

Rapport de DSR

Présenté par : Nathalie WAMBANG

Le 12 octobre 2016

**Etude des propriétés antiprolifératives
des complexes de Cu(II), Zn(II), Ru(II)
dérivés d'indéno[1,2-c]isoquinoléines
sur quelques lignées de cellules cancéreuses**

Encadrants

Alain MARTORIATI

Katia CAILLIAU MAGGIO

Université Lille1, CNRS, UMR 8576-UGSF, F-59000 Lille, France.

Résumé

Les indénoisoquinoléines sont des molécules que l'on synthétise de plus en plus en raison de leurs propriétés antiprolifératives par une action inhibitrice sur les topoisomérases. Depuis la découverte du cisplatine, la synthèse des complexes métalliques, employant divers types de métaux, est grandement utilisée en chimiothérapie. Dans ce travail, nous étudions la cytotoxicité des complexes de Cu(II), Zn(II) et Ru(II) dérivés des ligands indénoisoquinoléines en utilisant le test colorimétrique au MTS. La comparaison des cytotoxicités révèle que les complexes de cuivres ont des meilleures cytotoxicités sur les lignées de cellules cancéreuses MDA-MB-231, Hela, HEK293, HT29 et DU145. D'une manière générale, les complexes métalliques ont une plus forte cytotoxicité que celle des ligands respectifs. Les cytotoxicités des complexes de Cu(II) et Zn(II) sont jusqu'à 200 fois plus fortes que celle du cisplatine.

Abstract

The synthesis of Indenoisoquinolines increases because of their antiproliferative properties over cancer cells through the inhibition of topoisomerases. Since the discovery of cisplatin, the synthesis of metal complexes having all types of metals is used for chemotherapeutic application. In this work, we studied the cytotoxicity of Cu (II), Zn (II) and Ru (II) complexes derived from indenoisoquinolines ligands using the colorimetric MTS assay. Comparing cytotoxicities reveals that copper complexes have the best cytotoxicities on cancer cell lines MDA-MB-231, HeLa, HEK293, HT29 and DU145. The cytotoxicity of the complexes is better than their respective ligand. Importantly, Cu(II) and Zn(II) indenoisoquinolines complexes exhibited cytotoxicities two to two hundred time higher than the common cisplatin.

Remerciements

Je remercie l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), d'avoir accepté mon inscription en DSR

Je remercie l'équipe de Régulation des Signaux de Division (RSD) de l'Université de Lille 1 et son chef d'équipe le Pr. Jean-François Bodart pour l'accueil qu'il m'a accordé, et pour tous les moyens mis à ma disposition pour achever ce travail.

Je remercie le Dr. Katia Cailliau Maggio d'avoir accepté de diriger ces travaux en me transmettant des connaissances en biologie cellulaire et pour la parfaite harmonie dans la communication.

Je remercie Le Docteur Alain Martoriati pour l'encadrement en biologie cellulaire, et pour la bonne humeur au travail qu'il transmettait facilement.

Mes remerciements vont aussi aux autres membres de l'équipe RSD : Matthieu Marin, Arlette Lescuyer, Julie Hanotel et Sylvain Slaby respectivement Maître de Conférence, assistante ingénieure, post-doctorante et doctorant pour les différentes connaissances que nous avons échangées, et pour leur sympathie.

Sommaire

Résumé	2
Abstract	2
Remerciements	3
Sommaire	4
Liste des figures	6
INTRODUCTION.....	8
CHAPITRE 1 : Généralités	10
1.1.- Le cycle cellulaire	11
1.2.- Les morts cellulaires	13
1.3.- Le Cancer.....	13
1.4.- Biologie d'un cancer	14
1.5.- La lignée MDA-MB231.....	15
1.6.- La lignée MCF-7	15
1.7. La lignée cellulaire HeLa.....	16
1.8.- La lignée Hek 293.....	17
1.9. La lignée HT29.	16
1.10. La lignée DU145.	17
2.- Les cibles des molécules chimiothérapeutiques.....	17
2.1.- Les inhibiteurs de topoisomérases et les agents intercalants.	17
2.2.- Les agents alkylants	19
2.3.- Les antimétabolites	20
2.4.- Les poisons du fuseau cellulaire.....	21
3.- Origines des indéno[1,2-c]isoquinoléine-5,11-diones	21
CHAPITRE 2 : Partie expérimentale.....	25

1.- Préparation des solutions mère de composés	26
2.- Culture cellulaire.	26
3.- Détermination des IC50.....	26
CHAPITRE 3 : Résultats et discussions.....	29
1.- Rappel des Structures des composés testés.....	30
2.- Etude de la cytotoxicité des complexes de Cu(II) et Zn(II).....	31
3.- Etude de la cytotoxicité des complexes de Ru²⁺	34
4.- Etude de la cytotoxicité du cis-platine.....	35
CONCLUSION.....	37
Références Bibliographiques.....	40
ARTICLE	45

Liste des Figures

Figure 1 : schéma du cycle cellulaire ¹	11
Figure 2 : Organisation du fuseau mitotique illustrant les phases de la mitose. ²	12
Figure 3 : processus de développement d'un cancer de l'initiation à l'invasion des métastases. ⁶	14
Figure 4 : Mécanisme des poisons de topoisomérase ²⁰	18
Figure 5 : Topotécan I (poison de topoisomérase I), Etoposide II (poison de topoisomérase II), Mitoxantrone III (Poison intercalant de topoisomérase II), Dexrazoxane IV et la merbarone V (inhibiteurs catalytiques de topoisomérase II).	19
Figure 6 : Mécanisme d'action du cisplatine (un agent alkylant). ²³	20
Figure 7 : Agents alkylants anticancéreux : cyclophosphamide VI (moutarde à l'azote), carmustine VII (nitrosouré), cisplatine VIII (dérivé du platine).	20
Figure 8 : structure des antimétabolites IX : 5-fluorouracile (antipirimidique), X : Cladribine (agoniste purique).	21
Figure 9 : Structure de la vincristine XI (vincalcaloïde) et du Taxole XII (taxane)	21
Figure 10 : Structures des dérivés de la camptothécine XIII (Irrinotecan), XIV (Topotecan) et des dérivés de la NSC314622 XV (indotecan), XVI (indimitecan).	22
Figure 11 : structure du cycle indenopyranedione (XVII), AL60 (XVIII), Indénoisoquinoléines poisons de topoisomérase II (XIX, XX, XXI).	23
Figure 12 : Structures des indénoisoquinoléines étudiées.	24
Figure 13 : Courbes d'absorbances du formazan en fonction du nombre de cellules.	27
Figure 14 : Plaque 96 puits (A), courbe dose effet permettant de calculer la CI ₅₀ (B). ..	28
Figure 15 : Histogramme des CI ₅₀ des ligands et de leurs complexes sur les lignées cellulaires MDA-MB-231, MCF7, Hela, HEK293, HT29, DU145.	31
Figure 16 : Cytotoxicité des composés sur la lignée MDA-MB-231	32
Figure 17 : Cytotoxicité des composés sur la lignée MCF7	32
Figure 18 : Cytotoxicité des composés sur la lignée Hela	33
Figure 19 : Cytotoxicité des composés sur la lignée HEK293	33

Figure 20 : Cytotoxicité des composés sur la lignée HT29.....	34
Figure 21 : cytotoxicité des composés sur la lignée DU145	34
Figure 22 : Cytotoxicité des complexes de Ru ²⁺ sur les lignées étudiées.....	35
Figure 23 : Histogramme des CI50 du Cis-platine.....	36
Figure 24 : Relation structure activité des complexes de Cu(II), Zn(II), Ru(II) et de leur ligand par rapport à leur cytotoxicité	39

Introduction

Les cellules se multiplient lors du développement et sont renouvelées dans certains tissus. Il existe des mécanismes cellulaires précis et spécifiques qui contrôlent la prolifération et la mort cellulaire. Une erreur au cours de la programmation de ces mécanismes peut entraîner l'expression excessive ou déficitaire de certains gènes dans une cellule et provoquer une cancérisation.

Grâce aux progrès de la recherche scientifique, le taux de rémission de certains cancers a augmenté mais des efforts restent encore à faire pour assurer l'amélioration et l'éradication définitive de cette maladie.

L'isolement des cellules issues des tumeurs des patients permettent d'étudier l'efficacité cytotoxique de milliers de molécules chimiques à visée chimiothérapeutique, qui ne cessent d'être découvertes ou synthétisées. Parmi ces molécules, les indénoisoquinoléines se sont avérées être des molécules de choix, inhibitrices de topoisomérases I et II, aux propriétés pharmacologiques supérieures à celles de la camptothécine l'une des premières molécules inhibitrices de topoisomérases utilisée en clinique.

Jusqu'à présent, les dérivés organométalliques des indénoisoquinoléines et plus précisément leurs propriétés antiprolifératives sur les lignées de cellules cancéreuses ont très peu été étudiées.

Dans ce contexte, notre travail a consisté à établir la cytotoxicité des nouveaux complexes de Cu(II), Zn(II), Ru(II) dérivés des ligands indénoisoquinoléines, que nous avons au préalable synthétisés, sur différentes lignées de cellules cancéreuses MDA-MB-231, MCF7, HeLa, HEK, HT29, DU145.

Chapitre 1 : Généralités

1.1. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'ensemble des étapes nécessaires pour la reproduction des cellules. Ces étapes sont contrôlées et régulées par des complexes protéiques CDK/cyclines. Une erreur de régulation de ces étapes peut conduire à des altérations chromosomiques. Le cycle cellulaire débute lorsque la cellule est créée et se termine lorsqu'une cellule unique se divise en deux cellules filles identiques lors du processus de mitose. Il y a quatre étapes successives dans le cycle cellulaire : les phases G1, S, G2, et M. Les phases G1 et G2 sont des étapes de croissance, la phase S est l'étape de réplication de l'ADN et enfin la phase M est la phase de mitose (division) (Figure 1).

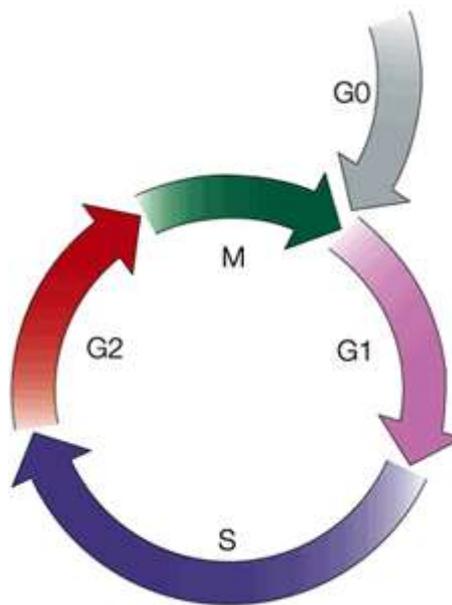


Figure 1 : schéma du cycle cellulaire ¹

La mitose est le processus de division cellulaire. Il est constitué d'une caryocinèse ou division du noyau et d'une cytokinèse ou division du cytoplasme. La mitose s'effectue en 5 phases : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase (anaphase A et anaphase B) et la télophase.

La prophase est une phase d'organisation où la chromatine se condense en structures très ordonnées appelées chromosomes. Ces chromosomes sont constitués de deux chromatides sœurs portant toutes les deux la même information génétique et reliés au niveau du centromère. Les centrosomes se séparent et migrent chacun vers un pôle de la cellule.

Pendant la prométaphase, les faisceaux de microtubules s'accrochent aux kinétochores qui sont des complexes protéiques situés au niveau des centromères, de telle sorte que les chromosomes s'alignent ensuite au niveau de l'équateur de la cellule lors de la métaphase.

Durant la métaphase, les microtubules sont uniformément orientés vers le centrosome avec leur extrémité (-) et s'étendent vers la plaque équatoriale avec leur extrémité (+), où ils se chevauchent souvent. Les microtubules astraux émanent des centrosomes et étendent leur extrémité (+) vers le cortex cellulaire.

Lors de l'anaphase A, le mouvement des chromosomes vers les pôles débute, et les deux pôles du fuseau séparés lors de l'anaphase B. L'enveloppe nucléaire commence à se reformer et l'ADN commence à se décondenser pendant la télophase. Une cytokinèse sépare le cytoplasme de la cellule dans les deux cellules filles qui s'individualisent et entrent en interphase pour un nouveau cycle (Figure 2).

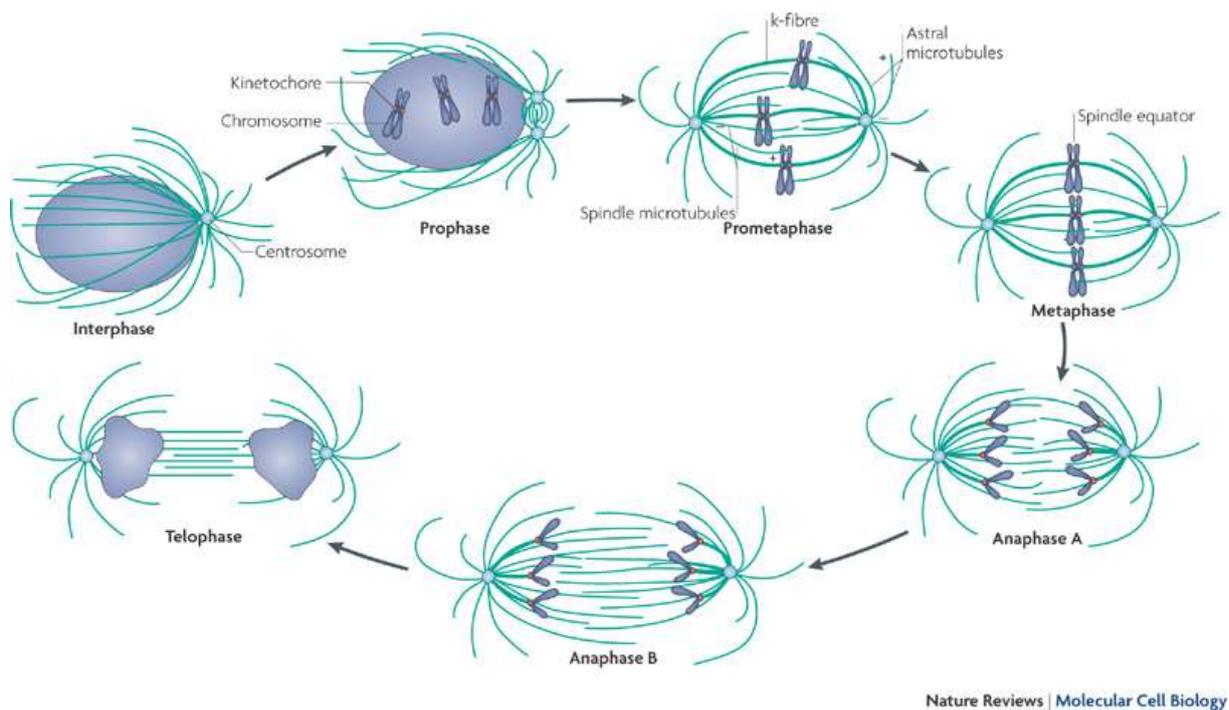


Figure 2 : Organisation du fuseau mitotique illustrant les phases de la mitose. ²

Le remplacement des cellules mortes des tissus peut se faire de différentes façons en fonction des circonstances.

1.2. Les morts cellulaires

Les morts cellulaires peuvent être classées en deux grandes catégories mutuellement exclusives : «accidentelle» et «réglementée». La mort cellulaire accidentelle (ACD) est causée par des chocs graves (des températures ou des pressions élevées) physiques, chimiques (des détergents puissants ou des variations extrêmes de pH) et mécaniques (cisaillement). Elle est quasi immédiate et elle est insensible à la pharmacothérapie ou à une quelconque interventions génétiques. Le Comité de Nomenclature sur la Mort Cellulaire (NCCD) pense que cela reflète la procédure d'élimination des cellules exposées à des conditions physico-chimiques très dures, qui ne comporte pas un mécanisme moléculaire spécifique. Bien que l'ACD peut se produire in vivo, par exemple par suite de brûlures ou de lésions traumatiques, elle ne peut pas être empêchée ou modulée et ne constitue donc pas une cible directe pour les interventions thérapeutiques dans le but de tuer les cellules indésirables de l'organisme ou d'empêcher la mort des cellules essentielles de l'organisme.³

Contrairement aux morts cellulaires accidentelles, les morts cellulaires régulées (RCD) impliquent une machinerie moléculaire codée génétiquement.⁴ Ainsi, une RCD peut être modifiée par des moyens pharmacologiques et des interventions génétiques visant les composants de son mécanisme. Par ailleurs, la RCD se produit souvent d'une manière relativement retardée et est initiée dans le cadre des réponses adaptatives (sans succès) pour tenter de rétablir l'homéostasie cellulaire.⁵

1.3. Le Cancer

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération anormale, incontrôlée et infinie des cellules au sein d'un tissu normal. Cette prolifération s'accroît, détruit les tissus environnants et se diffuse sous forme de métastase.

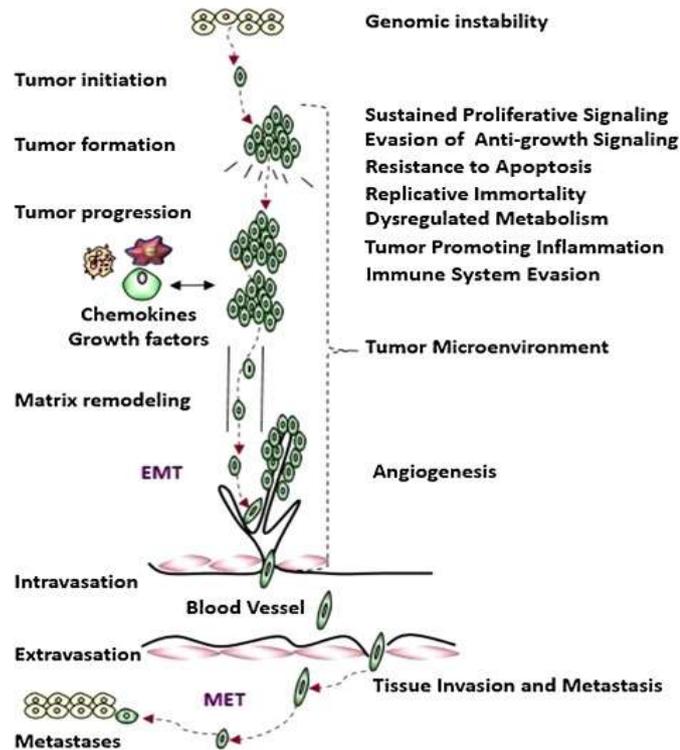


Figure 3 : processus de développement d'un cancer de l'initiation à l'invasion des métastases.⁶

1.4. Biologie d'un cancer

L'action d'un ou plusieurs agent carcinogène peut entrainer des modifications génétiques dans une cellule normale. En effet, il existe des gènes nommés pro-oncogènes qui codent pour des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire. Ces gènes, lorsqu'ils sont mutés, sont capables d'induire une prolifération cellulaire excessive et incontrôlée. Selon la nature et la fonction des protéines qu'ils codent, les oncogènes sont classés en 5 familles :

- Les facteurs de croissance (Sis, int-1, int-2, hst)
- Les Kinases (tyrosine-kinases et sérines/tréonine-Kynases)
- Les protéines G (ras, bcr)
- Les facteurs de transcription (Fos, jun, myc)
- Les non classifiés (bcl-2, cycline A)

Par contre les gènes supresseurs de tumeur codent pour des protéines normales régulatrices de la prolifération cellulaire, mais lorsqu'une ou plusieurs mutations génétiques les rendent inactives, elles ne constituent plus un frein de la prolifération cellulaire. Parmi les anti-oncogènes on distingue :

- Les kynases (NM 23)

- Les protéines GAP (NF1)
- Les molécules d'adhésion (DCC)
- Facteurs de transcription (RB1, P53, WR 1)
- Anti-enzymes lytiques (inhibiteurs du plasminogène)
- Non classifiés APC, ETS, MTS –

L'homéostasie d'une cellule est en partie assurée par l'équilibre entre les oncogènes et les antioncogènes.

Les autres familles de gènes impliqués dans le développement d'un cancer sont les gènes de réparations de l'ADN, les gènes impliqués dans le métabolisme des carcinogènes et les gènes de prédispositions à un cancer.⁷

Lors de notre étude nous avons utilisé les cellules cancéreuses de plusieurs adénocarcinomes, qui sont des cancers qui affectent des tissus dérivés en épithélium soit glandulaire (sein, rein, prostate) et des muqueuses glandulaires (côlon, endomètre).

1.5. La lignée MDA-MB231

La lignée cellulaire de cancer du sein MDA-MB-231 a été obtenue à partir d'un patient en 1973 au M. D. Anderson Cancer Center. Avec une morphologie épithéliale, les cellules MDA-MB-231 du cancer du sein apparaissent sous forme de cellules phénotypiquement en forme de broche. In vitro, la lignée de cellules MDA-MB-231 a un phénotype invasif et est également capable de croître sur l'agarose, un indicateur de la transformation et de la tumorigénicité. Cette lignée présente un rendement relativement élevé de formation de colonies. In vivo, les cellules MDA-MB-231 forment des tumeurs mammaires chez la souris nude. Une injection intraveineuse de cellules dans la queue de souris nude a été réalisée pour produire des métastases expérimentales. Elles sont hormono-indépendantes pour leur croissance. Elles sont qualifiées de cellules triples négatives.

1.6. La lignée MCF-7

La lignée cellulaire MCF-7 est une lignée qui a été isolée en 1970 à partir du tissu du sein d'une femme de 69 ans suite à une opération qui a révélé un adénocarcinome malin dans un épanchement pleural.

En plus de conserver leur sensibilité aux œstrogènes, les cellules MCF-7 sont également sensibles à la cytokératine. Elles sont réceptives à la desmine, l'endothéline, GAP, et à la vimentine. Lorsqu'elles sont cultivées *in vitro*, les cellules sont capables de former des dômes et de croître en monocouches.

1.7. La lignée cellulaire HeLa

La lignée cellulaire HeLa a été obtenue en 1951 à partir d'une biopsie d'une tumeur du col utérin prélevée chez Mme Henrietta Lacks, une ouvrière afro-américaine vivant près de Baltimore. Ces cellules cancéreuses sont les premières cellules humaines cultivées en laboratoire. Elles ont permis la mise au point d'un vaccin contre la poliomyélite, la mise en évidence de la télomérase humaine et de nombreuses autres découvertes.

1.8. La lignée cellulaire Hek 293

La lignée HEK293 (Human Embryonic Kidney 293 cells) est la seconde lignée la plus utilisée en biologie moléculaire après la lignée HeLa. HEK293 est une lignée cellulaire dérivée de cellules de rein embryonnaire humain. Cette lignée a été initiée par la transformation et la culture de cellules HEK normales avec l'adénovirus cisailé 5 ADN. La transformation a donné lieu à l'incorporation d'environ 4,5 kilobases à partir du génome viral dans le chromosome humain 19 des cellules HEK. La lignée a été cultivée par le Dr Alex Van der Eb, au début des années 1970, à l'Université de Leiden, aux Pays-Bas. La transformation a été exécutée par Frank Graham, qui a inventé la méthode de transfection au phosphate de calcium.^{8,9}

Il est difficile de caractériser de façon concluante les cellules post-transformation de la lignée cellulaire HEK293, étant donné que l'adénovirus 5 aurait considérablement perturbé la morphologie des cellules.

1.9. La lignée HT29.

HT-29 est une lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal humain avec une morphologie épithéliale. Elle a été établie en 1964 à partir d'une tumeur primaire colorectale d'une femme de 44 ans. Ces cellules sont sensibles aux médicaments chimiothérapeutiques 5-fluorouracile et de l'oxaliplatine, qui sont des options de traitement standard pour le cancer

colorectal. En plus d'être un modèle de tumeur de xénogreffe de cancer colorectal, la lignée cellulaire HT-29 est également utilisée en tant que modèle in vitro pour étudier l'absorption, le transport et la sécrétion par les cellules intestinales. Dans des conditions de culture standard, ces cellules se développent en tant que cellules non polarisées, indifférenciées, en multicouche. Cependant, la modification des conditions de culture ou du traitement des cellules avec divers inducteurs aboutit à une morphologie différenciée, polarisée et caractérisée par la redistribution des antigènes de la membrane et le développement d'une membrane de bordure en brosse apicale.^{11,12,13}

1.10. La lignée DU145.

La lignée DU145 est une lignée d'adénocarcinome de prostate isolée en 1977 à partir d'une métastase cérébrale chez un patient de 69 ans atteint d'un cancer de la prostate.¹⁴

La chimiothérapie est une méthode de traitement du cancer qui consiste à l'administration au patient de molécules chimiques dans le but de tuer les cellules cancéreuses. La découverte des nouvelles molécules à visée chimiothérapeutique va grandissante. Ces molécules peuvent avoir plusieurs cibles dans la cellule cancéreuse.

2. Les cibles des molécules chimiothérapeutiques

Les molécules chimiothérapeutiques utiliser actuellement pour traiter les cancers sont principalement des inhibiteurs de topoisomérases, des agents intercalants, et alkylants, des poisons du fuseau mitotiques et des antimétabolites.

2.1. Les inhibiteurs de topoisomérases et les agents intercalants.

Les topoisomérases sont des enzymes responsables du déroulement et du surenroulement réversible de l'ADN au cours de la réplication précédant la division cellulaire. La mitose étant un phénomène récurrent chez les cellules cancéreuses, les topoisomérases sont une cible de choix. Il existe les inhibiteurs de topoisomérases I dont l'action génère des cassures mono brin d'ADN et les topoisomérases de types II ATP dépendantes engendrant des cassures double brin.¹⁵

Les inhibiteurs de topoisomérases I et II sont classés en 3 catégories : les poisons intercalants, les poisons non intercalants et les inhibiteurs catalytiques.

Les poisons intercalants de topoisomérases inhibent la religation réversible de l'ADN. On assiste alors à une stabilisation des complexes de clivage Ligand-ADN-Topoisomérase^{16,17}(Figure 4). Les structures des poisons de topoisomérases sont représentées Figure 5

Le mécanisme d'action des poisons non intercalants n'a pas été élucidé pour le moment. Cette famille est constituée des molécules de la famille des épidothylotoxines telles que l'étoposide (Figure 5 :II) et le téniposide.

Les inhibiteurs catalytiques de topoisomérases empêchent la fixation de topoisomérases II à l'ADN ou la formation du complexe de clivage ligand-ADN-topoisomérase.¹⁸ Les molécules telles que la merbarone (ICRF 159), et la dioxopipérazine (ICRF 187) sont des inhibiteurs catalytiques de topoisomérases II.¹⁹ (Figure 5 : IV , V).

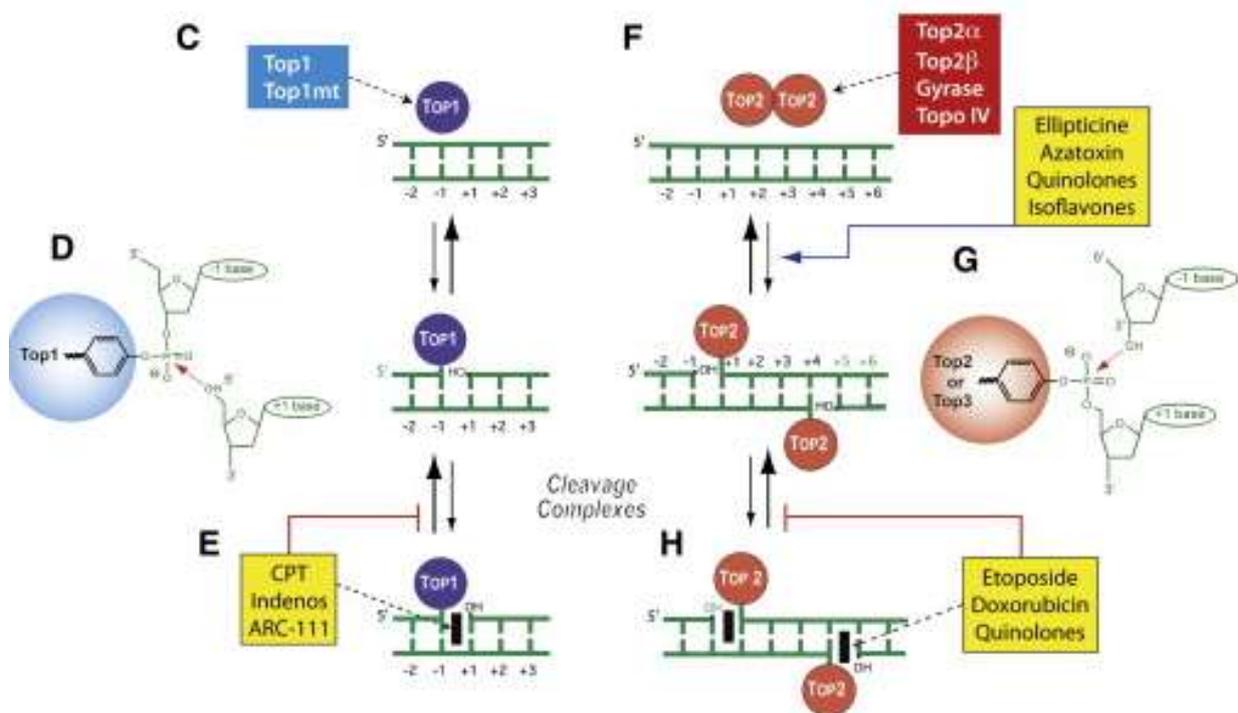


Figure 4 : Mécanisme des poisons de topoisomérases²⁰

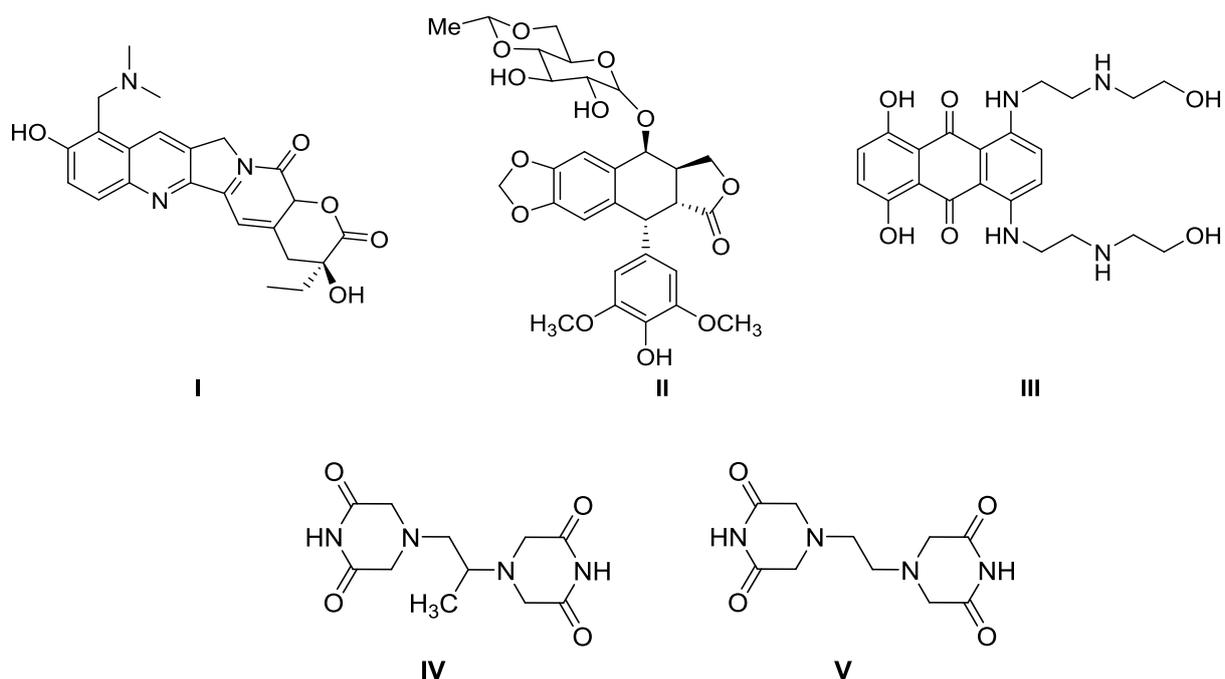


Figure 5 : Topotécane I (poison de topoisomérase I), Etoposide II (poison de topoisomérase II), Mitoxantrone III (Poison intercalant de topoisomérase II), Dexrazoxane IV et la merbarone V (inhibiteurs catalytiques de topoisomérase II).

2.2. Les agents alkylants

Les agents alkylants sont des molécules qui se lient de manière covalente à l'ADN. Ceci empêche la séparation des brins complémentaires (réplication) ou la lecture de l'ADN lors de la synthèse d'ARN (transcription). Cette interaction covalente induit une mort cellulaire à travers son interférence avec la structure et la fonction de l'ADN, une inactivation des enzymes de réparation de l'ADN et un dommage de la membrane cellulaire.^{21,22}

Les agents alkylants agissent par des mécanismes dont celui du cisplatine a été élucidé. Après son absorption, il subit une réaction d'échange de ligand puis, se fixe à l'ADN au niveau des bases purines sur les azotes N⁷, et forme des adduits inter et intra brins.

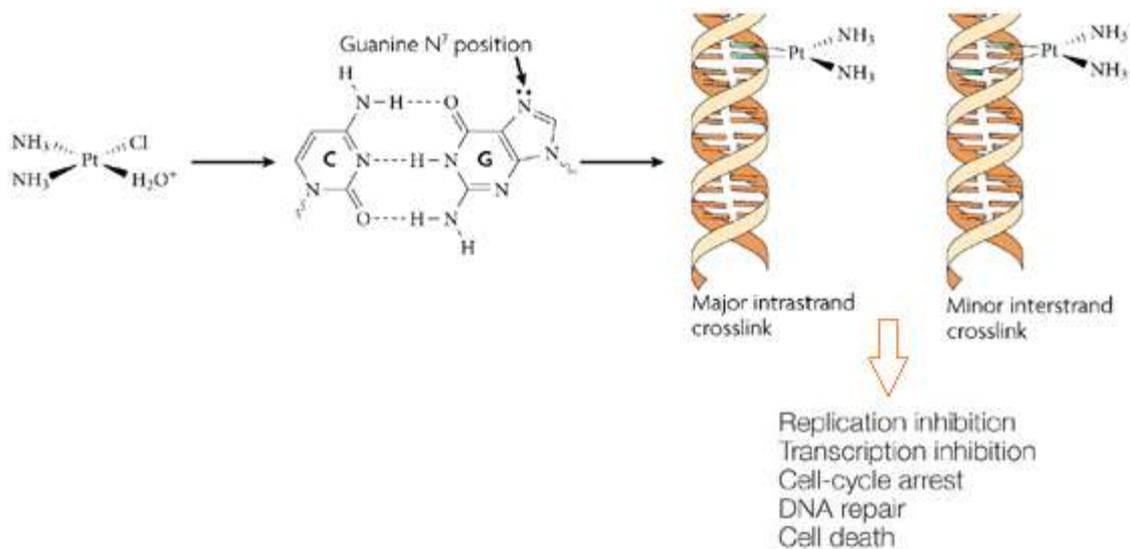


Figure 6 : Mécanisme d'action du cisplatine (un agent alkylant).²³

Les agents alkylants sont regroupés en trois familles selon leur structures chimiques à savoir les moutardes à l'azote, les nitrosourés et les dérivés du platine **Figure 7**.

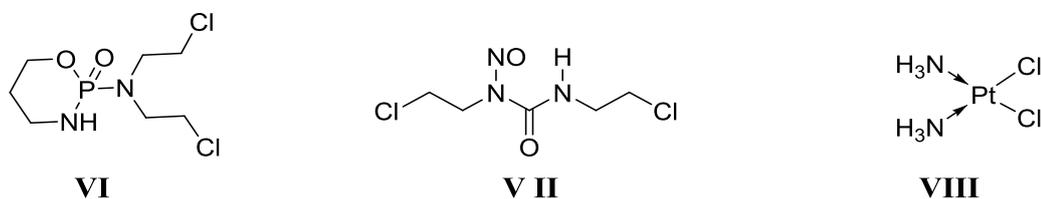


Figure 7 : Agents alkylants anticancéreux : cyclophosphamide VI (moutarde à l'azote), carmustine VII (nitrosouré), cisplatine VIII (dérivé du platine).

2.3. Les antimétabolites

Les antimétabolites sont des molécules qui ont des structures similaires aux bases de l'ADN et qui ciblent la synthèse des acides nucléiques. Grâce à cette analogie structurale ils inhibent les enzymes intervenant dans le métabolisme des acides nucléiques et forment aussi des nucléotides qui ne peuvent être incorporés dans l'ADN.²⁴En fonction de leur analogie structurale avec les bases de l'ADN, on distingue les antagonistes pyrimidiques et les agonistes puriques (Figure 8).

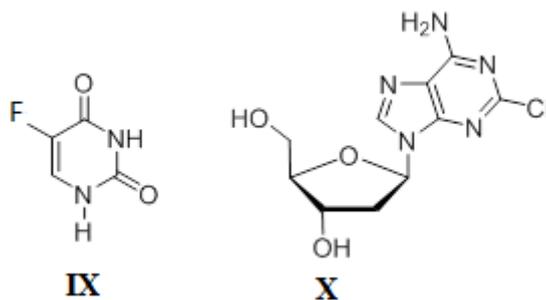


Figure 8 : structure des antimétabolites IX : 5-fluoracyle (antiprimidique), X : Cladribine (agoniste purique).

2.4. Les poisons du fuseau cellulaire

Le fuseau cellulaire est constitué des microtubules qui sont visualisés dans la cellule au moment de la division cellulaire. Les poisons du fuseau cellulaire agissent en inhibant la polymérisation des microtubules, c'est le cas des vincalcaloïdes et des combréstatines, ou en inhibant la dépolymérisation des microtubules c'est le cas des taxanes (Figure 9) .²⁵

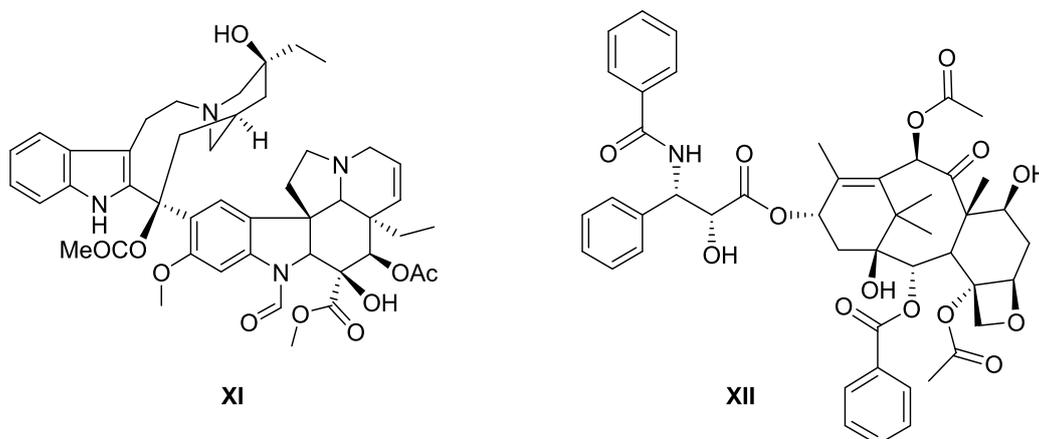


Figure 9 : Structure de la vincristine XI (vincalcaloïde) et du Taxole XII (taxane)

Au cours de ce projet, nous avons synthétisé et testé les effets de molécules dérivées des indéno[1,2-c] Jusqu'à présent plus de 300 dérivés de ces molécules ont été synthétisés et étudiées pour leurs propriétés antiprolifératives sur les lignées de cellules cancéreuses par une action inhibitrice des topoisomères I et II.^{26,27,28}

3. Origines des indéno[1,2-c]isoquinoléine-5,11-diones

Les indénoisoquinoléines-5,11-diones sont des molécules d'origine synthétiques. L'intérêt pour leur synthèse a débuté dans les années 1978,²⁹ lorsque une analogie cytotoxique³⁰ et mécanistique entre la NSC314622³¹, l'une des premières indénoisoquinoléines, avec la

camptothécine qui était à l'époque le seul inhibiteur de topoisomérases approuvé en clinique fut découverte. De plus, les dérivés de la NSC 314622 (indotécan et indimitecan) ont montré de meilleures propriétés pharmacologiques comparées à celles des dérivés de la camptothécine (Figure 10 : l'irrinotécan et le topotécan). En effet, les dérivés de la NSC314622 sont plus stables à pH physiologique par rapport aux dérivés de la camptothécine qui contiennent un cycle lactone qui s'hydrolyse à pH physiologique. Les complexes de clivage ADN-topoisomérases générés par les dérivés d'indénoisoquinoléines sont plus stables que ceux générés par les dérivés de la camptothécine.³¹ Les dérivés d'indénoisoquinoléines ne sont pas des substrats de pompes à efflux multidrugs résistant ABCG2 et MDR-1 comme c'est le cas avec les dérivés de la camptothécine.^{32,33}

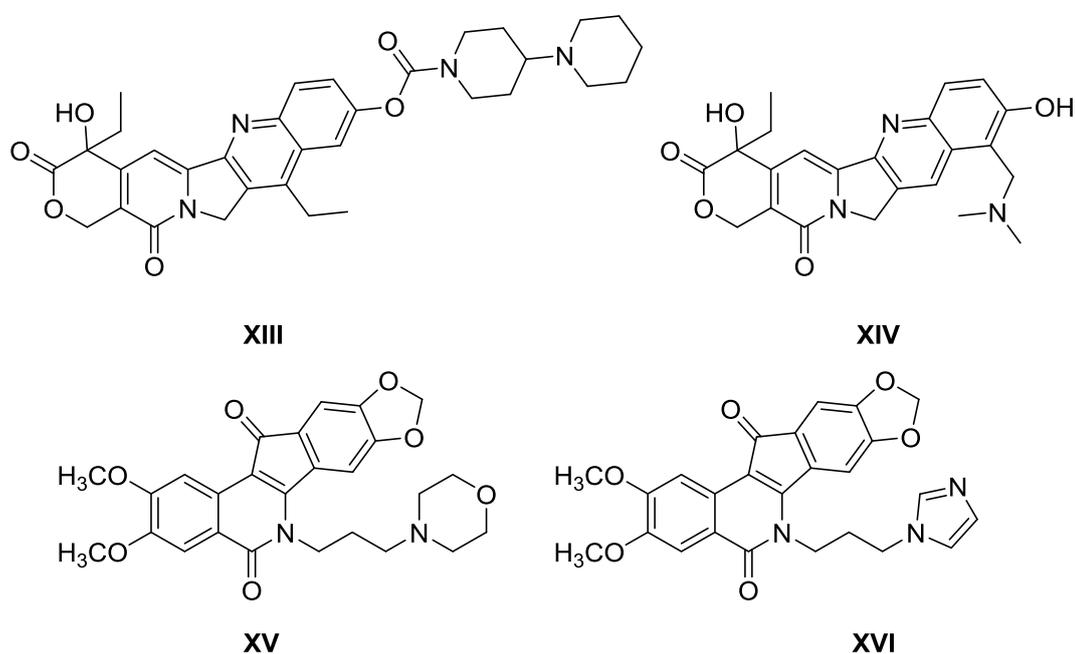


Figure 10 : Structures des dérivés de la camptothécine XIII (Irrinotecan), XIV (Topotecan) et des dérivés de la NSC314622 XV (indotecan), XVI (indimitecan)

Des modifications structurelles aboutissant aux dérivés organiques ont été effectuées sur les différentes parties du cycle indénopyrandione (XVII) par l'équipe du Pr Pommier dont certaines de ces molécules sont des poisons de topoisomérases I,^{34,35,36,37,38} puis par des chercheurs de l'université de Lille 2 qui ont découvert l'AL 60 (Figure 11 : XVIII) la première indénoisoquinoléine inhibitrice de topoisomérases II,³⁹. Par la suite, dans la perspective de trouver des molécules de la famille des indénoisoquinoléines de plus en plus actives, Gang a continué la synthèse des indénoisoquinoléines aboutissant à d'autres inhibiteurs de topoisomérases II (Figure 11: XIX, XX)^{40,27}.

La synthèse des dérivés indenoisoquinolines possédant des entités organométalliques, notamment le ferrocène, a commencé au laboratoire UCCS équipe CASECO, à l'Université de Lille 1. En collaboration avec des biologistes, il a été découvert que certaines indénoférocéniques telle que la **XXI** (Figure 11) possèdent des propriétés inhibitrices de topoisomérase II et des cytotoxicités (définies par des IC₅₀ variant de 0,95 à 10 µM) sur les cellules cancéreuses MDA-MB231.⁴¹

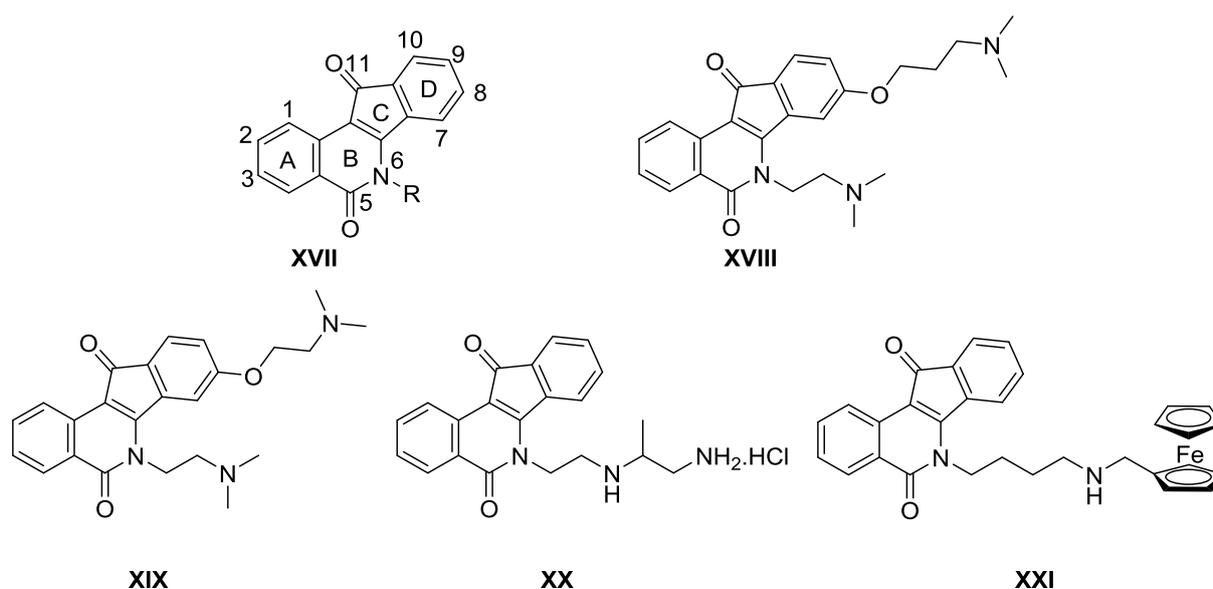


Figure 11 : structure du cycle indénopyranedione (XVII), AL60 (XVIII), Indénoisoquinoléines poisons de topoisomérase II (XIX, XX, XXI).

Ces résultats encourageants ont permis de tenter la diversification du type de métal à travers la synthèse des complexes métalliques de Cu(II), Zn(II), Ru(II) dérivés des ligands indénoisoquinoléines par les chercheurs de l'UCCS en collaboration avec le laboratoire de chimie inorganique appliquée de l'Université de Yaoundé 1 (Cameroun), dont les structures sont présentées à la Figure 12. Les propriétés antiprolifératives de ces structures ont été étudiées au cours de notre projet sur les lignées cellulaires MDA-MB231, MCF7, HeLa, HEK293, HT29, et DU145 .

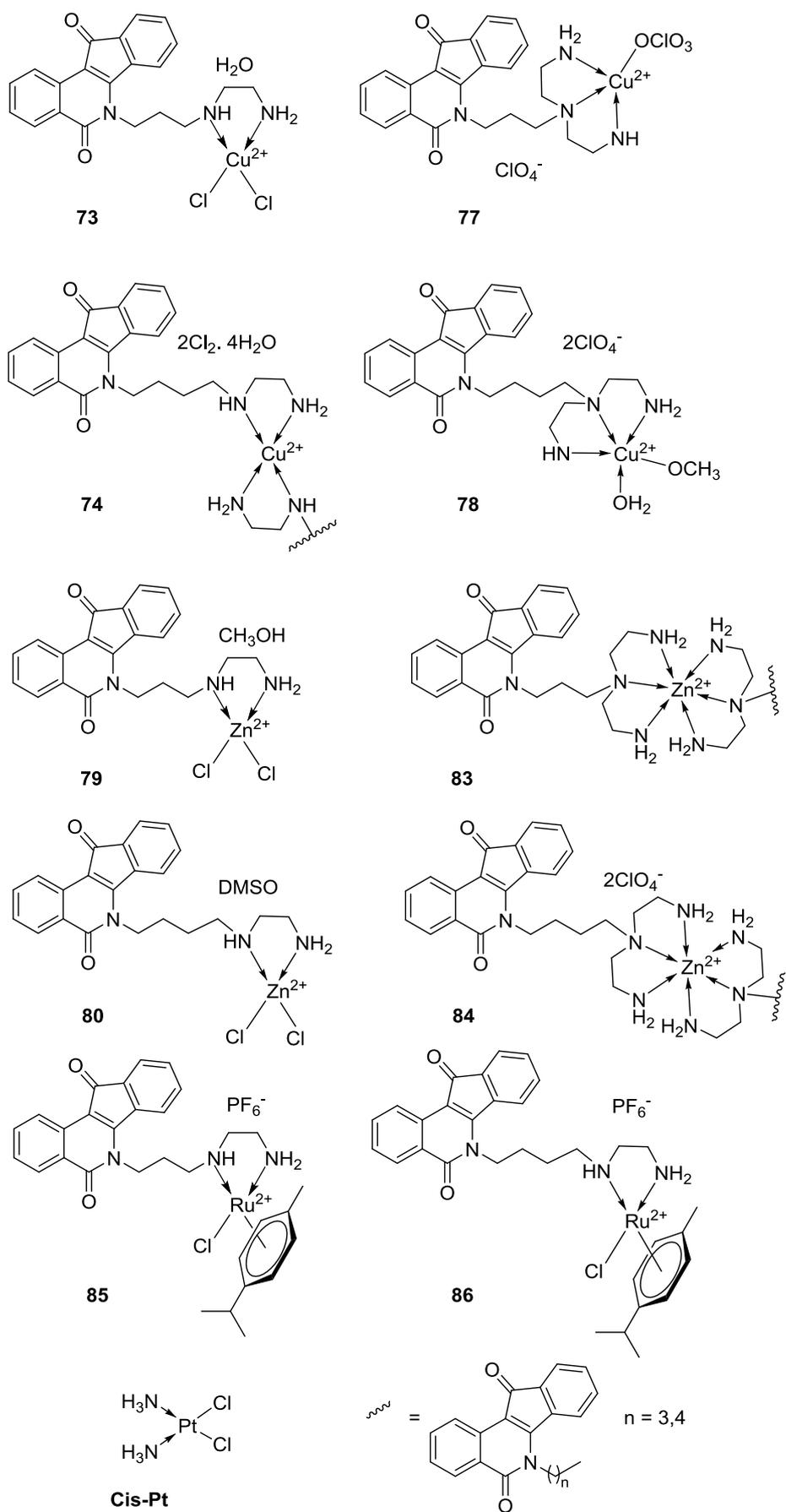


Figure 12 : Structures des indénoisoquinoléines étudiées

Chapitre 2 : Partie expérimentale

Dans cette partie nous décrivons les expériences qui ont été utilisées pour la détermination de la cytotoxicité des composés par la méthode colorimétrique au MTS CellTiter 96 Aqueous one Solution Cell Prolifération Assay Kit (Promega).

1. Préparation des solutions mère de composés

Des masses de composés ont été dissoutes dans des volumes de 2 mL de DMSO à des concentrations de 1.10^{-3} M. Les solutions obtenues ont été stockées à 4 °C. puis utilisées pour les différentes dilutions dans le milieu de culture cellulaire.

2. Culture cellulaire.

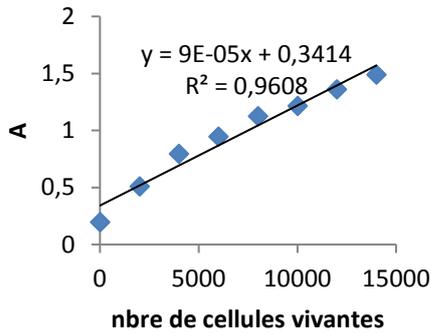
Le milieu de culture cellulaire a été préalablement préparé comme suit : à 450 mL de DMEM (Dulbécoc Modified Eagle Medium) ont été ajoutés 50 mL de SVF (Sérum de Veau Fœtal), 5 mL d'acides aminés non essentiels, 2 mL de pénicilline-Streptomycine. L'ensemble a été mélangé et stocké à 4 °C.

Les lignées cellulaires MDA-MB-231, MCF7, Hela, DU145, HEK 293 et HT29 ont étéensemencées dans du milieu DMEM. A confluence, les cellules sont décollées par l'addition de trypsine-EDTA et réensemencées, puis stockées dans un incubateur à 37 °C sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂.

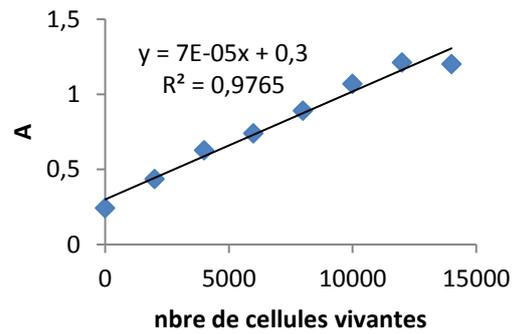
3. Détermination des IC₅₀

Pour évaluer la cytotoxicité des molécules, l'inhibition de croissance est évaluée à l'aide du test MTS, CellTiter 96 Aqueous one Solution Cell Prolifération Assay Kit (Promega). Les cellules vivantes sont capables de réduire le colorant MTS en un produit coloré soluble, le formazan. L'absorbance du formazan à 490 nm est alors proportionnelle au nombre de cellules vivantes, comme le montre les courbes d'absorbance du formazan à 490 nm, après une heure de contact des cellules avec le MTS pour chaque lignée cellulaire (Figure 13)

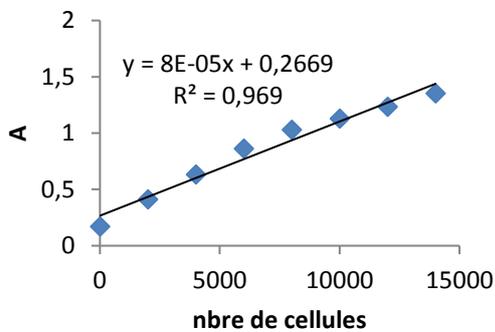
MDA-MB-231



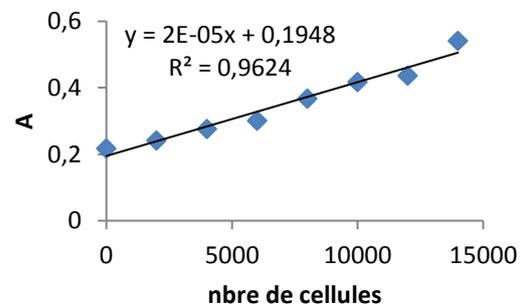
MCF7



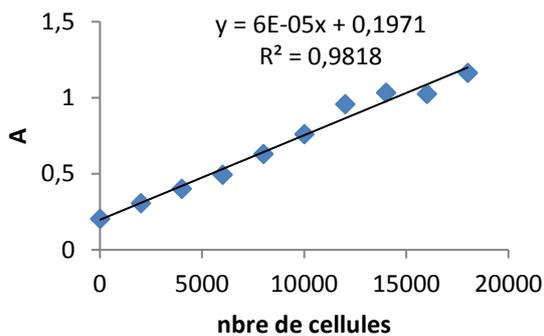
Hela



HEK 293



HT29



DU145

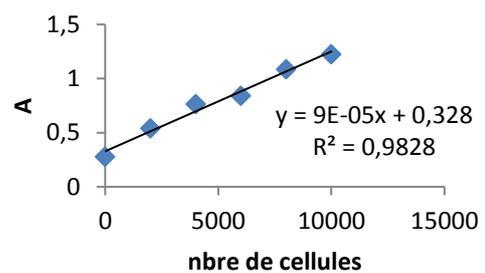
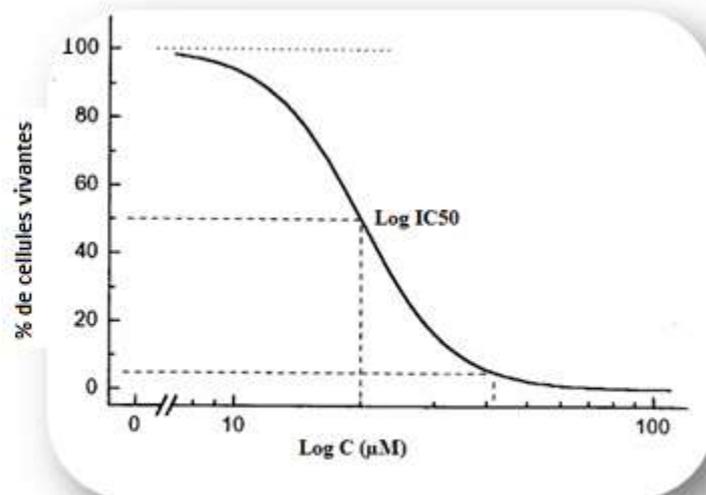


Figure 13 : Courbes d'absorbances du formazan en fonction du nombre de cellules pour chaque lignée cellulaire utilisée

Dans des plaques de 96 puits, 2000 cellules sontensemencées par puits dans 100 μ L de milieu. Après 24 h de culture, le milieu est aspiré et remplacé par 100 μ L de milieu contenant

les composés aux concentrations suivantes : 50 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM , 0,5 μM , 0,1 μM , 0,05 μM , 0,01 μM , 0 μM (Figure 14 A). Dans les puits ne contenant pas les cellules, on dépose 100 μL de milieu afin de servir de « blanc ». Après 72 h d'incubation, on ajoute 20 μL de réactif MTS dans chaque puits et on mesure l'absorbance à 492 nm après une heure d'incubation à 37°C. Les résultats obtenus sont exprimés selon une courbe dose-effet exprimant le pourcentage de cellules viables en fonction de la concentration du composé (Figure 14 B). On peut ainsi déterminer la concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) : concentration de composé pour laquelle on observe une réduction de 50% de la population cellulaire viable par rapport à un contrôle négatif.

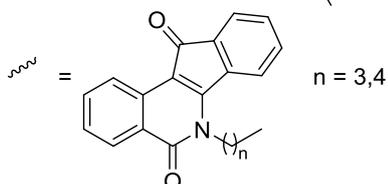
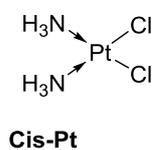
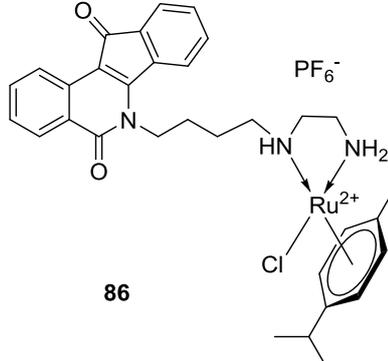
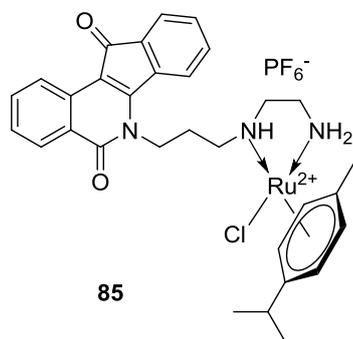
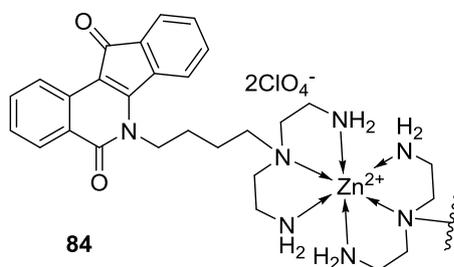
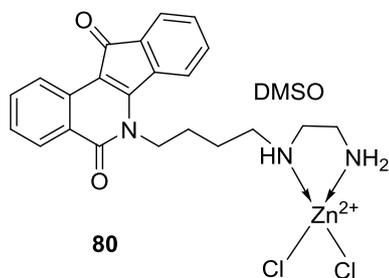
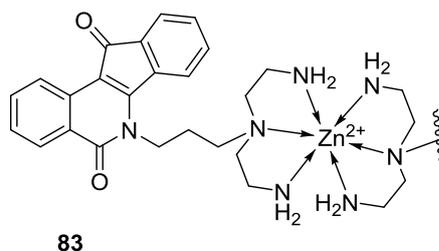
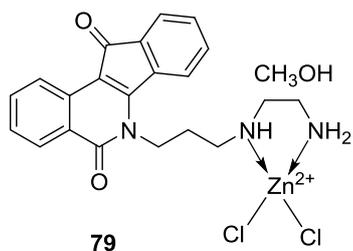
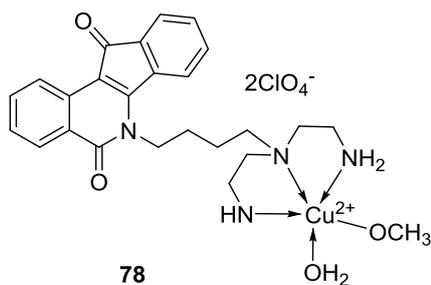
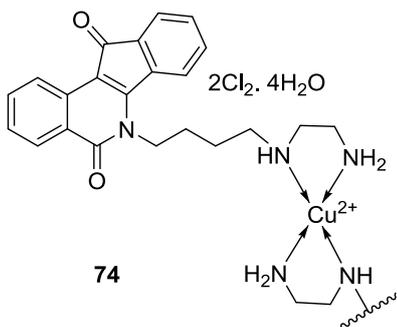
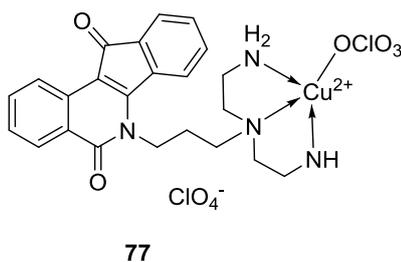
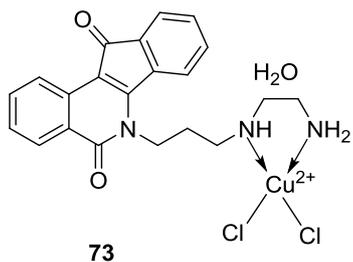


B

Figure 14 : Plaque 96 puits (A), courbe dose effet permettant de calculer la CI₅₀ (B).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Rappel des Structures des composés testés



2. Etude de la cytotoxicité des complexes de Cu(II) et Zn(II)

Les tests de cytotoxicité des ligands (L1, L2, L5 et L6) et de leurs complexes organométalliques respectifs ont été effectués sur les lignées cellulaires du cancer du sein non hormono-dépendant MDA-MB-231, hormono-dépendant MCF7, de l'utérus HeLa, du rein HEK 293, du colon HT29, et de la prostate DU-145. La Figure 15 représente l'histogramme des CI_{50} des ligands et de leurs complexes respectifs de Cu^{2+} et de Zn^{2+} sur l'ensemble des lignées cellulaires cancéreuses. De cette figure, il ressort que les CI_{50} varient de 0,14 μM (composé **74**) à 1,3 μM (composé **77**). Le complexe **74** est celui qui affiche la meilleure cytotoxicité par rapport aux autres composés sur toutes les lignées. Seul le résultat obtenu pour la lignée MCF7 ($CI_{50} = 0,7 \mu M$) est supérieur au ligand L5(**65**) ($CI_{50} 0.12 \mu M$).

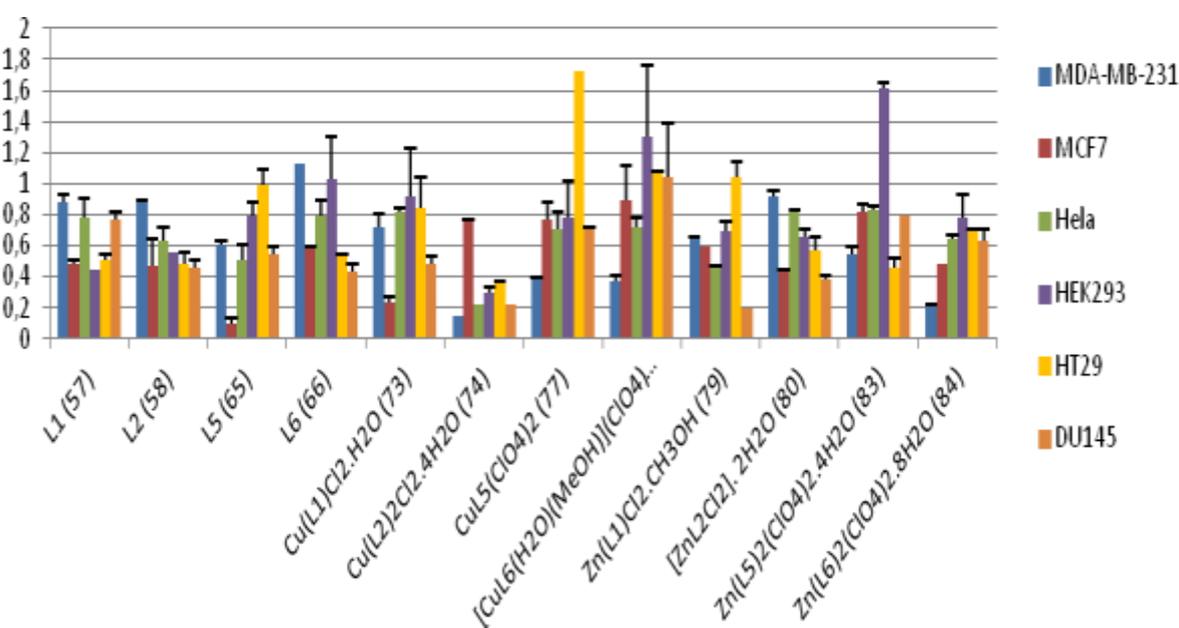


Figure 15 : Histogramme des CI_{50} des ligands et de leurs complexes sur les lignées cellulaires MDA-MB-231, MCF7, HeLa, HEK293, HT29, DU145.

Sur la lignée MDA-MB-231, le composé **65** est le plus actif dans la série de ligands. Le complexe **74** est le plus cytotoxique (0,14 μM) sur la série des complexes de Cu^{2+} et le complexe **84** est le plus actif sur la série des complexes de Zn^{2+} . Plus intéressant, les complexes de Cu^{2+} et de Zn^{2+} sont plus cytotoxiques sur cette lignée que leur ligand respectif, en outre les complexes Cu^{2+} ont des cytotoxicités presque égales à celles de leur analogue de Zn^{2+} (Figure 16).

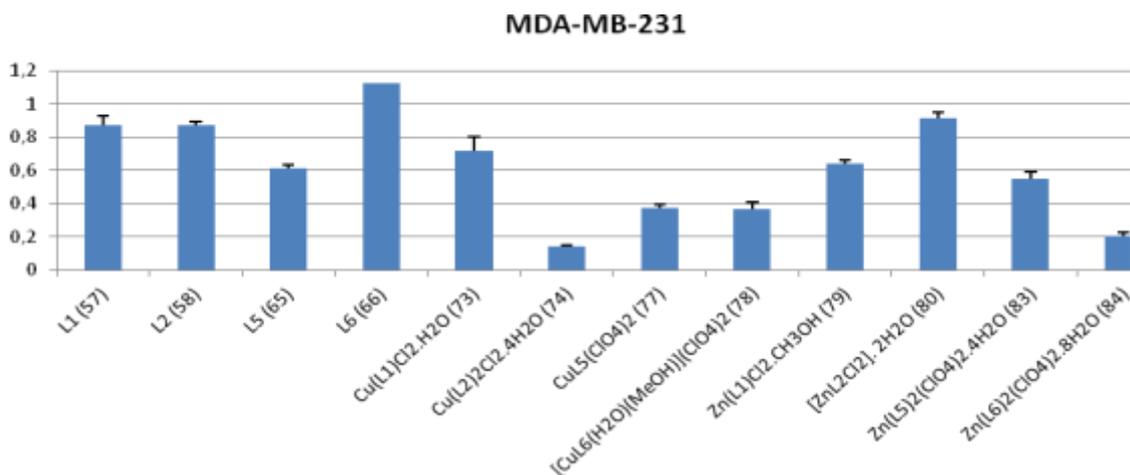


Figure 16 : Cytotoxicité des composés sur la lignée MDA-MB-231

Par contre, les tests de cytotoxicité sur la lignée cellulaire MCF-7 révèlent que les ligands sont légèrement plus cytotoxiques que leurs complexes respectifs de Cu^{2+} et de Zn^{2+} , à l'exception du complexe de Cu^{2+} **73** qui est plus cytotoxique que son ligand (Figure 17).

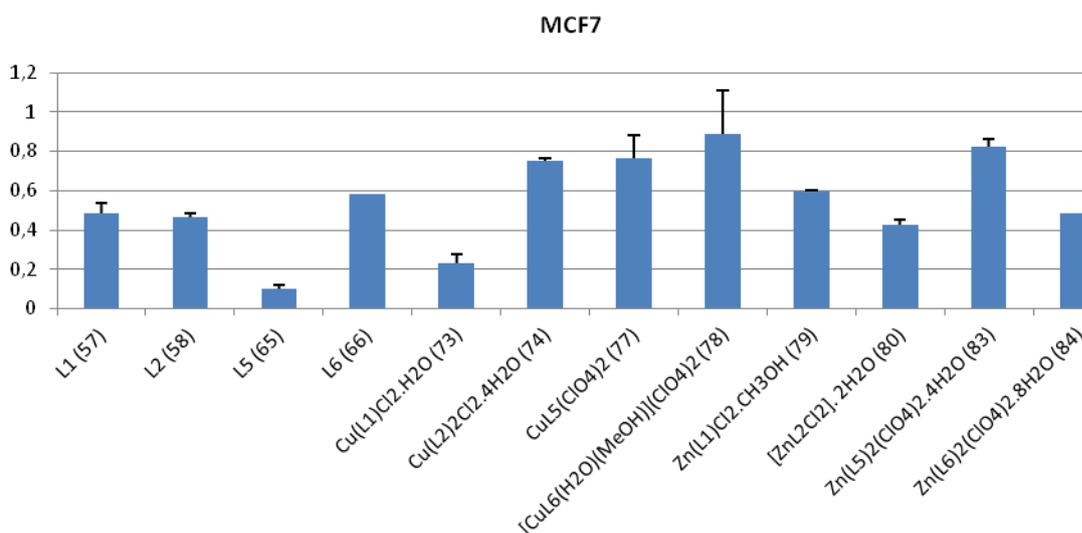


Figure 17 : Cytotoxicité des composés sur la lignée MCF7

De même que la lignée MCF7, les cytotoxicités des complexes de Cu^{2+} et de Zn^{2+} sont à peu près égales à celle de leur ligand respectif sur la lignée cellulaire Hela à l'exception du complexe de Cu^{2+} **74** déjà mentionné comme étant le plus cytotoxique sur toutes les lignées testées et du complexe de Zn^{2+} **79** (0,45 μM) plus cytotoxique que son ligand **57** (0,78 μM) (Figure 18).

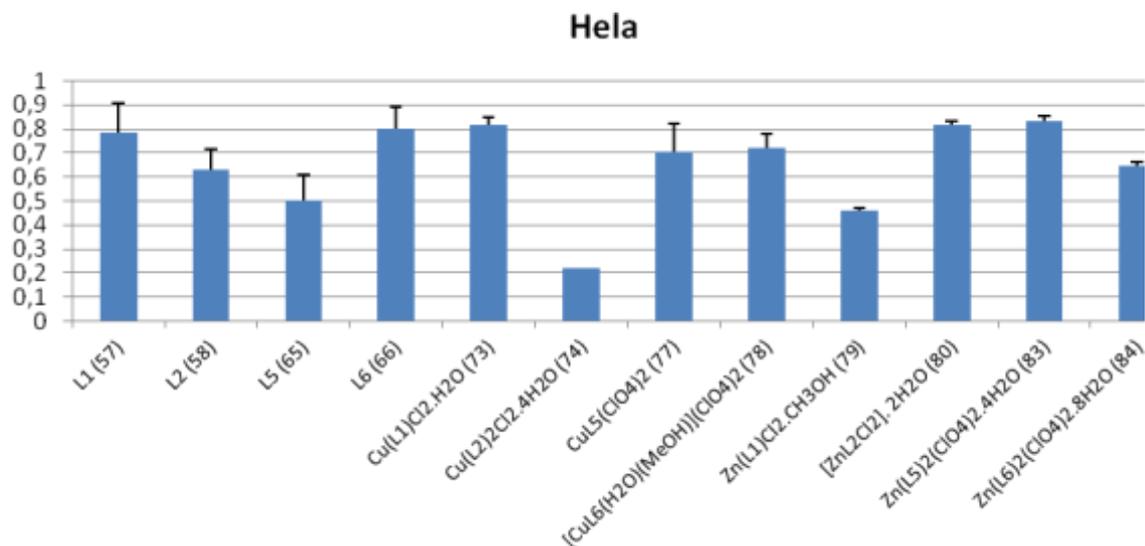


Figure 18 : Cytotoxicité des composés sur la lignée Hela

Contrairement aux lignées cellulaires précédentes, le ligand L1 s'avère le plus cytotoxique de tous les autres ligands L2, L5 et L6 sur la lignée cellulaire HEK293. Nous notons que le ligand **66** reste le moins cytotoxique de la série des ligands jusqu'ici. Cependant le complexe de Zn^{2+} **84** ($0,77 \mu M$) est plus cytotoxique que son ligand de synthèse **66** ($1,03 \mu M$), alors que les autres complexes de Cu^{2+} et de Zn^{2+} ont des cytotoxicités sensiblement inférieures ou égales à celles de leur ligand respectif (Figure 19).

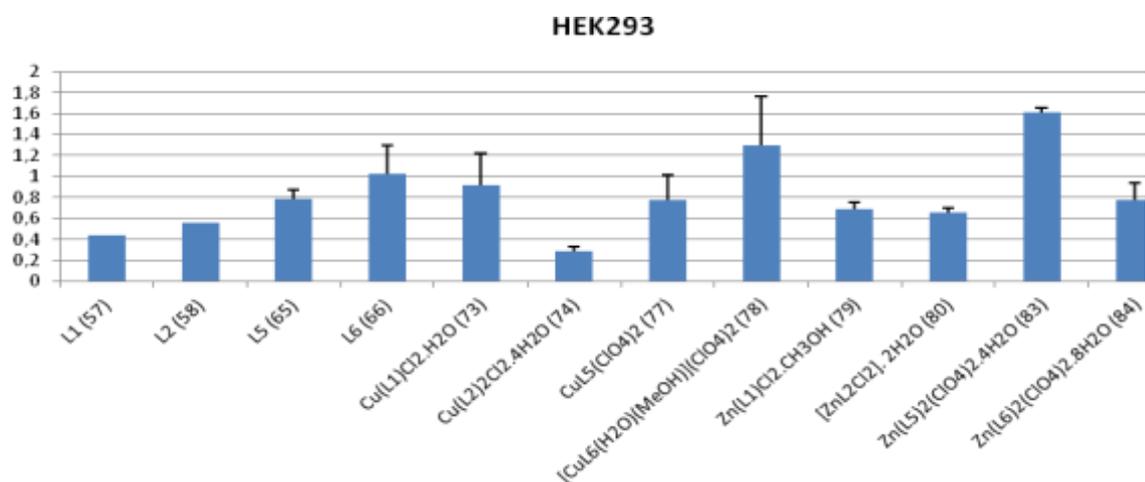


Figure 19 : Cytotoxicité des composés sur la lignée HEK293

Les ligands **57**, **58**, et **66** ont des valeurs de CI_{50} sensiblement égales à $0,5 \mu M$ alors que le ligand **65** à une CI_{50} de $1 \mu M$ sur la lignée cellulaire HT29. Leurs complexes de Cu^{2+} **73** et **77** sont moins cytotoxiques avec des valeurs de CI_{50} respectivement de $0,7$ et $1,8$ tandis que le complexe **78** ($1,06 \mu M$) a une cytotoxicité sensiblement égale à celle de son ligand. En outre le complexe de Zn^{2+} **79** ($1,04 \mu M$) a une valeur de CI_{50} double par rapport à celle de son ligand

57, le complexe **83** (0,45 μM) réduit de moitié la valeur de CI_{50} de son ligand **65**. Les complexes **80** (0,56 μM) et **84** (0,68 μM) ont des valeurs de CI_{50} sensiblement égales à celles de leurs ligands respectifs **58** et **66** (Figure 20).

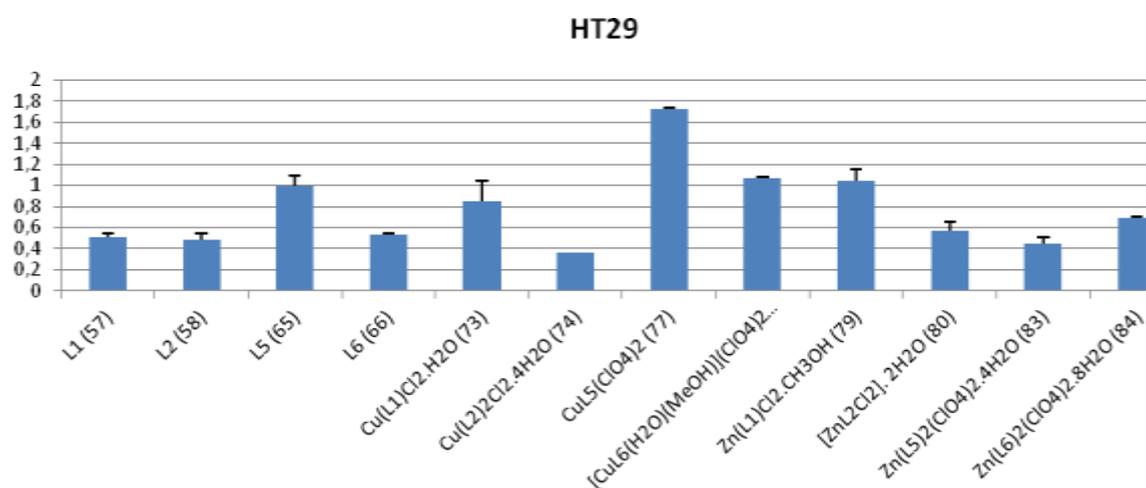


Figure 20 : Cytotoxicité des composés sur la lignée HT29

Les ligands **57** et **58** ont des CI_{50} respectives de 0,76 et 0,45 μM . Ces CI_{50} sont réduites pour leurs complexes respectifs de Cu^{2+} **73** (0,47 μM) et **74** (0,22 μM) et de Zn^{2+} **79** (0,19 μM) et **80** (0,38 μM). Par contre, les ligands **65** (0,54 μM) et **66** (0,43 μM) sont plus cytotoxiques que leur complexe respectif de Cu^{2+} **77** (0,71 μM) et **78** (1,04 μM) et de Zn^{2+} **83** (0,99 μM) et **84** (0,63 μM).

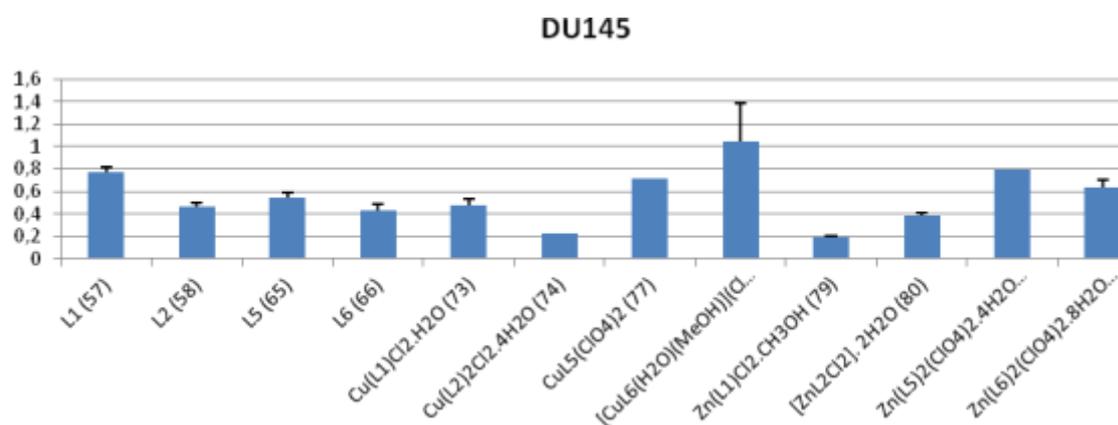


Figure 21 : cytotoxicité des composés sur la lignée DU145

3. Etude de la cytotoxicité des complexes de Ru^{2+}

La figure présente l'histogramme des cytotoxicités des complexes de Ru^{2+} sur les différentes lignées. De cette figure il ressort que le complexe **85** est 10 à 100 fois moins

cytotoxique que le complexe **86** sur les cinq premières lignées du diagramme. Ce résultat est en accord avec leur affinité à l'ADN puisque le complexe **85** interagit 4 fois moins avec l'ADN que son analogue **86**. (Figure 22).

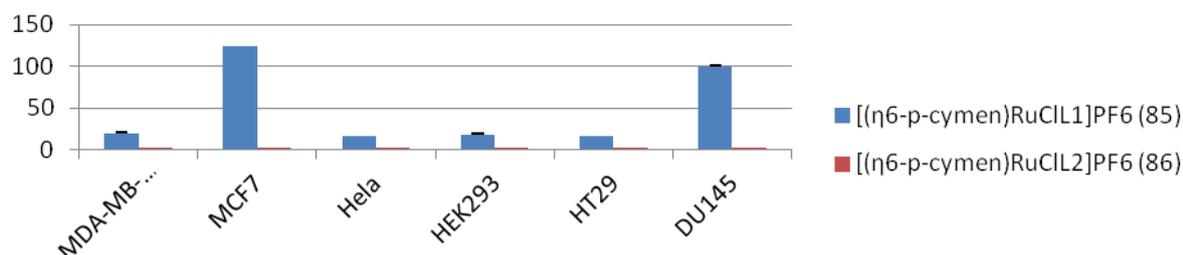


Figure 22 : Cytotoxicité des complexes de Ru²⁺ sur les lignées étudiées

4. Etude de la cytotoxicité du cis-platine

Enfin, nous avons réalisé des tests de cytotoxicité du cis-Platine sur nos lignées. Les résultats montrent que nos complexes de Cu²⁺ et de Zn²⁺ sont de 2 à 200 fois plus cytotoxiques que le cis-Pt. Le complexe de Ru²⁺ **85** a une cytotoxicité comparable à celle du cis-Pt (Figure 23). Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'il a été montré dans la littérature que les complexes de Ru et de Pt ont la même cinétique d'échange de ligand.⁴²

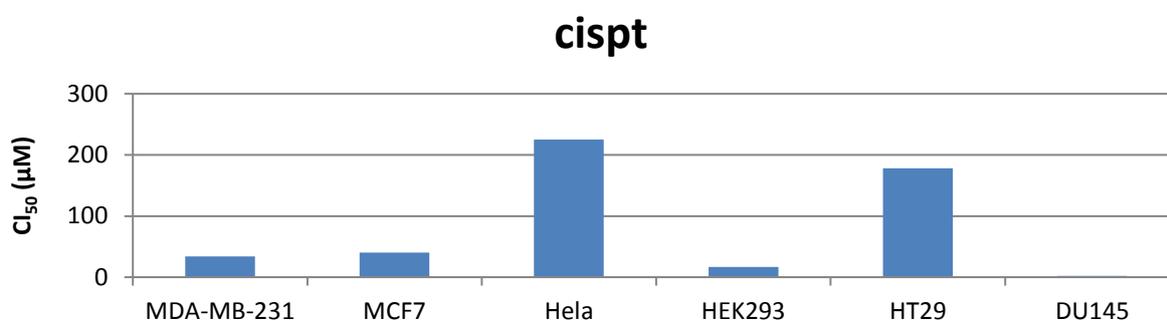


Figure 23 : Histogramme des CI₅₀ du Cis-platine

Le Tableau 1 présente les valeurs précises des CI₅₀ des composés sur les différentes lignées étudiées.

Tableau 1 : valeurs des CI₅₀ des composés

Composés	IC ₅₀ (μM)					
	MDA-MB-231	MCF-7	Hela	HEK 293	HT29	DU 145
L1 (57)	0,87±0,00	0,49±0,02	0,78±0,12	0,44±0,00	0,51±0,03	0,77±0,05
L2 (58)	0,87±0,01	0,46±0,17	0,63±0,09	0,56±0,00	0,48±0,07	0,45±0,04
L5 (65)	0,6±0,02	0,12±0,04	0,50±0,10	0,79±0,08	0,99±0,09	0,54±0,05
L6 (66)	1,12±0,01	0,58±0,02	0,79±0,09	1,03±0,27	0,53±0,01	0,43±0,05
73	0,72±0,08	0,23±0,04	0,81±0,03	0,91±0,31	0,84±0,19	0,47±0,05
74	0,14±0,01	0,75±0,02	0,22±0,00	0,29±0,04	0,36±0,00	0,22±0,00
77	0,38±0,02	0,76±0,11	0,70±0,11	0,77±0,24	1,72±0,01	0,71±0,01
78	0,37±0,04	0,89±0,22	0,72±0,06	1,30±0,46	1,06±0,02	1,04±0,34
79	0,64±0,02	0,59±0,00	0,46±0,01	0,69±0,06	1,04±0,01	0,19±0,01
80	0,92±0,03	0,43±0,02	0,82±0,01	0,66±0,04	0,57±0,08	0,38±0,02
83	0,55±0,04	0,82±0,04	0,83±0,02	1,61±0,04	0,45±0,06	0,79±0,00
84	0,21±0,02	0,49±0,00	0,65±0,01	0,77±0,16	0,69±0,01	0,63±0,07
85	19,16±1,85	124,43±0,0	15,37±0,89	18,07±0,4	16,30±0	100±0,64
86	1,04±0,01	1,10±0,04	1,64±0,33	0,79±0,02	2,027±0,2	0,93±0,08
cis-Pt	33,80±1,27	40,39±11,9	225,32±6,3	16,47±1,1	178±14	2,3±0,04

Conclusion

Au cours de ce travail il était question d'étudier la cytotoxicité des complexes de Cu(II), Zn(II), Ru(II) dérivés des ligands indénoisoquinoléines sur les lignées de cellules cancéreuses MDA MB231, MCF7, Hela, HEK293, HT29, DU145.

Après culture et entretien des cellules, le test colorimétrique au MTS nous a permis de déterminer les concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀). La comparaison des différentes CI₅₀ en fonction des structures révèle que d'une manière générale les complexes de cuivre et de zinc sont plus cytotoxiques que leur ligands respectifs, que les complexes de cuivre sont plus cytotoxiques que ceux de zinc, eux même plus cytotoxiques que ceux du ruthénium (Figure 24 page suivante). Aussi le complexe de cuivre 74 est celui qui affiche la meilleure cytotoxicité variant de 0,15µM à 0,35µM sur cinq lignées cellulaires, les MCF7 faisant figure d'exception. Une partie de nos résultats sur le ruthénium est publié dans la revue « Organometallics » et présenté dans le chapitre suivant.

Ces résultats seront complétés à l'avenir par une analyse de l'effet produit sur le cycle cellulaire. La phase d'arrêt dans le cycle cellulaire sera déterminée pour les composés les plus actifs. Des tests d'inhibition des topoisomérase I et II seront également pratiqués pour connaître la cible de chacun des composés les plus actifs.

Notre étude a ainsi permis de révéler des composés potentiellement intéressants dans des stratégies anti-cancéreuses.

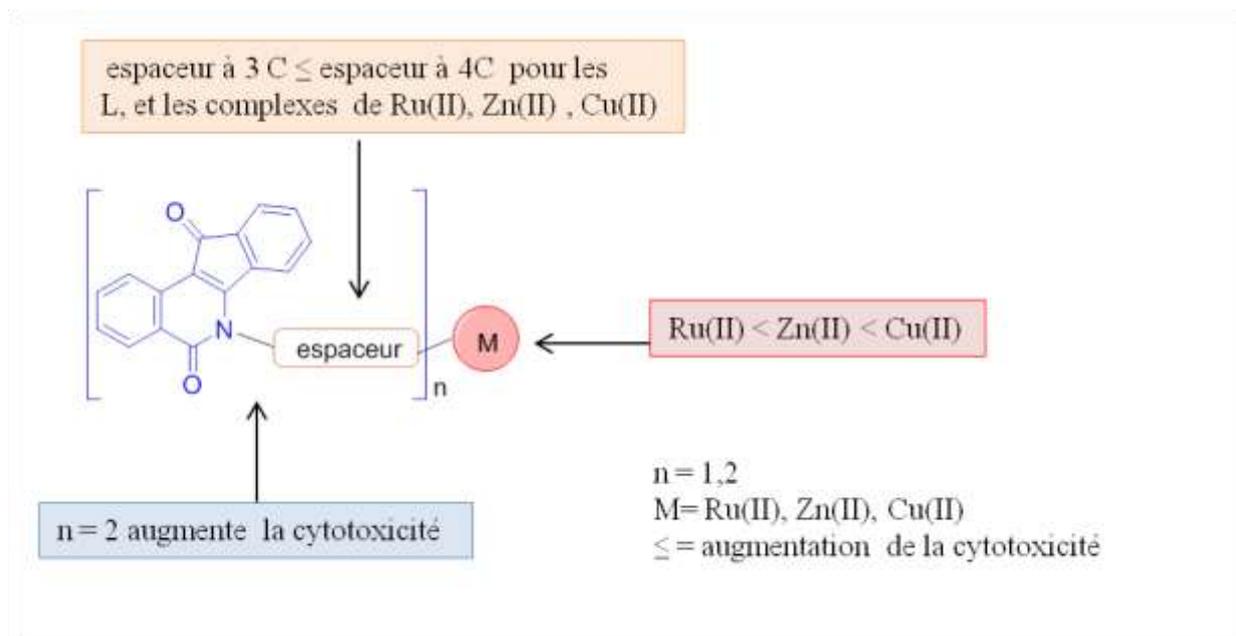


Figure 24 : Relation structure activité des complexes de Cu(II), Zn(II), Ru(II) et de leur ligand par rapport à leur cytotoxicité.

Références Bibliographiques

- (1) Mathew L. Coleman, C. J. M. & M. F. O. RAS and RHO GTPases in G1-Phase Cell-Cycle Regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5 (5), 355–366.
- (2) Claire E. Walczak, S. C. & A. K. Mechanisms of Chromosome Behaviour during Mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, 11, 91–102.
- (3) Galluzzi, L.; Pedro, J. M. B.; Vitale, I.; Aaronson, S. A.; Abrams, J. M.; Adam, D.; Alnemri, E. S.; Altucci, L.; Andrews, D. Essential versus Accessory Aspects of Cell Death : Recommendations of the NCCD 2015. **2015**, 58–73.
- (4) Galluzzi, L.; Vitale, I.; Abrams, J. M.; Alnemri, E. S.; Baehrecke, E. H.; Blagosklonny, M. V; Dawson, T. M.; Dawson, V. L.; El-deiry, W. S. Molecular Definitions of Cell Death Subroutines : Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **2012**, 107–120.
- (5) Spriggs, K. A.; Bushell, M.; Willis, A. E. Review Translational Regulation of Gene Expression during Conditions of Cell Stress. *Mol. Cell* **2010**, 40 (2), 228–237.
- (6) Block, K. I.; Gyllenhaal, C.; Lowe, L.; Amedei, A.; Amin, A. R. M. R.; Amin, A.; Aquilano, K.; Arbiser, J. Designing a Broad-Spectrum Integrative Approach for Cancer Prevention and Treatment. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, 35S, S276–S304.
- (7) Biyi, a; Benrais, N.; Albouzidi, A.; Benomar, S. Mécanisme de La Carcinogénèse à La Lumière Des Données de La Biologie Moléculaire. *Médecine du Maghreb* **1998**, 69, 1–7.
- (8) Eb, A. van der. USA FDA CTR For Biologics Evaluation and Research Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting. *USA FDA CTR Biol. Eval. Res. Vaccines Relat. Biol. Prod. Advis. Comm. Meet.* **2012**, No. USAFDA lines 14-22, 81.
- (9) Hill, M.; Iaa, N. W. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by D N A from Human Adenovirus Type 5. No. 2977.
- (10) Stepanenko, A. A.; Dmitrenko, V. V. HEK293 in Cell Biology and Cancer Research : Phenotype , Karyotype , Tumorigenicity , and Stress-Induced Genome-Phenotype Evolution. *Gene* **2015**, 569 (2), 182–190.

- (11) Fogh J, Fogh JM, O. T. One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice. *J Natl Cancer Inst.* **1977**, 59 (1), 221–226.
- (12) Cohen, E.; Ophir, I.; Shaul, Y. Ben. Induced Differentiation in HT29 , a Human Colon Adenocarcinoma Cell Line. **1999**, 2666, 2657–2666.
- (13) Nautiyal, J.; Kanwar, S. S.; Yu, Y.; Majumdar, A. P. N. Combination of Dasatinib and Curcumin Eliminates Chemo-Resistant Colon Cancer Cells. *J. Mol. Signal.* **2011**, 6 (1), 7.
- (14) Stone, K. R.; Mickey, D. D.; Wunderli, H.; Mickey, G. H.; Paulson, D. F. Isolation of. **1978**, 281, 274–281.
- (15) Champoux, J. J. DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, 70, 369–416.
- (16) Hsiang, Y.-H.; Liu, L. F.; Wall, M. E.; Wani, M. C.; Allan W. Nicholas, G. M.; Stanley Kirschenbaum, R. S.; Potmesil, M. DNA Topoisomerase I-Mediated DNA Cleavage and Cytotoxicity of Camptothecin Analogues. *Cancer Res.* **1989**, 49 (16), 4396–4389.
- (17) Fortune, J. M.; Osheroff, N. Topoisomerase II as a Target for Anticancer Drugs: When Enzymes Stop Being Nice. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2000**, 64, 221–253.
- (18) Yves Pommier; Schwartz, R. E.; Kohn, K. W.; Zwelling, L. A. Formation and Rejoining of Deoxyribonucleic Acid Double-Strand Breaks Induced in Isolated Cell Nuclei by Antineoplastic Intercalating Agents.
- (19) Cells, L. K.; Elifa, T. K. H.; Hasinoff, B. B.; Abram, M. E.; E, N. B.; Allan, W. P.; Yalowich, J. C. The Catalytic DNA Topoisomerase II Inhibitor Dextrazoxane (ICRF-187) Induces Differentiation and Apoptosis in Human. **2001**, 59 (3), 453–461.
- (20) Pommier, Y.; Leo, E.; Zhang, H.; Marchand, C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chem. Biol.* **2010**, 17 (5), 421–433.
- (21) Oronsky, B. T.; Reid, T.; Knox, S. J.; Scicinski, J. J. The Scarlet Letter of Alkylation : A Mini Review of Selective Alkylating Agents. **2012**, 5 (4), 226–229.
- (22) Kondo, N.; Takahashi, A.; Ono, K.; Ohnishi, T. DNA Damage Induced by Alkylating Agents and Repair Pathways. **2010**, 2010.

- (23) Lebwohl, D.; Canetta, R. Clinical Development of Platinum Complexes in Cancer Therapy: An Historical Perspective and an Update. *European Journal of Cancer*. 1998, pp 1522–1534.
- (24) Krynetskaia, N.; Xie, H.; Vucetic, S.; Obradovic, Z.; Krynetskiy, E. High Mobility Group Protein B1 Is an Activator of Apoptotic Response to Antimetabolite Drugs. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *73* (1), 260–269.
- (25) Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as a Target for Anticancer Drugs. *Nature Reviews Cancer*. 2004, pp 253–265.
- (26) Cushman, M.; Jayaraman, M.; Vroman, J. A.; Fukunaga, A. K.; Fox, B. M.; Kohlhagen, G.; Strumberg, D.; Pommier, Y. Synthesis of New indeno[1,2-C]isoquinolines: Cytotoxic Non-Camptothecin Topoisomerase I Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (20), 3688–3698.
- (27) Ahn, G.; Schifano-Faux, N.; Goossens, J. F.; Baldeyrou, B.; Couture, A.; Grandclaude, P.; Lansiaux, A.; Ryckebusch, A. Synthesis, Cytotoxicity and Topoisomerase Inhibition Properties of Multifarious Aminoalkylated indeno[1,2-C]isoquinolin-5,11-Diones. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (8), 2259–2263.
- (28) Wambang, N.; Schifano-Faux, N.; Aillerie, A.; Baldeyrou, B.; Jacquet, C.; Bal-Mahieu, C.; Bousquet, T.; Pellegrini, S.; Ndifon, P. T.; Meignan, S.; Goossens, J.; Lansiaux, A.; Pélinski, L. Synthesis and Biological Activity of Ferrocenyl indeno[1,2-C]isoquinolines as Topoisomerase II Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *11*, 1–10.
- (29) Cushman, M.; Cheng, L. Stereoselective Oxidation by Thionyl Chloride Leading to the indeno[1,2-C]isoquinoline System. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3781–3783.
- (30) Paull, K. D.; Shoemaker, R. H.; Hodes, L.; Monks, a; Scudiero, D. a; Rubinstein, L.; Plowman, J.; Boyd, M. R. Display and Analysis of Patterns of Differential Activity of Drugs against Human Tumor Cell Lines: Development of Mean Graph and COMPARE Algorithm. *J. Natl. Cancer Inst.* **1989**, *81* (14), 1088–1092.
- (31) Kohlhagen, G.; Paull, K. D.; Cushman, M.; Nagafuji, P.; Pommier, Y. Protein-Linked DNA Strand Breaks Induced by NSC 314622, a Novel Noncamptothecin Topoisomerase I Poison. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54* (1), 50–58.

- (32) Antony, S.; Agama, K. K.; Miao, Z. H.; Takagi, K.; Wright, M. H.; Robles, A. I.; Varticovski, L.; Nagarajan, M.; Morrell, A.; Cushman, M.; Pommier, Y. Novel Indenoisoquinolines NSC 725776 and NSC 724998 Produce Persistent Topoisomerase I Cleavage Complexes and Overcome Multidrug Resistance. *Cancer Res.* **2007**, *67* (21), 10397–10405.
- (33) Brangi, M.; Litman, T.; Ciotti, M.; Nishiyama, K.; Kohlhagen, G.; Takimoto, C.; Robey, R.; Pommier, Y.; Fojo, T.; Bates, S. E. Camptothecin Resistance: Role of the ATP-Binding Cassette (ABC), Mitoxantrone-Resistance Half-Transporter (MXR), and Potential for Glucuronidation in MXR-Expressing Cells. *Cancer Res.* **1999**, *59* (23), 5938–5946.
- (34) Nagarajan, M.; Morrell, A.; Fort, B. C.; Meckley, M. R.; Antony, S.; Kohlhagen, G.; Pommier, Y.; Cushman, M. Synthesis and Anticancer Activity of Simplified Indenoisoquinoline Topoisomerase I Inhibitors Lacking Substituents on the Aromatic Rings. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (23), 5651–5661.
- (35) Morrell, A.; Antony, S.; Kohlhagen, G.; Pommier, Y.; Cushman, M. Synthesis of Nitrated Indenoisoquinolines as Topoisomerase I Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (14), 3659–3663.
- (36) Peterson, K. E.; Cinelli, M. A.; Morrell, A. E.; Mehta, A.; Dexheimer, T. S.; Agama, K.; Antony, S.; Pommier, Y.; Cushman, M. Alcohol-, Diol-, and Carbohydrate-Substituted Indenoisoquinolines as Topoisomerase I Inhibitors: Investigating the Relationships Involving Stereochemistry, Hydrogen Bonding, and Biological Activity. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (14), 4937–4953.
- (37) Strumberg, D.; Pommier, Y.; Paull, K.; Jayaraman, M.; Nagafuji, P.; Cushman, M. Synthesis of Cytotoxic Indenoisoquinoline Topoisomerase I Poisons. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (3), 446–457.
- (38) Xiao, X.; Antony, S.; Kohlhagen, G.; Pommier, Y.; Cushman, M. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Cytotoxic 11-Aminoalkenylindenoisoquinoline and 11-Diaminoalkenylindenoisoquinoline Topoisomerase I Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **2004**, *12* (19), 5147–5160.
- (39) Ryckebusch, A.; Garcin, D.; Lansiaux, A.; Goossens, J.-F.; Baldeyrou, B.; Houssin, R.;

- Bailly, C.; Hénichart, J.-P. Synthesis, Cytotoxicity, DNA Interaction, and Topoisomerase II Inhibition Properties of Novel indeno[2,1-C]quinolin-7-One and indeno[1,2-C]isoquinolin-5,11-Dione Derivatives. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (12), 3617–3629.
- (40) Ahn, G.; Lansiaux, A.; Goossens, J.; Bailly, C.; Baldeyrou, B.; Schifano-Faux, N.; Grandclaudeon, P.; Couture, A.; Ryckebusch, A. Indeno[1,2-C]isoquinolin-5,11-Diones Conjugated to Amino Acids: Synthesis, Cytotoxicity, DNA Interaction, and Topoisomerase II Inhibition Properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (22), 8119–8133.
- (41) Wambang, N.; Schifano-Faux, N.; Aillerie, A.; Baldeyrou, B.; Jacquet, C.; Bal-Mahieu, C.; Bousquet, T.; Pellegrini, S.; Ndifon, P. T.; Meignan, S.; Goossens, J.; Lansiaux, A.; Péliniski, L. Synthesis and Biological Activity of Ferrocenyl indeno[1,2-C]isoquinolines as Topoisomerase II Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *24* (4), 1–10.
- (42) Reedijk, J. Metal-Ligand Exchange Kinetics in Platinum and Ruthenium Complexes: Significance for Effectiveness as Anticancer Drugs. *Platin. Met. Rev.* **2008**, *52* (1), 2–11.

Article

Synthesis, Structure and Antiproliferative Activity of Ruthenium(II) Arene Complexes of Indenoisoquinoline Derivatives

Nathalie Wambang,^{†,‡} Nadège Schifano-Faux,[§] Alain Martoriati,[#] Natacha Henry,[†] Brigitte Baldeyrou,[§] Christine Bal-Mahieu,[§] Till Bousquet,[†] Sylvain Pellegrini,[†] Samuel Meignan,[§] Katia Cailliau,[#] Jean-François Goossens,[§] Jean-François Bodart,[#] Peter T. Ndifon,[‡] and Lydie Pélinski^{†,*}

[†] Univ. Lille, CNRS, ENSCL, UMR 8181 - UCCS - Unité de Catalyse et Chimie du Solide, F-59000 Lille, France

[‡] Univ. Yaoundé 1, Laboratoire de Chimie de Coordination, BP 812, Yaoundé, Cameroun

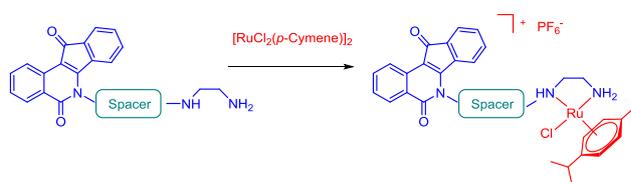
[§] Univ. Lille, EA 7365 - GRITA - Groupe de Recherche sur les formes Injectables et les Technologies Associées, F-59000 Lille, France

[#] Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France

[§] Univ. Lille, Inserm, U908 - CPAC - Cell Plasticity and Cancer, F-59000 Lille, France

Supporting Information Placeholder

ABSTRACT: Novel ruthenium complexes of indenoisoquinoline derivatives were synthesized and characterized. The structure of the complex **9** was determined by single crystal X-ray crystallography. Ruthenium complexes displayed strong DNA interactions. The cytotoxic activity of the complexes was tested against five cancer cell lines (MDA-MB-231, MCF-7, HEK-293, HT-29 ad DU-145).



INTRODUCTION

Metal-based compounds have become the most widely used chemotherapeutic agents. In particular, platinum complexes such as cisplatin, carboplatin and oxaliplatin are widely used in the clinical treatment of a broad range spectrum of cancer.¹ Ruthenium complexes are also considered to be one of the most promising types of metal-based drugs.² Particularly, two Ru(III) species, KP1019 **1** and NAMI-A **2**, are presently undergoing clinical trials (Figure 1).³ In addition, some Ru(II) complexes, such as RAPTA-C **3** and Ru(II)(arene) complexes of bidentate ethylenediamine **4**, exhibit interesting *in vitro* and *in vivo* anticancer activity and are already under preclinical evaluation (Figure 1).⁴ Recently, indenoisoquinolines have been identified as novel topoisomerase I inhibitors exhibiting better pharmacokinetic features and greater chemical stability than camptothecin.⁵ In particular, two anticancer agents, indotecan **5** (LMP400) and indimitecan **6** (LMP776), were promoted to a Phase I clinical trial at the National Institute of Health. Interestingly, structural modifications of the indenoisoquinolines induced good topoisomerase II inhibition properties.⁶

As part of our ongoing effort to develop metal-based indenoisoquinoline derivatives as anticancer agents,⁷ we report our preliminary results on the preparation and the characterization of Ru(II)-arene complexes **8** and **9** containing diamines as ligand. Their cytotoxicities on cancer cell lines and their DNA interaction were evaluated. (Figure 2).

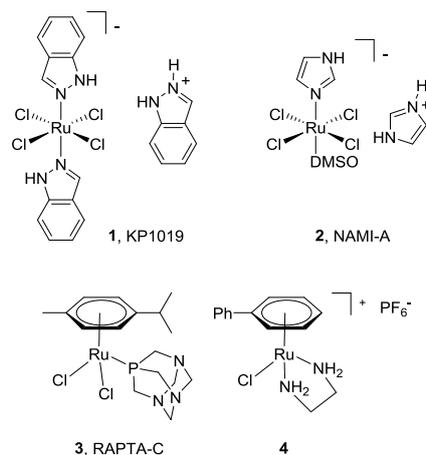


Figure 1 Ruthenium anticancer agents.

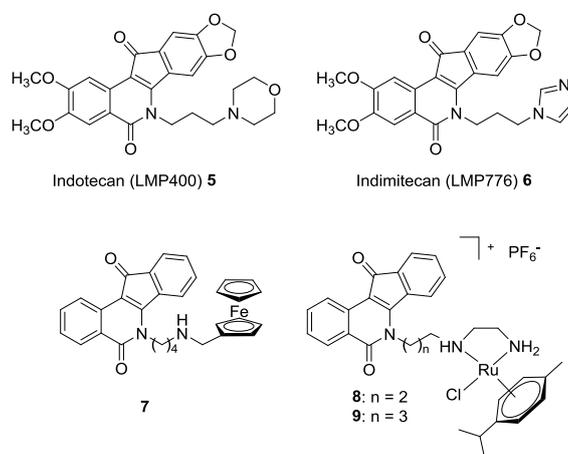


Figure 2 Indenoisoquinoline derivatives.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and characterization. The synthesis of ruthenium complexes **8** and **9** are described in Scheme 1. Indenoisoquinolines **11** and **12** were first obtained in a four step reaction. Condensation of the benzo[*d*]indeno[1,2-*b*]pyran-5,11-dione **10** with a primary aminoalcohol was followed by tosylation of the alcohol function. The substitution of the tosyl group by the protected ethylenediamine and the consecutive deprotection of the Boc group led to the indenoisoquinolines **11** and **12** in 65-68% global yield. Their complexation in the presence of [(*p*-cymene)RuCl₂]₂ in ethanol followed by an exchange of chloride by hexafluorophosphate afforded the ruthenium indenoisoquinolines **8** and **9** in 95% and 88% yields respectively.⁸

The structure of **9** was established by single crystal X-ray analysis. The drawing is displayed in Figure 3. The Ru-complex **9** crystallizes in the triclinic space group *PT* with two formula units per unitcell. As can be seen in Figure 3, the

complex shows a mononuclear structure in which the Ru(II) atom is four coordinated by one chlorine atom, an arene ligand and two nitrogen atoms from the indenoisoquinoline-diamine ligand.

The compound **9** demonstrated good stability in water and in BPE buffer as no significant change of their UV-Vis absorption spectra over a period of 24 h was observed (Figure S3, ESI).

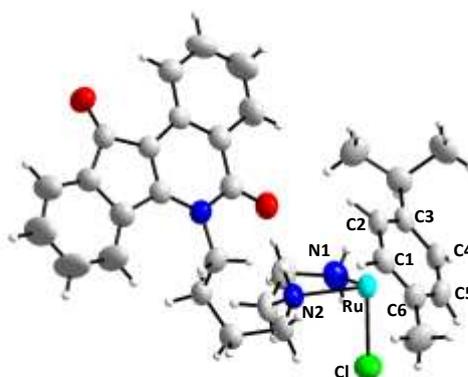


Figure 3 Molecular structure of Ru-complex **9** showing the local geometry around the Ruthenium and ligand. Selected bond lengths (Å) and angles (°): Ru–N1, 2.128 (4); Ru–N2, 2.167 (4); Ru–Cl, 2.3893 (15); Ru–C1, 2.167 (4); Ru–C2, 2.167 (5); Ru–C3, 2.191(5); Ru–C4, 2.178 (5); Ru–C5, 2.168 (5); Ru–C6, 2.209 (5); N1–Ru–N2, 79.60 (15); N1–Ru–Cl, 85.04 (13); N2–Ru–Cl, 86.88 (11).

Additionally, the ESI-MS of complex **9** has been acquired to understand its relative composition and stability. ESI-MS spectra were recorded directly after dissolution in water and after 2 and 6 h. Besides the anticipated parent mass peaks, a peak at m/z (**9**-HCl) was also observed and was attributed to the cleavage of the Ru-Cl bond. This result suggests that the chlorine atom of the Ru-complex is highly labile. An identical ESI-MS profile was obtained when the complex **9** was dissolved in acid solution at pH = 2.7. It can be noted that the cleavage of the Ru-Cl bond is more important in an acidified aqueous solution than in water (Figures S4 and S5, ESI)

Biological studies. The ability of drugs to protect calf thymus DNA (CT DNA, 42% GC bp) against thermal denaturation was used as an indicator of the relative capacity of indenoisoquinoline derivatives to bind and to stabilize the DNA double helix. ΔT_m values are reported in Table 1.⁹ The ruthenium complexes **8** and **9** displayed similar ΔT_m values (21°C for **8** and for **9**, drug/DNA ratio = 1). Binding affinities were determined using a fluorescence method. Since a weak intrinsic fluorescence was observed for our compounds, an indirect method was preferred.¹⁰

Scheme 1. Synthesis of Ruthenium Complexes.

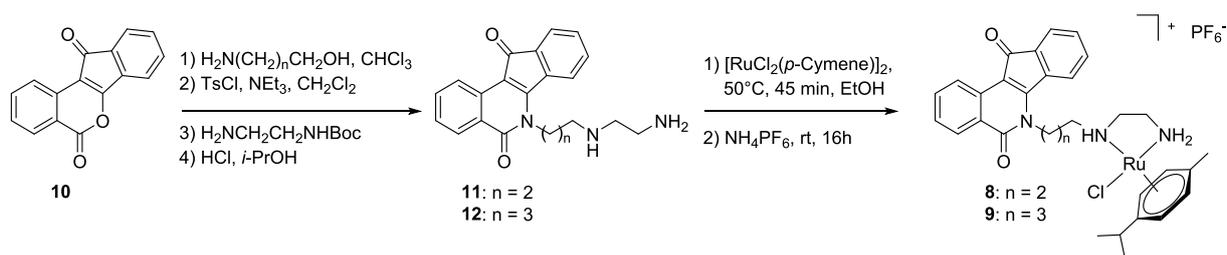


Table 1. Interaction of Ruthenium complexes with DNA and IC₅₀ values (μM) against human cancer cells after 72h.^a

Compd	ΔT_m (°C) ^b	K_{app} (10 ⁷ M ⁻¹) ^c	IC ₅₀ (μM)				
			MDA-MB-231	MCF-7	HEK-293	HT-29	DU-145
8	21	0.76±0.07	19.16 ± 1.85	>50	18.07 ± 0.64	16.30 ± 0.10	>50
9	21	3.19±0.01	1.04 ± 0.10	1.10 ± 0.40	0.79 ± 0.09	2.02 ± 0.20	0.93 ± 0.11
Cisplatin	Nd ^d	Nd	33.80 ± 1.27	40.39 ± 11.96	± 16.47 ± 1.61	178 ± 14	2.30 ± 0.40

^a Drug concentration that inhibits cell growth by 50% after incubation for 72h. Data are the mean of at least three independent experiments. ^b Variations in melting temperature ($\Delta T_m = T_m^{\text{drug-DNA complex}} - T_m^{\text{DNA alone}}$) at ratio of 1. ^c Apparent binding constant measured by fluorescence using $[EB]/[DNA] = 1.26$. ^d Not determined.

We used the conventional fluorescence quenching assay based on DNA binding competition between the intercalating drug ethidium bromide (EB) and the tested molecules. Indeed, EB displacement studies were performed to have deep insight into both binding affinities with DNA and the binding mode. Intrinsic fluorescence of compounds was firstly verified.⁹ The apparent DNA binding constant K_{app} values were calculated using the equation: $K_{app} = 1.26K_{app}(EB)/IC_{50}$ with $K_{app}(EB) = 10^7 M^{-1}$ and IC_{50} in μM . In agreement with ΔT_m , Ru-complexes have good binding affinities with DNA. However, it should be noted that complex **9**, possessing four methylene units, exhibited a higher K_{app} value ($K_{app} = 3.19 \cdot 10^7 M^{-1}$) than the complex **8** ($K_{app} = 0.76 \cdot 10^7 M^{-1}$) (Table 1).

The antiproliferative activity of ruthenium complexes was tested on breast cancer (MDA-MB-231 and MCF-7) and human embryonic kidney (HEK-293), colon carcinoma (HT-29) and prostate cancer (DU-145) cell lines using a colorimetric cell proliferation assay. Cisplatin was used as reference compound. The ability of ruthenium complexes to inhibit the growth of cancer cells is summarized in Table 1. The Ru-complex **9** exhibited excellent antiproliferative activities with IC_{50} values ranging from 0.79 to 1.10 μM . This compound was found to be more effective than the platinum compound cisplatin with the five cancer cell lines. The complex **8**, possessing three methylene units, is less active than its analogue **9** with four methylene units.

CONCLUSION

In summary, new ruthenium complexes containing an indenoisoquinoline scaffold were synthesized. The molecular structure of complex **9** has been confirmed by single-crystal X-Ray diffraction analysis. These compounds displayed strong DNA interaction and excellent cytotoxic activities against five cancer cell lines. These preliminary results will be continued by biological studies. Particularly, the influence of the complexation of the indenoisoquinoline amines by other metals will be investigated.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemistry. All commercial reagents and solvents were used without further purification. Melting points were determined with a Barnstead Electrothermal (BI 9300) capillary melting point apparatus and are uncorrected. The 1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker AC300 spectrometer at 300 and 75.5 MHz respectively using tetramethylsilane (TMS) as internal standard and DMSO- d_6 as solvent. HRMS experiments were performed on Q Exactive Benchtop LC-MS/MS (Thermo Scientific). ESI-MS studies were realized on a Orbitrap LTQ XL (ThermoFisher) in positive ionization (NanoESI, $1 \mu L/min$, complex concentration 80 pmol/ μL in water/DMSO: 95/5). Thin layer chromatography (TLC) was carried out on aluminium-baked Macherey-Nagel silica gel 60. Column chromatography was performed on silica gel (230-400 mesh). The electronic absorption spectra were acquired on a UV-Vis double beam spectrophotometer SPECORD[®] PLUS (Analytikjena). The molar conductance measurement was carried out using a CDRV 62 Tacussel electronic bridge, employing a calibrated $10^{-2} M$ KCl solution and $10^{-3} M$ solutions of compounds in DMSO. Purities of all tested compounds were $\geq 95\%$, as estimated by HPLC analysis. HPLC analyses were performed on a Thermo Finnigan using a 5 μM C18 Gravity Nucleodur column. Elemental analyses were performed with a varioMICRO analyser. Ligands **11** and **12** were synthesized according to the literature procedure.^{6b}

Ruthenium complex 9: To a solution of [$(\eta^6$ -*p*-cymene)RuCl $_2$] $_2$ (56 mg, 0.09 mmol) in dry ethanol (20 mL) was added diamine **11** (63 mg, 0.18 mmol). After stirring at 50°C for 45 min, the reaction mixture was filtered and NH $_4$ PF $_6$ (100 mg, 0.6 mmol) was added to the filtrate. After standing at room temperature for 16h, the solvent was removed and the powder was recrystallized in a mixture methanol/ether to give orange crystals (133 mg, 95% yield). Anal. Calc. for C $_{31}$ H $_{35}$ ClF $_6$ N $_3$ O $_2$ PRu.H $_2$ O: C, 47.67; H, 4.77; N, 5.38; Found: C, 47.69; H, 4.71; N, 5.31. M.p. 202°C. 1H NMR (DMSO- d_6) δ 8.63 (d, $^3J_{HH} = 7.8$ Hz, 1H, ArH), 8.28 (d, $^3J_{HH} = 7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.87 (m, 2H, ArH), 7.63 (m, 2H, ArH), 7.57 (m, 2H, ArH), 6.71 (br s, 1H, NH), 6.48 (br s, 1H, NH), 5.63-5.54 (m, 4H, PhH), 4.58 (m, 2H, CONCH $_2$), 3.75 (br s, 1H, NH), 3.25 (m, 2H, CH $_2$), 3.00 (m, 1H, CHMe $_2$), 2.77 (m, 2H, CH $_2$), 2.26 (m, 3H, CH $_2$), 2.16 (s, 3H, CH $_3$), 1.85 (b, 1H, CHH), 1.20 (d, $^3J_{HH} = 6.9$ Hz, 3H, CH $_3$), 1.12 (d, $^3J_{HH} = 6.9$ Hz, 3H, CH $_3$). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 189.9, 162.9, 156.2, 136.4, 134.4, 134.0, 133.9, 131.8, 131.4, 128.1, 127.2, 123.9, 122.8, 122.7, 122.6, 107.2, 105.6, 94.6, 82.2, 82.0, 81.2, 79.2, 51.2, 49.8, 40.3, 40.1, 30.0, 28.2, 22.3, 21.4, 16.8. Λ_m ($\Omega^{-1} \cdot cm^2 \cdot mol^{-1}$) 26. HRMS m/z (ESI) calcd for C $_{31}$ H $_{35}$ ClN $_3$ O $_2$ Ru (M)⁺ 618.1461 found 618.14551.

Ruthenium complex 9: To a solution of [$(\eta^6$ -*p*-cymene)RuCl $_2$] $_2$ (51 mg, 0.08 mmol) in dry ethanol (30 mL) was added diamine **12** (60 mg, 0.16 mmol). After stirring at 50°C for 45 min, the reaction mixture was filtered and NH $_4$ PF $_6$ (100 mg, 0.6 mmol) was added to the filtrate. After standing at room temperature for 16h, the solvent was removed and the powder was recrystallized in a mixture methanol/ether to give orange crystals (104 mg, 88% yield). Anal. Calc. for C $_{32}$ H $_{37}$ ClF $_6$ N $_3$ O $_2$ PRu.H $_2$ O: C, 48.34; H, 4.94; N, 5.28. Found: C, 48.38; H, 4.90; N, 5.33. Orange crystals, m.p. 178°C. 1H NMR (DMSO- d_6) δ 8.60 (d, $^3J_{HH} = 8.1$ Hz, 1H), 8.26 (d, $^3J_{HH} = 7.5$ Hz, 1H), 7.86 (t, $^3J_{HH} = 7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.80 (m, 1H, ArH), 7.63 (m, 2H, ArH), 7.56 (m, 2H, ArH), 6.57 (b, 1H), 6.44 (b, 1H), 5.66 (d, $^3J_{HH} = 6.0$ Hz, 1H, PhH), 5.63 (d, $^3J_{HH} = 6.0$ Hz, 1H, PhH), 5.57 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, PhH), 5.51 (d, $^3J_{HH} = 6.0$ Hz, 1H, PhH), 4.6 (m, 2H), 3.77 (m, 1H, CONCH $_2$), 3.71 (br s, 1H, NH), 3.13 (m, 2H, CH $_2$), 2.68 (m, 1H, CHMe $_2$), 2.46 (m, 2H, CH $_2$), 2.15 (s, 3H, CH $_3$), 1.83 (m, 4H, CH $_2$), 1.21 (d, $^3J_{HH} = 6.0$ Hz, 3H, CH $_3$), 1.19 (d, $^3J_{HH} = 6.0$ Hz, 3H, CH $_3$). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 189.9, 162.6, 156.1, 136.4, 134.4, 134.1, 133.9, 131.8, 131.4, 128.1, 127.2, 123.7, 122.8, 122.7, 122.6, 107.0, 105.7, 94.3, 82.2, 82.1, 81.1, 79.5, 54.4, 49.5, 45.0, 40.3, 30.1, 26.7, 25.3, 22.6, 21.1, 16.8. Λ_m ($\Omega^{-1} \cdot cm^2 \cdot mol^{-1}$) 30. HRMS m/z (ESI) calcd for C $_{32}$ H $_{37}$ ClN $_3$ O $_2$ Ru (M)⁺ 632.1618 found 632.1612.

X-ray Crystallography. Suitable crystal of Ru complex **9** [C $_{32}$ H $_{37}$ ClN $_3$ O $_2$ Ru, F $_6$ P, 0.5(H $_2$ O)] with approximate dimension 0.30 \times 0.05 \times 0.02 mm 3 was selected under polarizing optical microscope and glued on a glass fiber for a single-crystal X-ray diffraction experiment. X-ray intensity data were collected on a Bruker X8-APEX2 CCD area-detector diffractometer using Mo- K_α radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) with an optical fiber as collimator. Several sets of narrow data frames were collected at different values of θ (2.302 to 26.54°) and 2 initial values of ϕ and ω , respectively, using 0.3° increments of ϕ or ω . Data reduction was accomplished using SAINT V7.53a. The substantial redundancy in data allowed a semi-empirical absorption correction (SADABS)¹¹ to be applied, on the basis of multiple measurements of equivalent reflections. The structures were solved by direct methods (SHELXS)¹² and refined by full-matrix least-squares procedures (SHELXL) using Olex program.¹³ All non-hydrogen atoms were refined anisotropically. Hydrogen atoms

were included in the refinement at calculated positions using a riding model. The PF₆⁻ anions in the crystal structure were disordered over several orientations and were taking account by two different orientations.

Aqueous stability assays. Aqueous stability of the Ru-complex **9** was monitored using UV-Vis spectroscopy. Complex **9** was dissolved in DMSO and diluted with water or with BPE buffer to give 50 μM solution. The UV-vis peak profile of the sample was monitored for 24 h at 1h intervals. The temperature was kept constant at 25°C throughout.

Biological testing assay.

DNA and Drugs Solutions. Calf thymus DNA (CT DNA, Pharmacia) was deproteinized with sodium dodecyl sulfate (SDS, protein content less than 0.2%) and extensively dialyzed against the required experimental buffer. An extinction coefficient of 6600 M⁻¹cm⁻¹ was used to measure the nucleotide concentration of DNA solutions.^{9a} All synthesized compounds were dissolved as 10 mM solutions in DMSO. Further dilutions were made in the appropriate aqueous buffer.

Melting Temperature Studies. Melting curves were obtained using an Uvikon 943 spectrophotometer coupled to a Neslab RTE111 cryostat. To perform the melting temperature (*T*_m) measurements, CT DNA (20 μM) was incubated alone (control *T*_m) then, each compound was incubated with CT DNA at a drug/CT DNA ratio of 0.25, 0.5 and 1. Typically, 20, 10, 5 μM of the various drugs were prepared in 1 mL of BPE buffer (6 mM Na₂PO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7.1) in the presence or absence of 20 μM of CT DNA and transferred into a quartz cuvette of 10 mm path length. The absorbance at 260 nm was measured every minute over the range 20–100°C with an increment of 1°C per minute and the spectra were recorded from 230 to 500 nm and referenced against a cuvette containing the same DNA concentration in the same buffer. The *T*_m values were obtained from first-derived plots.

Fluorescence measurements. Fluorescence titration data were recorded at room temperature using a SPEX Fluorolog fluorometer. Since compounds show weak fluorescence intensity variation with DNA titration, the binding studies were carried out through a competitive displacement fluorimetry assay using DNA-bound ethidium bromide.^{10b} Excitation was set at 546 nm and the fluorescence emission was monitored over the range 490–630 nm. Experiments were performed with an ethidium bromide/DNA molar ratio of 12.6/10 and drug concentration ranges of 0.02–4 μM in a BPE buffer, pH 7.2. IC₅₀ values for ethidium bromide displacement were calculated using a fitting function incorporated into GraphPad Prism 3.0 software, and the apparent binding constant was calculated as follows: $K_{app} = (1.26/IC_{50})K_{ethidium}$, with $K_{ethidium} = 10^7 M^{-1}$.

Cell cultures and antiproliferative assay. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in DMEM medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, penicillin (100 IU/mL), and streptomycin (100 μg/mL). The cytotoxicity of the tested compounds was assessed using a cell proliferation assay developed by Promega (CellTiter 96 Aqueous one solution cell proliferation assay). Briefly, 2 × 10⁴ exponentially growing cells were seeded in 96-well microcultures plates with various drug concentrations in a volume of 100 μL. After 72h incubation at 37°C, 20 μL of the tetrazolium dye was added to each well and the samples were incubated for a further 1h at 37°C. Plates were analysed on a Labsystems Multiskan MS (type 352) reader at 492 nm.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website.

NMR of all new compounds, UV-Vis and ESI-MS spectra and crystallographic data for **9** (PDF and CIF)

AUTHOR INFORMATION

The contribution of authors was detailed as follows:

Performed the experiments: NW, NH, AM

Conceived and designed the experiments: LP, JFG.

Analyzed the data: NSF, JFG, SP, PTN.

Contributed reagents/materials/analysis tools: BB, CBM, SM, JFB

Wrote the paper: LP, TB, NSF, NW, JFG.

Corresponding Author

*Email for L.P.: lydie.pelinski@univ-lille1.fr

ACKNOWLEDGMENT

Chevreul institute (FR 2638), Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Région Nord – Pas de Calais and FEDER are acknowledged for supporting and funding this work. This research was supported by the “*Ligue contre le Cancer*” and the MUNDUS ACP II Project (grant for NW). Thanks are due to Dr Jérôme Vicogne (IBL, Lille) for providing cancer cells and to Arlette Lescuyer for cell culture. We are indebted to the Research Federation FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio) for providing the scientific and technical environment conducive to achieving this work. We thank Christian Rolando and Christophe Penverne for ESI-MS experiments.

REFERENCES

- (1) (a) Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3–25. (b) Bergamo, A.; Gaiddon, C.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H.; Sava, G. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *106*, 90–99. (c) Hartinger, C.; Dyson, P. J. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 391–401. (d) Arnesano, F.; Natile, G. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 2070–2081. (e) Hambley, T. W. *Dalton Trans.* **2007**, *21*, 4929–4937.
- (2) (a) Süß-Fink, G. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 1673–1688. (b) Bergamo, A.; Sava, G. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 7817–7823.
- (3) (a) Rademaker-Lakhai, J. M.; van den Bongard, D.; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; J. H. Schellens, J. H. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 3717–3727. (b) Trondl, R.; Heffeter, P.; Kowol, C. R.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Keppler, B. K. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2925–2932.
- (4) (a) Grozav, A.; Balacescu, O.; Balacescu, L.; Cheminel, T.; Berindan-Neagoe, I.; Therrien, B. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8475–8490. (b) Singh, A. K.; Pandey, D. S.; Xu, Q.; Braunstein, P. *Coord. Chem. Rev.* **2014**, *270–271*, 31–56. (c) Zhang, Y.; Zheng, W.; Luo, Q.; Zhao, Y.; Zhang, E.; Liu, S.; Wang, F. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 13100–13111. (d) Bonfili, L.; Pettinari, R.; Cuccioloni, M.; Cecarini,

- V.; Mozzicafreddo, M.; Angeletti, M.; Lupidi, G.; Marchetti, F.; Pettinari, C.; Eleuteri, A. M. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 2010–2020.
- (e) Wu, Q.; Chen, T.; Zhang, Z.; Liao, S.; Wu, X.; Wu, J.; Mei, W.; Chen, Y.; Wu, W.; Zeng, L.; Zheng, W. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 9216–9225.
- (f) Aird, R. E.; Cummings, J.; Ritchie, A. A.; Muir, M.; Morris, R. E.; Chen, H.; Sadler, P. J.; Jodrell, D. I. *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 1652–1657; (g) Adhireksan, Z.; Davey, G. E.; Campomanes, P.; Groessler, M.; Clavel, C. M.; Yu, H.; Nazarov, A. A.; Yeo, C. H.; Ang, W. H.; Dröge, P.; Rothlisberger, U.; Dyson, P. J.; Davey, C. A. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3462–3474.
- (5) (a) Antony, S.; Agama, K. K.; Miao, Z. H.; Takagi, K.; Wright, M. H.; Robles, A. I.; Varticovski, L.; Nagarajan, M.; Morrell, A.; Cushman, M.; Pommier, Y. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10397–10405; (b) Cinelli, M. A.; Reddy, P. V.; Lv, P. C.; Liang, J. H.; Chen, L.; Agama, K.; Pommier, Y.; van Breemen, R. B.; Cushman, M. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10844–10862; (c) Pommier, Y.; Cushman, M. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 1008–1014; (d) Khadka, D. B.; Le, Q. M.; Yang, S. H.; Van, H. T.; Le, T. N.; Cho, S. H.; Kwon, Y.; Lee, K. T.; Lee, E. S.; Cho, W. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1924–1929.
- (6) (a) Ryckebusch, A.; Garcin, D.; Lansiaux, A.; Goossens, J. F.; Baldeyrou, B.; Houssin, R.; Bailly, C.; Hénichart, J. P. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3617–3629; (b) Ahn, G.; Lansiaux, A.; Goossens, J. F.; Bailly, C.; Baldeyrou, B.; Schifano-Faux, N.; Grandclaudeon, P.; Couture, A.; Ryckebusch, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8119–9133.
- (7) Wambang, N.; Schifano-Faux, N.; Aillerie, A.; Baldeyrou, B.; Jacquet, C.; Bal-Mahieu, C.; Bousquet, T.; Pellegrini, S.; Ndifon Téké, P.; Meignan, S.; Goossens, J. F.; Lansiaux, A.; Péliniski, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 651–660.
- (8) Morris, R. E.; Aird, R. E.; Murdoch, P. S.; Chen, H.; Cummings, J.; Hughes, N. D.; Parsons, S.; Parkin, A.; Boyd, G.; Jodrell, D. I.; Sadler, P. J. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3616–3621.
- (9) (a) Wells, R. D.; Larson, J. E.; Grant, R. C.; Shortle, B. E.; Cantor, C. R. *J. Mol. Biol.* **1970**, *54*, 465–497. (b) David-Cordonnier, M.-H.; Gajate, C.; Olmea, O.; Laine, W.; de la Iglesia-Vicente, J.; Perez, C.; Cuevas, C.; Otero, G.; Manzanares, I.; Bailly, C.; Mollinedo, F. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1201–1210.
- (10) (a) Baguley, B. C.; Denny, W. A.; Atwell, G. J.; Cain, B. F. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 170–177. (b) Pavlov, V.; Kong Thoo Lin, P.; Rodilla, V. *Chem. Biol. Interact.* **2001**, *137*, 15–24.
- (11) Sheldrick, G. M. SADABS, version 2; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 2004.
- (12) Sheldrick, G. M. *Acta Cryst.* **2008**, *A64*, 112–122.
- (13) Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. *J. Appl. Cryst.* **2009**, *42*, 339–341.