NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  154.8, 152.1, 135.8, 133.8, 123.8, 71.4, 69.9, 69.6. HRMS, calcd for  $C_{17}H_{15}FeN_3O$ : 333.0565 [ $M^+$ ]; found 333.0571.

#### 5.5. *N*-(Pyridin-3-ylmethylene)ferrocenylhydrazide **15**

To ferrocenylcarbohydrazide **13** (145 mg, 0.594 mmol) in ethanol (30 mL) was added pyridine-3-carboxaldehyde (63 mg, 0.589 mmol). After stirring for 4 h in the presence of molecular sieves (3 Å) at room temperature, the solution was evaporated under reduced pressure to give brown oil. The product was purified using column chromatography with methanol and ethyl acetate (2/8) as eluent and crystallised with diethyl ether. Compound was obtained as brown crystals (283 mg, 37%). M.p. 210–212 °C.  $^1H$  NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.31 (br, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.72 (d, 1H,  $J = 4.2$  Hz), 8.24 (m, 1H), 7.40 (t, 1H,  $J = 5.2$  Hz), 4.91 (br, 1H), 4.53 (m, 2H), 4.30 (m, 7H), 4.28 (s, 5H). NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  161.4, 154.5, 152.4, 149.8, 135.5, 128.9, 124.4, 79.4, 71.5, 69.1, 68.1. MS ( $m/z$ ): 333.10 ( $M^+$ ). Anal. Calcd for  $C_{17}H_{15}FeN_3O$ : C, 61.29; H, 4.54; N, 12.61. Found: C, 61.45; H, 4.65; N, 12.71.

#### 5.6. *N*-(2-Aminophenylmethylene)ferrocenylhydrazide **16**

To ferrocenylcarbohydrazide (102 mg, 0.42 mmol) in ethanol (30 mL) was added 2-aminobenzaldehyde (50 mg, 0.42 mmol). After stirring for 4 h in presence of molecular sieves at room temperature, the solution was filtered and evaporated under reduced pressure to give yellow oil (100 mg, 68%).  $^1H$  NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.86 (s, 1H), 7.31 (d,  $J = 5.4$  Hz), 7.11 (s, 1H), 7.09 (m, 1H), 6.91 (m, 1H), 6.71 (d, 1H,  $J = 6.1$  Hz), 4.66 (m, 2H), 4.32 (m, 2H), 4.24 (s, 5H).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.2, 150.6, 146.3, 130.1, 128.0, 126.7, 117.6, 115.0, 79.6, 70.9, 69.0, 68.2. HRMS, calcd for  $C_{18}H_{17}FeN_3O$ : 347.0721 [ $M^+$ ]; found 347.0726.

#### 5.7. General procedure for the synthesis of ferrocenyl hydrazones **26–35**

The hydrazones were prepared by reaction of 7-(chloroquinolein-4-yl)hydrazine (243 mg, 1.22 mmol) or 6-chloro-9-hydrazinyl-2-methoxyacridine (333 mg, 1.22 mmol) with the appropriate ferrocenyl aminoaldehyde [24] (1.22 mmol) in methanol (20 mL) in the presence of molecular sieves 3 Å (4 g). After stirring for 4 h under reflux, the resulting mixture was filtered and concentrated under reduced pressure. Water (10 mL) was added to the residue. The mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3  $\times$  20 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. After purification by column chromatography, the oil was crystallised in petroleum ether and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

#### 5.7.1. 1-(7-Chloroquinolin-4-yl)-2-(ferrocenylmethylene)hydrazine **26**

Red solid. Yield 89%. M.p. 150 °C.  $^1H$  NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.86 (s, 1H), 8.68 (d, 1H,  $J = 4.7$  Hz), 8.03 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz), 8.01 (s, 1H), 7.46 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz), 7.38 (d, 1H,  $J = 4.7$  Hz), 4.70 (d, 2H,  $J = 1.9$  Hz), 4.50 (d, 2H,  $J = 1.8$  Hz), 4.17 (s, 5H).  $^{13}C$  NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  193.4, 150.3, 149.3, 142.6, 136.4, 128.6, 128.5, 125.6, 124.9, 121.4, 79.3, 73.2, 69.6. MS ( $m/z$ ) 390.01 ( $M^+^{35}Cl$ ). Anal. Calcd for  $C_{20}H_{16}ClFeN_3$ : C, 61.65; H, 4.14; N, 10.78. Found: C, 61.87; H, 4.21; N, 10.65.

**5.7.2. 1-(7-Chloroquinolin-4-yl)-2-(2-N,N-dimethylaminomethylferrocenylmethylene)hydrazine 27**

Red solid. Yield 61%. M.p. 158–160 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 10.02 (s, 1H), 8.07 (d, 1H, J = 4.5 Hz), 8.08 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 8.04 (s, 1H), 7.51 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 7.40 (d, 1H, J = 4.5 Hz), 4.70 (m, 2H), 4.50 (m, 2H), 4.14 (s, 5H), 3.75 (d, 1H, J = 6.9 Hz), 3.26 (d, 1H, J = 6.9 Hz), 2.09 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 151.0, 149.4, 142.6, 136.5, 128.7, 128.6, 125.6, 124.9, 121.4, 75.9, 71.9, 70.4, 70.2, 44.8, 30.3, 29.7. MS (m/z) 446.90 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl). Anal. Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>ClFeN<sub>4</sub>: C, 61.83; H, 5.19; N, 12.54. Found: C, 62.01; H, 5.32; N, 12.42.

**5.7.3. 1-(7-Chloroquinolin-4-yl)-2-(2-N-pyrrolidinomethylferrocenylmethylene)hydrazine 28**

Red solid. Yield 95%. M.p. 164–166 °C. <sup>1</sup>H NMR (MeOD-d<sub>4</sub>) δ 10.04 (s, 1H), 8.43 (d, 1H, J = 6.0 Hz), 8.21 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 7.82 (s, 1H), 7.46 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 7.37 (d, 1H, J = 6.0 Hz), 4.98 (s, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.45 (s, 1H), 4.38 (s, 1H), 4.17 (s, 5H), 4.08 (d, 1H, J = 13.1 Hz), 3.62 (d, 1H, J = 13.1 Hz), 2.60 (m, 4H), 1.78 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD-d<sub>4</sub>) δ 148.5, 145.4, 143.7, 138.5, 135.1, 128.7, 127.3, 124.9, 122.9, 115.4, 84.5, 78.6, 72.2, 69.5, 68.7, 66.1, 53.1, 52.2, 22.8. MS (m/z) 472.94 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl). Anal. Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>ClFeN<sub>4</sub>: C, 63.51; H, 5.33; N, 11.85. Found: C, 63.25; H, 5.30; N, 11.90.

**5.7.4. 1-(7-Chloroquinolin-4-yl)-2-(2-N-piperidinomethylferrocenylmethylene)hydrazine 29**

Red solid. Yield 91%. M.p. 172–174 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.97 (s, 1H), 8.88 (d, 1H, J = 4.7 Hz), 8.36 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 8.21 (s, 1H), 8.18 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 7.81 (d, 1H, J = 4.6 Hz), 4.77 (s, 1H), 4.43 (s, 1H), 4.38 (s, 1H), 4.16 (s, 5H), 3.66 (d, 1H, J = 12.8 Hz), 2.75 (d, 1H, J = 12.8 Hz), 2.36 (m, 4H), 1.43 (m, 4H), 1.32 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 152.4, 149.3, 141.8, 135.8, 129.2, 128.6, 128.0, 126.3, 124.7, 122.6, 80.6, 78.8, 74.7, 73.2, 70.0, 69.2, 57.6, 53.9, 25.8, 24.4. MS (m/z) 486.94 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl). Anal. Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>ClFeN<sub>4</sub>: C, 64.15; H, 5.59; N, 11.51. Found: C, 64.31; H, 5.71; N, 11.24.

**5.7.5. 1-(7-Chloroquinolin-4-yl)-2-(2-N-morphilinomethylferrocenylmethylene)hydrazine 30**

Red solid. Yield 74%. M.p. 212–214 °C. <sup>1</sup>H NMR (MeOD-d<sub>4</sub>) δ 10.2 (s, 1H), 8.40 (d, 1H, J = 5.7 Hz), 8.19 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.80 (s, 1H), 7.44 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 7.31 (d, 1H, J = 5.9 Hz), 5.47 (s, 1H), 4.83 (s, 1H), 4.52 (s, 1H), 4.45 (s, 1H), 4.18 (s, 5H), 3.89 (d, 1H, J = 15.7 Hz), 3.64 (m, 4H), 3.49 (d, 1H, J = 14.5 Hz), 3.46 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 152.6, 149.0, 140.6, 134.3, 133.3, 129.8, 126.4, 124.8, 124.7, 122.1, 83.1, 79.6, 73.2, 70.1, 69.4, 66.9, 66.5, 56.5, 53.3. MS (m/z) 488.94 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl). Anal. Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>ClFeN<sub>4</sub>O: C, 61.43; H, 5.16; N, 11.46. Found: C, 61.32; H, 5.12; N, 11.34.

**5.7.6. 1-(6-Chloro-2-methoxyacridin-9-yl)-2-(ferrocenylmethylene)hydrazine 31**

Red solid. Yield 90%. M.p. 117–119 °C. <sup>1</sup>H NMR (CHCl<sub>3</sub>) δ 9.96 (s, 1H), 8.55 (d, 1H, J = 4.2 Hz), 8.19 (s, 1H), 8.07 (d, 1H, J = 9.2 Hz), 7.85 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.48 (dd, 1H, J = 8.5 Hz and 4.6 Hz), 7.11 (d, 1H, J = 2.3 Hz), 4.80 (s, 2H), 4.61 (s, 2H), 4.28 (s, 5H), 3.9 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 93.8, 157.3, 147.3, 146.7, 133.7, 131.9, 130.8, 127.9, 127.4, 127.1, 126.2, 125.1, 103.2, 79.4, 73.2, 69.7, 55.0. MS (m/z) 469.90 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl). Anal. Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>ClFeN<sub>3</sub>O: C, 63.92; H, 4.29; N, 8.95. Found: C, 64.21; H, 4.40; N, 9.25.

**5.7.7. 1-(6-Chloro-2-methoxyacridin-9-yl)-2-(2-N,N-dimethylaminomethylferrocenylmethylene)hydrazine 32**

Red solid. Yield 80%. M.p. 130 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.98 (s, 1H), 9.15 (d, 1H, J = 11.5 Hz), 8.87 (s, 1H), 8.40 (d, 1H, J = 9.5 Hz), 8.10 (d, 1H, J = 11.4 Hz), 7.81 (s, 1H), 7.17 (d, 1H, J = 10.0 Hz), 5.10 (s, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.52 (s, 1H), 4.39 (s, 1H), 4.20 (s, 5H), 3.82 (s, 3H), 3.36 (d, 1H, J = 12.3 Hz), 2.50 (d, 1H, J = 12.1 Hz), 2.14 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR

(DMSO-d<sub>6</sub>) δ 195.8, 153.9, 146.2, 145.9, 143.4, 141.0, 134.6, 132.3, 127.7, 120.3, 119.6, 116.4, 114.6, 106.7, 82.4, 78.2, 74.7, 73.1, 69.8, 68.3, 57.3, 56.5, 44.8. MS (m/z) 526.89 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl). Anal. Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>ClFeN<sub>4</sub>O: C, 63.83; H, 5.17; N, 10.63. Found: C, 63.91; H, 5.22; N, 10.73.

**5.7.8. 1-(6-Chloro-2-methoxyacridin-9-yl)-2-(2-N-pyrrolidinomethylferrocenylmethylene)hydrazine 33**

Red solid. Yield 94%. M.p. 120–122 °C. <sup>1</sup>H NMR (MeOD-d<sub>4</sub>) δ 10.44 (s, 1H), 8.88 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 8.68 (s, 1H), 8.09 (d, 1H, J = 11.0 Hz), 7.59 (s, 1H), 6.98 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 6.78 (d, 1H, J = 11.2 Hz), 4.90 (s, 1H), 4.52 (s, 1H), 4.45 (s, 1H), 4.17 (s, 5H), 3.96 (d, 1H, J = 12.8 Hz), 3.87 (s, 3H), 3.57 (d, 1H, J = 12.9 Hz), 3.12 (m, 4H), 2.16 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD-d<sub>4</sub>) δ 195.8, 153.9, 149.2, 145.9, 143.4, 141.0, 134.6, 132.3, 127.7, 120.3, 119.6, 116.5, 114.7, 106.7, 85.0, 78.9, 75.4, 72.8, 69.8, 67.2, 55.7, 54.0, 46.2, 11.5. MS (m/z) 552.97 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl). Anal. Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>29</sub>ClFeN<sub>4</sub>O: C, 65.17; H, 5.29; N, 10.13. Found: C, 65.01; H, 5.40; N, 10.24.

**5.7.9. 1-(6-Chloro-2-methoxyacridin-9-yl)-2-(2-N-piperidinomethylferrocenylmethylene)hydrazine 34**

Red solid. Yield 64%. M.p. 130–132 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.01 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.87 (d, 1H, J = 11.4 Hz), 7.81 (d, 1H, J = 9.5 Hz), 7.45 (d, 1H, J = 11.4 Hz), 7.06 (s, 1H), 6.92 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 4.91 (s, 1H), 4.57 (s, 1H), 4.52 (s, 1H), 4.21 (s, 5H), 3.92 (s, 3H), 3.56 (d, 1H, J = 13.4 Hz), 3.42 (d, 1H, J = 13.1 Hz), 2.40 (m, 4H), 1.52 (m, 4H), 1.37 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 193.8, 150.9, 145.2, 138.0, 136.3, 130.6, 129.4, 128.2, 127.0, 122.7, 121.8, 120.3, 107.7, 101.0, 80.9, 78.5, 75.5, 74.0, 71.9, 71.1, 57.3, 56.9, 54.7, 26.2, 24.8. MS (m/z) 566.91 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl). Anal. Calcd for C<sub>31</sub>H<sub>31</sub>ClFeN<sub>4</sub>O: C, 65.68; H, 5.51; N, 9.88. Found: C, 65.83; H, 5.44; N, 10.03.

**5.7.10. 1-(6-Chloro-2-methoxyacridin-9-yl)-2-(2-N-morphilinomethylferrocenylmethylene)hydrazine 35**

Red solid. Yield 94%. M.p. 117–119 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.44 (s, 1H), 8.88 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 8.68 (s, 1H), 8.09 (d, 1H, J = 11.0 Hz), 7.45 (s, 1H), 7.03 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 6.78 (d, 1H, J = 11.0 Hz), 4.87 (s, 1H), 4.52 (s, 1H), 4.45 (s, 1H), 4.20 (s, 5H), 3.96 (s, 3H), 3.89 (d, 1H, J = 12.3 Hz), 3.84 (m, 4H), 3.74 (d, 1H, J = 11.1 Hz), 3.50 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 195.8, 155.9, 150.2, 145.0, 143.5, 141.4, 134.5, 132.3, 128.7, 120.3, 119.6, 117.5, 113.7, 109.7, 82.1, 78.4, 74.3, 73.1, 69.8, 68.9, 65.5, 57.5, 55.7, 54.3. MS (m/z) 568.96 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl). Anal. Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>29</sub>ClFeN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: C, 63.34; H, 5.14; N, 9.85. Found: C, 63.12; H, 5.20; N, 9.75.

**5.8. General procedure for synthesis of ferrocenic esters 43–45**

To a solution of the appropriate carboxylic acid (1.6 mmol) in dichloromethane (20 mL) was added 4-dimethylaminopyridine (0.16 mmol) followed by ferrocenyl methanol (1.5 mmol). The mixture was cooled at 0 °C and dicyclohexylcarbodiimide (1.5 mmol) was added. After stirring at 20 °C for 24 h, the DCU precipitate was removed by filtration. The filtrate was washed by an aqueous K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution (2 × 20 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum to give the crude oil. The product was purified using column chromatography (eluent: petroleum ether/diethyl ether: 5/5).

**5.8.1. Ferrocenylmethyl-2-pyrazinecarboxylate 43**

Yellow solid. Yield 79%. M.p. 79 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 9.26 (d, 1H, J = 1.3 Hz), 8.70 (d, 1H, J = 2.2 Hz), 8.67 (dd, 1H, J = 1.3 and 2.2 Hz), 5.26 (s, 2H), 4.37 (m, 2H), 4.19 (s, 5H), 4.18 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 163.7, 147.5, 146.3, 144.4, 143.6, 80.2, 70.1, 69.1, 68.6, 64.7. HRMS, calcd for C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>FeN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 322.0405 [M<sup>+</sup>]; found 322.0421.

### 5.8.2. Ferrocenylmethyl-2-quinoxalinecarboxylate **44**

Yellow solid. Yield 96%. M.p. 97 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 9.49 (s, 1H), 8.26 (dd, 1H, *J* = 8.0 and 1.7 Hz), 8.16 (dd, 1H, *J* = 8.8 and 1.9 Hz), 7.80 (m, 2H), 5.34 (s, 2H), 4.42 (m, 2H), 4.21 (s, 5H), 4.12 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 163.9, 145.0, 143.6, 142.7, 141.6, 132.3, 131.0, 130.6, 129.3, 80.4, 70.2, 69.1, 68.7, 64.9. HRMS, calcd for C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>FeN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 372.0561 [M<sup>+</sup>]; found 372.0545.

### 5.8.3. Ferrocenylmethyl-3-nicotinate **45**

Yellow solid. Yield 70%. M.p. 250 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 9.24 (s, 1H), 8.90 (m, 2H), 8.01 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 5.65 (s, 2H), 4.51 (m, 2H), 4.35 (m, 2H), 4.29 (s, 5H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 166.2, 151.9, 148.2, 134.9, 124.3, 82.3, 70.2, 68.7, 68.9, 68.5. HRMS, calcd for C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>FeN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 321.0452 [M<sup>+</sup>]; found 321.0445.

### 5.9. (N-Ferrocenylmethyl)-2-pyrazinamide **54**

To a solution of 2-pyrazinecarboxylic acid (152 mg, 1.23 mmol) and ferrocenylmethylamine (290 mg, 1.35 mmol) in dichloromethane (20 mL) was added bromo-tris-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (590 mg, 1.26 mmol) at 0 °C. Diisopropylethylamine (0.66 mL, 2.54 mmol) was slowly added to the mixture for 5 min at 0 °C. After stirring for 1 h at 20 °C, the mixture was hydrolyzed by water and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 30 mL). The organic layer was washed with 1 N HCl (20 mL), aqueous saturated K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution (40 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub> before removing the solvent under reduced pressure. The oil was purified by column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 1/1) to give **54** as a yellow solid (138 mg, 35%). M.p. 192 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 9.44 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz), 8.76 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 8.53 (dd, 1H, *J* = 2.4 and 1.4 Hz), 4.35 (s, 2H), 4.26 (m, 2H), 4.25 (s, 5H), 4.18 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 162.3, 147.3, 144.5, 142.6, 142.5, 84.6, 68.6, 68.2, 68.1, 38.5. HRMS, calcd for C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>FeN<sub>3</sub>O: 321.0565 [M<sup>+</sup>]; found: 321.0572.

### 5.10. (N-Ferrocenylmethyl)-2-quinoxalinamide **55**

To a solution of 2-quinoxalinecarboxylic acid (100 mg, 0.57 mmol) and ferrocenylmethylamine (136 mg, 0.63 mmol) in dichloromethane (20 mL) was added bromo-tris-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (268 mg, 0.57 mmol) at 0 °C. Diisopropylethylamine (0.30 mL, 1.72 mmol) was slowly added to the mixture for 5 min at 0 °C. After stirring for 1 h at 20 °C, the mixture was hydrolyzed by water and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 30 mL). The organic layer was washed with HCl 1 N (20 mL), aqueous saturated K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub> before removing the solvent under reduced pressure. The oil was purified by column chromatography (petroleum ether/diethyl ether/triethylamine: 3/1/2) to give **55** as a yellow solid (143 mg, 68%). M.p. 127 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 9.72 (s, 1H), 8.20 (dd, 1H, *J* = 7.8 and 1.7 Hz), 8.12 (dd, 1H, *J* = 8.0 and 1.9 Hz), 7.87 (m, 2H), 4.38 (m, 2H), 4.32 (s, 5H), 4.30 (s, 2H), 4.20 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 162.6, 143.9, 143.5, 143.4, 140.3, 131.6, 130.8, 129.6, 139.5, 85.1, 68.6, 68.3, 68.2, 38.5. HRMS, calcd for C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>FeN<sub>3</sub>O: 371.0721 [M<sup>+</sup>]; found: 371.0742.

### 5.11. (N-Ferrocenylmethyl)-3-pyridinamide **56**

To a solution of 3-pyridinecarboxylic acid (412 mg, 3.28 mmol) and ferrocenylmethylamine (705 mg, 3.28 mmol) in dichloromethane (30 mL) was added 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (643 mg, 3.28 mmol). After stirring overnight at 20 °C, the mixture was hydrolyzed by water and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 30 mL). The organic layer was washed with HCl 1 N (20 mL), aqueous saturated K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 mL) and dried over sodium sulfate before removing the solvent under reduced pressure. The oil was purified by column chromatography (ethyl acetate/diethyl

ether/methanol: 5/5/1) to give **56** as a yellow solid (611 mg, 63%). M.p. 155 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.86 (s, 1H), 8.60 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz), 8.04 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.29 (dd, 1H, *J* = 8.0 and 4.1 Hz), 6.65 (s, 1H), 4.28 (s, 2H), 4.18 (m, 2H), 4.11 (s, 5H), 4.09 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 165.1, 152.2, 147.9, 135.3, 123.7, 84.3, 68.8, 68.7, 68.5, 39.7. Anal. Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>FeN<sub>2</sub>O: C, 63.77; H, 5.04; N, 8.75. Found: C, 63.58; H, 5.05; N, 8.73.

### 5.12. (N-Ferrocenylmethylquinoline)-3-carboxamide **57**

To a solution of 3-quinolinecarboxylic acid (276 mg, 1.6 mmol) and ferrocenylmethylamine (340 mg, 1.6 mmol) in dichloromethane (30 mL) was added 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (306 mg, 1.6 mmol). After stirring overnight at 20 °C, the mixture was hydrolyzed by water and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 30 mL). The organic layer was washed with 1 N HCl (20 mL), aqueous saturated K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 mL) and dried over sodium sulfate before removing the solvent under reduced pressure. The oil was purified by column chromatography (ethyl acetate/diethyl ether/triethylamine: 4/4/2) to give **57** as a yellow solid (349 mg, 59%). M.p. 193 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 9.29 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.59 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz), 8.14 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 7.89 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.80 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.61 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz), 6.56 (br, 1H), 4.43 (m, 2H), 4.21 (m, 2H), 4.20 (s, 5H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 165.0, 155.0, 149.1, 148.0, 135.7, 131.2, 129.3, 128.7, 127.5, 126.9, 71.6, 68.6, 68.4, 39.7. Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>FeN<sub>2</sub>O: C, 68.13; H, 4.90; N, 7.57. Found: C, 67.89; H, 4.94; N, 7.51.

### 5.13. (N-Ferrocenylmethylquinoline)-2-carboxamide **58**

To a solution of 2-quinolinecarboxylic acid (276 mg, 1.6 mmol) and ferrocenylmethylamine (340 mg, 1.6 mmol) in dichloromethane (30 mL) was added 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (306 mg, 1.6 mmol). After stirring overnight at 20 °C, the mixture was hydrolyzed by water and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 30 mL). The organic layer was washed with 1 N HCl (20 mL), aqueous saturated K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 mL) and dried over sodium sulfate before removing the solvent under reduced pressure. The oil was purified by column chromatography (ethyl acetate/diethyl ether/triethylamine: 4/4/2) to give **58** as a yellow solid (183 mg, 31%). M.p. 161 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.56 (br, 1H), 8.26 (m, 2H), 8.05 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.81 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.67 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.54 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 4.27 (m, 2H), 4.26 (s, 5H), 4.11 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 163.8, 149.8, 146.5, 137.5, 130.1, 129.7, 129.3, 127.9, 127.7, 118.9, 68.6, 68.1, 68.1, 38.3. Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>FeN<sub>2</sub>O: C, 68.13; H, 4.90; N, 7.57. Found: C, 67.73; H, 5.02; N, 7.32.

### 5.14. (4-Ferrocenylmethylpiperazin-1-yl)(pyrazin-2-yl)methanone **59**

To a solution of 2-pyrazinecarboxylic acid (49 mg, 0.39 mmol) and ferrocenylmethylpiperazine (102 mg, 0.39 mmol) in dichloromethane (30 mL) was added 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (67 mg, 0.35 mmol). After stirring overnight at 20 °C, the mixture was hydrolyzed by water and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 30 mL). The organic layer was washed with 1 N HCl (20 mL), aqueous saturated K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 mL) and dried over sodium sulfate before removing the solvent under reduced pressure. The oil was purified by column chromatography (diethyl ether/methanol: 8/2) to give **59** as a yellow solid (68 mg, 45%). M.p. 108–110 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.91 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 8.62 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz), 8.52 (dd, 1H, *J* = 2.6 and 1.5 Hz), 4.20 (m, 2H), 4.12 (m, 2H), 4.13 (s, 5H), 3.70 (m, 4H), 3.41 (s, 2H), 2.47 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 161.2, 149.4, 145.6, 145.2, 142.5, 70.2, 68.6, 68.2, 58.2, 52.6, 52.1, 47.0, 42.3. Anal. Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>FeN<sub>4</sub>O: C, 61.55; H, 5.68; N, 14.36. Found: C, 59.92; H, 5.70; N, 14.07.

### 5.15. (4-Ferrocenylmethylpiperazin-1-yl)(quinoxalin-2-yl)methanone **60**

To a solution of 2-quinoxalinecarboxylic acid (61 mg, 0.352 mmol) and ferrocenylmethylpiperazine (100 mg, 0.352 mmol) in dichloromethane (30 mL) was added 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (67 mg, 0.35 mmol). After stirring overnight at 20 °C, the mixture was hydrolyzed by water and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 30 mL). The organic layer was washed with 1 N HCl (20 mL), aqueous saturated K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 mL) and dried over sodium sulfate before removing the solvent under reduced pressure. The oil was purified by column chromatography (ethylacetate/methanol: 8/2) to give **60** as a yellow solid (48 mg, 31%). M.p. 130 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 9.16 (s, 1H), 8.12 (m, 2H), 7.85 (m, 1H), 4.20 (m, 2H), 4.18 (m, 2H), 4.14 (m, 2H), 4.13 (s, 5H), 3.81 (m, 4H), 3.45 (s, 2H), 2.53 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 165.2, 148.1, 145.2, 142.2, 140.2, 131.1, 130.7, 129.7, 129.3, 70.2, 68.5, 68.2, 58.2, 52.7, 52.1, 47.1, 42.4. Anal. Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>FeN<sub>4</sub>O: C, 65.47; H, 5.49; N, 12.72. Found: C, 65.00; H, 5.54; N, 12.34.

### 5.16. Activity against *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv strain

Susceptibility testing with the BACTEC MGIT 960 system (Becton Dickinson) was performed according to the manufacturer's recommendations. For pyrazinamide and ferrocenyl derivatives **43–45** and **54–60**, the pH of the media was 6 using Bactec MGIT 960 PZA (BD). Test compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide or in methanol. 390 µl of diluted test compounds was added to MGIT 7 mL tubes supplemented with 0.8 mL of the provided enrichment solution. Susceptibility testing was performed by minimal inhibitory concentration (MIC) determination. Serial twofold dilution of a 1280 mg/l solution of each drugs were added to MGIT tubes to achieve final concentration ranging from 64 to 0.25 mg/L. All the drug-containing tubes were inoculated with 0.5 mL of the positive broth culture. Mycobacterial suspensions were used undiluted from 2 days following the detection of growth, while the suspensions were diluted 1:5 with sterile saline from days 3 to 5. A SIRE drug-free control was inoculated with 0.5 ml of a 10<sup>-2</sup> dilution of the positive culture broth in sterile saline. The tubes were then placed in a BACTEC 960 set carrier and incubated in the instrument. The tubes were continuously monitored until the results indicating susceptibility or resistance were automatically interpreted and reported using pre-defined algorithms that compared growth in the drug-containing tube to that in the control tube.

### Acknowledgments

The authors are thankful to the institutions that support our laboratory (Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Lille1). This research was supported by the "Conseil Régional Nord-Pas de Calais" (grant for GMM and program PRIM). The authors also gratefully acknowledge Catherine Méliet for her help.

### References

- [1] WHO Report 2009. <http://www.who.int/en>.
- [2] Tuberculosis (TB) WHO Extensively drug-resistant tuberculosis Available from: <http://www.who.int/tb/challenges/xdr/en/index.html> [accessed 22.6.09].
- [3] M. Laurenzi, A. Ginsberg, M. Spigelman, *Infect. Disord. Drug Targets* 7 (2007) 105–119.
- [4] E.C. Rivers, R.L. Mancera, *Drug Discov. Today* 13 (2008) 1090–1098.
- [5] P.J. Barry, T.M. O'Connor, *Curr. Med. Chem.* 14 (2007) 2000–2008.
- [6] J. van den Boogaard, G.S. Kibiki, E.R. Kisanga, M.J. Boeree, R.E. Aarnoutse, *Antimicrob. Agents Chemother* 53 (2009) 849–862.
- [7] G. Jaouen, *Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine*, Wiley-VCH, 2005.
- [8] E. Hillard, A. Vessières, L. Thouin, G. Jaouen, C. Amatore, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 285–290.
- [9] O. Payen, S. Top, A. Vessières, E. Brulé, M.-A. Plamont, M.J. McGlinchey, H. Müller-Bunz, G. Jaouen, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 1791–1799.
- [10] F. Dubar, G. Anquetin, B. Pradines, D. Dive, J. Khalife, C. Biot, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 7954–7957.
- [11] C. Biot, W. Daher, C.M. Ndiaye, P. Melnyk, B. Pradines, N. Chavain, A. Pellet, L. Fraisse, L. Pelinski, C. Jarry, J. Brocard, J. Khalife, I. Forfar-Bares, D. Dive, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 4707–4714.
- [12] M.A.L. Blackie, P. Beagley, S.L. Croft, H. Kendrick, J.R. Moss, K. Chibale, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 6510–6516.
- [13] C. Biot, N. Francois, L. Maciejewski, J. Brocard, D. Poulain, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10 (2000) 839–841.
- [14] A. Baramee, A. Coppin, M. Mortuaire, L. Pelinski, S. Tomavo, J. Brocard, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 1294–1302.
- [15] P.J. Higgins, A.M. Gellett, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 1614–1617.
- [16] C. Ventura, F. Martins, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 612–624.
- [17] B.N. Swamy, T.K. Suma, G.V. Rao, G.C. Reddy, *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 420–424.
- [18] D. Sriram, P. Yogeewari, K. Madhu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 4502–4505.
- [19] S. Gemma, L. Savini, M. Altarelli, P. Tripaldi, L. Chiasserini, S.S. Coccone, V. Kumar, C. Camodeca, G. Campiani, E. Novellino, S. Clarizio, G. Delogu, S. Butini, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 6063–6072.
- [20] J. Mao, Y. Wang, B. Wan, A.P. Kozikowski, S.G. Franzblau, *ChemMedChem* 2 (2007) 1624–1630.
- [21] A.L. Candéa, M.L. Ferreira, K.C. Pais, L.N. Cardoso, C.R. Kaiser, M.G. Henriques, M.C. Lourenço, F.A. Bezerra, M.V. de Souza, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 6272–6274.
- [22] A. Nayyar, V. Monga, A. Malde, E. Coutinho, R. Jain, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 626–640.
- [23] D.A. Ralambomanana, D. Razafimahefa, A.C. Rakotohova, J. Maugein, L. Pelinski, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 9546–9553.
- [24] Z.-F. Chen, H.-L. Zou, H. Liang, R.-X. Yuan, Y. Zhang, *Appl. Organomet. Chem.* 18 (2004) 438–439.
- [25] Z.H. Chohan, M. Praveen, *Met. Based Drugs* 6 (1999) 149–152.
- [26] H.-Y. Zhang, C.-R. Ji, Y.-Y. Niu, Q.-A. Wu, H.-Q. Zhang, *Chem. Res. Chin. Univ.* 15 (1999) 301–305.
- [27] P. Stepnicka, I. Cisarova, D. Niznansky, S. Bakardjieva, *Polyhedron* 29 (2010) 134–141.
- [28] A.R. Bhat, A.I. Bhat, F. Athar, A. Azam, *Helv. Chim. Acta* 92 (2009) 1644–1656.
- [29] S.C.B. Gnoatto, A. Dassonville-Klimpt, S. Da Nascimento, P. Galéra, K. Boumediene, G. Gosmann, P. Sonnet, S. Moslemi, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 1865–1877.
- [30] C.-A. Molyneux, M. Krugiak, H. Ginsburg, K. Chibale, *Biochem. Pharmacol.* 71 (2005) 61–68.
- [31] M.J. Hearn, M.H. Cynamon, M.F. Chen, R. Coppins, J. Davis, H.J.-O. Kang, A. Noble, B. Tu-Sekine, M.S. Terrot, D. Trombino, M. Thai, E.R. Webster, R. Wilson, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 4169–4178.
- [32] M.H. Cynamon, R. Gimi, F. Gyenes, C.A. Sharpe, K.E. Bergmann, H.J. Han, L.B. Gregor, R. Rapolu, G. Luciano, J.T. Welch, *J. Med. Chem.* 38 (1995) 3902–3907.
- [33] L.E. Seitz, W.J. Suling, R.C. Reynolds, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 5604–5606.



**CHAPITRE IV :**  
**SYNTHESE ET ACTIVITE ANTIPLASMODIALE**  
**IN-VITRO DES 4-AMINOQUINOLEINES**  
**FERROCENIQUES**



# CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro

## Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques

---

### I. INTRODUCTION

Les 4-aminoquinoléines sont reconnues et utilisées, depuis longtemps, dans le monde entier pour le traitement et la prévention du paludisme. En effet, en 1941, des produits dérivés de la quinine ont été introduits dans le traitement du paludisme. Ils ont la capacité de s'accumuler dans l'hématie parasitée et d'inhiber la croissance du parasite.

La chloroquine est la 4-aminoquinoléine de synthèse la plus étudiée et la connaissance de son mécanisme d'action semble être le plus avancée. Ainsi, elle s'accumule dans la vacuole digestive du parasite où elle va exercer son activité antipaludique en inhibant la conversion de l'hème toxique issu de la dégradation de l'hémoglobine en hémozoïne, un cristal inerte, qui conduit à des dommages membranaires et à la mort du parasite.<sup>1, 2, 3, 4</sup>

En raison de son faible coût et son efficacité remarquable, la chloroquine a été trop largement utilisée. Il en a résulté l'émergence et la propagation de souches résistantes dans le monde entier.

Ainsi, depuis la découverte de ces résistances, plusieurs équipes de recherches se sont penchées sur le sujet, en vue de trouver de nouveaux antipaludiques et donc lutter contre ces résistances. Non seulement en Afrique, notamment au Bénin,<sup>5</sup> au Rwanda,<sup>6</sup> et au Gabon,<sup>7</sup> mais aussi dans le reste du monde, au Cambodge,<sup>8</sup> des chercheurs se mobilisent sur l'étude des activités antiplasmodiales des plantes. D'autres équipes s'intéressent aux antipaludiques de synthèse. En effet, suite à la connaissance du cycle de vie du parasite, des molécules ciblant directement un ou plusieurs stades de son développement, sont synthétisées. Ainsi, très récemment, ont été découverts des inhibiteurs d'acides nucléiques,<sup>9, 10</sup> des gamétocytocides<sup>11</sup> et des schizonticides.<sup>12</sup> Aussi, des molécules duales<sup>13, 14</sup> (combinaison de deux molécules biologiquement actives) et des dérivés organométalliques<sup>15</sup> furent synthétisés et étudiés en traitement antipaludique. Deux exemples de molécules hybrides sont illustrés dans la Figure 63.<sup>16, 17</sup>

---

<sup>1</sup> Ridley, R. G. et al. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1997**, *5*, 559 – 566.

<sup>2</sup> Dorn, A et al. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 727 – 736.

<sup>3</sup> Dorn, A. et al. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 737 – 747.

<sup>4</sup> Dorn, A. et al. *Nature.* **1995**, *374*, 269 – 271.

<sup>5</sup> Adjobimey, T. et al. *C. R. Chimie* **2004**, *7*, 1023 – 1027.

<sup>6</sup> Muganga, R. et al. *Journal of Ethnopharmacology* **2010**, *128*, 52 – 57.

<sup>7</sup> Lekana-Douki, J. B. et al. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *133*, 1103 – 1108

<sup>8</sup> Hout, S. et al. *Journal of Ethnopharmacology* **2006**, *107*, 12 – 18.

<sup>9</sup> Crowther, G.J. et al. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2011**, *175*, 21 – 29.

<sup>10</sup> Hunt, S. Y. et al. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2005**, *144*, 198 – 205.

<sup>11</sup> Vale, N. et al. *Euro. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2506 – 2516.

<sup>12</sup> Casagrande, M. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6813 – 6823.

<sup>13</sup> Romeo, S. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2931 – 2934.

<sup>14</sup> Chavain, N. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 8048 – 8059.

<sup>15</sup> Wu, X. et al. *Eur. J. of Pharm. Sc.* **2006**, *27*, 175 – 187.

<sup>16</sup> Bellot, et al. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4103 – 4109.

<sup>17</sup> Wenzel, N. I. et al. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3214 – 3226.

## CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques

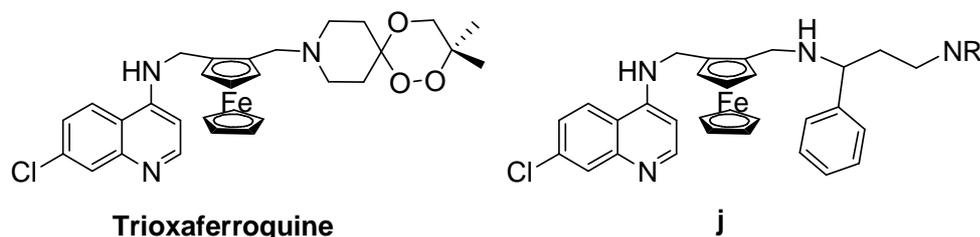


Figure 63 : Structures chimiques de deux drogues duales.

Nous nous sommes intéressés à la famille des 4-aminoquinoléines. L'objectif était, tout en gardant le motif quinoléique, de modifier la longueur de la chaîne alkyle linéaire par l'introduction d'un hétérocycle azoté saturé, et introduire un ferrocène en bout de chaîne.

### II. LES COMPLEXES METAL-CQ DANS LE TRAITEMENT DU PALUDISME

La synergie entre un métal et un médicament a été exploitée pour obtenir des agents métalliques antipaludiques efficaces.<sup>18, 19, 20</sup> Le succès remarquable est venu de la modification de la CQ par des fragments contenant du métal, une stratégie intensément poursuivie par Sanchez-Delgado et al. Plusieurs complexes métalliques ont été ainsi synthétisés avec des activités antipaludiques encourageantes.<sup>20, 21, 22</sup> le complexe  $[\text{Au}(\text{PPh}_3)(\text{CQ})]\text{PF}_6$ , (**k**, Figure 64) cause l'inhibition marquée de *Plasmodium berghei* et est très efficace contre des souches de *Plasmodium falciparum* CQ-résistantes FcB1 et FcB2 (Tableau 22).<sup>20, 21</sup> Aussi, sa pré-incubation dans des globules rouges non infectés, entraîne une protection contre des infections ultérieures.<sup>20</sup>

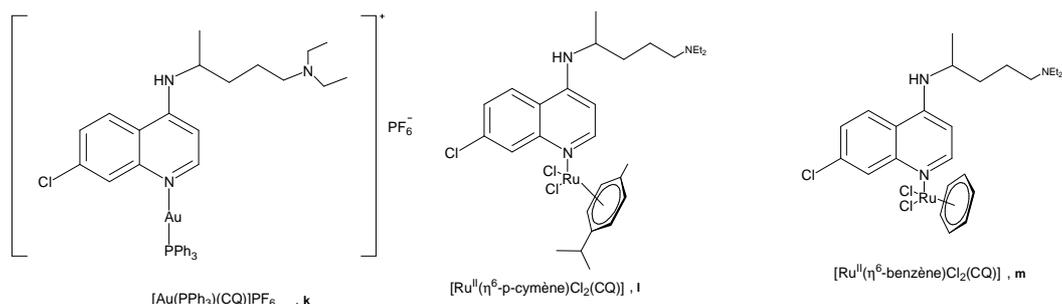


Figure 64 : Structures chimiques de  $[\text{Au}(\text{PPh}_3)(\text{CQ})]\text{PF}_6$  (**k**), de  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cymène})\text{Cl}_2(\text{CQ})]$  (**l**) et de  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-benzène})\text{Cl}_2(\text{CQ})]$  (**m**).

<sup>18</sup> Sanchez-Delgado, R. A.; Anzellotti, A. *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 23 – 30.

<sup>19</sup> Sharma, V. *Mini Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 337 – 351.

<sup>20</sup> Navarro, M. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 1619 – 1626.

<sup>21</sup> Navarro, M.; Pekerar, S.; Pérez, H. A. *Polyhedron.* **2007**, *26*, 2420 – 2424.

<sup>22</sup> Rajapakse, C. S. K. et al. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 1122 – 1131.

## CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques

**Tableau 22 :** Activité antiplasmodiale de  $[\text{Au}(\text{PPh}_3)(\text{CQ})]\text{PF}_6$ , (**k**) sur FcB1 et FcB2. (CI<sub>50</sub> en  $\mu\text{M}$ ).

Molécules	FcB1	FcB2
<b>k</b>	0.04	0.02
CQ	0.05	0.11

Récemment, une série de complexes organo-Ru(II)-CQ a été synthétisée et examinée sur plusieurs souches de *P. falciparum* (Figure 64). Ces complexes ont montré une bonne activité sur des parasites CQ-résistants par rapport à la chloroquine (Tableau 23).<sup>22</sup>

**Tableau 23 :** Résultat du test d'activité de **l**, **m** et CQ sur trois souches chloroquino-résistantes (CI<sub>50</sub> en  $\mu\text{M}$ ).

Molécules	Dd2	K1	W2
CQ	1.2	1.8	2.1
<b>l</b>	0.48	0.6	1.7
<b>m</b>	0.44	0.51	1.6

La complexation par un métal des médicaments antipaludiques existants, représente une option importante dans l'amélioration de l'efficacité des antipaludiques qui mérite d'être explorée. En effet, le potentiel antipaludique des complexes Métal-CQ contre les souches résistantes de *P. falciparum* a été démontré dans un certain nombre de cas.<sup>23, 24</sup> La résultante de cette complexation est la modification de la structure chimique de la CQ, qui a pour conséquence l'empêchement radical de l'expulsion de la CQ hors de la vacuole digestive par les transporteurs PfCRT. Ainsi, l'amélioration d'activité de dérivés Métal-CQ observée, peut être due, dans un premier temps, à l'importante accumulation dans la vacuole digestive des parasites résistants.

Une autre stratégie à base de métal intéressante pour le traitement du paludisme a été révélée en 1997, quand la ferroquine (FQ) a été synthétisée pour la première fois. Elle résulte de l'incorporation du ferrocène (Fc) dans la chaîne alkyle de la CQ (Schéma 22) qui lui confère lipophilie, rigidité et un comportement redox, trois propriétés renforçant potentiellement son action antipaludique. Comme la CQ, la FQ inhiberait la formation de l'hémozoïne.<sup>25</sup>

La FQ est extrêmement active contre des souches chloroquino-sensibles et chloroquino-résistantes de *P. falciparum*. La FQ est un des projets antipaludiques les plus avancés de Sanofi-Aventis. Comme recommandé par l'OMS, elle est actuellement testée en phase clinique II-b en combinaison avec l'artésunate sur des patients souffrant du paludisme.<sup>26, 27</sup>

<sup>23</sup> Martýnez, A. et al. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 703 – 712.

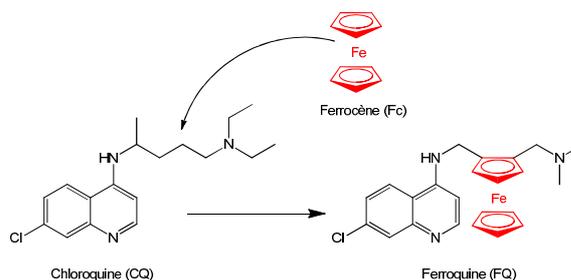
<sup>24</sup> Martýnez, A. et al. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 863 – 871.

<sup>25</sup> brocard, J. et al. US6127543 brevet.

<sup>26</sup> Fraisse, L.; Ter-Namissian, D. *International Patent PCT/FR2006/000842*, **2006**.

<sup>27</sup> <http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00563914>. Consulté le 17 mai **2011**.

# CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques



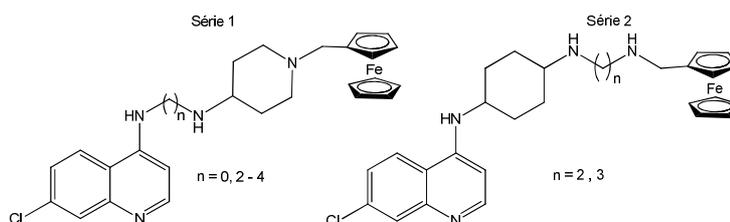
**Schéma 22** : Incorporation du Fc dans la CQ pour donner la FQ.

Cela dit, une émergence future de souches résistantes à la FQ n'est pas à négliger. Il est donc primordial de continuer à développer de nouveaux analogues quinoléiques ferrocéniques contre d'éventuelles souches résistantes à la FQ. C'est dans cette optique, que nous nous sommes orientés sur la synthèse de nouvelles 4-aminoquinoléines ferrocéniques.

## III. SYNTHÈSE DES 4-AMINOQUINOLEINES FERROCENIQUES

### III.1. Objectif de travail

Tout en conservant le noyau quinoléique, les nouvelles 4-aminoquinoléines ferrocéniques diffèrent de la FQ par la position du ferrocène. En effet, dans la FQ, le Fc est compris entre les deux atomes d'azote de la chaîne alkyle. Nous avons opté pour un positionnement du Fc plutôt en bout de chaîne. Ainsi, tout en faisant varier la longueur de la chaîne, le Fc est espacé du noyau quinoléique par une chaîne alkyle liée à un hétérocyclique saturé ou carbocycle possédant deux fonctions amines. Nous avons ainsi synthétisé deux séries de molécules (Figure 65).



**Figure 65** : Formules chimiques des deux séries des 4-aminoquinoléines ferrocéniques.

La synthèse de ces dérivés ferrocéniques se fait en trois grandes étapes.

Pour la série 1: il y aura d'abord la synthèse des diamines quinoléiques qui sera suivie par celle des précurseurs ferrocéniques et enfin la dernière étape consistera à la condensation des diamines quinoléiques et des précurseurs ferrocéniques.

Pour la série 2: elle commencera par la synthèse des bras espaceurs, puis celle des amines quinoléines et enfin la synthèse des 4-aminoquinoléines ferrocéniques.

#### III.1.1. Synthèse des nouveaux 4-aminoquinoléines ferrocéniques (série 1)

# CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro

## Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques

### a. Synthèse des diamines quinoléines

Par une réaction de substitution nucléophile à partir de la 4,7-dichloroquinoléine **42**, les diamines commerciales substituent le chlore en position 4 à 135°C pendant 4 h en absence de solvant (Schéma 23). Les produits **63-66** sont purifiés par cristallisation et obtenus avec des rendements compris entre 80-100% (Tableau 24).

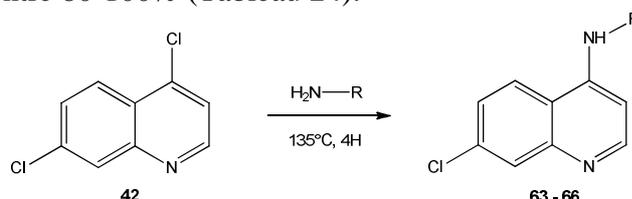


Schéma 23 : Synthèse des diamino-4-quinoléines **63 – 66**.

Tableau 24 : Résultats de la synthèse des diamino-4-quinoléines **63 – 66**.

Composés	R	Rdt (%)
<b>63</b>		100
<b>64</b>		80
<b>65</b>		87
<b>66</b>		87

### b. Synthèse du précurseur ferrocénique 67

Le précurseur ferrocénique **67** résulte de la réaction de substitution du chlorure de pipéridone sur l'iodure de 1-(ferrocénylméthyl)-*N,N,N*-triméthylammonium **12** en présence de carbonate de potassium dans l'acétonitrile à reflux durant toute une nuit (Schéma 24). Le composé **67** est obtenu avec un rendement de 99%.

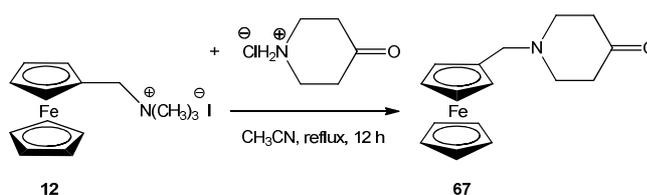
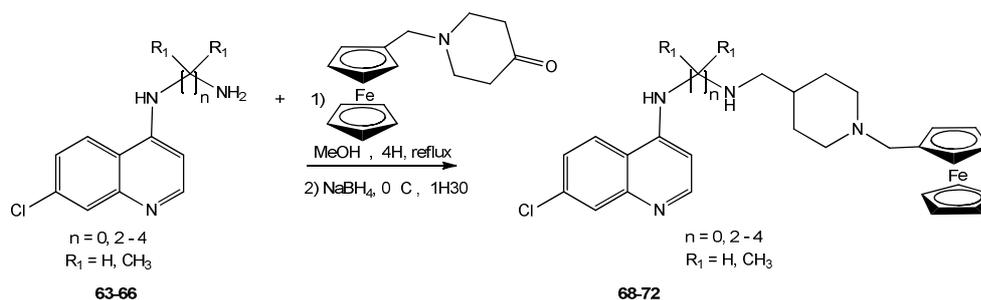


Schéma 24 : Synthèse du précurseur ferrocénique **67**.

### c. Synthèse des diamines quinoléines ferrocéniques

Cette étape de synthèse consiste en une amination réductrice entre la cétone ferrocénique **67** (Schéma 25) et les diamines quinoléiques. En effet, en présence de méthanol, les diamines quinoléiques vont se condenser à l'aldéhyde ou à la cétone à reflux pour former une imine au bout de 4 h. Cette imine est immédiatement réduite en amine par le NaBH<sub>4</sub> à 0°C. Les dérivés quinoléiques ferrocéniques sont purifiés par colonne chromatographique sur gel de silice et par recristallisation et sont obtenus avec des rendements compris entre 74 et 98 % (Tableau 25).

## CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques



**Schéma 25** : Synthèse des diamines quinoléines ferrocéniques **68 – 72**.

**Tableau 25** : Résultats de la synthèse des amino-4-quinoléiques ferrocéniques **68 – 72**.

Amines	Noms	Produits	Rdt (%)
	<b>68</b>		98
	<b>69</b>		95
	<b>70</b>		80
	<b>71</b>		74
	<b>72</b>		85

### III.1.2. Synthèse des 4-aminoquinoléines ferrocéniques de la série 2

La synthèse de ces molécules possédant plusieurs fonctions amines, commence par une réaction de protection des amines mono-bromées, puis de la substitution du brome par les diamines quinoléiques. La dernière étape consiste en une amination réductrice.

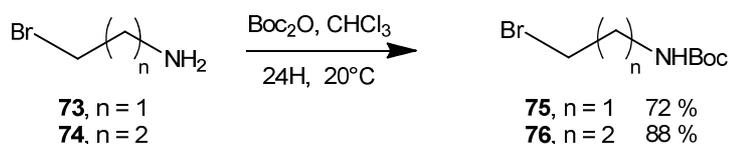
#### a. Synthèse des bras espaceurs

Afin d'essayer de comprendre au mieux la relation structure-activité des 4-aminoquinoléines ferrocéniques, nous avons décidé de changer la position de la chaîne alkyle linéaire. Nous nous sommes limités à une chaîne de 2 et 3 atomes de carbone.

Les fonctions amines de la 2-bromoéthylamine **73** et de la 3-bromopropylamine **74** sont au préalable protégées par un groupement Boc. Cette réaction de protection a lieu en présence de  $Boc_2O$  dans le chloroforme pendant une nuit. Les dérivés **75** et **76** sont obtenus après purification par recristallisation avec des rendements respectifs de 72 et 88% (Schéma 26).

# CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro

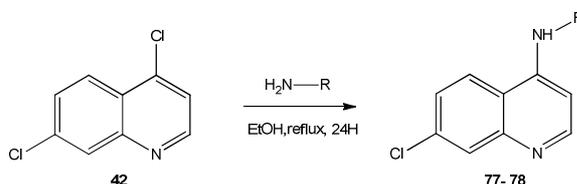
## Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques



**Schéma 26** : Protection des amines primaires **73** et **74**.

### b. Synthèse des amines quinoléiques

Dans le cas des 1,2 et 1,4-diaminecyclohexane, la substitution nucléophile du chlore en position 4 de la 4,7-dichloroquinoléine est réalisée dans l'éthanol à reflux pendant 24 h. Les produits **77** et **78** sont obtenus avec des rendements respectifs de 87 et 92 % (Schéma 27, Tableau 26).

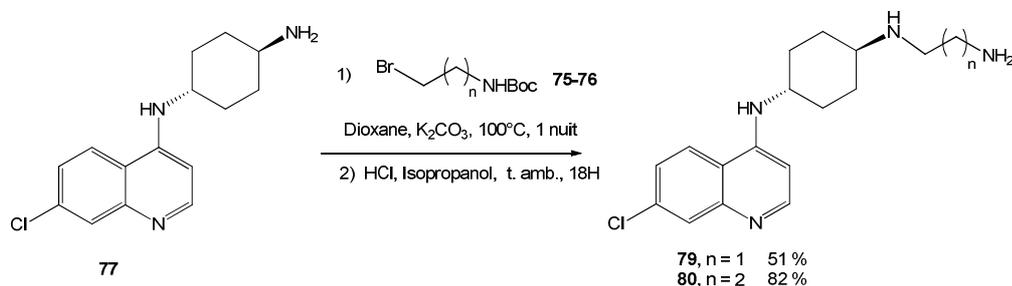


**Schéma 27** : Synthèse des diamines quinoléiques ferrocéniques **77** – **78**.

**Tableau 26** : Résultats de la synthèse des diamino-4-quinoléines **77** – **78**.

Composé	R	Rdt (%)
<b>77</b>		87
<b>78</b>		92

La synthèse des triamines quinoléiques **79** et **80** s'effectue en deux étapes. La première consiste à faire réagir la 1,4-diaminecyclohexane quinoléine **77** avec les dérivés bromés **75** et **76** par une réaction de substitution nucléophile dans du dioxane anhydre à 100°C. Les amines quinoléiques ainsi obtenues sont ensuite déprotégées à l'aide de l'acide chlorhydrique en solution dans l'isopropanol. Les triamines **79** et **80** sont obtenues avec des rendements globaux respectifs de 51 et 82 % (Schéma 28).



**Schéma 28** : Synthèse des amines quinoléiques **79** et **80**.

# CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro

## Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques

### c. Synthèse des amines quinoléines ferrocéniques de la série 2

Cette étape de synthèse consiste en une amination réductrice entre les deux amines quinoléiques **79** et **80** et le ferrocène carbaldéhyde dans l'éthanol à 90°C. L'intermédiaire imine ferrocénique formée est tout de suite réduite en amine secondaire. Les 4-aminoquinoléines ferrocéniques **81** et **82** sont obtenues avec des rendements de 95 % après purification par chromatographie colonne puis recristallisation (Schéma 29).

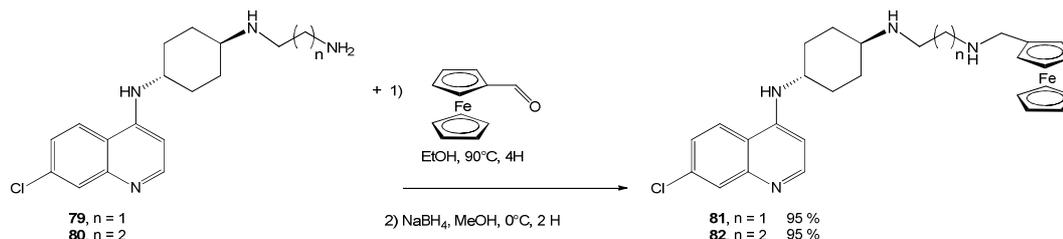


Schéma 29 : Synthèse des 4-aminoquinoléines ferrocéniques **81** et **82**.

De même, les diamines quinoléiques **77** et **78** subissent une amination réductrice en présence de ferrocène carbaldéhyde. Cette réaction permet d'accéder à des composés possédant le groupement ferrocényle directement sur les cyclohexanediamines. Les composés ferrocéniques **83** et **84** sont obtenus avec des rendements de 98 % (Schéma 30).

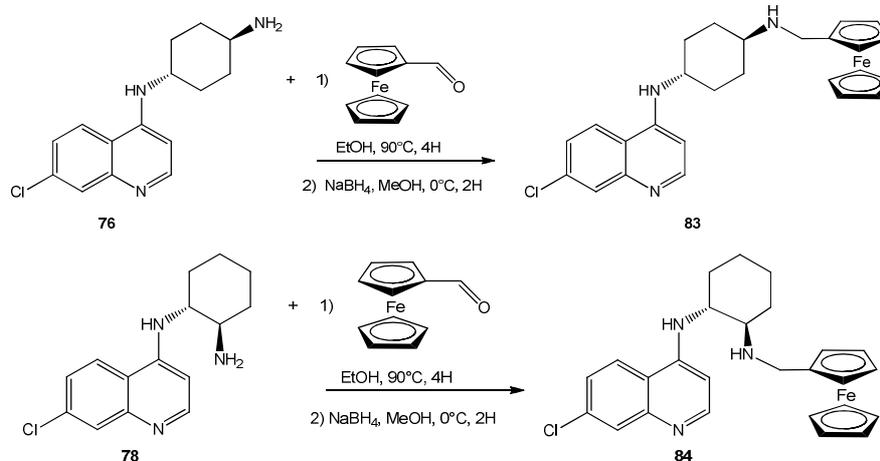
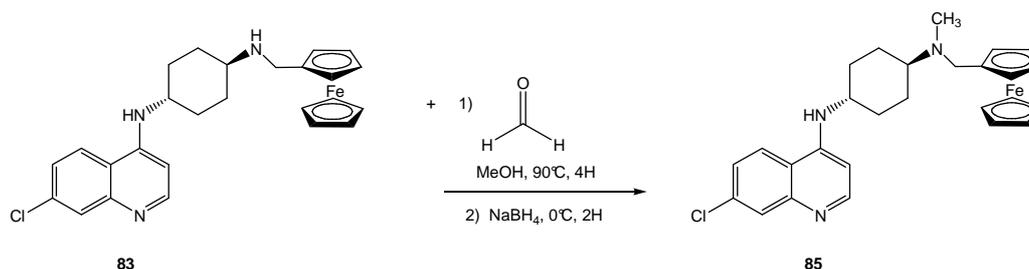


Schéma 30 : Synthèses des diamines quinoléiques ferrocéniques **83** – **84**.

Nous avons ensuite décidé de transformer la fonction amine secondaire portant l'entité ferrocénique en amine tertiaire en réalisant une réaction de méthylation à partir du composé **83**. Cette synthèse permettra d'évaluer l'importance de la présence de cette amine secondaire pour l'activité biologique.

Après l'obtention de l'imine formée suite à la condensation du composé **76** et du formaldéhyde, une réaction de réduction à l'aide du NaBH<sub>4</sub> dans le méthanol permet d'accéder au composé **85**. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice suivie d'une recristallisation, le composé méthylé **85** est obtenu avec un rendement de 60 % (Schéma 31).

## CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique *In Vitro* Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques



**Schéma 31** : Réaction de méthylation de l'amine ferrocénique 76.

### IV. ACTIVITE ANTIPALUDIQUE ET CYTOTOXICITE IN-VITRO DES 4-AMINOQUINOLÉINES FERROCÉNIQUES

L'activité antipaludique *in vitro* des 4-aminoquinoléines ferrocéniques **68-72** et **81-85** synthétisées a été étudiée sur des isolats cliniques gabonais de *P. falciparum* ainsi que sur des clones de laboratoire. Par ailleurs, leur cytotoxicité a été évaluée sur les cellules épithéliales de rein de singe Véro.

#### IV.1. Activité antipaludique *in vitro*

##### IV.1.1. Activité antipaludique des AQFcs 68-72 et 81-85 sur des souches de *P. falciparum*

C'est également au sein du Muséum d'Histoire Naturelle, dans l'équipe du Pr Philippe Grellier que nous avons testé les AQFcs sur une souche CQ-sensible (F32) et sur deux souches CQ-résistantes (FcB1 et K1). Le test a été réalisé 1 fois sur F32, deux fois sur K1 et trois fois sur FcB1. Le Tableau 27 ci-dessous regroupe les valeurs des  $\text{CI}_{50}$  et  $\text{CI}_{90}$ .

## CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique *In Vitro* Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques

**Tableau 27** : Activités biologiques *in vitro* des AQFc 68-72 et 81-85 sur F32, FcB1 et K1 (CI<sub>50</sub> et CI<sub>90</sub> en μM). CI<sub>50</sub> FcB1 (Moyennes±écart-type)

Molécules	Formule	F32 (μM)		FcB1 (μM)		K1 (μM)	
		CI <sub>50</sub>	CI <sub>90</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>90</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>90</sub>
<b>68</b>		3	4.8	2±0.1	4.4±0.1	2.4	4.2
<b>69</b>		0.03	0.04	0.03±0.35	0.05±0.3	0.03	0.04
<b>70</b>		0.03	0.05	0.03±0.8	0.05±0.3	0.02	0.04
<b>71</b>		0.03	0.05	0.03±0.35	0.04±0.7	0.03	0.05
<b>72</b>		0.32	0.48	0.22±2.4	0.41±5.5	0.21	0.39
<b>81</b>		0.03	0.05	0.03±0.7	0.05±1.4	0.03	0.05
<b>82</b>		0.29	0.45	0.17±5.3	0.40±4.4	0.26	0.44
<b>83</b>		0.03	0.05	0.03±0.4	0.05±0.8	0.03	0.05
<b>84</b>		0.03	0.05	0.03±0.15	0.06±2.9	0.03	0.05
<b>85</b>		0.03	0.06	0.03±2.4	0.05±0.9	0.03	0.04
<b>CQ</b>		0.02	0.03	0.11±1.1	0.21±0.9	0.16	0.23
<b>FQ</b>		0.03	0.05	0.02±0.9	0.04±0.7	0.03	0.05
<b>Art</b>		0.03	0.05	0.02±0.8	0.03±0.5	0.03	0.04

En vert : les molécules possédant une très bonne activité antipaludique

En bleu : les molécules moyennement actives

En noir : les molécules inactives

Fond gris : les molécules de référence (CQ, FQ et Art)

## CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro

### Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques

---

#### a. Analyse des résultats

L'analyse des résultats du Tableau 27 montrent que les composés ferrocéniques quinoléiques présentent des concentrations inhibitrices  $CI_{50}$  compris entre 0,03 et 3  $\mu\text{M}$  pour la souche CQ-sensible F32, entre 0,03 et 2  $\mu\text{M}$  pour FcB1 et entre 0,02 et 2,4  $\mu\text{M}$  pour K1, les deux souches CQ-résistantes.

Sur les dix molécules testées, le composé **68** montre une activité antipaludique réduite avec une  $CI_{50}$  de l'ordre du micromolaire (2-3  $\mu\text{M}$ ). Les composés **72** et **82** sont moins efficaces que la CQ. Elles ont des  $CI_{50}$  comprises entre 200 et 300 nM. En revanche, les 7 AQFc restantes ont donné d'excellentes activités antipaludiques que ce soit sur la souche CQ-sensible F32 que sur les souches CQ-résistantes FcB1 et K1. En effet, elles sont plus efficaces que la CQ. Elles affichent une  $CI_{50}$  similaire comprise entre 30 et 40 nM. Aussi, faut-il noter qu'elles sont 10 fois plus actives que la CQ sur les deux souches CQ-résistantes FcB1 et K1. Ces AQFc ont une activité similaire à celle de la FQ. Ces AQFc sont aussi actives que l'artémisinine sur les trois souches (Moyenne des  $CI_{50} \approx 30$  nM). Dans tous les cas, leurs activités restent du même ordre de grandeur pour la souche CQ-sensible, et supérieures à celles de la chloroquine pour les souches CQ-résistantes. Il convient également de signaler que les  $CI_{90}$  sont comprises entre 30 et 50 nM quel que soit le type de souches. Ces faibles valeurs représentent un facteur important pour la conception d'un nouveau médicament. Car une molécule qui, utilisée à faible concentration, inhibe 90% des parasites, est en effet intéressante pour l'industrie du médicament (utilisation à faibles doses pour une grande efficacité/activité et donc une bonne tolérance pour l'organisme).

#### b. Comparaison avec d'autres 4-aminoquinoléines de synthèse

Dans la série **68-72**, les molécules diffèrent structurellement, les une des autres par le nombre de carbones compris entre les deux atomes d'azote de la chaîne latérale ( $n = 0, 2, 3$  et  $4$ ). Dans la structure du composé **68**, qui présente la plus faible activité antipaludique, la fonction liée au cycle quinoléique est une hydrazine et entraîne l'absence de chaîne carbonée entre les deux azotes. En revanche, dans les structures chimiques des AQFc **69-71**, les deux azotes secondaires sont espacés par une chaîne alkyle courte (éthyle, propyle ou isopropyle) ce qui leur confère cette bonne activité. En effet, la séparation inter-azote (la distance moléculaire entre *N*-quinoléine et *N*-alkylamino) affecte le niveau de l'activité des 4-aminoquinoléines<sup>28</sup> et peut être importante dans leur capacité à se lier à l'hème.<sup>29</sup> Les composés **n**, **o** et **p** ( $CI_{50} < 50$  nM) (Figure 66), synthétisés par De et al.<sup>30, 31</sup> confirment ces hypothèses.<sup>32</sup>

On peut également émettre l'hypothèse, que le fait de rallonger la chaîne, par l'ajout d'un carbone en plus dans la liaison inter-azote, suffirait pour entraîner une perte d'activité. Car, on note une baisse d'activité du composé **72**, qui possède 4 atomes de carbone entre la séparation inter-azote, contrairement à ces homologues AQFc **69-71**. Ce phénomène de baisse d'activité a été également observé par Chibale et al. En effet, après avoir synthétisé des

<sup>28</sup> Koh, H. L.; Go, M. L.; Ngiam, T. L.; Mak, J. W. *Eur. J. Med. Chem.* **1994**, *29*, 107 – 113.

<sup>29</sup> O'Neill, P. M. et al. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 437 – 448.

<sup>30</sup> De, D.; Krogstad, F. M.; Cogswell, F. B.; Krogstad, D. J. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1996**, *55*, 579 – 583.

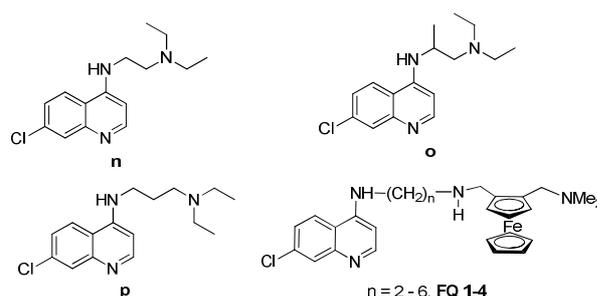
<sup>31</sup> De, D.; Krogstad, F. M.; Byers, L. D.; Krogstad, D. J. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4918 – 4926.

<sup>32</sup> Ridley, D. G. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 1846 – 1854.

## CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques

analogues de la FQ dont la chaîne alkyle latérale variait de 2 à 6 carbones, ils obtinrent des conclusions similaires aux nôtres sur la souche K1 (Tableau 28).<sup>33</sup>

Cependant, cette hypothèse n'est pas entièrement vraie, car l'AQFc **72** aurait sensiblement des activités du même ordre de grandeur que la CQ (car toutes les deux possèdent 4C entre la séparation inter-azote). De ce fait, la faible activité de l'AQFc **72** pourrait également être due à la gêne stérique apportée par le groupement ferrocénylméthylpipéridine lié à l'azote en bout de chaîne. Pour mieux élucider ces hypothèses, il serait intéressant d'effectuer une étude conformationnelle.



**Figure 66** : Structures chimiques de **n**, **o**, **p**, et d'analogues de FQ actifs sur *P. falciparum*.

**Tableau 28** : Activité antipaludique *in vitro* des dérivés de FQ sur K1.

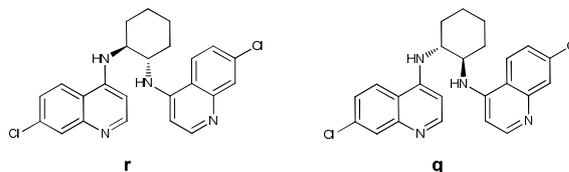
Molécules	n	CI <sub>50</sub> , K1 (nM)
CQ		125
FQ1	2	73
FQ2	3	36
FQ3	4	111
FQ4	6	81

Dans la série **81-85**, la séparation inter-azote est faite à l'aide d'un cyclohexane disubstitué en 1,4 ou 1,2. Ces molécules possèdent des structures comparables aux bisquinoléines **q** et **r** (Figure 67)<sup>34</sup> où la seconde quinoléine serait remplacée par le ferrocène. Ces deux bis-quinoléines étaient très actives sur des souches chloroquino-résistantes de *P. falciparum*. L'énantiomère (*S,S*) le plus actif était susceptible de devenir un potentiel médicament antipaludique, mais suite à son effet toxique, son étude a été interrompue.<sup>34</sup> Les deux composés **81** et **83** ont une activité similaire avec des CI<sub>50</sub> de l'ordre de 30 nM quel que soit le type de souches. L'ajout de deux atomes de C dans la chaîne linéaire, entre la partie *N*-cyclohexylquinoléine et *N*-méthylferrocène dans le composé **81** n'affecte aucunement l'activité antipaludique de ce dernier. En revanche, l'ajout d'un troisième carbone dans le composé **82** entraîne une diminution importante de l'activité d'un facteur 10 (de 30 à 300 nM, Tableau 27). Enfin, la méthylation de l'azote porté par le ferrocène dans **85** n'affecte pas non plus l'activité antipaludique de cette dernière. En effet, les CI<sub>50</sub> restent de l'ordre de 26 à 33 nM pour les trois souches. La comparaison des résultats obtenus pour les composés **83** et **84** montre que les activités biologiques sont pratiquement identiques.

<sup>33</sup> Chibale, K. et al. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 6231 – 6235.

<sup>34</sup> Ridley, R. G. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 677.

## CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques



**Figure 67** : Structures chimiques des bisquinoléines.

### IV.1.2. Activité antipaludique des AQFc 68-72 et 81-85 sur des isolats cliniques gabonais

Toujours au sein du CIMRF au Gabon, nous avons réalisé les tests de sensibilité des AQFc **68-72** et **81-85** sur des isolats cliniques infectés par *P. falciparum*. Nous avons utilisé la méthode ELISA pour effectuer le test sur 3 isolats cliniques dont 2 étaient chloroquinorésistants et un seul chloroquinosensible. Les tests ont été réalisés en duplicate sur chacun des isolats. La chloroquine a été prise comme molécule de référence.

**Tableau 29** : Activité biologique *in vitro* des AQFc 68-72 et 81-85 sur des isolats cliniques infectés par *P. falciparum* (CI<sub>50</sub> en µM).

Molécules	Isolat 22777	Isolat 23130	Isolat 22829	
Noms	Formules	CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>
<b>68</b>		0.3	0.8	0.5
<b>69</b>		0.011	0.008	0.008
<b>70</b>		0.004	0.023	0.008
<b>71</b>		0.005	0.007	0.002
<b>72</b>		0.003	0.061	0.013
<b>81</b>		0.050	0.461	0.623
<b>82</b>		0.025	0.423	0.852
<b>83</b>		0.005	0.017	0.030
<b>84</b>		0.070	0.153	0.170
<b>85</b>		0.050	0.961	1.4
<b>CQ</b>		0.053	0.100	0.307

## CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro

### Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques

En vert: les molécules les plus actives, en bleu: les molécules moyennement actives, en noir: les molécules inactives, en gris: la CQ, molécule de référence.

#### a. Analyse et interprétation des résultats

Dans la série des AQFcs **68-72**, l'hydrazine quinoléine ferrocénique **68** demeure la moins active avec des  $300 \leq CI_{50} \leq 800$  nM obtenus sur les trois isolats (Tableau 29). Cependant, son activité est supérieure sur les isolats que sur les souches de références FcB1, F32 et K1. Sa meilleure activité de 300 nM a été obtenue sur l'isolat 22777 (Tableau 29) et de 2  $\mu$ M sur FcB1. Les AQFcs **69-72** présentent d'excellentes activités sur les trois isolats avec des  $CI_{50} \leq 61$  nM. Les composés **69** et **71** se démarquent des autres par leurs effets antipaludiques homogènes (respectivement 0.008 et 0.005 nM, Tableau 29). Contrairement aux résultats des tests obtenus sur les souches de laboratoire (Tableau 27) où AQFc **72** était moyennement actif, sur les isolats cliniques, il est très actif avec des  $CI_{50}$  de 3 à 61 nM pour les isolats contre 215 à 319 nM pour les souches de référence.

Les AQFcs **81-85** ont des  $CI_{50}$  compris entre 2 nM à 1,4  $\mu$ M. D'après le Tableau 29, l'AQFc **84** présente une activité similaire à celle de la CQ sur les trois isolats. En effet, sa  $CI_{50}$  varie proportionnellement avec la sensibilité de l'isolat à la CQ. Ainsi, plus la résistance à la CQ de l'isolat augmente, plus son efficacité diminue (Tableau 29). Les composés **81** et **85**, qui étaient très actifs sur les souches de référence (8<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> ligne du Tableau 27), le sont moins sur les isolats cliniques. En effet, sur un isolat CQ-sensible, les valeurs de  $CI_{50}$  sont comparables à celles de la chloroquine (50 nM). Par contre, sur les isolats CQ-résistants, elles sont beaucoup plus élevées (0,461 à 1,4  $\mu$ M). Seules les molécules **82** et **83** gardent le même effet inhibiteur sur *P. falciparum* tant sur les isolats cliniques que sur les souches de laboratoire. Dans cette série, le composé **83** possède les meilleures  $CI_{50}$  de 5 nM à 30 nM sur les trois types d'isolats.

Tout comme dans les chapitres précédents, on note une différence d'activités antipaludiques des AQFcs sur les isolats et les souches de laboratoire de *P. falciparum*, différence essentiellement dues à la différence des méthodes de tests de sensibilités utilisées.

## IV.2. Activité Cytotoxique

Suite aux résultats intéressants obtenus précédemment, la suite logique dans la synthèse des molécules à visée thérapeutique était de déterminer leurs effets toxiques. C'est ainsi qu'au CIRMF, toujours avec le Dr Lekana, la cytotoxicité des quinoléines ferrocéniques a été étudiée sur des cellules épithéliales de rein de singe Véro.

Très succinctement, le protocole expérimental est le suivant. Dans un premier temps, les cellules ont été cultivées dans des microplaques de 96 puits à raison de 5000 cellules par puits. Au bout de 24 h d'incubation, les cellules ont été lavées avec du milieu de culture DMEM/F12. Ensuite, les molécules, préalablement dissoutes dans du DMSO étaient introduites dans du milieu de culture à différentes concentrations, au contact des cellules. Le milieu était incubé pendant 5 jours à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>.<sup>35</sup> À l'issue de ces jours d'incubation, la détermination de la cytotoxicité ( $CI_{50}$ ) était réalisée à l'aide du test

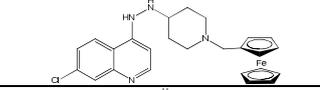
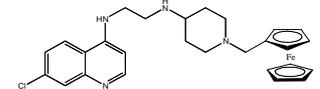
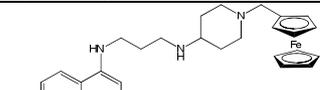
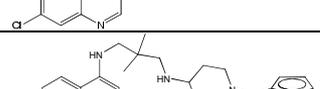
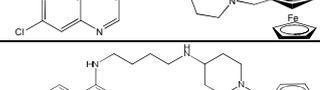
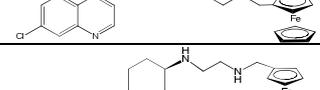
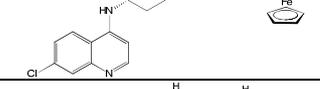
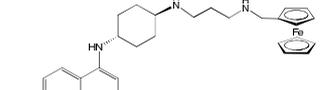
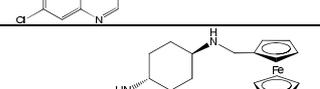
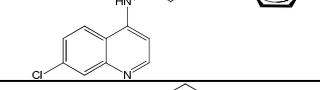
<sup>35</sup> Zirih, G. N. et al. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 98, 281 – 285.

## CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro

### Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques

colorimétrique MTT et les absorbances étaient lues à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm avec une référence à 690 nm.<sup>36</sup>

**Tableau 30** : Résultat des tests de cytotoxicité des AQFc 68-72 et 81-85.

Molécules		Vero (μM)	K1 (μM)	IS
Noms	Formules	CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub> Véro / CI <sub>50</sub> K1
<b>68</b>		0.050	2.4	0.02
<b>69</b>		0.017	0.027	0.63
<b>70</b>		0.689	0.025	27.6
<b>71</b>		0.551	0.030	18.4
<b>72</b>		5.52	0.215	25.7
<b>81</b>		0.067	0.032	2.2
<b>82</b>		8.9	0.261	34.1
<b>83</b>		0.052	0.032	1.6
<b>84</b>		0.059	0.030	0.2
<b>85</b>		8.57	0.026	267.8

En vert : les molécules ne présentent aucun danger pour l'organisme.

En bleu : les molécules moyennement toxiques

En rouge : les molécules très dangereuses pour la cellule en culture

IS = Index de sélectivité (rapport CI<sub>50</sub> Véro/CI<sub>50</sub> K1)

<sup>36</sup> Mosmann, T. *J. of Immunological Methods*. **1983**, 65, 55 – 63.

## CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro

### Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques

---

D'après ce tableau ci-dessus, on constate que les molécules **68-69**, **81**, **83** et **84** sont très toxiques pour la cellule car, avec une concentration  $\leq 60$  nM, les cellules de la souris étaient retrouvées mortes. Les molécules **70** et **71** avec des doses létales comprises entre 500 et 700 nM peuvent être tolérées par la cellule. En effet, des IS de 18 et 37 sont acceptables.

Par contre, *in vitro*, les composés **82** et **85** ne présentent aucun danger pour la cellule. En effet, pour qu'ils soient létaux, il faudrait les utiliser à de très fortes concentrations ( $CI_{50} \geq 5\mu M$ ). Ces composés détiennent les meilleurs IS (respectivement 342 et 267).

Le dérivé **72** n'a pas d'effet cytotoxique, mais son activité antipaludique est moyenne, d'où son IS moyen de 25.

Les effets cytotoxiques des AQFc **68** et **84** ne sont pas étonnants. Car, dans la structure de l'AQFc **68**, se trouve une fonction hydrazine. Et, dans la littérature, les hydrazines sont reconnues comme étant toxique.<sup>37</sup> L'AQFc **84** est structurellement identique à la bis-quinoléine **q** (Figure 66) décrite plus haut comme étant toxique,<sup>34</sup> avec pour motif en commun le squelette 1,2-diaminocyclohexylquinoléique.

## V. CONCLUSION

L'étude des nouveaux 4-aminoquinoléines ferrocéniques **68-72** et **81-85** est très intéressante. En effet, certaines molécules telles que **69-71** et **83** ont conduit à des activités antipaludiques élevées ( $\approx 10$  nM) à la fois sur les isolats cliniques que sur les souches de *P. falciparum*. Les AQFc **81** et **85**, se sont avérées très actives sur toutes les souches de *P. falciparum* (33 nM), tandis que sur les isolats cliniques, elles sont moyennement actives pour **81** (500 nM) et inactive pour **85** (1  $\mu M$ ). L'effet inverse a été rencontré chez AQFc **72** (200 nM contre 13 nM). L'AQFc **84**, reste toujours active, mais voit son efficacité baisser lorsqu'on passe du modèle de référence au modèle clinique (33 nM contre  $\approx 160$  nM). C'est le cas de l'AQFc **82** où son activité diminue de moitié ( $\approx 200$  nM contre  $\approx 400$  nM). Le composé **68** reste inactif sur les deux modèles.

Les tests de sensibilité antipaludique nous ont permis de confirmer également l'hypothèse selon laquelle, la longueur de la chaîne influençait significativement l'activité inhibitrice des 4-aminoquinoléines. Ainsi, il est non seulement important que la distance inter-azote soit présente, mais aussi et surtout que cette distance se fasse par 2-3 atomes de carbones, pour la première série (**68-72**) et uniquement 2C pour la seconde série (**81-84**). La présence d'un méthyle sur l'azote porté par le ferrocène ne perturbe pas l'activité antipaludique.

L'étude cytotoxique de ces molécules sur les cellules Véro, a montré l'effet toxique des AQFc **68** et **84**. Les composés **69**, **81** et **83** se sont malheureusement avérés toxiques. Donc, les effets inhibiteurs de ces molécules seraient certainement dus à leurs toxicités (les IS le confirment).

Les AQFc **70-72**, **82** et **85** utilisées à des doses inférieures à 500 nM ne présentent aucun danger pour la cellule car elles ne sont pas cytotoxiques. Pour ces molécules, notamment les AQFc **70**, **71** et **72**, qui présentent à la fois de très bonnes activités inhibitrices de *P. falciparum* et aucun effet cytotoxique, il est fortement conseillé de poursuivre leurs études en faisant des analyses plus poussées (logD, modélisation moléculaire, interaction avec la  $\beta$ -hématine, test sur un modèle animal, etc....).

---

<sup>37</sup> Lauwerys, R. et al. *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*. Masson, 2007, pp 679 – 681.

# CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro

## Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ridley, R. G.; Dorn, A.; Vippagunta, S. R.; Vennerstrom, J. L.: Haematin (haem) polymerization and its inhibition by quinoline antimalarials. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1997**, *5*, 559 – 566.
2. 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 Quinoline Antimalarials. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 727 – 736.
3. Dorn, A.; Vippagunta, S. R.; Matile, H.; Jaquet, C.; 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.
4. Dorn, A.; Stoffel, R.; Matile, H.; Bubendorf, A.; Ridley, R. G.: Malarial haemozoin/beta-haematin supports haem polymerization in the absence of protein. *Nature.* **1995**, *374*, 269 – 271.
5. Adjobimey, T.; Edayé, I.; Lagnika, L.; Gbenou, J.; Moudachirou, M.; Sanni, A.: Activités antiplasmodiales in vitro de quelques plantes antipaludiques de la pharmacopée béninoise. *C. R. Chimie* **2004**, *7*, 1023 – 1027.
6. Muganga, R.; Angenot, L.; Tits, M.; Frédéricich, M.: Antiplasmodial and cytotoxic activities of Rwandan medicinal plants used in the treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology* **2010**, *128*, 52 – 57.
7. Lekana-Douki, J. B.; Bongui, J. B.; Oyegue-Liabagui, S. L.; Zang-Edou, S. E.; Zatra, R.; Bisvigou, U.; Druilhe, P.; Lebibi, J.; Toure-Ndouo, F. S.; Kombila, M.: *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of nine plants traditionally used in Gabon. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *133*, 1103 – 1108.
8. Hout, S.; Chea, A.; Bun, S.-S.; Elias, R.; Gasquet, M.; Timon-David, P.; Balansard, G.; Azas, N.: Screening of selected indigenous plants of Cambodia for antiplasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **2006**, *107*, 12 – 18.
9. Crowther, G. J.; Napuli, A. J.; Gilligan, J. H.; Gagaring, K.; Borboa, R.; Francek, C.; Chen, Z.; Dagostino, E. F.; Stockmyer, J. B.; Wang, Y.; Rodenbough, P. P.; Castaneda, L. J.; Leibly, D. J.; Bhandari, J.; Gelb, M. H.; Brinker, A.; Engels, I. H.; Taylor, J.; Chatterjee, A. K.; Fantauzzi, P.; Glynn, R. J.; Van Voorhis, W. C.; Kuhnen, K. L. Identification of inhibitors for putative malaria drug targets among novel antimalarial compounds. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2011**, *175*, 21 – 29.
10. Hunt, S. Y.; Detering, C.; Varani, G.; Jacobus, D. P.; Schiehsler, G. A.; Shieh, H.-M.; Nevchas, I.; Terpinski, J.; Sibley, C. H.: Identification of the optimal third generation antifolate against *P. falciparum* and *P. vivax*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2005**, *144*, 198 – 205.
11. Vale, N.; Nogueira, F.; do Rosário, V. E.; Gomes, P.; Moreira, R.: Primaquine dipeptide derivatives bearing an imidazolidin-4-one moiety at the N-terminus as potential antimalarial prodrugs. *Euro. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2506 – 2516.
12. Casagrande, M.; Basilico, N.; Parapini, S.; Romeo, S.; Taramelli, D.; Sparatore, A.: Novel amodiaquine congeners as potent antimalarial agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6813 – 6823.
13. Romeo, S.; Dell'Agli, M.; Parapini, S.; Rizzi, L.; Galli, G.; Mondani, M.; Sparatore, A.; Taramelli, D.; Bosisio, E.: Plasmeprin II inhibition and antiplasmodial activity of Primaquine-Statine 'double-drugs'. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2931 – 2934.
14. Chavain, N.; Davioud-Charvet, E.; Trivelli, X.; Mbeki, L.; Rottmann, M.; Brun, R.; Biot, C.: Antimalarial activities of ferroquine conjugates with either glutathione reductase inhibitors or glutathione depletors via a hydrolyzable amide linker. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 8048 – 8059.
15. Wu, X.; Tiekink, E. R.T.; Kostetski, 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. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006**, *27*, 175 – 187.
16. Bellot, F.; Coslédan, F.; Vendier, L.; Brocard, J.; Meunier, B.; Robert, A.: Trioxaferroquines as New Hybrid Antimalarial Drugs. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4103 – 4109.
17. Wenzel, N. I.; Chavain, N.; Wang, Y.; Friebolin, W.; Maes, L.; Pradines, B.; Lanzer, M.; Yardley, V.; Brun, R.; Herold-Mende, C.; Biot, C.; Toth, Davioud-Charvet, E.: Antimalarial versus Cytotoxic Properties of Dual Drugs Derived From 4-Aminoquinolines and Mannich Bases: Interaction with DNA. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3214 – 3226.
18. Sanchez-Delgado, R. A.; Anzellotti, A.: Metal Complexes as Chemotherapeutic Agents Against Tropical Diseases: Trypanosomiasis, Malaria and Leishmaniasis. *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 23 – 30.
19. Sharma, V.: Therapeutic drugs for targeting chloroquine resistance in malaria. *Mini Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 337 – 351.

## CHAPITRE IV : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro

### Des 4-Aminoquinoléines Ferrocéniques

20. Navarro, M.: Gold complexes as potential anti-parasitic agents. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253, 1619 – 1626.
21. Navarro, M.; Pekarar, S.; Pérez, H. A.: Synthesis, characterization and antimalarial activity of new iridium-chloroquine complexes. *Polyhedron.* **2007**, 26, 2420 – 2424.
22. Rajapakse, C. S. K.; Martinez, A.; Naoulou, B.; Jarzecki, A. A. ; Suarez, L.; Deregnacourt, C.; Sinou, V.; Schrével, J.; Musi, E.; Ambrosini, G.; Schwartz, G. K.; Sanchez-Delgado, R. A.: Synthesis, Characterization, and *in vitro* Antimalarial and Antitumor Activity of New Ruthenium(II) Complexes of Chloroquine. *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 1122 – 1131.
23. Martýnez, A.; Rajapakse, C. S. K.; Naoulou, B.; Kopkalli, Y.; Davenport, L.; Sanchez-Delgado. R. A.: The mechanism of antimalarial action of the ruthenium(II)–chloroquine complex [RuCl<sub>2</sub>(CQ)]<sub>2</sub>. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, 13, 703 – 712.
24. Martýnez, A.; Rajapakse, C. S. K.; Jalloh, D.; Dautriche, C.; Sanchez-Delgado. R. A.: The antimalarial activity of Ru–chloroquine complexes against resistant *Plasmodium falciparum* is related to lipophilicity, basicity, and heme aggregation inhibition ability near water/*n*-octanol interfaces. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, 14, 863 – 871.
25. Brocard, J.; Lebibi, J.; Maciejewski, L.: Antimalarial Organometallic Iron Complex. *United State Patent N° 6, 127, 543.* **2000**, 1 – 11.
26. Fraisse, L.; Ter-Namissian, D.: Association between Ferroquine and an Artemisinin Derivative for Treating Malaria. *International Patent PCT/FR2006/000842*, **2006**.
27. <http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00563914>. Consulté le 17 mai 2011.
28. Koh, H. L.; Go, M. L.; Ngiam, T. L.; Mak, J. W.: Conformational and structural features determining *in vitro* antimalarial activity of some indolo[3,2-*c*] quinolines, anilinoquinolines and tetrahydroindolo[3,2-*d*] benzazepines. *Eur. J. Med. Chem.* **1994**, 29, 107 – 113.
29. O'Neill, P. M.; Willock, D. J.; Hawley, S. R.; Bray, P. G.; Storr, R. C.; Ward, S. A.; Park, B. K.: Synthesis, Antimalarial Activity, and Molecular Modeling of Tebuquine Analogues. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 437 – 448.
30. 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.
31. 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.
32. Ridley, D. 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.; Thaithong, 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.
33. 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 Letters* **2000**, 41, 6231 – 6235.
34. Ridley, R.G.; Matile, H.; Jaquet, C.; Dom, A.; Hofheinz, W.; Luepin, W.; Masciadri, R.; Theil, F.P.; Richter, W.F.; Girometta, M.-A.; Guenzi, A.; Urwyler, H.; Gocke, E.; Potthast, J.-M.; Csato, M.; Thomas, A.; Peters, W.: Antimalarial activity of the bisquinoline trans-N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>-bis(7-chloroquinolin-4-yl)cyclohexane-1,2-diamine: Comparison of two stereoisomers and detailed evaluation of the S,S enantiomer, Ro 47-7737. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 677.
35. Zirihi, G. N.; Mambu, L.; Guédé-Guina, F.; Bodo, B.; Grellier, P.: In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of malaria. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 98, 281 – 285.
36. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methode.* **1983**, 65, 55 – 63.
37. Lauwers, R.; Haufroid, V.; Hoet, P.; Lison, D.: *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles : Hydrazines et dérivés de l'hydrazine*. Chapitre V, Masson, **2007**, pp 679 – 681.

**CHAPITRE V : SYNTHÈSE ET ACTIVITÉ  
ANTIPLASMODIALE IN-VITRO DES  
BENZODIAZEPINES FERROCENIQUES**

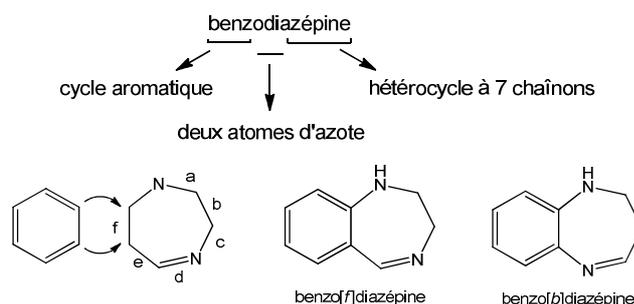


# CHAPITRE V : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des Benzodiazépines Ferrocéniques

## I. INTRODUCTION

### I.1. Les benzodiazépines

Les benzodiazépines (BZDs) comportent deux parties importantes : un cycle benzénique et un hétérocycle à 7 atomes sur lequel se trouvent deux atomes d'azote en position 1,4 (diazépine). D'après le site de liaison du cycle benzénique sur la diazépine on différencie une benzo *f* de la benzo *b* (Figure 68). Dans notre cas, nous nous intéresserons uniquement aux benzo[*f*]diazépines.



**Figure 68** : Structures des benzo[*f*] et benzo[*b*]diazépines.

C'est en 1960,<sup>1</sup> que ces 1,4-benzodiazépines furent découvertes par hasard lors d'une recherche qui consistait à rendre moins nocif des sédatifs tels que les barbituriques. Ainsi, en voulant synthétiser un analogue de ce dernier, les benzodiazépines chlordiazépam et diazépam (Figure 69) ont été obtenus par erreur. A de moindres doses, des tests ont démontré que les benzodiazépines ont des effets sédatifs identiques aux barbituriques. Par la suite, en approfondissant les recherches, le diazépam a montré une meilleure activité sur l'anxiété. De nos jours, cet antidépresseur est l'un des plus connus dans la famille des anxiolytiques,<sup>2</sup> des anticonvulsivants et des myorelaxants.<sup>3</sup> Ainsi les BZDs restent connus pour leurs propriétés anxiolytiques et sédatives.<sup>4</sup> Par ailleurs, ces dernières ont montré d'autres propriétés intéressantes telles que l'inhibition de la prolifération de certaines cellules cancéreuses<sup>5</sup>(Bz423,<sup>6</sup> Figure 69) et le traitement pour la maladie d'Alzheimer (s, Figure 69).<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Fryer, R. I. *Bicyclic Diazepines, The chemistry of Heterocyclic Coumpounds*, Wiley : New York, **1991** ; Chapter 7.

<sup>2</sup> Zavala, F. *Pharmacol. Ther.* **1997**, *75*, 199 – 216.

<sup>3</sup> Basile, A. S.; Lippa, A. S.; Skolnick, P. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *500*, 441 – 451.

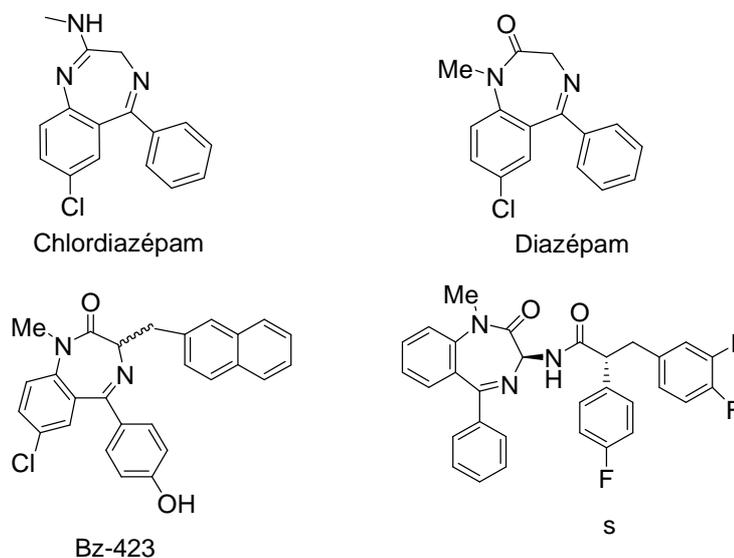
<sup>4</sup> Marshall, B. E.; Longnecker, D. E. General Anesthetics. In *The Pharmacological Basis of Therapeutiques*, 8th ed. ; Gillman, A. G., Rall, T. W., Nies, A. S., Taylor, P., Eds. ; Pergamon : New York, **1990** ; p 303. (b) Rall, T. W. *Ibid*, p 346.

<sup>5</sup> Nordenberg, J. et al. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 1229 – 1236.

<sup>6</sup> Boitano, A. et al. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6870 – 6876.

<sup>7</sup> Churcher, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 179 – 183.

## CHAPITRE V : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des Benzodiazépines Ferrocéniques



**Figure 69** : Structures chimiques de benzodiazépines.

L'autre avantage dont disposent les BZDs est leurs structures dites privilégiées.<sup>8</sup> Ce terme a été inventé par Evans et al.<sup>9</sup> en 1988 pour désigner des molécules ayant, par le biais de leurs structures uniques, une grande affinité avec de nombreux récepteurs.<sup>9,10</sup> Ainsi, ces dernières peuvent de part leurs structures et leurs propriétés physicochimiques, se fixer à de multiples récepteurs comme le GABA (un neurotransmetteur jouant un rôle dans l'hyperactivité neuronale). Les benzodiazépines, plus particulièrement le diazépam, sont utilisés comme anticonvulsivant initial dans la gestion des crises chez les enfants atteints de paludisme causé par *P. falciparum*.<sup>11, 12, 13</sup> En outre, Winstanley et coll.,<sup>14</sup> lors des études menées sur des souris infectées par *P. berghei*, découvrent que les récepteurs des benzodiazépines présents dans le cerveau de ces souris étaient altérés. Ils déduisent ainsi que le paludisme peut-être associé à la baisse d'activité des benzodiazépines.<sup>14</sup>

Les méthodes de synthèse des benzodiazépines décrites dans la littérature sont multiples. Le Schéma 32 illustre un aperçu de quelques unes d'entre elles.

<sup>8</sup> Horton, D. A. ; Bourne, G. T ; Smythe, M. L. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 893 – 930.

<sup>9</sup> Evans, B. E. et al. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2235 – 2246.

<sup>10</sup> Nicolaou, K. C. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9939 – 9953.

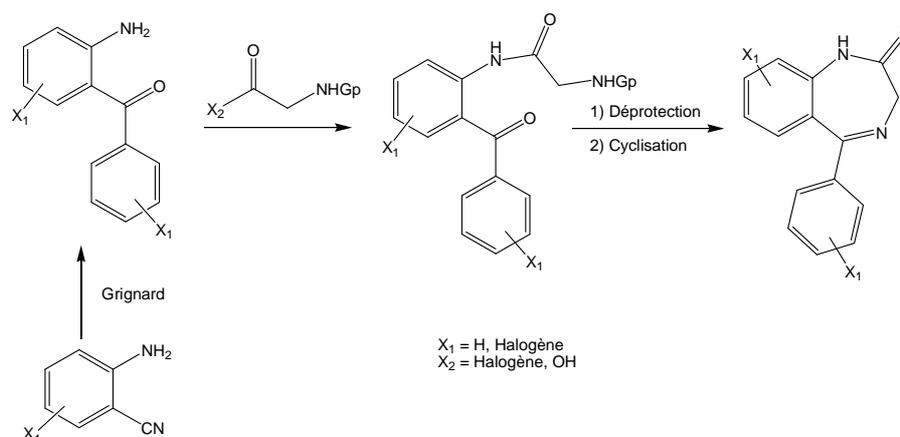
<sup>11</sup> Ogutu, B. R.; Newton, C. R. *Tropical Doctor* **2004**, *34*, 71 – 75.

<sup>12</sup> Ikumi, M. L. et al. *Epilepsy Res.* **2008**, *82*, 215 – 218.

<sup>13</sup> Mpimbaza, A. et al. *Malaria Journal* 2009, **8**:145.

<sup>14</sup> Kokwaro, G. et al. *Arch. Med. Res.* **1997**, *28*, 425 – 427.

## CHAPITRE V : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des Benzodiazépines Ferrocéniques



**Schéma 32** : Méthodes générales de synthèse des benzodiazépines.

Les BZDs sont souvent obtenues à partir de l'aminobenzophénone commerciale, sur laquelle un acide aminé *N*-protégé réagit en présence d'un agent de couplage (DCC,<sup>15</sup> EEDQ,<sup>16</sup> DIEA<sup>17</sup>) ou après formation intermédiaire de l'halogénure d'acide correspondant (SOCl<sub>2</sub>,<sup>18</sup> PCl<sub>5</sub><sup>19</sup>). La séquence déprotection/cyclisation se réalise ensuite en milieu acide (AcOH ou TFA).

Dans les travaux de Bolli et al.,<sup>20</sup> une autre alternative de synthèse est proposée. En effet, les aminobenzophénones sont générées par réaction entre le 2-aminobenzonitrile et un réactif de Grignard avant d'être couplé à un bromure d'acide de bromoacétique. Dans une dernière étape, la cyclisation se produit *in situ* après génération de l'amine par substitution nucléophile de l'ammoniac sur le brome.

Les BZDs peuvent être également obtenues *via* des réactions multicomposants (MCRs). Ce sont des réactions « one-pot » dans lesquelles au moins trois réactifs interviennent simultanément. Les avantages des MCRs sont :

- Un gain de temps, de coût et d'énergie,
- Un mode opératoire simplifié,
- Une économie d'atome,
- Une conception aisée d'intermédiaires clés dans de nombreux schémas réactionnels.

Les MCRs sont notamment très utilisées dans l'élaboration de chimiothèques, en catalyse et également en chimie thérapeutique. Pour illustrer cette stratégie de synthèse, le Schéma 33 décrit la synthèse d'une BZD via une réaction de Ugi.<sup>21</sup> Dans ce cas, interviennent l'acide 2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]benzoïque, un aldéhyde, un isonitrile et une amine. Ensuite, l'étape de cyclisation consiste en une séquence déprotection/cyclisation et est réalisée en présence d'un acide et sous microonde.

<sup>15</sup> Hart, B. R.; Rush, D. J.; Shea, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 460 – 465.

<sup>16</sup> Spencer, J. et al. *Organometallics*, **2005**, *24*, 5665 – 5672.

<sup>17</sup> Doulat, J. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2527 – 2530.

<sup>18</sup> Hirai, K. et al. *J. Med. Chem.*, **1981**, *24*, 20 – 27.

<sup>19</sup> Walser, A.; Szente, A.; Hellerbach, J. *J. Org. Chem.*, **1973**, *38*, 449 – 456.

<sup>20</sup> Bolli, M. H. et al. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2776 – 2795.

<sup>21</sup> Zhou, H.; Zang, W.; Bing, Y. *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 206 – 214.

# CHAPITRE V : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des Benzodiazépines Ferrocéniques

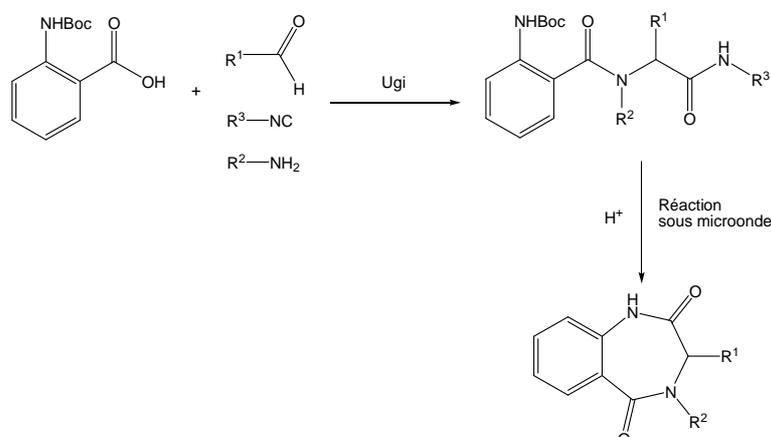


Schéma 33 : Synthèse de la BZD via une réaction de Ugi.

## I.2. Objectif du travail

L'étude de l'activité antipaludique et antitoxoplasmique des benzodiazépines avait déjà été réalisée et confirmée par le Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle-UMR 8576 en 2002. Florence Dzierszinski de l'équipe de Tomavo avait montré que le flurazépam (Schéma 34) était actif contre *Plasmodium falciparum* et *Toxoplasma gondii*.<sup>22</sup> Aussi, l'activité était conservée sur des souches chloroquino- et méfloquino-résistantes.

Nous avons cherché à moduler la structure de la benzodiazépine en incluant l'entité ferrocénique (Schéma 34). Le but était de se rapprocher le plus possible de la structure du Flurazépam. Nos travaux se sont basés, dans un premier temps, sur le remplacement du groupe *N,N*-diméthylaminéthyle par l'introduction du ferrocène (Schéma 34). Puis, dans l'optimisation de cette synthèse. Trois molécules ont été synthétisées et leurs activités antipaludiques analysées sur des souches de *P. falciparum*.

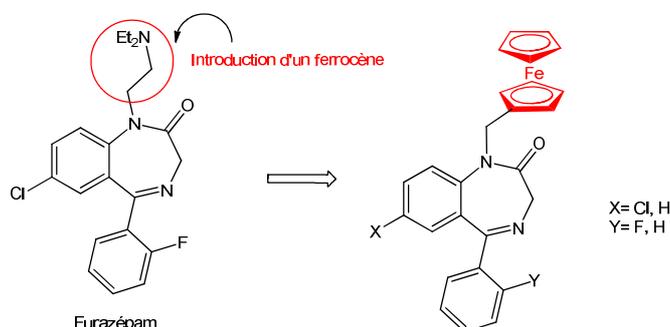


Schéma 34 : Schéma de synthèse des benzodiazépines ferrocéniques.

<sup>22</sup> Dzierszinski, F. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 3197 – 3207.

## II. SYNTHÈSE DES BENZODIAZÉPINES FERROCÉNIQUES

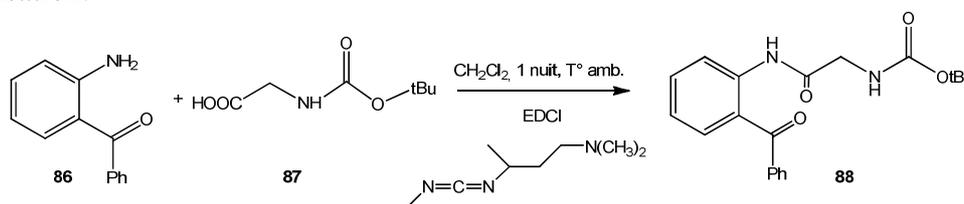
Pour réaliser la synthèse des benzodiazépines ferrocéniques (BZDFcs), deux méthodes bien distinctes ont été mises au point : une méthode classique par synthèse multi-étape et une autre méthode « one-pot » par irradiation micro-onde.

### II.1. Méthode classique (M1)

La synthèse multi-étape des BZDFcs par la première méthode nécessite trois grandes étapes dont la première correspond à une réaction de couplage, la seconde une réaction de protection/cyclisation et la dernière, une réaction de condensation.

#### II.1.1. Réaction de couplage

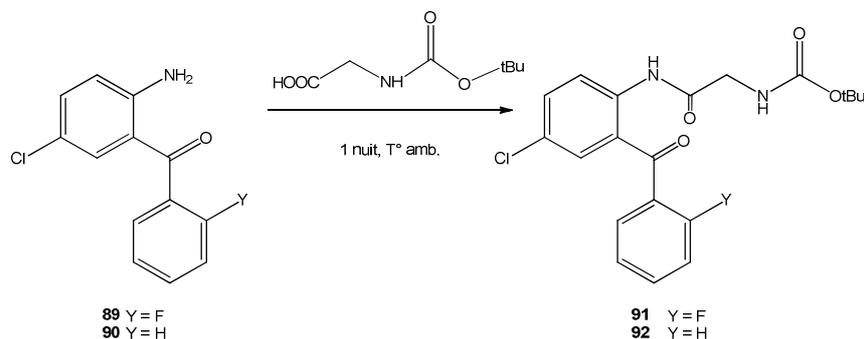
Dans une première étape, la création de la liaison amide se réalise par les techniques classiques d'amidification (addition d'amines sur une fonction acide activée). Le composé **88** est ainsi obtenu par condensation de la glycine **87** protégée par un groupement tertbutoxycarbonate (BOC) sur l'*o*-aminobenzophénone **86** en présence d'un agent de couplage, le 1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI), à température ambiante pendant une nuit (Schéma 35). L'urée formée au cours de cette réaction présente l'avantage d'être soluble en phase aqueuse et est facilement éliminée de la phase organique par simple extraction. Le composé **88** est obtenu avec un rendement de 74 % après recristallisation.



**Schéma 35** : Synthèse du composé **88** par réaction de couplage.

Dans le cas des benzophénone halogénées, la condensation de la Boc-glycine sur les amines **89** et **90** conduit aux composés **91** et **92** (Schéma 36). Cependant, une autre méthode de couplage a été adoptée. Les Tableau 31 et Tableau 32 illustrent les différentes réactions effectuées afin d'optimiser cette étape. En effet, lorsque la réaction est réalisée avec le même réactif que précédemment, l'EDCI, les rendements de la réaction s'avèrent décevants : 23 % pour le composé **91** (entrée 1, Tableau 31) et 31 % pour le composé **92** (entrée 1, Tableau 32).

## CHAPITRE V : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des Benzodiazépines Ferrocéniques



**Schéma 36** : Synthèse des composés **91** et **92**.

La réaction de couplage est réalisée dans le dichlorométhane distillé en présence d'un autre agent de couplage, le dicyclocarbodiimide (DCC), à température ambiante pendant une nuit. Les composés **91** et **92** sont obtenus après purification par colonne chromatographique sur gel de silice avec les rendements respectifs de 70 % (entrée 4, Tableau 31) et 88 % (entrée 2, Tableau 32). La présence de diméthylaminopyridine (DMAP) ne permet pas d'améliorer le rendement de la réaction (entrées 2 et 3, Tableau 31).

**Tableau 31** : Optimisation de la réaction de couplage pour le composé **91**.

Entrée	Nombre d'équivalents					Rdt (%)
	<b>91</b>	Boc-glycine	EDCI	DMAP	DCC	
1	1	1	1	-	-	23
2	1	1,2	-	0,165	1	44
3	1	3	-	0,27	2	30
4	1	1	-	-	1	70

**Tableau 32** : Optimisation de la réaction de couplage pour le composé **92**.

Entrée	Nombre d'équivalents						Rdt (%)
	<b>92</b>	Boc-glycine	EDCI	DCC	HOBt	CDI	
1	1	1	1	-	1	-	31
2	1	1	-	1	-	1	88
3	1	3	2	-	1	-	52
4	1	3	-	-	-	1	0

### II.1.2. Réaction de déprotection et cyclisation

La deuxième étape consiste en la déprotection de la fonction amine.

A partir du composé **88**, la déprotection s'effectue en présence d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane durant 4 heures. L'amine déprotégée **93** est obtenue avec un rendement de 97 % (Schéma 37).

## CHAPITRE V : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des Benzodiazépines Ferrocéniques

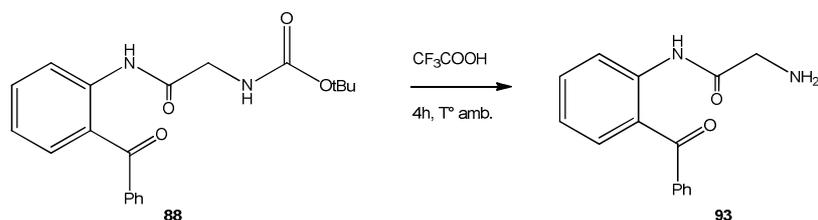


Schéma 37 : Synthèse du composé **93** par déprotection de **88**.

Ensuite, la cyclisation intramoléculaire est réalisée en présence d'acide acétique durant une nuit et à 60°C (Schéma 38). Le produit **94** est obtenu avec un rendement de 92 %.

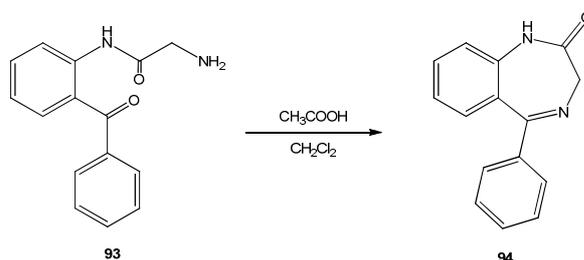


Schéma 38 : Synthèse de **94** par réaction de cyclisation intramoléculaire.

L'obtention de nombreux produits secondaires lors de la déprotection des composés **91** et **92** portant des halogènes sur les groupements aromatiques, a été évitée par la mise en place d'une autre méthode plus douce. En effet, la déprotection est réalisée en présence d'une solution de HCl dans l'isopropanol (5 à 6 N) dans le chloroforme toute une nuit à température ambiante (Schéma 39). Après traitement du milieu réactionnel, deux produits sont obtenus : un correspondant au produit de déprotection (**95** et **96**) et un autre au produit de cyclisation (**97** et **98**). Par conséquent, après la première étape, une simple extraction est effectuée et la cyclisation est réalisée à partir du mélange en présence d'acide acétique par chauffage une nuit à 60°C (Schéma 40). Les produits **97** et **98** sont ainsi obtenus avec un bon rendement global de 87% pour les deux étapes.

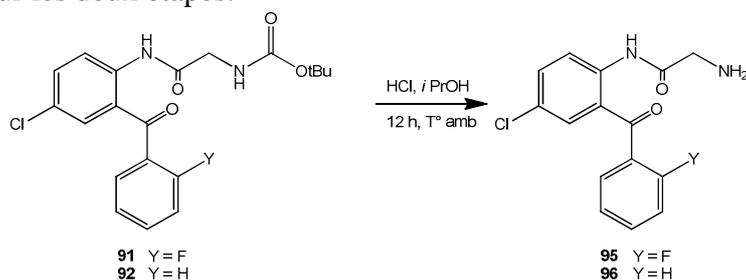


Schéma 39 : Synthèse des composés **95** et **96**.

# CHAPITRE V : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des Benzodiazépines Ferrocéniques

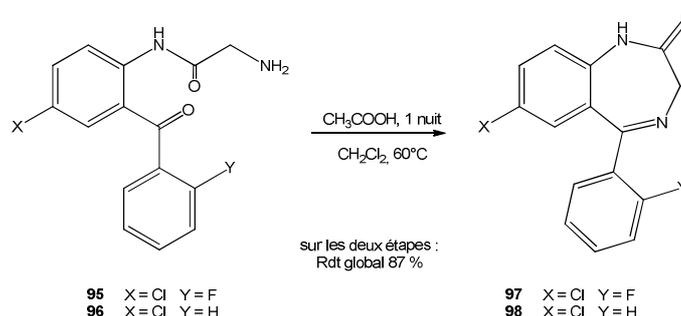


Schéma 40 : Cyclisation intramoléculaire pour la synthèse de **97** et **98**.

## II.1.3. Condensation du dérivé ferrocénique

Pour la dernière étape, le groupement ferrocénique est introduit sur l'azote de la fonction amide de la benzodiazépine.

Plusieurs tentatives de condensation ont été effectuées. Ainsi, la première stratégie reposait sur la réaction directe de l'alcool ferrocénique sur la benzodiazépine en milieu acide. En effet, le carbocation issu de l'action de l'acide sur l'alcool ferrocénique aurait pu réagir sur la fonction amide. Cependant, aucune réaction ne s'est produite.<sup>23, 24</sup>

La seconde stratégie consistait en la modification de l'alcool ferrocénique **99** en un meilleur groupe partant (acétate, tosylate) et la condensation avec la benzodiazépine en milieu basique. Seule la synthèse de l'acétate ferrocénique **100** (Schéma 41) a pu être réalisée avec un rendement de 94 %. Cependant, contrairement aux résultats de la littérature,<sup>25, 26</sup> le tosylate ferrocénique n'a pas été obtenu quelles que soient les conditions opératoires utilisées. L'éther **101** (Schéma 41) correspond à une substitution *in situ* du tosylate par l'alcool ferrocénique.

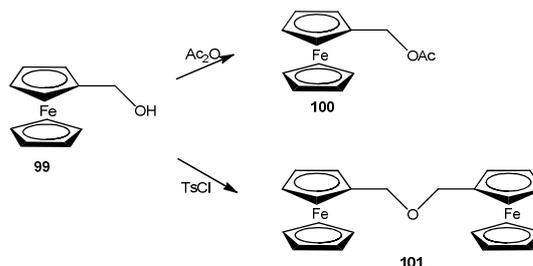


Schéma 41 : Modification de l'alcool ferrocénique en acétate.

La réaction de l'acétate ferrocénique **101** sur la benzodiazépine **98** a permis d'obtenir le composé ferrocénique mais avec un faible rendement de 18% (Schéma 42). Le changement de base (NaH, *t*BuLi) n'a pas entraîné d'augmentation du rendement de la réaction.

<sup>23</sup> Athelstan, L. J.; Beckwith, Vickery, G. G.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1975**, *1*, 1818 – 1821.

<sup>24</sup> Boev, V. I. et al. *Russian Chem. Rev.*, **1997**, *66*, 613 – 636.

<sup>25</sup> Tipson J. *J. Org. Chem.* **1944**, *9*, 239.

<sup>26</sup> Kochi, J. K.; Hammond, G. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, *75*, 3443.

## CHAPITRE V : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des Benzodiazépines Ferrocéniques

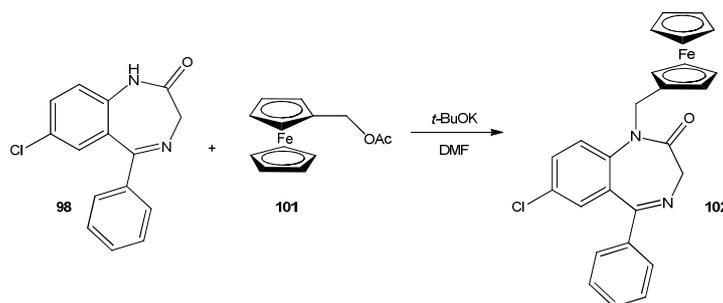


Schéma 42 : Synthèse de la benzodiazépine ferrocénique **102**.

Notre choix s'est donc porté sur un autre groupement partant tel que l'ammonium quaternaire **12** synthétisé au chapitre II. Ainsi, les benzodiazépines **94**, **97** et **98** sont donc condensées sur cet ammonium ferrocénique **12** en présence de tertio-butylate de potassium (Schéma 43). Après purification par colonne chromatographique sur gel de silice, les benzodiazépines ferrocéniques **102**, **103** et **104** sont obtenues avec de bons rendements allant de 68 à 84 %.

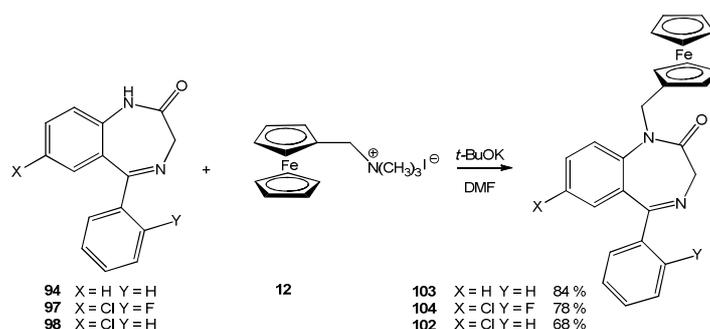


Schéma 43 : Synthèse des benzodiazépines ferrocéniques **102-104**.

### II.2. Méthode 2 : Réactions sous irradiation micro-onde

Suite à cette première série de synthèse, nous avons souhaité optimiser les conditions de réactions. Une autre méthode d'obtention des benzodiazépines ferrocéniques a ainsi été élaborée par voie micro-onde. L'objectif a été de synthétiser les benzodiazépines de manière « one pot » et ainsi d'éviter des temps de réaction longs et des purifications. En effet, dans un premier temps, il s'agit d'introduire la benzophénone, la BOC-glycine et notre agent de couplage. La seconde étape consiste à réaliser la déprotection ainsi que la cyclisation en même temps.<sup>27</sup>

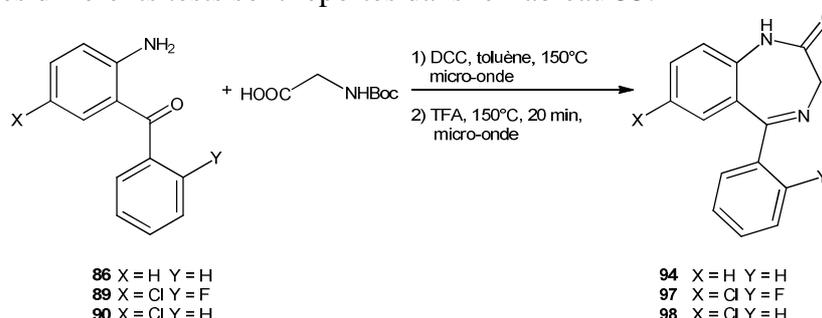
#### II.2.1. Réaction de couplage-déprotection-cyclisation « one-pot »

L'étape de couplage entre l'amine et l'acide s'effectue à 150°C, pendant 5 à 15 minutes en présence de toluène ou sans solvant sous irradiation micro-onde (1<sup>ère</sup> étape). Ensuite, après ajout d'acide trifluoroacétique, le mélange est introduit à nouveau dans l'appareil micro-onde pendant 15 minutes à 150°C (Schéma 44). Après neutralisation et

<sup>27</sup> Mwande-Maguene, G. et al *New J. Chem.*, DOI:10.1039/C1NJ20551J.

## CHAPITRE V : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des Benzodiazépines Ferrocéniques

extraction, les produits sont ensuite purifiés sur colonne chromatographique de gel de silice. Les résultats des différents tests sont reportés dans le Tableau 33.



**Schéma 44** : Synthèse des benzodiazépines **94**, **97** et **98** par irradiation micro-onde.

**Tableau 33** : Optimisation de la synthèse des benzodiazépines par irradiation micro-onde.

Entrée	Réactifs	Agent de couplage	Température (°C)	Durée de la 1ère étape (min)	Solvant	Produits	Rdt (%)
1	<b>90</b>	DCC	100	5	aucun	<b>98</b>	0
2	<b>90</b>	DCC	120	10	aucun	<b>98</b>	0
3	<b>90</b>	DCC	150	20	aucun	<b>98</b>	31
4	<b>90</b>	DCC	150	20	toluène	<b>98</b>	69
5	<b>90</b>	DCC	170	20	toluène	<b>98</b>	35
6	<b>90</b>	EDCI	150	20	toluène	<b>98</b>	41
7	<b>86</b>	DCC	150	20	toluène	<b>94</b>	77
8	<b>89</b>	DCC	150	20	toluène	<b>97</b>	80

Les conditions opératoires de la première étape ont été optimisées à partir du composé **90** (entrées 1 à 6). Lorsque la première étape de la réaction est réalisée sans solvant et en présence de DCC, aucune benzodiazépine n'est obtenue (entrées 1 et 2) quel que soit le temps de réaction à une température de 120°C. Ce n'est qu'en chauffant à une température plus élevée (150°C), et avec un temps de réaction de la première étape plus long (20 mn) que le produit **98** est obtenu avec un rendement de 31% (entrée 3). L'ajout d'un solvant classique pour ce type de réaction, tel que le toluène, a permis la formation du produit souhaité avec un rendement satisfaisant de 69 % (entrée 4). Enfin, une température plus élevée semble néfaste à la réaction (entrée 5) ainsi qu'un changement de l'agent de couplage (EDCI) (entrée 6).

Ces conditions opératoires optimisées (toluène, DCC, 150°C, 20 min) ont été utilisées pour la synthèse des BZDs **94** et **97**. Ces dernières sont obtenues avec de bons rendements de 77 et 80 % (Tableau 33).

Au vu de ces résultats, il est clair que cette méthodologie micro-onde présente comme avantages : une bonne sélectivité, un gain de temps considérable et une amélioration des rendements. En effet, alors que la première méthode nécessitait au moins deux à trois jours pour l'obtention des benzodiazépines, cette seconde méthode par irradiation micro-onde ne requiert que 40 minutes de réaction pour les deux étapes. De plus, les étapes de couplage-déprotection-cyclisation s'effectuent « one-pot ».

## CHAPITRE V : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des Benzodiazépines Ferrocéniques

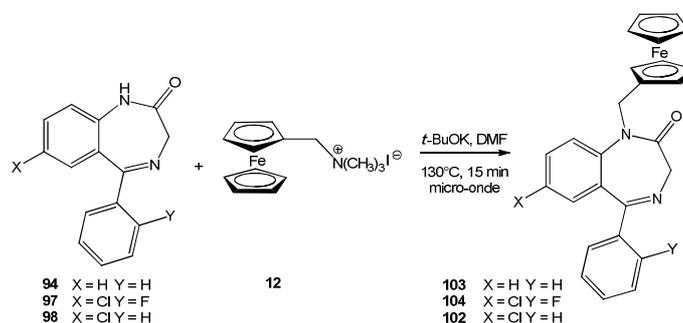
Les rendements obtenus entre les deux méthodes sont reportés dans le Tableau 34. La réaction effectuée par irradiation micro-onde permet d'améliorer de façon non négligeable les rendements globaux de la réaction dans le cas des benzodiazépines **94** et **97**. Par contre une légère diminution du rendement a été observée pour la benzodiazépine **98**.

**Tableau 34** : Comparaison des rendements obtenus entre la méthode 1 (3 étapes) et la méthode 2 (par irradiation micro-onde) pour la synthèse des benzodiazépines **94**, **97** et **98**.

Benzodiazépines	Rdt. (%) Méthode 1 (3 étapes)	Rdt. (%) Méthode 2 (micro-onde)
<b>94</b>	66	77
<b>97</b>	61	80
<b>98</b>	75	69

### II.2.2. Réaction de condensation des BZDs avec le composé ferrocéniques

La dernière étape consistant à introduire le ferrocène a également été étudiée par voie micro-onde. Cette dernière s'effectue en présence de tertibutylate de potassium dans le DMF à 130°C pendant 15 minutes. Les produits **102-104** sont obtenus après purification sur colonne chromatographique avec des rendements variant de 34 à 72 % (Schéma 45, Tableau 35).



**Schéma 45** : Synthèse des benzodiazépines ferrocéniques **103**, **104** et **105** par irradiation micro-onde.

Les benzodiazépines ferrocéniques **102** et **104** sont obtenues avec des rendements comparables et satisfaisants alors que le rendement diminue considérablement dans le cas de la benzodiazépine ferrocénique **103** (Tableau 35).

**Tableau 35** : Comparaison des rendements obtenus lors de la synthèse de **102**, **103** et **104** entre la Méthode 1 et la Méthode 2.

Produits	Rdts (%) Méthode 1	Rdts (%) Méthode 2
<b>103</b>	84	34
<b>104</b>	78	71
<b>102</b>	68	72

## CHAPITRE V : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des Benzodiazépines Ferrocéniques

Afin d'introduire une chaîne aminée sur le ferrocène et ainsi se rapprocher de la structure du Flurazépam, différentes synthèses ont été réalisées mais se sont toutes soldées par des échecs.

À l'issue de ces deux méthodes de synthèses, nous avons cherché à vérifier l'activité antipaludique de ces 3 benzodiazépines ferrocéniques.

### III. ACTIVITE ANTIPALUDIQUE ET CYTOTOXICITE DES BENZODIAZEPINES FERROCENIQUES

Nous avons à nouveau réalisé les tests de sensibilité des BZDFcs : au Muséum d'Histoire Naturelle de Paris, pour les tests sur les souches de laboratoire de *P. falciparum* (F32, FCB1 et K1), à l'Unité de Parasitologie Médicale du CIRMF pour la cytotoxicité et les tests sur les isolats cliniques infectés par *P. falciparum*. Le Tableau 36 rassemble toutes les données obtenues.

**Tableau 36** : Résultats des tests de cytotoxicité et de sensibilité antipaludique des BZDFcs.

	F32 ( $\mu\text{M}$ )		FCB1 ( $\mu\text{M}$ )		K1 ( $\mu\text{M}$ )		Isolat 23130 ( $\mu\text{M}$ )	Isolat 23145 ( $\mu\text{M}$ )	Cytotoxicité ( $\mu\text{M}$ )
	CI <sub>50</sub>	CI <sub>90</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>90</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>90</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>
<b>102</b>	1.4	3	1.4	2.6	6.4	11	7	9	10
<b>103</b>	2	3	2	4	9.2	16	10	0.5	10
<b>104</b>	4	7	4	2.6	5.5	10	7	1	10
<b>CQ</b>	0.019	0.028	0.067	0.138	0.157	0.253	0.100	0.095	NT
<b>Art</b>	0.031	0.049	0.018	0.027	0.029	0.045	NT	NT	NT

D'après ce Tableau 36 ci-dessus, nous constatons malheureusement qu'aucune de ces trois molécules ne possède une activité antipaludique. En effet, elles ont toutes des CI<sub>50</sub> de l'ordre du micromolaire. Que ce soit sur des souches de références ou sur les isolats cliniques, elles sont toutes moins actives que la CQ et l'Art. En outre, elles ne présentent aucun danger pour la cellule en culture car elles ne sont pas cytotoxiques.

### IV. CONCLUSION

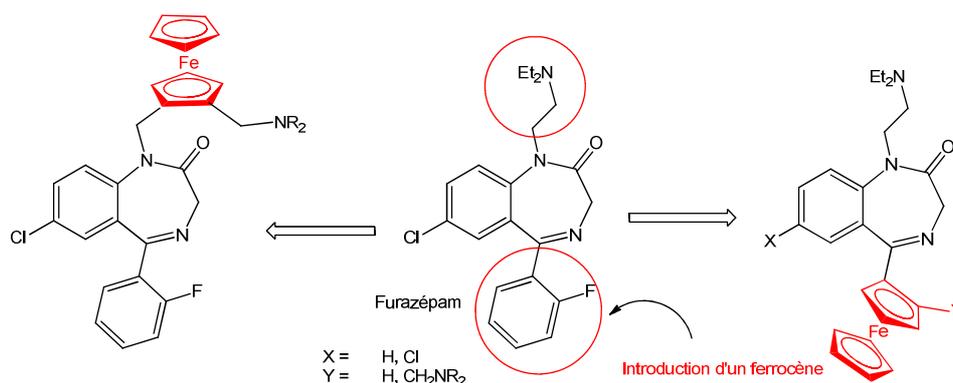
Nous nous sommes limités dans ce chapitre à la synthèse de trois benzodiazépines ferrocéniques. Ainsi, une méthode de synthèse efficace par irradiation micro-onde a été mise au point. En comparant deux méthodes de synthèses évoquées plus haut, nous pouvons conclure que la méthode par irradiation micro-onde semble être la meilleure car elle permet un gain de temps considérable (40 mn au lieu de quelques jours). Aussi, majoritairement, les rendements obtenus par cette méthode sont plus importants que ceux issus de la méthode classique. Enfin, cette méthode nécessite moins d'étapes et permet l'utilisation one-pot de plusieurs réactifs.

Malheureusement, les trois BZDFcs **102** à **104** ne présentent aucune activité antipaludique. Cependant, elles présentent l'avantage de ne pas être toxiques et donc elles

## CHAPITRE V : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des Benzodiazépines Ferrocéniques

pourraient être exploitées dans le traitement d'autres maladies. Pourquoi ne pas essayer d'analyser leurs effets anxiolytique, hypnotique, myorelaxant, anticonvulsivant etc... comme la majorité des benzodiazépines ?

Les perspectives de synthèse pour améliorer l'activité antipaludique de ces benzodiazépines seraient de chercher à rester le plus proche de la structure de la flurazépam. En particulier, il serait intéressant d'introduire un groupement amino sur le ferrocène ou de modifier le groupement phényle par l'introduction du ferrocène comme le montre le Schéma 46.



**Schéma 46 :** Perspectives de synthèse de nouveaux analogues ferrocéniques du Flurazépam.

# CHAPITRE V : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des Benzodiazépines Ferrocéniques

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Fryer, R. I. *Bicyclic Diazepines, The chemistry of Heterocyclic Coumpounds*, Wiley : New York, **1991** ; Chapter 7.
2. Zavala, F.: Benzodiazepines, Anxiety and Immunity. *Pharmacol. Ther.* **1997**, *75*, 199 – 216.
3. Basile, A. S.; Lippa, A. S.; Skolnick, P.: Anxiolytic drugs: can less be more? *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *500*, 441 – 451.
4. Marshall, B. E.; Longnecker, D. E. General Anesthetics. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th ed. ; Gillman, A. G., Rall, T. W., Nies, A. S., Taylor, P., Eds. ; Pergamon : New York, **1990** ; p 303. (b) Rall, T. W. *Ibid.*, p 346.
5. Nordenberg, J.; Fenig, E.; Landau, M.; Weizman, R.; Weizman, A.: Effects of Psychotropic Drugs on Cell Proliferation and Differentiation. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 1229 – 1236.
6. Boitano, A.; Ellman, J. A.; Glick, G. D.; Opipari, A. W.: The Proapoptotic Benzodiazepine Bz-423 Affects the Growth and Survival of Malignant B Cells. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6870 – 6876.
7. Churcher, I.; Ashton, K.; Butcher, J. W.; Clarke, E. E.; Harrison, T.; Lewis, H. D.; Owens, A. P.; Teall, M. R.; Williams, S.; Wrigley, J. D. J.: A New Series of Potent Benzodiazepine  $\alpha$ -Secretase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 179 – 183.
8. Horton, D. A.; Bourne, G. T.; Smythe, M. L.: The Combinatorial Synthesis of Bicyclic Privileged Structures or Privileged Substructures. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 893 – 930.
9. Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; DiPardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whitter, W. L.; Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, R. S. L.; Lotti, V. J.; Cerino, D. J.; Chen, T. B.; Kling, P. J.; Kunkel, K. A.; Springer, J. P.; Hirshfield, J.: Methods for Drug Discovery: Development of Potent, Selective, Orally Effective Cholecystokinin Antagonists. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2235 – 2246.
10. Nicolaou, K. C.; Pfefferkorn, J. A.; Roecker, A. J.; Cao, G.-Q.; Barluenga, S.; Mitchell H. J.: Natural Product-like Combinatorial Libraries Based on Privileged Structures. 1. General Principles and Solid-Phase Synthesis of Benzopyrans. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9939 – 9953.
11. Ogotu, B. R.; Newton, C. R.: Management of seizures in children with falciparum malaria. *Tropical Doctor* **2004**, *34*, 71 – 75.
12. Ikumi, M. L.; Muchohi, S. N.; Ohuma, E. O.; Kokwaro, G. O.; Newton, C. R.: Response to diazepam in children with malaria-induced seizures. *Epilepsy Res.* **2008**, *82*(2-3), 215 – 218.
13. Mpimbaza, A.; G Staedke, S.; Ndeezi, G.; Byarugaba, J.; Rosenthal, P. J.: Predictors of anti-convulsant treatment failure in children presenting with malaria and prolonged seizures in Kampala, Uganda. *Malaria Journal* **2009**, *8*:145.
14. Kokwaro, G.; Edwards, G.; Roberts, P.; Ward, S.; Winstanley, P.; Watkins, W.: Infection with *Plasmodium berghei* alters benzodiazepine receptor in rat brain. *Arch. Med. Res.* **1997**, *28*, 425 – 427.
15. Hart, B. R.; Rush, D. J.; Shea, K. J.: Discrimination between Enantiomers of Structurally Related Molecules: Separation of Benzodiazepines by Molecularly Imprinted Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 460 – 465.
16. Spencer, J.; Sharratt, D. P.; Dupont, J.; Monteiro, A. L.; Reis, V. I.; Stracke, M. P.; Rominger, F.; McDonald, I. M.: Synthesis and Evaluation of 5-Phenyl-1*H*-1,4-benzodiazepin-2(3*H*)-one-Based Palladium Complexes as Precatalysts in C-C Bond Forming Reactions. *Organometallics*, **2005**, *24*, 5665 – 5672.
17. Doulat, J.; Liu, W.-Q.; Gresh, N.; Garbay, C.: Novel 1,4-benzodiazepine derivatives with antiproliferative properties on tumor cell lines. Doulat, J. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2527 – 2530.
18. Hirai, K.; Ishiba, T.; Sugimoto, H.; Fujishita, T.; Tsukinoki, Y.; Hirose, K.: Novel peptidoaminobenzophenones, terminal N-substituted peptidoaminobenzophenones, and N-(acylglycyl)aminobenzophenones as open-ring derivatives of benzodiazepines. *J. Med. Chem.*, **1981**, *24*, 20 – 27.
19. Walser, A.; Szente, A.; Hellerbach, J.: Cyclization Products Derived from o-Benzoyl Malonanilates. *J. Org. Chem.*, **1973**, *38*, 449 – 456.
20. Bolli, M. H.; Marfurt, J.; Grisostomi, C.; Boss, C.; Binkert, C.; Hess, P.; Treiber, A.; Thorin, E.; Morrison, K.; Buchmann, S.; Bur, D.; Ramuz, H.; Clozel, M.; Fischli, W.; Weller, T.: Novel Benzo[1,4]diazepin-2-one Derivatives as Endothelin Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2776 – 2795.

## CHAPITRE V : Synthèse et Activité Antipaludique In Vitro Des Benzodiazépines Ferrocéniques

---

21. Zhou, H.; Zang, W.; Bing, Y.: Use of Cyclohexylisocyanide and Methyl 2-Isocynoacetate as Convertible Isocyanides for Microwave-Assisted Fluorous Synthesis of 1,4-Benzodiazepine-2,5-dione Library. *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 206 – 214.
22. Dzierszynski, F.; Coppin, A.; Mortuaire, M.; Dewailly, E.; Slomianny, C.; Ameisen, J.-C.; DeBels, F.; Tomavo, S.: Ligands of the Peripheral Benzodiazepine Receptor Are Potent Inhibitors of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3197 – 3207.
23. Athelstan, L. J.; Beckwith, Vickery, G. G.: Displacement of the hydroxy-group from ferrocenylmethanol by amines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1975**, *1*, 1818 – 1821.
24. Boev, V. I.; Snegur, L. V.; Babin, V. N. Nekrasov, Y. S.:  $\alpha$ -Metallocenylalkylation. *Russ. Chem. Rev.* **1997**, *66*, 613 – 636.
25. Tipson R. S. J.: On Ester of *p*-Toluenesulfonic acid. *J. Org. Chem.* **1944**, *9*, 235.
26. Kochi, J. K. Hammond, G. S.: Benzyl tosylates. I. Preparation and properties. *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, *75*, 3443 – 3444.
27. Mwande-Maguene, G.; Jakhlal, J.; Lekana-Douki, J.-B.; Mouray, E.; Bousquet, T.; Pellegrini, S.; Grellier, P.; Toure Ndouo, F. S. ; Lebibi, J.; Pelinski, L. *New J. Chem.* DOI:10.1039/C1NJ20551J

Cite this: DOI: 10.1039/c1nj20551j

www.rsc.org/njc

LETTER

## One-pot microwave-assisted synthesis and antimalarial activity of ferrocenyl benzodiazepines†

Gabin Mwandu-Maguene,<sup>a</sup> Jouda Jakhlal,<sup>a</sup> Jean-Bernard Lekana-Douki,<sup>b</sup> Elisabeth Mouray,<sup>c</sup> Till Bousquet,<sup>a</sup> Sylvain Pellegrini,<sup>a</sup> Philippe Grellier,<sup>c</sup> Fousseyni Samba Toure Ndouo,<sup>b</sup> Jacques Lebibi\*<sup>d</sup> and Lydie Pelinski\*<sup>a</sup>

Received (in Montpellier, France) 22nd June 2011, Accepted 30th August 2011

DOI: 10.1039/c1nj20551j

An efficient synthesis of 1,4-benzodiazepin-2-ones is described by condensation between 2-aminobenzophenone and Boc-protected amino acids *via* microwave-assisted irradiation. This produces higher yields in shorter reaction times than with traditional methods. The antiplasmodial activity of the corresponding ferrocenyl benzodiazepines was evaluated *in vitro* against *Plasmodium falciparum* F32 (chloroquine-sensitive) and FCB1 and K1 (chloroquine-resistant) strains and gabonese clinical isolates.

Benzodiazepine (BZD) derivatives have received significant attention, as their core is indeed a “privileged scaffold” found in active compounds against a variety of target types.<sup>1</sup> Particularly, the ability of 1,4-benzodiazepin-2-ones to bind to cholecystokinin (CCK)<sup>2</sup> and central benzodiazepine receptors<sup>3</sup> has been widely described. The benzodiazepine scaffold is also found in neurokinin-1 antagonists as enzyme inhibitors such as  $\gamma$ -secretase<sup>4</sup> and farnesyl protein transferase inhibitors.<sup>5</sup> Some 1,4-benzodiazepine derivatives show antiproliferative properties on tumor cell lines.<sup>6</sup> They have also been proven to be efficient peptidomimetic of *Plasmodium falciparum* falcipain-2 inhibitors.<sup>7</sup> It also appears that flurazepam (Fig. 1), an agonist of BDZ receptors, is effective against the chloroquine- and mefloquine-resistant Dd2 strain of *Plasmodium falciparum*.<sup>8</sup> Moreover, it has been reported that malaria infection reduces the binding capacity of benzodiazepine receptors.<sup>9</sup>

Our interest in the search for new antiplasmodial drugs has been focused on the synthesis of ferrocenyl 1,4-benzodiazepin-2-ones in which the aminoethyl group has been replaced by the lipophilic entity of ferrocene. Indeed, a bioorganometallic approach to cancer and malaria therapeutics is a growing area

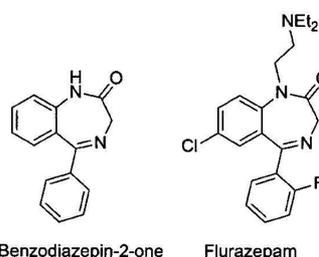


Fig. 1 Structures of 1,4-benzodiazepin-2-one and flurazepam.

of organometallic chemistry.<sup>10</sup> The high lipophilicity of ferrocene and its electrochemical behavior render it very attractive for drug design. Particularly, ferroquine (FQ, SSR97193), an antimalarial molecule with a ferrocenyl moiety inserted within the side chain of chloroquine, is currently being developed by Sanofi-Aventis and entered phase II clinical trials in association with artesunate.<sup>11</sup>

Many combinatorial syntheses based on this scaffold have been reported in the literature. In particular, a general way to build the ring skeleton of 1,4-benzodiazepin-2-ones is *via* reactions between protected amino acids and an aryl moiety.<sup>12</sup> In other procedures, 2-aminobenzophenone was left to react with halogenoacetylhalide to produce the halogenoacetamido followed by condensation with ammonia.<sup>13</sup> Only one report has described a one-pot protocol for the synthesis of 5-phenyl-1,4-benzodiazepin-2-one derivatives using ammonium hydroxide solution with  $K_2CO_3$  instead of liquid ammonia.<sup>14</sup> This procedure requires a reaction time of 16 hours.

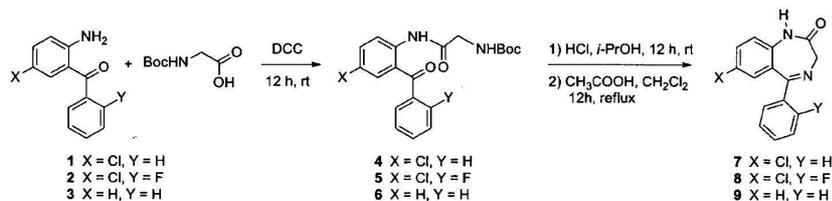
Microwave-Assisted Organic Synthesis (MAOS) has become increasingly popular in recent years to improve the yield and/or to shorten reaction times in a large variety of synthetic transformations. Microwave heating of closed reaction vessels is a highly energy efficient heating technique. In developing a strategy towards the synthesis of novel ferrocenyl antimalarial drugs,<sup>15</sup> we applied microwave technology to a one-pot synthesis of 1,4-benzodiazepin-2-ones. Herein we present our preliminary results on the *in vitro* antimalarial activity of ferrocenyl benzodiazepines against *Plasmodium* strains and gabonese clinical isolates.

<sup>a</sup> Université Lille Nord de France, Université de Lille1, Unité de Catalyse et de Chimie du Solide, CNRS UMR 8181, ENSCL, 59652 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>b</sup> Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Unité de Parasitologie, BP 769 Franceville, Gabon  
<sup>c</sup> FRE 3206 CNRS MCAM, Muséum National d'Histoire Naturelle, Département Régulations, Développement, Diversité Moléculaire CP 52, 61 rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France

<sup>d</sup> Université des Sciences et Techniques de Masuku, BP 901, Franceville, Gabon

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c1nj20551j



**Scheme 1** Synthesis of 1,4-benzodiazepin-2-ones *via* conventional heating.

Benzodiazepines **7–9** were synthesized by the procedure outlined in Scheme 1. Peptidic coupling of substituted 2-aminobenzophenones **1–3** with protected glycine in the presence of dicyclohexylcarbodiimide (DCC) gives amides **4, 5** and **6** in 88, 70 and 74% yields, respectively, after purification by column chromatography. The Boc-protecting group was removed by treatment with chloride acid in isopropanol. Finally, benzodiazepines **7–9** were obtained by cyclization using 5% acetic acid in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  in 87–89% global yield for the two steps.<sup>16</sup>

With the aim to increase the yields, whilst shortening the reaction times, we decided to exploit microwave irradiation as a heating source. Using 2-amino-5-chlorobenzophenone **1** as a model substrate, various reaction conditions were tested to obtain benzodiazepine **7**. Results and conditions are summarized in Table 1.

In a general procedure, 2-amino-5-chlorobenzophenone **1** and Boc-glycine were placed in a microwave vial in the presence of a coupling reagent and a solvent. The vessel was hermetically sealed with a removable fitted cap. Heating was maintained for an appropriate period. Trifluoroacetic acid was then added to the mixture for an additional 20 min. Optimization was performed for the first step.

When an equimolar amount of **1** and Boc-glycine, in the presence of DCC, were irradiated without solvent for 5 or 10 min, no reaction occurred (entries 1 and 2). Increasing the

temperature and reaction times for the first step resulted in formation of benzodiazepine **7** in only 31% yield (entry 3).

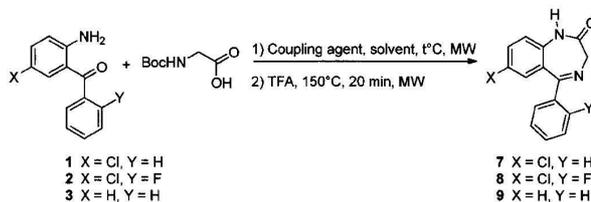
To improve the yield, several experimental conditions were tested such as temperature, solvent, coupling reagent and time. A higher yield of 86%, for **7**, is obtained when the reaction is performed using toluene as the solvent and DCC as the coupling reagent at 150 °C for 30 min (entry 6). Increasing the reaction temperature induced a lower yield (entry 5). Alternative organic solvents, including dimethylformamide and dimethylsulfoxide, were unsatisfactory due to the formation of a by-product derived from solvent decomposition (entries 7 and 8). The use of other coupling reagents such as EEDQ, EDCI and PyBOP caused a decrease in the yield (entries 9, 10 and 11).

Using the conditions reported in entry 6 for aminoketones **2** and **3**, 1,4-benzodiazepin-4-ones **8** and **9** were obtained in 80 and 83% yields, respectively, after purification by column chromatography (entries 12 and 13).

When compared to the conventional heating process, microwave irradiation has given higher yields in shorter reaction times as reported in Table 2.

Alkylation of benzodiazepines **7–9** with the ferrocenylmethyltrimethyl ammonium iodide **10** in the presence of potassium *tert*-butoxide has afforded ferrocenylmethyl benzodiazepines **11–13** in 68–84% yield (Scheme 2). An attempt to

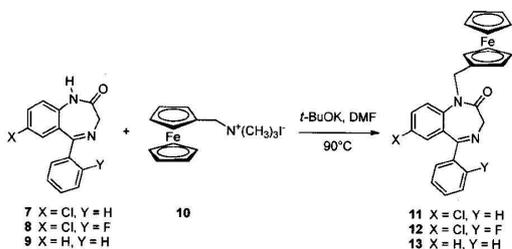
**Table 1** Synthesis of benzodiazepines *via* a microwave procedure



Entry	Aminoketone	Coupling reagent	Temperature/°C	Time of first step/min	Solvent	Yield (%)
1	<b>1</b>	DCC	100	5	None	0
2	<b>1</b>	DCC	120	10	None	0
3	<b>1</b>	DCC	150	20	None	31
4	<b>1</b>	DCC	150	20	Toluene	69
5	<b>1</b>	DCC	170	20	Toluene	35
6	<b>1</b>	DCC	150	30	Toluene	86
7	<b>1</b>	DCC	150	30	DMF	21
8	<b>1</b>	DCC	150	30	DMSO	30
9	<b>1</b>	EEDQ	150	30	Toluene	31
10	<b>1</b>	PyBOP	150	30	Toluene	10
11	<b>1</b>	EDCI	150	30	Toluene	41
12	<b>2</b>	DCC	150	30	Toluene	80
13	<b>3</b>	DCC	150	30	Toluene	83

**Table 2** Comparison of yields between the conventional heating method and the microwave irradiation method for benzodiazepine synthesis

Benzodiazepine	Conventional heating yield (%)	Microwave irradiation yield (%)
<b>7</b>	76	86
<b>8</b>	61	80
<b>9</b>	66	83



**Scheme 2** Synthesis of ferrocenylmethyl benzodiazepines **11–13**.

**Table 3** Comparison of yields between the conventional heating method and the microwave irradiation method for alkylation of benzodiazepines

Ferrocenyl benzodiazepines	Conventional heating yield (%)	Microwave irradiation yield (%)
<b>11</b>	68	71
<b>12</b>	78	72
<b>13</b>	84	34

increase these yields *via* microwave methods was made. However, the resulting yields are lower or equal to conventional heating (Table 3).

The three ferrocenyl benzodiazepines were evaluated for their antimalarial activity *in vitro* upon the chloroquine-sensitive F32 ( $IC_{50}$  CQ = 0.019  $\mu$ M) and resistant FCB1 ( $IC_{50}$  = 0.111  $\mu$ M) and K1 ( $IC_{50}$  = 0.157  $\mu$ M) *P. falciparum* strains. These benzodiazepines were also tested on two CQ-resistant clinical isolates from Franceville/Gabon. The potencies of the ferrocenyl compounds, as indicated by their  $IC_{50}$  values, are summarized in Table 4. All tested compounds exhibited modest activities on the CQ-sensitive F32, CQ-resistant

FCB1 and K1 strains with  $IC_{50}$  ranging from 1.4 to 9.2  $\mu$ M. A decrease of the antimalarial activity was observed on the CQ-resistant K1 strain and the clinical isolate 23130 with higher  $IC_{50}$  values (5.5 to 10  $\mu$ M). The best biological activities have been obtained on the CQ-resistant clinical isolate 23145 with  $IC_{50}$  of 1  $\mu$ M for benzodiazepine **12** and  $IC_{50}$  of 0.5  $\mu$ M for **13**.

The three ferrocenyl benzodiazepines were subjected to cytotoxic evaluation against MRC-5 cells employing the MTT colorimetric method and values of 10  $\mu$ M have been obtained (Table 4). These compounds provided a selectivity index calculated on K1 strain (ratio  $CC_{50}/IC_{50}$ ) of 1–1.8, too low for potential development as drug candidates.

In conclusion, a convenient and efficient synthesis of 1,4-benzodiazepin-2-ones has been developed with microwave heating. Short reaction times and simple procedures and purifications make this method applicable for other benzodiazepine syntheses. The ferrocenyl benzodiazepines in particular display significant antiplasmodial activity against the *P. falciparum* F32 CQ-sensitive and FCB1 and K1CQ-resistant strains with  $IC_{50}$  ranging from 1 to 10  $\mu$ M. Thus, the synthesis of ferrocenyl benzodiazepines bearing varied substituents on the ferrocenyl entity is currently underway in our laboratory.

The authors are thankful to the institutions that support our laboratory (Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Lille1). This research was supported by the "Conseil Régional Nord-Pas de Calais" (grant for GMM and program PRIM), the Museum d'Histoire Naturelle de Paris, the Centre International de Recherches Médicales de Franceville and the Université de Franceville. The authors also gratefully acknowledge Catherine Méliet for microanalysis experiments, Faustin Lekoulou, Julie Pontarollo and Sonya Estelle Zang-Edou for parasitological assistance.

## Experimental

### Syntheses

**General procedure for preparation of 7–9 by a microwave-assisted method.** Substituted 2-aminobenzophenone (0.126 mmol), DCC (0.126 mmol, 0.026 g) and *N*-Boc-glycine (0.126 mmol, 0.022 g) in toluene (400  $\mu$ L) were placed in a 10 mL microwave tube equipped with a magnetic stirrer. The sealed tube was placed in the cavity of the microwave reactor and irradiated for 20 min at 150  $^{\circ}$ C. Trifluoroacetic acid (600  $\mu$ L, 7.9 mmol)

**Table 4** *In vitro* antiplasmodial activity against F32, FCB1 and K1 *P. falciparum* strains and gabonese clinical isolates<sup>a</sup> and cellular cytotoxicity<sup>b</sup> of ferrocenyl benzodiazepines **11–13**

BDZ	<i>In vitro</i> activity $IC_{50}$ ( $\mu$ M)					Cytotoxicity $CC_{50}/\mu$ M MRC-5 cells
	F32	FCB1	K1	Isolate 23130	Isolate 23145	
<b>11</b>	1.4	1.4	6.4	7	9	10
<b>12</b>	4	1.4	5.5	7	1	10
<b>13</b>	2	2.4	9.2	10	0.5	10
CQ <sup>c</sup>	0.019	0.111	0.157	0.100	0.095	NT <sup>d</sup>
FQ <sup>c</sup>	0.029	0.020	0.031	NT	NT	NT
ART <sup>c</sup>	0.031	0.018	0.029	NT	NT	NT

<sup>a</sup> The results are expressed as  $IC_{50}$  values at least one experiment for F32, three independent experiments for FCB1, two experiments for K1 and one experiment in triplicate for clinical isolates. <sup>b</sup> The cytotoxic activity was assayed *in vitro* on MRC-5 cell line using the MTT assay. <sup>c</sup> CQ = chloroquine, FQ = ferroquine, ART = artemisinin. <sup>d</sup> NT: not tested.

was then added to the mixture and the reaction vessel was irradiated at 150 °C for 20 min. The solution was neutralized by an aqueous 6 N NaOH solution and extracted with dichloromethane (3 × 3 mL). The organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The residue was purified using column chromatography (eluent: petroleum ether/diethyl ether: 7/3).

**General procedure for ferrocenyl benzodiazepine synthesis.** To a solution of benzodiazepines 7–9 (0.636 mmol) in freshly distilled DMF (10 mL) was added *t*-BuOK (0.713 g, 0.636 mmol) at 0 °C. After stirring for 30 min at 0 °C, ferrocenylmethyltrimethyl ammonium iodide **10** (0.169 g, 0.438 mmol) in DMF (5 mL) was added to the mixture at 20 °C. The solution was heated at 150 °C for 4 h under N<sub>2</sub>. 1 M HCl solution was then added until neutralization and the mixture was extracted by CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 15 mL). The organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The residue was purified using column chromatography (eluent: ethyl acetate/petroleum ether: 5/5).

**7-Chloro-1,3-dihydro-1-ferrocenylmethyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one (11).** Yield 68%. Mp 184 °C. δ<sub>H</sub> (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.37 (3H, m, ArH), 7.27 (4H, m, ArH), 7.06 (1H, m, ArH), 5.12 (1H, d, *J* 14.0 Hz, CH<sub>2</sub>Fc), 4.70 (1H, d, *J* 10.3 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.41 (1H, d, *J* 14.0 Hz, CH<sub>2</sub>Fc), 4.09 (5H, s, Cp'), 3.97 (4H, m, Cp), 3.64 (1H, d, *J* 10.3 Hz, CH<sub>2</sub>); δ<sub>C</sub> (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 169.1, 168.2, 140.7, 138.2, 132.0, 131.0, 130.5, 129.5, 129.4, 128.2, 124.4, 69.4, 68.6, 67.9, 56.9, 46.2. rt<sub>LCMS</sub> 3.58 MS 368.9. Found: C, 66.35; H, 4.57; N, 5.96%. C<sub>26</sub>H<sub>21</sub>ClFeN<sub>2</sub>O requires C, 66.62; H, 4.52; N, 5.98%.

**7-Chloro-1,3-dihydro-1-ferrocenylmethyl-5-(2-fluorophenyl)-2H-1,4-benzodiazepin-2-one (12).** Yield 78%. Mp 110 °C. δ<sub>H</sub> (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.37–7.30 (3H, m, ArH), 7.29 (1H, td, *J* 9.1 and 3.0 Hz, ArH), 7.10 (1H, td, *J* 7.1 and 3.0 Hz, ArH), 6.99 (1H, s, ArH), 6.97–6.95 (1H, m, ArH), 5.05 (1H, d, *J* 14.2 Hz, CH<sub>2</sub>Fc), 4.78 (1H, d, *J* 10.5 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.61 (1H, d, *J* 14.1 Hz, CH<sub>2</sub>Fc), 4.07–3.96 (3H, m, Cp), 4.05 (5H, s, Cp'), 3.98 (2H, m, Cp), 3.67 (1H, d, *J* 10.5 Hz, CH<sub>2</sub>); δ<sub>C</sub> (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 168.1, 165.8, 140.1, 132.2, 1322, 131.5, 131.1, 130.0, 128.4, 124.3, 124.1, 116.4, 116.1, 69.7, 69.1, 68.7, 68.1, 57.0, 46.6. rt<sub>LCMS</sub> 3.51 MS 486.9. Found: C, 63.99; H, 4.13; N, 5.65%. C<sub>26</sub>H<sub>20</sub>ClFFeN<sub>2</sub>O requires C, 64.16; H, 4.14; N, 5.76%.

**1,3-Dihydro-1-ferrocenylmethyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one (13).** Yield 84%. Mp 215 °C. δ<sub>H</sub> (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.49 (2H, m, ArH), 7.42–7.31 (5H, m, ArH), 7.28 (2H, m, ArH), 5.20 (1H, d, *J* 15.0 Hz, CH<sub>2</sub>Fc), 4.70 (1H, d, *J* 10.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.53 (1H, d, *J* 15.0 Hz, CH<sub>2</sub>Fc), 4.16 (5H, s, Cp'), 3.90 (4H, m, Cp), 3.67 (1H, d, *J* 10.2 Hz, CH<sub>2</sub>); δ<sub>C</sub> (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 172.2, 171.2, 139.4, 138.8, 131.7, 131.3, 130.3, 129.7, 128.7, 127.2, 123.3, 121.2, 69.7, 69.1, 68.7, 68.7, 68.1, 57.0, 55.7. rt<sub>LCMS</sub> 3.31 MS 434.9. Found: C, 71.12; H, 5.23; N, 6.33%. C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>FeN<sub>2</sub>O requires C, 71.40; H, 5.11; N, 6.45%.

## References

- D. A. Horton, G. T. Bourne and M. L. Smythe, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 893–930.
- (a) R. G. Sherrill, J. M. Berman, L. Birkemo, D. K. Croom, M. Dezube, G. N. Ervin, M. K. Grizzle, M. K. James, M. F. Johnson, K. L. Queen, T. J. Rimele, F. Vanmiddlesworth and E. E. Sugg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **11**, 1145–1148; (b) M. G. Bock, R. M. DiPardo, B. E. Evans, K. E. Rittle, W. L. Whitter, V. M. Garsky, K. F. Gilbert, J. L. Leighton, K. L. Carson, E. C. Mellin, D. F. Veber, R. S. L. Chang, M. J. Lotti, S. B. Freedman, A. J. Smith, S. Patel, P. S. Anderson and R. M. Freidinger, *J. Med. Chem.*, 1993, **36**, 4276–4292.
- (a) M. Anzini, C. Braile, S. Valenti, A. Cappelli, S. Vomero, L. Marinelli, V. Limongelli, E. Novellino, L. Betti, G. Giannaccini, A. Lucacchini, C. Ghelardini, M. Norcini, F. Makovec, G. Giorgi and R. Ian Fryer, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 4730–4743; (b) E. Sigel, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2002, **2**, 833–839.
- I. Churcher, K. Ashton, J. W. Butcher, E. E. Clarke, T. Harrison, H. D. Lewis, A. P. Owens, M. R. Teall, S. Williams and J. D. Wrigley, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 179–183.
- (a) J. T. Hunt, C. Z. Ding, R. Batorsky, M. Bednarz, R. Bhide, Y. Cho, S. Chong, S. Chao, J. Gullo-Brown, P. Guo, S. H. Kim, F. Y. Lee, K. Leftheris, A. Miller, T. Mitt, M. Patel, B. A. Penhallow, C. Ricca, W. C. Rose, R. Schmidt, W. A. Slusarchyk, G. Vite and V. Manne, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 3587–3595; (b) G. L. James, J. L. Goldstein, M. S. Brown, T. E. Rawson, T. C. Somers, R. S. McDowell, C. W. Crowley, B. K. Lucas, A. D. Levinson and J. C. Marsters, *Science*, 1993, **260**, 1937–1942.
- J. Doulat, W.-Q. Liu, N. Gresh and C. Garbay, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, **17**, 2527–2530.
- (a) R. Ettari, E. Nizi, M. E. Di Francesco, N. Micale, S. Grasso, M. Zappalà, R. Vicik and T. Schirmeister, *ChemMedChem*, 2008, **3**, 1030–1033; (b) N. Micale, A. P. Kozikowski, R. Ettari, S. Grasso, M. Zappalà, J. J. Jeong, A. Kumar, M. Hanspal and A. H. Chishti, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 3064–3067.
- F. Dzierszynski, A. Coppin, M. Mortuaire, E. Dewailly, C. Slomianny, J. C. Ameisen, F. DeBels and S. Tomavo, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, **46**, 3197–3207.
- (a) G. Kokwaro, G. Edwards, P. Roberts, S. Ward, P. Winstanley and W. Watkins, *Arch. Med. Res.*, 1997, **28**, 425–427; (b) M. L. Ikumi, S. N. Muchohi, E. O. Ohuma, G. O. Kokwaro and C. R. J. C. Newton, 2008, **82**, 215–218; (c) A. Mpimbaza, S. G. Staedke, G. Ndeezi, J. Byarugaba and P. J. Rosenthal, *Malar. J.*, 2009, **8**, 145.
- (a) N. Chavain and C. Biot, *Curr. Med. Chem.*, 2010, **17**, 2729–2745; (b) C. G. Hartinger and P. J. Dyson, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 391–401; (c) G. Gasser, I. Ott and N. Metzler-Nolte, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 3–25.
- (a) C. Biot, D. Taramelli, I. Forfar-Bares, L. A. Maciejewski, M. Boyce, G. Nowogrocki, J. S. Brocard, N. Basilio, P. Olliaro and T. J. Egan, *Mol. Pharm.*, 2005, **2**, 185–193; (b) W. Daher, L. Pelinski, S. Klieber, F. Sadoun, V. Meunier, M. Bourrie, C. Biot, F. Guillou, G. Fabre, J. Brocard, L. Fraisse, J.-P. Maffrand, J. Khalife and D. Dive, *Drug Metab. Dispos.*, 2006, **34**, 667–682.
- (a) B. A. Bunin, M. J. Plunkett and J. A. Ellman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994, **91**, 4708–4712; (b) B. R. Hart, D. J. Rush and K. J. Shea, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 460–465; (c) K. Matsushita, C. Okamoto, M. Yoshimoto, K. Harada, M. Kubo, Y. Fukuyama and H. Hioki, *J. Comb. Chem.*, 2010, **12**, 311–314.
- M. G. Bock, R. M. DiPardo, B. E. Evans, K. E. Rittle, D. F. Veber, R. M. Freidinger, J. Hirshfield and J. P. Springer, *J. Org. Chem.*, 1987, **52**, 3232–3239.
- J. Safaei-Ghomi and A. Hatami, *Synth. Commun.*, 2008, **38**, 297–302.
- (a) A. Baramee, A. Coppin, M. Mortuaire, L. Pelinski, S. Tomavo and J. Brocard, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 1294–1302; (b) C. Biot, W. Daher, C. M. Ndiaye, P. Melnyk, B. Pradines, N. Chavain, A. Pellet, L. Fraisse, L. Pelinski, C. Jarry, J. Brocard, J. Khalife, I. Forfar-Bares and D. Dive, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 4707–4714.
- (a) B. Narayana, K. K. Vijaya Ray, B. V. Ashalatha, N. Suchetha and N. Kumari, *Eur. J. Med. Chem.*, 2006, **41**, 417–422; (b) P. Cheng, Q. Zhang, Y.-B. Ma, Z.-Y. Jiang, X.-M. Zhang, F.-X. Zhang and J.-J. Chen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 3787–3789; (c) J. Spencer, R. P. Rathnam, A. L. Harvey, C. J. Clements, R. L. Clark, M. P. Barrett, P. E. Wong, L. Male, S. J. Coles and S. P. Mackay, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 1802–1815.



# **CONCLUSION GENERALE**



## Conclusion générale

---

Le paludisme demeure jusqu'à présent, un problème de santé publique majeur dans le monde. En effet, plus de la moitié de la population mondiale est exposée au risque de contracter la maladie. De même, la toxoplasmose est une maladie parasitaire due à un protozoaire du genre *Toxoplasma gondii*. La toxoplasmose constitue une maladie majeure opportuniste pour les sujets immunodéprimés. Elle est également très dangereuse pour les femmes enceintes, plus précisément pour l'enfant qu'elle porte.

Suite à l'augmentation des résistances aux antiparasitaires utilisés face à *Plasmodium* et *Toxoplasma*, les chercheurs travaillent pour tenter de trouver des molécules plus efficaces et accessibles à tous. C'est dans cette perspective que les travaux de la thèse ont reposé sur la conception et la synthèse de nouvelles molécules ferrocéniques ainsi que sur leurs activités antipaludique, antitoxoplasmique et antituberculeuse.

Dans une première partie, nous avons présenté la synthèse de nouveaux dérivés ferrocéniques de l'atovaquone. Cette série de molécules présente un squelette 2-hydroxynaphtoquinone et une chaîne ferrocénylalkylamino en position 3. L'objectif de la synthèse de cette série était de se rapprocher de la structure chimique de l'atovaquone afin d'améliorer son efficacité antiplasmodiale et antitoxoplasmique. Nous avons étudié leurs activités antiplasmodiale, anti-toxoplasmique et cytotoxique sur un clone de *P. falciparum* chloroquino-résistant (W2) et sur 3 isolats cliniques infectés par *P. falciparum*, un clone de *T. gondii*, Pru- $\beta$ -Gal co-culture macrophages J774 et deux lignées cellulaires, J774 A.1 et HepG2. Cette première série de molécules agissent toutes à de fortes concentrations inhibitrices (de l'ordre du micromolaire) sur le clone CQ-résistant W2. Cependant, de meilleurs résultats ont été observés pour les composés possédant un groupement cyclohexyle sur des souches cliniques. Ces deux molécules présentent une structure plus proche de l'Atovaquone. Pour l'activité anti-toxoplasmique, nous notons une perte d'activité de nos molécules en comparaison de celles obtenues précédemment au laboratoire. Une étude plus approfondie sur la géométrie spatiale des aminohydroxynaphtoquinones ferrocéniques est nécessaire pour comprendre le rôle exact joué par la partie alkylaminoferrocénique. Il serait beaucoup plus intéressant d'arriver à mimer la structure exacte de l'atovaquone en remplaçant uniquement le *p*-chlorophényle par un ferrocène. Cependant, malgré tous les efforts menés, aucun schéma de synthèse n'a permis d'accéder à ce composé.

La seconde étude nous a permis d'accéder à treize hydrazones quinoléiques et acridiniques substituées par une fonction amine. Ainsi, en combinant les squelettes hydrazines quinoléiques et acridiniques et le ferrocène carboxaldéhyde substitué par une fonction amine, nous avons synthétisé des hydrazones ferrocéniques acridiniques et quinoléiques. Une variation des groupements aminés a été apportée sur le squelette ferrocénique. L'activité antiplasmodiale de ces dernières a été évaluée sur des clones de référence F32, FcB1 et K1 et également sur des isolats cliniques infectés par *P. falciparum*. D'une manière générale, les hydrazones quinoléiques ferrocéniques sont plus actives que les hydrazones ferrocéniques acridiniques. Parmi ces 13 molécules, quatre d'entre elles présentent de bonnes activités antipaludiques avec des  $CI_{50}$  de l'ordre du nanomolaire. Il serait important d'approfondir leur étude. En particulier, il serait intéressant d'introduire des substituants sur le cycle quinoléique. Nous avons également réalisé des tests d'activité des hydrazones ferrocéniques sur une

## Conclusion générale

---

souche de tuberculose (*M. tuberculosis*). Cependant, les résultats biologiques ont montré une activité limitée par rapport aux molécules de référence telles que l'éthambutol et l'isoniazide.

Dans le chapitre 4, nous avons présenté une nouvelle série de 4-aminoquinoléines dont l'originalité repose sur la présence d'un hétérocycle azoté saturé et d'un ferrocène. Une chaîne carbonée linéaire de longueur variable a été également insérée entre le cycle quinoléique et l'hétérocycle. Les activités de ces molécules ont été également étudiées sur des isolats cliniques gabonais infectés par *P. falciparum* et sur des souches de laboratoire de *P. falciparum* F32, FcB1 et K1. L'effet cytotoxique de ces AQFcs a aussi été analysé sur des cellules épithéliales de rein de singe Véro. Certaines quinoléines ferrocéniques ont conduit à des activités antipaludiques élevées ( $\approx 10$  nM) à la fois sur les isolats cliniques que sur les souches de *P. falciparum*. Les tests de sensibilité antiplasmodiale nous ont permis de confirmer également l'hypothèse selon laquelle, la longueur de la chaîne influençait significativement l'activité inhibitrice des 4-aminoquinoléines. Ainsi, il est non seulement important que la séparation inter-azote soit présente, mais aussi et surtout que cette séparation se fasse par une chaîne à 2-3 atomes de carbones. La présence d'un méthyle sur l'azote porté par le ferrocène ne perturbe pas l'activité antipaludique. L'étude cytotoxique de ces molécules sur les cellules Véro a montré l'effet toxique de certains composés actifs sur *P. falciparum*. Le calcul des indices de sélectivité permet de souligner que les effets inhibiteurs de ces molécules seraient certainement dus à leurs toxicités. Cependant certaines aminoquinoléines utilisées à des doses inférieures à 500 nM ne présentent aucun danger pour la cellule car elles ne sont pas cytotoxiques. Pour la série des aminoquinoléines, il serait particulièrement intéressant de poursuivre leurs études en faisant des analyses plus poussées (logD, modélisation moléculaire, interaction avec la  $\beta$ -hématine, test sur un modèle animal, etc...).

Le chapitre 5 présente la synthèse de nouvelles benzodiazépines ferrocéniques. Tout en conservant le motif benzodiazépine du Flurazepam, nous avons modifié la partie aminoéthyle par l'introduction du motif ferrocénique. Une première partie de cette étude s'est limitée à l'optimisation de la synthèse du squelette benzodiazépine. C'est ainsi que l'utilisation des irradiations micro-ondes a permis de diminuer le temps global de réaction et d'augmenter le rendement de la réaction. Comme pour les molécules précédentes, l'activité antiplasmodiale de ces benzodiazépines ferrocéniques a été étudiée. Malheureusement, les trois benzodiazépines ferrocéniques ne présentent aucune activité antiplasmodiale. Cependant, elles présentent l'avantage de ne pas être toxiques et donc elles pourraient être exploitées dans le traitement d'autres maladies. Les perspectives de synthèse pour améliorer l'activité antiplasmodiale de ces benzodiazépines seraient de chercher à rester le plus proche de la structure de la flurazepam. En particulier, il serait intéressant d'introduire un groupement amino sur le ferrocène ou de modifier le groupement phényle par l'introduction du ferrocène.

# **PARTIE EXPERIMENTALE**



### A. CHIMIE

Les réactions étaient suivies par chromatographie sur couche mince de gel de silice Macherey-Nagel Polygram Sil G/UV254. Les produits étaient détectés sous lampe UV à 254, ensuite purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (Merck Kieselgel 60).

Les spectres RMH  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ont été enregistrés à température ambiante sur un spectromètre Bruker AC 300 dont le TMS (tétraméthylsilane) était utilisé comme référence interne. Les déplacements chimiques  $\delta$  sont donnés en partie par million (ppm) par rapport au TMS ( $\delta = 0,00$ ). Les analyses  $^1\text{H}$  étaient obtenues à 300 MHz et  $^{13}\text{C}$  à 75,5 MHz. Le chloroforme, le méthanol et le DMSO étaient utilisés comme solvants deutérés suivant la solubilité des produits. Les abréviations s, d, t, q, dd et m se référant à des signaux sous forme de singulet, doublet, triplet, quadruplet, doublet dédoublé et multiplet ont été utilisées pour les spectres  $^1\text{H}$ . Les constantes de couplage sont données en Hertz. Pour les spectres  $^{13}\text{C}$ , les abréviations utilisées sont  $\text{C}^{\text{iv}}$ , CH, CH<sub>2</sub>, et CH<sub>3</sub> pour désigner les carbones quaternaires, tertiaires, secondaires et primaires. Cp correspond au cycle cyclopentadiényle du ferrocène. La numérotation des protons figurant sur les molécules sert à faciliter l'analyse des spectres RMN et ne correspond pas à la nomenclature officielle.

Le micro onde utilisé est un CEM Discover, puissance de micro onde focalisées de 0 à 300 W.

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre de masse Waters Micromass Quartro II triple quadrupole LC équipé d'une ionisation electrospray (ESI) et de sources d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).

Les analyses élémentaires ont été réalisées sur un analyseur varioMICRO au sein du laboratoire.

## I. DERIVES FERROCENIQUES D'ATOVAQUONE

### I.1. Synthèse des amines ferrocéniques 2 - 5

#### Mode opératoire général

Dans un ballon de 100 mL, 1,3 équivalent d'alkylamine (0,66 mmol) et 1 équivalent de ferrocène carbaldéhyde (0,5 mmol) sont solubilisés dans 20 mL de tertibutylméthyléther en présence de 4 g de tamis moléculaire à 4 Å. Le mélange est placé sous agitation magnétique à température ambiante pendant 4 h. 3 Mmol de borohydrure de sodium et 10 mL de méthanol sont additionnés au mélange. Après 15 minutes d'agitation, le mélange réactionnel est filtré. Un mélange de 10 mL d'eau et de 20 mL d'éther éthylique est ajouté au filtrat. La phase étherée est alors lavée par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1 N (3 × 20 mL). La phase aqueuse est neutralisée du KOH et extraite par du dichlorométhane (3 × 20 mL). La phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée sous pression réduite.

#### *N*-[2-(4-chlorophényl)éthyl]ferrocénylméthylamine 2

	Poudre jaune (R. = 99%) M = 353,674 g/mol P.F = 148°C
RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) : 2.3 (s, 1H, NH), 2.67 (t, <i>J</i> 1.37, 2H, H <sub>2</sub> ), 2.72 (t, <i>J</i> 1.37, 2H, H <sub>1</sub> ), 3.8 (s, 2H, H <sub>1''</sub> ), 4.1 (s, 5H, Cp), 4.15 (s, 2H, Cp), 4.19 (s, 2H, Cp), 7.3 (d, <i>J</i> 7.2 Hz, 2H, H <sub>2'</sub> et H <sub>6'</sub> ), 7.5 (d, <i>J</i> 7.2, 2H, H <sub>3'</sub> et H <sub>5'</sub> ), RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) : 36.2 (1C, C <sub>2</sub> ), 48.2 (1C, C <sub>1</sub> ), 49 (1C, C <sub>1''</sub> ), 69.23 (2C, Cp), 70.01 (5C, Cp), 74.73 (2C, Cp), 80.64 (1C, Cp-C <sub>1''</sub> ), 128.8 (2C, C <sub>3'</sub> ), 129.2 (2C, C <sub>2'</sub> ), 130.8 (1C, C <sub>4'</sub> ), 137.1 (1C, C <sub>1'</sub> ).	

#### *N*-(2-phényléthyl)ferrocénylméthylamine 3<sup>1</sup>

	Poudre jaune (R. = 95%) M = 319.229 g/mol P.F = 66°C
RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) : 2.3 (s, 1H, NH), 2.67 (t, <i>J</i> 1.37, 2H, H <sub>2</sub> ), 2.88 (t, <i>J</i> 1.38, 2H, H <sub>1</sub> ), 3.81 (s, 2H, H <sub>1''</sub> ), 4.1 (s, 5H, Cp), 4.15 (s, 2H, Cp); 4.19 (s, 2H, Cp), 7.08 (m, 1H, H <sub>4'</sub> ), 7.12 (d, <i>J</i> 7.2, 2H, H <sub>2'</sub> ), 7.21 (m, 2H, H <sub>3'</sub> ). RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) : 36.2 (1C, C <sub>2</sub> ), 48.2 (1C, C <sub>1</sub> ), 49 (1C, C <sub>1''</sub> ), 69.23 (2C, Cp), 70.01 (5C, Cp), 74.73 (2C, Cp), 80.64 (1C, Cp-C <sub>1''</sub> ), 128.8 (1C, C <sub>4'</sub> ), 129.2 (2C, C <sub>3'</sub> ), 131.5 (2C, C <sub>2'</sub> ), 136.2 (1C, C <sub>1'</sub> ).	

#### *N*-(4-phénylbutyl)ferrocénylméthylamine 4

	Poudre jaune (R. = 97%) M = 347.283 g/mol P.F = 168°C
RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) : 1.41 (m, 2H, H <sub>3</sub> ), 1.62 (m, 2H, H <sub>2</sub> ), 2.1 (s, 1H, NH), 2.67 (m, 4H, H <sub>1</sub> et H <sub>4</sub> ), 3.81 (s, 2H, H <sub>1''</sub> ), 4.1 (s, 5H, Cp), 4.15 (s, 2H, Cp), 4.19 (s, 2H, Cp), 7.08 (m, 1H, H <sub>4'</sub> ), 7.21 (m, 4H, 2H <sub>2'</sub> , 2H <sub>3'</sub> ). RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) : 28.7 (1C, C <sub>3</sub> ), 30.2 (1C, C <sub>2</sub> ), 35.7 (1C, C <sub>4</sub> ), 49.09 (1C, C <sub>1''</sub> ), 49.5 (1C, C <sub>1</sub> ), 69.23 (2C, Cp), 71.01 (5C, Cp), 75.73 (2C, Cp), 81.02 (1C, Cp-C <sub>1''</sub> ), 126 (1C, C <sub>4'</sub> ), 128.8 (2C, C <sub>3'</sub> ), 129.25 (2C, C <sub>2'</sub> ), 135.2 (1C, C <sub>1'</sub> ).	

<sup>1</sup> Wenzel, M.; Asindraza, P.; Schachschneider, G. *J. of Labelled Compd and Radiopharm.* **1983**, *20*, 1061 – 71.

## Partie expérimentale

### *N*-(4-hydroxycyclohexyl)ferrocénylméthylamine 5<sup>2</sup>

	Poudre jaune orangé (R. = 97%) M = 313.22 g/mol P.F = 130-132°C
RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) : 1.09 (m, 2H, H <sub>3</sub> et H <sub>5</sub> en axial), 1.19 (m, 2H, H <sub>2</sub> et H <sub>6</sub> en axial), 1.61 (m, 2H, H <sub>2</sub> et H <sub>6</sub> en équatorial), 1.78 (m, 2H, H <sub>3</sub> et H <sub>5</sub> en équatorial), 2.05 (s, 1H, NH), 2.09 (m, 1H, H <sub>1</sub> en axial), 3.38 (m, 1H, H <sub>4</sub> en axial), 3.81 (s, 2H, H <sub>1'</sub> ), 4.1 (s, 5H, Cp), 4.15 (s, 2H, Cp), 4.19 (s, 2H, Cp). RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) : 36.6 (2C, C <sub>2</sub> et C <sub>6</sub> ), 35.7 (2C, C <sub>3</sub> et C <sub>5</sub> ), 46.78 (C <sub>1'</sub> ); 56,2 (C <sub>1</sub> ), 72.7 (1C, C <sub>4</sub> ), 69.23 (2C, Cp), 70.01 (5C, Cp), 74.73 (2C, Cp), 80.64 (1C, Cp-C <sub>1'</sub> ).	

## I.2. Synthèse des amines ferrocéniques 10 a et b

### *Oxime de la 4-phénylcyclohexanone 8*

#### Mode opératoire

Dans un ballon de 100 mL, 713 mg (4,1 mmol, 1équivalent) de 4-phénylcyclohexanone (**7**), 1g (25 mmol) de soude et 412 mg (5,8 mmol) de chlorhydrate d'hydroxylamine sont préalablement solubilisés dans un minimum (2 mL) d'eau et mis en solution dans 50 mL éthanol. Le mélange est chauffé à reflux sous agitation magnétique pendant 3 h. Le mélange réactionnel est refroidi lentement jusqu'à température ambiante, puis neutralisé par 100 mL d'eau. La phase aqueuse est extraite trois fois par 100 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, et évaporée sous pression réduite.

	Poudre blanche (R. = 99%) M = 186,26 g/mol P.F = 107°C
RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) : 1.3 (m, 1H, H <sub>3</sub> en axial), 1.7 (m, 1H, H <sub>5</sub> axial), 1.82 (t, <i>J</i> <sub>HaHa</sub> 7.5, <i>J</i> <sub>HaHe</sub> 4.5, 1H, H <sub>6</sub> axial), 1.85 (t, <i>J</i> <sub>HaHa</sub> 7.5, <i>J</i> <sub>HaHa</sub> 4.5, 1H, H <sub>2</sub> en axial), 2.06 (m, 1H, H <sub>3</sub> en équatorial), 2.2 (m, 1H, H <sub>5</sub> en équatorial), 2.48 (m, 1H, H <sub>4</sub> en axial), 2.7 (m, 2H, H <sub>2</sub> et H <sub>6</sub> en équatorial), 2.78 (t, <i>J</i> <sub>HeHa</sub> 4.5, <i>J</i> <sub>HeHe</sub> 3.5, 1H, H <sub>2</sub> en équatorial), 7.11 (d, <i>J</i> 7.2, 1H, H <sub>8</sub> ), 7.15 (m, 2H, H <sub>8</sub> et H <sub>12</sub> ), 7.17 (d, <i>J</i> 7.1, 1H, H <sub>12</sub> ), 7.20 (t, <i>J</i> 7.1, 1H, H <sub>10</sub> ), 7.22 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 1H, H <sub>9</sub> ), 7.23 (m, 2H, H <sub>9</sub> et H <sub>11</sub> ), 7.25 (t, <i>J</i> 7.1, 1H, H <sub>11</sub> ), 9.05 (s, 1H, H <sub>13</sub> ). RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) : 24 (1C, C <sub>3</sub> ), 32.01 (1C, C <sub>5</sub> ), 32.9 (C <sub>2</sub> ), 34.04 (1C, C <sub>6</sub> ), 43.72 (1C, C <sub>4</sub> ), 126.00 (1C, C <sub>10</sub> ), 126.76 (2C, C <sub>12</sub> et C <sub>8</sub> ), 128.53 (2C, C <sub>11</sub> et C <sub>9</sub> ), 145.77 (1C, C <sub>7</sub> ), 159.8 (1C, C <sub>1</sub> ).	

### *4-Phénylcyclohexylamine 9*<sup>3</sup>

#### Mode opératoire

Dans un ballon de 100 mL, 4 équivalents de LiAlH<sub>4</sub> (5,28 mmol) sont placés dans 10 mL de THF sous atmosphère d'azote. 1 équivalent de la 4-phénylcyclohexanone oxime dans 10 mL de THF est ajouté goutte à goutte. Le mélange est chauffé à reflux (90°C) sous agitation magnétique. Après 4 H de réaction, le mélange est refroidi à température ambiante, hydrolysé par 50 mL d'eau et extrait par du dichlorométhane (3 X 30 mL). La phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée sous pression réduite. Le mélange se présente sous deux diastéréoisomères cis et trans non séparables par chromatographie colonne.

	Huile (R. = 100%) M = 175.275 g/mol
RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) : 1.15 (m, 1H, H <sub>2ax</sub> ), 1.22 (m, 1H, H <sub>6ax</sub> ), 1.24 (m, 1H, H <sub>3ax</sub> ), 1.42 (m, 1H, H <sub>5ax</sub> ), 1.47 (m, 1H, H <sub>2eq</sub> ), 1.50 (m, 1H, H <sub>6eq</sub> ), 1.65 (m, 1H, H <sub>3eq</sub> ), 1.81 (m, 1H, H <sub>5eq</sub> ), 1.91 (q, 1H, H <sub>4eq</sub> ), 2.55 (m, 1H, H <sub>1trans</sub> ), 2.77 (m, 1H, H <sub>1cis</sub> ), 3.22 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.1 (1H, H <sub>10</sub> ), 7.24 (m, 4H, H <sub>8</sub> , H <sub>9</sub> , H <sub>11</sub> , H <sub>12</sub> ). RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) : 27.7 (C <sub>2</sub> ), 33.1 (1C, C <sub>3cis</sub> ), 33.3 (1C, C <sub>3trans</sub> ), 36.9 (1C, C <sub>6</sub> ), 43.5 (1C, C <sub>5cis</sub> ), 43,6 (C <sub>5trans</sub> ), 45.1 (1C, C <sub>4</sub> ), 50.4 (1C, C <sub>1</sub> ), 125.89 (1C, C <sub>10</sub> ), 125.98 (1C, C <sub>9</sub> ), 126.80 (1C, C <sub>11</sub> ), 126.89 (1C, C <sub>8</sub> ), 128.3 (1C, C <sub>12</sub> ), 147.1 (C <sub>7</sub> ).	

<sup>2</sup> Baramée, A.; Coppin, A.; Mortuaire, M.; Pelinski, L.; Tomavo, S.; Brocard, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1294 – 1302.

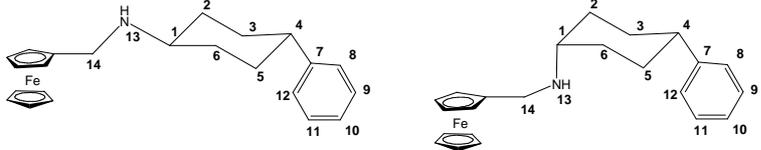
<sup>3</sup> Carenini, G.; Carissimi, M.; D'Ambrosio, R.; Grumelli, E.; Milla, E.; Ravenna, F. *Farmaco*, **1973**, *28*, 265 – 77.

## Partie expérimentale

### *N*-(4-phénylcyclohexyl)ferrocénylméthylamine 10 (a et b)

#### Mode opératoire

Dans un ballon de 100 mL, 1,3 équivalent d'alkylamine (0,66 mmol) et 1 équivalent de ferrocène carbaldéhyde (0,5 mmol) sont solubilisés dans 20 mL de tertibutylméthyléther en présence de 4 g de tamis moléculaire à 4 Å. Le mélange est placé sous agitation magnétique à température ambiante pendant 4 h. 3 mmol de borohydrure de sodium et 10 mL de méthanol sont additionnés au mélange. Après 15 minutes d'agitation, le mélange réactionnel est filtré. Un mélange de 10 mL d'eau et de 20 mL d'éther éthylique est ajouté au filtrat. La phase étherée est alors lavée par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1 N (3 × 20 mL). La phase aqueuse est neutralisée par KOH et extraite par du dichlorométhane (3 × 20 mL). La phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée sous pression réduite. La séparation des deux isomères *cis* et *trans* se fait par chromatographie sur colonne de gel de silice avec graduation d'éluant (100% d'éther éthylique pour le premier et un mélange d'éther de pétrole/triéthylamine (80/20) pour le second).

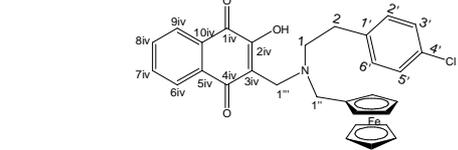
	Brut huile (R. = 99%), Mélange <i>Cis</i> (huile R. 35%), <i>Trans</i> (solide R.65%) M = 373.231 g/mol P.F <i>trans</i> = 95°C
RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , ppm) : 1.25 (s, 4H, H <sub>2</sub> ,H <sub>3</sub> ,H <sub>5</sub> ,H <sub>6</sub> en ax), 1.8 (m, 1H, H <sub>6</sub> eq), 1.9 (m, 1H, H <sub>2</sub> eq), 2.00 (m, 1H, H <sub>5</sub> eq), 2.05 (m, 1H, H <sub>3</sub> eq), 25 (m, 1H, H <sub>1</sub> ax), 2.55 (m, 1H, H <sub>4</sub> ax), 4.03 (s, 1H, H <sub>13</sub> ),, 4.06 (s, 5H, Cp), 4.12 (s, 2H, Cp), 4.13 (s,2H, Cp), 7.1 (m, 1H, H <sub>10</sub> ), 7.12 (m, 2H, H <sub>11</sub> et H <sub>9</sub> ), 7.14 (s ,2H, H <sub>12</sub> et H <sub>8</sub> ), 7.17 (m, 1H, H <sub>9</sub> ), 7.19 (m,1H, H <sub>11</sub> ), 7.22 (d, <i>J</i> 7.25, 1H, H <sub>8</sub> ), 7.24 (d, <i>J</i> 7.25, 1H, H <sub>12</sub> ). RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) : 27.7 (C <sub>2</sub> ), 33.3 (1C, C <sub>3</sub> ), 36.9 (1C, C <sub>6</sub> ), 43,6 (C <sub>5</sub> ), 47.1 (1C, C <sub>4</sub> ), 52.4 (1C, C <sub>14</sub> ), 68.22 (2C, Cp), 71.1 (5C, Cp), 74.73 (2C, Cp), 79.64 (1C, Cp-C <sub>14</sub> ), 125.89(1C, C <sub>10</sub> ), 125.98 (1C, C <sub>9</sub> ), 126.80 (1C, C <sub>11</sub> ), 126.89 (1C, C <sub>8</sub> ), 128.3 (1C, C <sub>12</sub> ), 147.1 (C <sub>7</sub> ).	
RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , ppm) : 1,59-1,63 (m, 4H, H <sub>6</sub> ax , H <sub>2</sub> ax, H <sub>3</sub> ax, H <sub>5</sub> ax), 1,64-1,75 (m, 2H, H <sub>2</sub> eq, H <sub>6</sub> eq), 1,78-1,86 (m, 2H, H <sub>3</sub> eq, H <sub>5</sub> eq), 2,50-2,58 (m, 1H, H <sub>4</sub> ), 2,91 (m, 1H, H <sub>1</sub> ), 3,48 (s, 2H, H <sub>15</sub> ), 4,04 (s, 1H, H <sub>13</sub> ), 4,11 (s, 5H, Cp), 4,08-4,29 (m,4H Cp), 7,14-7,26 (m, 5H, H benzénique). RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , ppm) : 28,3 (2C, C <sub>3</sub> , C <sub>5</sub> ), 30,6 (2C, C <sub>2</sub> , C <sub>6</sub> ), 43,9 (1C, C <sub>4</sub> ), 46,3 (1C, Cp), 51,2 (1C, C <sub>14</sub> ), 67,8 (2C, Cp), 68,4 (5C, Cp), 68,5 (2C, Cp), 87,8 (1C, Cp), 125,9 (1C, C <sub>10</sub> ), 127,0 (2C, C <sub>8</sub> , C <sub>12</sub> ), 128,4 (2C, C <sub>9</sub> , C <sub>11</sub> ), 147,5 (C <sub>7</sub> ).	

### I.3. Condensation des amines ferrocéniques sur la 2-hydroxynaphtoquinone : composés 22 - 27

#### Mode opératoire général

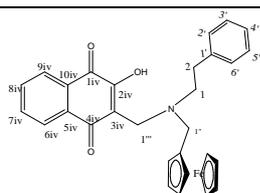
Dans un ballon de 100 mL, 4 mmol de l'amine ferrocénique et 4 mmol de la 2-hydroxynaphtoquinone sont solubilisés dans 10 mL d'éthanol. Le mélange est chauffé à 45°C sous agitation pendant cinq minutes. Puis, deux gouttes soit 36 mg (1,2 mmol) de formaldéhyde en solution aqueuse à 37% sont ajoutées sous agitation vigoureuse. Ce mélange est laissé sous agitation à température ambiante durant quatre heures (sachant qu'au bout d'une heure il y a apparition d'un précipité rouge pourpre). Le mélange est filtré, lavé avec du méthanol et trois fois 20 mL d'éther éthylique. La phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée sous pression réduite.

### 3-[*N*-2-(parachlorophényl)éthyl]-*N*-(ferrocénylméthyl)aminométhyl]-2-hydroxynaphtoquinone 22

	Poudre rouge (R. = 99%) M = 539 g/mol P.F = 110-115°C LC/MS : 540.08 (MH <sup>+</sup> )
RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , ppm) : 2.65 (m, 2H, H <sub>2</sub> ), 2.69 (m, 2H, H <sub>1</sub> ), 3.03 (s, 2H, H <sub>1</sub> ...), 3.62 (s, 2H, H <sub>1</sub> ...), 4.1 (s, 5H, Cp), 4.15 (s, 2H, Cp), 4.19 (s, 2H, Cp), 7.06 (d, <sup>3</sup> <i>J</i> 7.25, 2H, H <sub>2</sub> ' et H <sub>6</sub> '), 7.22 (d, <sup>3</sup> <i>J</i> 7.25, 2H, H <sub>3</sub> ' et H <sub>5</sub> '), 7.73 (m, 2H, H <sub>7iv</sub> et H <sub>8iv</sub> ), 8.11 (m, 2H, H <sub>6iv</sub> et H <sub>9iv</sub> ), 15.08 (s, 1H, OH <sub>2</sub> ...). RMN <sup>13</sup> C : 36.2 (1C, C <sub>2</sub> ), 48.9 (1C, C <sub>1</sub> ...), 51.32 (1C, C <sub>1</sub> ...), 48.2 (1C, C <sub>1</sub> ), 69.23 (2C, Cp), 70.01 (5C, Cp), 74.73 (2C, Cp), 80.64 (1C, Cp-C <sub>1</sub> '), 117.8 (1C, C <sub>3iv</sub> ), 128.8 (2C, C <sub>3</sub> '), 129,2 (2C, C <sub>2</sub> '), 130.4 (2C, C <sub>6iv</sub> et C <sub>9iv</sub> ), 131.5 (1C, C <sub>4</sub> '), 131.9 (2C, C <sub>5iv</sub> et C <sub>10iv</sub> ), 135.7 (2C, C <sub>7iv</sub> et C <sub>8iv</sub> ), 137.8 (1C, C <sub>1</sub> '), 154.00 (1C, C <sub>2iv</sub> ), 178.03 (1C, C <sub>1iv</sub> ), 183.1 (1C, C <sub>4iv</sub> ).	

## Partie expérimentale

### 3-[N-2-phényl)thyl)-N-(ferrocénylméthyl)aminométhyl]-2-hydroxynaphtoquinone 23



Poudre orange (R. = 99%)

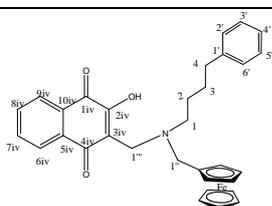
M = 505 g/mol

P.F = 101-110°C

LC/MS : 506.13 (MH<sup>+</sup>)

RMN <sup>1</sup>H (CdCl<sub>3</sub>, ppm) : 2.65 (m, 2H, H<sub>2</sub>), 2.69 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 3.03 (s, 2H, H<sub>1''</sub>), 3.62 (s, 2H, H<sub>1''</sub>), 4.1 (s, 5H, Cp), 4.15 (s, 2H, Cp), 4.19 (s, 2H, Cp), 7.08 (m, 1H, H<sub>4'</sub>), 7.12 (d, <sup>3</sup>J 7,25, 2H, H<sub>2''</sub> et H<sub>6''</sub>), 7.21 (d, <sup>3</sup>J 7,25, 2H, H<sub>3''</sub> et H<sub>5''</sub>), 7.73 (m, 2H, H<sub>7iv</sub> et H<sub>8iv</sub>), 8 (m, 2H, H<sub>6iv</sub> et H<sub>9iv</sub>), 15 (s, 1H, OH<sub>2''</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 36.2 (1C, C<sub>2</sub>), 48.2 (1C, C<sub>1</sub>), 49 (1C, C<sub>1''</sub>), 69.23 (2C, Cp), 70.01 (5C, Cp), 74.73 (2C, Cp), 80.64 (1C, Cp-C<sub>1''</sub>), 117.8 (1C, C<sub>3iv</sub>), 128.8 (1C, C<sub>4'</sub>), 129.2 (2C, C<sub>3'</sub>), 130.9 (2C, C<sub>6iv</sub> et C<sub>9iv</sub>), 131.8 (2C, C<sub>2'</sub>), 132.2 (2C, C<sub>5iv</sub> et C<sub>10iv</sub>), 135.7 (2C, C<sub>7iv</sub> et C<sub>8iv</sub>), 136.2 (1C, C<sub>1'</sub>), 154.1 (1C, C<sub>2iv</sub>), 178.03 (1C, C<sub>1iv</sub>), 183.1 (1C, C<sub>4iv</sub>).

### 3-[N-2-phényl)thyl)-N-(ferrocénylméthyl)aminométhyl]-2-hydroxynaphtoquinone 24



Poudre jaune (R. = 97%)

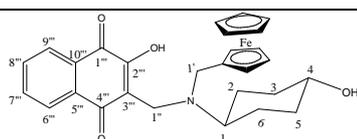
M = 533 g/mol

P.F = 75°C

LC/MS : 534.13 (MH<sup>+</sup>)

RMN <sup>1</sup>H (CdCl<sub>3</sub>, ppm) : 1.39 (m, 2H, H<sub>2</sub>), 1.62 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 2.36 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 2.55 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 3.03 (s, 2H, H<sub>1''</sub>), 3.62 (s, 2H, H<sub>1''</sub>), 4.1 (s, 5H, Cp), 4.15 (s, 2H, Cp), 4.19 (s, 2H, Cp), 7.08 (m, 1H, H<sub>4'</sub>), 7.21 (m, 4H benzénique H<sub>2'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>5'</sub>, et H<sub>6'</sub>), 7.73 (m, 2H, H<sub>7iv</sub> et H<sub>8iv</sub>), 8 (m, 2H, H<sub>6iv</sub> et H<sub>9iv</sub>), 15 (s, 1H, OH<sub>2''</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 28.7 (1C, C<sub>3</sub>), 30.2 (1C, C<sub>2</sub>), 35.7 (1C, C<sub>4</sub>), 49.09 (1C, C<sub>1''</sub>), 49.5 (1C, C<sub>1</sub>), 69.23 (2C, Cp), 71.01 (5C, Cp), 75.73 (2C, Cp), 81.02 (1C, Cp-C<sub>1''</sub>), 117.8 (1C, C<sub>3iv</sub>), 126 (1C, C<sub>4'</sub>), 129.8 (2C, C<sub>3'</sub>), 129.25 (2C, C<sub>2'</sub>), 130.9 (2C, C<sub>6iv</sub> et C<sub>9iv</sub>), 131.8 (2C, C<sub>2'</sub>), 133.08 (2C, C<sub>5iv</sub> et C<sub>10iv</sub>), 135.2 (1C, C<sub>1'</sub>), 135.7 (2C, C<sub>7iv</sub> et C<sub>8iv</sub>), 154.1 (1C, C<sub>2iv</sub>), 178.03 (1C, C<sub>1iv</sub>), 183.1 (1C, C<sub>4iv</sub>).

### 3-[N-2-phényl)thyl)-N-(ferrocénylméthyl)aminométhyl]-2-hydroxynaphtoquinone 25



Poudre jaune orangée (R. = 96%)

M = 499 g/mol

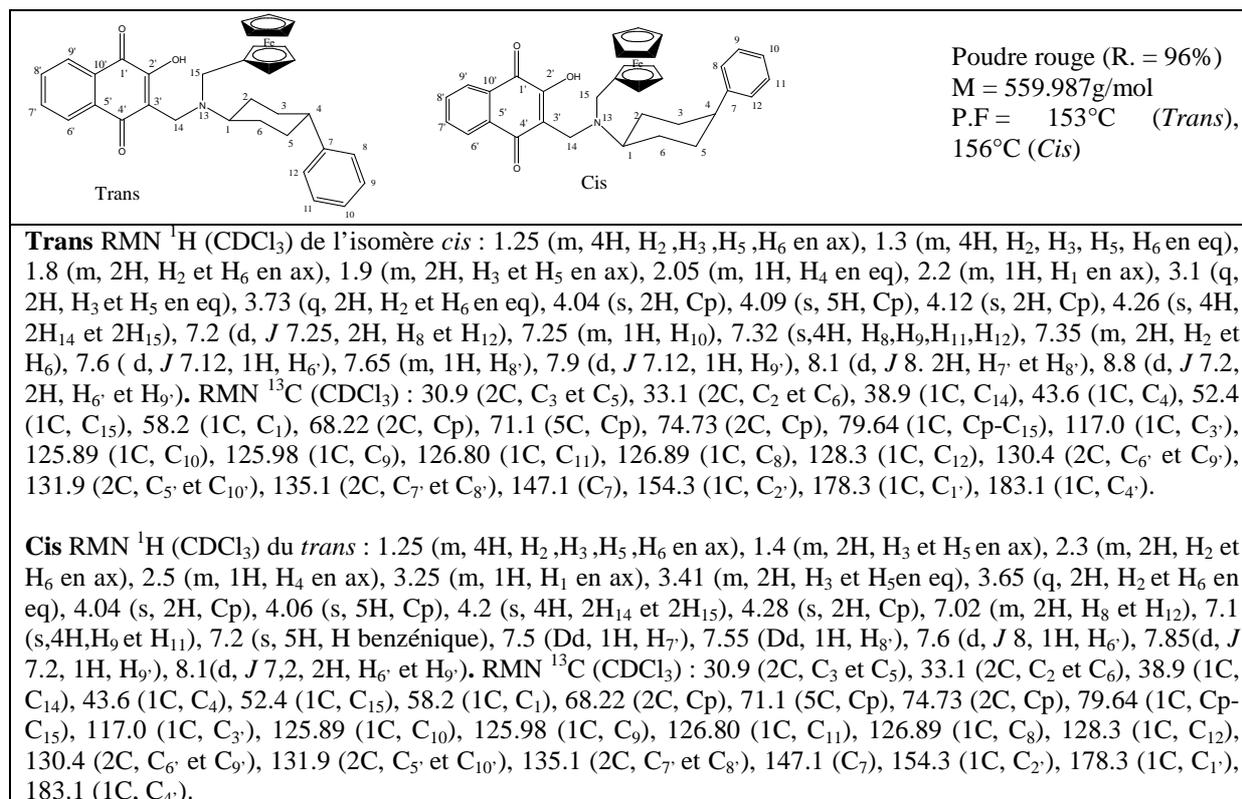
P.F = 139°C

LC/MS : 500.15 (MH<sup>+</sup>)

RMN <sup>1</sup>H (CdCl<sub>3</sub>, ppm) : 1.09 (m, 2H, H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub> en axial), 1.19 (m, 2H, H<sub>2</sub> et H<sub>6</sub> en axial), 1.61 (m, 2H, H<sub>2</sub> et H<sub>6</sub> en équatorial), 1.78 (m, 2H, H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub> en équatorial), 2 (s, 1H, OH<sub>4</sub> en équatorial), 2.09 (m, 1H, H<sub>1</sub> en axial), 3.03 (s, 2H, H<sub>1''</sub>), 3.38 (m, 1H, H<sub>4</sub> en axial), 3.62 (s, 2H, H<sub>1'</sub>), 4.1 (s, 5H, Cp non substitute), 4.15 (s, 2H, Cp substitute), 4.19 (s, 2H, Cp substitute), 7.73 (m, 2H, H<sub>7'''</sub> et H<sub>8'''</sub>), 8.00 (m, 2H, H<sub>6'''</sub> et H<sub>9'''</sub>), 15 (s, 1H, OH<sub>2'''</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 34.6 (2C, C<sub>2</sub> et C<sub>6</sub>), 36.7 (2C, C<sub>3</sub> et C<sub>5</sub>), 43.78 (1C, C<sub>1''</sub>), 52,8 (1C, C<sub>1'</sub>), 62.4 (1C, C<sub>1</sub>), 69.23 (2C, Cp), 70.01 (5C, Cp), 72.7 (1C, C<sub>4</sub>), 74.73 (2C, Cp), 80.64 (1C, Cp-C<sub>1'</sub>), 117.8 (1C, C<sub>3iii</sub>), 130.9 (2C, C<sub>6iii</sub> et C<sub>9iii</sub>), 133.08 (2C, C<sub>5iii</sub> et C<sub>10iii</sub>), 135.7 (2C, C<sub>7iii</sub> et C<sub>8iii</sub>), 154.1 (1C, C<sub>2iii</sub>), 178.03 (1C, C<sub>1iii</sub>), 183.1 (1C, C<sub>4iii</sub>).

## Partie expérimentale

### 3-[N-(4-phénylcyclohexyl)-N-(ferrocénylméthyl)aminométhyl]-2-hydroxynaphtoquinone 26 et 27



## II. DERIVES D'HYDRAZONES FERROCENIQUES

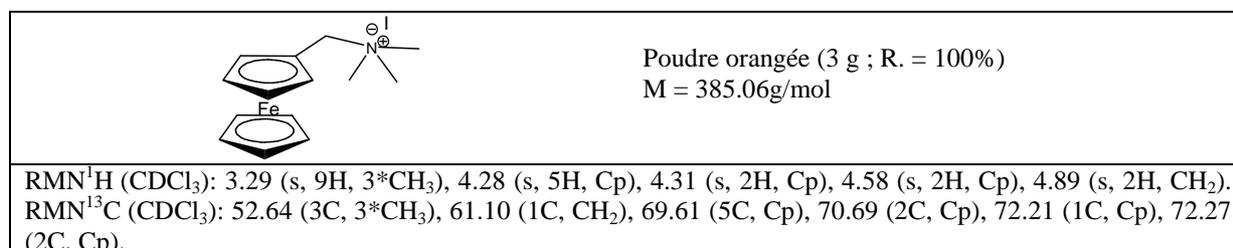
### II.1. Synthèse des aldéhydes ferrocéniques

#### II.1.1. Synthèse des précurseurs ferrocéniques

##### Iodure de 1-(ferrocénylméthyl)-N,N,N-triméthylammonium 12

###### Mode opératoire

9 mmol de 1-(ferrocénylméthyl)-N,N-diméthylamine sont solubilisés dans 80 ml d'acétone. 4,6ml d'iodométhane sont ajoutés et le tout est laissé sous agitation magnétique à température ambiante. Après une heure de réaction, le solvant est évaporé sous vite pour donner 3 grammes de poudre orangée.



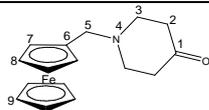
##### N-ferrocénylméthylpipéridone 67

###### Mode opératoire

5 Equivalents de pipéridone hydrochloride (46mmol) sont portés à ébullition de l'acétonitrile pendant 5 mn en présence de bicarbonate de potassium. Puis 1 équivalent d'iodure de 1-(ferrocénylméthyl)- N,N,N-

## Partie expérimentale

triméthylammonium **12** (8.8mmol) sont ajoutés au mélange. La mixture est laissée sous agitation magnétique à reflux durant 20h. Le solvant est évaporé pour donner une poudre jaune. Le produit est solubilisé dans 30 ml de dichlorométhane et purifié par lavage acide avec 3 X 30 ml HCL 1N. Les phases aqueuses sont rassemblées et neutralisées à 0°C par du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Les phases organiques sont extraites par 4x20 ml de dichlorométhane. Après séchage sous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, le solvant est évaporé pour donner une huile jaune qui se solidifie sous vide.



Solide jaune orangé (2.35 g ; R. = 99%)

M = 297 g/mol

LC/MS : 298.16 (MH<sup>+</sup>)

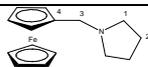
RMN<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.41 (t *J* 6.03, 4H, H<sub>3</sub>), 2.70 (t *J* 6.00, 4H, H<sub>2</sub>), 3.50 (s, 2H, H<sub>5</sub>), 4.12 (s, 7H, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>), 4.18 (s, 2H, H<sub>7</sub>). RMN<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 41.12 (2C, C<sub>3</sub>), 52.36 (2C, C<sub>2</sub>), 57.43 (1C, C<sub>5</sub>), 68.32 (2C, C<sub>8</sub>), 68.64 (5C, C<sub>9</sub>), 70.19 (2C, C<sub>7</sub>), 82.29 (1C, C<sub>6</sub>), 209.17 (1C, C<sub>1</sub>).

### II.1.2. Synthèse des amines ferrocéniques **32 - 34**

#### Mode opératoire général

Dans un ballon de 250 mL, 0,689 g (1,77 mmol) d'iodure de *N,N,N*-triméthyl(ferrocénylméthyl)ammonium est solubilisé dans 29 mL d'acétonitrile, puis 32 mmol d'amine correspondant (pipéridine, pyrrolidine et morpholine) et 24,60 mmol de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y sont ajoutés. Le mélange est ensuite chauffé à 70°C sous agitation magnétique pendant une nuit. L'acétonitrile est alors évaporé sous vide. Après hydrolyse avec 50 mL d'eau, le mélange est extrait avec du dichlorométhane (3x20 mL). La phase organique est récupérée puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée sous vide. Le mélange de produits est ensuite purifié par extraction de la phase organique avec de l'acide chlorhydrique 1N (3 x 50 mL). La phase aqueuse récupérée est neutralisée avec une base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, puis extraite au dichlorométhane (3 x 50 mL) et lavée à l'eau. La phase organique obtenue est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puis condensée sous vide.<sup>4</sup>

#### *N*-(ferrocénylméthyl)pyrrolidine **32**

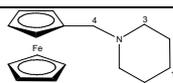


Poudre rouge (R. = 98%)

M = 269.169 g/mol

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 1.72 (t, *J* 3.6, 4H, H<sub>2</sub>), 2.45 (t, *J* 3, 4H, H<sub>1</sub>), 3.42 (s, 2H, H<sub>3</sub>), 4.08 (t, *J* 1.8, 2H, Cp), 4.10 (s, 5H, Cp), 4.18 (t, *J* 1.8, 2H, Cp). RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 23.30 (2C, C<sub>2</sub>), 53.83 (2C, C<sub>1</sub>), 55.52 (1C, C<sub>3</sub>), 67.91 (2C, Cp), 68.45 (5C, Cp), 69.83 (2C, Cp), 84.31 (1C, C<sub>4</sub>).

#### *N*-(ferrocénylméthyl)pipéridine **33**

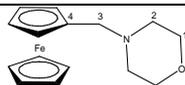


Cristaux jaunes (R. = 57%)

M = 283.176 g/mol

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 1.37 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 1.54 (m, 4H, H<sub>2</sub>), 2.34 (m, 4H, H<sub>3</sub>), 3.36 (s, 2H, H<sub>4</sub>), 4.10 (t, *J* 1.8, 2H, Cp), 4.11 (s, 5H, Cp), (4.18 (t, *J* 1.9, 2H, Cp). RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 24.39 (1C, C<sub>1</sub>), 25.83 (2C, C<sub>2</sub>), 53.96 (2C, C<sub>3</sub>), 57.58 (1C, C<sub>4</sub>), 69.23 (2C, Cp), 70.01 (5C, Cp), 74.73 (2C, Cp), 80.64 (1C, Cp).

#### *N*-(ferrocénylméthyl)morpholine **34**



Cristaux jaunes (R. = 68%)

M = 285.168 g/mol

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 2.40 (m, H<sub>2</sub>, 4H), 3.35 (s, 2H, H<sub>3</sub>), 3.66 (t, *J* 4.5, H<sub>1</sub>, 4H), 4.11 (s, 5H, Cp), 4.17 (m, 4H, Cp). RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 53.16 (2C, C<sub>2</sub>), 58.83 (1C, C<sub>3</sub>), 66.86 (2C, C<sub>1</sub>), 68.15 (2C, Cp), 68.54 (5C, Cp), 70.29 (2C, Cp), 82.29 (1C, C<sub>4</sub> Cp).

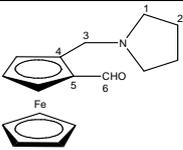
<sup>4</sup> Bhat, A. R.; Bhat, A. I.; Athar, F.; Azam, A. *Helv. Chim. Acta* **2009**, *92*, 1644 – 1656.

### II.1.3. Réaction d'ortholithiation des amines ferrocéniques

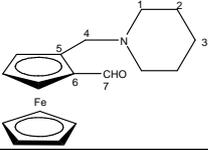
#### Mode opératoire général

Sous atmosphère d'azote, à une solution d'amine tertiaire ferrocénique correspondant (*N,N*-diméthylaminométhylferrocène, *N*-ferrocénylméthyl(pipéridine, pyrroline morpholine) (0,486 g, 2 mmol) dans 20 mL d'éther diéthylique anhydre est ajouté 1,8 mL (3 mmol) de *t*-butyllithium (1,7 M). La métallation est accomplie après 1 heure à température ambiante. 360  $\mu$ l (4,7 mmol) de *N,N*-diméthylformylamide (DMF) sont alors ajoutés. Le mélange est abandonné pendant 15 minutes à température ambiante, puis hydrolysé et extrait avec 2x20 mL d'éther. Les phases organiques sont séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporées pour donner une huile brune qui est purifiée sur colonne chromatographique de gel de silice (éluant = éther diéthylique 7/éther de pétrole 2/triéthylamine<sup>1</sup>).

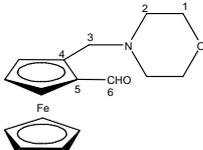
#### 2-(*N*-pyrrolidinométhyl)ferrocénecarbaldéhyde 37

	<p>Huile rouge (R. =99%) M = 297.179 g/mol</p>
<p>RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 1.05 (t, <i>J</i> 7.3, 4H, H2), 1.72 (s, 2H, H3), 2.51 (t, <i>J</i> 7.2, 4H, H1), 3.52 (d, <i>J</i> 13.5, 1H, H3), 3.92 (d, <i>J</i> 13.5, 1H, H3), 4.22 (5H, Cp), 4.54 (s, 1H, Cp), 4.64 (s, 1H, Cp), 4.76 (s, 1H, Cp), 10.11 (s, 1H, CHO). RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 23.33 (2C, C2), 46.26 (1C, C3), 53.70 (2C, C1), 70.05 (5C, Cp), 70.17 (1C, Cp), 71.91 (2C, Cp), 75.63 (1C, C4), 87.57 (1C, C5), 193.38 (1C, C6).</p>	

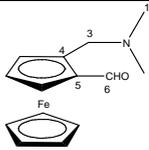
#### 2-(*N*-pipéridinométhyl)ferrocénecarbaldéhyde 38

	<p>Huile rouge (R. =94.6%) M = 311.206 g/mol</p>
<p>RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 1.37 (m, 2H, H3), 1.52 (m, 4H, H2), 2.35 (m, 4H, H1), 3.45 (d, <i>J</i> 13.2, 1H, H4), 3.85 (d, <i>J</i> 13.2, 1H, H4), 4.22 (s, 5H, Cp), 4.56 (m, 1H, Cp), 4.62 (m, 1H, Cp), 4.78 (m, 1H, Cp), 10.11 (s, 1H, H7). RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 24.11 (1C, C3), 25.75 (2C, C2), 53.69 (2C, C1), 56.22 (1C, C4), 69.78 (1C, Cp), 70.12 (5C, Cp), 71.79 (1C, Cp), 77.94 (1C, C5), 86.24 (1C, C6), 193.31 (1C, C7).</p>	

#### 2-(*N*-morpholinométhyl)ferrocénecarbaldéhyde 39

	<p>Huile rouge (R. = 88%) M = 313.178 g/mol</p>
<p>RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 1.04 (t, <i>J</i> 6.5, 4H, H2), 2.39 (t, <i>J</i> 5.2, 4H, H1), 3.36 (d, <i>J</i> 13.5, 1H, H3), 3.88 (d, <i>J</i> 13.3, 1H, H3), 4.20 (s, 5H, Cp), 4.53 (s, 1H, Cp), 4.58 (s, 1H, Cp), 4.76 (s, 1H, Cp), 10.08 (s, 1H, H6). RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 52.87 (2C, C2), 56.06 (1C, C3), 66.81 (2C, C1), 70.22 (5C, Cp), 70.50 (1C, Cp), 71.90 (1C, Cp), 76.00 (1C, Cp), 77.84 (1C, C4), 85.56 (1C, C5), 193.93 (1C, C6).</p>	

#### 2-(*N,N*-diméthylaminométhyl)ferrocénecarbaldéhyde 41

	<p>Huile brune (R. = 82.9%) M = 271.141 g/mol</p>
<p>RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 2.19 (s, 6H, H1), 3.30 (d, <i>J</i> 12.7, 1H, H3), 3.81 (d, <i>J</i> 12.4, 1H, H3), 4.21 (s, 5H, Cp), 4.54 (m, 1H, Cp), 4.59 (m, 1H, Cp), 4.77 (m, 1H, Cp), 10.09 (s, CHO). RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 44.80 (2C, C1), 56.22 (1C,</p>	

## Partie expérimentale

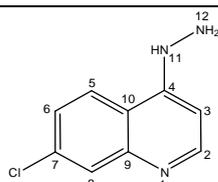
C3), 70.21 (5C, Cp), 70.41 (1C, Cp), 71.91 (1C, Cp), 75.92 (1C, Cp), 86.55 (1C, Cp, C4), 87.24 (1C, Cp, C5), 193.31 (1C, C6).

### II.2. Synthèse des hydrazines

#### Mode opératoire général

Dans un ballon de 250 mL, 2.50 mmol de 6,9-dichloro-2-methoxyacridine / 4,7-dichloro-quinoléine sont solubilisés dans 80 mL de méthanol. Un excès d'hydrazine hydraté (10 mL) est ajouté au mélange réactionnel. Le mélange est porté à reflux (80-90°C) sous agitation magnétique durant 4 heures. Après retour à température ambiante, le mélange est hydrolysé avec 50 mL d'eau, puis extrait au dichlorométhane (3x50 mL). La phase organique est ensuite lavée avec 2x50 mL d'H<sub>2</sub>O, séchée avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée.

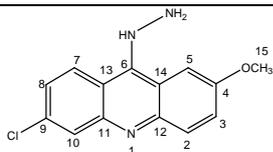
#### 7-Chloro-4-hydrazinequinoléine 43



Solide blanchâtre (2 g ; R. = 100%)  
M = 193.637g/mol

RMN<sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>) : 3.32 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.96 (d, *J* 5.37, 1H, H<sub>3</sub>), 7.35 (d, *J* 8.76, 1H, H<sub>6</sub>), 7.75 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.96 (d, *J* 8.85, 1H, H<sub>5</sub>), 8.35 (d, *J* 5.37, 1H, H<sub>2</sub>). RMN<sup>13</sup>C NMR (MeOH-d<sub>4</sub>) : 98.2 (1C, C<sub>3</sub>), 115.17 (1C, C<sub>10</sub>), 122.78 (1C, C<sub>6</sub>), 124.63 (1C, C<sub>5</sub>), 125.54 (1C, C<sub>8</sub>), 135.04 (1C, C<sub>7</sub>), 147.3 (1C, C<sub>9</sub>), 150.30 (1C, C<sub>4</sub>), 153.74 (1C, C<sub>2</sub>).

#### 1-(6-chloro-2-methoxyacridin-9-yl) hydrazine 45



Poudre jaune (1 g ; R. = 89%)  
M = 273.723 g/mol

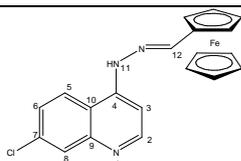
RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 2.17 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.8 (s, 1H, H<sub>1'</sub>), 3.9 (s, 2H, H<sub>2'</sub>), 7.15 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 7.24 (s, 3H, H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>7</sub>), 7.25 (s, 3H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>8</sub>), 7.48 (t, *J* 7.5 et *J* 11.4, 1H, H<sub>7</sub>), 7.9 (d, *J* 11.4, 1H, H<sub>1</sub>), 8.1 (d, *J* 8.7, 1H, H<sub>4</sub>), 8.2 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.6 (s, 1H, H<sub>8</sub>). RMN<sup>13</sup>C (MeOH-d<sub>4</sub>) : 55 (1C, C<sub>15</sub>), 103.22 (1C, C<sub>5</sub>), 125.09 (1C, C<sub>14</sub>), 126.21 (1C, C<sub>13</sub>), 127.15 (1C, C<sub>2</sub>), 127.46 (1C, C<sub>8</sub>), 127.93 (1C, C<sub>3</sub>), 130.84 (1C, C<sub>10</sub>), 131.91 (1C, C<sub>12</sub>), 133.70 (1C, C<sub>9</sub>), 146.7 (1C, C<sub>11</sub>), 147.3 (1C, C<sub>6</sub>), 157.29 (1C, C<sub>4</sub>).

### II.3. Synthèse des hydrazones

#### Mode opératoire général

Dans un ballon de 100 mL, 0,243 g (1,22 mmol) du 7-(chloroquinoléin-4-yl)hydrazine et 0,332 g (0,61 mmol) de 2-(N,N-diméthylaminométhyl)ferrocènealdéhyde dans 20 mL de méthanol en présence de 4 g de tamis moléculaire sont portés à reflux. Après 4 heures de réaction, le mélange est filtré. Après évaporation du solvant, du dichlorométhane est ajouté pour solubiliser le produit, ensuite 10 mL d'eau est ajouté. Le mélange est extrait avec 3x30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La phase organique est séchée avec Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée. On obtient une huile orangée, qui est cristallisée avec un mélange 40 ml EP / 10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

#### (E)-7-chloro-4-(2-ferrocénylidenehydrazinyl)quinoline 50



Poudre rouge (478 mg ; R. = 89%)  
M = 389.66 g/mol  
PF : 150°C

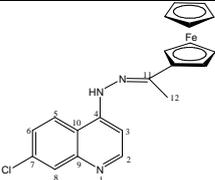
Analyse élémentaire (C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>ClFeN<sub>3</sub>) calculée: C, 61.65; H, 4.14; N, 10.78% ; mesurée : C, 61.87; H, 4.21; N, 10.65% ; MS (m/z) 390.01 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl)

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 4.17 (s, 5H, Cp), 4.50 (d, *J* 1.83, 2H Cp), 4.70 (d, *J* 1.89, 2H, Cp), 7.38 (d, *J* 4.74, 1H, H<sub>3</sub>), 7.46 (d, *J* 9.18, 1H, H<sub>6</sub>), 8.01 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 8.03 (d, *J* 8.97, 1H, H<sub>5</sub>), 8.68 (d, *J* 4.71, 1H, H<sub>2</sub>), 9.86 (s, 1H, H<sub>12</sub>).

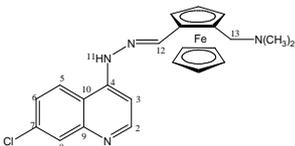
## Partie expérimentale

RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 69.64 (5C, Cp), 73.22 (4C, Cp), 79.32 (1C, Cp), 121.41 (1C, C3), 124.93 (1C, C10), 125.58 (1C, C6), 128.58 (1C, C5), 128.66 (1C, C8), 136.43 (1C, C7), 142.62 (1C, C9), 149.33 (1C, C4), 150.37 (1C, C2), 193.48 (1C, C12).

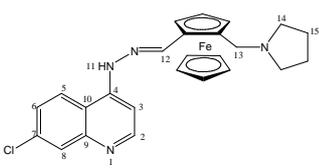
### (E)-7-chloro-4-(2-(1-ferrocenylethylidene)hydrazinyl)quinoline 51

	<p>Poudre rouge (178 mg ; R. = 90%)  M = 403.69 g/mol  m/z = 405  Analyse élémentaire (C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>ClFeN<sub>3</sub>) calculée: C, 62.48; H, 4.49; N, 10.41%.</p>
<p>RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 2.40 (s, 3H, H12), 4.2 (s, 5H, Cp), 4.49 (d, J 1.59, 2H, Cp), 4.76 (d, J 1.29, 2H, Cp), 7.47 (d, J 4.68, 1H, H3), 7.57 (d, J 9.18, 1H, H6), 8.11 (s, 1H, H8), 8.15 (d, J 8.82, 1H, H5), 8.77 (d, J 4.38, 1H, H2).  RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 27.46 (1C, C12), 69.08 (5C, Cp), 72.38 (4C, Cp), 79.22 (1C, Cp), 121.45 (1C, C3), 125.00 (1C, C10), 125.63 (1C, C6), 128.66 (1C, C5), 128.73 (1C, C8), 136.5 (1C, C7), 142.74 (1C, C9), 149.45 (1C, C4), 151.02 (1C, C2), 201.30 (1C, C11).</p>	

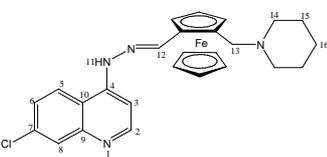
### (E)-1-(2-((2-(7-chloroquinolin-4-yl)hydrazano)methyl)ferrocenyl)-N,N-dimethylmethanamine 52

	<p>Poudre rouge (300 mg ; R. = 61%)  M = 446.763 g/mol  P.F = 158-160 °C  Analyse élémentaire (C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>ClFeN<sub>4</sub>) calculée: C, 61.83; H, 5.19; N, 12.54% ; mesurée : C, 62.01; H, 5.32; N, 12.42% ; MS (m/z) 446.90 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl)</p>
<p>RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 2.199 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.24 (d, J 6.9, 1H, H13), 3.73 (d, J 6.9, 1H, H13), 4.14 (s, 5H, Cp), 4.47 (s, 1H, Cp), 4.53 (s, 1H, Cp), 4.70 (s, 1H, Cp), 7.40 (d, J 4.44, 1H, H3), 7.49 (d, J 8.7, 1H, H6), 8.04 (s, 1H, H8), 8.08 (d, J 8.97, 1H, H5), 8.69 (d, J 4.41, 1H, H2), 10.02 (s, 1H, H12). RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 44.80 (2C, 2*CH<sub>3</sub>), 56.53 (1C, C12), 70.21 (5C, Cp), 70.41 (1C, Cp), 71.91 (1C, Cp), 75.92 (1C, Cp), 86.55 (1C, Cp-C13), 87.24 (1C, Cp-C12), 121.42 (1C, C3), 124.98 (1C, C10), 125.6 (1C, C6), 128.65 (1C, C5), 128.72 (1C, C8), 136.49 (1C, C7), 142.68 (1C, C9), 149.4 (1C, C4), 151.0 (1C, C2), 193.29 (1C, C12).</p>	

### (E)-7-chloro-4-(2-(2-(pyrrolidin-1-ylméthyl)ferrocénylidène)hydrazinyl)quinoline 53

	<p>Poudre rouge (345 mg ; R. = 95%)  M = 472.7 g/mol  P.F = 164-166 °C  Analyse élémentaire (C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>ClFeN<sub>4</sub>) calculée: C, 63.51; H, 5.33; N, 11.85% ; mesurée : C, 63.25; H, 5.30; N, 11.90% ; MS (m/z) 472.94 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl)</p>
<p>RMN<sup>1</sup>H (MeOH-d<sub>4</sub>) : 1.78 (m, 4H, H15), 2.60 (m, 4H, H14), 3.62 (d, J 13.08, 1H, H13), 4.08 (d, J 13.08, 1H, H13), 4.17 (s, 5H, Cp), 4.38 (s, 1H, Cp), 4.45 (s, 1H, Cp), 4.75 (s, 1H, Cp), 4.98 (s, 1H, H11), 7.37 (d, J 6, 1H, H3), 7.46 (d, J 8.8, 1H, H6), 7.82 (s, 1H, H8), 8.21 (d, J 8.78, 1H, H5), 8.43 (d, J 6, 1H, H2), 10.04 (s, 1H, H12). RMN<sup>13</sup>C (MeOH-d<sub>4</sub>) : 22.83 (2C, C15), 52.27 (1C, C13), 53.16 (2C, C14), 66.08 (1C, Cp), 68.68 (1C, Cp), 69.49 (5C, Cp), 72.19 (1C, Cp), 78.61 (1C, Cp-C13), 84.50 (1C, Cp-C12), 115.40 (1C, C3), 122.91 (1C, C10), 124.93 (1C, C6), 127.36 (1C, C5), 128.75 (1C, C8), 135.15 (1C, C7), 138.52 (1C, C9), 143.76 (1C, C4), 145.44 (1C, C2), 148.49 (1C, C12).</p>	

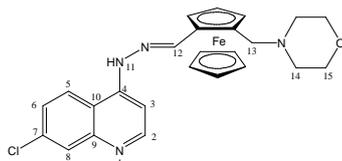
### (E)-7-chloro-4-(2-(2-(pipéridin-1-ylméthyl)ferrocénylidène)hydrazinyl)quinoline 54

	<p>Poudre rouge (350 mg ; R. = 91%)  M = 486.83 g/mol  P.F = 172-174 °C  Analyse élémentaire (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>ClFeN<sub>4</sub>) calculée: C, 64.15; H, 5.59; N, 11.51% ; mesurée : C, 64.31; H, 5.71; N, 11.24% ; MS (m/z) 486.94 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl)</p>
---	--

## Partie expérimentale

RMN<sup>1</sup>H (DMSO) : 1.32 (m, 2H, H16), 1.43 (m, 4H, H15), 2.36 (m, 4H, H14), 2.75 (d, *J* 12.9, 1H, H13), 3.66 (d, *J* 12.78, 1H, H13), 4.16 (s, 5H, Cp), 4.39 (s, 1H, Cp), 4.43 (s, 1H, Cp), 4.77 (s, 1H, Cp), 7.81 (d, *J* 4.65, 1H, H3), 8.18 (d, *J* 7.68, 1H, H6), 8.21 (s, 1H, H8), 8.36 (d, *J* 8.01, 1H, H5), 8.88 (d, *J* 4.71, 1H, H2), 10.97 (s, 1H, H12). RMN<sup>13</sup>C (DMSO) : 24.39 (1C, C16), 25.83 (2C, C15), 53.96 (2C, C14), 57.58 (1C, C13), 69.23 (1C, Cp), 70.01 (5C, Cp), 73.19 (1C, Cp), 74.73 (1C, Cp), 78.82 (1C, Cp-C13), 80.64 (1C, Cp-C12), 122.57 (1C, C3), 124.77 (1C, C10), 126.35 (1C, C6), 128.02 (1C, C5), 128.63 (1C, C8), 129.24 (1C, C7), 135.87 (1C, C9), 141.8 (1C, C4), 149.3 (1C, C2), 152.43 (1C, C12).

### (*E*)-4-(2-((2-(7-chloroquinolin-4-yl)hydrazono)méthyl)ferrocényl)morpholine 55



Poudre rouge (300 mg ; R. = 74%)

M = 488.797 g/mol

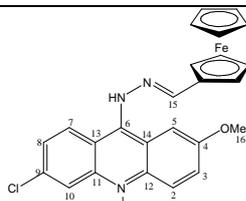
m/z = 489

P.F = 212-214 °C

Analyse élémentaire (C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>ClFeN<sub>4</sub>O) calculée: C, 61.43; H, 5.16; N, 11.46%; mesurée: C, 61.32; H, 5.12; N, 11.34%; MS (m/z) 488.94 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl)

RMN<sup>1</sup>H (MeOH-d<sub>4</sub>) : 3.46 (m, 4H, H14), 3.49 (d, *J* 13.47, 1H, H13), 3.64 (m, 4H, H15), 3.89 (d, *J* 15.69, 1H, H13), 4.18 (s, 5H, Cp), 4.45 (s, 1H, Cp), 4.52 (s, 1H, Cp), 4.83 (m, 1H, Cp), 5.47 (s, 1H, NH) ; 7.31 (d, *J* 5.9, 1H, H3), 7.44 (d, *J* 7.9, 1H, H6), 7.80 (s, 1H, H8), 8.19 (d, *J* 8.1, 1H, H5), 8.40 (d, *J* 5.7, H1), 10.2 (s, 1H, H12). RMN<sup>13</sup>C (DMSO) : 53.33 (2C, C14), 56.52 (1C, C13), 66.48 (2C, C15), 66.89 (1C, Cp), 69.38 (1C, Cp), 70.08 (5C, Cp), 73.24 (1C, Cp), 79.59 (1C, Cp-C13), 83.09 (1C, Cp-C12), 122.12 (1C, C3), 124.69 (1C, C10), 124.85 (1C, C6), 126.42 (1C, C5), 129.83 (1C, C8), 133.29 (1C, C7), 134.31 (1C, C9), 140.63 (1C, C4), 149 (1C, C2), 152.66 (1C, C12).

### (*E*)-6-chloro-9-(2-ferrocénylidenehydrazinyl)-2-methoxyacridine 57



Poudre rouge (119 mg ; R.= 90%)

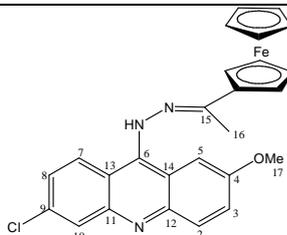
M= 469.74 g/mol

P.F = 120 °C

Analyse élémentaire (C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>ClFeN<sub>3</sub>O) calculée: C, 63.92; H, 4.29; N, 8.95%; mesurée: C, 64.21; H, 4.40; N, 9.25%; MS (m/z) 469.90 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl).

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 3.9 (s, 3H, H16), 4.28 (s, 5H, Cp), 4.61 (s, 2H, Cp), 4.80 (s, 2H, Cp), 7.11 (d, *J* 2.29, 1H, H3), 7.48 (Dd, *J* 8.55 RMN 4.62, 1H, H8), 7.85 (d, *J* 8.55, 1H, H7), 8.07 (d, *J* 9.21, 1H, H2), 8.19 (s, 1H, H5), 8.55 (d, *J* 4.23, H10), 9.96 (s, 1H, H15). RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 55 (1C, C16), 69.73 (5C, Cp), 73.22 (4C, Cp), 79.45 (1C, Cp), 103.22 (1C, C5), 125.09 (1C, C14), 126.21 (1C, C13), 127.15 (1C, C2), 127.46 (1C, C8), 127.93 (1C, C3), 130.84 (1C, C10), 131.91 (1C, C12), 133.70 (1C, C9), 146.7 (1C, C11), 147.3 (1C, C6), 157.29 (1C, C4), 193.81 (1C, C15).

### (*E*)-6-chloro-2-methoxy-9-(2-(1-ferrocényléthylidene)hydrazinyl)acridine 58



Poudre rouge (119 mg ; R.= 90%)

M= 483.78 g/mol

MS (m/z) = 485.08 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl)

Analyse élémentaire (C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>ClFeN<sub>3</sub>O) calculée: C, 64.55; H, 4.58; N, 8.69%.

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 2.40 (s, 3H, H16), 3.97 (s, 3H, H17), 4.2 (s, 5H, Cp), 4.5 (s, 2H, Cp), 4.77 (s, 2H, Cp), 7.13 (d, *J* 2.67, 1H, H3), 7.47 (Dd, *J* 9.12 RMN 3, 1H, H8), 7.86 (d, *J* 9.03, 1H, H7), 8.01 (d, *J* 9.36, 1H, H2), 8.19 (s, 1H, H5), 8.57 (s, 1H, H10). RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 27.46 (1C, C16), 55.6 (1C, C17), 69.63 (2C, Cp), 69.89 (5C, Cp), 72.40 (2C, Cp), 79.89 (1C, Cp), 103.09 (1C, C5), 125.14 (1C, C14), 126.23 (1C, C13), 127.2 (1C, C2), 127.48 (1C, C8), 127.92 (1C, C3), 127.93 (1C, C7), 130.83 (1C, C10), 133.76 (1C, C9), 134.56 (1C, C12), 146.71 (1C, C11), 147.33 (1C, C6), 158.00 (1C, C4), 202.15 (1C, C15).

## Partie expérimentale

### (E)-6-chloro-2-méthoxy-9-(2-(N,N-diméthylaminométhyl)ferrocénylidène)acridine 59

	<p>Poudre rouge (353 mg ; R. = 80%)  M = 526.846 g/mol  P.F = 130 °C  Analyse élémentaire (C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>ClFeN<sub>4</sub>O) calculée: C, 63.83; H, 5.17; N, 10.63% ; mesurée : C, 63.91; H, 5.22; N, 10.73% ; MS (m/z) 526.89 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl)</p>
<p>RMN<sup>1</sup>H (DMSO): 2.14 (s, 6H, H17), 2.50 (d, J 12.15, 1H, H16), 3.36 (d, J 12.35, 1H, H16), 3.82 (s, 3H, H18), 4.20 (s, 5H, Cp), 4.39 (s, 1H, Cp), 4.52 (s, 1H, Cp), 4.87 (s, 1H, Cp), 5.10 (s, NH), 7.17 (d, J 10.02, 1H, H3), 7.81 (s, 1H, H5), 8.10 (d, J 11.4, 1H, H8), 8.40 (d, J 9.48, 1H, H2), 8.87 (s, 1H, H10), 9.15 (d, J 11.5, 1H, H7), 10.98 (d, 1H, H15). RMN<sup>13</sup>C (DMSO): 44.80 (2C, C17), 56.53 (1C, C16), 57.35 (1C, C18), 68.30 (1C, Cp), 69.84 (5C, Cp), 73.15 (1C, Cp), 74.67 (1C, Cp), 78.25 (1C, Cp-C16), 82.38 (1C, Cp-C15), 106.73 (1C, C14), 114.68 (1C, C5), 116.49 (1C, C13), 119.6 (1C, C2), 120.36 (1C, C8), 127.74 (1C, C3), 132.34 (1C, C7), 134.58 (1C, C10), 141.01 (1C, C9), 143.44 (1C, C12), 145.89 (1C, C11), 149.19 (1C, C6), 153.92 (1C, C4), 195.81 (1C, C15).</p>	

### (E)-6-chloro-2-méthoxy-9-(2-(2-(pyrrolidin-1-ylméthyl)ferrocénylidène)acridine 60

	<p>Poudre rouge (287 mg ; R. = 94%)  M = 552.8 g/mol  P.F = 120-122 °C  Analyse élémentaire (C<sub>30</sub>H<sub>29</sub>ClFeN<sub>4</sub>O) calculée: C, 65.17; H, 5.29; N, 10.13% ; mesurée : C, 65.01; H, 5.40; N, 10.24% ; MS (m/z) 552.97 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl).</p>
<p>RMN<sup>1</sup>H (MeOH-d<sub>4</sub>): 2.16 (m, 2H, H18), 3.12 (m, 4H, H17), 3.57 (d, J 12.93, 1H, H16), 3.94 (s, 5H, Cp cis), 3.87 (s, 3H, H19), 3.96 (d, J 12.81, 1H, H16), 4.17 (s, 5H, Cp), 4.45 (s, 1H, Cp), 4.52 (s, 1H, Cp), 4.90 (s, 1H, Cp), 6.78 (d, J 12.24, 1H, H3), 6.98 (d, J 8.19 1H, H8), 7.59 (s, 1H, H10), 8.09 (d, J 11.04, 1H, H2), 8.68 (s, 1H, H5), 8.88 (d, J 10.03, 1H, H7), 10.44 (d, J 23.19, 1H, H15). RMN<sup>13</sup>C (MeOH-d<sub>4</sub>): 11.51 (1C, C18), 46.19 (2C, C17), 54.04 (1C, C16), 55.68 (1C, C19), 67.21 (1C, Cp), 69.84 (5C, Cp), 72.83 (1C, Cp), 75.46 (1C, Cp), 78.92 (1C, Cp-C16), 85.03 (1C, Cp-C15), 106.73 (1C, C14), 114.68 (1C, C5), 116.49 (1C, C13), 119.6 (1C, C2), 120.36 (1C, C8), 127.74 (1C, C3), 132.34 (1C, C7), 134.58 (1C, C10), 141.01 (1C, C9), 143.44 (1C, C12), 145.89 (1C, C11), 149.19 (1C, C6), 153.92 (1C, C4), 195.81 (1C, C15).</p>	

### (E)-6-chloro-2-méthoxy-9-(2-(2-(pipéridin-1-ylméthyl)ferrocénylidène)hydrazinyl)acridine 61

	<p>Poudre rouge (160 mg ; R. = 64%)  M = 566.9 g/mol  m/z = 567  P.F = 130-132 °C  Analyse élémentaire (C<sub>31</sub>H<sub>31</sub>ClFeN<sub>4</sub>O) calculée: C, 65.68; H, 5.51; N, 9.98% ; mesurée : C, 65.83; H, 5.44; N, 10.03% ; MS (m/z) 566.91 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl)</p>
<p>RMN<sup>1</sup>H (DMSO): 1.37 (m, 2H, H19), 1.52 (m, 4H, H18), 2.4 (m, 4H, H17), 3.42 (d, J 13.1, 1H, H16), 3.56 (d, J 13.4, 1H, H16), 3.92 (s, 3H, H20), 4.21 (s, 5H, Cp), 4.52 (s, 1H, Cp), 4.57 (s, 1H, Cp), 4.91 (s, 1H, Cp), 6.92 (d, J 9, 1H, H3), 7.06 (s, 1H, H5), 7.45 (d, J 11.4, 1H, H8), 7.81 (d, J 9.48, 1H, H2), 7.87 (d, J 11.4, 1H, H7), 7.95 (s, 1H, H10), 8.52(s, 1H, NH), 10.01 (s, 1H, H15). RMN<sup>13</sup>C (DMSO): 24.87 (1C, C19), 26.20 (2C, C18), 54.76 (2C, C17), 56.88 (1C, C16), 57.35 (1C, C20), 71.15 (5C, Cp), 71.93 (1C, Cp), 74.02 (1C, Cp), 75.46 (1C, Cp), 78.56 (1C, Cp-C16), 80.95 (1C, Cp-C15), 101.01 (1C, C14), 107.69 (1C, C5), 120.35 (1C, C13), 121.79 (1C, C2), 122.70 (1C, C8), 127.04 (1C, C3), 128.23 (1C, C7), 129.42 (1C, C10), 130.62 (1C, C9), 136.35 (1C, C12), 138.02 (1C, C11), 145.19 (1C, C6), 150.92 (1C, C4), 193.81 (1C, C15).</p>	

### (E)-4-(2-((2-(6-chloro-2-méthoxyacridin-9-yl)hydrazono)méthyl)ferrocényl)morpholine 62

	<p>Poudre rouge (148 mg ; R. = 98%) M = 568.8 g/mol P.F = 117-119 °C Analyse élémentaire (C<sub>30</sub>H<sub>29</sub>ClFeN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) calculée: C, 63.34; H, 5.14; N, 9.85% ; mesurée : C, 63.12; H, 5.20; N, 9.75% ; MS (m/z) 468.96 (M<sup>+</sup> <sup>35</sup>Cl)</p>
<p>RMN<sup>1</sup>H (DMSO): 3.50 (m, 4H, H17), 3.74 (d, J 11.15, 1H, H16), 3.84 (m, 4H, H15), 3.89 (d, J 12.32, 1H, H16), 3.96 (s, 3H, H19), 4.20 (s, 5H, Cp), 4.45 (s, 1H, Cp), 4.52 (s, 1H, Cp), 4.87 (s, 1H, Cp), 6.78 (d, J 12.38, 1H, H3), 7.03 (d, J 8.19 1H, H8), 7.45 (s, 1H, H10), 8.09 (d, J 11.084, 1H, H2), 8.68 (s, 1H, H5), 8.88 (d, J 9.03, 1H, H7), 10.44 (d, J 23.19, 1H, H15). RMN<sup>13</sup>C (DMSO): 54.33 (2C, C17), 55.68 (1C, C19), 57.52 (1C, C16), 65.48 (2C, C18), 68.98 (1C, Cp), 69.87 (5C, Cp), 73.15 (1C, Cp), 74.29 (1C, Cp), 78.42 (1C, Cp-C16), 82.1 (1C, Cp-C15), 109.73 (1C, C14), 113.68 (1C, C5), 117.49 (1C, C13), 119.6 (1C, C2), 120.36 (1C, C8), 128.74 (1C, C3), 132.34 (1C, C7), 134.58 (1C, C10), 141.39 (1C, C9), 143.48 (1C, C12), 145.05 (1C, C11), 150.23 (1C, C6), 155.92 (1C, C4), 195.81 (1C, C15).</p>	

## III. DERIVES 4-AMINOQUINOLEINES FERROCENIQUES

### III.1. Synthèse des amines quinoléines

#### III.1.1. Synthèse des diamines quinoléines<sup>5</sup>

##### Mode opératoire A

Dans un ballon de 250 mL, 0,500 g (1,8 mmol) de 4,7-dichloroquinoléine est solubilisé dans 80 mL de méthanol. Un excès d'hydrazine hydraté (10 mL) est ajouté. Le mélange est porté à reflux (80-90°C) sous agitation magnétique durant 4 heures. Après retour à température ambiante, le mélange est hydrolysé avec 50 mL d'eau, puis extrait au dichlorométhane (3x50 mL). La phase organique est ensuite lavée avec 2x50 mL d'H<sub>2</sub>O, séchée avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée.

##### Mode opératoire B

Un mélange de 4,7-dichloroquinoléine (0,99 g, 4,9 mmol) et 5 équivalents de diamine est porté à reflux à 80°C durant 1h sans agitation magnétique ; puis à 135°C pendant 3h avec agitation. Après retour à température ambiante, 30 ml de NaOH 10% sont ajoutés. La phase organique est extraite par 4x30 ml d'acétate d'éthyle, séchée sous MgSO<sub>4</sub>. Le produit est condensé sous vide par évaporation. Un solide jaune/blanc est obtenu par recristallisation en ajoutant de l'acétate d'éthyle.

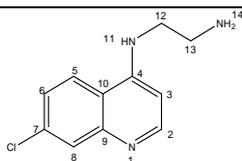
##### Mode opératoire C

Dans 20 ml d'éthanol sont dissous 1 équivalent de 4,7-dichloroquinoléine/4-fluoro-7-chloroquinoléine et 5 équivalents de diamine. Le mélange est porté à reflux durant 24h-30h sous agitation magnétique. Le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif. Puis, du dichlorométhane (20ml) et de l'eau (30ml) sont ajoutés. Les phases organiques sont extraites à l'aide de 20 ml de dichlorométhane, lavées par 50 ml d'eau, séchées sous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Le produit est condensé sous vide, pour donner un solide blanc. L'excès de diamine est purifié par ajout de dichlorométhane.

<sup>5</sup> 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. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4707 – 4714.

## Partie expérimentale

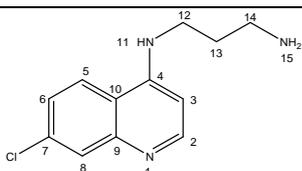
### N1-(7-chloroquinoléin-4-yl)éthane-1,2-diamine 63



Solide jaunâtre (2,2 g ; R. = 100%)  
M = 221.691g/mol

RMN  $^1\text{H}$  (MeOH-d4) : 1.35 (s, 2H, H14) ; 3.00 (t,  $J$  6.24, 2H, H13), 3.20 (t,  $J$  6.09, 2H, H12), 5.89 (s, 1H, H11), 6.27 (d,  $J$  5.4, 1H, H3), 7.20 (dd,  $J$  2.16,  $J$  8.76, 1H, H6), 7.64 (d,  $J$  8.97, 1H, H5), 7.8 (d,  $J$  2.16, 1H, H8), 8.4(d,  $J$  5.37, 1H, H2). RMN  $^{13}\text{C}$  (MeOH-d4) : 40.17 (1C, C13), 44.73 (1C, C12), 99.14 (1C, C3), 117.39 (1C, C10), 121.44 (1C, C6), 125.18 (1C, C5), 128.55 (1C, C8), 134.80 (1C, C7), 149.06 (1C, C9), 150.00 (1C, C4), 151.98 (1C, C2).

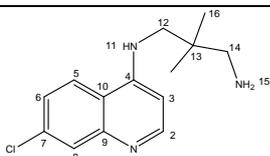
### N1(7-chloroquinoléin-4-yl)propane-1,3-diamine 64



Solide blanc (2,83 g ; R.= 80%)  
M=235.718g/mol

RMN  $^1\text{H}$  (MeOH-d4) : 1.87 (m, 2H, H13) ; 2.79 (t  $J$  6.99, 2H, H14), 3.35 (t,  $J$  7.02, 2H, H12), 6.42 (d  $J$  5.67, 1H, H3), 7.30 (d,  $J$  8.91, 1H, H6), 7.30 (s, 1H, H8), 7.99 (d,  $J$  9.03, 1H, H5), 8.15 (d,  $J$  5.61, 1H, H2). RMN  $^{13}\text{C}$  (MeOH-d4) : 31.96 (1C, C13), 40.28 (1C, C14), 41.72 (1C, C12), 99.61 (1C, C3), 118.72 (1C, C10), 124.28 (1C, C6), 125.91 (1C, C5), 127.56 (1C, C8), 136.22 (1C, C7), 149.57 (1C, C9), 152.37 (1C, C4) , 152.99 (1C, C2).

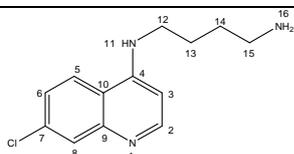
### N1(7-chloroquinoléin-4-yl)-2,2-diméthylpropane-1,3-diamine 65



Solide blanc (1.22 g ; R. = 87%)  
M = 263.772g/mol

RMN  $^1\text{H}$  (MeOH-d4) : 1.53 (m, 2H, H14) ; 1.74 (m, 2H, H13), 2.68 (t  $J$  7.14, 2H, H15), 3.32 (t,  $J$  5.16, 2H, H12), 6.42 (d  $J$  5.16, 1H, H3), 7.32 (dd,  $J$  2.16, 9.03, 1H, H6), 7.74 (d  $J$  2.13, 1H, H8), 8.04 (d,  $J$  9.03, 1H, H5), 8.29 (d,  $J$  5.64, 1H, H2). RMN  $^{13}\text{C}$  (MeOH-d4) : 25.33 (2C, C19), 35.10 (1C, C13), 53.43(1C, C14), 57.15 (1C, C12), 99.61 (1C, C3), 118.75 (1C, C10), 124.36 (1C, C6), 125.88 (1C, C5), 127.57 (1C, C8), 136.23 (1C, C7), 149.65 (1C, C9), 152.40 (1C, C4) , 152.66 (1C, C2).

### N1(7-chloroquinoléin-4-yl)butane-1,4-diamine 66

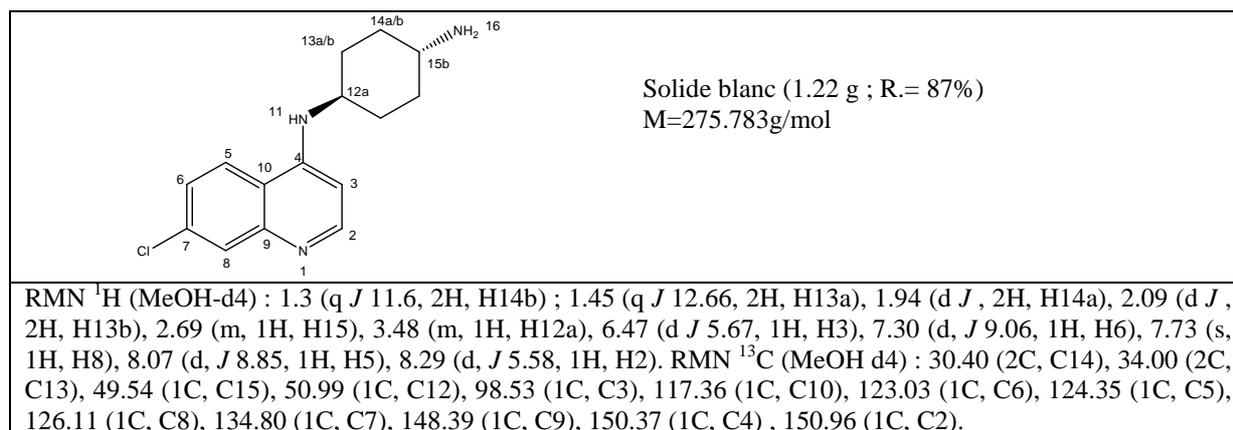


Solide Jaunâtre (1.22 g ; R. = 87%)  
M = 259.745g/mol

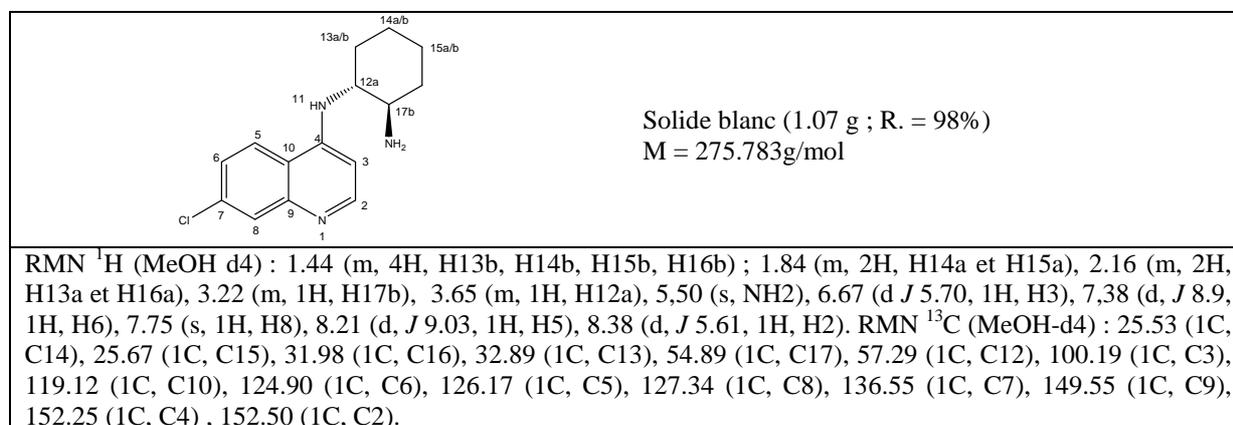
RMN  $^1\text{H}$  (MeOH-d4) : 1.53 (m, 2H, H14) ; 1.74 (m, 2H, H13), 1.92 (s, 2H, NH2), 2.68 (t  $J$  6.96, 2H, H15), 3.32 (t,  $J$  6.72, 2H, H12), 5.47 (s, 1H, NH), 6.42 (d  $J$  5.58, 1H, H3), 7.32 (dd,  $J$  2.16, 8.97, 1H, H6), 7.74 (d  $J$  2.13, 1H, H8), 8.04 (d,  $J$  9.00, 1H, H5), 8.29 (d,  $J$  5.58, 1H, H2). RMN  $^{13}\text{C}$  (MeOH-d4) : 25.40 (1C, C14), 29.78 (1C, C13), 40.85 (1C, C15), 42.45(1C, C12), 98.17 (1C, C3), 117.30 (1C, C10), 122.93 (1C, C6), 124.44 (1C, C5), 126.15 (1C, C8), 134.78 (1C, C7), 148.19 (1C, C9), 150.95 (1C, C4) , 151.18 (1C, C2).

## Partie expérimentale

### (1*R*,4*R*)-*N*1-(7-chloroquinoléin-4-yl)cyclohexane-1,4-diamine 77<sup>6</sup>



### (1*R*,2*R*)-*N*1-(7-chloroquinoléin-4-yl)cyclohexane-1,2-diamine 78



## III.1.2. Synthèse des triamines quinoléines

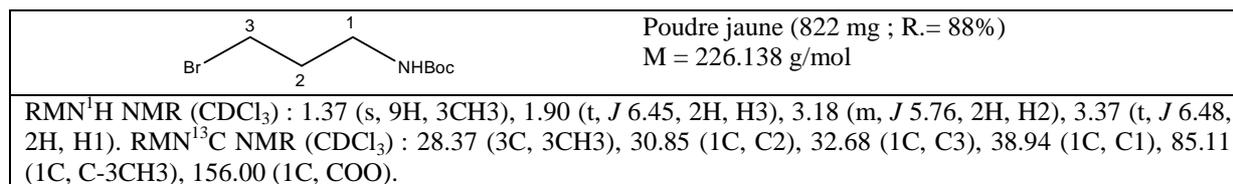
### a. Synthèse des tert-butyle alcane carbamates

#### Précurseurs halogène-alcane protégés

#### Mode opératoire général

4,7 mmol de Boc<sub>2</sub>O sont préalablement dissous dans 20 ml de chloroforme. 4,7 mmol de sel d'amine solubilisée dans 4 ml de triéthylamine sont ensuite ajoutés à la solution à 0°C. La protection de l'amine est complète au bout de 24h de réaction. Le mélange est hydrolysé avec 50 ml d'eau, puis les phases organiques sont extraites par 3x20 ml de chloroforme. Après séchage sous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, le solvant est évaporé pour donner des cristaux jaunâtres.

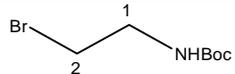
#### tert-butyl 3-bromopropylcarbamate 75



<sup>6</sup> Yearick, K.; Ekoue-Kovi, K.; Iwaniuk, D.P.; Natarajan, J.K.; Alumasa, J.; de Dios, A.C.; Roepe, P.D.; Wolf, C. *J. Med Chem.* **2008**, *51*, 1995 – 8.

## Partie expérimentale

### tert-butyl 2-bromoethylcarbamate 76

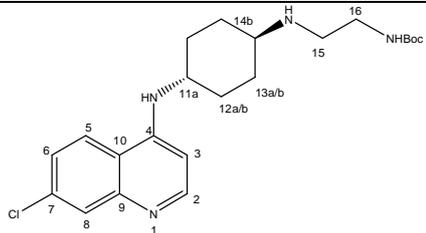
	Poudre jaune (501 g ; R. = 72%) M = 212.111 g/mol
RMN <sup>1</sup> H NMR (CDCl <sub>3</sub> ) : 1.37 (s, 9H, 3CH <sub>3</sub> ), 3.39 (t, J 3.45, 2H, H <sub>2</sub> ), 3.44 (t, J 3.84, 2H, H <sub>1</sub> ). RMN <sup>13</sup> C NMR (CdCl <sub>3</sub> ) : 28.29 (3C, 3CH <sub>3</sub> ), 32.64 (1C, C <sub>2</sub> ), 42.34 (1C, C <sub>1</sub> ), 85.28 (1C, CO(3CH <sub>3</sub> )), 155.58 (1C, COO).	

### b. Synthèses des tert-butyl aminoquinoléïnes carbamates

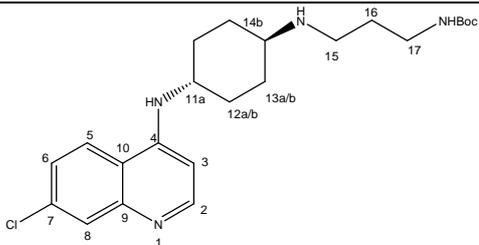
#### Mode opératoire général

Un mélange de 1.33 mmol de tert-butyl bromoéthylamine/bromopropylamine carbamate, de 1.21 mmol de diamine quinoléïque et de 400 mg de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans 25 ml de 1-4 dioxane anhydre est chauffé à 100°C durant toute une nuit. Après retour à température ambiante, le dioxane est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué dans 100 ml de chloroforme, lavé avec 1% d'HCl en solution, 50 ml d'eau, une solution saturée de NaCl, puis séché sous MgSO<sub>4</sub>. Le solvant est condensé sous vide pour donner une huile qui cristallise à température ambiante.

### tert-butyl 2-((1R,4R)-4-(7-chloroquinolin-4-ylamino)cyclohexylamino)ethylcarbamate

	Poudre jaune (255 g ; R. = 51%) M = 418.969 g/mol
RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) : 0.78 (m, 2H, H <sub>11</sub> et H <sub>14</sub> ), 1.18 (m, 4H, H <sub>13</sub> ), 1.38 (s, 9H, 3CH <sub>3</sub> ), 3.39 (m, 4H, H <sub>12</sub> ), 3.52 (m, 2H, H <sub>15</sub> ), 3.63 (m, 2H, H <sub>16</sub> ), 4.92 (s, NH), 7.42 (d, J 4.65, 1H, H <sub>3</sub> ), 7.52 (d, J 8.91, 1H, H <sub>6</sub> ), 8.03 (s, 1H, H <sub>8</sub> ), 8.10 (d, J 9.12, 1H, H <sub>5</sub> ), 8.71 (d, J 4.77, 1H, H <sub>2</sub> ). RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) : 28.29 (3C, 3CH <sub>3</sub> ), 32.40 (2C, C <sub>13</sub> ), 33.64 (1C, C <sub>15</sub> ), 35.23 (2C, C <sub>12</sub> ), 42.34 (1C, C <sub>16</sub> ), 49.54 (1C, C <sub>14</sub> ), 50.99 (1C, C <sub>11</sub> ), 85.28 (1C, CO(3CH <sub>3</sub> )), 98.53 (1C, C <sub>3</sub> ), 117.36 (1C, C <sub>10</sub> ), 123.03 (1C, C <sub>6</sub> ), 124.35 (1C, C <sub>5</sub> ), 126.11 (1C, C <sub>8</sub> ), 134.80 (1C, C <sub>7</sub> ), 148.39 (1C, C <sub>9</sub> ), 150.37 (1C, C <sub>4</sub> ), 150.96 (1C, C <sub>2</sub> ), 155.58 (1C, COO).	

### tert-butyl 3-((1R,4R)-4-(7-chloroquinolin-4-ylamino)cyclohexylamino)propylcarbamate

	Poudre jaune (312 mg ; R. = 68%) M = 432.998 g/mol
RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) : 1.28 (m, 4H, H <sub>13b</sub> et H <sub>12b</sub> ), 1.38 (s, 9H, 3CH <sub>3</sub> ), 1.41 (m, 1H, H <sub>14</sub> ), 1.64 (m, 2H, H <sub>16</sub> ), 2.04 (m, 2H, H <sub>15</sub> ), 2.10 (m, 2H, H <sub>13a</sub> ), 2.49 (m, 1H, H <sub>11</sub> ), 3.16 (m, 2H, H <sub>12a</sub> ), 3.45 (m, 2H, H <sub>17</sub> ), 5.23 (s, NH), 6.35 (d, J 5.28, 1H, H <sub>3</sub> ), 7.26 (d, J 8.52, 1H, H <sub>6</sub> ), 7.56 (d, J 8.94, 1H, H <sub>5</sub> ), 7.86 (s, 1H, H <sub>8</sub> ), 8.43 (d, J 5.28, 1H, H <sub>2</sub> ). RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) : 28.44 (3C, 3CH <sub>3</sub> ), 31.24 (2C, C <sub>13</sub> ), 32.68 (1C, C <sub>16</sub> ), 35.11 (2C, C <sub>12</sub> ), 35.23 (1C, C <sub>15</sub> ), 42.34 (1C, C <sub>14</sub> ), 49.54 (1C, C <sub>17</sub> ), 50.99 (1C, C <sub>11</sub> ), 85.11 (1C, CO(3CH <sub>3</sub> )), 99.35 (1C, C <sub>3</sub> ), 117.05 (1C, C <sub>10</sub> ), 120.07 (1C, C <sub>6</sub> ), 125.19 (1C, C <sub>5</sub> ), 128.84 (1C, C <sub>8</sub> ), 134.84 (1C, C <sub>7</sub> ), 148.55 (1C, C <sub>9</sub> ), 149.36 (1C, C <sub>4</sub> ), 151.96 (1C, C <sub>2</sub> ), 168.52 (1C, COO).	

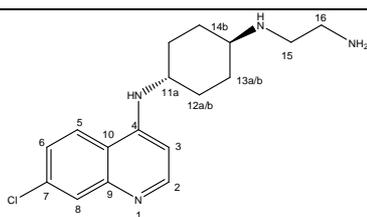
### c. Synthèse des triamines quinoléïnes

#### Mode opératoire général

A une solution de 10 ml de chloroforme contenant 1 mmol d'amine quinoléïque protégée est ajouté, à 0°C, 10 ml d'acide chlorhydrique dans de l'isopropanol. La mixture est laissée sous agitation magnétique à température ambiante. La déprotection est totale au bout de 18h de réaction. Après hydrolyse par 50 ml d'eau, l'HCl est neutralisé par ajout de NaOH. Les phases organiques sont extraites par 3x20 ml de chloroforme, séchées sous MgSO<sub>4</sub> et condensées à l'évaporateur rotatif pour donner une huile jaune.

## Partie expérimentale

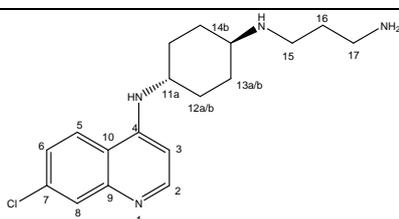
### (1*R*,4*R*)-*N*1-(2-aminoethyl)-*N*4-(7-chloroquinolin-4-yl)cyclohexane-1,4-diamine 79



Poudre jaune (185 mg ; R. = 51%)  
M = 318.852 g/mol

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 1.04 (m, 2H, H13a), 1.06 (m, 2H, H12a), 1.45 (m, 4H, H13b et H12b), 2.08 (m, 2H, H16), 2.10 (m, 2H, H15), 2.90 (m, 1H, H14), 3.45 (m, 2H, H11), 6.46 (d, *J* 5.91, 1H, H3), 7.27 (d, *J* 9.03, 1H, H6), 7.65 (s, 1H, H8), 8.04 (d, *J* 9.03, 1H, H5), 8.23 (d, *J* 5.52, 1H, H2). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 31.18 (2C, C13), 32.33 (2C, C12), 48.16 (1C, C14), 49.86 (1C, C11), 50.85 (1C, C16), 51.80 (1C, C15), 100.01 (1C, C3), 118.79 (1C, C10), 124.54 (1C, C6), 125.95 (1C, C5), 127.48 (1C, C8), 136.38 (1C, C7), 149.76 (1C, C9), 151.83 (1C, C4), 152.37 (1C, C2).

### (1*R*,4*R*)-*N*1-(3-aminopropyl)-*N*4-(7-chloroquinolin-4-yl)cyclohexane-1,4-diamine 80



Poudre jaune (270 mg ; R. = 82%)  
M = 332.879 g/mol

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 0.86 (m, 2H, H16), 1.24 (m, 2H, H13a), 1.36 (m, 2H, H12a), 1.45 (m, 4H, H13b et H12b), 2.08 (m, 2H, H17), 2.10 (m, 2H, H15), 2.90 (m, 1H, H14), 3.45 (m, 2H, H11), 7.84 (d, *J* 5.91, 1H, H3), 7.98 (d, *J* 9.63, 1H, H6), 8.15 (s, 1H, H8), 8.36 (d, *J* 9.75, 1H, H5), 8.93 (d, *J* 5.52, 1H, H2). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 31.24 (2C, C13), 32.68 (1C, C16), 35.11 (2C, C12), 35.23 (1C, C15), 42.34 (1C, C14), 49.54 (1C, C17), 50.99 (1C, C11), 99.35 (1C, C3), 117.05 (1C, C10), 120.07 (1C, C6), 125.19 (1C, C5), 128.84 (1C, C8), 134.84 (1C, C7), 148.55 (1C, C9), 149.36 (1C, C4), 151.96 (1C, C2).

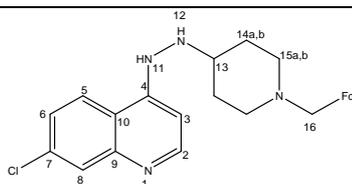
## III.2. Synthèse des amines quinoléines ferrocéniques

### III.2.1. Synthèse diamines quinoléines ferrocéniques

#### Mode opératoire général

A une solution de 1.30 mmol de **63** – **66** et **77** - **78** dans 20 ml d'éthanol sont ajoutés 1.30 mmol de ferrocène carboxaldéhyde (pour **65**, **77** – **66**)/*N*-ferrocénylméthylpiperidone (pour **63** – **64** et **66**). La mixture est portée à reflux sous agitation magnétique durant 4h. Le solvant est complètement évaporé sous pression réduite. Le résidu est solubilisé dans du dichlorométhane et séché sous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, puis évaporé à nouveau. L'imine obtenue est mise en solution dans 20 ml de méthanol, puis à 0°C 10 mmol de NaBH<sub>4</sub> sont ajoutés. La mixture est laissée durant 2h à 0°C. La réaction est stoppée par ajout de 20 ml d'une solution aqueuse de 0.5M de NaOH. Les phases organiques sont extraites par 20 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rassemblées et lavées avec une solution saturée de NaCl. Après séchage sous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner une poudre jaune (**68** – **72** et **83** – **84**). Les produits sont purifiés soit par cristallisation ou par chromatographie sur colonne éluant 7/3 acétate d'éthyle/ triéthylamine.

### 4-(2-(1-ferrocénylméthylpiperidin-4-yl)hydrazinyl)-7-chloroquinoline 68



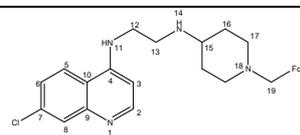
Poudre jaune (449 mg ; R. = 98%)  
M = 474.817g/mol  
P.F = 87°C

Analyse élémentaire (C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>ClFeN<sub>4</sub>) calculée: C 63.24 ; H, 5.73 ; N, 11.80%, trouvé C 63.18 ; H, 5.56 ; N, 11.83%

## Partie expérimentale

RMN  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>) : 1.47 (t, *J* 12.09, 2H, H14a), 1.79 (d, *J* 12.09, 2H, H15a), 1.95 (t, *J* 10.56, 2H, H14b), 2.77(d, *J* 9, 2H, H15b), 3.32 (s, 2H, H16), 3.52 (m, 1H, H13), 4.00(s, 7H, H Fc), 4.08 (s, 2H, H fc), 6.95 (d, *J* 6.54, 1H, H3), 7.27 (d, *J* 9.33, 1H, H6), 7.53(d, *J* 9.33, 1H, H5), 7.87 (s, 1H, H8), 8.46(d, *J* 5.61, 1H, H2).  
 RMN  $^{13}\text{C}$  (MeOH-d<sub>4</sub>) : 30.23 (2C, C14), 50.93 (2C, C15), 56.82 (1C, C13), 58.26 (1C, C16), 68.11 (2C, C Fc), 68.53 (5C, C Fc), 70.34 (2C, C Fc), 82.1 (1C, C Fc), 100.84 (1C, C3), 115.60 (1C, C10), 120.89 (1C, C6), 125.40 (1C, C5), 128.55 (1C, C8), 134.92 (1C, C7), 148.76 (1C, C9), 151.33 (1C, C4), 151.93 (1C, C2).

### N1-(1-ferrocénylméthylpiperidin-4-yl)-N<sup>2</sup>-(7-chloroquinolin-4-yl)éthane-1,2-diamine 69



Poudre jaune (700 g ; R.= 95%)

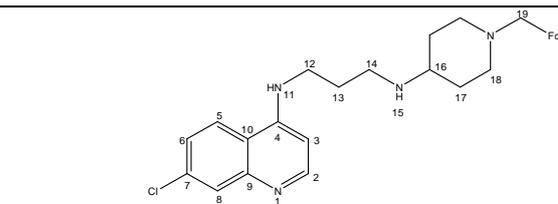
M=502.88g/mol

P.F = 66°C

Analyse élémentaire (C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>ClFeN<sub>4</sub>) calculée: C 64.49 ; H, 6.21 ; N, 11.14%, trouvé : C 64.65 ; H, 6.25 ; N, 11.21%

RMN  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>): 1.27 (t, *J* 6.24, 2H, H13), 1.78 (m, 4H, H16), 1.85(m, 1H, H15), 2.35 (t, *J* 6.09, 2H, H12), 2.74 (t *J* 6.03, 4H, H17), 3.29 (s, 2H, H19), 4.02 (s, 7H, H Fc), 4.07 (s, 2H, H Fc), 5.20 (s, 1H, H11), 6.27 (d, *J* 5.4, 1H, H3), 7.20 (dd, *J* 2.16, *J* 8.76, 1H, H6), 7.64 (d, *J* 8.97, 1H, H5), 7.8 (d, *J* 2.16, 1H, H8), 8.4(d, *J* 5.37, 1H, H2). RMN  $^{13}\text{C}$  (CDCl<sub>3</sub>): 32.74 (2C, C16), 42.35 (1C, C13), 44.23 (1C, C12), 51.70 (2C, C17), 54.21 (1C, C15), 58.30 (1C, C19), 99.10 (1C, C3), 117.37 (1C, C10), 121.56 (1C, C6), 125.17 (1C, C5), 128.37 (1C, C8), 134.74 (1C, C7), 148.93 (1C, C9), 149.96 (1C, C4), 151.92 (1C, C2).

### N1-(1-ferrocénylméthylpiperidin-4-yl)-N<sup>3</sup>-(7-chloroquinolin-4-yl)propane-1,3-diamine 70



Poudre jaune (700 mg ; R. = 80%)

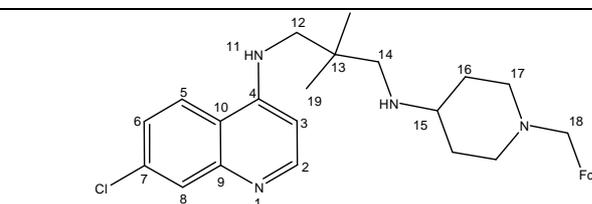
M = 516.89 g/mol

P.F = 64°C

Analyse élémentaire (C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>ClFeN<sub>4</sub>) calculée: C 65.06 ; H, 6.44 ; N, 10.84%, trouvé C 65.21 ; H, 6.39 ; N, 10.78%

RMN  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>): 1.21 (m, 4H, H17), 1.50 (m, 2H, H13), 2.5 (m, 1H, H16); 2.79 (d *J* 7.16, 2H, H14), 2.85 (m, 4H, H18), 3.29 (t, *J* 5.67, 2H, H12), 3.39 (s, 2H, H19), 4.11 (s, 7H, H Fc), 4.15 (s, 2H, H Fc), 6.25 (d *J* 5.37, 1H, H3), 7.32 (dd, *J* 1.98; 9.18, 1H, H6), 7.81 (d, *J* 8.94, 1H, H5), 7.88 (d, *J* 1.98, 1H, H8), 8.43 (d, *J* 5.34, 1H, H2). RMN  $^{13}\text{C}$  (CDCl<sub>3</sub>): 27.19 (1C, C13), 31.98 (2C, C17), 34.47 (1C, C14), 43.51 (1C, C12), 51.61 (2C, C18), 55.40 (1C, C16), 58.12 (1C, C19), 68.12 (2C, C Fc), 68.54 (5C, C Fc), 70.35 (2C, C Fc), 82.13 (1C, C Fc), 98.18 (1C, C3), 117.43 (1C, C10), 122.54 (1C, C6), 125.64 (1C, C5), 127.80 (1C, C8), 134.92 (1C, C7), 144.45 (1C, C9), 150.70 (1C, C4), 151.44 (1C, C2).

### N1-(1-ferrocénylméthylpiperidin-4-yl)-N<sup>3</sup>-(7-chloroquinolin-4-yl)2,2-diméthylpropane-1,3-diamine 71



Poudre Jaune (533 mg ; R. = 74%)

M = 544.21 g/mol

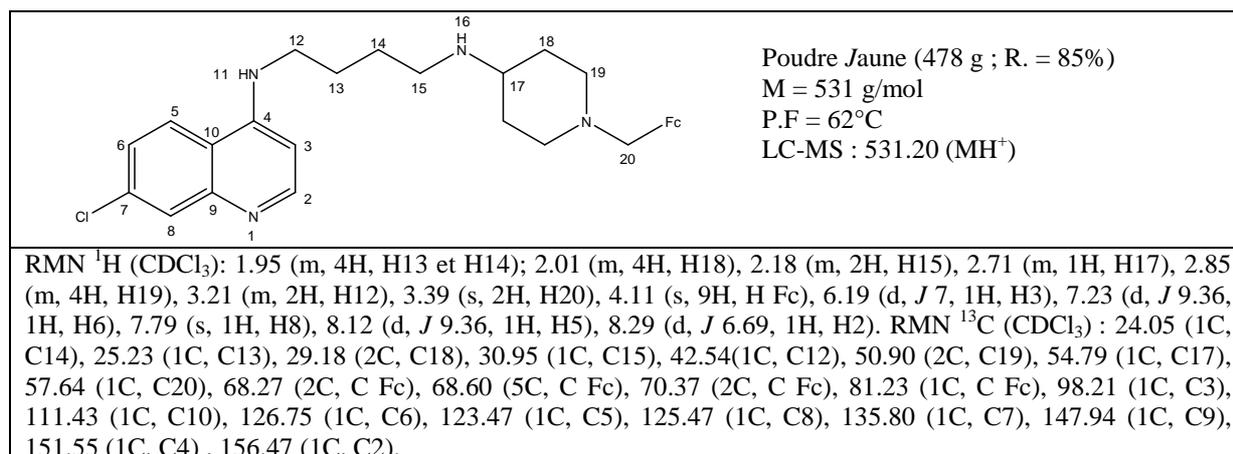
P.F = 58°C

Analyse élémentaire (C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>ClFeN<sub>4</sub>) calculée: C 66.12 ; H, 6.84 ; N, 10.28%, trouvé : C 66.40 ; H, 6.89 ; N, 10.18%

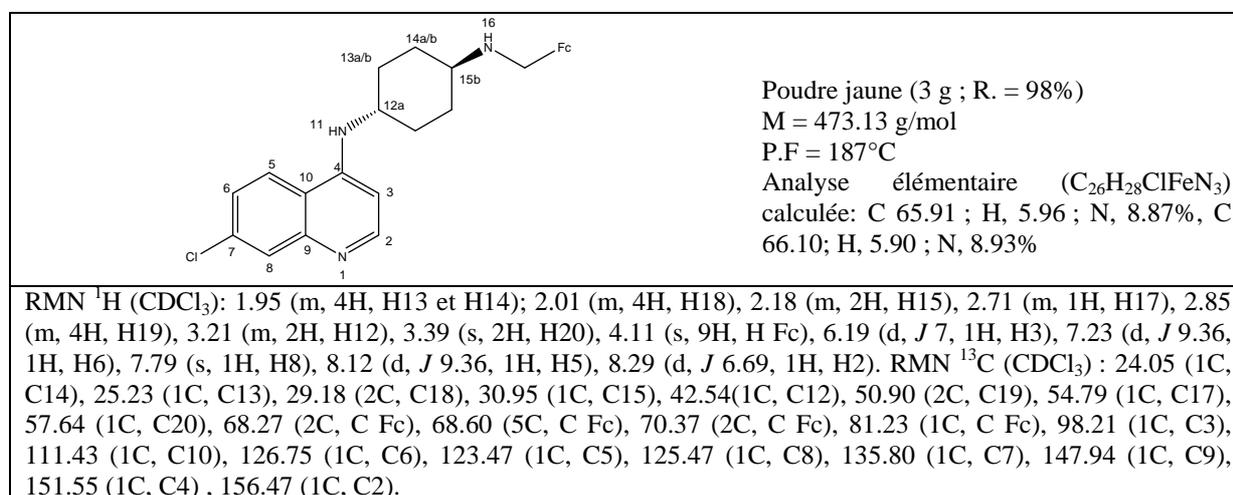
RMN  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>) : 1.06 (s, 6H, H19); 1.15 (m, 4H, H16), 1.95 (m, 2H, H17), 2.37 (m, 1H, H15), 2.69 (s, 2H, H14), 3.1 (s, 2H, H12), 3.37 (s, 2H, H18), 4.11 (s, 7H, H Fc), 4.16 (s, 2H, H Fc), 6.62 (d, *J* 6.9, 1H, H3), 7.29 (dd, *J* 2.13 RMN 8.88, 1H, H6), 7.70 (d, *J* 9.24, 1H, H5), 7.91 (d, *J* 2, 1H, H8), 8.44 (d, *J* 6.93, 1H, H2). RMN  $^{13}\text{C}$  (CDCl<sub>3</sub>) : 25.03 (2C, C19), 32.75 (2C, C16), 33.55 (1C, C13), 51.91 (2C, C17), 55.93(2C, C14 et C15), 58.23 (2C, C12 et C18), 68.02 (2C, C Fc), 68.52 (5C, C Fc), 70.41 (2C, C Fc), 82.73 (1C, C Fc), 97.88 (1C, C3), 117.75 (1C, C10), 122.45 (1C, C6), 124.75 (1C, C5), 128.49 (1C, C8), 134.53 (1C, C7), 149.18 (1C, C9), 150.83 (1C, C4), 152.14 (1C, C2).

## Partie expérimentale

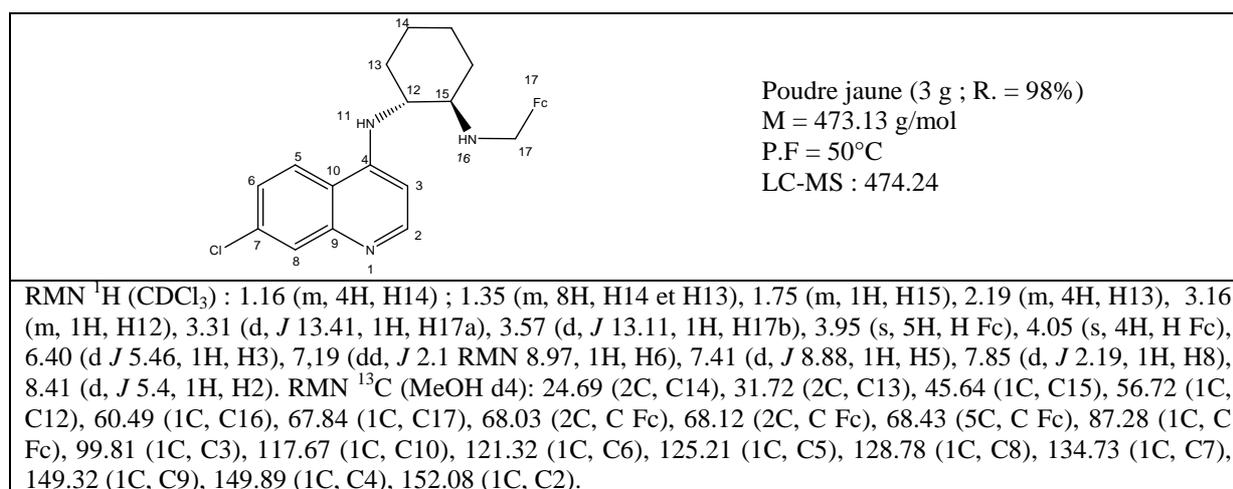
### *N1-(1-ferrocénylméthylpiperidin-4-yl)-N<sup>4</sup>-(7-chloroquinolin-4-yl)butane-1,4-diamine 72*



### *(1R,4R)-N1-(7-chloroquinolin-4-yl)-N4-(ferrocénylméthyl)cyclohexane-1,4-diamine 83*



### *(1R,2R)-N1-(7-chloroquinolin-4-yl)-N2-(ferrocénylméthyl)cyclohexane-1,2-diamine 84*



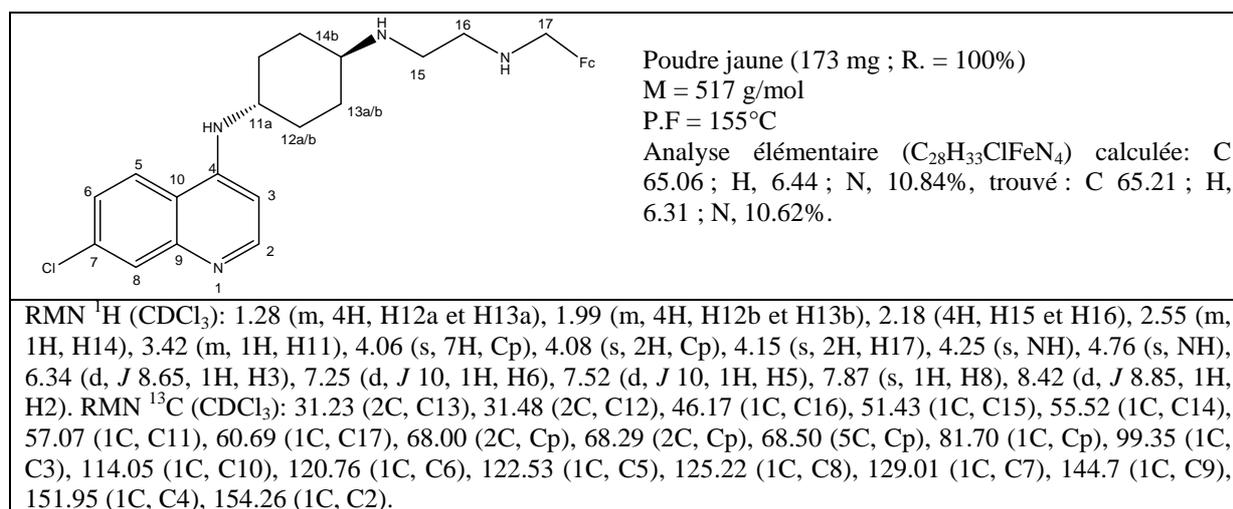
## III.2.2.Synthèse des triamines ferrocéniques

## Partie expérimentale

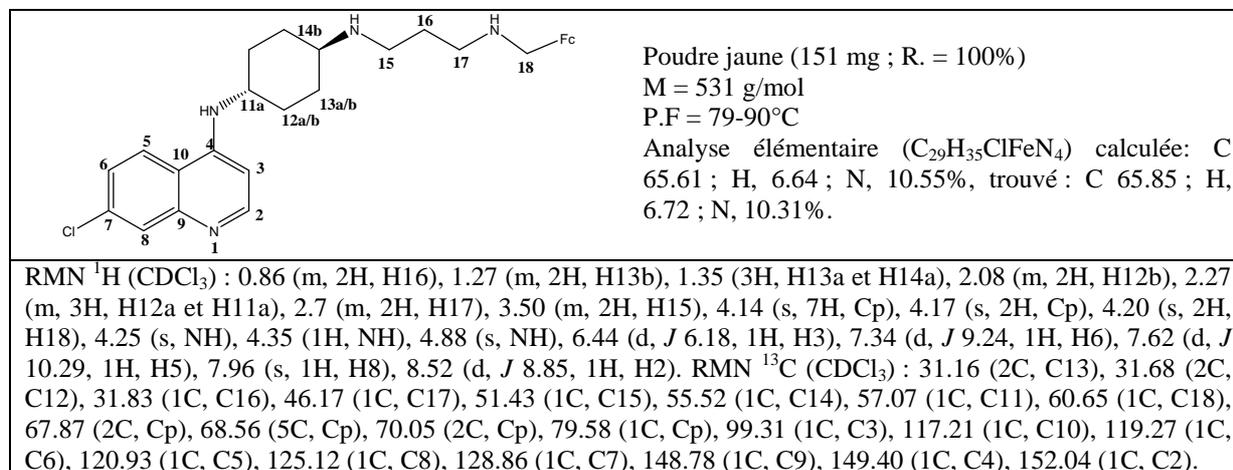
### Mode opératoire général

1 équivalent de ferrocène carbaldéhyde est ajouté dans un ballon contenant 1 équivalent de diamine quinoléique correspondant **79** – **80** solubilisé dans 20 ml d'éthanol. La mixture est portée à 90°C sous agitation magnétique. Au bout de 4h, l'imine est formée. L'éthanol est évaporé, puis le résidu est dissous dans 20 ml de méthanol. L'imine est réduite après 2h de réaction lors de l'ajout lent du NaBH<sub>4</sub>. Après hydrolyse avec 50 ml d'eau, la phase organique est extraite par 3x20 ml de dichlorométhane. Après séchage sous MgSO<sub>4</sub>, le produit est condensé à l'aide de l'évaporateur rotatif pour donner une poudre jaune.

### (1*R*,4*R*)-*N*1-(7-chloroquinolin-4-yl)-*N*4-(3-(ferrocénylméthylamino)éthyl)cyclohexane-1,4-diamine **81**

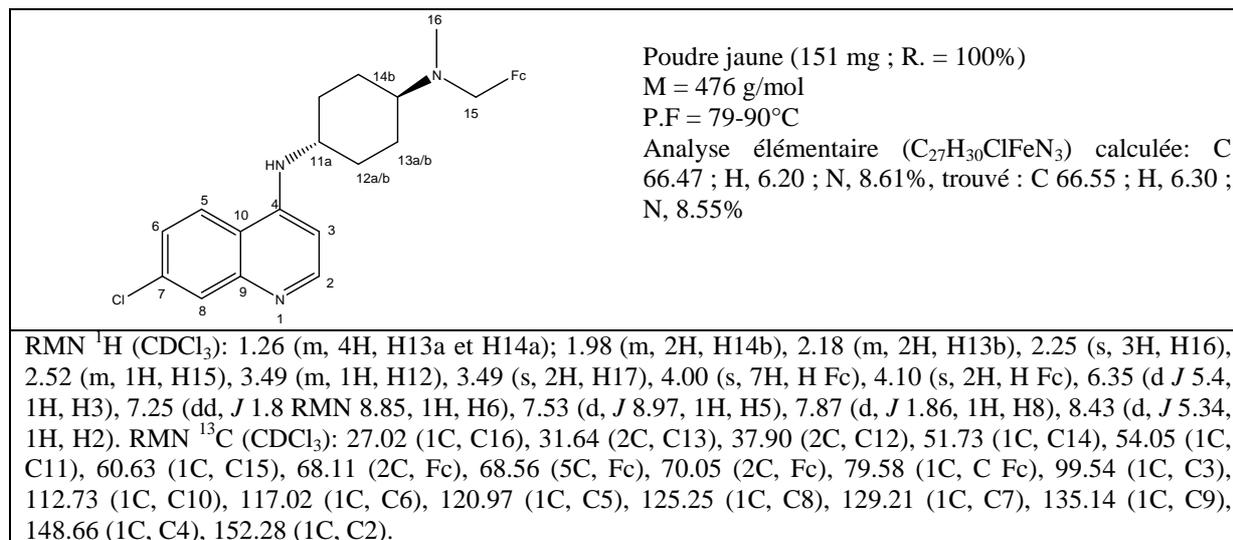


### (1*R*,4*R*)-*N*1-(7-chloroquinolin-4-yl)-*N*4-(3-(ferrocénylméthylamino)propyl)cyclohexane-1,4-diamine **82**



## Partie expérimentale

### (1*R*,4*R*)-*N*1-(7-chloroquinolin-4-yl)-*N*4-(ferrocénylméthyl)-*N*4-méthylcyclohexane-1,4-diamine 85



## IV. DERIVES BENZODIAZEPINES FERROCENIQUES

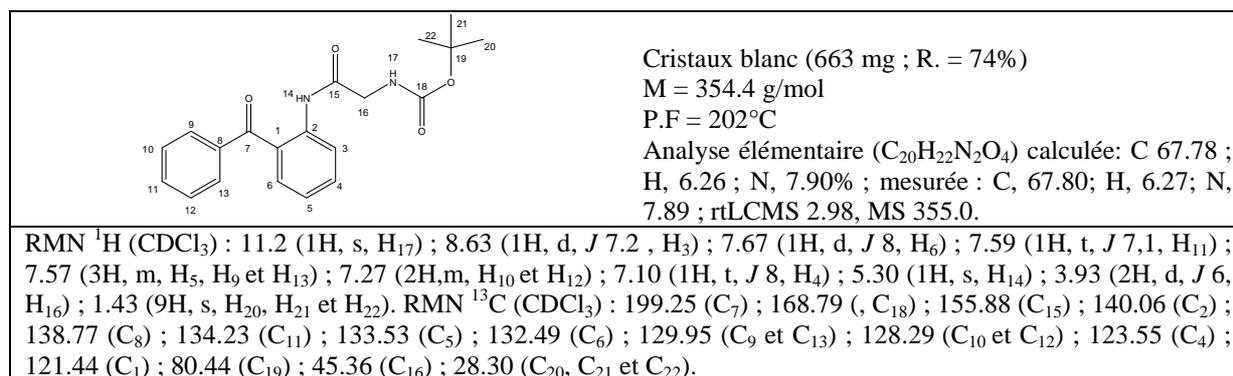
### IV.1. Synthèse des benzodiazépines par la méthode conventionnelle 1

#### IV.1.1. Réaction de couplage

##### 2-*N*-(*N*'-Boc-glycyl)aminobenzophénone 88

##### Mode opératoire

Dans un ballon de 100 mL, 0.499 g (2,53 mmol) de 2-aminobenzophénone et 0.478 g (2.73 mmol) de *N*-Boc-glycine et 0,486 g (2,54 mmol) d'EDCI sont solubilisés dans 40 mL de dichlorométhane (DCM). Le mélange est maintenu une nuit sous agitation magnétique, à température ambiante. De l'eau distillée (30 mL) est ajoutée au mélange et une extraction au DCM est effectuée, la phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée. Le solide obtenu est lavé à l'éther de pétrole et à l'éther éthylique (1 EE/ 2 EP).

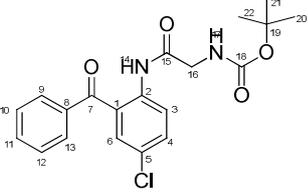


##### Mode opératoire général pour la synthèse des composés 91, 92

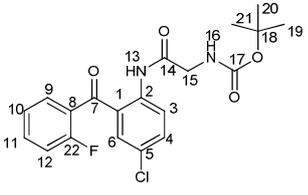
Dans un ballon de 50 mL sous atmosphère inerte, contenant une solution de 2-aminobenzophénone (1 équivalent) et de *N*-Boc-glycine (1 équivalent) dans 5 mL de dichlorométhane, sont ajoutés très lentement 1 équivalent de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pendant 30 mn à 0°C. Après 10 h de réaction à température ambiante, la solution est filtrée sur célite et le filtrat est récupéré puis évaporé. Le produit formé est ainsi purifié par chromatographie sur colonne de silice en utilisant comme éluant : un mélange de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EP (6/4) et acétate d'éthyle/EP (5/5).

## Partie expérimentale

### 2-N-(N'-Boc-glycyl)amino-5 chlorobenzophénone 92

	<p>Solide jaune claire (1470 mg ; R. = 88%) M = 388.4 g/mol P.F = 147°C Analyse élémentaire (C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) calculée: C, 61.78; H, 5.44; N, 7.20%; mesurée : C, 61.71; H, 5.47; N, 7.23 ; rt<sub>LCMS</sub> 3.19, MS 388.9</p>
<p>RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 11,07 (1H, s, H<sub>14</sub>) ; 8,6 (1H, d, J 9, H<sub>3</sub>) ; 7,63-7,47 (3H, m, H<sub>6</sub>, H<sub>4</sub> et H<sub>11</sub>) ; 7,46-7,40 (4H, m, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>12</sub> et H<sub>13</sub>) ; 5,15 (1H, s, H<sub>17</sub>) ; 3,90 (2H, d, J 6, H<sub>16</sub>) ; 1,38 (9H, s, H<sub>20</sub>, H<sub>21</sub> et H<sub>22</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 197,94 (C<sub>7</sub>) ; 169,09 (C<sub>15</sub>) ; 155,90 (C<sub>18</sub>) ; 138,30 (C<sub>2</sub>) 137,71 (C<sub>8</sub>) ; 133,87 (C<sub>4</sub>) ; 132,99 (C<sub>11</sub>) ; 132,6 (C<sub>9</sub>) ; 129,97 (C<sub>13</sub>) ; 128,54 (C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub>) ; 127,6 (C<sub>8</sub>) ; 124,9 (C<sub>5</sub>) ; 122,92 (C<sub>3</sub>) ; 77,09 (C<sub>19</sub>) ; 45,32 (C<sub>16</sub>) ; 28,21 (C<sub>20</sub>, C<sub>21</sub> et C<sub>22</sub>).</p>	

### 2-N-(N'-Boc-glycyl)amino-5 chloro-2'-fluorobenzophénone 91

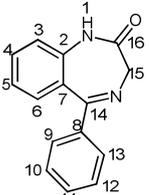
	<p>Poudre jaune claire (569 mg ; R. = 70%) M = 406.9 g/mol P.F = 130°C Analyse élémentaire (C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) calculée: C, 59.04; H, 4.96; N, 6.89%; mesurée : C, 59.24; H, 5.08; N, 6.88% ; rt<sub>LCMS</sub> 3.21, MS 406.9</p>
<p>RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 11,6 (1H, s, H<sub>16</sub>) ; 8,68 (1H, d, J 9, H<sub>3</sub>) ; 7,48 (2H, m, H<sub>11</sub> et H<sub>4</sub>) ; 7,38 (2H, m, H<sub>3</sub> et H<sub>6</sub>) ; 7,24 (1H, d, J 8, H<sub>12</sub>) ; 7,12 (1H, t, J 9, H<sub>10</sub>) ; 5,15 (1H, s, H<sub>16</sub>) ; 5,16 (1H, s, H<sub>13</sub>) ; 3,95 (2H, d, J 6, H<sub>15</sub>) ; 1,39 (9H, s, H<sub>19</sub>, H<sub>20</sub> et H<sub>21</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 195,47 (C<sub>7</sub>) ; 169,20 (C<sub>14</sub>) ; 165,11 (C<sub>22</sub>) ; 153,07 (C<sub>17</sub>) ; 138,91 (C<sub>2</sub>) ; 135,04 (C<sub>11</sub>) ; 133,68 (C<sub>4</sub>) ; 133,01 (C<sub>9</sub>) ; 130,27 (C<sub>6</sub>) ; 127,75 (C<sub>1</sub>) ; 125,6 (C<sub>5</sub>) ; 124,51 (C<sub>10</sub>) ; 124,04 (C<sub>8</sub>) ; 122,33 (C<sub>3</sub>) ; 116,5 (C<sub>12</sub>) ; 77,06 (C<sub>18</sub>) ; 49,91 (C<sub>15</sub>) ; 28,25 (C<sub>19</sub>, C<sub>20</sub>, C<sub>21</sub>).</p>	

## IV.1.2. déprotection et cyclisation des 88, 91 et 92

### (Z)-5-phenyl-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2(3H)-one 94

#### Mode opératoire

Dans un ballon de 100 mL, 0,318 g du composé **88**, est dissous dans 20 mL de dichlorométhane. Après ajout d'acide trifluoroacétique (1mL) le mélange est maintenu sous agitation magnétique et à température ambiante durant 4h. L'excès d'acide est neutralisé avec une solution 4N de l'hydroxyde de potassium. Une extraction au DCM (3×15 mL) est effectuée, la phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée. Le solide obtenu est dissous dans 20 ml de DCM avec 5% d'acide acétique. La solution est portée à reflux toute une nuit. Une extraction au DCM est effectuée suivie d'une neutralisation avec le carbonate de potassium. La phase organique est récupérée, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée.

	<p>Solide blanc (1950 mg ; R. = 92%) M = 236.3 g/mol P.F = 148°C</p>
<p>RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 9,78 (1H, s, H<sub>1</sub>) ; 7,44 (2H, d, J 7.4, H<sub>13</sub> et H<sub>9</sub>) ; 7,39 (2H, t, J 7,6 Hz, H<sub>12</sub> et H<sub>10</sub>) ; 7,29 (1H, t, J 8, H<sub>4</sub>) ; 7,25 (1H, d, J 8,1 Hz, H<sub>6</sub>) ; 7,22 (1H, t, J 7,6, H<sub>11</sub>) ; 7,15 (1H, d, J 8,1 Hz, H<sub>3</sub>) ; 7,06 (1H, t, J 8 Hz, H<sub>5</sub>) ; 4,26 (2H,s, H<sub>15</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 172,44 (C<sub>16</sub>) ; 171,21 (C<sub>14</sub>) ; 139,46 (C<sub>2</sub>) ; 138,85 (C<sub>8</sub>) ; 131,74 (C<sub>4</sub>) ; 131,36 (C<sub>11</sub>) ; 130,32 (C<sub>6</sub>) ; 129,72 (C<sub>13</sub> et C<sub>9</sub>) ; 128,20 (C<sub>12</sub> et C<sub>10</sub>) ; 127,23 (C<sub>7</sub>) ; 123,34 (C<sub>5</sub>) ; 121,27 (C<sub>3</sub>) ; 56,71 (C<sub>15</sub>).</p>	

## Partie expérimentale

### Mode opératoire général de synthèse des composés 97 et 98

Première étape :

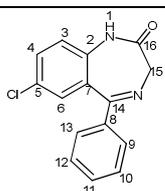
2,816 g (8,98 mmol) de **91** et **92** sont dissous dans 170 mL de chloroforme et 14 mL d'une solution de HCl dans du 2-propanol (5 à 6 N, 50 équiv.) sont ajoutés lentement à 0°C. La réaction est laissée 24h sous agitation magnétique. La solution est neutralisée avec une solution aqueuse de NaOH (6N) et extraite au DCM (3×30 mL) a été effectuée. La phase organique récupérée, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée sous pression réduite.

Seconde étape :

Le résidu obtenu est dissous dans 900 mL de dichlorométhane en présence de 40 mL d'acide acétique glacial (100 équiv.). Le mélange est laissé sous agitation et à reflux pendant une nuit. La solution est ensuite neutralisée avec une solution aqueuse de NaOH (6N) avant d'être extraite au dichlorométhane (3×50mL). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée sous vide.

Purification : chromatographie sur colonne de silice avec 100% EE comme éluant et cristallisation à froid avec un mélange de DCM:EP (1:4).

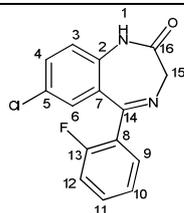
#### (Z)-7-chloro-5-phenyl-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2(3H)-one 98



Poudre blanche (1900 mg ; R. = 87%)  
M = 271 g/mol  
P.F = 216°C

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 9,2 (1H, s, H<sub>1</sub>), 7,47 (1H, m, H<sub>3</sub>) ; 7,46-7,40 (2H, m, H<sub>9</sub> et H<sub>13</sub>) ; 7,39 (2H, m, H<sub>10</sub> et H<sub>12</sub>) ; 7,34 (1H, d, J 2,4, H<sub>6</sub>) ; 7,10 (1H, d, J 8,6, H<sub>4</sub>) ; 4,26 (2H, s, H<sub>15</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 172,8 (C<sub>16</sub>) ; 167,8 (C<sub>14</sub>) ; 138,6 (C<sub>8</sub>) ; 137,1 (C<sub>2</sub>) ; 131,7 (C<sub>4</sub>) ; 130,5 (C<sub>11</sub>) ; 130,4 (C<sub>5</sub>) ; 129,7 (C<sub>6</sub>) ; 128,9 (C<sub>13</sub> et C<sub>9</sub>) ; 128,6 (C<sub>12</sub> et C<sub>10</sub>) ; 128,3 (C<sub>7</sub>) ; 122,6 (C<sub>3</sub>) ; 69,40 (1C, Cp substitué) ; 68,63 (2C, Cp non substitué) ; 67,96 (5C, Cp non substitué) ; 65,88 (1C, Cp substitué) ; 58,8 (C<sub>15</sub>).

#### (E)-7-chloro-5-(2-fluorophenyl)-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2(3H)-one 97



Poudre blanche (2540 mg ; R. = 98%)  
M = 289 g/mol  
P.F = 208°C

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 9,04 (1H, s, H<sub>1</sub>) ; 7,51 (1H, t, J 8, H<sub>10</sub>) ; 7,51 (1H, t, J 8, H<sub>10</sub>) ; 7,41-7,36 (2H, m, H<sub>4</sub> et H<sub>12</sub>) ; 7,19-7,18 (2H, m, H<sub>3</sub> et H<sub>6</sub>) ; 7-6,91 (2H, m, H<sub>11</sub> et H<sub>9</sub>) ; 4,30 (2H, s, H<sub>14</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 207,18 (C<sub>16</sub>) ; 166,7 (C<sub>14</sub>) ; 162,12 (C<sub>13</sub>) ; 136,23 (C<sub>2</sub>) ; 132,44 (C<sub>11</sub>) ; 132,04 5 (C<sub>4</sub>) ; 131,45 (C<sub>6</sub>) ; 128,24 (C<sub>9</sub>) ; 124,49 (C<sub>3</sub>) ; 124,44 (C<sub>10</sub>) ; 116,51 (C<sub>12</sub>) ; 56,54 (C<sub>15</sub>).

## IV.2. Synthèse des benzodiazépines par irradiation micro-onde

### Mode opératoire générale

Un tube de microonde de 10 ml contenant 25 mg de 2-aminobenzophénone (0,126 mmol), 22,2 mg de N-Boc-glycine (0,126 mmol) et 26,3 mg de DCC (0,126 mmol) dissous dans 0,4 mL de toluène est irradié au micro onde pendant 20 min à 150°C. Ensuite, 0,6 mL de TFA est ajouté au mélange avant d'être à nouveau irradié à 150°C pendant 20 min. La solution est neutralisée avec NaOH et extraite au DCM (3×3 mL). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de gel de silice (EE:EP 7/3). Les produits **94**, **97** et **98** sont obtenus avec des rendements de 77%, 80% et 69%.

## IV.3. Synthèse des benzodiazépines ferrocéniques

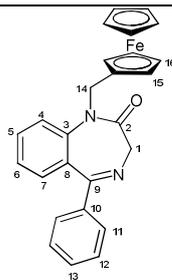
### IV.3.1. Méthode classique 1

## Partie expérimentale

### Mode opératoire générale

À 0°C, sous atmosphère inerte, à une solution de benzodiazépines (**94**, **97** et **98**, 0.636 mmol) dans du DMF distillé (10 ml), sont ajoutés 71,3 mg de *t*-BuOK (0.636 mmol). Après 30 min, la température est élevée à l'ambiante avant d'ajouter 5 mL d'une solution de triméthylferrocénylméthyl ammonium **12** (169 mg, 0,438 mmol) dans de la DMF distillée. La solution est laissée sous agitation magnétique et chauffée à 150°C pendant 4h sous atmosphère inerte. A température ambiante, 10 mL d'eau sont ajoutés au mélange. Le mélange est ensuite neutralisé (pH = 7) avec une solution molaire d'HCl. La phase organique est extraite avec du DCM (3×15 mL) séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Les produits obtenus sont purifiés par chromatographie sur colonne de silice avec pour éluant un mélange d'acetate d'éthyle et d'éther de pétrole (5/5).

### (Z)-1-(ferrocénylméthyl)-5-phényl-1H-benzo[e][1,4]diazépin-2(3H)-one 103



Solide jaune claire (159 mg ; R. = 84%)

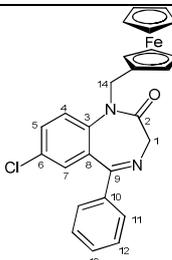
M = 433.9 g/mol

P.F = 215°C

Analyse élémentaire (C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>FeN<sub>2</sub>O) calculée: C, 71.90; H, 5.11; N, 6.45%; mesurée: C, 71.12; H, 5.23; N, 6.33%; rt<sub>LCMS</sub> 3.31 MS 434.9

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 8,52 (2H, d, J 7.6, H<sub>11</sub>) ; 7,73 (2H, m, H<sub>5</sub> et H<sub>7</sub>) ; 7,65 (3H, m, H<sub>12</sub> et H<sub>13</sub>) ; 7,32 (1H, t, J 8.1, H<sub>6</sub>) ; 7,26 (1H, d, J 8, H<sub>4</sub>) ; 5,20 (1H, d, J 15, H<sub>15</sub>) ; 4,70 (1H, d, J 10, H<sub>1</sub>) ; 4,53 (1H, d, J 15, H<sub>15</sub>) ; 4,16 (5H, m, Cp non substitué) ; 3,90 (4H, m, Cp substitué) ; 3,67 (1H, d, J 10, H<sub>1</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 172,27 (C<sub>2</sub>) ; 171,20 (C<sub>9</sub>) ; 139,43 (C<sub>3</sub>) ; 138,85 (C<sub>10</sub>) ; 131,73 (C<sub>5</sub>) ; 131,36 (C<sub>13</sub>) ; 130,33 (C<sub>7</sub>) ; 129,72 (C<sub>11</sub>) ; 128,68 (C<sub>12</sub>) ; 127,22 (C<sub>8</sub>) ; 123,32 (C<sub>6</sub>) ; 121,26 (C<sub>4</sub>) ; 69,74 (1C, Cp substitué) ; 69,12 (2C, Cp substitué) ; 68,76 (5C, Cp non substitué) ; 68,76 (1C, Cp substitué) ; 68,14 (1C, Cp substitué) ; 57,01 (C<sub>1</sub>) ; 55,69 (C<sub>14</sub>).

### (Z)-7-chloro-1-(ferrocénylméthyl)-5-phényl-1H-benzo[e][1,4]diazépin-2(3H)-one 102



Solide jaune (121 mg ; R. = 68%)

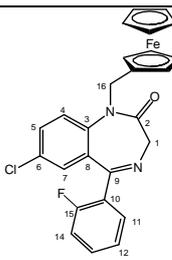
M = 467 g/mol

P.F = 184°C

Analyse élémentaire (C<sub>26</sub>H<sub>21</sub>ClFeN<sub>2</sub>O) calculée: C, 66.62; H, 4.52; N, 5.98%; mesurée: C, 66.35; H, 4.57, N, 5.96%; rt<sub>LCMS</sub> 3.58, MS 468.9.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 7,37 (3H, m, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>7</sub>) ; 7,27 (4H, d, J 4, H<sub>12</sub> et H<sub>11</sub>) ; 7,06 (1H, m, H<sub>13</sub>) ; 5,12 (1H, d, J 14, H<sub>14</sub>) ; 4,7 (1H, d, J 10.3, H<sub>1</sub>) ; 4,41 (1H, d, J 14, H<sub>14</sub>) ; 4,09 (5H, m, Cp non substitué) ; 3,97 (4H, m, Cp substitué) ; 3,64 (1H, d, J 10.3, H<sub>1</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 169.10 (C<sub>2</sub>) ; 168,26 (C<sub>9</sub>) ; 140,74 (C<sub>3</sub>) ; 138,18 (C<sub>8</sub>) ; 132,02 (C<sub>6</sub>) ; 131.03 (C<sub>5</sub>) ; 130.48 (C<sub>13</sub>) ; 129.55 (C<sub>7</sub>) ; 129.42 (C<sub>11</sub>) ; 128.22 (C<sub>12</sub>) ; 124.45 (C<sub>4</sub>) ; 69,40 (3C, Cp substitué) ; 68,63 (5C, Cp non substitué) ; 67,96 (2C, Cp substitué) ; 56.90 (C<sub>1</sub>) ; 46.28 (C<sub>14</sub>).

### (E)-7-chloro-1-(ferrocénylméthyl)-5-(2-fluorophényl)-1H-benzo[e][1,4]diazépin-2(3H)-one 104



Solide jaune (166 mg ; R. = 78%)

M = 487 g/mol

P.F = 110°C

Analyse élémentaire (C<sub>26</sub>H<sub>20</sub>ClFFeN<sub>2</sub>O) calculée: C, 64.16; H, 4.14; N, 5.76%; mesurée: C, 63.99; H, 4.13; N, 5.65%; rt<sub>LCMS</sub> 3.51 MS 486.9.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 7,36-7,29 (4H, m, H<sub>5</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>13</sub>) ; 7,10 (1H, t, J 7.5, H<sub>12</sub>) ; 6,97 (2H, m, H<sub>14</sub> et H<sub>4</sub>) ; 5,05 (1H, d, J 14, H<sub>16</sub>) ; 4,78 (1H, d, J 10.5, H<sub>1</sub>) ; 4,61 (1H, d, J 14, H<sub>16</sub>) ; 4,07 (7H, Cp non substitué et Cp

substitué) ; 3,98 (2H, Cp substitué) ; 3,67 (1H, d, *J* 10,5, H<sub>1</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 168,11 (C<sub>2</sub>) ; 165,80 (C<sub>9</sub>) ; 140,12 (C<sub>15</sub>) ; 132,22 (C<sub>3</sub>) ; 132,18 (C<sub>13</sub>) ; 131,50 (C<sub>5</sub>) ; 131,15 (C<sub>8</sub>) ; 130,05 (C<sub>6</sub>) ; 128,43 (C<sub>7</sub>) ; 124,27 (C<sub>11</sub>) ; 124,12 (C<sub>10</sub>) ; 116,40 (C<sub>4</sub> et C<sub>12</sub>) ; 116,12 (C<sub>14</sub>) ; 69,74 (1C, Cp substitué) ; 69,12 (2C, Cp substitué) ; 68,76 (5C, Cp non substitué) ; 68,14 (2C, Cp substitué) ; (57,02 (C<sub>16</sub>) ; 46,62 (C<sub>1</sub>).

### IV.3.2. Méthode par irradiation micro-onde

#### Mode opératoire général

Dans un tube de micro onde sous flux d'azote contenant 25 mg de benzodiazépines (**94**, **97** et **98**, 0,106 mmol) et 61 mg d'ammonium ferrocéniques **12** (0,159 mmol) sont introduits 17,8 mg de *t*-BuOK (0,159 mmol) et 2 ml de DMF distillé. La réaction est conduite à 130°C pendant 20 min avant d'ajouter 3 mL d'eau. Le mélange est extrait avec du dichlorométhane (3×2 mL) et les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de gel de silice (EE:EP 7:3). Les produits **102**, **103** et **104** sont obtenus respectivement avec des rendements de 72 %, 34 % et 71%.

## B. PARASITOLOGIE

### Test d'activité antiplasmodiale

Sur les souches FcB1, F32 et K1 de *P. falciparum*, le test a été réalisé au Muséum d'Histoire Naturelle de Paris.

La méthode utilisée était la méthode radioisotopique par marquage à l'hypoxanthine [<sup>3</sup>H]. Les souches de *P. falciparum* F32 (en provenance de Tanzanie), FcB1 (de Colombie) et K1 (de Thaïlande) sont cultivées en continu dans des érythrocytes humains.<sup>7</sup> Les solutions stock de chloroquine diphosphate, d'Artémisine, de ferroquine et des molécules à tester, étaient préparées respectivement dans de l'eau distillée et du DMSO. Ces solutions ont été ensuite diluées en série avec du milieu de culture et introduites dans des plaques de 96 puits contenant les cultures asynchrones de parasites (présence de toutes les formes du parasite : rings, trophozoïtes, schizontes). Le test a été réalisé avec un taux final d'hématocrite de 1% et une parasitémie de 1%. Les plaques ont été ensuite incubées, une première fois, pendant 24h à 37°C, sous une atmosphère réduite en oxygène (cloche à bougie). Puis, après rajout de l'hypoxanthine [<sup>3</sup>H] (0.5 µCi par puits, 1 – 5 Ci/mol), elles ont été de nouveau mises à incuber pendant 24h.

L'activité antiplasmodiale est déterminée en fonction de l'incorporation de l'hypoxanthine [<sup>3</sup>H] par le parasite.<sup>8</sup> Ainsi, la radioactivité incorporée par des parasites en contact avec les molécules est comparée à celle des parasites maintenus en absence de médicament (puits de contrôle). Les concentrations inhibitrices 50% (CI<sub>50</sub>) et 90% (IC<sub>90</sub>) sont déterminées en traçant la courbe d'inhibition en fonction des concentrations médicamenteuses.

Sur la souche W2, le test a été réalisé à l'UMR MD3 Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale de la faculté de Pharmacie de Marseille, Au bout de 72 H d'incubation, la prolifération du parasite a été évaluée par le test du SYBR green et le solvant de dilution était le DMSO.<sup>9</sup>

Les molécules ont été testées sur les isolats cliniques gabonais, en provenance de l'Hôpital de l'Amitié Sinogabonaise de Franceville, du Centre Hospitalier Régionale Amissa BONGO de Franceville et de l'Hôpital de COMILOG de la ville de Moanda.

La méthode utilisée était celle du test colorimétrique de DELI-microtest (Double-Site Enzyme Linked LDH Immunodetection) qui permet de détecter la lactate déshydrogénase de *P. falciparum* (LDHPf).<sup>10</sup> L'analyse de l'activité antiplasmodiale s'effectuait en trois étapes : la mise en culture de l'isolat, le test préliminaire et le test d'activité. La parasitémie initiale de l'échantillon sanguin était comprise entre 0.005% et 0.5%. L'isolat était lavé avec 2 à 3 mL du milieu de culture, du RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) par centrifugation (1500 tours/mn pendant 10 mn) pendant 3 fois. La microculture préparée avec la série de dilutions appropriées des molécules dans chaque puits avait un volume maximal de 200µL soit un taux d'hématocrite de 1.5%. Un volume de 197µL de chaque molécule y compris la chloroquine en référence était reparti dans des plaques de 96 puits, 3µL du culot sanguin de l'isolat était ensuite ajouté. Deux puits supplémentaires sont réservés comme

<sup>7</sup> Trager, W.; Jensen, J. B. *Science* **1976**, *193*, 673 – 677.

<sup>8</sup> Schrével, J.; Sinou, V.; Grellier, P.; Frappier, F.; Guénard, D.; Potier, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8472 – 8476.

<sup>9</sup> Guigembe, W. et al. *Nature*. **2010**, *465*, 311 – 315.

<sup>10</sup> Brasseur, P.; Agnamey, P.; Moreno, A.; Druilhe, P. *Med. Trop.* **2001**, *61*, 545 – 547.

## Partie expérimentale

---

contrôle positif. Un puits sans médicament (avec uniquement du RPMI) et un autre avec du DMSO sont mis également au contact de l'isolat. La plaque est ensuite incubée à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> pendant 44H. La culture était interrompue en congelant la plaque à -20 °C durant au moins 3H. Enfin, La plaque est décongelée à température ambiante (12 – 25°C) pendant 30 à 40 mn avant de procéder au test d'activité. Les densités optiques (DO), proportionnelle à la concentration de la pLDH présentent dans l'échantillon, étaient lues au spectrophotomètre à 450 nm.

### *Test d'activité antitoxoplasma gondii*

L'activité anti-toxoplasmique était évalué sur la croissance *in vitro* des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* de la souche PRU-β-Gal exprimant la β-galactosidase d'*Escherichia coli* selon une méthode colorimétrique adaptée de celle de McFadden et al.,<sup>11</sup> au Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale de Marseille. La lecture d'absorbance était faite à 570/630 nm.

### *Test d'activité cytotoxique*

L'étude cytotoxique des aminohydroxynaphtoquinones ferrocéniques a été réalisée sur plusieurs lignées cellulaires selon la méthode rapide de numération des cellules vivantes, MTT test,<sup>12</sup> au Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale de Marseille.

Ces AHNQFc ont été testés sur deux lignées de cellules à savoir : la lignée J774 A.1 (monocytes macrophages murins adhérents (ECACC)) et la lignée HepG2 (hépatocytes humains adhérents (ATCC-LGC)). La doxorubicine a été prise comme molécule de référence à cause de son effet cytotoxique. La toxicité de l'atovaquone a également été étudiée. Le temps d'incubation était de 72 heures et la lecture des plaques a été faite au spectrophotomètre à 570 nm et 630 nm (Biotek microtiter plate reader).

L'activité cytotoxique des autres molécules a été réalisée au CIRMF (Gabon), toujours suivant la méthode du MTT test. Les cellules ont été cultivées dans des microplaques de 96 puits à raison de 5000 cellules par puits. Au bout de 24 h d'incubation, les cellules étaient lavées avec du milieu de culture DMEM/F12. Ensuite, les molécules, préalablement dissoutes dans du DMSO étaient introduites dans du milieu de culture à différentes concentrations, au contact des cellules. Le milieu était incubé pendant 5 jours à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Les absorbances étaient lues à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm avec une référence à 690 nm.

---

<sup>11</sup> McFadden, D. C.; Seeber, F.; Boothroyd, J. C. *Antimicrobial Agents ChemotheR.* **1997**, *41*, 1849 – 1853.

<sup>12</sup> Mosmann, T. J. *Immunol. Methode.* **1983**, *65*, 55 – 63.

# RESUME

La pharmacomodulation des molécules biologiquement actives par l'introduction d'une entité organométallique telle que le ferrocène constitue une alternative très intéressante pour pallier les problèmes de recrudescence des résistances aux antipaludiques. Ce travail de thèse est centré sur la conception, la synthèse et l'activité antiplasmodiale de nouveaux composés ferrocéniques.

Quatre familles de molécules ont été modifiées structurellement par l'introduction d'un motif ferrocénique. Ainsi, les aminohydroxynaphtoquinones (analogues de l'atovaquone), les hydrazones quinoléiques et acridiniques, les 4-aminoquinoléines (analogues de la chloroquine) et les benzodiazépines (dérivés du flurazepam) ferrocéniques ont été synthétisées. Les études biologiques d'inhibition de la croissance de *P. falciparum* sur des clones de laboratoire et des isolats cliniques gabonais ont abouti à des résultats très prometteurs, notamment pour la famille des 4-aminoquinoléines ferrocéniques. L'activité cytotoxique et l'indice de sélectivité de ces composés ont également été étudiés et ainsi permis de dégager des candidats médicaments pour un prochain développement.

**Mots clés:** chimie bioorganométallique, ferrocène, paludisme, toxoplasme, tuberculose, isolats cliniques gabonais, test Elisa, parasitologie.

## SUMMARY

Pharmacomodulation of biologically active drugs by the introduction of an organometallic entity such as ferrocene constitutes a very interesting alternative to compensate the problematic increase of antimalarial drug resistances. This PhD work is focused on the design, the synthesis and the study of antiplasmodial activity of new ferrocenyl compounds.

For this purpose, four families of drugs containing a ferrocenyl entity were synthesized and studied for the first time. Thus, several aminohydroxynaphthoquinones (Atovaquone analog), quinolinyl- and acridinylhydrazones, 4-aminoquinolines (Chloroquine analog) and benzodiazepines (Flurazepam analog) were designed and obtained in good conditions. The ferrocenyl derivatives were evaluated for their antimalarial activity *in vitro* upon *Plasmodium falciparum* strains and gabonese clinical isolates. Some of these synthesized compounds have displayed very promising results, in particular for the ferrocenyl 4-aminoquinolines derivatives. The cytotoxic activity and the selectivity index of these compounds have indicated some of them as promising candidates for further development.

**Keywords:** bioorganometallic chemistry, ferrocene, malaria, toxoplasmosis, tuberculosis, Gabonese clinical strains, Elisa test, parasitology.