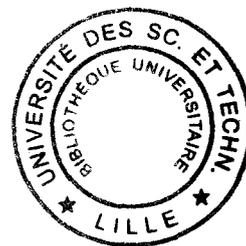


ju 2000 675

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Sophie GIRAULT

Thèse de Doctorat en Chimie Organique et Macromoléculaire



**CONCEPTION ET EVALUATION
D'INHIBITEURS SPECIFIQUES DE LA TRYPANOTHION
REDUCTASE DE *TRYPANOSOMA CRUZI*
DANS LA FAMILLE DES 2-AMINODIPHENYLSULFURES**

Soutenu le 25 septembre 1997

| | |
|-------------|--|
| Président | Pr Henri SLIWA |
| Rapporteurs | Pr Annie MARCINCAL Pr Jacques BARBE |
| Examineurs | Dr Achiel HAEMERS Pr André TARTAR Pr Christian SERGHERAERT Dr Elisabeth DAVIOUD-CHARVET |

Je dédie ce mémoire
à ma mère et ma soeur
à Thérèse, Henri et Gisèle
à Jean et Marie-Louise
à Stéphanie, Jean-Marc et Thomas
à Pascal, Annie et les jumeaux
à Amaya
à Sophie M.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Service de Chimie des Biomolécules, URA CNRS 1309, (Institut Pasteur de Lille et Institut de Biologie de Lille), dirigé par Monsieur le Professeur André Tartar puis par Monsieur le Professeur Christian Sergheraert, et plus particulièrement dans l'équipe de Monsieur le Professeur Christian Sergheraert.

Il a été réalisé grâce à une bourse co-financée par l'Institut Pasteur de Lille et la Région Nord-Pas de Calais.

Les tests réalisés chez Janssen Pharmaceutica ont été financés par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Monsieur Henri SLIWA

Je vous remercie vivement de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de cette thèse et de l'intérêt que vous m'avez témoigné.

Madame Annie MARCINCAL

Vous êtes à l'origine de la famille des 2-aminodiphénylsulfures. J'espère m'être montrée digne dans la poursuite de l'étude de cette famille de composés. Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Monsieur Jacques BARBE

Je suis très sensible à l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail en acceptant d'en être le rapporteur et vous prie de recevoir toute ma gratitude.

Monsieur Achiel HAEMERS

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse. Je vous en remercie.

Monsieur André TARTAR

Je vous remercie vivement de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et de m'avoir accordé votre confiance.

Monsieur Christian SERGHERAERT

Vous m'avez accordé votre confiance en acceptant de diriger ce travail. Tout au long de ces trois années, vous avez fait preuve de disponibilité et d'attention à mon égard. Je vous en remercie vivement.

Madame Elisabeth DAVIOUD-CHARVET

Vous m'avez ouvert les portes de l'enzymologie avec gentillesse et patience. Vous avez apporté une grande contribution à cette thèse. Je vous en remercie de tout coeur.

Je tiens également à remercier :

Stéphanie Baillet pour sa gentillesse, sa grande disponibilité et son aide précieuse pendant mes débuts,

Pascal Lemièrre pour sa gentillesse et sa promptitude à répondre à toutes mes demandes,

Amaya Bercibar pour sa gentillesse, son aide précieuse, ses remarques judicieuses de chaque instant et pour les corrections constructives qu'elle a apportées à ce manuscrit,

Valérie Landry et Annick Lemaire pour la réalisation des tests enzymatiques et pour m'avoir enseigné les rudiments de leurs techniques de mesure,

Dragos Horvath pour ses calculs théoriques si subtils,

Marie-Ange Debreu pour son aide technique efficace pendant mes derniers mois de thèse,

Carole Desruelle pour son soutien et son aide attentive dans toutes les questions administratives,

Marc Bossus et Christophe Boutillon pour leurs précieux conseils en informatique,

Steven Brooks pour sa joie de vivre,

tous les membres du laboratoire pour leurs encouragements et leurs conseils au cours de ces trois années.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----------|
| Remerciements | 4 |
| Table des matières | 7 |
| Publications et communications | 16 |
| Abréviations | 19 |
| Avant-propos | 23 |
| Introduction | 25 |
| I. La maladie de Chagas | 27 |
| 1. Cycle évolutif du parasite <i>Trypanosoma cruzi</i> | 29 |
| 2. La maladie | 31 |
| 2.1. La phase aiguë | 31 |
| 2.2. La phase indéterminée | 32 |
| 2.3. La phase chronique | 32 |
| 2.3.1. Forme cardiaque | 32 |
| 2.3.2. Forme digestive | 32 |
| 3. Le diagnostic et le traitement | 33 |
| 4. Orientation actuelle de la recherche thérapeutique | 36 |
| II. La Lutte contre le Stress Oxydant chez l'Hôte et le Parasite | 37 |
| 1. Le stress oxydant | 37 |
| 2. Stress oxydant et glutathion chez l'hôte | 38 |
| 2.1. Elimination des espèces oxygénées réactives | 38 |
| 2.1.1. Enzymes glutathion-indépendantes | 39 |
| 2.1.2. Enzymes glutathion-dépendantes | 39 |
| 2.2. Autres fonctions du glutathion | 41 |
| 3. Stress oxydant et trypanothion chez le parasite | 42 |
| 3.1. Propriétés physiques du trypanothion comparées à celles du glutathion | 44 |
| 3.2. Réactivité des fonctions thiols de T(SH) ₂ et de GSH | 45 |
| 3.3. Biosynthèse du trypanothion | 46 |
| 3.3.1. Les polyamines | 46 |
| 3.3.2. Le glutathion | 48 |
| 3.3.3. Le trypanothion | 49 |
| 3.4. Elimination des espèces oxygénées réactives | 50 |
| 3.5. Autres fonctions du trypanothion | 51 |
| 3.5.1. Réactions d'échange thiol-disulfure | 51 |

| | |
|--|----|
| 3.5.2. Détoxification des xénobiotiques | 53 |
| 3.5.3. Régulation des concentrations en polyamines | 54 |
| 3.5.4. Elimination des métaux lourds | 54 |
| III. La Trypanothion Réductase | 55 |
| 1. Isolement et caractérisation | 55 |
| 2. Mécanisme réactionnel | 57 |
| 2.1. La glutathion réductase | 57 |
| 2.2. La trypanothion réductase | 59 |
| 3. Anciennes méthodes d'étude du site actif de la TR | 60 |
| 3.1. Etude enzymatique d'analogues de T(S) ₂ | 60 |
| 3.2. Mutagénèse dirigée | 62 |
| 4. Etudes structurales | 64 |
| 4.1. Structure globale de la GR et de la TR | 64 |
| 4.2. Le complexe GR-GSSG | 67 |
| 4.3. Le complexe TR-N ^l -glutathionylspermidine disulfure | 69 |
| 4.4. Comparaison des deux complexes | 71 |
| 4.5. Le complexe TR-mépacrine | 73 |
| 5. Recherche d'inhibiteurs de la TR | 75 |
| 5.1. Inhibiteurs compétitifs vis-à-vis du trypanothion disulfure | 75 |
| 5.1.1. Dérivés cycliques | 75 |
| 5.1.2. Inhibiteurs syn-catalytiques | 77 |
| 5.1.3. Inhibiteurs de type peptidique | 80 |
| 5.2. Inhibiteurs non compétitifs vis-à-vis du trypanothion disulfure | 81 |
| 5.3. Inhibiteurs subversifs | 82 |
| 5.4. Autres approches | 83 |
| 5.4.1. Ligands chimères | 83 |
| 5.4.2. Blocage de la dimérisation de la protéine par des peptides mimes | 83 |
| | |
| Premier Chapitre | |
| Recherche d'inhibiteurs de la trypanothion réductase | 87 |
| Introduction | 88 |
| I. Détermination de la Molécule-Tête de Série | 88 |
| 1. Criblage enzymatique systématique | 88 |
| 1.1. Principe du test enzymatique | 88 |
| 1.2. Résultats du criblage systématique | 91 |
| 1.2.1. Les 2-aminodiphénylesulfures : une famille d'inhibiteurs de la TR déjà connue | 92 |

| | |
|--|-----|
| 1.2.2. Modélisation dans le site actif de la TR | 95 |
| 2. Choix de la molécule-tête de série | 97 |
| 2.1. Structure dimérique | 97 |
| 2.2. Vérification de la nécessité de la structure dimérique : deux chaînes aminées latérales sur un monomère | 98 |
| II. Modifications structurales envisagées | 99 |
| 1. Structures monomériques | 99 |
| 1.1. Orientations respectives des deux chaînes latérales | 99 |
| 1.2. Réduction ou non des fonctions amides | 99 |
| 2. Structures dimériques symétriques | 100 |
| 2.1. Orientation du bras espaceur | 101 |
| 2.2. Réduction ou non des fonctions amides | 101 |
| 2.3. Amine en bout de chaîne latérale : diméthylamine ou <i>N</i> -méthylpipérazine | 101 |
| 2.4. Longueur du bras espaceur | 102 |
| 2.5. Présence ou non d'un atome d'halogène sur un des noyaux aromatiques | 102 |
| 2.6. Diéthylènetriamine ou 1,4-diaminobutane en bout de chaîne latérale par analogie avec de bons inhibiteurs de la TR | 103 |
| Conclusion | 106 |

Deuxième chapitre

| | |
|---|-----|
| Conception et évaluation d'inhibiteurs de la trypanothion réductase : mono et bis(2-aminodiphénylsulfures) | 107 |
| Introduction | 108 |
| I. Synthèses des composés | 109 |
| 1. Aminodiphénylsulfures de départ | 109 |
| 1.1. Méthode protection/déprotection de la fonction amine | 110 |
| 1.2. Passage par un disulfure | 111 |
| 1.3. Méthode directe | 111 |
| 2. Fixation du bras espaceur | 112 |
| 2.1. Cas général | 113 |
| 2.2. Cas où $n=1$ | 113 |
| 3. Réduction du groupement nitro | 114 |
| 4. Fixation des chaînes latérales aminées | 115 |
| 4.1. Diméthylamine, <i>N</i> -méthylpipérazine ou 1,4-diaminobutane | 116 |
| 4.2. Diéthylènetriamine | 120 |
| 5. Réduction des fonctions amides | 120 |

| | |
|--|-----|
| 6. Schéma de synthèse des 2-aminodiphénylsulfures substitués par deux chaînes latérales aminées | 122 |
| 7. Schémas de synthèse des bis(2-aminodiphénylsulfures) | 123 |
| 7.1. Variation de l'orientation du bras espaceur et de l'amine en bout de chaîne latérale (diméthylamine ou <i>N</i> -méthylpipérazine) | 123 |
| 7.2. Variation de la longueur du bras espaceur (en position <i>mé</i> ta) | 124 |
| 7.3. Variation de l'atome d'halogène (bras espaceur à 5 atomes de carbone et en position <i>mé</i> ta) | 125 |
| 7.4. Variation de l'amine en bout de chaîne latérale : diéthylènetriamine ou 1,4-diaminobutane (bras espaceur à 5 atomes de carbone et en position <i>mé</i> ta) | 126 |
| II. Résultats enzymatiques et Discussion | 127 |
| 1. 2-Aminodiphénylsulfures à deux chaînes latérales aminées | 128 |
| 1.1. Tests spectrophotométriques | 128 |
| 1.1.1. Résultats | 128 |
| 1.1.2. Discussion : Importance de la structure dimérique | 128 |
| 1.2. Tests Janssen | 130 |
| 1.2.1. Résultats | 130 |
| 1.2.2. Discussion | 130 |
| 2. Bis(2-aminodiphénylsulfures) | 131 |
| 2.1. Tests spectrophotométriques | 131 |
| 2.1.1. Résultats | 131 |
| 2.1.2. Discussion | 132 |
| 2.1.2.1. Orientation du bras espaceur | 132 |
| 2.1.2.2. Amine en bout de chaîne latérale : diméthylamine ou <i>N</i> -méthylpipérazine | 134 |
| 2.1.2.3. Longueur du bras espaceur | 135 |
| 2.1.2.4. Atome d'halogène en para de l'atome de soufre | 136 |
| 2.1.2.5. Amine en bout de chaîne latérale : diéthylènetriamine ou 1,4-diaminobutane | 137 |
| 2.2. Tests Janssen | 138 |
| 2.2.1. Composés non halogénés, non réduits, possédant un bras espaceur à cinq atomes de carbone | 138 |
| 2.2.2. Composés non halogénés, réduits, possédant un bras espaceur à cinq atomes de carbone | 139 |
| 2.2.3. Composés non halogénés, réduits ou non, possédant un bras espaceur à un ou sept atomes de carbone | 140 |

| | |
|--|-----|
| 2.2.4. Composés halogénés, non réduits, possédant un bras espaceur à cinq atomes de carbone | 141 |
| 2.2.5. Composés non halogénés, réduits, possédant un bras espaceur à cinq atomes de carbone | 142 |
| 2.2.6. Composés halogénés, non réduits, possédant un bras espaceur à cinq atomes de carbone et présentant le 1,4-diaminobutane ou la diéthylènetriamine en bout de chaîne latérale | 143 |
| Conclusion | 144 |

Troisième chapitre

Des inhibiteurs partiellement compétitifs

Un phénomène d'aggrégation à forte concentration 147

Introduction 148

I. Inhibition compétitive, non compétitive ou incompétitive 148

1. Modèle de Michaelis-Menten 149

2. Représentation de Lineweaver-Burk 151

3. Inhibition réversible 152

3.1. Inhibition compétitive 152

3.2. Inhibition non compétitive 154

3.3. Inhibition incompétitive 156

II. Nature de l'inhibition pour les bis(2-aminodiphénylesulfures) :

Existence d'un phénomène d'aggrégation 157

Conclusion 164

Quatrième chapitre

Détermination du rôle de la deuxième entité noyau

hydrophobe-chaîne latérale aminée

Dérivés dissymétriques de la famille des 2-aminodiphénylesulfures

Une troisième génération d'inhibiteurs de la TR 165

Introduction 166

I. Remplacement de la deuxième entité noyau hydrophobe-chaîne latérale

aminée par des amines aliphatiques ou aromatiques 167

1. Choix des amines 167

1.1. Variations structurales 168

1.2. Substrats subversifs 169

2. Synthèse des composés dissymétriques 170

2.1. Cas des amines aliphatiques 170

| | |
|--|-----|
| 2.1.1. Synthèse de l'acide | 170 |
| 2.1.2. Couplage acide/amine | 173 |
| 2.2. Cas des amines aromatiques | 174 |
| 2.2.1. Couplage acide/amine aromatique | 174 |
| 2.2.1.1. Méthode de couplage classique : | |
| PyBrop/DIEA/DMF | 174 |
| 2.2.1.2. Passage par le chlorure d'acide | 174 |
| 2.2.1.3. Passage par l'hydrazide et l'azide | 177 |
| 2.2.1.4. Réaction de couplage sur résine HOBt | 178 |
| 2.2.1.5. Couplage ester méthylique/amine direct | 181 |
| 2.2.1.6. Couplage ester méthylique/amine avec le tribromure de bore | 181 |
| 2.2.1.7. Couplage ester méthylique/amine avec l'iodure de méthylmagnésium | 182 |
| 2.2.2. Couplage acide à sept atomes de carbone/amine aromatique | 183 |
| 2.2.2.1. Synthèse de l'acide à sept atomes de carbone | 183 |
| 2.2.2.2. Couplage acide/amine | 187 |
| a. Passage par le chlorure d'acide | 187 |
| b. Passage par le fluorure d'acide | 188 |
| II. Résultats enzymatiques et Discussion | 190 |
| 1. Amines aliphatiques | 191 |
| 1.1. Tests spectrophotométriques | 191 |
| 1.1.1. Résultats | 191 |
| 1.1.2. Discussion | 192 |
| 1.2. Tests Janssen | 192 |
| 1.2.1. Résultats | 192 |
| 1.2.2. Discussion | 193 |
| 2. Amines aromatiques | 194 |
| 2.1. Tests spectrophotométriques | 194 |
| 2.1.1. Résultats | 194 |
| 2.1.2. Discussion | 194 |
| 2.2. Tests Janssen | 195 |
| 2.2.1. Résultats | 195 |
| 2.2.2. Discussion | 196 |
| Conclusion | 196 |

| | |
|--|-----|
| Cinquième chapitre | |
| Les bis(2-aminodiphénylsulfures) à trois chaînes latérales : | |
| Une quatrième génération d'inhibiteurs de la TR | 199 |
| Introduction | 200 |
| I. Synthèse des composés | 202 |
| 1. Synthèse du bis(2-aminodiphénylsulfure) possédant une fonction amine secondaire centrale | 202 |
| 2. Acylation de la fonction amine secondaire libre | 207 |
| 2.1. Acide en position terminale | 208 |
| 2.2. Amine libre ou substituée en position terminale | 209 |
| 2.3. Biotine | 212 |
| II. Résultats enzymatiques et Discussion | 212 |
| 1. Résultats | 212 |
| 2. Discussion | 214 |
| Conclusion | 215 |
| | |
| Sixième chapitre | |
| Conception d'un marqueur d'affinité de la TR | |
| Etude de sa pénétration dans le parasite | |
| et de sa localisation ultérieure | 217 |
| Introduction | 218 |
| I. Conception d'un marqueur d'affinité | 218 |
| 1. Principe du marquage à la biotine | 218 |
| 2. Synthèse d'un marqueur d'affinité de la famille des bis(2-aminodiphénylsulfures) | 219 |
| II. Pénétration et suivi dans le parasite | 220 |
| | |
| Conclusion | 221 |
| | |
| Partie expérimentale | 227 |
| I. Généralités | 228 |
| 1. Méthodes de purification et d'analyse des produits | 228 |
| 1.1. Chromatographie sur couche mince de silice | 228 |
| 1.2. Chromatographie sur colonne de silice | 228 |
| 1.3. Chromatographie sur couche épaisse de silice | 228 |
| 1.4. Spectrométrie de masse "Temps de Vol" (TOFMS) | 229 |
| 1.5. Chromatographie liquide à haute performance | 229 |
| 1.6. Résonance Magnétique Nucléaire | 229 |

| | |
|--|-----|
| 1.7. Mesure des points de fusion | 229 |
| 2. Formation des sels d'oxalates | 230 |
| 3. Préparation des solvants de réaction | 230 |
| 3.1. Distillation du tétrahydrofurane | 230 |
| 3.2. Autres solvants | 230 |
| II. Synthèse des Inhibiteurs | 230 |
| 1. Aminodiphénylesulfures de départ | 230 |
| 2. Bis(2-aminodiphénylesulfures) | 234 |
| 2.1. Variation simultanée de l'orientation du bras espaceur et de l'amine (diméthylamine ou <i>N</i> -méthylpipérazine) en bout de chaîne latérale | 234 |
| 2.2. Variation de la longueur du bras espaceur | 245 |
| 2.3. Variation de l'atome d'halogène | 249 |
| 2.4. Variation finale de l'amine (1,4-diaminobutane ou diéthylènetriamine) en bout de chaîne latérale | 256 |
| 2.4.1. Cas du 1,4-diaminobutane | 256 |
| 2.4.2. Cas de la diéthylènetriamine | 257 |
| 3. 2-aminodiphénylesulfures à deux chaînes latérales aminées | 259 |
| 4. Dérivés dissymétriques | 264 |
| 4.1. Couplage des amines aliphatiques | 264 |
| 4.1.1. Acide à cinq atomes de carbone ($n = 3$) | 264 |
| 4.1.2. Couplage acide/amine | 267 |
| 4.2. Couplage des amines aromatiques | 274 |
| 4.2.1. Acide à sept atomes de carbone ($n = 5$) | 274 |
| 4.2.2. Couplage acide/amine | 276 |
| 5. Bis(2-aminodiphénylesulfures) à trois chaînes latérales | 280 |
| 5.1. Bis(2-aminodiphénylesulfure) possédant une fonction amine secondaire centrale | 280 |
| 5.2. Acylation de l'amine secondaire centrale | 284 |
| III. Tests enzymatiques | 292 |
| 1. Activité sur la trypanothion réductase | 292 |
| 1.1. Production et purification de la trypanothion réductase recombinante | 292 |
| 1.1.1. La souche surproductrice de la TR | 292 |
| 1.1.2. Culture de la souche | 293 |
| 1.1.3. Purification de la TR | 293 |
| 1.2. Tests de criblage sur microplaques | 296 |
| 1.3. Tests spectrophotométriques | 297 |

| | |
|--|------------|
| 2. Tests Janssen | 297 |
| 2.1. Test <i>in vitro</i> sur la trypanothion réductase | 298 |
| 2.2. Test <i>in vitro</i> sur la glutathion réductase | 298 |
| 2.3. Test <i>in vitro</i> sur <i>Trypanosoma brucei</i> | 298 |
| 2.4. Test <i>in vitro</i> sur <i>Trypanosoma cruzi</i> | 299 |
| 2.5. Test <i>in vitro</i> sur <i>Leishmania infantum</i> | 299 |
| 2.6. Test <i>in vivo</i> sur <i>Trypanosoma brucei</i> | 300 |
| Références | 301 |

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Le travail réalisé au cours de cette thèse a fait l'objet des publications et communications suivantes :

Publications

S. Girault, S. Baillet, D. Horvath, V. Lucas, E. Davioud-Charvet, A. Tartar, C. Sergheraert

New potent inhibitors of trypanothione reductase from Trypanosoma cruzi in the 2-amino-diphenylsulfide series

European Journal of Medicinal Chemistry **1997**, 32, 39-52

S. Girault, S. Baillet, D. Horvath, V. Lucas, E. Davioud-Charvet, A. Tartar, C. Sergheraert

De bons inhibiteurs spécifiques de la trypanothion réductase de Trypanosoma cruzi : des Dimères de 2-Aminodiphénylsulfures

Journal de Pharmacie de Belgique **1997**, 52, 2bis, 24

S. Girault, S. Baillet, B. Bonnet, D. Soullez, E. Davioud-Charvet, V. Lucas, D. Horvath, A. Tartar, C. Sergheraert

Bis 2-Amino Diphenylsulfides as potent and selective inhibitors for TR

Tropical Medicine and International Health **1996**, 1, 6, A21-A22

Une publication est en cours de rédaction et sera soumise à Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters :

S. Girault, A. Berecibar, V. Landry, E. Davioud-Charvet, C. Sergheraert

Studies of the structure-activity relationships of bis 2-aminodiphenylsulfides on trypanothione reductase from Trypanosoma cruzi

Communications orales

S. Girault, V. Landry, E. Davioud-Charvet, A. Tartar, C. Sergheraert

Optimisation dans la famille des bis 2-aminodiphénylsulfures de l'activité inhibitrice sur la trypanothion réductase de Trypanosoma cruzi

SECO XXXIV (semaine d'étude de chimie organique), Caen - Villers sur Mer, 1-7 juin
1997

S. Girault, S. Baillet, V. Landry, E. Davioud-Charvet, A. Tartar, C. Sergheraert

Les Bis 2-Aminodiphénylsulfures : une nouvelle famille d'inhibiteurs de la trypanothion réductase de Trypanosoma cruzi

4^{ème} Journée Jeunes Chercheurs, Société de Chimie Pharmaceutique, Paris, 10 janvier
1997

S. Girault, S. Baillet, V. Landry, E. Davioud-Charvet, A. Tartar, C. Sergheraert

Les Bis 2-Aminodiphénylsulfures : de bons inhibiteurs spécifiques de la trypanothion réductase de Trypanosoma cruzi

2^{ème} Journée Jeunes Chercheurs, Institut Pasteur de Lille, 18 novembre **1996**

S. Girault, S. Baillet, E. Davioud-Charvet, V. Lucas, D. Horvath, A. Tartar, C. Sergheraert

Bis 2-Amino Diphenylsulfides as potent and selective inhibitors for TR

5th conference of COST Action 815 on 'Antiparasitic Chemotherapy' at the 'Internationales Wissenschaftsforum', Heidelberg, Allemagne, 23-24 mai **1996**

Posters

S. Girault, E. Davioud-Charvet, V. Landry, D. Horvath, E. Buisine, C. Sergheraert

Progress in the design of potent and selective TR inhibitors

6th COST/ACRIVAL/IOCD Congress on Antiparasitic Chemotherapy, Louvain, Belgique, 14-16 mai **1997**

S. Girault, S. Baillet, V. Lucas, E. Davioud-Charvet, A. Tartar, C. Sergheraert

Les Bis 2-Aminodiphénylsulfures : une nouvelle famille d'inhibiteurs de la trypanothion réductase de Trypanosoma cruzi

4^{èmes} journées de l'Association des Enseignants et Chercheurs de Chimie Physique et de Chimie Minérale des facultés de Pharmacie, Montpellier, 7-8 avril **1997**

S. Girault, S. Baillet, V. Lucas, E. Davioud-Charvet, A. Tartar, C. Sergheraert
De bons inhibiteurs spécifiques de la trypanothion réductase de Trypanosoma cruzi : des Dimères de 2-Aminodiphénylsulfures

10^{èmes} Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Luxembourg, 30-31 mai **1996**

Prix du meilleur poster

S. Girault, S. Baillet, V. Lucas, E. Davioud-Charvet, A. Tartar, C. Sergheraert
Les Dimères de 2-Aminodiphénylsulfures : une nouvelle famille d'inhibiteurs de la trypanothion réductase de Trypanosoma cruzi

3^{ème} Journée Jeunes Chercheurs, Société de Chimie Pharmaceutique, Paris, 12 janvier
1996

ABRÉVIATIONS

| | |
|-------------------|--|
| ACN | acétonitrile |
| AcOEt | acétate d'éthyle |
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| BCNU | 1,3-bis(2-chloroéthyl)-1-nitrosourée |
| Boc | groupement <i>tert</i> -butyloxycarbonyle |
| BOP | benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphoniumhexafluoro phosphate |
| CCE | chromatographie sur couche épaisse |
| CCM | chromatographie sur couche mince |
| CNDB | 1-chloro-2,4-dinitrobenzène |
| CTMQ | sel de 4-chloro-1-méthyl-7-trifluorométhylquinolinium |
| DCC | <i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide |
| DFMA | D,L- α -difluorométhylarginine |
| DFMO | D,L- α -difluorométhylornithine |
| DHHA | déshydroascorbate |
| DIC | <i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide |
| DIEA | <i>N,N'</i> -diisopropyléthylamine |
| DL ₅₀ | dose létale 50 |
| DMF | <i>N,N'</i> -diméthylformamide |
| DMSO | diméthylsulfoxyde |
| D.O. | densité optique |
| EDTA | acide éthylène diamine tétraacétique |
| Ell-S-S-Ell | réactif d'Ellman ou acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) |
| éq | équivalent |
| Et ₃ N | triéthylamine |
| EtOH | éthanol |
| FAD | flavine adénine dinucléotide |
| Fmoc | groupement fluorénylméthoxyloxycarbonyle |
| FSSF | <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-1-cystéinylglycine-3-diméthylamino propylamide disulfure |
| g | gramme |
| GPx | glutathion peroxydase |
| GR | glutathion réductase |

| | |
|----------------------|--|
| Grx | glutarédoxine |
| GrxR | glutarédoxine réductase |
| GSH | glutathion |
| Gspd(S) ₂ | <i>N</i> ¹ -glutathionylspermidine disulfure |
| GspdSH | <i>N</i> ¹ -glutathionylspermidine |
| GSSG | glutathion disulfure |
| GST | glutathion S-transférase |
| h | heure |
| Hepes | acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique |
| HBTU | 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate |
| HeCNU | 1-(2-chloroéthyl)-3-(2-hydroxyéthyl)-1-nitrosourée |
| HOBt | <i>N</i> -hydroxybenzotriazole |
| HPLC | chromatographie liquide haute performance |
| Hz | hertz |
| IC ₅₀ | concentration inhibitrice 50 |
| IOR | intermédiaire oxygéné réactif |
| kDa | Kilodalton |
| K _i | constante d'inhibition |
| K _m | constante de Michaelis |
| MeOH | méthanol |
| μL | microlitre |
| μM | micromole par litre |
| mg | milligramme |
| mL | millilitre |
| mmol | millimole |
| mol | mole |
| N | normale (solution) |
| NADPH | β-nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| nM | nanomole par litre |
| O.M.S. | Organisation Mondiale de la Santé |
| PCR | polymerase chain reaction |
| P.F. | point de fusion |
| PMFS | fluorure de phényl méthyl sulfonyle |
| PyBrop | bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate |
| R1 | sel de 4-chloro-1-méthyl-7-trifluorométhylquinolinium |
| Rf | rapport frontal |
| R.H. | Reindel-Hoppe (test de détection de la fonction amide) |

| | |
|--------------------|---|
| RMN | résonance magnétique nucléaire |
| s | singulet |
| d | doublet |
| t | triplet |
| q | quadruplet |
| m | multiplet |
| J | constante de couplage |
| SNAr | substitution nucléophile aromatique |
| SOD | superoxyde dismutase |
| spd | spermidine |
| T. amb. | température ambiante |
| TDM | tétraméthyldiaminodiphénylméthane |
| THF | tétrahydrofurane |
| TOF | Time of flying (spectrométrie de masse) |
| TR | trypanothion réductase |
| Trx | thiorédoxine |
| TrxR | thiorédoxine réductase |
| T(SH) ₂ | dihydrotrypanothion |
| T(S) ₂ | trypanothion disulfure |
| 2VP | 2-vinylpyridine |

AVANT-PROPOS

A l'aube du XXIème siècle, les maladies parasitaires restent un des grands fléaux de l'humanité.

Chez l'homme, le parasite *Trypanosoma cruzi* est l'agent responsable de la maladie de Chagas, contre laquelle il n'existe, à ce jour, aucune chimiothérapie réellement efficace. Cette maladie fait peser une menace constante sur près du quart de la population d'Amérique latine. Elle sévit dans toute l'étendue du sous-continent, mais avec des manifestations pathologiques et des caractéristiques épidémiologiques très variables d'une région d'endémie à l'autre. Une grande diversité s'observe dans les taux de prévalence, les modes de transmission, les caractéristiques du parasite, l'anatomo-pathologie clinique, les vecteurs et les hôtes réservoirs. Plus que toute autre parasitose, la maladie de Chagas est liée au développement socio-économique : le réduve vecteur et la maladie transmise par cet insecte persisteront aussi longtemps que la médiocrité de l'habitat, l'ampleur des mouvements de population et la rapidité de l'urbanisation constitueront la norme en Amérique latine. Il faudra de longues années avant que cette situation évolue. D'ici là, la lutte contre la maladie de Chagas doit être poursuivie sans relâche.

Avec quelques 100 millions de personnes exposées et environ 20 millions d'individus parasités, cette maladie constitue un grave problème de santé dans 17 pays. Dans de nombreux autres, les cas d'infestation humaine semblent n'être que sporadiques, bien que le vecteur soit présent et que le parasite *Trypanosoma cruzi* puisse être isolé chez les animaux réservoirs. La transmission du parasite à l'occasion d'une transfusion sanguine est de plus en plus souvent incriminée quand des infestations nouvelles se produisent en dehors des foyers naturels de transmission.

Au cours des vingt dernières années, l'intérêt porté à la maladie de Chagas s'est considérablement renforcé, chez les scientifiques comme chez les responsables de la santé publique. Les fonds mis à la disposition des programmes de recherche ont augmenté grâce au soutien national et international. Dans le même temps, plusieurs pays ont lancé

ou renforcé des programmes de lutte à l'échelle nationale, parfois avec des succès remarquables. Ces programmes prouvent que les méthodes de lutte actuelles peuvent être efficaces lorsqu'elles sont durablement appliquées.

Introduction

La maladie de Chagas constitue un problème de santé majeur en Amérique Centrale et en Amérique du Sud. C'est une parasitose due à un protozoaire flagellé : *Trypanosoma cruzi*. La seule drogue utilisée actuellement en chimiothérapie est le benznidazole, composé aspécifique et extrêmement toxique. Il est donc nécessaire de découvrir rapidement de nouvelles molécules qui devront répondre aux critères suivants :

- spécificité et efficacité optimales en chimiothérapie
- faible coût de revient, vues les populations concernées

La recherche rationnelle de telles molécules consiste à étudier le métabolisme du parasite et à le comparer à celui de l'hôte pour déterminer l'existence de cibles spécifiques, mais également nécessaires à la survie de ce parasite.

T. cruzi est très sensible au stress oxydant et possède, contre ce dernier, un système de défense original basé sur un dithiol, le trypanothion, conjugué de la spermidine et du glutathion, régénéré sous sa forme active par une enzyme, la trypanothion réductase (TR). Bien que présentant 40% d'homologie dans leur séquence primaire, la TR de *T. cruzi* et la glutathion réductase humaine (GR) sont discriminantes vis-à-vis de leurs substrats respectifs. La TR constitue donc une cible idéale dans la recherche de drogues spécifiques contre la maladie de Chagas.

Un test enzymatique mis au point au laboratoire a permis d'isoler des familles d'inhibiteurs de la TR. De plus, l'étude tridimensionnelle du complexe enzyme-substrat et les relations structure-activité nous permettent de concevoir rationnellement des molécules à visée thérapeutique contre cette parasitose.

Ce travail a consisté, à partir de molécules - têtes de série issues du test et d'études de dynamique et de modélisation moléculaires, en la conception d'une nouvelle famille d'inhibiteurs de la TR et en l'optimisation, par des changements de structure, de l'activité de ces molécules. L'inhibiteur le plus actif obtenu dans la série présente une **IC₅₀ de 350 nM** en présence d'une concentration en trypanothion équivalente au K_m de ce substrat pour l'enzyme. C'est le meilleur inhibiteur *in vitro* de la TR connu à ce jour. La

mesure du K_i de ce composé ($K_i = 700 \text{ nM}$) et d'autres composés de notre série a permis de mettre en évidence un phénomène d'aggrégation de ce type d'inhibiteurs en solution.

Enfin, nous avons cherché, d'une part, à déterminer le rôle des différents éléments structuraux de ce type d'inhibiteurs et, d'autre part, à expliquer l'activité *in vitro* sur le parasite de cette famille de composés, plus faible qu'attendu, par l'introduction dans le parasite d'analogues marqués non radioactifs.

I. La maladie de Chagas

La maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine a été décrite pour la première fois par Carlos Chagas en 1909. C'est une parasitose chronique due à un protozoaire flagellé : *Trypanosoma cruzi* de l'ordre des kinétoplatidae, de la famille des Trypanosomatidae et du sous genre des Schizotrypanum (figure 1).

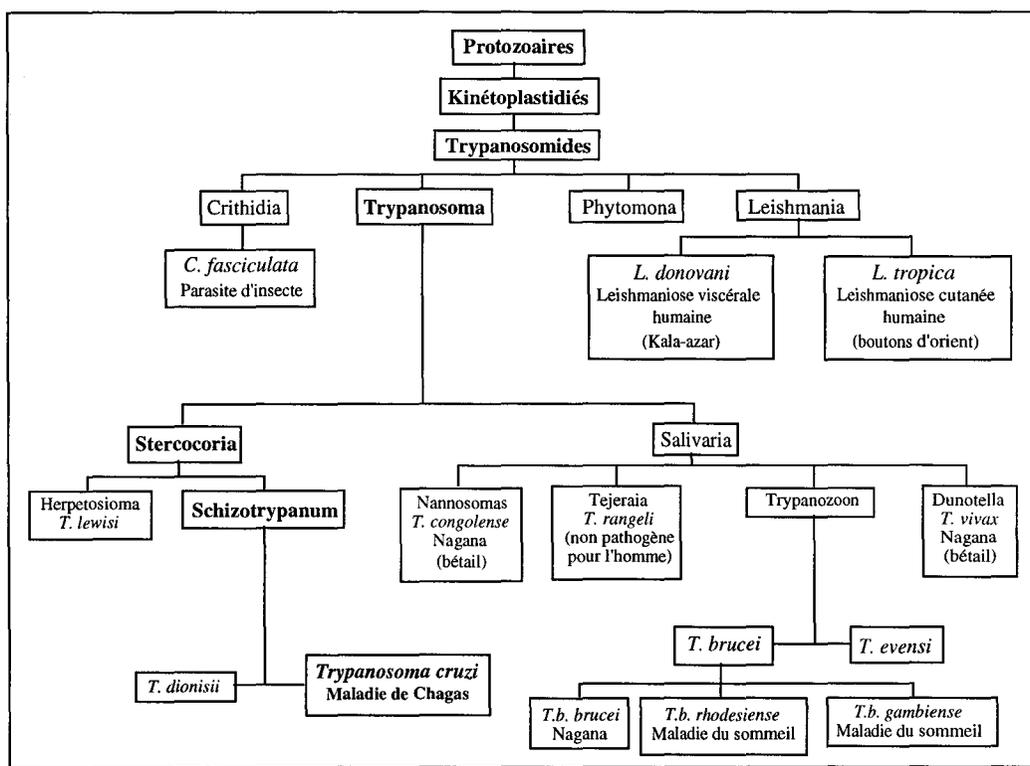


figure 1. Classification des trypanosomes parasites des mammifères

Elle ne concerne pour le moment que les pays d'Amérique Centrale et d'Amérique du Sud, où 90 millions de personnes (environ 25% de la population) sont menacées et 20 millions malades (figure 2).¹



figure 2.
Distribution géographique des cas d'infestations humaines par *Trypanosoma cruzi*
en Amérique centrale et en Amérique latine

Le parasite *T. cruzi* est transmis par un insecte hématophage de la famille des réduviidés, le réduve (triatomadae) dont il existe une centaine d'espèces en Amérique Latine (*triatoma* sp., *rhodnius* sp., *panstrongylus* sp.). Chez le vecteur, la transmission s'effectue au cours du repas sanguin. Des vertébrés tels que chiens, chats, rats, marsupiaux, également victimes des piqûres de réduves, peuvent être infectés par le parasite et représentent un réservoir important de parasites. La maladie de Chagas est une zoonose capable de se perpétuer ainsi dans des foyers enzootiques, en l'absence de cas d'infection humaine.

Les réduves prolifèrent très facilement dans les habitations de bois et de torchis, d'où l'étendue de l'infection en particulier dans les zones rurales des pays en voie de développement du continent américain. Dans certains de ces pays (Brésil, Argentine, Vénézuéla), des programmes de lutte contre le vecteur ont été mis en place depuis quelques années (utilisation de peintures insecticides par exemple), mais, des efforts à plus grande échelle doivent être mis en oeuvre au niveau de l'habitat et des moeurs des populations rurales.

Les zones urbaines et les pays développés ne sont pas à l'abri d'une telle infection. En effet, d'autres modes de transmission tels que les transmissions congénitales, les transfusions sanguines ou les transplantations d'organes infectés multiplient les risques d'extension de la maladie. Malgré l'internationalisation du marché du sang, de ses dérivés et des organes humains, la recherche sérologique de *T. cruzi* est effectuée uniquement dans les pays directement concernés, bien que des cas de maladie de Chagas aient été décrits aux Etats-Unis et au Canada.^{2,3,4}

L'O.M.S. a annoncé, le 16 janvier 1997, que le Brésil avait éliminé la maladie de Chagas de son territoire par éradication des insectes vecteurs.^{5,6}

1. Cycle évolutif du parasite *Trypanosoma cruzi*

Le cycle évolutif de *T. cruzi* se partage entre un insecte vecteur (hôte intermédiaire) et un mammifère (hôte définitif) (figure 3).⁷ Au cours d'un repas sanguin, le vecteur ingère des trypomastigotes sanguicoles qui atteignent le tube digestif moyen de l'insecte, où ils se transforment en épimastigotes (forme non infectante chez l'homme). Les épimastigotes, au cours de leur progression dans l'intestin, se multiplient par division binaire. Dans le tube digestif postérieur, ils se différencient en trypomastigotes (forme infectante pour l'homme et pour les autres mammifères). L'insecte élimine enfin ces parasites dans ses déjections lors d'un repas sanguin et les transmet à l'hôte définitif à travers les muqueuses, la conjonctive ou des lésions, dues ou non à la piqûre.

LA DIFFERENCIATION DE *T. CRUZI*

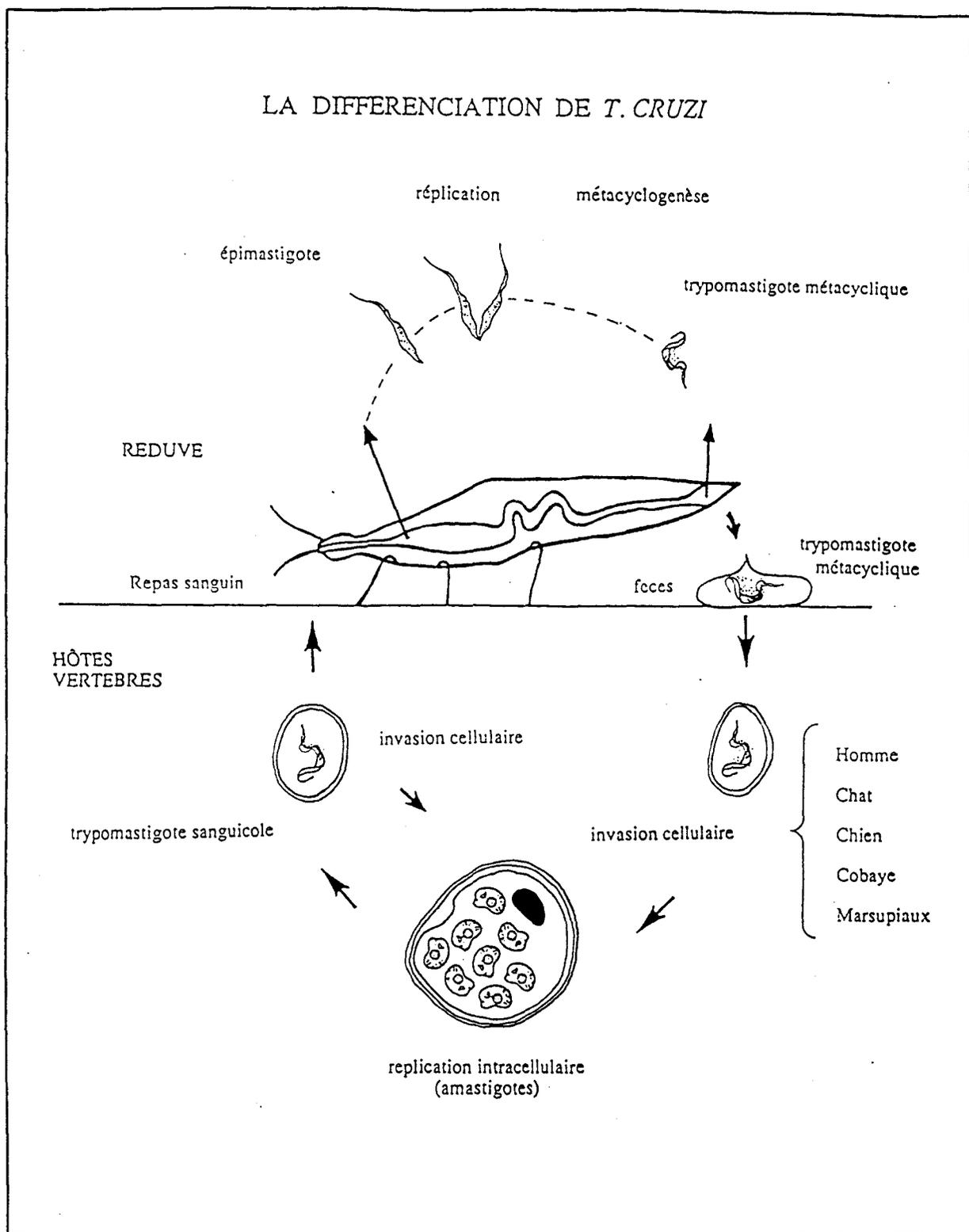


figure 3. Cycle de différenciation de *Trypanosoma cruzi*

Une fois dans le sang de l'hôte définitif, les parasites peuvent infecter divers types de cellules au niveau du site de l'infection (macrophages, polynucléaires neutrophiles,

fibroplastes, cellules musculaires ou endothéliales...). A l'intérieur de la cellule, les parasites s'échappent dans le cytoplasme où ils se différencient en amastigotes et se multiplient par scissiparité. Après un certain nombre de cycles de division, les amastigotes se différencient en trypomastigotes (appelés sanguicoles) qui sont libérés dans la circulation sanguine après éclatement de la cellule. Ces derniers peuvent soit infecter d'autres cellules, soit être ingérés par un insecte au cours d'un repas sanguin, assurant, de ce fait, la continuité du cycle parasitaire.

2. La maladie

La maladie de Chagas passe par trois phases : une phase aiguë de courte durée, une phase de latence clinique dite indéterminée et une phase chronique qui dure plusieurs années. L'évolution est irréversible : cardiopathies et encéphalopathies chagasiques, méga-organs chagasiques (tube digestif, vessie), avec formation d'autoanticorps dus à l'existence de déterminants antigéniques communs à *T. cruzi*, aux neurones du système nerveux végétatif et aux cellules cardiaques.

2.1. La phase aiguë

Les symptômes de la phase aiguë peuvent être parfaitement bénins et atypiques, de sorte que la maladie passe souvent inaperçue à ce stade d'évolution (taux de diagnostic : 1 à 2% des cas).

Les troubles cliniques sont d'autant plus graves que le patient est jeune. Au niveau du site d'infection peut exister une inflammation locale nommée "chagome" (appelée aussi "signe de Romaña" lorsque l'infection a lieu au niveau de la conjonctive). Les symptômes généraux sont la fièvre, l'asthénie, la tuméfaction des ganglions lymphatiques et parfois une anorexie, des diarrhées et des vomissements. 30% des malades présentent des anomalies de l'électrocardiogramme correspondant à une myocardite aiguë pouvant entraîner la mort dans 2 à 3% des cas, le plus souvent chez l'enfant de moins de deux ans.

Une autre complication grave est la méningo-encéphalite qui entraîne la mort dans 50% des cas (surtout chez les jeunes enfants).

Après quelques semaines, les parasites disparaissent et les troubles régressent.

2.2. La phase indéterminée

Durant cette période, les patients sont asymptomatiques et présentent une parasitémie négative. C'est une période de latence qui peut durer de dix à vingt ans.

2.3. La phase chronique

Au début de cette phase, la maladie évolue vers une forme cardiaque ou une forme digestive chez 30% des malades. Parfois, des atteintes neurologiques apparaissent. Les autres malades ne présentent jamais d'atteintes organiques.

2.3.1. Forme cardiaque

Les manifestations cliniques dépendent du degré d'atteinte du myocarde. Les symptômes généraux sont une hypertrophie cardiaque, des troubles du rythme et de la conduction ventriculaire. La formation d'autoanticorps dirigés contre les cellules du myocarde est parfois observée. La manifestation la plus grave est l'embolie pulmonaire entraînant la mort subite.

2.3.2. Forme digestive

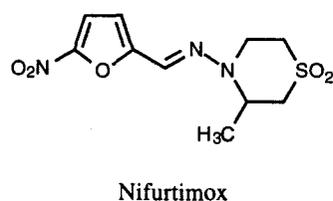
Isolée ou associée à la forme cardiaque, elle se traduit essentiellement par une dilatation de l'œsophage et du côlon.

3. Le diagnostic et le traitement

Le diagnostic de ces infections peut être réalisé par un examen parasitologique, immunologique, par polymérase chain reaction (PCR) ou par combinaison de ces différentes techniques.

Les souches de *T. cruzi* peuvent être individualisées par l'étude de leur comportement et du cours de l'infection chez l'hôte (infectivité, virulence, pathogénicité...) et par une analyse moléculaire et génétique des parasites. Elles peuvent être isolées par xénodagnostic, hémoculture et, en phase aiguë, par inoculation de sang d'animaux infectés au souriceau nouveau-né. L'amplification se fait par passages successifs chez l'animal de laboratoire ou en culture cellulaire axénique.

Il n'existe pas encore de chimiothérapie efficace contre la Maladie de Chagas.⁸ Entre 1965 et 1975 sont apparus le benznidazole et le nifurtimox, deux hétérocycles nitrés, les deux seules drogues mises sur le marché jusqu'à présent.⁸ Le benznidazole est toujours utilisé en chimiothérapie contre la maladie de Chagas malgré ses effets secondaires importants. Le nifurtimox a été retiré du marché.



Le nifurtimox ou (3-méthyl-4-(5'-nitrofurfurylidèneamino) tétrahydro-4H-1,4-thiazine-1,1-dioxyde (BAY 2502) était commercialisé sous le nom de Lampit® par la compagnie Bayer. Le benznidazole ou *N*-benzyl-2-nitroimidazole acétamide (RO 7-1051) est commercialisé sous le nom Rochagan® par la compagnie Roche.

Ces médicaments trypanocides sont actifs uniquement pendant la phase aiguë (tableau 1⁹). Ils éliminent les symptômes présents durant cette phase et diminuent la durée

de l'infection. Pour certains patients, le traitement est inefficace ; cela peut s'expliquer par la grande diversité des souches de parasites et l'apparition de phénomènes de résistance de certaines souches. Les spécialistes considèrent que le traitement est sans intérêt en phase chronique.¹⁰ La maladie de chagas n'est pas curable à son stade ultime.

| Composé | Tolérance et toxicité | Indications et posologies | Observation |
|-------------------------------------|--|---|-------------------------------|
| Benznidazole (encore sur le marché) | Réactions cutanées par hypersensibilité immédiate liée à la destruction des parasites Polynévrites dose-dépendantes Polynévrites réversibles après l'arrêt des prises | - forme aiguë : 5 à 10 mg/kg/jour 2 prises, posologie croissante pendant 1 semaine, <i>per os</i> pendant 1 mois - <u>forme chronique</u> : cure de 2 mois | Surveillance médicale |
| Nifurtimox (retiré du marché) | Toxicité neurologique (céphalée, convulsions, polynévrites) Troubles psychiques Troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissement, douleurs abdominales) Troubles allergiques | <u>forme aiguë</u> : - adultes et enfants de plus de 16 ans : 8 à 10 mg/kg/jour en 2 prises pendant 4 mois - enfants : 10 ans : 20mg/kg/j 10 - 15 ans : 15mg/kg/jour pendant 3 mois | Séjour à l'hôpital nécessaire |

tableau 1. Pharmacologie et Thérapeutique du benznidazole et du nifurtimox

Les modes d'action de ces deux molécules ont été étudiés par l'équipe de Docampo.¹¹ Ils diffèrent de façon notable :

- le benznidazole peut interférer dans la synthèse de macromolécules par la formation de liaisons covalentes ou par l'établissement d'autres interactions entre des composés intermédiaires de réduction du groupement nitro et différents composants cellulaires comme l'ADN, les lipides et les protéines.¹²
- dans le cas du nifurtimox, la réduction du groupement nitro conduit, en premier lieu, à la formation de radicaux nitroanions. Leur réoxydation par l'oxygène moléculaire mène à la production d'espèces oxygénées réactives qui nuisent au parasite, déficient en enzymes de détoxification. Il y aurait aussi une inhibition de la synthèse des acides nucléiques.

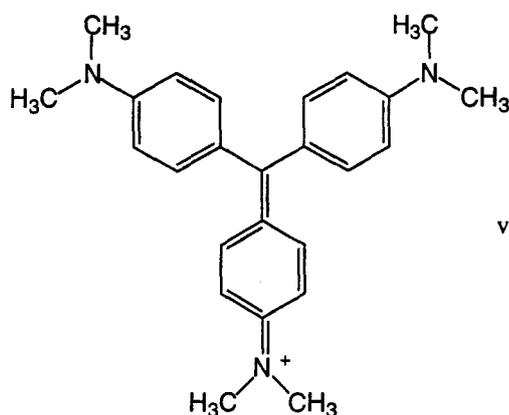
Mais, les effets secondaires sont très gênants, d'autant plus que les doses nécessaires sont importantes et le traitement long. Les risques encourus du fait de l'usage

de ces deux trypanocides sont de nature diverse. Dans le cas du benznidazole, la toxicité est due à l'interaction entre ses intermédiaires oxygénés réactifs (IOR) et des composants cellulaires de l'hôte. Dans le cas du nifurtimox, les radicaux libres formés se fixent directement sur des composants cellulaires et déclenchent, entre autres, la peroxydation des lipides.¹³ Des études menées sur des bactéries et des cellules de mammifères ont montré la génotoxicité de ces deux composés.^{14,15} Des enfants traités par le benznidazole ont présenté un accroissement du nombre des altérations chromosomiques des lymphocytes périphériques,¹⁶ tandis que l'emploi du nifurtimox multipliait par 13 le nombre de modifications génétiques spontanées.¹⁷

Les effets secondaires sont donc loin d'être négligeables, mais il est important de remarquer que 2 à 8% des malades non traités décèdent de la maladie de Chagas au cours de la phase aiguë.

Dans les formes chroniques, les cures sont longues (1 à 4 mois) et les résultats aléatoires. Plusieurs années de surveillance clinique, parasitologique et sérologiques sont nécessaires pour affirmer la guérison.

Mais, la prévention demeure toujours la meilleure solution. Les différents traitements de la maladie de Chagas étant peu efficaces et chers, et les pays concernés économiquement pauvres, un moyen simple et peu coûteux a été mis en oeuvre pour limiter au maximum la transmission du parasite par transfusion sanguine : les sangs suspects sont traités par le violet de gentiane (0.25 g/litre de sang).



violet de gentiane ou cristal viole

Ce composé détruit les formes trypomastigotes du parasite au bout de 24 heures à 4°C.¹⁸ De plus, son seul effet secondaire est l'apparition d'une couleur bleue transitoire de la peau et des muqueuses.^{19,20}

4. Orientation actuelle de la recherche thérapeutique

Depuis des années, de nombreuses molécules ont été étudiées dans le but de concevoir une chimiothérapie contre la maladie de Chagas. L'introduction sur le marché du benznidazole et du nifurtimox, dans les années 70, a marqué un tournant dans les méthodes d'étude et de recherche.

Avant 1960, l'approche prévalente de la chimiothérapie reposait principalement sur des observations cliniques. Mais, les essais étaient menés de façon peu rigoureuse tant au niveau du traitement, effectué sur des animaux pendant de trop courtes périodes, qu'au niveau de l'interprétation des résultats, beaucoup trop simplifiée.

Au cours des années 80 ont été rendues publiques de nombreuses études sur les mécanismes d'action de diverses molécules, telles que des dérivés de purine, des hétérocycles nitrés et des dérivés d'azole. Mais, pour 50% de ces composés, seul leur effet sur la prolifération des épimastigotes était testé et, de plus, était impossible à généraliser vues les différences notables existant avec les autres formes du parasite.

Jusqu'à présent, de toutes les molécules ayant atteint les phases cliniques, aucune n'a réellement rempli tous les critères nécessaires à la mise sur le marché (efficacité, absence d'effets secondaires, faible coût ...).

Actuellement, la recherche s'oriente vers une meilleure connaissance du parasite et, en particulier, des mécanismes biologiques et biochimiques différant de ceux de l'hôte infesté. Ainsi, à partir de l'étude de cibles spécifiques au parasite *T. cruzi*, des molécules efficaces en chimiothérapie et surtout spécifiques pourront être mises au point. En

particulier, la sensibilité de *T. cruzi* au stress oxydant ouvre des perspectives dans la chimiothérapie contre la maladie de Chagas.

II. La Lutte contre le Stress Oxydant chez l'Hôte et le Parasite

1. Le stress oxydant

Hormis les organismes spécialement adaptés à la vie anaérobie, tous les animaux et plantes ont besoin d'oxygène pour la production de l'énergie nécessaire à la vie. Ainsi, l'être humain consomme journalièrement 800 litres d'oxygène dont le vingtième environ est converti à la suite de réactions secondaires en espèces oxygénées réactives comme $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} ... Ces espèces se forment par l'intermédiaire d'un processus biochimique qui permet à la molécule d'oxygène moléculaire de réagir malgré son inertie naturelle. Elles sont cytotoxiques du fait de leur aptitude à modifier acides nucléiques, protéines à groupements thiols ou encore lipides membranaires, et sont directement impliquées autant dans diverses pathologies, comme le cancer ou l'athérosclérose, que dans l'évolution naturelle que constitue le vieillissement.

En plus du processus physiologique normal, des radicaux sont également produits sous l'influence de substances exogènes. Ces substances peuvent être des composés qui existent naturellement dans l'atmosphère (ozone, NO_2 ,...), des composés chimiques synthétisés par l'homme (CCl_4 ,...) ou résultant des activités humaines (benzopyrènes).²¹

La transformation de l'oxygène en radical libre s'effectue par réduction enzymatique de la molécule d'oxygène. La capture d'un électron transforme cet élément en un intermédiaire oxygène réactif, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Les enzymes qui catalysent cette réduction sont des métallo-protéines : les oxydases. L'anion superoxyde subit à son tour, spontanément ou sous l'action d'une enzyme (la superoxyde dismutase ou SOD), une réaction de dismutation qui produit de l'eau oxygénée. Par rupture de la liaison O-O,

H_2O_2 se transforme en espèces oxygénées très oxydantes telles que le radical hydroxyle OH^\bullet (figure 4).

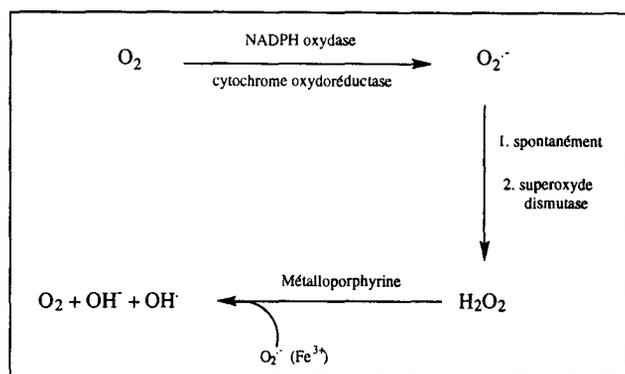


figure 4. Formation des IOR

Le stress oxydant n'est pourtant pas seulement une conséquence indésirable de la vie aérobie : il peut représenter aussi un important moyen de défense de l'organisme face aux agressions externes. Ainsi, les leucocytes polynucléaires neutrophiles et les macrophages produisent des anions superoxydes pour combattre bactéries, parasites et cellules tumorales. Ces cellules possèdent un système enzymatique basé sur la NADPH-oxydase producteur d'anion superoxyde. L'anion et l'eau oxygénée formés entraînent toute une série de réactions chimiques productrices de substances très efficaces pour lutter contre une infection bactérienne (anion hypochlorite, chloramines, oxygène singulet...).²²

2. Stress oxydant et glutathion chez l'hôte

2.1. Elimination des espèces oxygénées réactives

La toxicité de la molécule d'oxygène s'exprime par des états pathologiques et par le vieillissement. En effet, les êtres vivants possèdent des systèmes de défense contre le stress oxydant, basés sur trois familles d'enzymes : la superoxyde dismutase, le système glutathion peroxydase/glutathion réductase, la catalase (figure 5).²³

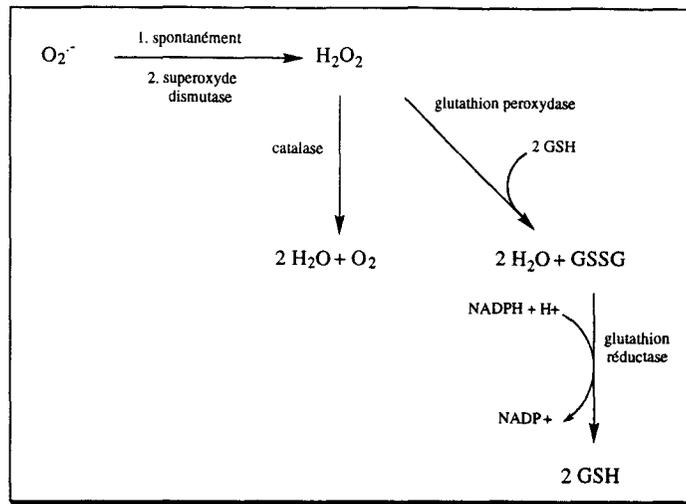


figure 5. Système de défense enzymatique

2.1.1. Enzymes glutathion-indépendantes

Le système de défense le plus important est basé sur la superoxyde dismutase. Cette enzyme catalyse la dismutation de $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 . Les SOD existent dans les mitochondries (SOD à manganèse) et dans la cytosol (SOD à cuivre et à zinc).²⁴

La catalase accélère la réaction spontanée de transformation de H_2O_2 en H_2O et O_2 .

2.1.2. Enzymes glutathion-dépendantes

Le glutathion est un tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine) présent en concentration très importante à l'intérieur des cellules (0.5 à 10 mM).

La glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR) jouent également un rôle essentiel dans le système de défense des cellules. La GPx, enzyme cytosolique sélénée, réduit, en présence de glutathion, l'eau oxygénée et les peroxydes lipidiques (ROOR). La GR, flavoprotéine NADPH-dépendante, régénère le glutathion sous sa forme réduite active GSH, à partir du GSSG formé au cours de ces réactions.

Ce système de défense enzymatique se double d'un autre moyen de lutte contre le stress oxydant basé sur le piégeage des radicaux libres par des réactions chimiques. Mais, une concentration assez importante en réactif de piégeage est nécessaire. Certains de ces réactifs sont régénérés par des enzymes et peuvent ainsi éliminer les IOR de façon catalytique.

Ainsi, le GSH peut réagir avec les peroxydes ou les radicaux hydroxyles pour donner du glutathion disulfure (GSSG), régénéré en GSH par la GR, et de l'eau respectivement. C'est le seul mode d'élimination du radical hydroxyle (figure 6).

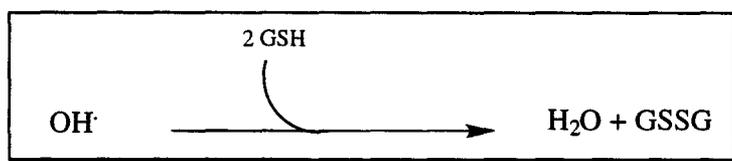
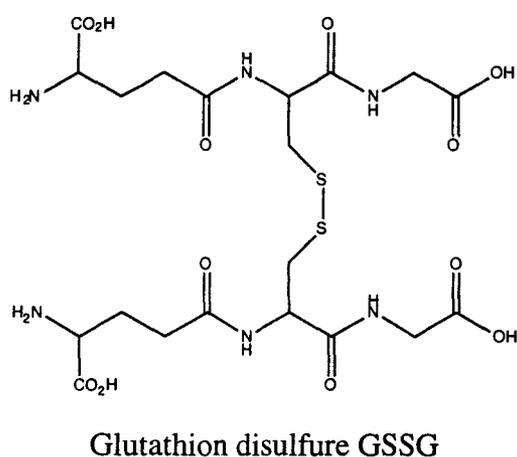


figure 6. Détoxification de l'ion hydroxyle

Le tocophérol ou vitamine E réagit avec les radicaux libres et forme un radical tocophéryle très stable, d'où le piégeage des espèces oxygénées réactives.

L'ascorbate ou vitamine C réagit avec les IOR de la même façon que le GSH. Il se forme le radical libre semihydroascorbate qui se transforme en déshydroascorbate. Ce dernier est régénéré en ascorbate sous l'action de la déshydroascorbate réductase, enzyme GSH-dépendante (figure 7).

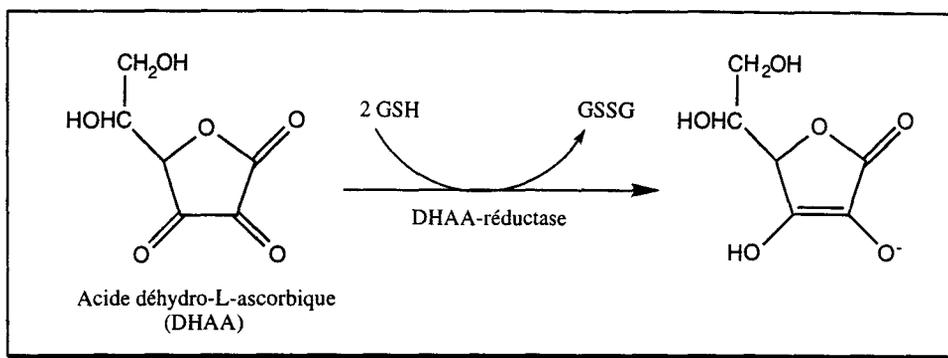


figure 7. Régénération enzymatique de l'ascorbate

L'ascorbate régénère la vitamine E en réagissant avec le radical tocophéryle pour donner le radical ascorbyle également très stable.²⁵

Parmi les autres piègeurs de radicaux, on peut également citer l'acide urique, les flavonoïdes régénérables par l'ascorbate, le β -carotène et la biliburine.

Le glutathion intervient dans de nombreux mécanismes enzymatiques ou non de lutte contre le stress oxydant chez l'hôte. Mais, il possède également d'autres fonctions biochimiques.

2.2. Autres fonctions du glutathion

En dehors de son rôle dans des réactions enzymatiques de lutte contre le stress oxydant et dans les piégeages de radicaux libres, le glutathion intervient également dans la réduction de ponts disulfures, dans le transport d'acides aminés, dans la réduction des ribonucléotides...²⁶

De plus, il piège des substances xénobiotiques (substances exogènes telles que les drogues) et de nombreuses substances électrophiles endogènes. Des composés glutathion S-conjugués se forment par des additions nucléophiles catalysées par des enzymes appelées glutathion S-transférases (GST) (figure 8).²⁷ Ces composés sont plus stables, moins réactifs et plus polaires que les électrophiles initiaux. Ils sont donc plus facilement exportés hors de la cellule par des pompes ATP-dépendantes.

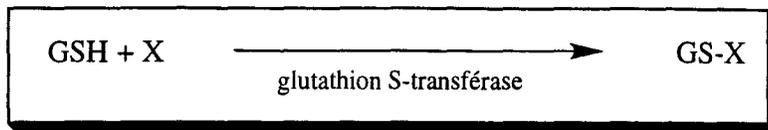


figure 8. Réactions enzymatiques catalysées par les glutathions S-transférases

Le glutathion intervient également comme cofacteur dans plusieurs réactions enzymatiques, en particulier celles catalysées par les glyoxalases (figure 9). Au cours de cette réaction, l'hémimercaptal, issu de l'addition nucléophile du GSH sur le méthylglyoxal, est transformé en S-lactoylglutathion par la glyoxalase I, lui-même hydrolysé en D-lactase par la glyoxalase II. Le GSH est régénéré au cours de cette deuxième réaction.

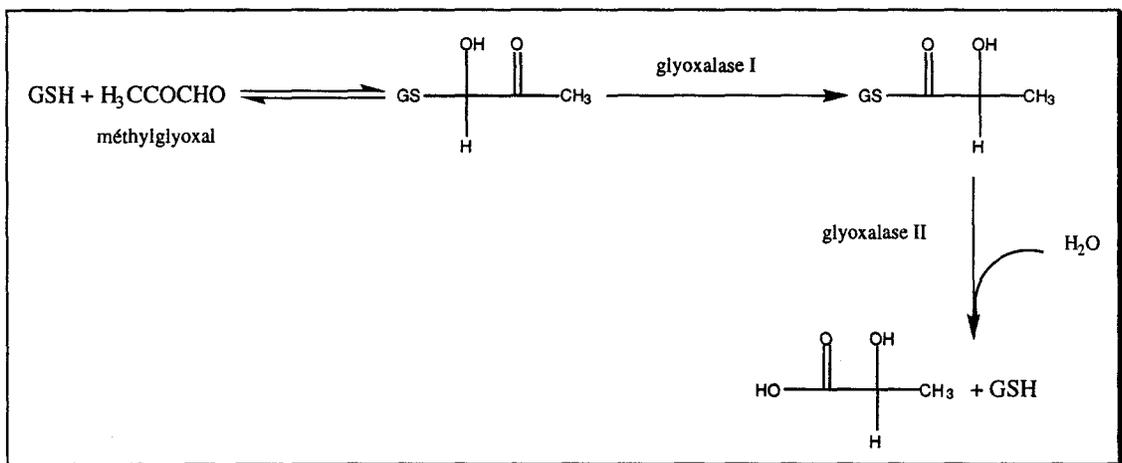
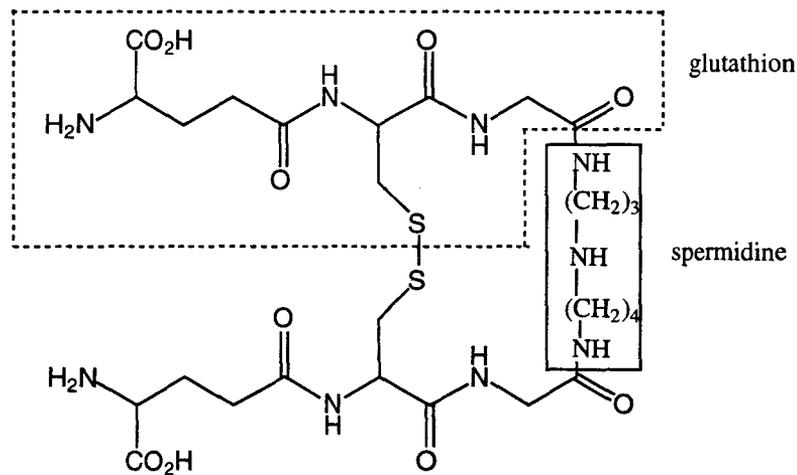


figure 9. Réactions enzymatiques catalysées par les glyoxalases I et II

3. Stress oxydant et trypanothion chez le parasite

Des expériences ont montré que les parasites de la famille des trypanosomatidae ne présentent pas d'activités glutathion réductase, glutathion peroxydase ou catalase décelables, au contraire des organismes hôtes, qui ont nécessairement besoin de glutathion pour se défendre contre le stress oxydant.

Chez les parasites, le thiol majoritaire est le trypanothion,²⁸ malgré la présence d'une faible quantité de glutathion intracellulaire. Les trypanosomatidae (*leishmania*, *T. cruzi*, *T. congolense* et *T. brucei*) sont capables de conjuguer le glutathion avec une polyamine pour former le trypanothion. Le trypanothion est la N^1, N^8 -bis(glutathionyl)spermidine, deux molécules de glutathion reliées de façon covalente par une spermidine, par l'intermédiaire des groupements carboxylates des glycines.



Trypanothion disulfure T(S)₂

Le trypanothion a été découvert en 1985, par Fairlamb et Cérani,²⁹ lors de l'étude d'une activité glutathion réductase inhabituelle chez le trypanosome africain *Trypanosoma brucei brucei*. Des extraits cellulaires dialysés de cet organisme ne pouvaient réduire le GSSG en présence de NADPH que si le milieu contenait un cofacteur de faible poids moléculaire. Des études ont montré que ce cofacteur comportait un groupement disulfure réductible enzymatiquement et qu'il était absent des autres organismes. Après purification à partir des extraits dialysés,³⁰ analyse des acides aminés, spectrométrie de masse et synthèse par voie chimique, ce cofacteur a été identifié comme étant le N^1, N^8 -bis(glutathionyl)spermidine et a été nommé trypanothion.

Le trypanothion et l'enzyme, la trypanothion réductase (TR), flavoprotéine NADPH-dépendante, jouent chez le parasite le rôle du couple glutathion/glutathion réductase chez l'hôte (figure 10).

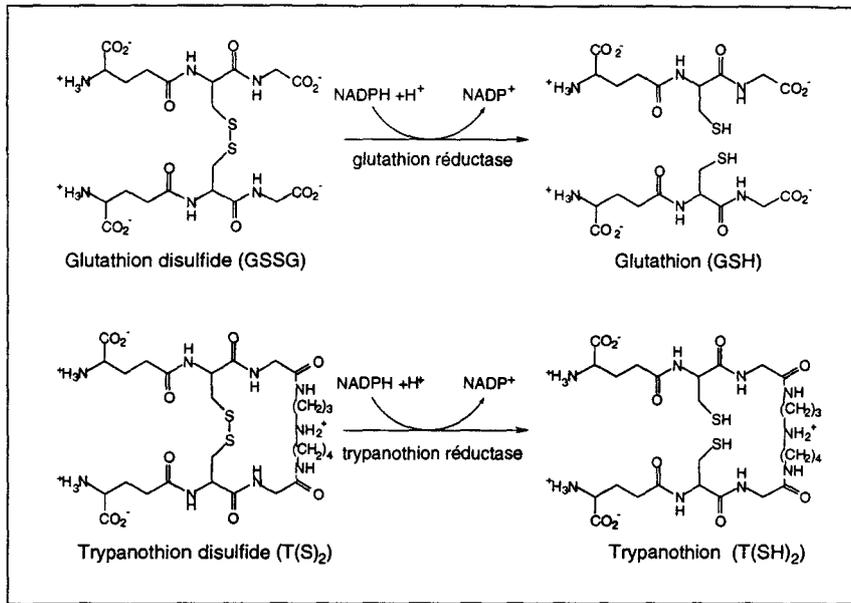


figure 10. Réactions enzymatiques de régénération du glutathion de l'hôte et du trypanothion du parasite

D'autre part, il a été récemment mis en évidence, chez *T. cruzi*, l'existence d'un nouveau conjugué thiol-polyamine, le *N*¹,*N*⁹-bis(glutathionyl)aminopropylcadavérine appelé homotrypanothion, dont la structure a été confirmée par synthèse chimique.³¹ Des études cinétiques utilisant la TR recombinante montrent que l'homotrypanothion disulfure est reconnu et réduit par l'enzyme de la même façon que le T(S)₂. Cet homotrypanothion n'existe pas chez les trypanosomes africains et chez les leishmanies.

3.1. Propriétés physiques du trypanothion comparées à celles du glutathion

A des valeurs de pH physiologiques, les deux composés trypanothion disulfure (T(S)₂) et dihydrotrypanothion (T(SH)₂) sont sous la forme de zwitterions avec une charge nette de + 1. La charge nette est de - 1 pour le glutathion et de -2 pour le glutathion disulfure.

A l'opposé du glutathion dont les extrémités carboxylates sont polaires, le pont spermidine donne un caractère hydrophobe à la partie carboxylate terminale du trypanothion.

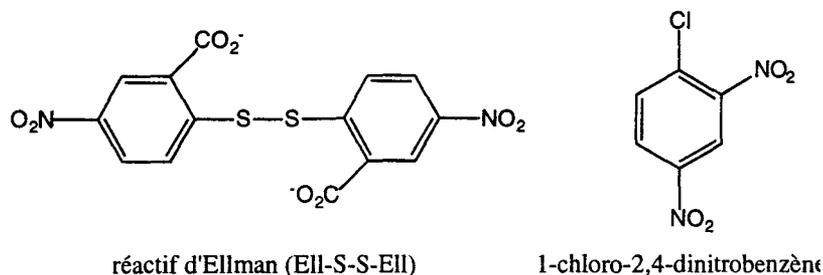
Des modèles moléculaires ont permis de déduire la capacité du T(S)₂, macrocycle à 24 atomes, et du T(SH)₂, dithiol linéaire, à adopter la conformation de feuillets β.³⁰ Cependant, la RMN a montré la flexibilité de ces deux peptides en phase aqueuse.³²

La connaissance du potentiel rédox du couple T(S)₂/ T(SH)₂ est importante pour la compréhension du rôle de ces composés dans les cellules. Des mesures par une technique de déplacement d'équilibre ont déterminé un potentiel rédox standard E₀' de - 0.242 ± 0.002 V.³³ Cette valeur est légèrement plus électronégative que celle du couple GSSG/GSH (E₀' = -0.230 V), mais moins que celle d'autres dithiols physiologiques comme le couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase (E₀' = -0.260 V) ou l'acide lipoïque (E₀' = -0.288 V). Le T(SH)₂ ne peut être considéré comme un équivalent biologique du dithiothréitol (E₀' = -0.330 V) du fait de leur différence d'électronégativité.

Comme d'autres dithiols, le dihydrotrypanothion peut former des complexes stables avec des composés organiques trivalents de l'arsenic.³⁴

3.2. Réactivité des fonctions thiols de T(SH)₂ et de GSH

Au laboratoire a été étudiée la réaction non enzymatique de conjugaison du GSH et du T(SH)₂ avec deux centres électrophiles de nature différente : le réactif d'Ellman et le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB).³⁵



Les résultats obtenus sont valables pour des pH compris entre 6 et 9.5, pour lesquels le pourcentage de thiolate en solution est plus important pour T(SH)₂ que pour GSH. Cette gamme de pH inclut vraisemblablement les valeurs de pH des compartiments physiologiques dans lesquels de telles réactions de conjugaison peuvent avoir lieu.

Dans les deux cas, à un pH aux environs de 7 et à 28°C (température de prolifération des épimastigotes), la formation des trypanothion S-conjugués se faisait plus rapidement que la formation des glutathion S-conjugués équivalents. Pour les électrophiles tels que le CDNB, lorsque le pH décroissait jusqu'à une valeur de 5.5, T(SH)₂ était encore capable d'effectuer une réaction de conjugaison alors que GSH n'était plus réactif. Bien que GSH soit intrinsèquement un meilleur nucléophile que T(SH)₂, le fait que ce dernier soit davantage ionisé à pH physiologique le rend plus réactif. La grande quantité de T(SH)₂ présente chez les trypanosomes (1 à 2 nM d'après Fairlamb)³⁷ rend sa conjugaison non enzymatique extrêmement efficace avec de nombreux électrophiles. Ainsi, la formation non enzymatique des trypanothion S-conjugués est suffisante pour éliminer la plupart des xénobiotiques.

Dans le cas de la réaction d'échange thiol-disulfure avec le réactif d'Ellman, la structure bifonctionnelle de T(SH)₂ conduit à un mécanisme cinétique différent de celui obtenu pour GSH. Le dernier équilibre, qui conduit à la formation de T(S)₂ et d'un thiolate Ell-S⁻, est, dans ce cas, intramoléculaire et, en conséquence, beaucoup plus rapide que pour GSH. En milieu dilué, une structure telle que celle du trypanothion sera beaucoup plus efficace que GSH pour réduire des composés de type RSSR en leurs thiols correspondants. De plus, la présence d'une amine protonée sur le pont spermidine du trypanothion peut éventuellement faciliter le départ d'un anion thiolate.

3.3. Biosynthèse du trypanothion

3.3.1. Les polyamines

Les polyamines sont indispensables à la croissance et à la prolifération des cellules que ce soit chez l'hôte ou chez les parasites.³⁶ En particulier, chez les trypanosomatidae, la spermidine joue un rôle important.³⁷

Chez les trypanosomes africains, la spermidine est synthétisée à partir de l'ornithine et de la méthionine, de la même façon que dans les cellules de mammifères (figure 11).

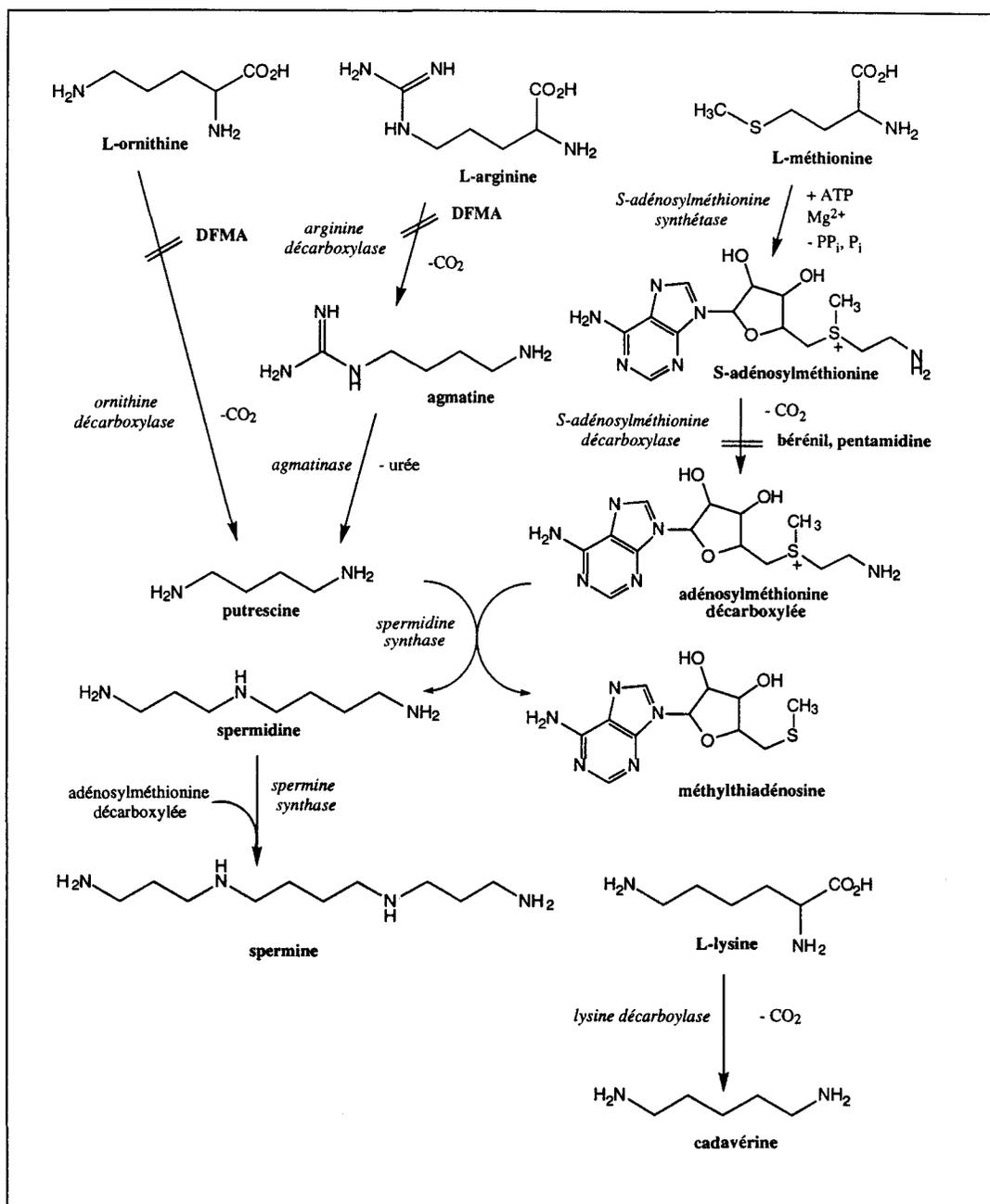


figure 11. Voies de biosynthèse des polyamines

Toutes les enzymes intervenant dans cette synthèse ont été identifiées : ornithine décarboxylase (ODC),^{38,39,40} S-adenosylméthionine synthétase,⁴¹ S-adenosylméthionine décarboxylase^{42,43} et spermidine synthase.⁴⁴ Un certain nombre de molécules, inhibant ces

enzymes, sont déjà utilisées chez le trypanosome africain. L'Eflornithine ou D,L- α -difluorométhylornithine (DFMO) est un très bon trypanocide couramment utilisé.⁴⁵ Ce composé mime la structure de l'ornithine et inhibe de façon irréversible l'ODC. Outre les problèmes de croissance et de réplication dus au manque de polyamines, il entraîne une diminution de la synthèse du trypanothion et, donc, une plus grande sensibilité au stress oxydant. Les autres inhibiteurs des voies de biosynthèse des polyamines sont le Bérénil et la Pentamidine (Lomidine) qui inhibent la S-adénosylméthionine décarboxylase.

Le mécanisme de l'étape initiale de formation de la putrescine chez *Trypanosoma cruzi* est moins clair. En effet, la croissance de ces organismes n'est pas sensible au DFMO.⁴⁶ Par contre, la prolifération de ces parasites (forme amastigote) à l'intérieur des macrophages est sensible à de fortes concentrations en D,L- α -difluorométhylarginine (DFMA).⁴⁶ Le DFMA est un inhibiteur de la biosynthèse de la putrescine à partir de l'arginine *via* l'agmatine.⁴⁷ Cette sensibilité au DFMA suggère que *T. cruzi* contient de l'arginine décarboxylase, une enzyme qui n'existe pas dans les cellules de mammifères.⁴⁸ Des études de radiolabelling avec de la [¹⁴C]-ornithine et de la [¹⁴C]-arginine ont montré l'absence d'activité enzymatique *in vitro*.⁴⁶ Ainsi, la décarboxylation des acides aminés joue un rôle négligeable dans la biosynthèse des polyamines. La majeure partie de la putrescine et de la cadavérine présentes chez le parasite provient du milieu de croissance, par transport actif, et est ensuite convertie respectivement en trypanothion et homotrypanothion *via* la spermine et la bis(aminopropyl)cadavérine.³¹

3.3.2. Le glutathion

Tous les trypanosomatidae contiennent du glutathion (dont 10 à 30% sous forme GSH libre). Les voies de synthèse n'ont pas été étudiées en détail. Mais, le fait que la buthionine sulfoximine, un inhibiteur spécifique de la L- γ -glutamyl-L-cystéine synthétase dans les cellules de mammifères, inhibe également la biosynthèse du glutathion chez *T.*

cruzi, *T. brucei* et *C. fasciculata* suggère que les trypanosomes utilisent des voies de biosynthèse classique.

3.3.3. Le trypanothion

Dans les cellules de mammifères, il n'existe pas de processus permettant de conjuguer la spermidine et le glutathion.

Chez les parasites, des études de métabolisme ont montré que la spermidine et le glutathion se conjuguent sous l'action de deux enzymes ATP-dépendantes pour former le trypanothion *via* des isomères N^1 - et N^8 - de la glutathionylspermidine (figure 12) :^{49,50} une glutathionylspermidine synthétase de 90 kDa et une trypanothion synthétase de 82 kDa.⁵⁰

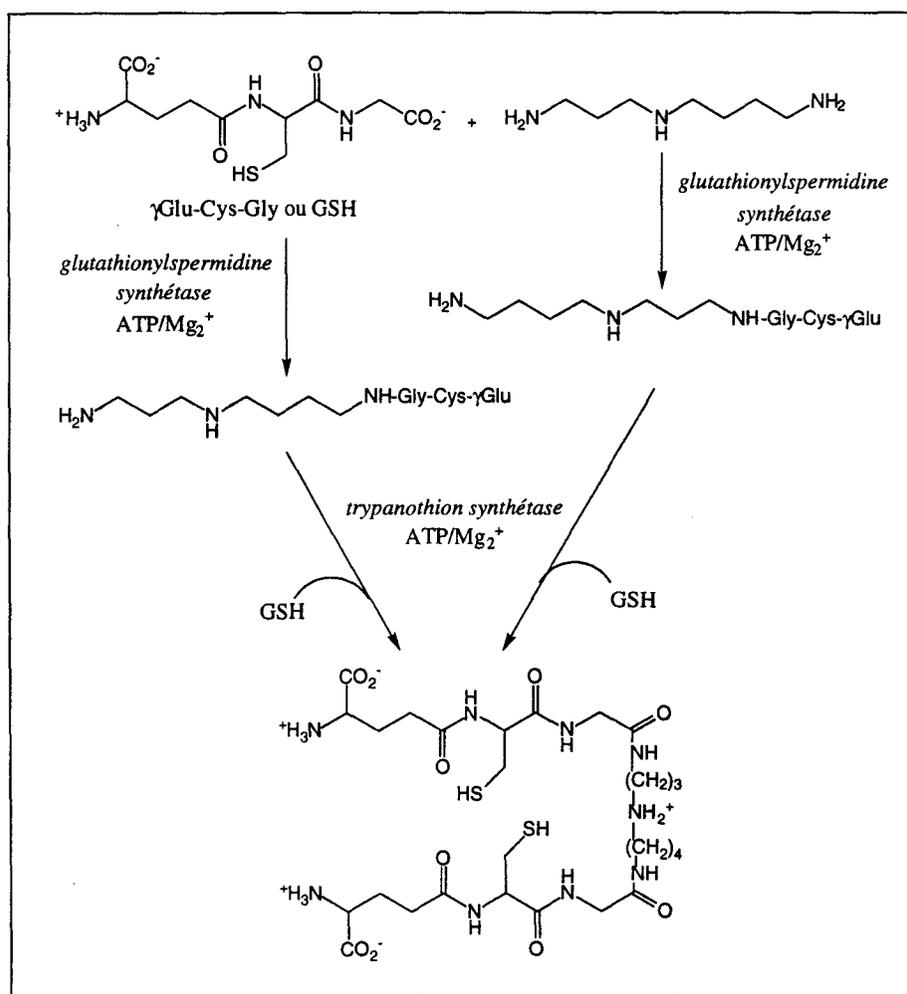


figure 12. Biosynthèse du trypanothion

La glutathionylspermidine synthétase forme les isomères N^1 - et N^8 - de la glutathionylspermidine. La trypanothion synthétase provoque la fixation d'un deuxième GSH sur chacun de ces isomères pour former le trypanothion réduit $T(SH)_2$. Le trypanothion est régénéré à partir de $T(S)_2$ par la trypanothion réductase. Ces trois enzymes sont fortement spécifiques vis-à-vis de leur substrat respectif. Elles constituent donc des cibles potentielles pour la chimiothérapie contre la maladie de Chagas.

3.4. Elimination des espèces oxygénées réactives

Comme tout organisme vivant dans un environnement aérobie, les trypanosomatidae sont exposés à la formation d'IOR tels l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle. Ces espèces proviennent de cofacteurs internes (flavones, quinones, thiols réduits...), de leur propre métabolisme (réduction d'hétérocycles nitrés, de quinones, de bléomycines...) et du système de défense immunitaire de l'hôte.

Trypanosoma cruzi est très sensible au stress oxydant. Sa première ligne de défense consiste en une SOD Fe-dépendante,⁵¹ différente des SOD Cu-, Zn- et Mn-dépendantes des cellules de mammifères (figure 13).

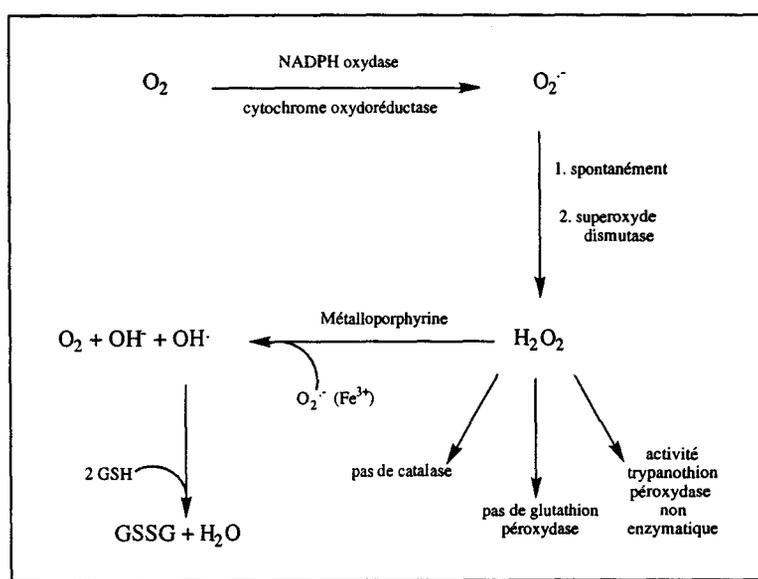


figure 13. Elimination des IOR

Sa deuxième ligne de défense nécessite l'élimination du peroxyde d'hydrogène. Mais, il semble que le parasite ne possède ni catalase, ni glutathion peroxydase. Le trypanothion peut réagir non enzymatiquement avec H_2O_2 de façon efficace et pallier ainsi l'absence d'une trypanothion peroxydase.⁵² De plus, des activités ascorbate peroxydase⁵³ et déshydroascorbate réductase⁵⁴ ont été mises en évidence à partir de lysats parasitaires sans que les enzymes aient été isolées.

3.5. Autres fonctions du trypanothion

3.5.1. Réactions d'échange thiol-disulfure

Tous les organismes sans exception contiennent de fortes concentrations d'au moins un thiol de faible poids moléculaire dont le rôle est de maintenir un environnement intracellulaire réducteur. Généralement, le glutathion GSH remplit, entre autres, cette fonction. Certains organismes utilisent des analogues du GSH comme l'homoglutathion,⁵⁵ la *N*⁷-glutathionylspermidine,⁵⁶ le trypanothion et la L- γ -glutamyl-L-cystéine.⁵⁷ D'autres procaryotes sont totalement dépourvus de glutathion et utilisent des composés contenant des groupements thiols tels que la cystéine, l'acide lipoïque, le sulfure d'hydrogène ou des thiosulfates.⁵⁸

L'activité de nombreuses enzymes peut être affectée par la modification des groupements thiols des protéines, soit par la formation de disulfures mixtes, soit par la formation de disulfures intramoléculaires.

Chez les mammifères, la réduction des ponts disulfures est assurée par deux familles de disulfures réductases, la thiorédoxine (Trx) et la glutarédoxine (Grx). Cette activité réductase nécessite leur réduction préalable par un réducteur plus puissant, le NADPH, *via* les deux flavoprotéines NADPH-dépendantes, la thiorédoxine réductase (TrxR) et le couple glutathion réductase/glutathion (figure 14).

Chez les trypanosomes, ces deux systèmes n'ont pas encore été détectés. C'est le couple TR/trypanothion qui semble remplacer les couples GR/glutathion et TrxR/Trx observés chez les eucaryotes supérieurs (figure 14).

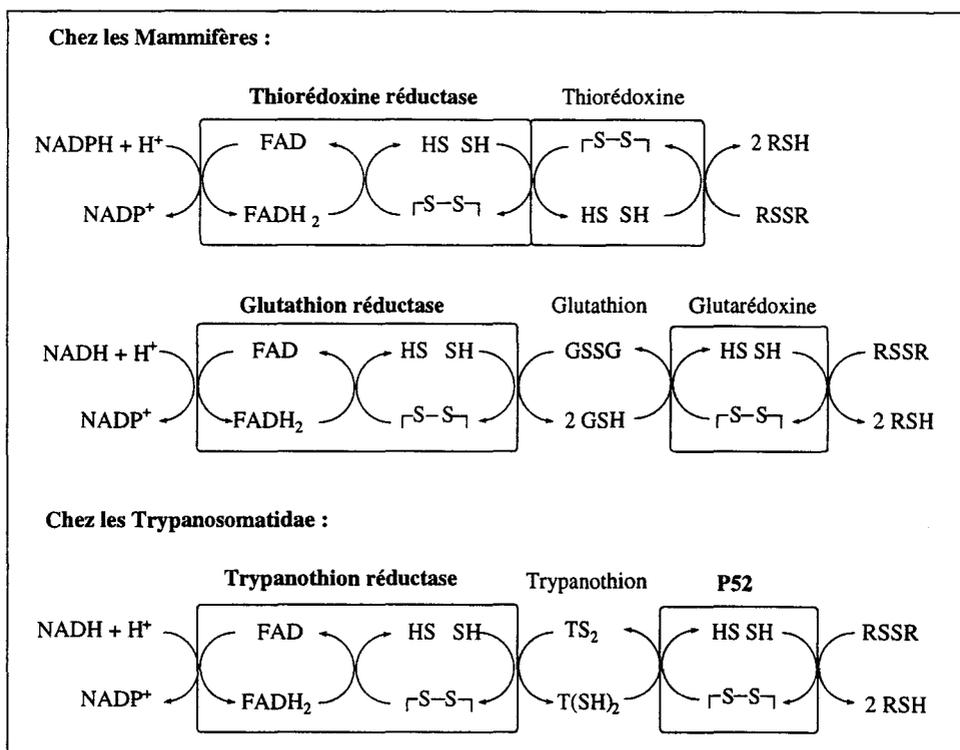


figure 14. Systèmes de réduction NADPH-dépendants des ponts disulfures

Afin d'identifier de nouvelles cibles, des colonnes de chromatographie d'affinité ont été préparées, dans notre laboratoire, en utilisant, soit le S-hexylglutathion, soit un analogue du trypanothion comme ligand. Le passage d'une fraction cytosolique d'épimastigotes de *T. cruzi* sur ces deux types de colonnes de chromatographie d'affinité a conduit à l'isolement de deux protéines originales (notées P52 et P28) dont les poids moléculaires en gel SDS-PAGE sont respectivement de 52 et 28 kDa. La protéine P52 s'est avérée être identique au produit du gène TcAc2, un gène déjà isolé chez *T. cruzi*. Une première activité thioltransférase entre le trypanothion et le GSSG a été décrite.⁵⁹

La mise en évidence pour P52 d'une activité trypanothion-glutathion disulfure thioltransférase, ainsi que la présence du motif FXXXXCPFC dans la partie N-terminale de la protéine, ont permis de l'identifier à un des membres de la famille des thiol-disulfure

oxydoréductases.⁶⁰ Ce motif est identique à celui retrouvé dans le site actif de la glutarédoxine (porc, riz, virus de la vaccine), un autre membre de la même famille. De plus, la protéine P52 catalyse les réactions de réduction de l'hydroxyéthylthiolsulfure (activité glutarédoxine) et du déshydroascorbate en présence de glutathion comme donneur d'hydrogène (activité déshydroascorbate réductase glutathion-dépendante). Des tests supplémentaires ont montré que P52 joue probablement le rôle d'une protéine disulfure réductase *in vivo*.

3.5.2. Détoxification des xénobiotiques

Certains organismes possèdent une famille remarquablement diverse de glutathion S-transférases, qui catalysent l'attaque nucléophile du glutathion sur de multiples xénobiotiques électrophiles hydrophobes, pour former des composés S-conjugués souvent moins toxiques et plus facilement excrétés. Certaines de ces enzymes participent à la réparation des dommages sur l'ADN et les membranes lipidiques, dus au stress oxydant.⁶¹ De nombreuses études ont également montré l'implication des glutathion S-transférases dans la résistance aux médicaments, aux métaux lourds toxiques, aux herbicides et aux insecticides.

Il est surprenant de constater le peu d'informations connues concernant les glutathion S-transférases chez les trypanosomatidae. Une enzyme a été purifiée chez *T. cruzi* : il s'agit d'un hétérodimère constitué de deux sous-unités de 20 et 17 kDa présentant une faible activité de type GST en présence d'iodure de méthyle ou de 1-chloro-2,4-dinitrobenzène.⁶² La fonction et le substrat physiologique de cette enzyme restent inconnus. Son isolement a précédé la découverte du trypanothion et sa spécificité pour ce dithiol n'a pas été étudiée.

Récemment, une activité trypanothion S-transférase a été identifiée dans des extraits de *C. fasciculata*,⁶³ mais une telle activité n'a pas été décelée chez *T. cruzi*.

Cette absence d'activité s'explique probablement par le fait que la formation non enzymatique des trypanothion S-conjugués est suffisante pour éliminer la plupart des xénobiotiques (voir & 3.2.).

3.5.3. Régulation des concentrations en polyamines

Des concentrations élevées en polyamines sont essentielles à la croissance et à la prolifération des cellules. Par conséquent, la biosynthèse des polyamines et la reconversion de molécules issues de ces polyamines jouent un rôle important dans la survie des organismes mammifères ou parasites.

Le trypanothion pourrait jouer un rôle de régulation des concentrations en spermidine libre durant la croissance.⁶⁴ Les concentrations en polyamines sont élevées chez les trypanosomatidae durant la phase exponentielle de croissance.⁶⁵ Chez *C. fasciculata*, au cours de la phase stationnaire de croissance, la spermidine libre peut être stockée sous forme de *N*^l-glutathionylspermidine quand le milieu devient acide.⁶⁴ Quand des conditions favorables de croissance sont rétablies, la *N*^l-glutathionylspermidine est rapidement reconvertie en spermidine libre et en trypanothion sans qu'il soit nécessaire de synthétiser *de novo* du glutathion ou de la spermidine.

3.5.4. Elimination des métaux lourds

Les groupements thiols des protéines sont des cibles pour les métaux lourds toxiques tels que le mercure, le cadmium, l'argent, le plomb, l'or et l'arsenic. Certains métaux, tels que le zinc et le cuivre, sont essentiels à l'état de traces en participant à diverses réactions enzymatiques mais sont toxiques aux fortes concentrations. Le piégeage de ces métaux fait souvent intervenir des groupements sulfhydryles comme le glutathion, dans les cellules de mammifères.⁶⁶

Le trypanothion forme un complexe stable avec des composés trivalents de l'arsenic.³⁴ L'exposition de *C. fasciculata* à des concentrations sublétales de Cd²⁺ ou Hg⁺

provoque un accroissement notable de la quantité de trypanothion, un accroissement moyen de la quantité de glutathionylspermidine et un accroissement mineur de la quantité de glutathion. A la suite de l'inhibition de la biosynthèse du glutathion et du trypanothion par de la buthionine sulfoximine, les cellules deviennent hypersensibles aux effets toxiques du cadmium. Le trypanothion est donc un paramètre important du système de défense du *C. fasciculata* contre la toxicité du cadmium.

III. La Trypanothion Réductase

Le trypanothion intervient dans de nombreux mécanismes de défense du parasite contre les agressions extérieures. Or, la plupart des fonctions antioxydantes du trypanothion conduisent à la formation de $T(S)_2$, qui doit être régénéré sous la forme $T(SH)_2$ pour permettre au parasite de se défendre. La trypanothion réductase est un élément essentiel pour la régénération du $T(SH)_2$ (figure 15) et peut donc constituer une cible majeure dans la recherche d'une chimiothérapie contre la maladie de Chagas.

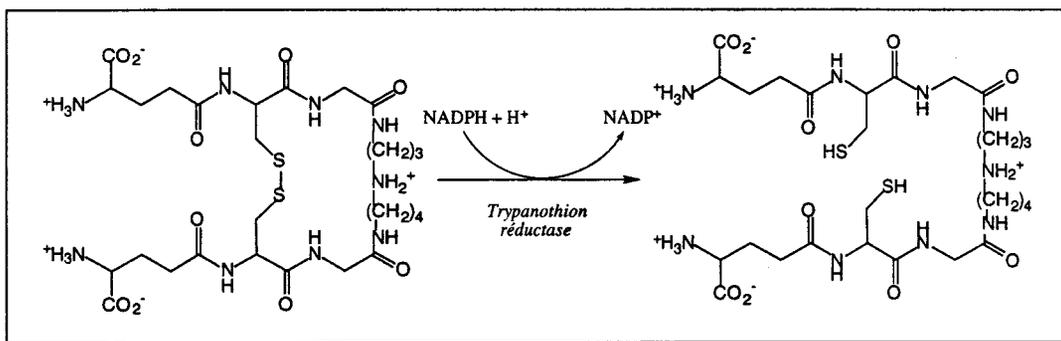


figure 15. Réduction enzymatique de $T(S)_2$ par la TR

1. Isolement et caractérisation

Le trypanothion a été mis en évidence en 1985. Ultérieurement, dans des extraits bruts de *Crithidia fasciculata* (espèce proche des trypanosomes mais non-pathogène pour l'homme), une enzyme de type NADPH-dépendante qui catalysait la réduction du $T(S)_2$ a

été identifiée. Cette enzyme a été purifiée en 1986⁶⁷ chez *C. fasciculata* par la même méthode utilisée pour purifier la GR et sa caractérisation a montré ses similitudes avec la GR. Par exemple, les deux enzymes sont des flavoprotéines homodimériques NADPH-dépendantes, présentant une activité rédox et une masse moléculaire de 50 kDa environ par sous-unité. La purification ultérieure de la TR chez *T. cruzi*,⁶⁸ le clonage et le séquençage du gène codant chez *T. cruzi*,⁶⁹ *T. congolense*,⁷⁰ *C. fasciculata*,⁷¹ *T. brucei*⁷² et *Leishmania donovani*⁷³ ont permis d'obtenir des données supplémentaires sur la TR (tableau 2).³⁷.

| Source | Trypanothion réductase | | | Glutathion réductase | |
|--|------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| | <i>C. fasciculata</i> | <i>T. cruzi</i> | <i>T. congolense</i> | <i>E. coli</i> | Homme |
| flavine | FAD | FAD | FAD | FAD | FAD |
| Pyridine dinucléotide | NADPH | NADPH | NADPH | NADPH | NADPH |
| Sous-unité M _r ^a | 54000 | 53900 | 53400 | 48700 | 52500 |
| Acides aminés/ss-unité | 491 | 492 | 492 | 450 | 478 |
| Structure oligomérique | dimérique | dimérique | dimérique | dimérique | dimérique |
| E _{ox} , λ _{max} (nm) | 464 | 461 | 464 | 462 | 460 |
| ε _{max} à λ _{max} (mM ⁻¹ cm ⁻¹) | 11.3 | 11.2 | 10.6 | -- | 11.3 |
| Transfert de charge dans EH ₂ | oui | oui | oui | oui | oui |
| K _m (μM) ^b | | | | | |
| Trypanothion disulfure | 53 (51;58) | 31 (18) | 45 (55;50) | 2000 | NS |
| Glutathion disulfure | NS | NS | NS | 66 (61;70) | 65 |
| K _{cat} (min ⁻¹) | | | | | |
| Trypanothion disulfure | 31000 (28600) | 9600 | 14200 | 6100 | NS |
| Glutathion disulfure | NS | NS | NS | 44000 | 12600 |
| K _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹) | 9.8 10 ⁶ | 5.2 10 ⁶ | 5.3 10 ⁶ | 6.2 10 ⁶ | 3.1 10 ⁶ |
| K _m ^{app} (NADPH) | 7 | 5 | 5 | 16 (25) | 9 |

a : calculée à partir de la séquence d'acides aminés (hormis le FAD)

b : les valeurs absolues varient suivant les conditions expérimentales (en particulier, les paramètres catalytiques pour la TR de *T. cruzi* sont très sensibles aux changements de pH et de force ionique)

NS : le composé considéré n'est pas un substrat de l'enzyme

tableau 2. Caractéristiques des GRs et TRs de différentes espèces

Les TRs issues de tous ces micro-organismes sont très homologues aux GRs, non seulement par leur nature et leur type d'activité, mais aussi parce qu'elles contiennent le FAD comme coenzyme, utilisent le NADPH comme donneur d'hydrogène et possèdent un pont disulfure capable d'exercer une activité rédox à l'intérieur du site actif. Cependant, malgré 40% d'homologie de séquence primaire entre la TR parasitaire et la GR humaine, ces enzymes sont fortement spécifiques vis-à-vis de leur substrat disulfure.^{68,37}

La GR de *E. coli* constitue une exception intéressante car elle est capable de réduire le T(S)₂ de la même façon que le GSSG.⁷⁴ Ceci est probablement dû au fait que *E. coli* peut synthétiser de la glutathionylspermidine au cours de sa phase stationnaire de croissance.

2. Mécanisme réactionnel

2.1. La glutathion réductase

La GR humaine est un homodimère constitué de deux sous-unités de 52 kDa. Elle possède deux sites actifs identiques. Des acides aminés des deux sous-unités participent à la formation de chacun des sites. Le cycle isoalloxazine du FAD forme une barrière entre les sites substrats : le NADPH se lie du côté *ré* et le GSSG du côté *si* de la flavine, qui se trouve proche du pont disulfure actif de la protéine (figure 16).

Le mécanisme de la GR humaine a été étudié par différentes méthodes : des analyses cinétiques incluant des modifications chimiques et de la spectroscopie UV, de la mutagenèse dirigée⁷⁵ et de la cristallographie aux rayons X.^{76,77} Toutes ces études confirment que c'est un mécanisme de type "ping-pong" dans lequel les électrons sont transférés du NADPH vers le GSSG *via* le cycle isoalloxazine du FAD et le pont disulfure de la cystéine du site catalytique de l'enzyme (figure 17).

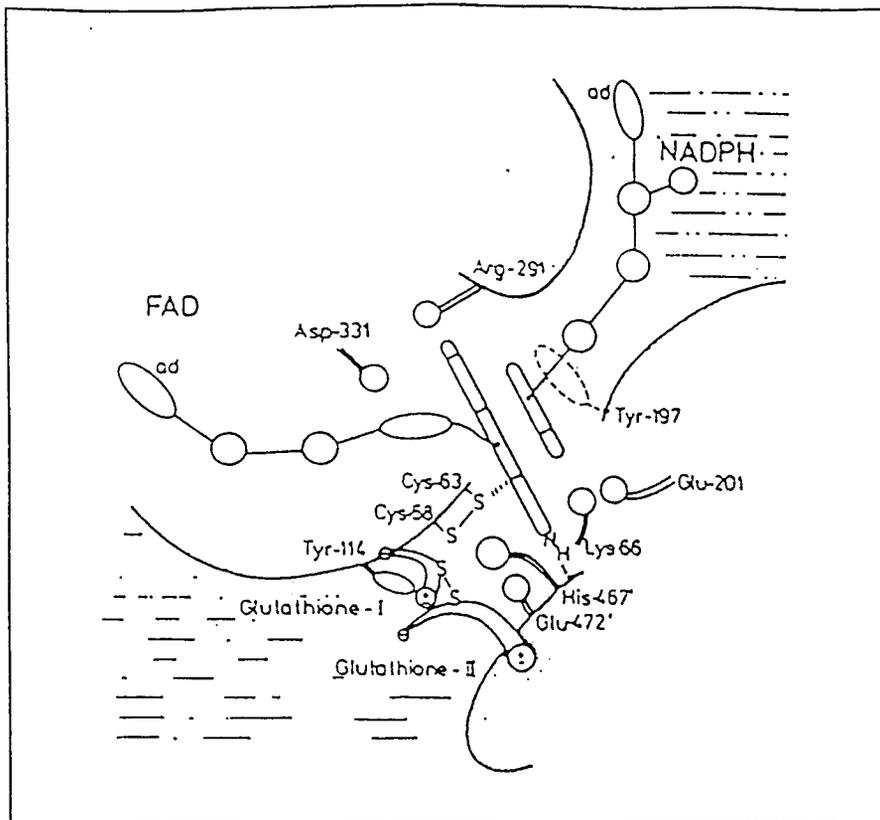


figure 16. Centre catalytique de la GR

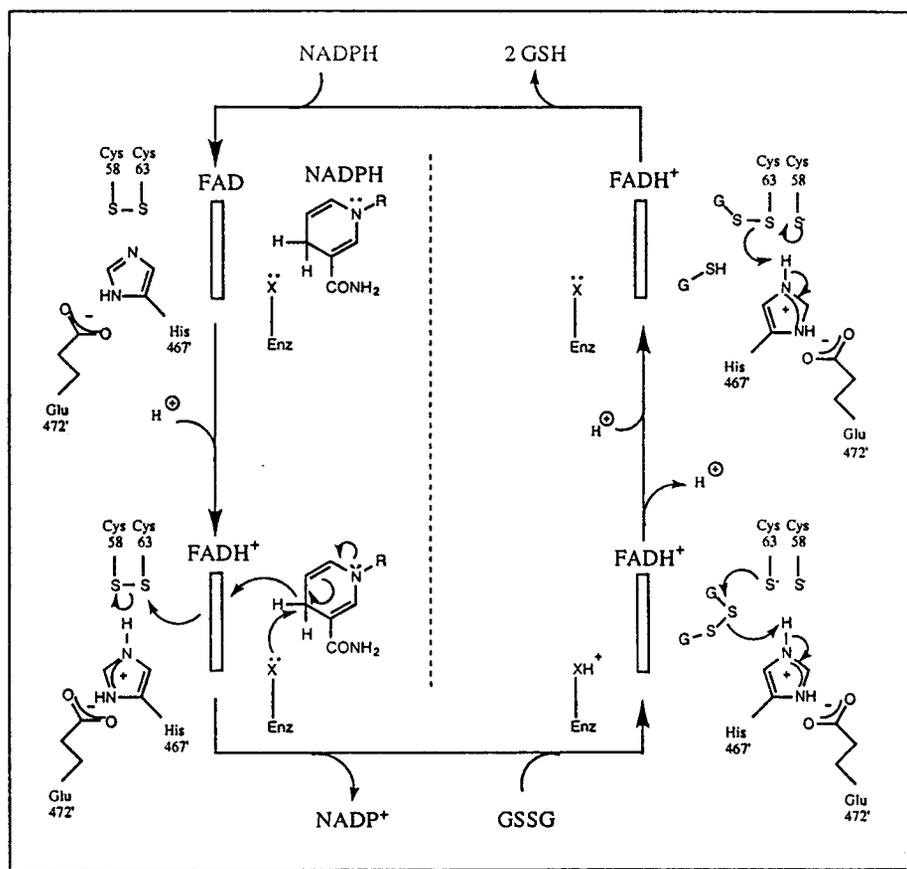


figure 17.
Mécanisme réactionnel postulé pour la GR humaine
(l'expérience montrerait que la base X est la Lys₆₆)⁷⁶

La première moitié du cycle catalytique comprend la réduction de l'enzyme sous sa forme EH₂, caractérisée par la formation du complexe de transfert de charge entre l'anion thiolate de Cys₆₃ du site de la GR et le cycle isoalloxazine du FAD. La seconde moitié du cycle catalytique comprend la réoxydation de la forme EH₂ par GSSG *via* un intermédiaire disulfure mixte entre Cys₅₈ de la GR et Cys-I de GSSG. Puis intervient His₄₆₇' qui agit en tant que système donneur/accepteur de protons.

Il est intéressant de noter que le remplacement du résidu histidine par un résidu glutamine ou arginine dans la GR de *E. coli* n'inhibe pas complètement l'activité. Les enzymes mutantes peuvent utiliser un donneur de protons de rechange permettant d'assurer faiblement la catalyse.⁷⁸

2.2. La trypanothion réductase

La TR de *T. cruzi* est un homodimère de deux sous-unités de 52 kDa. Le mécanisme de la TR n'a pas été étudié de manière aussi approfondie que celui de la GR. Mais, les alignements des séquences des TRs obtenues jusqu'à présent suggèrent la conservation des cystéines possédant une activité rédox, celle de l'histidine et du glutamate qui favorisent l'orientation correcte du site imidazole latéral de l'histidine vers le site actif et la tyrosine qui s'insère entre les deux moitiés tripeptides du GSSG (tableau 3).

| GR humaine | Fonction dans la GR humaine | Trypanothion réductase | | | | |
|------------|---|------------------------|-----------------|-----------------------|------------------|--------------------|
| | | <i>T. congolense</i> | <i>T. cruzi</i> | <i>C. fasciculata</i> | <i>T. brucei</i> | <i>L. donovani</i> |
| Cys58 | disulfure rédox-actif | Cys52 | Cys53 | Cys52 | Cys 52 | Cys52 |
| Cys63 | disulfure rédox-actif | Cys57 | Cys58 | Cys57 | Cys57 | Cys57 |
| Tyr114 | s'insère entre les deux moitiés GS du GSSG | Tyr110 | Tyr111 | Tyr110 | Tyr110 | Tyr110 |
| His467' | base du site actif | His461' | His462' | His461' | His461' | His461' |
| Glu472' | liaisons hydrogène avec l'histidine du site actif | Glu466' | Glu467' | Glu466' | Glu466' | Glu466' |

' : deuxième sous-unité

tableau 3.
Résidus du site actif impliqués dans le mécanisme catalytique de la GR et des TRs respectivement³⁷

Des études spectroscopiques ont montré la formation d'un complexe de transfert de charge lors de la réduction de l'enzyme suggérant que la réaction enzymatique passe par un intermédiaire réduit possédant deux charges négatives.⁶⁸ L'alkylation avec l'iodoacétamide de l'enzyme réduite en présence de NADPH indique le rôle catalytique essentiel des cystéines ayant une activité rédox.⁶⁷

Ces similitudes suggèrent un mécanisme catalytique en deux étapes très proche de celui observé pour la GR : réduction de l'enzyme par le NADPH *via* le FAD puis réduction de T(S)₂ accompagnée de la réoxydation du pont disulfure de l'enzyme (figure 18).

D'après les études structurales réalisées sur les TRs de *C. fasciculata*⁷⁹ et de *T. cruzi*⁸⁰ et sur la GR, l'enzyme TR possède deux sites actifs identiques où interviennent les acides aminés des deux sous-unités. De plus, le FAD et le NADPH se placent quasiment comme dans le site actif de la GR.⁸¹

3. Anciennes méthodes d'étude du site actif de la TR

Préalablement à toute information sur la séquence primaire de la TR, la connaissance du site du pont disulfure était basée sur des études de l'activité enzymatique de structures analogues à T(S)₂,⁸² synthétisées chimiquement, ou sur la mutagenèse dirigée.

3.1. Etude enzymatique d'analogues de T(S)₂

Des modifications de la partie spermidine de la molécule de trypanothion disulfure ont montré que :

- une structure macrocyclique n'est pas indispensable pour la catalyse car le *N'*-glutathionylspermidine disulfure est un substrat efficace de la TR,

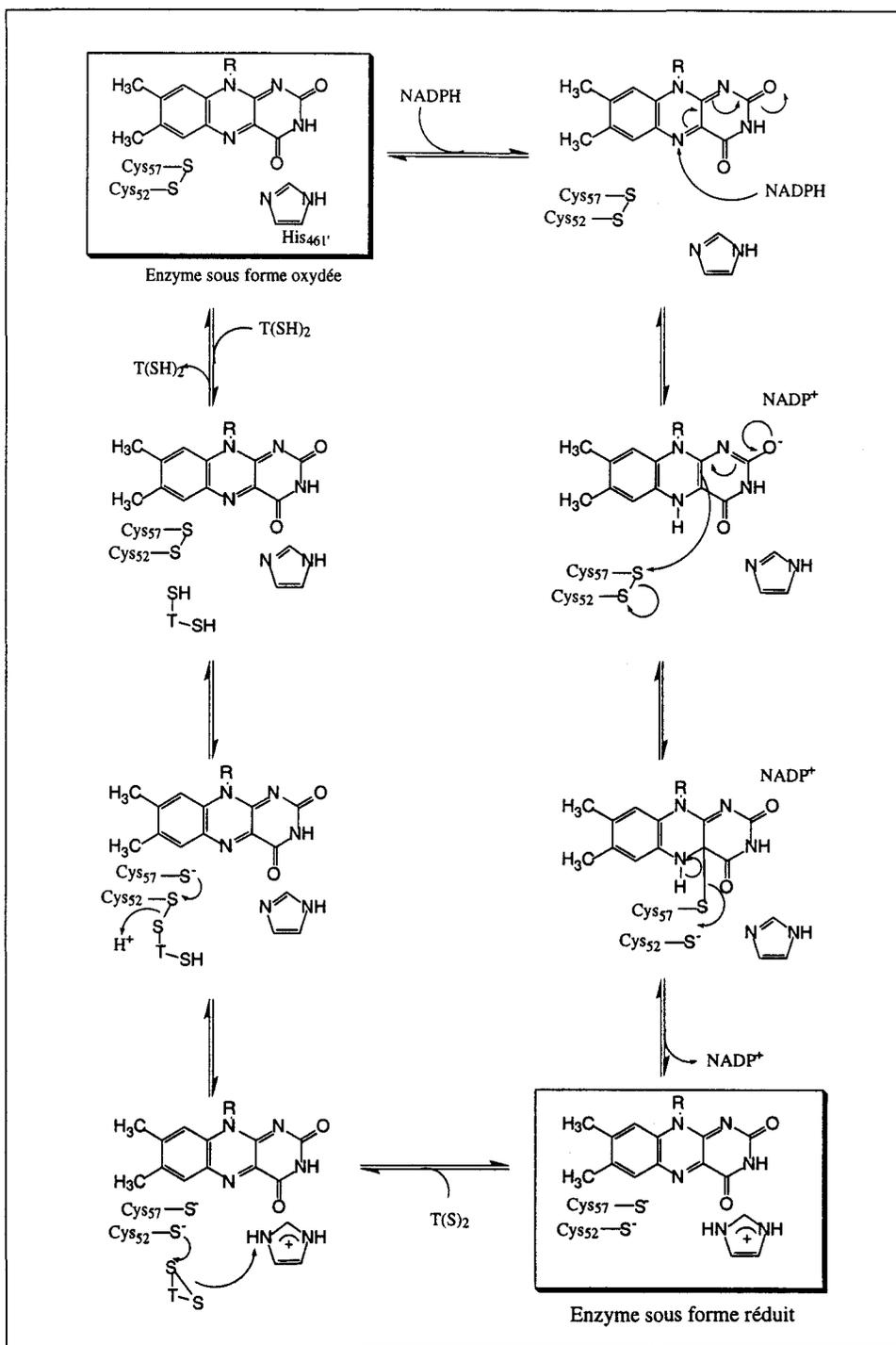
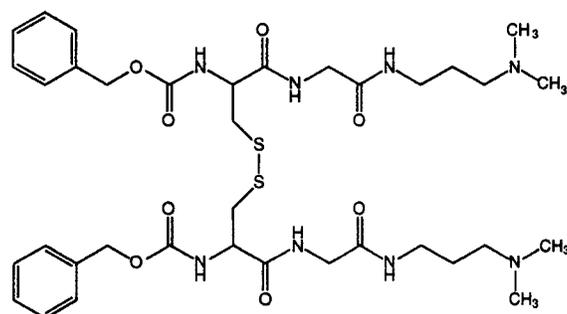


figure 18. Mécanisme réactionnel postulé pour la TR

- la suppression des charges négatives des groupements carboxylates des glycines par une réaction d'amidation empêche la reconnaissance du substrat par la TR,
- la présence d'un groupement hydrophobe, de préférence possédant une fonction amine secondaire ou tertiaire chargée positivement, est importante pour la reconnaissance.

Plus récemment, la partie γ -glutamyle a été étudiée en présence de plusieurs analogues chimiquement synthétisés du L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycyl-diméthylamino propylamide disulfure, (γ -glu-cys-gly-DMAP)₂.⁸³ Ces études ont montré que le groupement α -amino est plus important que le groupement α -carboxyle pour la reconnaissance et la catalyse, comme dans le cas de la GR.⁸⁴ De façon surprenante, deux intermédiaires de la synthèse de ces analogues, où le résidu γ -glu est remplacé soit par un groupement benzyloxycarbonyle, soit par un groupement *t*-butyloxycarbonyle, sont d'excellents substrats. Le meilleur (Z-cys-gly-DMAP)₂, appelé FSSF, est moins cher et plus facile à synthétiser que le trypanothion. Il est utilisé pour des essais enzymatiques de routine lors de la purification de l'enzyme.⁸³



Substrat FSSF

3.2. Mutagénèse dirigée

Tous les substrats physiologiques de la TR et de la GR ont en commun le motif γ -glutamylcystéinyl disulfure. La GR humaine contient 19 résidus qui interagissent avec le GSSG.⁸⁵ Dans la TR, la plupart des résidus qui interagissent avec Cys-I, Cys-II et Glu-II

sont conservés (Cys-I, Cys-II et Glu-II correspondent aux résidus de GSSG qui sont liés covalamment à l'enzyme pendant la catalyse) et les quelques modifications observées sont conservatives (tableau 4).

| Site | Glutathion réductase | | | | Trypanothion réductase | | |
|--------|------------------------|----------|----------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------|
| | GSSG | Homme | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. fasciculata</i> | <i>T. congolense</i> | <i>T. cruzi</i> |
| Glu-I | T ₃₃₉ | T | T | T ₃₃₅ | T | T | T |
| | I ₃₄₃ | V | L | I ₃₃₉ | I | I | A |
| | R₃₄₇ | R | M | A₃₄₃ | A | A | A |
| | H _{467'} | H | H | H _{461'} | H | H | H |
| | T _{476'} | T | T | S _{470'} | S | S | S |
| Glu-II | M₄₀₆ | M | M | L_{399'} | L | L | L |
| | H _{467'} | H | H | H _{461'} | H | H | H |
| | P _{468'} | P | P | P _{462'} | P | P | P |
| | T _{469'} | T | T | T _{463'} | T | T | T |
| | E _{472'} | E | E | E _{466'} | E | E | E |
| Cys-I | S ₃₀ | S | S | S ₁₄ | S | S | S |
| | V ₅₉ | V | V | V ₅₃ | V | V | V |
| | V ₆₄ | V | V | V ₅₈ | V | V | V |
| | Y ₁₁₄ | Y | Y | Y ₁₁₀ | Y | Y ₁₁₁ | Y |
| | H _{467'} | H | H | H _{461'} | H | H | H |
| Cys-II | L ₁₁₀ | I | I | I ₁₀₆ | I | I | I |
| | Y ₁₁₄ | Y | Y | Y ₁₁₀ | Y | Y ₁₁₁ | Y |
| | H _{467'} | H | H | H _{461'} | H | H | H |
| Gly-I | A₃₄ | A | R | E₁₈ | E | E₁₉ | E |
| | R₃₇ | N | R | W₂₁ | W | W₂₂ | W |
| | Y ₁₁₄ | Y | Y | Y ₁₁₀ | Y | Y ₁₁₁ | Y |
| Gly-II | I ₁₁₃ | S | I | S ₁₀₉ | S | S ₁₁₀ | S |
| | Y ₁₁₄ | Y | Y | Y ₁₁₀ | Y | Y ₁₁₁ | Y |
| | N ₁₁₇ | V | L | M ₁₁₃ | M | M ₁₁₄ | M |

' : deuxième sous-unité
en gras : substitution non conservative

tableau 4.
Résidus impliqués dans la fixation des substrats disulfures dans les GRs et les TRs

La différence la plus notable se situe au niveau du site de fixation de Glu-I, où l'arginine 347 dans la GR humaine est remplacée par une alanine dans toutes les TRs. Cette alanine a été remplacée par une arginine dans la TR de *T. congolense*.⁸⁶ Cette mutation affecte peu l'efficacité de la catalyse (K_{cat}/K_m) que ce soit avec T(S)₂ ou GSSG. Ce résidu n'est donc pas important pour la discrimination du substrat entre GR et TR. De

plus, l'orientation du motif γ -glutamylcystéinyl disulfure est similaire dans les GRs et les TRs.

Du fait des différences marquées entre la région autour du groupement carboxylate de la glycine de GSSG et celle de $T(S)_2$, il n'est pas surprenant de constater que quatre des cinq résidus qui interagissent avec cette région sont différents dans la GR et dans les TRs. Lorsqu'on mute les résidus Ala₃₄ et Arg₃₇ de la GR humaine, qui interagissent avec le carboxylate de Gly-I de GSSG, respectivement en Glu et en Trp, le mutant obtenu ne reconnaît plus le GSSG, mais peut catalyser la réduction de $T(S)_2$. Des mutations équivalentes faites chez *E. coli* provoquent seulement une légère amélioration (facteur cinq) de l'efficacité catalytique vis-à-vis de $T(S)_2$. Ceci est probablement dû au fait que l'enzyme native reconnaît déjà $T(S)_2$ comme substrat.⁸⁷

4. Etudes structurales

Les TRs de *T. cruzi*⁸⁸ et de *C. fasciculata*⁸⁹ ont été cristallisées. La séquence en acides aminés de la TR de *T. cruzi* possède 69% d'identité avec celle de *C. fasciculata* et 79% d'identité avec celle de *T. congolense*. La structure cristallographique de la TR de *C. fasciculata* a été résolue à 2.8 Å par la technique de remplacement moléculaire à partir de la structure de la GR humaine.⁷⁹ Celle de la TR de *T. cruzi* a été obtenue avec une résolution de 3.3 Å,⁸⁰ puis de 2.3 Å⁹⁰ par la même méthode, mais à partir de la structure de la TR de *C. fasciculata*.

Récemment, la structure tridimensionnelle du complexe formé par la TR de *T. cruzi* et la mépacrine a été élucidée par la méthode de cristallisation et de diffraction aux rayons X à 2.9 Å.⁹¹

4.1. Structure globale de la GR et de la TR

En comparant la GR humaine et la TR de *C. fasciculata*, on constate que ces deux enzymes présentent 40% d'homologie dans leur structure primaire. De plus, la structure

secondaire (en particulier celle du site actif) et l'organisation des différents domaines sont bien conservées.

La TR contient 30% d'hélices α et 30% de feuillets β . C'est un homodimère. Chaque monomère se compose de quatre domaines :^{79,81} le domaine I (résidus 1 à 155 pour la TR et 19-157 pour la GR) constitue le domaine de fixation du FAD et forme avec le domaine III (résidus 290 à 359 pour la TR et 294 à 364 pour la GR) l'une des parois du site de fixation du substrat disulfure, le domaine II (résidus 156 à 289 pour la TR et 158 à 293 pour la GR) constitue le domaine de fixation du NADPH, le domaine IV (résidus 360 à 492 pour la TR et 365 à 478 pour la GR) forme l'interface avec la seconde sous-unité et constitue la deuxième paroi du site disulfure (figures 19, 20 et 21).

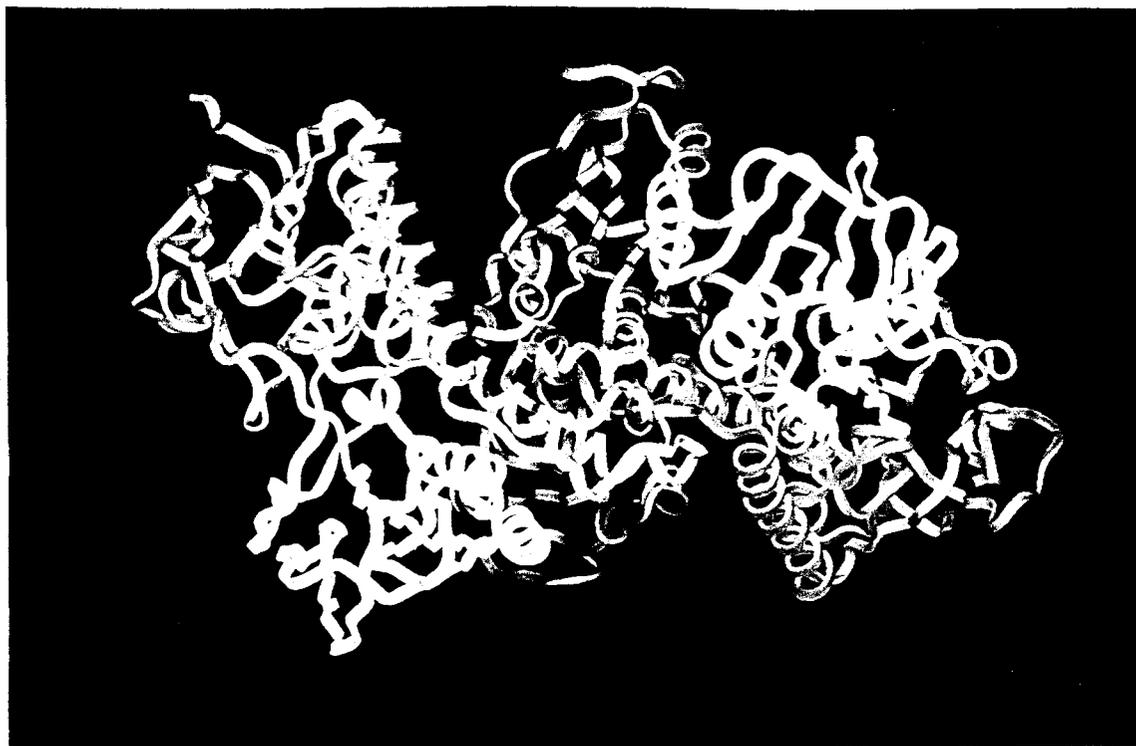


figure 19. Les différents domaines de la TR de *T. cruzi*
domaine I (en bleu), domaine II (en jaune), domaine III (en vert), domaine IV (en rose)

Chaque homodimère contient deux sites actifs qui forment une cavité. Dans le cas de la TR, cette cavité mesure approximativement 20 Å de longueur, 15 Å de largeur et 15 Å de profondeur. Trois hélices du domaine I et une hélice du domaine III délimitent un côté du site actif. L'autre côté est formé de deux segments hélicoïdaux, d'un segment

étendu du domaine IV et, à la périphérie, d'une extrémité de feuillet β . Le plancher du site actif est formé du segment hélicoïdal sur lequel sont situées les cystéines rédox-actives Cys₅₂ et Cys₅₇. Ces similitudes de structure entre la TR et la GR sont corroborées par la conservation du mécanisme catalytique faisant intervenir cette paire de cystéines rédox-actives sur un hélice du domaine I et l'histidine située sur un segment du domaine IV de la seconde sous-unité.

Des différences existent au niveau des extrémités C-terminales des hélices des domaines I et III (résidus 14 à 21, 106 à 113 et 336 à 344 de la TR). Des modifications de séquences entraînent des interactions inter-hélices et une forme du site actif différentes. Le site actif est plus ouvert dans le cas de la TR, d'où un meilleur accès pour le T(S)₂, qui nécessite plus d'espace que son homologue dans la GR (le GSSG).

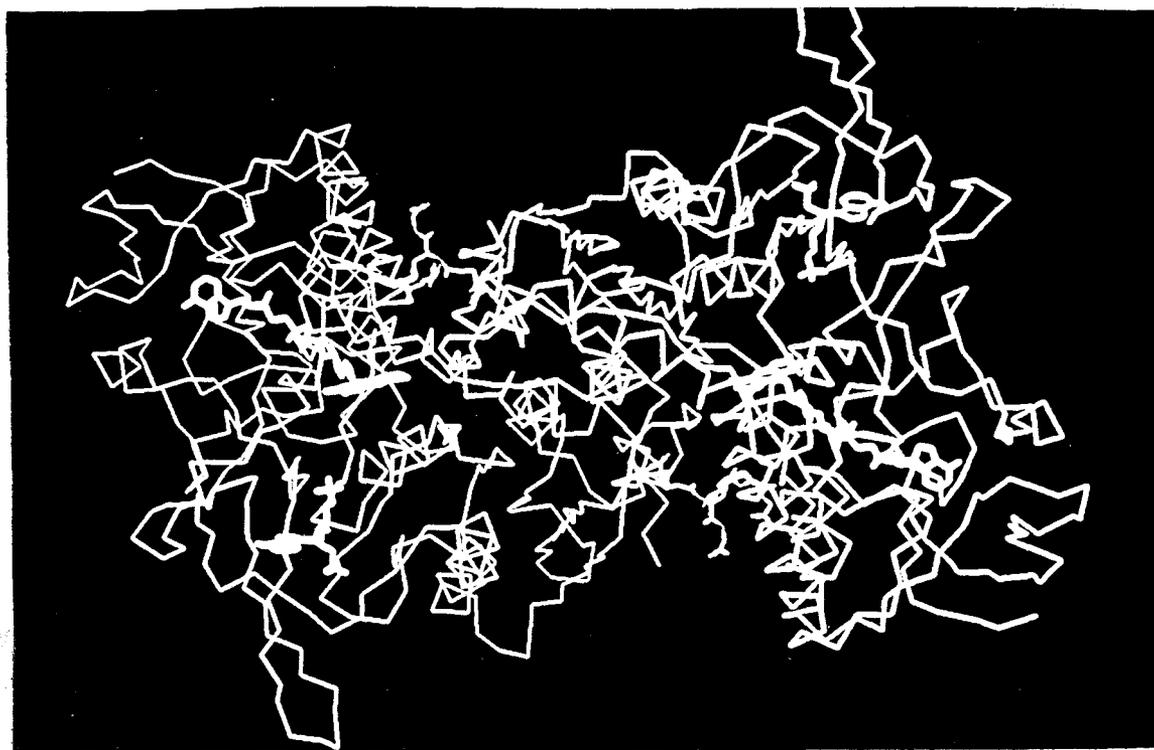


figure 20. Structure de la GR humaine

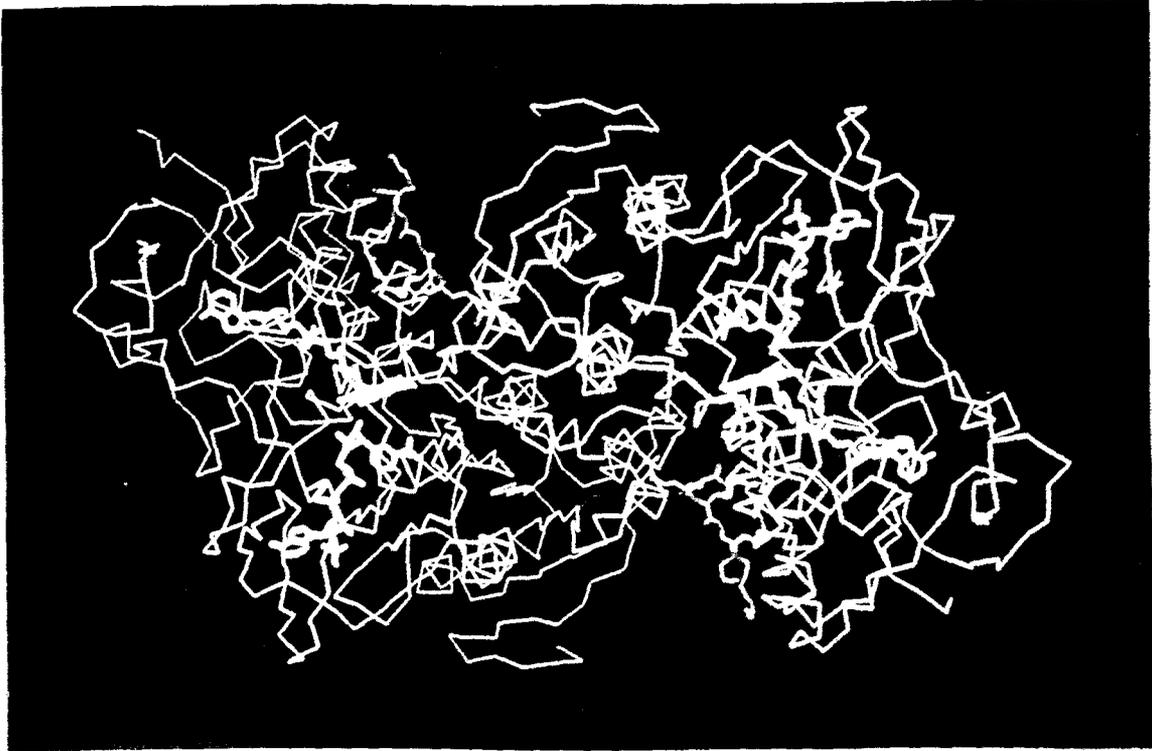


figure 21. Structure de la TR de *T. cruzi*

4.2. Le complexe GR-GSSG⁷⁷

Dans le site actif de la GR interviennent les résidus 30 à 37, 59 à 64, 110 à 117 et 339 à 347 de la première sous-unité et les résidus 403' à 406' et 467' à 476' de la seconde sous-unité. La charge globale du site actif est de +2 et celle du glutathion disulfure est de -2, d'où la neutralité du complexe GR-GSSG. Ce dernier a été élucidé avec une résolution de 2 Å : GS-I est lié au site actif sous une forme en V et GS-II sous une conformation étendue (figure 22).⁹²

Le site actif de la GR reconnaît le GSSG par des interactions entre les chaînes aminées latérales de la protéine et les groupements fonctionnels du peptide. Différentes liaisons se forment :

- une liaison hydrogène entre le carboxylate de Glu I et Arg₃₄₇,
- des liaisons de type Van der Waals entre Cys I et Cys₅₈ ainsi que His₄₆₇,

- une liaison hydrogène probable entre le carbonyle de Cys I et le groupement hydroxyle de Ser₃₀,
- une liaison hydrogène entre le carboxylate de Gly I et Arg₃₇,
- une interaction entre le groupement amide de Gly I et la fonction hydroxyle de Tyr₁₁₄,
- des liaisons hydrogène entre la fonction amine de Glu II et la chaîne principale de Thr₄₆₉, ainsi que les résidus acides Glu₄₇₂ et Glu₄₇₃,
- une liaison hydrogène entre le carboxylate de Glu II et Met₄₀₆.

Le zwitterion formé par Glu II semble la partie du GSSG qui interagit le plus avec le site actif de la GR. Cys II interagit faiblement et est retenu probablement par le pont disulfure. Enfin, Gly II interagit par l'intermédiaire d'une faible liaison hydrogène entre son amide et Tyr₁₁₄. Sa fonction carboxylate interagit avec Asn₁₁₇ *via* le solvant.

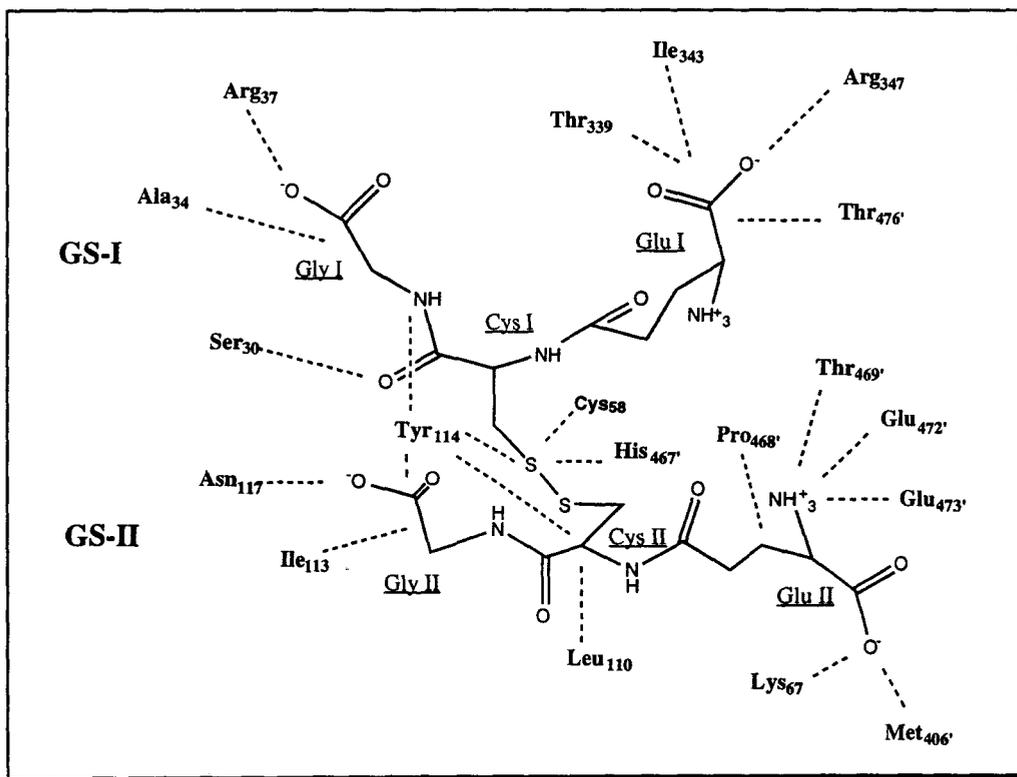


figure 22. Complexe GR-GSSG

Des modifications fonctionnelles⁸⁴ ont montré que le complexe GR-GSSG est faiblement lié, facilement perturbé par des modifications minimes du substrat. Ces modifications peuvent entraîner l'abolition totale de la catalyse.

4.3. Le complexe TR-*N*¹-glutathionylspermidine disulfure

La structure de la TR de *C. fasciculata* complexée avec le *N*¹-glutathionylspermidine disulfure a été élucidée par diffraction aux rayons X, à 2.8 Å de résolution.⁹³

Les acides aminés qui constituent le site actif de la TR comprennent les résidus 14 à 21, 52 à 58, 106 à 113 et 335 à 339 de l'une des sous-unités et les résidus 396' à 399' et 461' à 470' de la seconde sous-unité. Quatorze de ces résidus sont conservés par rapport au complexe GR-GSSG (tableau 4). Tous ces résidus conservés interagissent avec les parties γ -glutamylcystéinyle des substrats. Quatre des six résidus non conservés interagissent avec la partie glycine de GSSG.

Les acides aminés jouant un rôle dans la fixation du substrat dans le site actif de la TR sont au nombre de 23 (tableau 5). La présence des résidus acides Glu₁₈, Glu_{466'} et Glu_{467'} permet d'obtenir une charge globale négative à l'intérieur du site compatible avec les charges positives des substrats aminés reconnus par la TR.

Le substrat Gspd(S)₂ se place dans le site actif de la TR de façon similaire au GSSG dans celui de la GR :

- La partie GspdS I (par analogie avec la notation GS-I) se fixe sous une forme de V. γ -Glu I interagit essentiellement avec les résidus des domaines III et IV, alors que Cys I, Gly I et spd I interagissent avec les résidus du domaine I. La partie spd I se place dans une poche hydrophobe formée par Trp₂₁ et Met₁₁₃. Met₁₁₃ pourrait également former une liaison hydrogène avec le N^o de la partie spermidine. Trp₂₁ interagit de façon hydrophobe avec l'un des segments aliphatiques de spd I. L'amide reliant spd I et Gly I forme une liaison hydrogène avec Glu₁₈, lui-même maintenu fixe par une liaison hydrogène avec Asn₂₂.
- La partie Gspd II se fixe dans une configuration étendue. γ -Glu II interagit avec des résidus du domaine IV et Cys II, Gly II et spd II avec des résidus du domaine I. Ser₁₀₉

forme une liaison hydrogène avec le N^4 de spd II. L'amine terminale interagit avec le solvant.

| GSSG | GR humaine | TR de <i>C. fasciculata</i> | Variations structurales |
|--------|---------------------------|--------------------------------|---|
| Glu I | Thr ₃₃₉ | Thr ₃₃₅ | |
| | Ile ₃₄₃ | Ile ₃₃₉ | |
| | Arg₃₄₇ | Ala₃₄₃ | enlève une charge positive, élargit le site |
| | His _{467'} | His _{461'} | participe à la catalyse |
| | Thr_{476'} | Ser_{470'} | substitution conservative |
| Cys I | Ser ₃₀ | Ser ₁₄ | |
| | Cys ₅₈ | Cys ₅₂ | forme une liaison covalente pendant la catalyse |
| | Val ₅₉ | Val ₅₃ | |
| | Val ₆₄ | Val ₅₈ | |
| | Tyr ₁₁₄ | Tyr ₁₁₀ | située entre GS I et GS II dans la GR |
| | His _{467'} | His _{461'} | participe à la catalyse |
| Gly I | Ala₃₄ | Glu₁₈ | ajoute une charge positive |
| | Arg₃₇ | Trp₂₁ | résidu hydrophobe au lieu d'un résidu chargé positivement |
| | Tyr ₁₁₄ | Tyr ₁₁₀ | |
| | Arg₃₈ | Asn₂₂ | |
| Glu II | Lys ₆₇ | Lys ₆₁ | |
| | Met_{406'} | Leu_{399'} | substitution conservative |
| | His _{467'} | His _{461'} | participe à la catalyse |
| | Pro _{468'} | Pro _{462'} | <i>cis</i> -proline adjacente à l'histidine du site actif |
| | Thr _{469'} | Thr _{463'} | liaison hydrogène avec le substrat |
| | Glu _{472'} | Glu _{466'} | liaison hydrogène, permet de bloquer l'histidine du site |
| | Glu _{473'} | Glu _{467'} | |
| Cys II | Leu₁₁₀ | Ile₁₀₆ | substitution conservative |
| | Tyr ₁₁₄ | Tyr ₁₁₀ | |
| | His _{467'} | His _{461'} | participe à la catalyse |
| Gly II | Ile₁₁₃ | Ser₁₀₉ | permet une liaison hydrogène avec T(S) ₂ |
| | Tyr ₁₁₄ | Tyr ₁₁₀ | |
| | Asn₁₁₇ | Met₁₁₃ | résidu hydrophobe au lieu d'un résidu polaire |

première colonne : partie de GSSG qui interagit avec les résidus de la GR
Les résidus en gras sont ceux qui diffèrent dans la GR et dans la TR.

tableau 5. Résidus dans le site actif de la TR

Sur les 23 résidus interagissant directement avec le substrat, seul Gly₁₁₂ n'est pas conservé dans toutes les TRs. Chez *C. fasciculata*, le C_α de Gly₁₁₂ interagit avec spd II. Chez *T. cruzi*, on trouve un aspartate et, chez *T. congolense*, un glutamate. Il est possible

que la présence d'un aspartate ou d'un glutamate facilite une interaction directe avec spd II.

4.4. Comparaison des deux complexes

Le site actif de la TR est plus ouvert que celui de la GR et possède une charge différente. En effet, dans la TR, les charges des résidus qui interagissent avec le substrat sont globalement négatives alors que les résidus correspondants dans la GR présentent une charge globale positive. Entre la TR de *T. cruzi* et la GR humaine, parmi les acides aminés engagés dans l'interaction avec le substrat, six diffèrent : Glu₁₈-Ala₃₄, Trp₂₁-Arg₃₇, Asn₂₂-Arg₃₈, Ser₁₀₉-Ile₁₁₃, Met₁₁₃-Asn₁₁₇ et Ala₃₄₃-Arg₃₄₇ respectivement dans la TR et la GR. Ces variations sont à l'origine de la spécificité des deux enzymes vis-à-vis de leurs substrats respectifs :

- La GR humaine possède des résidus Arg₃₇ et Arg₃₈ positivement chargés qui repoussent les substrats aminés de la TR.
- La présence de Asn₁₁₇ proche des arginines du site de la GR constitue une poche hydrophile au coeur de ce site.
- L'asparagine, à l'opposé de la méthionine, ne possède pas les propriétés hydrophobes et hydrophiles adéquates pour interagir avec spd II.
- Le remplacement de Arg₃₄₇ par Ala₃₄₃ entraîne la disparition d'une charge positive du site et donc une meilleure interaction avec les substrats chargés positivement.

A la surface extérieure des sites actifs de la TR et de la GR, la répartition des résidus chargés diffère de façon importante :

- La TR possède un anneau de résidus acides liant les spermidines protonées. Ces résidus pourraient attirer le substrat et l'orienter préalablement à son entrée dans le site.
- La GR présente au même endroit des résidus d'arginine et de lysine qui jouent probablement le même rôle vis-à-vis par exemple des groupements carboxylates de GSSG (figures 23 et 24).

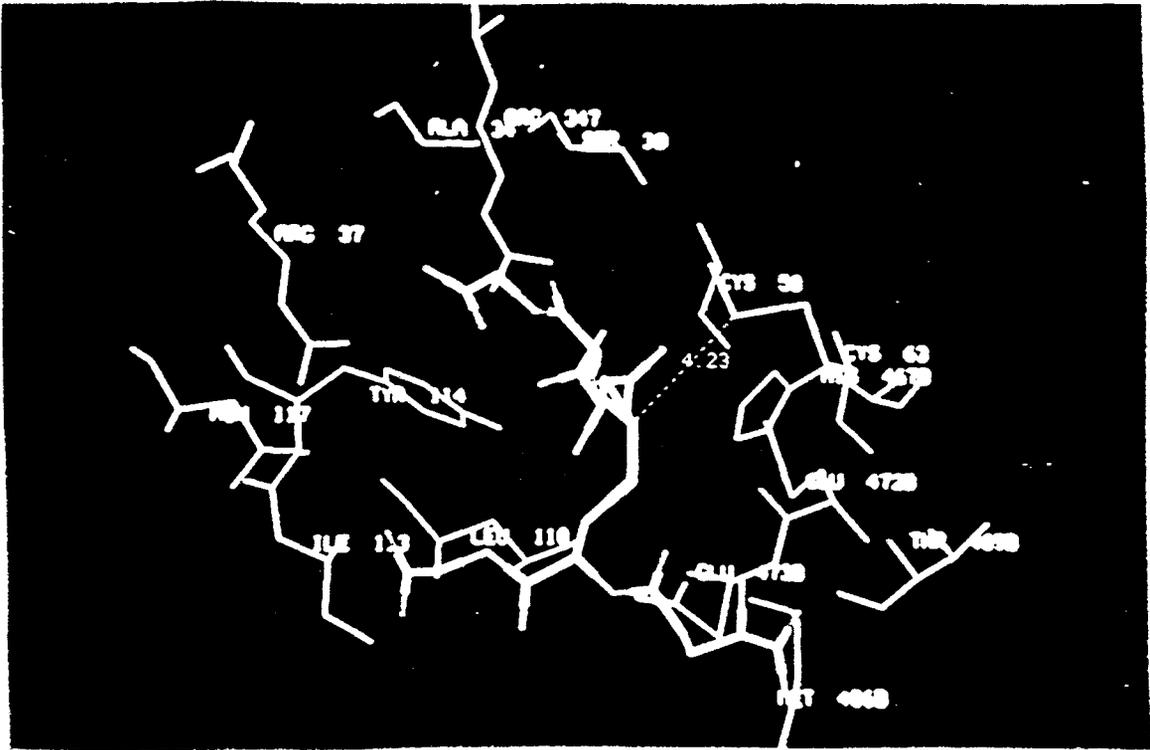


figure 23. Site actif de la GR humaine

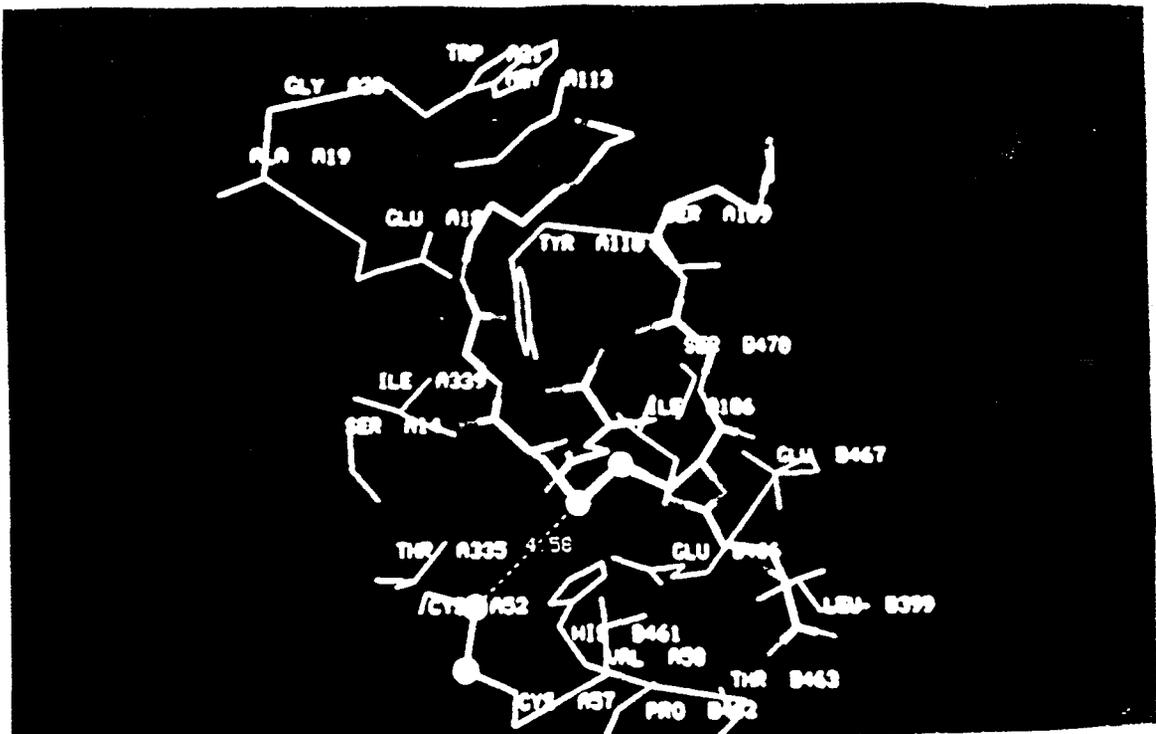
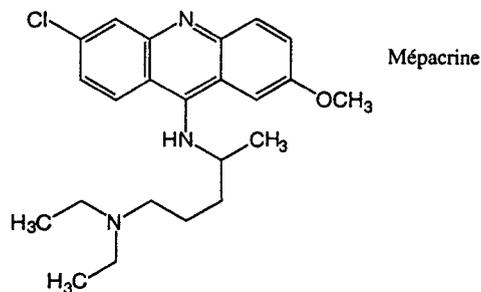


figure 24. Site actif de la TR de *T. cruzi*

4.5. Le complexe TR-mépacrine

Récemment, la structure tridimensionnelle du complexe formé par la TR de *T. cruzi* et la mépacrine a été élucidée par la méthode de cristallisation et de diffraction aux rayons X à 2.9 Å. La mépacrine est un inhibiteur compétitif de la TR mais est sans effet sur la GR humaine. La mépacrine ou quinacrine est une drogue anti-parasitaire, anti-protozoaire, commercialisée sous le nom Primaquine® ou Atebrin®.



La mépacrine est insérée dans le site actif de la TR en immergeant un cristal de l'enzyme dans une solution saturée en inhibiteur. La présence de l'inhibiteur dans le cristal est confirmée par la réalisation du spectre d'absorption du complexe (en solution dans un tampon). L'absorption maximale, dans le visible, se trouve à 461 nm pour la flavoenzyme⁶⁸ et à 450 nm dans le cas du complexe enzyme /acridine (figure 25).

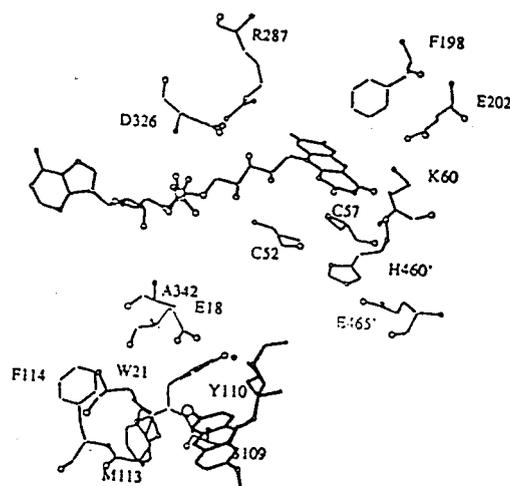


figure 25. Complexe TR-mépacrine

La mépacrine est liée au site catalytique de l'enzyme par l'intermédiaire, d'une part, du cycle acridine, qui interagit de façon hydrophobe avec le tryptophane 21 et la méthionine 113, et, d'autre part, de la chaîne polyaminée qui se trouve à proximité du glutamate 18.

Tous les substituants du cycle acridine se trouvent à proximité de chaînes latérales de la protéine (figure 26).

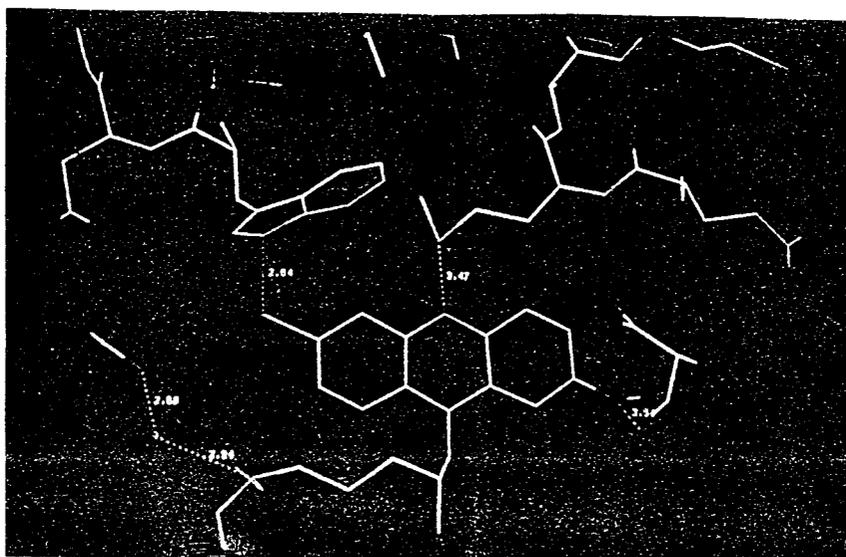


figure 26. Interactions entre la mépacrine et les résidus du site actif de la TR

Le groupement méthoxy est à la distance adéquate pour former une liaison hydrogène avec la chaîne latérale oxygénée de la sérine 109. L'atome de chlore est à proximité de l'atome d'azote intracyclique du tryptophane 21. L'atome d'halogène est stabilisé par interaction avec l'hydrogène polarisé positivement porté par l'azote indolye. L'azote intracyclique est distant de 3.5 Å du soufre de la méthionine 113. Cette longueur est classiquement observée dans le cas d'autres protéines.⁹⁴ Comme la mépacrine est une base faible, une liaison hydrogène entre l'atome d'azote protoné et l'atome de soufre peut se former. Bien que les liaisons hydrogène fassent rarement intervenir des atomes de soufre, ce type d'interaction peut jouer un rôle important dans la fixation de l'inhibiteur dans le site de la TR.

La chaîne polyaminée est dirigée vers l'intérieur du site actif. L'amine en bout de chaîne est protonée et peut établir, par l'intermédiaire du solvant (eau), une liaison hydrogène avec le carboxylate du glutamate 18. Ce substituant du noyau acridine est également très important pour la fixation. Il a des similitudes avec les polyamines naturelles.

Ces résultats confirment la double capacité de la méthionine d'être le résidu hydrophobe le plus flexible et de pouvoir former une liaison hydrogène, d'où une double fixation des ligands. Ainsi, Met₁₁₃ est à proximité des groupements méthylènes de la partie spermidine et peut simultanément former une liaison hydrogène avec le groupement N⁸-amino de la glutathionylspermidine.

5. Recherche d'inhibiteurs de la TR

La recherche d'inhibiteurs de la TR a pu être rationalisée depuis la résolution de la structure tridimensionnelle de l'enzyme. En effet, la modélisation moléculaire permet d'estimer au préalable l'affinité entre une molécule et le site actif de la TR.

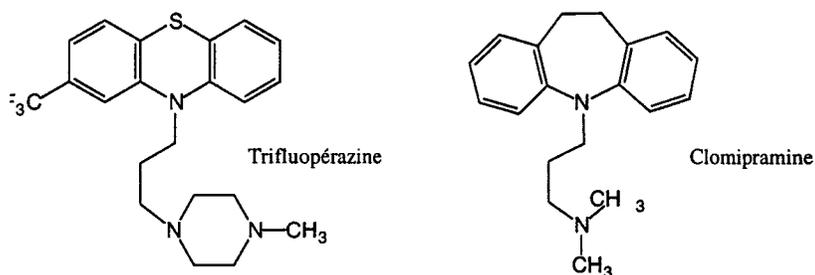
Différentes familles d'inhibiteurs actifs *in vitro* sont déjà connus. Ils agissent selon divers mécanismes.⁹⁵

5.1. Inhibiteurs compétitifs vis-à-vis du trypanothion disulfure

5.1.1. Dérivés cycliques

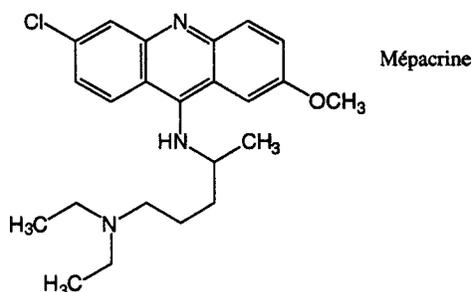
Une des différences principales entre les sites actifs de la GR et de la TR est la région polaire de la GR remplacée par une zone hydrophobe dans la TR. Grâce au programme assisté par ordinateur de Goodford,⁹⁶ des éléments de structure géométriquement et énergétiquement favorables à la fixation dans le site actif de la TR ont

été déterminés.⁹⁷ Cette modélisation a permis de mettre en évidence des composés tricycliques tels que les phénothiazines. Ces composés sont connus en tant que neuroleptiques. Des molécules comme la clomipramine et la trifluopérazine se sont révélés être de bons inhibiteurs compétitifs de la TR ($K_i = 7$ et $22 \mu\text{M}$ respectivement). Elles n'inhibent pas la GR. De tels inhibiteurs spécifiques de la TR peuvent constituer des têtes de série dans la recherche de nouveaux inhibiteurs.

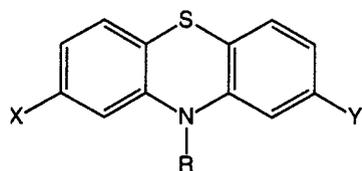


Les premières expériences réalisées avec les phénothiazines ont montré leurs activités trypanocides sur la forme sanguicole trypomastigote. De plus, les propriétés pharmacologiques et toxicologiques de ces molécules avaient déjà été étudiées. Mais, les doses nécessaires sont quatre fois plus élevées que les concentrations tolérées par l'homme.⁹⁸ Ces molécules ne peuvent donc être utilisées dans la chimiothérapie contre la maladie de Chagas mais peuvent constituer un point de départ dans la synthèse de trypanocides.

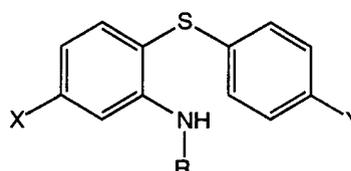
Un autre composé tricyclique trypanocide⁹⁹ est la mépacrine. Ce composé est un inhibiteur compétitif de la TR ($K_i = 25 \mu\text{M}$) qui n'inhibe pas la GR. Cette molécule est commercialisée comme anti-parasitaire et anti-protazoaire.



Au laboratoire, un test enzymatique de criblage a permis d'isoler deux familles de molécules : les phénothiazines et les 2-aminodiphénylsulfures.



phénothiazine



2-aminodiphénylsulfure

Au début de l'étude de la famille des 2-aminodiphénylsulfures, en 1975,¹⁰⁰ nous souhaitions savoir si ces "phénothiazines ouvertes" conservaient les propriétés inhibitrices, sur la TR, des phénothiazines, en l'absence de tout effet neuroleptique. Ces composés se sont révélés être des inhibiteurs compétitifs de la TR et inactifs sur la GR. Les études antérieures portant sur cette famille de composés sont présentées de façon plus détaillée dans le premier chapitre. La famille des 2-aminodiphénylsulfures fait l'objet de mon travail de thèse.

5.1.2. Inhibiteurs syn-catalytiques

Le principe de cette inhibition ressemble à celui des inhibiteurs de type substrats-suicides. Un inhibiteur substrat-suicide est un analogue de substrat qui est converti par l'enzyme en une entité réactive, très stable, pouvant former un complexe stable avec l'enzyme ou bloquer le site actif par formation d'une liaison covalente. La structure des inhibiteurs syn-catalytiques présente une fonction réactive pouvant piéger un état intermédiaire de l'enzyme formé au cours de la catalyse.

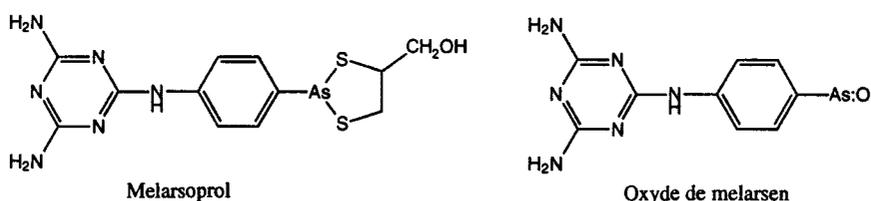
Par exemple, les composés arséniés forment une famille d'inhibiteurs syn-catalytiques.

Les groupements thiols des protéines sont des cibles pour les métaux lourds toxiques tels que le mercure, le cadmium, l'argent, le plomb, l'or et l'arsenic.

L'oxyde de melarsen (*p*-(4,6-diamino-*s*-triazin-2-yl)aminophénylarsenoxide) inhibe assez efficacement la TR avec un K_i de 17.2 μM .¹⁰¹ Il peut se complexer avec l'enzyme réduite EH_2 .

L'inhibition nécessite la réduction préalable de l'enzyme par le NADPH et peut être réversible sous l'action d'un excès de dithiols. Un modèle d'inhibition a été proposé : l'arsenic libre et EH_2 établissent immédiatement un équilibre avec un complexe monothioarsane stable, inactif sur l'enzyme ; deuxièmement, un réarrangement a lieu au niveau de la liaison arsenic-soufre, qui conduit à la liaison de l'arsenic sur une cystéine rédox-active, à proximité du FAD, engendrant un complexe encore plus stable. L'incubation de EH_2 en présence d'un excès de $\text{T}(\text{SH})_2$ et d'oxyde de mélarsen permet d'éviter l'inhibition de l'enzyme. Ce résultat suggère que le $\text{T}(\text{SH})_2$ agit comme un protecteur *in vivo* en prévenant la modification directe de la TR par piégeage d'arsenic.

La drogue arsénée Melarsoprol® est utilisée couramment dans le traitement de la trypanosomiase africaine, parasitose causée par *T. brucei rhodesiense* et *T. brucei gambiense*. Mais, son mode d'action est mal connu.



Le trypanothion peut également former un complexe stable avec des composés trivalents de l'arsenic. Avec l'oxyde de melarsen, il réagit immédiatement pour former une paire d'adduits diastéréoisomériques,¹⁰² beaucoup plus stables que ceux issus de la réaction avec GSH. En effet, les adduits formés entre les composés arséniés trivalents et les thiols sont plus stables avec les dithiols qu'avec les monothiols.

Comme autre exemple, on peut citer l'agent cytostatique, la BCNU (1,3-bis(2-chloroéthyl)-1-nitrosourée), qui inhibe la GR et la TR. Cet inhibiteur joue son rôle non pas sur la forme de l'enzyme présente naturellement *in vitro* (E_{ox}), mais sur la forme

NADPH-réduite (EH_2). En fait, le thiolate de Cys_{58} réagit avec l'isocyanate de chloroéthyle, un produit de décomposition de la BCNU, pour donner l'ester chloroéthylcarbamoyle (figure 27). Des études aux rayons X de la GR ont montré que le groupement carbamoyle est fixé, dans le site actif, par des liaisons hydrogène et des forces de Van der Waals.¹⁰³ Ces interactions non-covalentes supplémentaires, entre l'enzyme et l'inhibiteur, assurent la stabilité de l'ester carbamoyle formé. Dans le cas de thiols de faible poids moléculaire, la carbamoylation est aisément réversible.¹⁰⁴

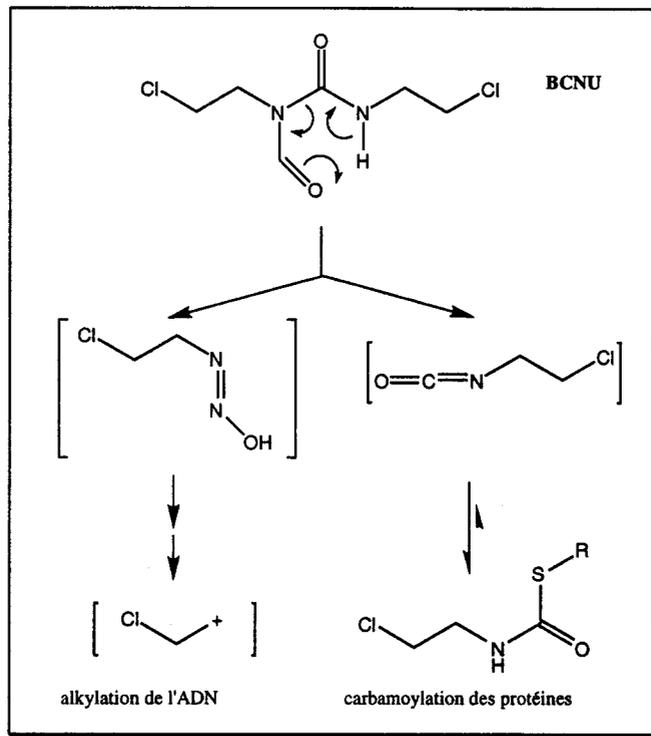


figure 27. Inhibition par la BCNU

La BCNU et la HeCNU (1-(2-chloroéthyl)-3-(2-hydroxyéthyl)-1-nitrosourée), mieux toléré par l'organisme, ont des activités antimalariales sur des cellules et sur des animaux. La HeCNU n'engendre pas une carbamoylation mais une alkylation de la Cys_{58} de la GR.⁹⁵

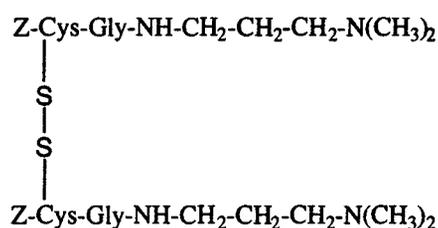
Ces observations suggèrent la synthèse d'agents de carbamoylation qui, à l'inverse de la BCNU, pourraient différencier les sites actifs de la GR, de la TR et de la

lipoamide déshydrogénase, une enzyme proche de la GR et de la TR d'un point de vue mécanistique.

5.1.3. Inhibiteurs de type peptidique

Les peptides ligands ont été déterminés de façon rationnelle à partir de l'étude du site actif de la TR.¹⁰⁵ Les études de modélisation pour obtenir des ligands spécifiques étaient basées sur les différences existant entre les sites actifs de la TR et de la GR. Ainsi, le benzoyl-Leu-Arg-Arg-β-naphtylamide est un inhibiteur compétitif de la TR de *T. cruzi* ($K_i = 13.8 \mu\text{M}$) par rapport au T(S)₂ et n'inhibe pas la GR.

Au laboratoire, un substrat alternatif de la trypanothion réductase, le *N,N'*-bis(benzoyloxycarbonyl)-L-cystéinyglycine 3-diméthylaminopropylamide disulfure, a été modifié, au niveau du pont disulfure, pour obtenir des dérivés analogues non réductibles.¹⁰⁶ La cystéine a été remplacée par trois diamino-diacides naturels : acide djenkolique, lanthionine et cystathionine. Les composés synthétisés se sont révélés être des inhibiteurs compétitifs de la TR, vis-à-vis du trypanothion (tableau 6).



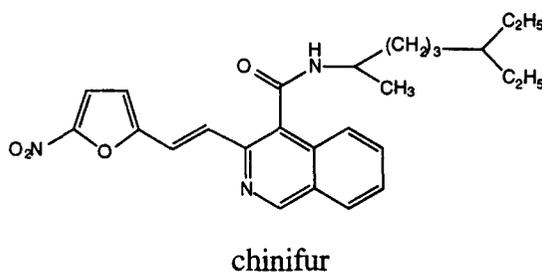
N,N'-bis(benzoyloxycarbonyl)-L-cystéinyglycine 3-diméthylaminopropylamide
disulfure

| Composé | K_i (μM) |
|---------------------------------|-------------------------|
| dérivé avec l'acide djenkolique | 31 ± 4 |
| dérivé avec la lanthionine | 92 ± 9 |
| dérivé avec la cystathionine | 43 ± 6 |

tableau 6. Valeurs de K_i sur la TR recombinante de *T. cruzi*

5.2. Inhibiteurs non compétitifs vis-à-vis du trypanothion disulfure

Le chinifur (2-{5'-nitro(furo-2'-yl)-éthène-1-yl}-4(*N,N*-diéthylamino)-1-méthyl-but-1-yl-aminocarbonyl-4-quinoline) est un bon inhibiteur de la TR de *T. congolense* ($K_i = 4.5 \mu\text{M}$), non compétitif vis-à-vis du trypanothion.¹⁰⁷ Une explication possible de la nature non compétitive de l'inhibition par le chinifur est que l'inhibiteur se lie simultanément au site actif de la TR et à un site analogue à l'interface des deux sous-unités de la glutathion réductase (Phe-78,78', His-75,75').



Le chinifur est un inhibiteur de la TR incompétitif vis-à-vis du NADPH.

Un inhibiteur incompétitif ne peut se lier que sur le complexe enzyme-substrat et non sur l'enzyme libre. Dans le cas de l'inhibition compétitive, l'accroissement de la concentration en substrat peut permettre de surmonter l'effet de l'inhibiteur. Dans le cas de l'inhibition incompétitive, l'accumulation du substrat consécutive à l'inhibition tend à renforcer cette dernière et, plus la concentration en substrat augmente, plus la réaction atteint les conditions limites dans lesquelles l'inhibition incompétitive est optimale.¹⁰⁸

La molécule trypanocide crystal violet est un bon inhibiteur de la trypanothion réductase de *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*. L'inhibition est compétitive vis-à-vis du trypanothion avec un K_i de $5.3 \mu\text{M}$ et incompétitive vis-à-vis du NADPH.¹⁰⁹

5.3. Inhibiteurs subversifs

Le principe des substrats subversifs est d'inhiber la réaction physiologique de l'enzyme et de favoriser une réaction secondaire non désirée. Par exemple, le composé GH 8693 (figure 28) peut détourner le métabolisme rédox de défense des trypanosomes.

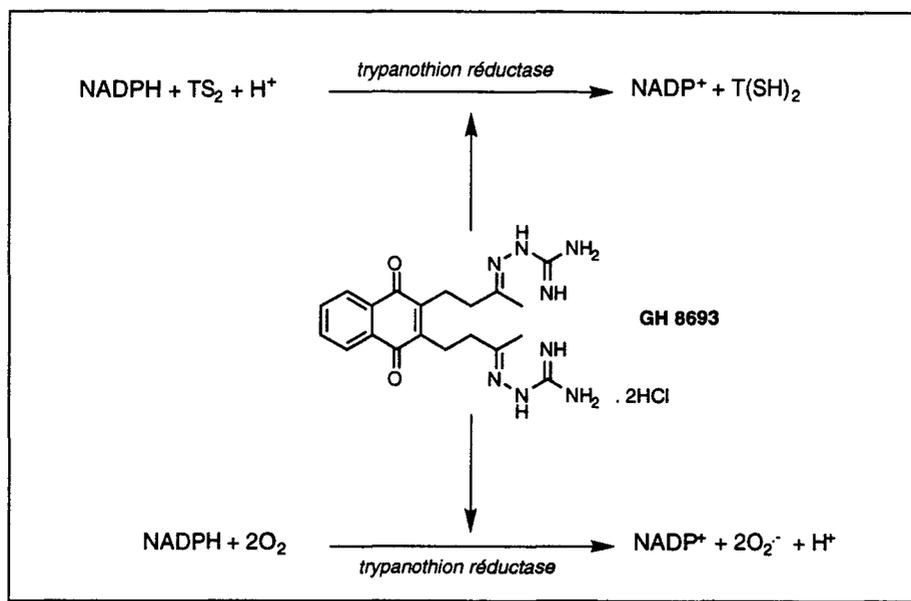


figure 28. GH 8693 : un inhibiteur subversif

A des concentrations micromolaires, GH 8693 agit comme un inhibiteur de la TR avec un K_i de $1 \mu\text{M}$.¹¹⁰ En présence de fortes concentrations en GH 8693, la trypanothione réductase catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en radical superoxyde ($K_m = 15 \mu\text{M}$). Ainsi, la fixation du GH 8693 sur la forme réduite de la TR transforme la fonction antioxydante de l'enzyme en une fonction prooxydante, d'où le nom de substrat subversif donné à ce type d'inhibiteurs. Ce composé fixé sur l'enzyme transfère des électrons de EH_2 à l'oxygène moléculaire. Simultanément, la réduction de T(S)_2 est inhibée.

Le chinifur peut également jouer le rôle d'un substrat subversif par l'intermédiaire de son groupement nitré, qui peut être réduit par la TR pour conduire à l'anion radical

correspondant. Ce radical peut ensuite réduire le cytochrome c, directement ou par l'intermédiaire de la paire rédox $O_2/O_2^{\cdot-}$.

Les inhibiteurs subversifs engendrent divers effets qui peuvent être exploités dans la chimiothérapie contre les maladies parasitaires.¹¹¹ Le NADPH et l'oxygène moléculaire sont détournés de leur action classique, le rapport thiol/disulfure est très faible et les IOR résultants peuvent provoquer, par exemple, la peroxydation des lipides.

5.4. Autres approches

5.4.1. Ligands chimères

La plupart des protéines lient des types de ligands très différents dans des sites éloignés les uns des autres. Deux ligands peuvent être chimiquement reliés par un bras espaceur dont la longueur et la nature chimique doivent être adaptées à l'enzyme. Cette modélisation moléculaire conduit à des ligands chimères ayant une forte affinité pour le récepteur. Dans le cas de la GR et la TR, de nombreuses combinaisons sont possibles, étant donnés les nombreux ligands, substrats, cofacteurs et inhibiteurs connus. Une possibilité envisagée consisterait en un ligand chimère constitué d'un inhibiteur tricyclique et d'un substrat subversif liés covalamment par un bras d'une longueur calculée.⁹⁵

Cette possibilité sera prise en compte au cours de notre étude de dérivés des 2-aminodiphénylsulfures.

5.4.2. Blocage de la dimérisation de la protéine par des peptides mimes

La plupart des protéines pathogènes telles que la TR de *T. cruzi*, les enzymes du virus du SIDA, la ribonucléotide réductase du virus de l'Herpes simplex, sont des

dimères, où chaque sous-unité est inactive par elle-même. Ainsi, les composés qui perturbent les interactions protéine-protéine sont des inhibiteurs fortement spécifiques.

La ribonucléotide réductase du virus de l'Herpes simplex est constituée de deux sous-unités : une de petite taille et une de grande taille. Un nonapeptide dont la séquence correspond à la région C-terminale de la petite sous-unité éloigne celle-ci de la grande sous-unité et finit par les séparer.¹¹² La ribonucléotide est ainsi désactivée. En principe, de tels inhibiteurs peptidiques doivent agir de façon catalytique (en quantités sous-stoechiométriques), les sous-unités séparées étant souvent instables et dégradées par les protéases de la cellule. L'inhibiteur plus stable au contact de la surface de la cellule est libéré et peut s'attaquer à un autre dimère.

L'inhibition de la dimérisation et ses conséquences dans le cas de la GR humaine ont été étudiées en détail.¹¹³ Chaque sous-unité contribue à la formation des deux sites catalytiques : le monomère est inactif. De plus, des peptides qui correspondent aux surfaces de contact des sous-unités de la protéine inhibent la formation de l'enzyme active. Le site de contact entre les deux sous-unités a été choisi pour des études de mutagenèse : il est formé des hélices parallèles 439-454 et 439'-454'. En remplaçant le Gly₄₄₆ ainsi que le Gly₄₄₆' par un Glu, les petites chaînes latérales (en particulier, l'atome d'hydrogène du résidu de la glycine) sont remplacées par des groupements encombrés négativement chargés. Ces mutations n'ont pas seulement empêché la formation du dimère. Chaque monomère se comporte comme une chaîne peptidique non ordonnée : aucun élément de structure n'a été retrouvé dans les quatre domaines constituant la GR. La stabilité biologique de cette protéine a été étudiée dans des cellules de bactéries. Alors que la GR humaine normale reste stable et active pendant des heures, la protéine mutante est dégradée quantitativement au bout de quelques minutes.

De même, le domaine d'interface entre les deux sous-unités de la TR de *C. fasciculata* a été étudié en détail.⁸¹ Les acides aminés et les interactions impliqués dans le contact semblent suffisamment différents par rapport à ceux de la GR pour que la TR puisse être inhibée sélectivement.

Le développement de mimes peptidiques représente un champ de recherches intéressant dans la mise au point de composés qui peuvent interagir à la fois sur la structure de l'enzyme et sur les interactions protéine-protéine. De tels mimes conduisent normalement à la déstabilisation et donc à la dégradation de la protéine-cible, mais, à de faibles concentrations, ils peuvent affecter les processus physiologiques.

Premier Chapitre

Recherche d'inhibiteurs de la trypanothion réductase

Introduction

La détermination de la molécule - tête de série ainsi que les modifications structurales ultérieures sont basées sur les données suivantes :

- le criblage enzymatique systématique de milliers de molécules grâce à un test, mis au point par l'équipe d'enzymologistes du laboratoire,¹¹⁴ permettant de déceler une activité inhibitrice sur la TR de *T. cruzi*,
- les relations structure-activité déterminées grâce aux produits synthétisés antérieurement, au laboratoire, par les Dr S. Baillet¹¹⁵ et C. Baert-Viau,¹⁰⁰
- les calculs de dynamique moléculaire et les études de modélisation moléculaire réalisés par les Dr E. Buisine et D. Horvath.¹¹⁵

I. Détermination de la Molécule - Tête de Série

1. Criblage enzymatique systématique

Un test enzymatique de criblage a été mis au point au laboratoire.¹¹⁴ Il est basé sur une réaction colorée adaptable à des mesures à gros débit. Cette méthode a été adaptée sur microplaques et est compatible avec l'utilisation d'un certain pourcentage d'un solvant organique, comme le DMSO, pour dissoudre le composé étudié.

1.1. Principe du test enzymatique

Le test de criblage enzymatique est basé sur la réduction, en présence de NADPH, du $T(S)_2$ en $T(SH)_2$ (figure 29). Cette réduction enzymatique est catalysée par la trypanothion réductase.

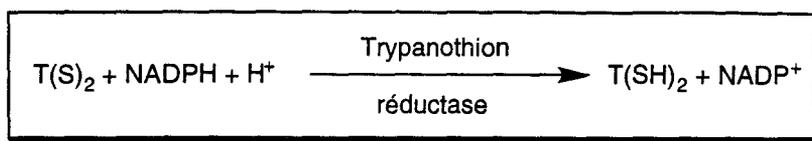


figure 29. Réduction enzymatique du $T(S)_2$ en $T(SH)_2$

L'addition d'un inhibiteur de la TR, dans le milieu réactionnel, diminue la vitesse de réaction de la réduction enzymatique. Ainsi, dans le milieu, la quantité en $T(S)_2$, présente, augmente et la quantité en $T(SH)_2$, présente, diminue. Un dosage du $T(S)_2$ ou du $T(SH)_2$ doit nous permettre de déterminer le pouvoir de l'inhibiteur.

Le principe du test est basé sur le fait que, sous des conditions fortement basiques ($pH > 13.5$), les disulfures et les thiols conduisent quantitativement à leur forme thiolate, qui peut substituer l'atome de chlore du CTMQ (sel de 4-chloro-1-méthyl-7-trifluorométhylquinolinium), le CTMQ étant un réactif des thiols utilisé pour titrer le glutathion réduit dans des échantillons biologiques.

Mais, cet agent chromophorique ne permet pas de doser sélectivement le $T(S)_2$ en présence de $T(SH)_2$ et réciproquement. Comme notre test devait permettre de discerner le trypanothion disulfure du trypanothion réduit et que la 2-vinylpyridine permet de piéger sélectivement le $T(SH)_2$ sous une forme qui ne réagit pas avec le CTMQ, nous avons choisi de doser le $T(S)_2$ restant dans le milieu.

Etant donné que, à $pH > 13.5$, des concentrations équimolaires en GSH et en $T(S)_2$ donnent une absorbance équivalente à 400 nm,¹¹⁶ seul un thiol du trypanothion disulfure est ionisé (figure 30).

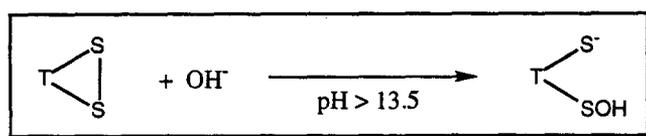


figure 30. Réaction du $T(S)_2$ en milieu fortement basique

Le thiolate formé peut alors effectuer une substitution nucléophile sur le carbone 4 du réactif CTMQ. Le thioéther, qui en résulte, subit ensuite une β -élimination, spécifique de la structure de type glutathion, et donne finalement une thione chromophorique (figure 31). Cette thione a un maximum d'absorbance à 400 nm et est identique à celle obtenue à partir du GSH.

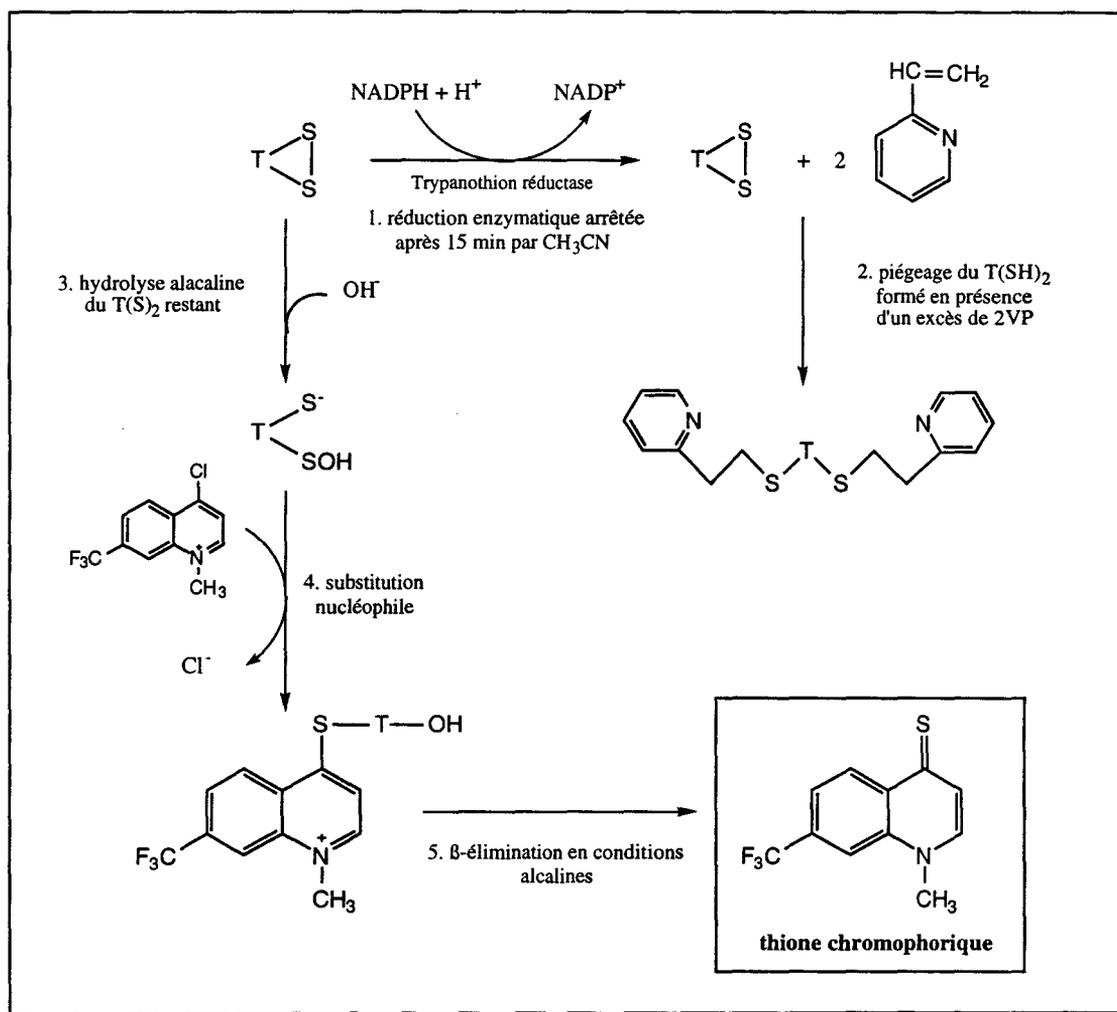


figure 31. Test de criblage enzymatique

Les différentes étapes du test sont les suivantes :

- à un instant t_0 , la réaction enzymatique de réduction est stoppée par dénaturation de l'enzyme avec un solvant organique (seul l'acétonitrile s'est révélé capable de dénaturer

quasi-instantanément la TR en l'absence de toute interaction avec les autres réactifs utilisés dans le test) ;

- puis, le $T(SH)_2$ formé est piégé sous une forme qui ne réagit pas avec le CMTQ : l'alkylation des thiols formés est réalisée par un excès de 2-vinylpyridine ;
- le $T(S)_2$, qui n'a pas été réduit, peut être quantifié spécifiquement par réaction avec le CTMQ en milieu fortement basique ;
- l'adduit obtenu subit une β -élimination favorisée par les conditions basiques pour conduire à la thione chromophorique.

On a déterminé le moment t_0 où l'on stoppe la réaction enzymatique selon deux critères :

- à t_0 , en l'absence d'inhibiteur, le $T(S)_2$ est complètement réduit,
- à t_0 , en présence d'un inhibiteur, le $T(S)_2$ est encore présent en quantité suffisante pour qu'on puisse le doser.

Ainsi, en l'absence d'inhibiteur, aucune coloration n'apparaît et, en présence d'un inhibiteur, une coloration jaune apparaît.

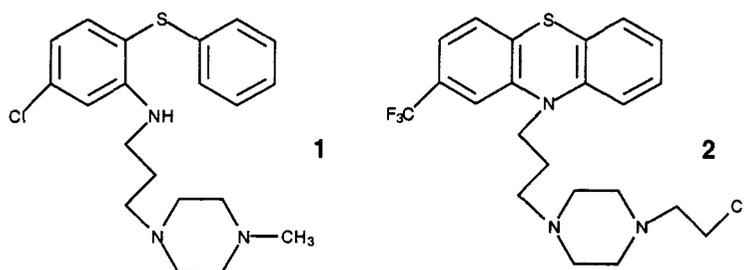
La densité optique de la solution ainsi testée est mesurée par spectrométrie à 405 nm. La longueur d'onde utilisée est 405 nm et non 400 nm (λ_{max} d'absorbance de la thione) car la plupart des lecteurs de microplaques ne possède qu'un filtre permettant de lire à 405 nm.

1.2. Résultats du criblage systématique

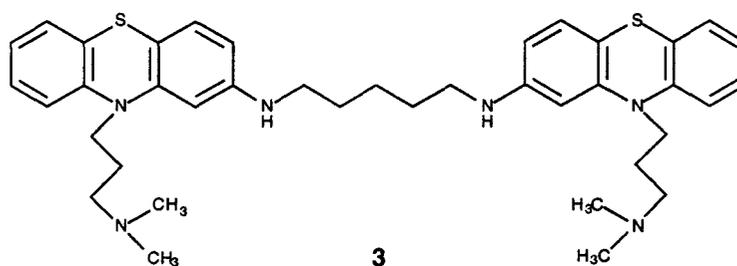
Le test de criblage a permis de tester plusieurs milliers de molécules issues de pharmacothèques classiques ainsi que de banques combinatoires. Nous avons pu disposer de produits provenant de firmes pharmaceutiques comme Rhône-Poulenc et Glaxo.

Ce criblage systématique a permis de mettre en évidence, entre autres, deux familles structurellement proches, présentant des K_i entre 10 et 25 μM : les 2-

aminodiphénylsulfures tels que le composé **1** et les phénothiazines telles que le composé **2**.¹⁰⁰



La molécule **3** dimérique, dérivée des phénothiazines, a également été sélectionnée à partir du criblage focalisé d'une banque de produits issus de Rhône-Poulenc.



90% d'inhibition de la TR à 57 μM et 80% à 5.7 μM
trypanocide (forme épimastigote)

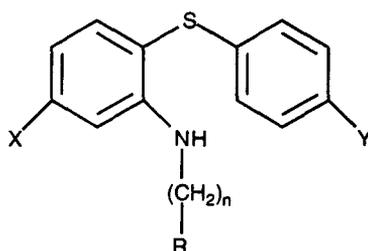
1.2.1. Les 2-aminodiphénylsulfures : une famille d'inhibiteurs de la TR déjà connue

Les phénothiazines sont connues comme trypanocides.⁹⁸ Malheureusement, les concentrations requises pour l'activité trypanocide de ces molécules sont largement supérieures aux concentrations auxquelles se manifeste l'effet neuroleptique interdisant toute application clinique.⁹⁸ Une étude pharmaceutique a permis de montrer que la famille des 2-aminodiphénylsulfures,¹⁰⁰ bien que structurellement proches des phénothiazines, présentait l'avantage d'une activité neuroleptique quasiment nulle.

Le composé **1** appartient à une série de produits qui avait été préparée 20 ans auparavant dans le but d'appliquer la théorie des "cycles ouverts" aux phénothiazines. L'objectif d'obtenir une nouvelle famille de bons neuroleptiques n'avait pas été atteint, mais ces molécules présentaient un grand intérêt en tant qu'antiparasitaires. Ainsi, le

composé **1** s'est révélé être un inhibiteur compétitif de la TR n'inhibant pas la GR. Il constituait donc une tête de série pour la recherche d'inhibiteurs de la TR dans la famille des 2-aminodiphénylsulfures.

Dans le but d'établir des relations structure-activité, différents analogues de **1**, dans lesquels variaient la longueur de la chaîne latérale ($n = 2$ ou 3), l'amine en bout de chaîne (diméthylamine, pyrrolidine ou *N*-méthylpipérazine) et la position de l'atome de chlore, ont été également testés sur la TR (tableau 7) et leur activité trypanocide évaluée sur les différents formes du parasite.¹¹⁷



| R | X | Y | n | K_i (μM) |
|----------------------------|----|----|---|-------------------------|
| <i>N</i> -méthylpipérazine | Cl | H | 3 | 25 |
| pyrrolidine | Cl | H | 3 | 44 |
| diméthylamine | Cl | H | 3 | 66 |
| <i>N</i> -méthylpipérazine | Cl | H | 2 | 43 |
| pyrrolidine | Cl | H | 2 | 77 |
| diméthylamine | Cl | H | 2 | 80 |
| <i>N</i> -méthylpipérazine | H | Cl | 2 | 80 |
| pyrrolidine | H | Cl | 2 | 160 |
| diméthylamine | H | Cl | 2 | 300 |

tableau 7. Constantes d'inhibition des composés synthésés

Dans l'étude du pouvoir inhibiteur de cette série de composés sur la TR, les conclusions ont été les suivantes :

- la longueur de chaîne optimale entre la partie hydrophobe et l'amine tertiaire correspond à trois atomes de carbone ($n = 3$),
- l'amine en bout de chaîne donnant les meilleurs résultats est la *N*-méthylpipérazine,
- la position de l'atome de chlore est très importante. Dans le cas des 2-aminodiphénylsulfures (contrairement aux phénothiazines), les molécules ne sont pas symétriques, d'où la variation des propriétés électroniques des deux cycles suivant la position de l'atome de chlore.

Ainsi, le composé **1** s'est révélé être le composé le plus actif de la série.¹¹⁸

Puis, une étude a été menée sur l'influence des groupements X et Y sur l'activité TR (tableau 8). C'est la molécule **1** correspondant à $n = 3$, $X = \text{Cl}$, $Y = \text{H}$ et $R = \text{N}$ -méthylpipérazinyle qui a subi les modifications. En collaboration avec le Docteur E. Buisine, une corrélation a pu être établie entre le logarithme de K_i et la différence de densité électronique entre les deux cycles benzéniques (figure 32).

| Composé | X | Y | K_i (μM) | densité électronique π sur le cycle | | différence de densité |
|----------|-----------------|--------------------|----------------------------|---|-------------|-----------------------|
| | | | | qui porte X | qui porte Y | |
| P17 | H | CH ₃ | 65 | -0.14 | -0.09 | 0.05 |
| 1 | Cl | H | 27 | -0.2 | -0.08 | 0.12 |
| P16 | Cl | Cl | 55 | -0.2 | -0.12 | 0.08 |
| P18 | Cl | CH ₃ | 28 | -0.2 | -0.09 | 0.11 |
| P19 | Cl | COCH ₃ | 19 | -0.2 | -0.05 | 0.15 |
| P20 | H | COOCH ₃ | 90 | -0.14 | -0.05 | 0.09 |
| P21 | CH ₃ | F | 200 | -0.16 | -0.14 | 0.02 |
| P22 | Cl | F | 114 | -0.19 | -0.14 | 0.05 |
| P23 | CH ₃ | CH ₃ | 85 | -0.16 | -0.09 | 0.007 |

les incertitudes sur les K_i se situent entre 1 (pour la plus faible valeur) et 10 (pour la plus forte valeur).

tableau 8. Relation entre les K_i et les différences de densité

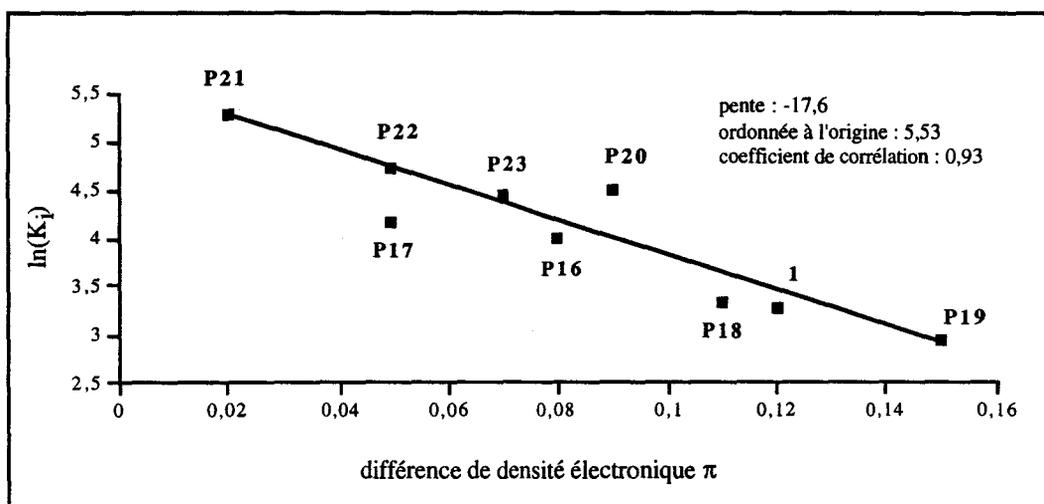
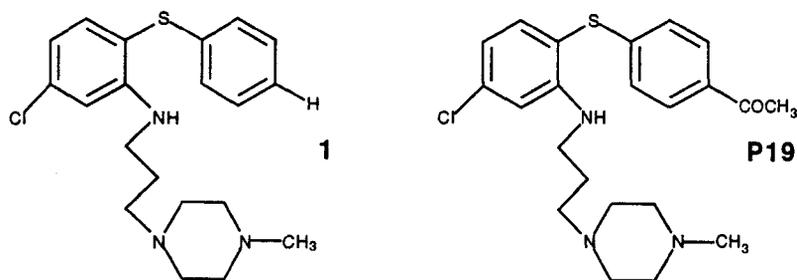


figure 32.
Corrélation structure-activité sur la deuxième série de dérivés de 2-aminodiphénylsulfures

Il semble, d'après ces résultats, que la présence de groupements électroniques attracteurs en X et donneurs en Y soit le cas le plus favorable. La différence de densité électronique la plus importante permet d'obtenir le meilleur potentiel inhibiteur.

De plus, l'analogue du meilleur inhibiteur dérivé du 2-aminodiphénylesulfure, où le soufre était remplacé par un oxygène, a été synthétisé.¹¹⁷ Le soufre a également été remplacé par une sulfone. La présence d'un atome d'oxygène est plus favorable que celle d'une sulfone, mais moins favorable que celle d'un atome de soufre.

Enfin, les activités de **1** et **P19** ont été testées sur le stade épimastigote. L'évolution de la population de parasites a été mesurée par deux méthodes : suivi de la D.O. à 560 nm, qui est proportionnelle à la quantité de parasites dans le milieu, et comptage des parasites morts et vivants sur cellules de Thoma. A 100 μM , la lyse des parasites est pratiquement instantanée. Il faut environ trois heures pour obtenir un résultat équivalent avec la clomipramine. D'autres études, effectuées au laboratoire de recherche sur les Trypanosomatidés INSERM U415, ont montré que le composé **1** a une activité trypanocide sur les trois stades parasitaires. A 10 μM , il est aussi actif que le benznidazole à 380 μM sur le stade épimastigote.



1.2.2. Modélisation dans le site actif de la TR

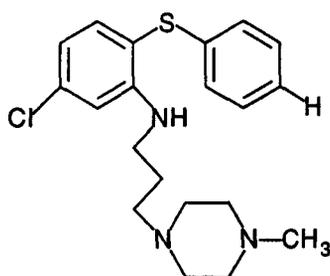
La position et la conformation, dans le site actif de la TR de *Crithidia fasciculata*, du meilleur inhibiteur de cette série, le composé **1**, ont été prédites par calcul de

dynamique moléculaire.^{115,119,91} Ces études ont été réalisées, au laboratoire, par les Drs E. Buisine et D. Horvath.

Les résultats de modélisation montrent que les énergies du complexe ligand/enzyme calculées sont considérablement plus basses lorsque la pipérazine terminale est protonée. Les minima d'énergie calculés diffèrent d'environ 20 kcal/mol, 5 kcal/mol représentant la différence d'énergie entre deux états de protonation différents. Etant donné que le ligand protoné en bout de chaîne apporte un gain d'énergie de 15 kcal/mol à l'énergie d'interaction du complexe enzyme/ligand, on suppose que c'est l'amine la plus éloignée du noyau hydrophobe qui possède les interactions ioniques les plus importantes avec l'enzyme.

Le composé 1 interagit au niveau de sa partie aromatique avec la zone hydrophobe du site actif formée de Leu₁₇, Trp₂₁, Tyr₁₁₀ et Met₁₁₃. De plus, il interagit au niveau de son extrémité *N*-méthylpipérazinyle terminale avec l'un ou l'autre des résidus Glu₄₆₆ ou Glu₄₆₇.

Seules deux conformations de faible potentiel énergétique dans une fenêtre de 3 kcal/mol ont été retenues (figure33).



composé 1

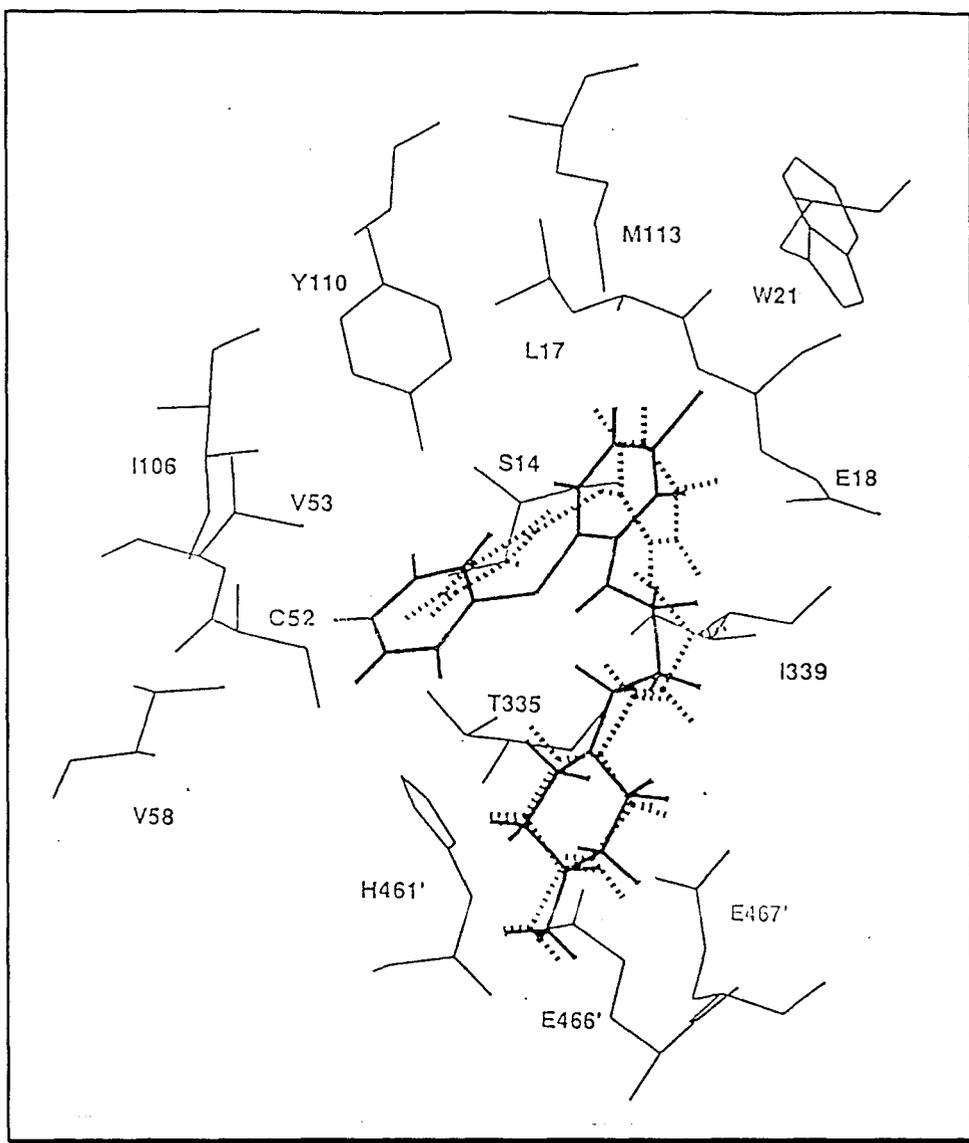


figure 33.
Conformations de plus bas niveaux d'énergie du composé 1 dans le site actif de la trypanothion réductase

2. Choix de la molécule - tête de série

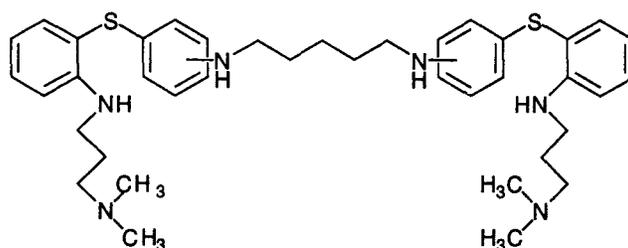
2.1. Structure dimérique

Contrairement au site actif de la GR, il existe des résidus carboxylates supplémentaires dans le site actif de la TR : Glu₁₈ ou proches du site actif : Asp₁₁₆, Asp₃₄₇ ou Glu₁₁₈. Il paraissait donc intéressant de rechercher un surcroît d'énergie de liaison par

greffage de chaînes latérales aminées supplémentaires sur la partie aromatique de l'inhibiteur.

Les études de modélisation montraient également, de façon claire, que la poche hydrophobe pouvait contenir une entité aromatique plus importante¹¹⁵.

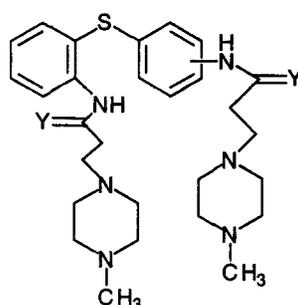
Nous avons donc décidé de synthétiser l'analogue "ouvert" du composé **3** issu du criblage enzymatique.



analogue "ouvert" du composé **3**

2.2. Vérification de la nécessité de la structure dimérique : deux chaînes aminées latérales sur un monomère

Nous avons également voulu contrôler la nécessité de la structure dimérique en ajoutant une deuxième chaîne latérale, de même nature que celle présente dans le composé **1**, sur un dérivé monomère du 2-aminodiphénylsulfure. Nous pourrions ainsi voir si l'ajout d'une chaîne latérale aminée supplémentaire sur un monomère suffit pour améliorer l'activité inhibitrice sur la TR, par accroissement de l'énergie de liaison entre l'inhibiteur et le site actif de la TR.



monomère possédant deux chaînes latérales aminées

II. Modifications structurales envisagées

1. Structures monomériques



1.1. Orientations respectives des deux chaînes latérales

Les phénothiazines sont caractérisées par une partie aromatique plane. Par contre, dans le cas des diphenylsulfures, les deux noyaux aromatiques reliés par un soufre se situent, en l'absence de toute contrainte, dans des plans perpendiculaires. Il n'est donc pas possible de se baser sur les orientations respectives des substituants des noyaux aromatiques des phénothiazines pour déterminer les orientations respectives de ces mêmes substituants dans le cas des 2-aminodiphenylsulfures.

Nous avons donc décidé de placer la chaîne latérale portée par le deuxième noyau aromatique dans les trois orientations possibles : *ortho*, *mé*ta et *para* par rapport à l'atome de soufre.

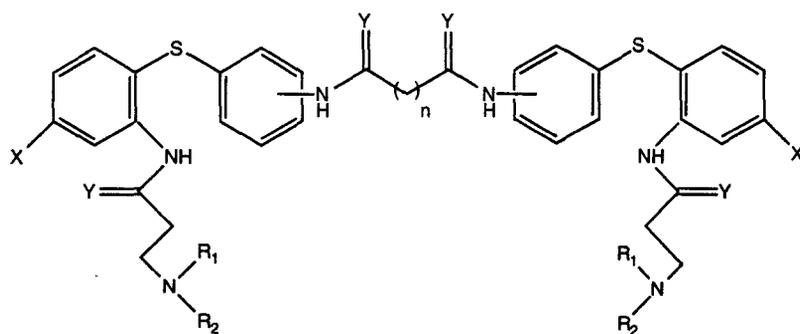
1.2. Réduction ou non des fonctions amides

Les produits issus du criblage enzymatique possèdent des chaînes latérales polyaminées. Mais, certains présentent une fonction amide en α du noyau aromatique et qui relie ce dernier à la chaîne latérale. De plus, le passage par les fonctions amides en α des noyaux aromatiques est nécessaire dans le schéma réactionnel mis en oeuvre. Nous avons donc décidé de tester également ces composés comme inhibiteurs de la TR.

2. Structures dimériques symétriques

Les analogues du composé **3** doivent répondre à certains critères pour que soient optimisées les chances de concevoir des inhibiteurs spécifiques, efficaces, de la TR :

- un bras espaceur comprenant cinq atomes de carbone pour mimer **3**,
- une chaîne latérale aminée possédant trois atomes de carbone sur chacune des parties hydrophobes de la molécule (par analogie avec les composés **1** et **3**),
- une amine en bout de chaîne latérale pouvant interagir avec les extrémités carboxylates des résidus glutamiques du site actif,
- éventuellement, des substituants supplémentaires comme un atome d'halogène, en *para* de l'atome de soufre, sur le noyau aromatique portant la chaîne latérale (par analogie avec le composé **1**).



structures dimériques

Dans l'étude de l'activité TR, les différents critères structuraux, permettant d'optimiser l'inhibition, ont été déterminés selon l'ordre suivant :

- orientation du bras espaceur et nature de l'amine en bout de chaîne latérale (diméthylamine ou *N*-méthylpipérazine),
- longueur du bras espaceur (trois, cinq ou sept atomes de carbone),
- présence d'un atome d'halogène ou non en *para* de l'atome de soufre et nature de cet halogène (chlore, brome, fluor ou iode),
- optimisation de l'activité par variation de la nature de l'amine en bout de chaîne latérale (diéthylènetriamine ou 1,4-diaminobutane).

2.1. Orientation du bras espaceur

Comme dans le cas des monomères, les différences de structure des parties aromatiques des phénothiazines et des 2-aminodiphénylsulfures ne permettent pas de prévoir la meilleure orientation du bras espaceur.

Dans la molécule **3**, ce dernier est en *para* de l'atome de soufre. Mais, nous ne pouvons pas en déduire que la position *para* est optimale pour le bras espaceur des bis(2-aminodiphénylsulfures). Nous avons donc décidé de synthétiser les trois composés analogues de **3** correspondant aux orientations en *ortho*, *méta* et *para* du bras espaceur par rapport à l'atome de soufre.

2.2. Réduction ou non des fonctions amides

Le cas est identique à celui des monomères portant deux chaînes latérales aminées. Les composés réduits (fonctions amines en α du noyau aromatique et aux extrémités du bras espaceur) et non réduits (fonctions amides en α du noyau aromatique et aux extrémités du bras espaceur) ont été synthétisés et testés comme inhibiteurs de la TR.

2.3. Amine en bout de chaîne latérale : diméthylamine ou *N*-méthylpipérazine

Par analogie avec le composé **3**, nous avons décidé de synthétiser des composés présentant la diméthylamine en bout de chaîne latérale. De plus, d'après les résultats obtenus dans le cas des monomères issus du criblage ou synthétisés au laboratoire, par analogie avec le composé **1**, les mêmes composés dimériques présentant une *N*-méthylpipérazine en bout de chaîne latérale ont été synthétisés.

2.4. Longueur du bras espaceur

Nous avons cherché à optimiser la longueur du bras espaceur : en plus de la chaîne centrale comprenant cinq atomes de carbone (par analogie avec le composé **3**) ont été synthétisés les analogues avec, respectivement, deux atomes de carbone supplémentaires et deux atomes de carbone de moins.

2.5. Présence ou non d'un atome d'halogène sur un des noyaux aromatiques

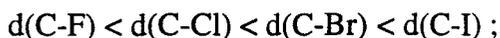
Les études préalablement réalisées au laboratoire ont montré l'importance de l'atome de chlore en *para* de l'atome de soufre et en *mé*ta de la chaîne latérale aminée ($K_i = 25 \mu\text{M}$ en présence de l'atome de chlore et $80 \mu\text{M}$ en l'absence de l'atome de chlore).

Nous avons donc décidé d'ajouter cet atome de chlore comme substituant et de déterminer également l'effet du remplacement du chlore par un brome, un fluor ou un iode, pour suivre l'influence de la densité électronique ou de l'encombrement stérique. Nous espérons pouvoir ainsi déterminer l'influence de l'atome d'halogène sur l'efficacité de l'inhibition.

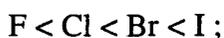
Dans le cadre des activités biologiques et des réactivités chimiques, chaque atome d'halogène présente des caractéristiques particulières en comparaison à un atome d'hydrogène :

- l'introduction d'un atome d'halogène à la place d'un atome d'hydrogène rend la molécule plus lipophile ;
- les halogènes présentent un effet inductif attracteur qui peut avoir des effets plus ou moins prononcés sur la distribution électronique des charges dans la molécule, sur la basicité ou l'acidité des groupements voisins, sur les moments dipolaires de la molécule et sur la réactivité des groupements voisins ; les électronégativités des différents atomes d'halogène sont classées dans l'ordre suivant : $F > Cl > Br > I$;

- les distances carbone-halogène sont classées dans l'ordre suivant :



- les tailles respectives des atomes sont classées dans l'ordre suivant :



- l'atome de fluor a la même taille qu'un atome d'hydrogène, il peut jouer le rôle d'accepteur de liaison hydrogène

- les atomes de brome et d'iode, du fait de leur taille et de leur électronégativité plus faibles, sont de meilleurs nucléofuges qui donnent lieu plus facilement à des réactions secondaires.

2.6. Diéthylènetriamine ou 1,4-diaminobutane en bout de chaîne latérale par analogie avec de bons inhibiteurs de la TR

Récemment, au laboratoire, des études complémentaires ont été réalisées sur la nature de l'amine en bout de chaîne latérale.¹¹⁵ Pour accroître les interactions de type ionique entre l'inhibiteur et le site actif de la TR, deux possibilités s'offraient à nous :

- étant donnée l'orientation du ligand **1**, ajout d'une chaîne latérale supplémentaire sur la partie hydrophobe qui pourrait interagir avec Asp₁₁₆,

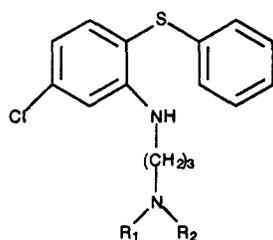
- variation de la longueur de la chaîne latérale préexistante et ajout de fonctions amines supplémentaires qui pourraient interagir avec les résidus carboxylates de plusieurs Glu simultanément.

La solution choisie a été l'allongement de la chaîne latérale par une réaction de substitution nucléophile par une polyamine. Le but était de créer des interactions entre le ligand et Glu₄₆₆/Glu₄₆₇ et Glu₁₈ simultanément. La distance entre les carboxylates du premier et du dernier résidu acide est environ de 12-13 Å. Ainsi, la longueur optimale du bras entre deux groupements ammoniums interagissant avec ces deux zones de potentiel négatif doit se situer entre 6 et 8 Å (4 à 5 atomes de carbone entre les deux atomes d'azote).

Les modifications chimiques sur le ligand ne doivent pas interférer avec l'interaction entre la partie aromatique de ce dernier et la poche hydrophobe du site. Les

chaînes latérales doivent pouvoir s'accommoder des groupements positifs pouvant exister dans la zone de potentiel négatif créée par les résidus acides dans le site. Ainsi, une variation structurale minime du ligand peut modifier complètement le mode de fixation de ce dernier. Il n'est donc pas possible de se fier uniquement aux hypothèses basées sur l'étude de modélisation moléculaire.

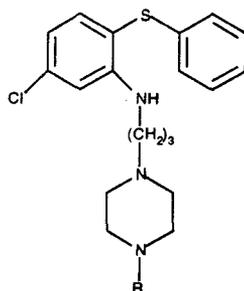
Les composés synthétisés ont une chaîne latérale linéaire ou ramifiée (tableau 9) ou présentent des variations au niveau de l'azote terminal de la pipérazine de **1** (tableau 10). Ces composés ont été testés *in vitro* sur la TR de *T. cruzi* à 10 μ M, puis, s'ils présentaient une activité, à 3 et 1 μ M. Les pourcentages d'inhibition mesurés sont comparés à ceux de la clomipramine, composé le plus facilement disponible parmi les meilleurs inhibiteurs de la TR.^{97,120,121} Ces composés étaient ensuite testés *in vitro* sur la forme trypomastigote de *T. cruzi* puis, *in vivo*, pour les plus actifs.



| Composé | R ₁ | R ₂ | % inhibition TR (<i>T. cruzi</i>) | | | % inhibition <i>in vitro</i> (<i>T. cruzi</i>) | | |
|--------------|---|--|--|----|----|---|------|------|
| | | | 10 | 3 | 1 | 25 | 12.5 | 6.25 |
| SB26 | H | (CH ₂) ₂ NH ₂ | 0 | | | | | 0 |
| SB32 | H | (CH ₂) ₃ NH ₂ | 33 | | | T | T | T |
| SB36 | H | (CH ₂) ₄ NH ₂ | 67 | 29 | 8 | T | T | T |
| SB18 | H | (CH ₂) ₂ NH(CH ₂) ₂ NH ₂ | 12 | | | T | T | T |
| SB31 | H | (CH ₂) ₃ NH(CH ₂) ₃ NH ₂ | 53 | 22 | 11 | T | T | T |
| SB25 | H | (CH ₂) ₂ N((CH ₂) ₂ NH ₂) ₂ | 4 | | | T | nd | 0 |
| SB30 | (CH ₂) ₂ NH ₂ | (CH ₂) ₂ NH ₂ | 75 | 46 | 23 | T | T | T |
| SB24 | H | (CH ₂) ₂ NHC(=NH)NH ₂ | 30 | | | T | nd | 0 |
| clomipramine | | | 45 | 16 | 4 | 40 | 0 | |

T : cytotoxique
nd : non déterminé

tableau 9.
Activité inhibitrice sur la TR de *T. cruzi* et sur la forme trypomastigote de *T. cruzi*



| Composé | R | % inhibition TR (<i>T. cruzi</i>) | | | % inhibition <i>in vitro</i> (<i>T. cruzi</i>) | | |
|--------------|---|--|----|----|---|------|------|
| | | 10 | 3 | 1 | 25 | 12.5 | 6.25 |
| 1 | CH ₃ | 22 | 14 | 11 | T | nd | 0 |
| SB40 | (CH ₂) ₂ NH ₂ | 22 | 5 | 3 | T | nd | T |
| SBA | (CH ₂) ₂ NHCOCH ₃ | 5 | | | 0 | | |
| SBB | (CH ₂) ₂ NHCOC ₆ H ₅ | 5 | | | 0 | | |
| SB43 | H | 18 | | | 0 | | |
| clomipramine | | 45 | 16 | 4 | 40 | 0 | |

T : cytotoxique
nd : non déterminé

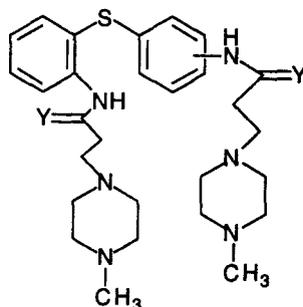
tableau 10.
Activité inhibitrice sur la TR de *T. cruzi* et sur la forme trypomastigote de *T. cruzi*

Les meilleures activités ont été obtenues avec les composés où les deux groupements ammoniums sont séparés par quatre (composé **SB36**) ou cinq (composé **SB30**) atomes de carbone. Des K_i de 24 et 12 μM ont été respectivement mesurés pour les composés **SB36** et **SB30**. Ce dernier présente une activité inhibitrice comparable à celle de la clomipramine. De plus, tous ces inhibiteurs de la TR sont inactifs sur la GR humaine (à 10 μM). Mais, *in vitro* sur le parasite et *in vivo* sur la souris, ces dérivés de 2-aminodiphénylsulfures polyaminés présentent fréquemment une certaine cytotoxicité.

Par analogie avec ces résultats et malgré la cytotoxicité des composés obtenus, nous avons décidé de greffer en bout de chaîne latérale la 1,4-diaminobutane et la diéthylènetriamine sur le meilleur des inhibiteurs de notre série.

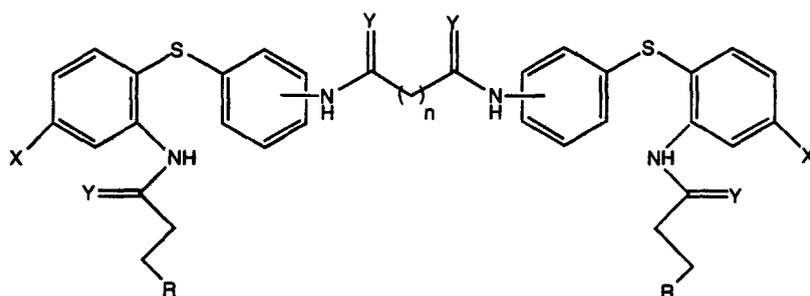
Conclusion

Une première génération de molécules sera synthétisée, puis, le potentiel inhibiteur sur la trypanothion réductase évalué : des monomères de 2-aminodiphénylsulfures possédant deux chaînes latérales aminées.



orientation de la deuxième chaîne latérale *ortho*, *méta* ou *para*
Y = O ou 2H

Une deuxième génération de molécules sera synthétisée, puis, le potentiel inhibiteur sur la trypanothion réductase évalué : des bis(2-aminodiphénylsulfures) possédant deux chaînes latérales aminées.



orientation *ortho*, *méta* ou *para* du bras espaceur
bras espaceur de trois (n = 1), cinq (n = 3) ou sept atomes de carbone (n = 5)
X = H, Cl, Br, F ou I
Y = O ou 2H

R : diméthylamine, *N*-méthylpipérazine, diéthylènetriamine ou 1,4-diaminobutane

Deuxième chapitre

Conception et évaluation d'inhibiteurs de la trypanothion réductase : mono et bis(2-aminodiphénylsulfures)

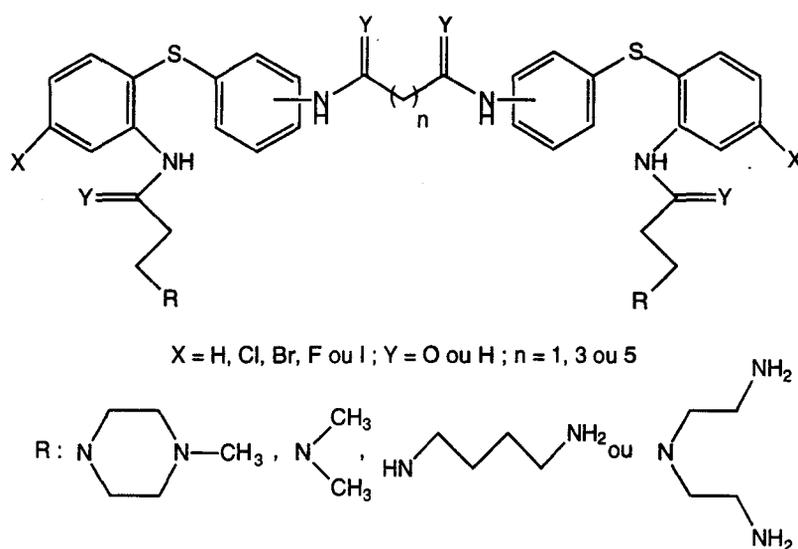
Introduction

Dans ce chapitre sont décrites la synthèse des mono 2-aminodiphénylsulfures, à deux chaînes latérales aminées, et celle de première série de bis(2-aminodiphénylsulfures).

Dans le cas de notre première série de bis(2-aminodiphénylsulfures), plusieurs paramètres structuraux varient :

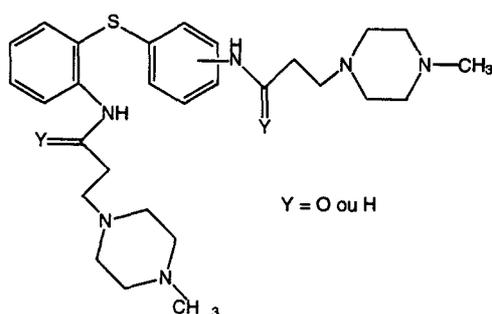
- orientation du bras espaceur (*ortho*, *mé*ta ou *para*),
- longueur du bras espaceur,
- amine en bout de chaîne latérale (diméthylamine, *N*-méthylpipérazine, 1,4-diaminobutane ou diéthylènetriamine),
- atome d'halogène (chlore, brome, iode ou fluor) en *para* de l'atome de soufre sur le noyau aromatique portant la chaîne latérale.

Dans tous les cas (sauf pour la diéthylènetriamine ou le 1,4-diaminobutane), les fonctions amide en α des noyaux aromatiques sont sous forme non réduite ou réduite.



première génération de bis(2-aminodiphénylsulfures)

Dans le cas des 2-aminodiphénylsulfures, les seules variations structurales envisagées sont l'orientation, par rapport à l'atome de soufre, d'une des deux chaînes aminées (*ortho*, *mé*ta ou *para*) et la présence de fonctions amides ou amines en α des noyaux aromatiques.



dérivés de 2-aminodiphénylsulfures

I. Synthèses des composés

1. Aminodiphénylsulfures de départ

Le composé à la base de toutes les synthèses décrites dans ce chapitre est le 2-nitrodiphénylsulfure. La synthèse de ce composé se fait par substitution nucléophile aromatique (S_NAr) d'un atome de chlore par un atome de soufre (schéma 1).

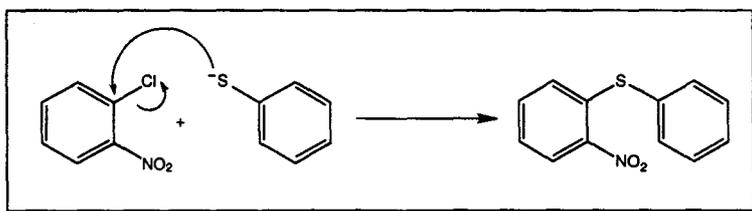


schéma 1. Substitution nucléophile aromatique

Cette réaction se fait entre le thiophénol et le 2-chloronitrobenzène (ou le 2,5-dichloronitrobenzène dans le cas des inhibiteurs chlorés en *para* du soufre par

exemple).¹¹⁵ La substitution est favorisée par la présence du groupement nitro en *ortho* (et du groupement chloro en *para*). En effet, le mécanisme de la S_NAr passe par un intermédiaire possédant trois formes mésomères en équilibre (schéma 2). La formation de cet intermédiaire est favorisée par l'effet mésomère attracteur du groupement nitro en *ortho* (et celui du chlore en *para*).

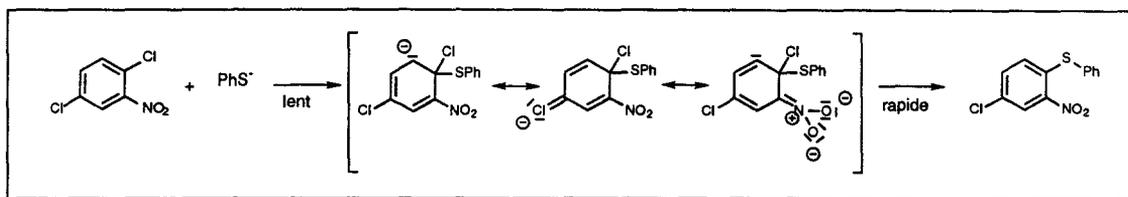


schéma 2. Mécanisme de la S_NAr

Dans notre série de composés, le deuxième noyau aromatique porte également une fonction amine. Cette fonction amine présente sur le thiophénol pourrait interférer dans la réaction de S_NAr. L'atome d'azote et non l'atome de soufre pourrait substituer l'atome de chlore.

Nous avons voulu protéger sélectivement l'atome d'azote, faire réagir la fonction thiol, puis déprotéger la fonction amine pour permettre la suite de la synthèse.

1.1. Méthode protection/déprotection de la fonction amine

Une méthode classique de protection sélective d'une fonction amine en présence d'une fonction sulfure est la benzoylation :¹²² le composé comprenant une fonction amine et une fonction thiol est traité par deux équivalents de chlorure de benzoyle dans la pyridine. Un groupement benzoyle se fixe sur l'atome de soufre et un autre sur l'atome d'azote. Puis, un traitement à l'ammoniaque permet de déprotéger sélectivement la fonction thiol,¹²³ qui peut ensuite réagir (schéma 3). La fonction amine est déprotégée par un traitement acide fort.

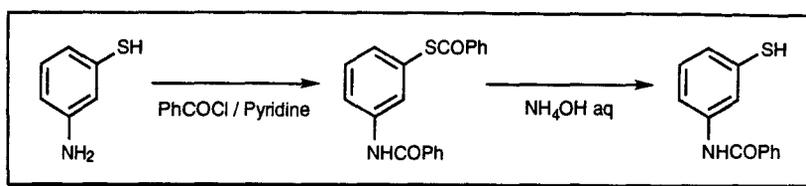


schéma 3. Protection sélective de la fonction amine

Lors de la réaction de déprotection de la fonction thiol, nous avons observé la formation d'un seul produit qui n'était pas celui attendu : ce composé avait une masse molaire de 319 g/mol.

1.2. Passage par un disulfure

Nous pensions protéger la fonction thiol sous la forme d'un disulfure, benzoyler la fonction amine puis régénérer le thiol pour le faire réagir dans la S_NAr . Différentes méthodes ont été testées : traitement par un mélange soude méthanolique/iode bisublimé,¹²⁴ NaOH aqueux 10%/H₂O₂ 3%, H₂O₂/EtOH/H₂O¹²⁵ ou barbotage d'air dans une solution de NaOH aqueux 10%. Dans tous les cas, le disulfure attendu ne s'est pas formé.

1.3. Méthode directe

Des études sur le 2-aminothiophénol¹²⁶ avaient montré que la substitution pouvait se faire sans protection préalable de la fonction amine (schéma 4). Le 2-chloronitrophénol (substitué ou non en *para*) est traité à reflux par un léger excès d'aminothiophénol et un gros excès d'acétate de sodium anhydre dans de l'éthanol absolu.¹²⁷

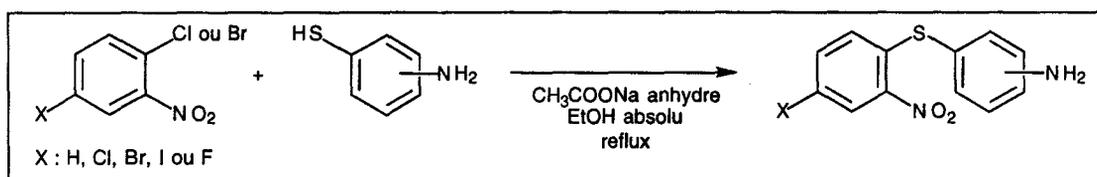


schéma 4. Synthèse des diphenylsulfures

Différents aminodiphénylsulfures ont été synthétisés nécessitant différents nitrobenzènes au départ : 2-chloronitrobenzène, 2,5-dichloronitrobenzène, 2,5-dibromonitrobenzène, 2-chloro-5-fluoronitrobenzène, 2-chloro-5-iodonitrobenzène. Les quatre premiers produits sont commerciaux. Le cinquième a dû être synthétisé, au laboratoire, à partir de la 4-chloro-3-nitroaniline par un traitement avec un mélange $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}/\text{NaNO}_2$.

2. Fixation du bras espaceur

La fixation du bras espaceur se fait par acylation de la fonction amine des différents diphénylsulfures.

Dans le cas du bras espaceur comprenant cinq atomes de carbone, nous pensons faire réagir le diphénylsulfure aminé sur l'anhydride glutarique (schéma 5), puis coupler l'acide formé avec ce même diphénylsulfure.

La formation de l'acide se fait par réaction avec l'anhydride glutarique dans la pyridine.

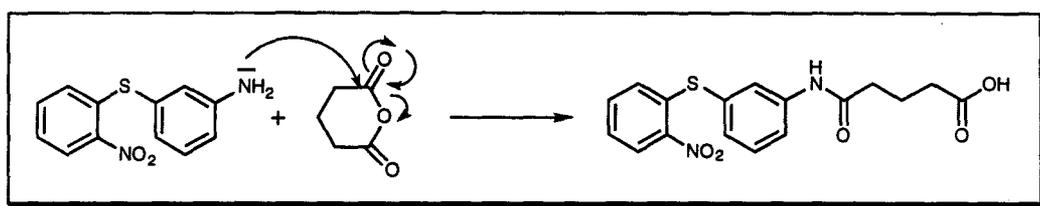


schéma 5. Formation de l'acide par réaction avec l'anhydride glutarique

Différentes méthodes de couplage acide/amine ont été testées :

- passage par un ester activé par traitement avec un mélange HOBt/HBTU/DIEA/DMF, puis couplage de cet ester,
- passage par un ester activé, par traitement avec un mélange *N*-hydroxysuccimide/DCC/DMF, puis couplage de cet ester,
- activation de l'acide par formation de l'anhydride correspondant avec la DCC dans CH_2Cl_2 , puis couplage avec l'amine.

Les esters activés se forment mais ne réagissent pas avec l'amine aromatique. Par contre, l'anhydride ne se forme pas.

Le principe des esters activés sera détaillé dans le quatrième chapitre portant sur les dérivés dissymétriques.

2.1. Cas général

La fixation du bras espaceur a finalement été réalisée, simultanément, aux deux extrémités, par réaction avec des dichlorures d'acides commerciaux (schéma 6).

Dans le cas des composés où $n = 3$ ou 5 , la réaction se fait dans la pyridine pure, avec deux équivalents d'aminodiphénylsulfure pour un équivalent de dichlorure d'acide.

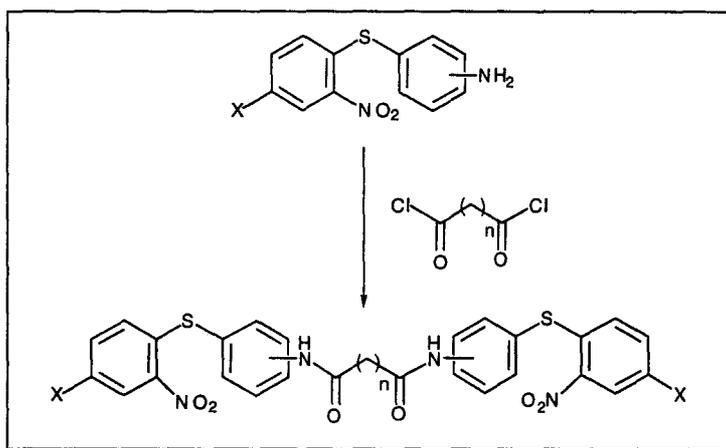


schéma 6. Fixation du bras espaceur

La pyridine permet de piéger les molécules de HCl qui se forment et d'activer le dichlorure d'acide (le mécanisme d'activation sera décrit en détail dans le § 4.1.).

2.2. Cas où $n=1$

Dans le cas du dichlorure de propanoyle, le manque de stabilité du réactif nécessite l'utilisation de l'éther comme solvant et de deux équivalents de pyridine. L'addition de

plus de deux équivalents de pyridine entraîne le noircissement du milieu réactionnel et la dégradation du chlorure d'acide avant réaction. L'ajout trop rapide du dichlorure de propanoyle provoque le même phénomène. Cela est dû très probablement à la très grande instabilité du réactif, d'où l'utilisation d'éther préalablement séché sur tamis et de pyridine fraîchement distillée, et l'ajout du réactif avec beaucoup de précautions.

3. Réduction du groupement nitro

Dans un premier temps, la réduction (schéma 7) a été réalisée dans l'éthanol absolu, en présence de nickel de Raney, sous pression d'hydrogène (100 bars) et à 80°C pendant cinq heures. La réaction se fait dans un autoclave sous pression, agité et chauffé. Mais, cette méthode ne convient pas aux petites quantités, consomme beaucoup de solvant et est peu pratique à mettre en oeuvre.

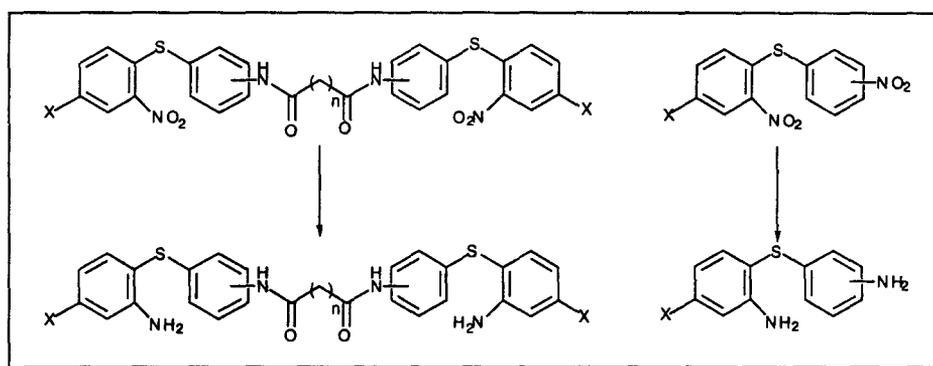


schéma 7. Réduction des groupements nitro

Enfin, une méthode beaucoup plus facile à mettre en oeuvre, plus rapide et adaptée à toutes les quantités, a montré son efficacité sur les produits de notre série. Elle consiste, selon une réaction analogue à la réaction de Clémmsen, en un traitement à la poudre de fer et à l'acide chlorhydrique concentré, dans de l'éthanol à 95°. ¹²⁸ Une simple filtration sur célite permet de récupérer le produit. Le seul inconvénient est sa couleur souvent marron due à la présence de traces de fer. Mais, ce dernier n'interfère pas dans l'étape suivante.

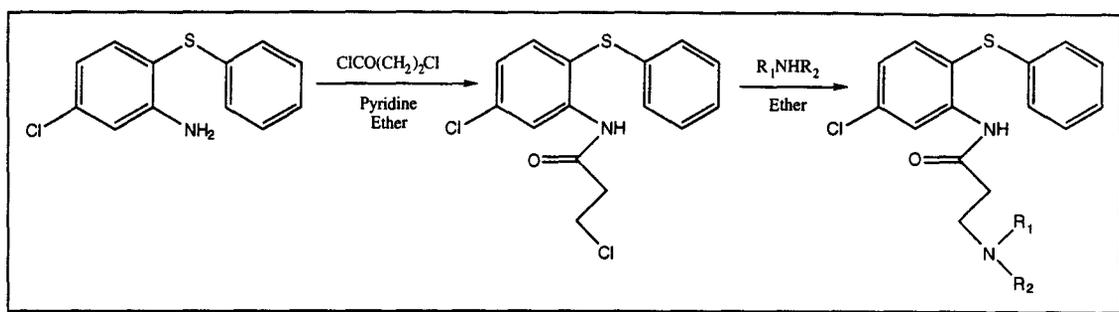
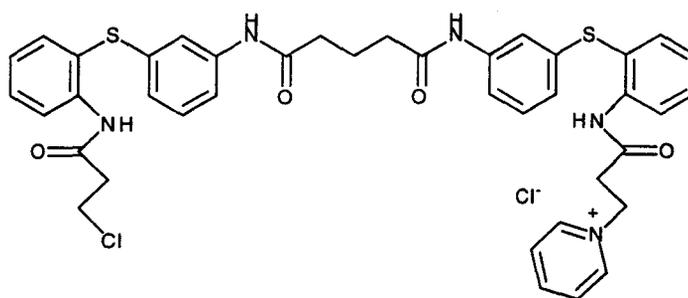


schéma 9. Fixation de la chaîne latérale aminée

4.1. Diméthylamine, *N*-méthylpipérazine ou 1,4-diaminobutane

Dans notre série de composés à deux chaînes latérales, cette méthode n'a pu être appliquée.

Dans un premier temps, pour des raisons de solubilité, l'éther n'a pu être utilisé. Le traitement du composé diaminé par un léger excès de chlorure de 3-chloropropanoyle dans la pyridine pure entraîne la formation d'un composé dont l'atome de chlore d'une des chaînes latérales est substitué par la pyridine pour former ainsi le sel de pyridinium correspondant. Enfin, pour des raisons de solubilité, le THF a été choisi comme solvant. Mais, le même composé se forme si on réalise la réaction dans le THF avec un léger excès de pyridine. Dans les deux cas, ce groupement pyridinium n'a pu être déplacé, ensuite, par la *N*-méthylpipérazine ou la diméthylamine.



sel de pyridinium

Cette réaction a été mise en oeuvre en l'absence de pyridine. Mais, la formation de chaque composé dimérique substitué s'accompagne de l'apparition de deux molécules d'acide chlorhydrique, qui protonent les amines aromatiques libres encore présentes dans le milieu réactionnel. Ces amines protonées ne peuvent plus réagir. Ainsi, le rendement de la réaction est au maximum de 50 %. De plus, le produit de départ et le produit d'arrivée ont des R_f identiques (dans les éluants classiquement utilisés pour notre série de composés), d'où l'impossibilité de purifier le produit formé.

En plus de cette fonction de piégeage de l'acide chlorhydrique formé, la pyridine permet également d'activer le chlorure d'acide (schéma 10).

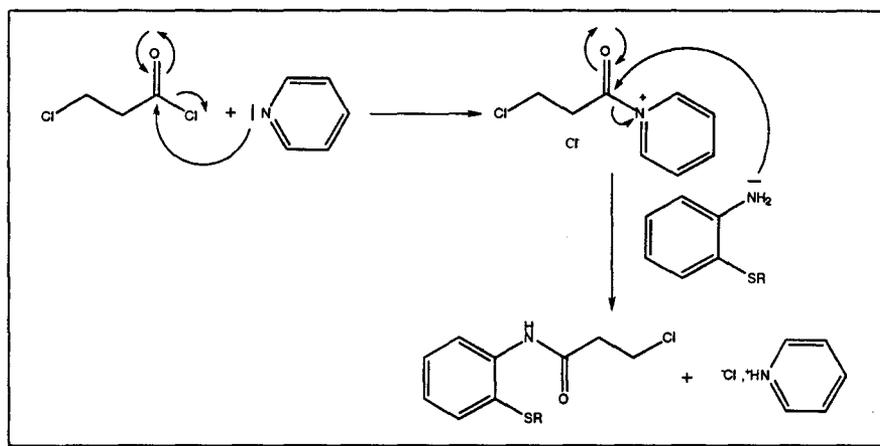
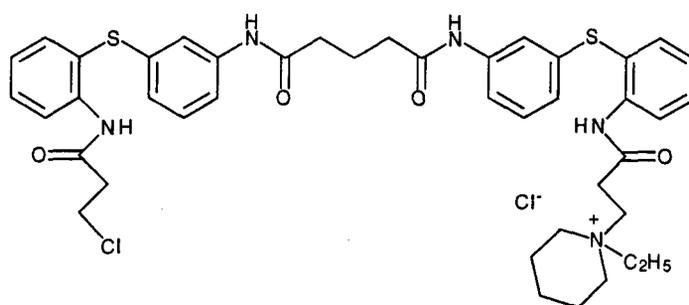


schéma 10. Activation du chlorure d'acide

Nous avons donc recherché une amine tertiaire permettant de rendre totale l'acylation des fonctions amines et pouvant être déplacée ensuite par la *N*-méthylpipérazine ou la diméthylamine :

- le remplacement de la pyridine par la DIEA n'a pas conduit à l'acylation des fonctions amines libres,
- l'utilisation de la *N*-éthylpipéridine permet d'observer la formation du produit acylé, où un des atomes de chlore est substitué par un groupement *N*-éthylpipéridinyle.



sel de pipéridinium

De nombreux essais ont montré que :

- la disparition totale des fonctions amines libres (constatée par une révélation ninhydrine négative) nécessite au minimum trois équivalents de chlorure d'acide et 5 équivalents de *N*-éthylpipéridine (NEP),
- le produit formé est un sel de pipéridinium qui est difficile à purifier du fait de sa nature de sel. L'élimination du chlorure d'acide en excès nécessite un traitement aqueux (pour transformer tout le chlorure d'acide restant en acide), puis basique (pour éliminer l'acide). De plus, l'élimination de la NEP en excès nécessite un traitement aqueux voire acide. L'importante solubilité du sel dans les phases aqueuses empêche donc toute purification par extraction. Sa nature de sel interdit également toute purification par chromatographie sur colonne de silice.

Nous avons essayé de réaliser, directement sur le produit brut, la substitution de l'atome de chlore ou de la *N*-éthylpipéridine (chauffage à reflux en présence de 20 équivalents de *N*-méthylpipérazine ou de diméthylamine). Les deux amines utilisées déplacent l'atome de chlore et la *N*-éthylpipéridine quantitativement. Le déplacement de l'amine en bout de chaîne nécessite le chauffage à reflux du THF : la réaction ne se fait pas à froid et très peu à température ambiante.

En nous basant sur ces résultats, nous avons essayé de mettre au point une synthèse en deux étapes "one pot" en utilisant directement la diméthylamine pour

l'acylation des fonctions amines. Mais, la réaction d'acylation n'est pas totale. La même observation a été faite pour la *N*-méthylpipérazine.

Tout en conservant le principe de deux étapes en une seule réaction, nous sommes revenus à l'utilisation de la *N*-éthylpipéridine pour permettre l'acylation totale des amines primaires aromatiques. Le mode opératoire mis en oeuvre est le suivant :

- dans un premier temps, ajout du chlorure d'acide (5 équivalents) sur la solution de bis(2-aminodiphénylsulfure) aminé dans le THF anhydre, agitation pendant quelques minutes pour bien homogénéiser le mélange, puis ajout en trois fois de la *N*-éthylpipéridine (3 équivalents à chaque fois), le tout à froid,
- enfin, ajout dans le milieu réactionnel de la *N*-méthylpipérazine ou de la diméthylamine (20 équivalents) et chauffage à reflux.

L'amine doit être additionnée, par portions, après le chlorure d'acide pour permettre une bonne homogénéisation préalable du milieu avant le début de la réaction et donc une bonne réactivité du chlorure d'acide sur les amines aromatiques.

L'utilisation de THF anhydre est nécessaire pour éviter l'hydrolyse du chlorure d'acide.

Ce mode opératoire permet d'obtenir de bons rendements globaux. Il s'applique à la diméthylamine, à la *N*-méthylpipérazine et au 1,4-diaminobutane (schéma 11).

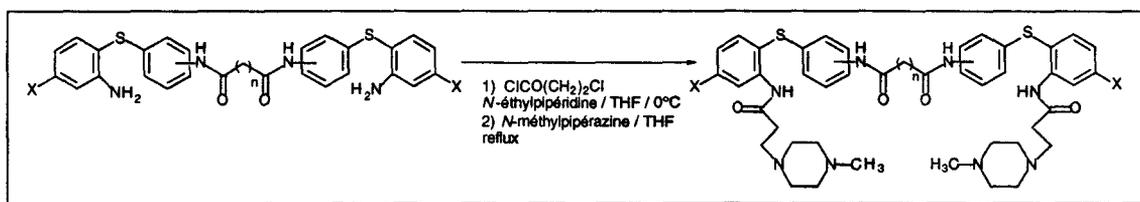


schéma 11. Exemple de fixation d'une chaîne latérale aminée

4.2. Diéthylènetriamine

Nous souhaitons fixer la diéthylènetriamine en bout de chaîne latérale par sa fonction amine secondaire. Il était donc nécessaire de protéger préalablement les deux fonctions amines primaires. Le schéma réactionnel est celui mis en oeuvre dans le cas des 2-aminodiphénylsulfures :¹¹⁵ protection des amines primaires par des groupements trifluoroacétates (traitement par un mélange trifluoroacétate d'éthyle/acétonitrile/eau), fixation de l'amine diprotégée en bout de chaîne (mode opératoire décrit précédemment légèrement modifié car l'amine sous forme d'un sel de trifluoroacétate doit être ajoutée avec de la triéthylamine), puis déprotection par un traitement à la lithine.

5. Réduction des fonctions amides

En l'absence de fonctions amines primaires et secondaires (schéma 12), l'hydrure mixte de lithium et d'aluminium, LiAlH_4 , doit pouvoir réduire les composés obtenus, le mode opératoire étant plus simple que celui utilisant le borane BH_3 , méthode utilisée dans le cas des 2-aminodiphénylsulfures.¹¹⁵

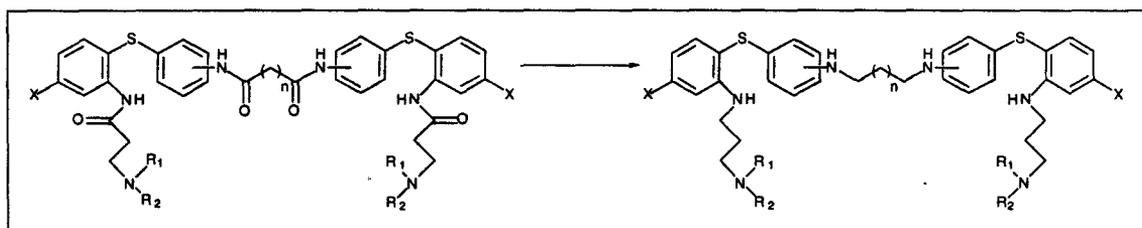


schéma 12. Réduction simultanée des quatre fonctions amides

Le premier mode opératoire mis en oeuvre est le suivant : traitement à reflux avec cinq équivalents de LiAlH_4 dans le THF anhydre, neutralisation à froid avec AcOEt , concentration au quart, puis filtration des sels de lithine formés et récupération du produit par évaporation à sec. Dans le cas de notre série de composés, les quatre fonctions amides

ont été réduites, mais le produit n'a pu être récupéré ; il est vraisemblablement resté prisonnier dans les sels de lithium.

Finalement, la méthode au borane, inspirée du protocole expérimental de Brown et Heim,¹³⁰ a permis de réduire les quatre fonctions amides simultanément : traitement à reflux dans le THF anhydre par une solution de BH_3 dans le THF. A la fin de la réaction, l'excès de BH_3 est hydrolysé afin de former de l'acide borique, facilement éliminé par un lavage en milieu basique.

Le mécanisme d'action du borane est basé sur la formation d'un complexe du bore (schéma 13).

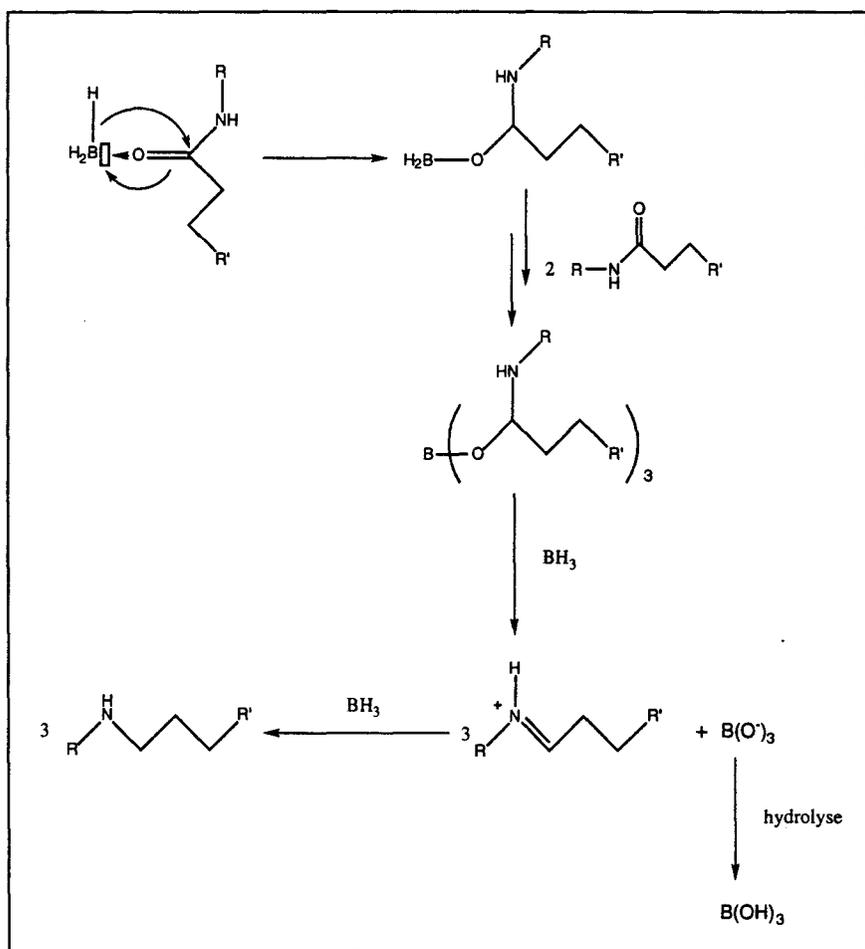
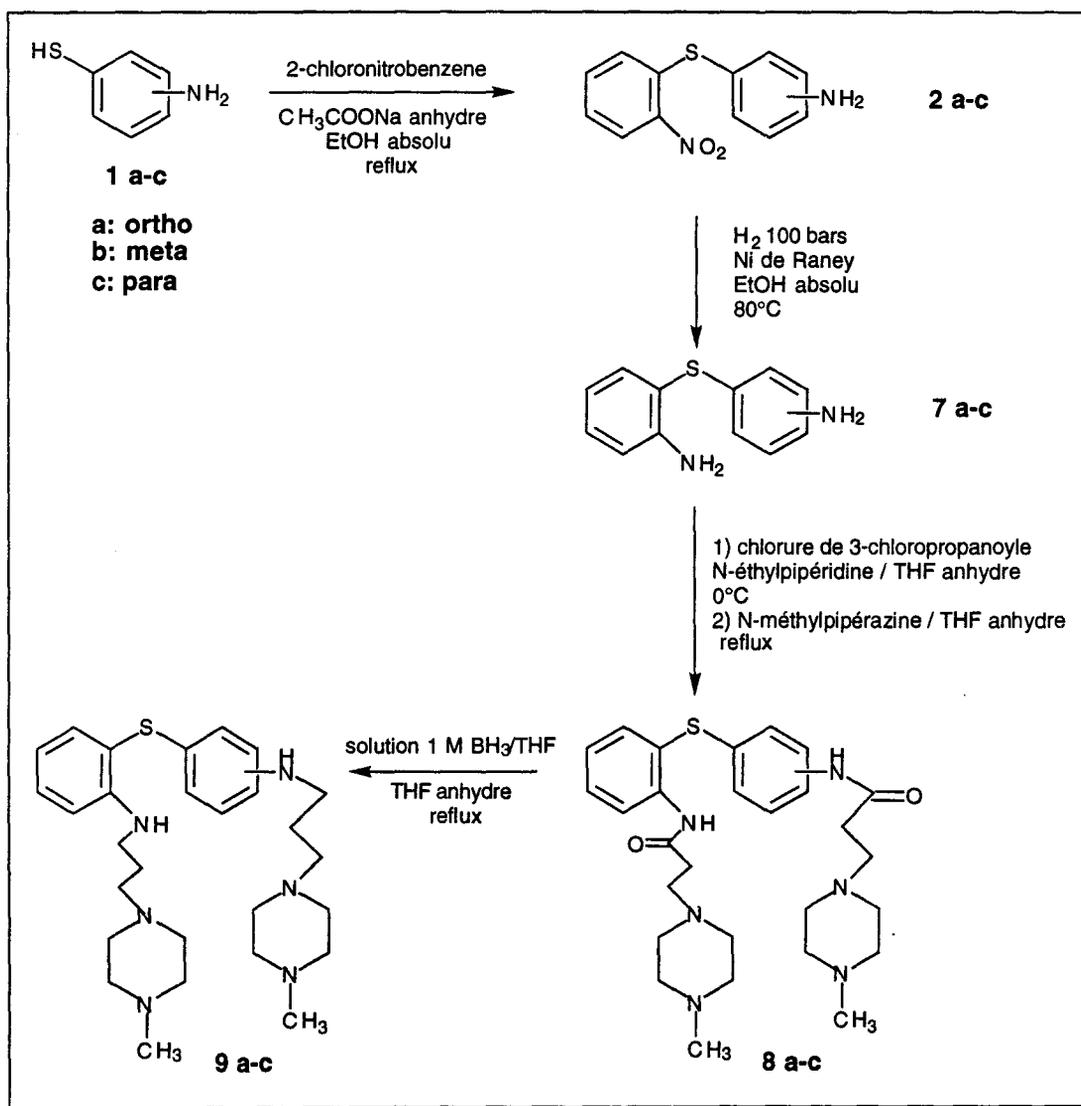


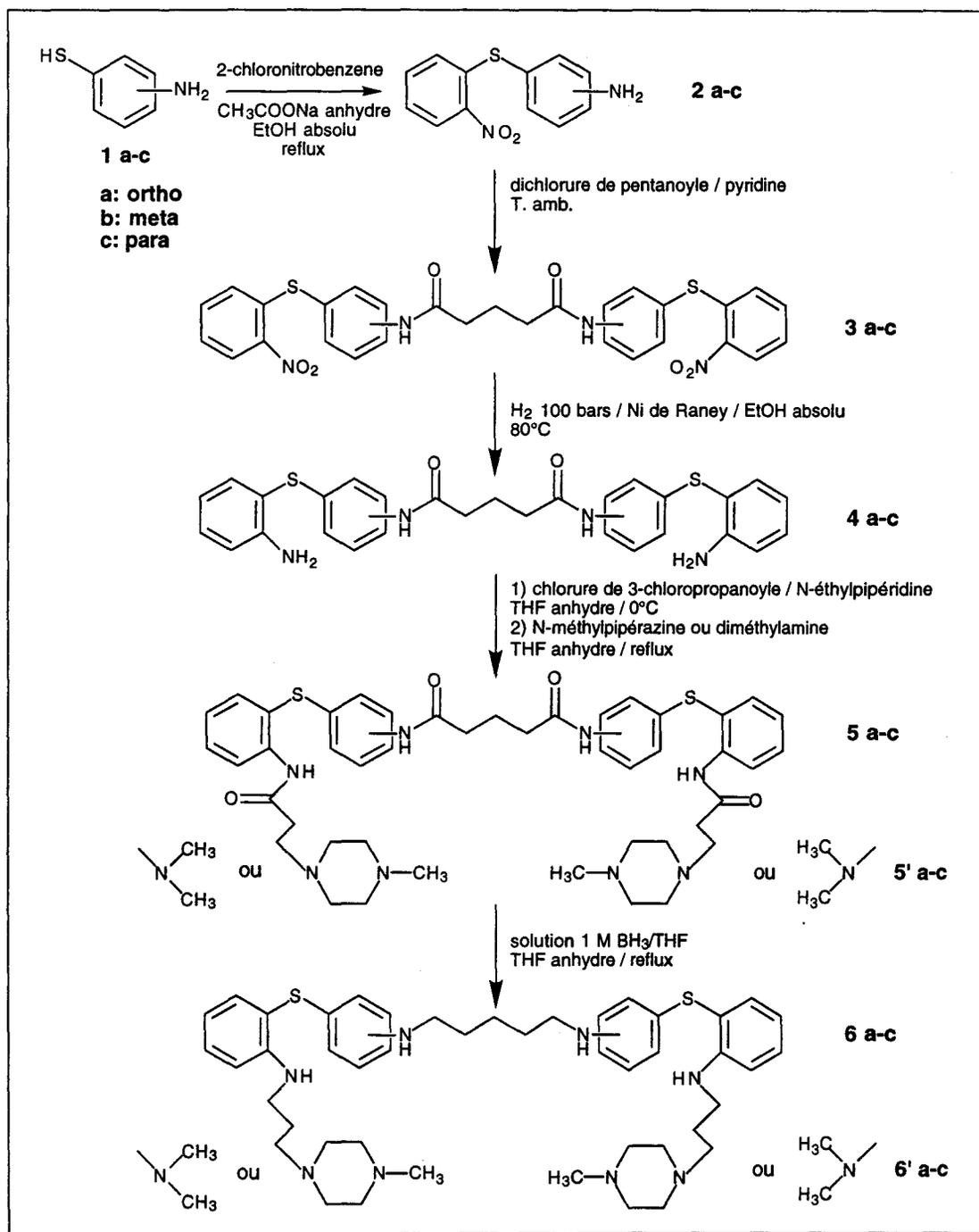
schéma 13. Mécanisme de réduction des amides par BH_3

6. Schéma de synthèse des 2-aminodiphénylsulfures substitués par deux chaînes latérales aminées

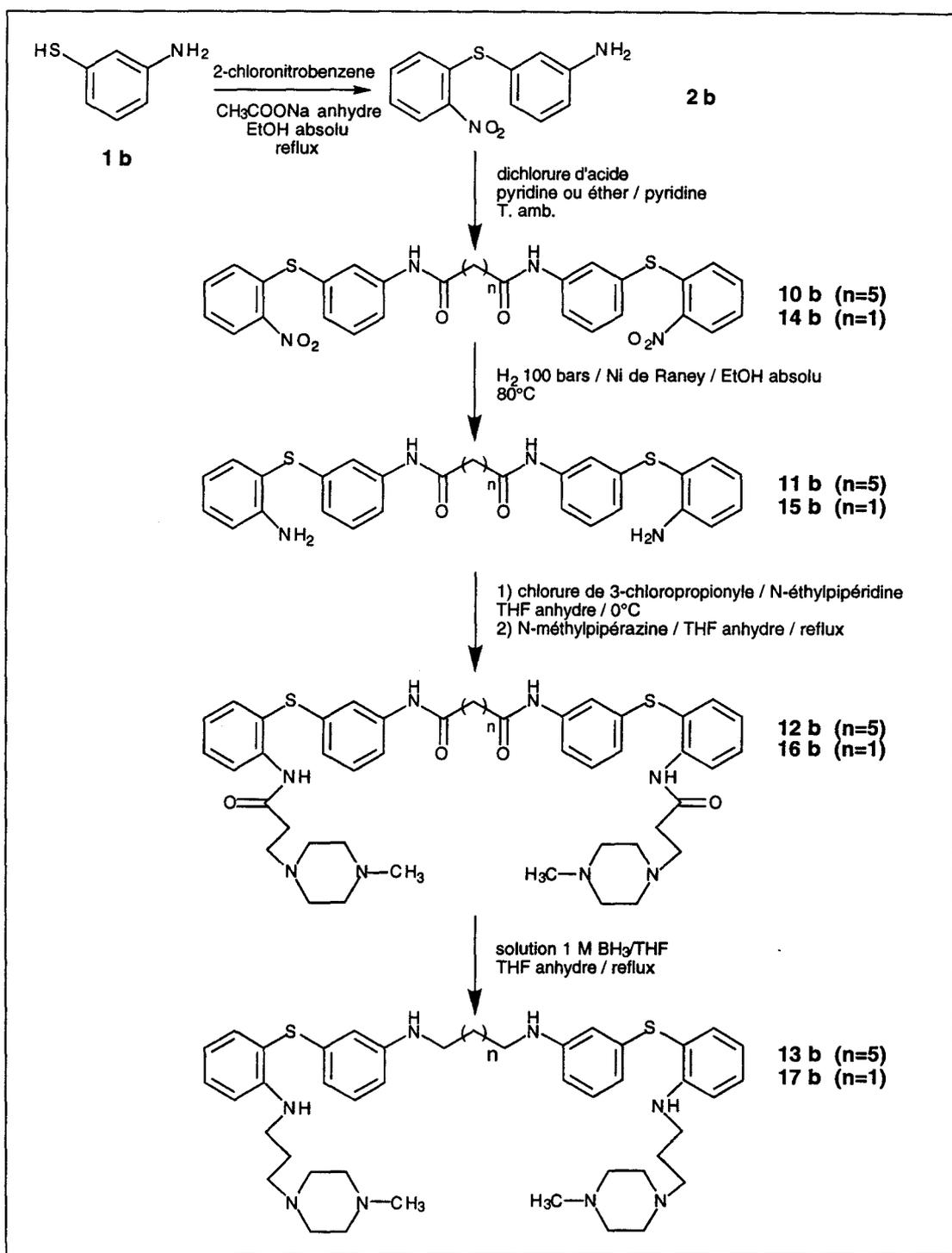


7. Schémas de synthèse des bis(2-aminodiphénylsulfures)

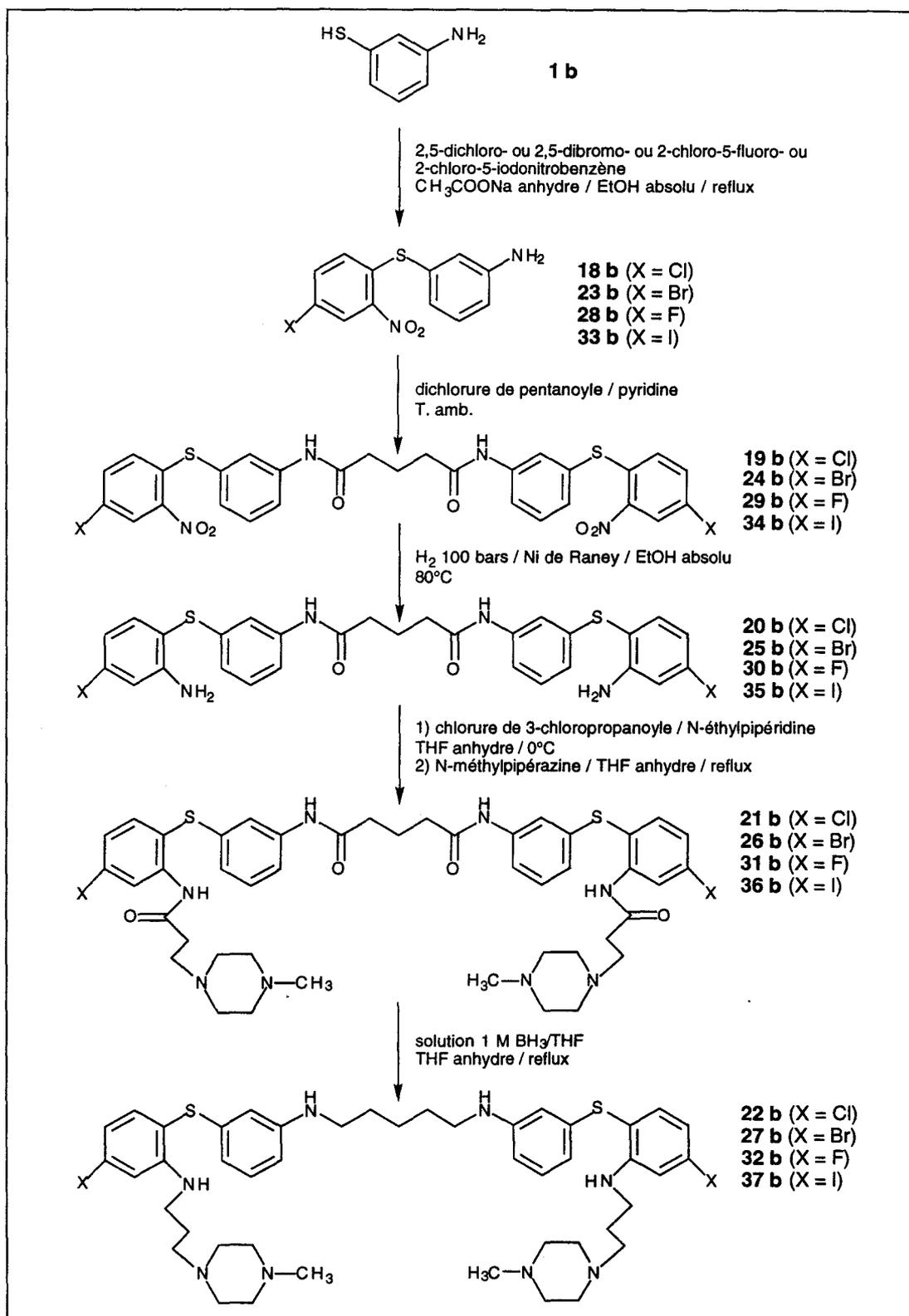
7.1. Variation de l'orientation du bras espaceur et de l'amine en bout de chaîne latérale (diméthylamine ou *N*-méthylpipérazine)



7.2. Variation de la longueur du bras espaceur (en position *mé*ta)



7.3. Variation de l'atome d'halogène (bras espaceur à 5 atomes de carbone et en position *mé*ta)



7.4. Variation de l'amine en bout de chaîne latérale : diéthylènetriamine ou 1,4-diaminobutane (bras espaceur à 5 atomes de carbone et en position *mé*ta)

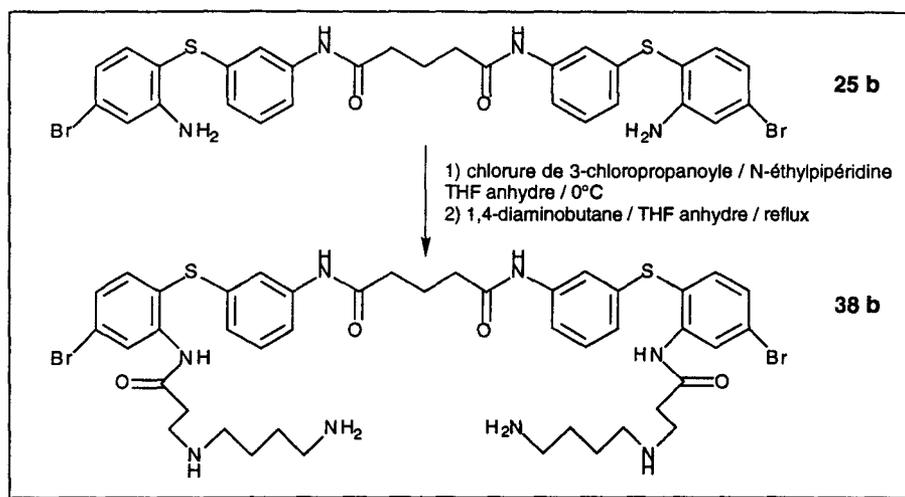


schéma 14. 1,4-Diaminobutane en position terminale

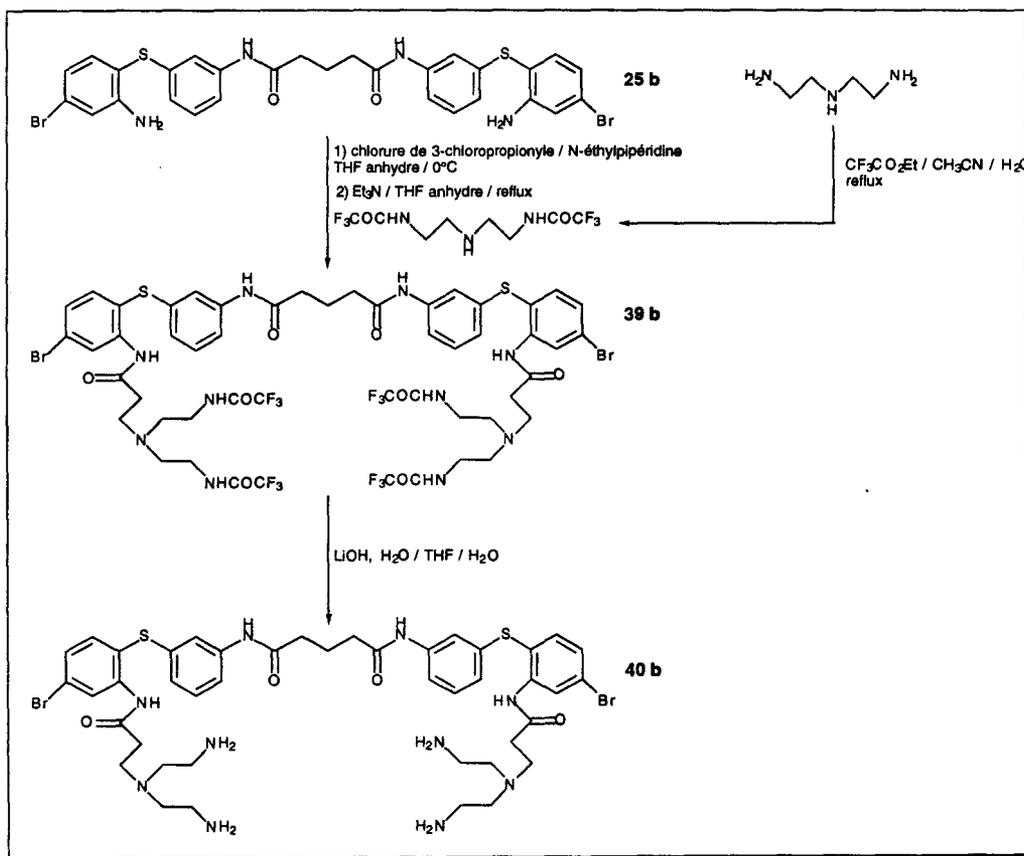


schéma 15. Diéthylènetriamine en position terminale

II. Résultats enzymatiques et Discussion

Nous avons mesuré les IC_{50} de notre série de composés, pour la trypanothion réductase, dans le but de déterminer les caractéristiques structurales optimales pour la conception d'inhibiteurs de la TR.

La concentration inhibitrice 50 ou IC_{50} est une constante couramment utilisée pour exprimer le pouvoir inhibiteur d'une molécule, ceci quel que soit le type d'inhibition. Elle correspond à la valeur de la concentration en inhibiteur qui est nécessaire pour réduire de 50% l'activité de l'enzyme considérée. Cette valeur dépend des conditions expérimentales utilisées, en particulier des concentrations en enzyme et en substrat. Elle permet néanmoins de faire des comparaisons entre plusieurs inhibiteurs dans un système donné.

Pour notre série de composés, les mesures des IC_{50} ont été faites en présence d'une concentration en substrat $T(S)_2$ de 57 μM (correspondant au K_m du substrat pour l'enzyme). Le composé pris comme référence est la clomipramine qui présente une IC_{50} de 12 μM .

En nous basant sur les IC_{50} de notre première série de composés, nous avons pu tirer des conclusions quant aux caractéristiques structurales permettant d'optimiser l'activité inhibitrice vis-à-vis la TR.

En plus des tests spectrophotométriques réalisés au laboratoire, la Société Janssen Pharmaceutic a réalisé les tests suivants :

- tests sur la TR de *Trypanosoma cruzi* et la GR humaine, pour déterminer la spécificité des composés,
- tests *in vitro* sur différents parasites : *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. infantum*,
- mesure de la cytotoxicité,
- tests *in vivo* sur des souris infectées.

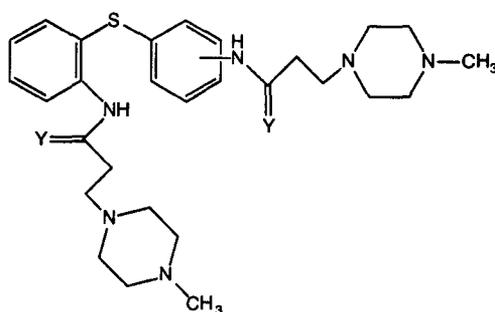
Dans le cas des tests sur la TR, les tableaux présentent l'activité TR résiduelle sous la forme de pourcentages. Plus ce pourcentage est faible, meilleure est l'inhibition.

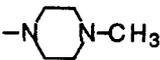
1. 2-Aminodiphénylsulfures à deux chaînes latérales aminées

1.1. Tests spectrophotométriques

1.1.1. Résultats

Le tableau de résultats suivant présente les IC_{50} pour les composés non réduits et réduits.



| Molécule | Orientation | Y | - R | IC_{50} (μM) |
|----------|--------------|----|--|-----------------------|
| 8a | <i>ortho</i> | O | }  | > 60 |
| 8b | <i>mé</i> ta | O | | > 60 |
| 8c | <i>para</i> | O | | > 60 |
| 9a | <i>ortho</i> | 2H | | > 60 |
| 9b | <i>mé</i> ta | 2H | | > 60 |
| 9c | <i>para</i> | 2H | | > 60 |

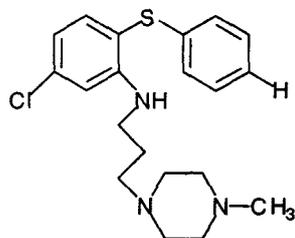
$[T(S)_2] = 57 \mu M$

1.1.2. Discussion : Importance de la structure dimérique

Des calculs de dynamique moléculaire ont permis de prédire la position et la conformation du composé **1** dans le site actif de la TR (voir premier chapitre, & 1.2.2.).

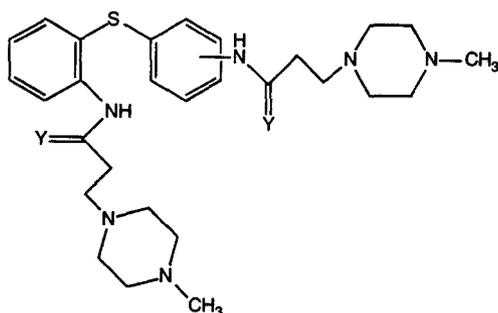
Ce composé engage des liaisons ioniques entre les sites ammoniums de sa chaîne

latérale aminée et des extrémités carboxylates des résidus glutamiques 466' et 467' du site actif de la TR.



composé 1

Contrairement au site actif de la GR, il existe des résidus carboxylates supplémentaires dans le site actif de la TR : Glu₁₈ ou proches du site actif : Asp₁₁₆, Asp₃₄₇ ou Glu₁₁₈. Il paraissait donc intéressant d'augmenter le nombre de chaînes aminées portées par la partie aromatique de l'inhibiteur, d'où la synthèse de 2-aminodiphénylsulfures possédant deux chaînes latérales aminées.



Quelle que soit l'orientation relative des deux chaînes latérales et la nature de la fonction $R_1NHC(Y)R_2$ (amide ou amine), les composés synthétisés présentent des IC_{50} supérieures à 60 μM .

L'accroissement du nombre de chaînes latérales aminées portées par une seule entité 2-aminodiphénylsulfure, pouvant engendrer des liaisons ioniques avec des résidus acides du site actif de la TR, n'est donc pas un élément suffisant pour améliorer l'activité inhibitrice sur la TR des 2-aminodiphénylsulfures.

1.2. Tests Janssen

1.2.1. Résultats

| Produit | Modèle | Activité <i>in vitro</i> (µM) | | | | | | Criblage TR (%) | | | Activité <i>in vivo</i> | |
|-----------|-------------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|-----------------|-------|-------|-------------------------|-------|
| | | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 | 1 E-5 | 3 E-6 | 1 E-6 | 40mpk | 20mpk |
| 8a | <i>T.brucei</i> | | | 0 | 0 | 0 | | 93 | 100 | 100 | | |
| | <i>T.cruzi</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 8 | 0 | 16 | 0 | | | | | | |
| 8b | <i>T.brucei</i> | | | 0 | 0 | 0 | | 100 | 100 | 100 | 7.7.7 | |
| | <i>T.cruzi</i> | 40 | | 0 | | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 8c | <i>T.brucei</i> | | | 0 | 0 | 0 | | 100 | 100 | 100 | | |
| | <i>T.cruzi</i> | 40 | | 0 | | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 4 | 0 | 12 | | | | | | |
| 9a | <i>T.brucei</i> | | | 100 | 100 | 90 | | 100 | 99 | 100 | 7.7.7 | |
| | <i>T.cruzi</i> | T | | T | | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | T | | T | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 57 | 72 | 75 | 0 | 0 | | | | | | |
| 9b | <i>T.brucei</i> | | | 100 | 100 | 100 | | 100 | 99 | 97 | | |
| | <i>T.cruzi</i> | T | | T | | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | T | | T | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 81 | 57 | 83 | 59 | 0 | | | | | | |
| 9c | <i>T.brucei</i> | | | 100 | 100 | 100 | | 100 | 100 | 100 | 7.7 | |
| | <i>T.cruzi</i> | T | | T | | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | T | | T | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 48 | 62 | 43 | 78 | 0 | | | | | | |

1.2.2. Discussion

Tous les dérivés de 2-aminodiphénylesulfures sont inactifs sur la GR.

Dans le cas des composés non réduits, l'absence d'activité sur la TR est confirmée. Une légère activité *in vitro* sur *T. cruzi* est décelée (40 % à 12.5 µM) pour les composés **8b** et **8c**, ainsi qu'une faible cytotoxicité. Les tests réalisés *in vivo* pour les composés **8b**, **9a** et **9c** montrent l'absence totale d'activité.

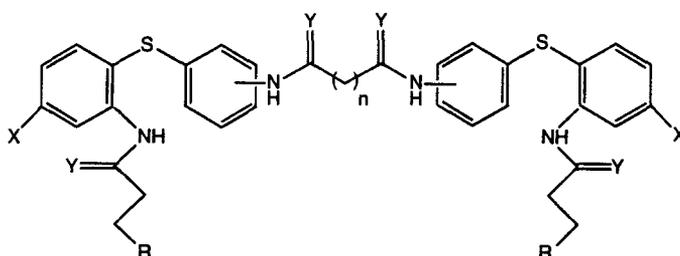
Tous les composés réduits présentent une cytotoxicité importante interdisant toute conclusion quant à leur action, *in vitro*, sur les parasites.

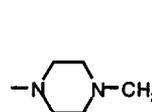
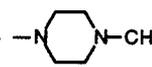
2. Bis(2-aminodiphénylsulfures)

2.1. Tests spectrophotométriques

2.1.1. Résultats

Le tableau de résultats suivant présente les IC_{50} mesurées pour les composés non réduits (Y : O).

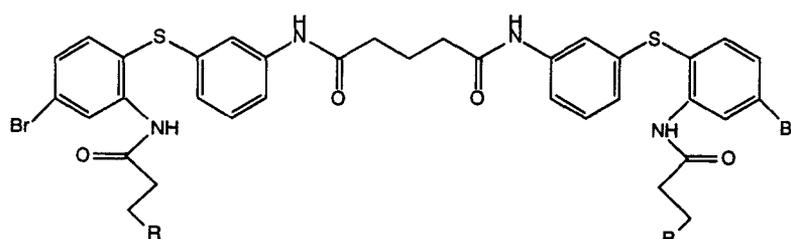


| Molécule | n | Orientation | X | - R | IC_{50} (μ M) |
|----------|---|--------------|----|--|----------------------|
| 5a | 3 | <i>ortho</i> | H | }  | 60 |
| 5b | 3 | <i>mé</i> ta | H | | 1.8 |
| 5c | 3 | <i>para</i> | H | | 2.5 |
| 5'a | 3 | <i>ortho</i> | H | }  | > 60 |
| 5'b | 3 | <i>mé</i> ta | H | | 23 |
| 5'c | 3 | <i>para</i> | H | | > 60 |
| 12b | 5 | <i>mé</i> ta | H | }  | 7 |
| 16b | 1 | <i>mé</i> ta | H | | > 60 |
| 21b | 3 | <i>mé</i> ta | Cl | | 0.8 |
| 26b | 3 | <i>mé</i> ta | Br | | 0.55 |
| 31b | 3 | <i>mé</i> ta | F | | 0.67 |
| 36b | 3 | <i>mé</i> ta | I | | 0.5 |

$[T(S)_2] = 57 \mu$ M

Dans le cas de notre famille de bis(2-aminodiphénylsulfures), les composés réduits (Y : 2H) ont tous posé des problèmes de solubilité dans les conditions du test (voir partie expérimentale) : ils précipitent dans le tampon enzymatique à 14.25 μM (2% en DMSO). Les IC_{50} obtenues pour ces molécules ne sont donc absolument pas fiables et ne sont pas présentées.

Deux amines supplémentaires ont été greffées en bout de chaîne latérale : le 1,4-diaminobutane et la diéthylènetriamine.



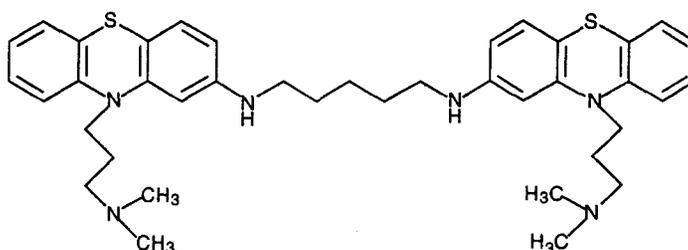
| Molécule | - R | IC_{50} (μM) |
|----------|-----|------------------------------------|
| 38b | | 0.35 |
| 40b | | 0.9 |

$[\text{T}(\text{S})_2] = 57 \mu\text{M}$

2.1.2. Discussion

2.1.2.1. Orientation du bras espaceur

Les noyaux aromatiques des phénothiazines sont plans. Cette caractéristique structurale impose une certaine position du bras espaceur vis-à-vis des chaînes latérales dans le cas des bis phénothiazines tels que le composé **3**.



composé 3

Par contre, les deux noyaux aromatiques d'un groupement diphénylsulfure non substitué sont perpendiculaires, en l'absence de toute contrainte. Nous ne pouvons donc prédire l'orientation du bras espaceur vis-à-vis de la chaîne latérale permettant de mimer la structure du composé 3 et/ou d'obtenir la meilleure activité inhibitrice sur la TR.

De plus, par analogie avec le composé 3, les premières molécules synthétisées possédaient un bras espaceur constitué de cinq atomes de carbone ($n = 3$). La longueur optimale de ce dernier a été déterminée ultérieurement.

Les résultats enzymatiques obtenus étaient prometteurs avec des IC_{50} de l'ordre de la micromole.

Les bis(2-aminodiphénylsulfures) possédant deux chaînes latérales aminées se sont révélés être de bien meilleurs inhibiteurs de la TR que les 2-aminodiphénylsulfures possédant deux chaînes latérales aminées (IC_{50} d'environ $2 \mu\text{M}$ pour les meilleurs bis(2-aminodiphénylsulfures) par rapport à des IC_{50} supérieures à $60 \mu\text{M}$ dans le cas des 2-aminodiphénylsulfures). Ce résultat montre l'intérêt de la présence de deux parties hydrophobes pour optimiser l'activité des inhibiteurs de la TR de la famille des 2-aminodiphénylsulfures.

La meilleure orientation pour le bras espaceur sur le deuxième noyau aromatique du groupement diphénylsulfure est en *méta* de l'atome de soufre. En effet, dans le cas de la *N*-méthylpiperazine, les résultats sont les suivants :

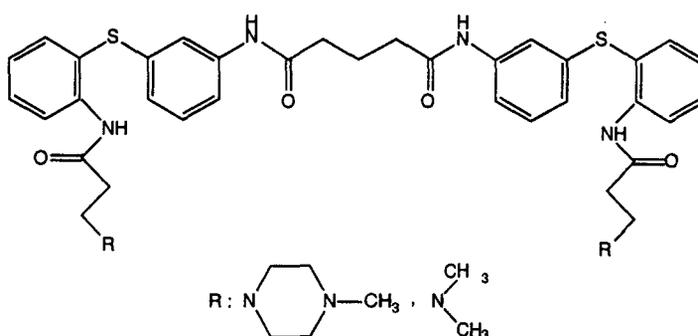
- l'orientation en *méta* donne une IC_{50} de $1.8 \mu\text{M}$,

- l'orientation en *para* donne une IC_{50} de 2.5 μM ,
- l'orientation en *ortho* donne une IC_{50} de 60 μM .

Dans le cas de la diméthylamine, les résultats sont les suivants :

- l'orientation en *mé*ta donne une IC_{50} de 23 μM ,
- l'orientation en *para* donne une IC_{50} supérieure à 60 μM ,
- l'orientation en *ortho* donne une IC_{50} supérieure à 60 μM .

En ce qui concerne l'orientation du bras espaceur, le meilleur inhibiteur est donc le composé suivant :



2.1.2.2. Amine en bout de chaîne latérale : diméthylamine ou *N*-méthylpipérazine

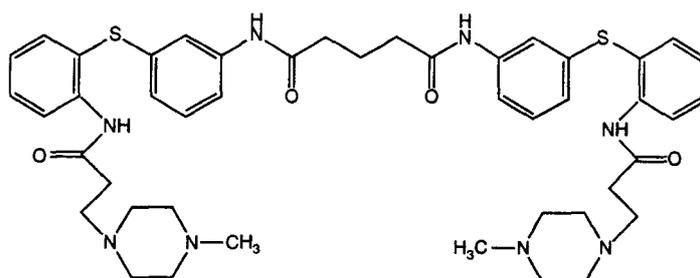
La première étude de l'amine en bout de chaîne latérale a été réalisée simultanément à l'étude de l'orientation du bras espaceur.

La diméthylamine a été sélectionnée par analogie avec le composé **3** et la *N*-méthylpipérazine par analogie avec le composé **1**.

Quelle que soit l'orientation du bras espaceur, la ***N*-méthylpipérazine** donne de bien meilleurs résultats que la diméthylamine :

- orientation en *ortho* : IC_{50} respectivement = 60 μM et > 60 μM ,
- orientation en *mé*ta : IC_{50} respectivement = 1.8 μM et = 23 μM ,
- orientation en *para* : IC_{50} respectivement = 2.5 μM et > 60 μM .

En ce qui concerne l'orientation du bras espaceur et la diméthylamine ou la *N*-méthylpipérazine en position terminale de la chaîne latérale, le meilleur inhibiteur est donc le composé **5b** suivant :



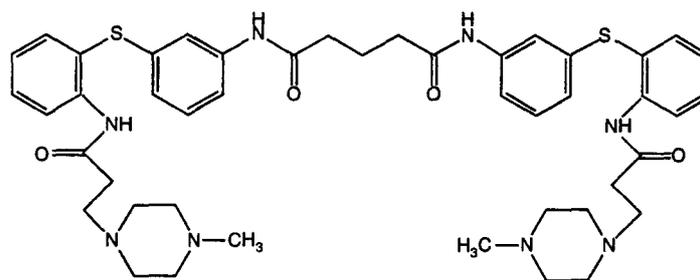
composé **5b** ($IC_{50} = 1.8 \mu M$)

2.1.2.3. Longueur du bras espaceur

Trois longueurs ont été choisies pour le bras espaceur : trois, cinq ou sept atomes de carbone (respectivement, $n = 1, 3$ ou 5).

La chaîne centrale à 5 atomes de carbone ($n = 3$, $IC_{50} = 1.8 \mu M$) donne une meilleure inhibition que la chaîne à sept atomes de carbone ($n = 5$, $IC_{50} = 7 \mu M$) et bien meilleure que la chaîne à trois atomes de carbone ($n = 1$, $IC_{50} > 60 \mu M$).

En ce qui concerne l'orientation, la longueur du bras espaceur et la diméthylamine ou la *N*-méthylpipérazine en position terminale de la chaîne latérale, le meilleur inhibiteur est donc le composé suivant :



composé **5b** ($IC_{50} = 1.8 \mu M$)

2.1.2.4. Atome d'halogène en *para* de l'atome de soufre

Dans le cas des 2-aminodiphénylsulfures, les composés présentant un atome de chlore en *para* de l'atome de soufre et en *méta* de la chaîne latérale aminée donnent une meilleure inhibition que les composés non chlorés. Nous avons donc décidé de synthétiser les bis(2-aminodiphénylsulfures) présentant un atome d'halogène (chlore, brome, fluor ou iode) en *para* de l'atome de soufre et en *méta* de la chaîne latérale aminée.

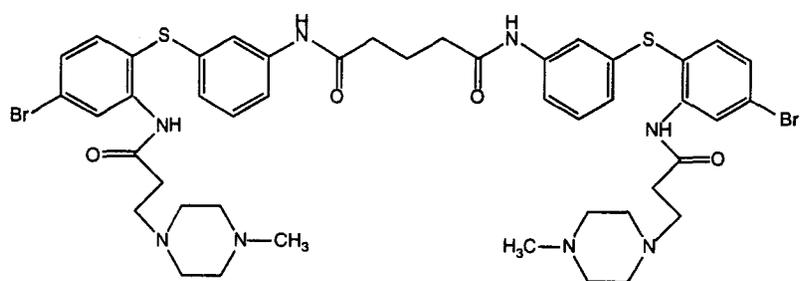
Quel que soit l'atome d'halogène, le pouvoir inhibiteur du bis(2-aminodiphénylsulfure) est meilleur que dans le cas du composé 5b. Nous avons amélioré le pouvoir inhibiteur d'un facteur trois environ ($IC_{50} = 1.8 \mu\text{M}$ en l'absence d'atome d'halogène). En effet, les résultats sont les suivants :

- $IC_{50} = 800 \text{ nM}$ pour le composé chloré,
- $IC_{50} = 550 \text{ nM}$ pour le composé bromé,
- $IC_{50} = 670 \text{ nM}$ pour le composé fluoré,
- $IC_{50} = 500 \text{ nM}$ pour le composé iodé.

Les ordres de grandeur des IC_{50} étant similaires quel que soit l'atome d'halogène, il est impossible de déduire l'influence réelle de la variation de la nature de l'atome d'halogène.

Le meilleur résultat est obtenu avec le composé iodé ($IC_{50} = 500 \text{ nM}$), l'inhibition est légèrement meilleure que celle du composé bromé ($IC_{50} = 550 \text{ nM}$) ; mais, du fait de sa plus grande électropositivité et de sa plus grande taille, l'atome d'iode est un meilleur nucléofuge que l'atome de brome et les risques de réactions dues au départ de l'atome d'iode plus grands.

Pour la suite de notre étude, nous avons donc décidé de nous baser sur le composé **26b** bromé.



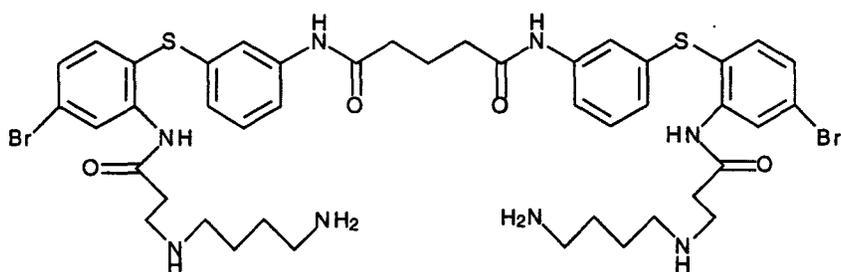
composé **26b** ($IC_{50} = 550 \text{ nM}$)

2.1.2.5. Amine en bout de chaîne latérale : diéthylènetriamine ou 1,4-diaminobutane

Par analogie avec des études réalisées sur les 2-aminodiphénylsulfures, nous avons synthétisé les bis(2-aminodiphénylsulfures) présentant le 1,4-diaminobutane ou la diéthylènetriamine en bout de chaîne latérale.

Le meilleur résultat est obtenu avec la diéthylènetriamine avec une IC_{50} de 350 nM. Un facteur d'environ 1.5 a été ainsi gagné par rapport au composé correspondant présentant la *N*-méthylpiperazine en bout de chaîne latérale.

En ce qui concerne l'orientation, la longueur du bras espaceur l'amine en position terminale de la chaîne latérale et l'atome d'halogène en *para* de l'atome de soufre, le meilleur inhibiteur est donc le composé suivant :



composé **38b** ($IC_{50} = 350 \text{ nM}$)

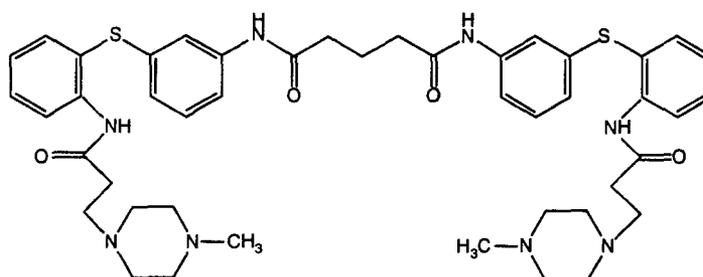
2.2. Tests Janssen

2.2.1. Composés non halogénés, non réduits, possédant un bras espaceur à cinq atomes de carbone

| Produit | Modèle | Activité <i>in vitro</i> (µM) | | | | | | Criblage TR (%) | | | Activité <i>in vivo</i> | |
|------------|-------------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|-----------------|-------|-------|-------------------------|-------|
| | | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 | 1 E-5 | 3 E-6 | 1 E-6 | 40mpk | 20mpk |
| 5a | <i>T.brucei</i> | | | 0 | 0 | 0 | | 100 | 100 | 100 | | |
| | <i>T.cruzi</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 7 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | | | | | |
| 5b | <i>T.brucei</i> | | | 0 | 0 | 0 | | 67 | 80 | 91 | | |
| | <i>T.cruzi</i> | 40 | | 0 | | | | 47 | 75 | 90 | | |
| | <i>L.infantum</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 5c | <i>T.brucei</i> | | | 0 | 0 | 0 | | 66 | 84 | 100 | | |
| | <i>T.cruzi</i> | 0 | | 0 | | | | 50 | 79 | 94 | | |
| | <i>L.infantum</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 5'a | <i>T.brucei</i> | | | 100 | 100 | 0 | | 100 | 100 | 99 | | |
| | <i>T.cruzi</i> | T | | 0 | | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | T | | 0 | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 100 | 100 | 99 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 5'b | <i>T.brucei</i> | | | 0 | 0 | 0 | | 100 | 100 | 100 | | |
| | <i>T.cruzi</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 5'c | <i>T.brucei</i> | | | 0 | 0 | 0 | | 90 | 100 | 100 | | |
| | <i>T.cruzi</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |

Tous ces composés sont inactifs sur la GR.

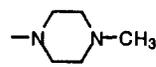
Une faible activité TR a été mesurée pour les composés **5b** et **5c**. De plus, le composé **5b** présente une faible activité *in vitro* sur *T. cruzi*. Les autres composés sont inactifs sur la TR et, *in vitro*, sur les trois parasites. Seul le composé **5'a** est cytotoxique.



composé **5b**

2.2.2. Composés non halogénés, réduits, possédant un bras espaceur à cinq atomes de carbone

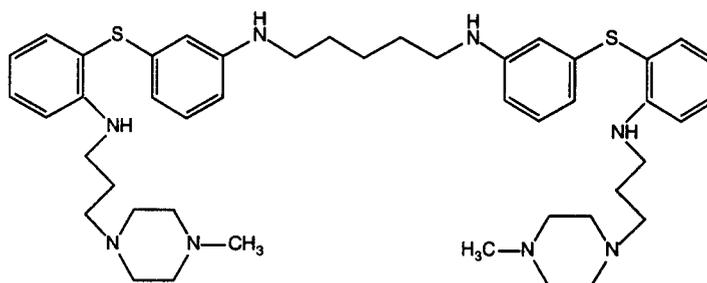
Les structures des composés réduits, non testés sur la TR pour des raisons d'insolubilité dans le tampon enzymatique, sont les suivantes :

| Molécule | n | Orientation | X | Y | - R |
|------------|---|--------------|---|----|---|
| 6a | 3 | <i>ortho</i> | H | 2H |  |
| 6b | 3 | <i>méta</i> | H | 2H | |
| 6c | 3 | <i>para</i> | H | 2H | |
| 6'a | 3 | <i>ortho</i> | H | 2H |  |
| 6'b | 3 | <i>méta</i> | H | 2H | |
| 6'c | 3 | <i>para</i> | H | 2H | |

| Produit | Modèle | Activité <i>in vitro</i> (µM) | | | | | | Criblage TR (%) | | | Activité <i>in vivo</i> | |
|------------|------------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|-----------------|-------|-------|-------------------------|-------|
| | | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 | 1 E-5 | 3 E-6 | 1 E-6 | 40mpk | 20mpk |
| 6a | <i>T.brucei</i> | | | 100 | 100 | 0 | | 100 | 100 | 92 | 2.7.8 | |
| | <i>T.cruzi</i> | T | | 0 | | | | | | | | |
| | <i>Linfantum</i> | T | | 0 | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 3 | | | | | |
| 6b | <i>T.brucei</i> | | | 0 | 0 | 0 | | 68 | 100 | 100 | 7.7.7 | |
| | <i>T.cruzi</i> | T | | 0 | | | | 36 | 73 | 96 | | |
| | <i>Linfantum</i> | T | | 0 | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 6c | <i>T.brucei</i> | | | 0 | 0 | 0 | | 100 | 100 | 100 | | |
| | <i>T.cruzi</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | <i>Linfantum</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 6'a | <i>T.brucei</i> | | | 100 | 0 | 0 | | 100 | 100 | 99 | | |
| | <i>T.cruzi</i> | T | | 0 | | | | | | | | |
| | <i>Linfantum</i> | T | | 0 | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | | | | | |
| 6'b | <i>T.brucei</i> | | | 0 | 0 | 0 | | 100 | 100 | 100 | | |
| | <i>T.cruzi</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | <i>Linfantum</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 6'c | <i>T.brucei</i> | | | 0 | 0 | 0 | | 100 | 97 | 100 | | |
| | <i>T.cruzi</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | <i>Linfantum</i> | 0 | | 0 | | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |

Tous ces composés sont inactifs sur la GR.

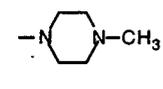
Seul le composé **6b** est faiblement actif sur la TR, mais il est inactif sur *T. cruzi*. Les autres composés sont inactifs sur la TR et, *in vitro*, sur les trois parasites. Aucun de ces composés n'est cytotoxique.



composé **6b**

2.2.3. Composés non halogénés, réduits ou non, possédant un bras espaceur à sept ou trois atomes de carbone

Les structures des composés réduits, non testés sur la TR pour des raisons d'insolubilité dans le tampon enzymatique, sont les suivantes :

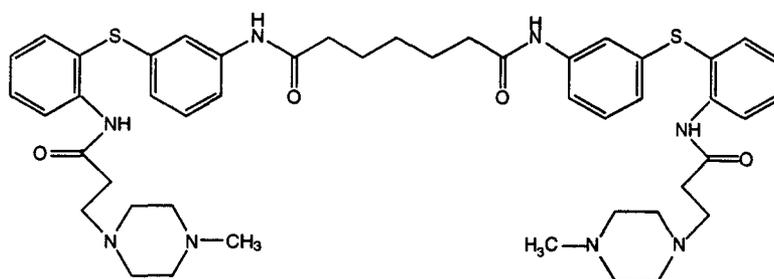
| Molécule | n | Orientation | X | Y | - R |
|------------|---|-------------|---|----|---|
| 13b | 5 | <i>méta</i> | H | 2H | }  |
| 17b | 1 | <i>méta</i> | H | 2H | |

| Produit | Modèle | Activité <i>in vitro</i> (μM) | | | | | | Criblage TR (%) | | | Activité <i>in vivo</i> | |
|------------|-------------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|-----------------|-------|-------|-------------------------|-------|
| | | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 | 1 E-5 | 3 E-6 | 1 E-6 | 40mpk | 20mpk |
| 12b | <i>T.brucei</i> | | | 0 | 0 | 0 | | 77 | | | | |
| | <i>T.cruzi</i> | | 60 | | 0 | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | | 0 | | 0 | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 16b | <i>T.brucei</i> | | | 100 | 100 | 0 | | 100 | | | | |
| | <i>T.cruzi</i> | | 0 | | 0 | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | | 0 | | 0 | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |

| Produit | Modèle | Activité <i>in vitro</i> (µM) | | | | | | Criblage TR (%) | | | Activité <i>in vivo</i> | |
|------------|-------------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|-----------------|-------|------|-------------------------|-------|
| | | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 | 1 E-5 | 3 E-6 | 1E-6 | 40mpk | 20mpk |
| 13b | <i>T.brucei</i> | | | 0 | 0 | 0 | | 73 | | | | |
| | <i>T.cruzi</i> | | T | | T | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | | T | | T | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 100 | 100 | 100 | 100 | | | | | | | |
| 17b | <i>T.brucei</i> | | | 100 | 89 | 0 | | 100 | | | | |
| | <i>T.cruzi</i> | | T | | 60 | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | | T | | 0 | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |

Tous ces composés sont inactifs sur la GR.

Les composés **12b** et **13b** sont faiblement actifs sur la TR, mais le composé **13b** est cytotoxique. Le composé **12b** est également faiblement actif, *in vitro*, sur *T. cruzi*.



composé **12b**

Les composés possédant un bras espaceur à trois carbones (n = 1) sont inactifs sur la TR et sur *T. cruzi*, mais faiblement actifs sur *T. brucei*.

2.2.4. Composés halogénés, non réduits, possédant un bras espaceur à cinq atomes de carbone

| Produit | Modèle | Activité <i>in vitro</i> (µM) | | | | | | Criblage TR (%) | | | Activité <i>in vivo</i> | |
|------------|-------------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|-----------------|-------|-------|-------------------------|-------|
| | | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 | 1 E-5 | 3 E-6 | 1 E-6 | 40mpk | 20mpk |
| 21b | <i>T.brucei</i> | | | 100 | 100 | 98 | | 23 | | | 7.7.7 | |
| | <i>T.cruzi</i> | T | T | 40 | 0 | 0 | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | T | T | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| | cytotoxicité | 93 | 98 | 100 | 27 | | | | | | | |
| 26b | <i>T.brucei</i> | | | 87 | 89 | 67 | | 88 | | | 7.7.7 | |
| | <i>T.cruzi</i> | T | T | 0 | 0 | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | T | T | 0 | 0 | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 99 | 100 | 14 | 41 | | | | | | | |

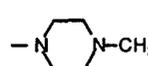
| Produit | Modèle | Activité <i>in vitro</i> (µM) | | | | | | Criblage TR (%) | | | Activité <i>in vivo</i> | |
|------------|-------------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|-----------------|-------|-------|-------------------------|-------|
| | | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 | 1 E-5 | 3 E-6 | 1 E-6 | 40mpk | 20mpk |
| 31b | <i>T.brucei</i> | | | 93 | 81 | 0 | | 88 | | | | |
| | <i>T.cruzi</i> | | 40 | | 0 | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | | 0 | | 0 | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 93 | 83 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 36b | <i>T.brucei</i> | | | 8 | 0 | 0 | | 88 | | | | |
| | <i>T.cruzi</i> | | 40 | | 0 | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | | 0 | | 0 | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 100 | 100 | 0 | 0 | | | | | | | |

Tous ces composés sont inactifs sur la GR.

Une faible activité TR a été mesurée, en particulier en ce qui concerne le composé chloré. Mais, tous ces composés sont cytotoxiques. On ne peut donc rien en déduire quant à leur activité, *in vitro*, sur les parasites. Les composés chlorés et bromés sont inactifs *in vivo* sur les souris.

2.2.5. Composés non halogénés, réduits, possédant un bras espaceur à cinq atomes de carbone

Les structures des composés réduits, non testés sur la TR pour des raisons d'insolubilité dans le tampon enzymatique, sont les suivantes :

| Molécule | n | Orientation | X | Y | - R |
|------------|---|-------------|----|----|---|
| 22b | 3 | <i>méta</i> | Cl | 2H |  |
| 27b | 3 | <i>méta</i> | Br | 2H | |
| 32b | 3 | <i>méta</i> | F | 2H | |
| 37b | 3 | <i>méta</i> | I | 2H | |

| Produit | Modèle | Activité <i>in vitro</i> (µM) | | | | | | Criblage TR (%) | | | Activité <i>in vivo</i> | |
|------------|-------------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|-----------------|-------|-------|-------------------------|-------|
| | | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 | 1 E-5 | 3 E-6 | 1 E-6 | 40mpk | 20mpk |
| 22b | <i>T.brucei</i> | | | 98 | 76 | 50 | | 70 | | | 7.7.7 | |
| | <i>T.cruzi</i> | T | T | T | 0 | 0 | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | T | T | T | 80 | 40 | | | | | | |
| | cytotoxicité | 98 | 100 | 8 | 26 | | | | | | | |
| 27b | <i>T.brucei</i> | | | 94 | 53 | 57 | | 33 | | | 7.7.7 | |
| | <i>T.cruzi</i> | T | T | T | 0 | 0 | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | T | T | T | 40 | 0 | | | | | | |
| | cytotoxicité | 96 | 100 | 27 | 22 | | | | | | | |
| 32b | <i>T.brucei</i> | | | 90 | 87 | 0 | | 100 | | | | |
| | <i>T.cruzi</i> | | T | | 0 | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | | T | | 0 | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 100 | 100 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 37b | <i>T.brucei</i> | | | 98 | 83 | 0 | | 100 | | | | |
| | <i>T.cruzi</i> | | T | | 0 | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | | T | | 0 | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 100 | 100 | 31 | 9 | | | | | | | |

Tous ces composés sont inactifs sur la GR.

Une faible activité TR a été mesurée pour les composés bromé et chloré. Mais, tous ces composés sont cytotoxiques. On ne peut donc rien en déduire quant à leur activité, *in vitro*, sur les parasites. Les composés chlorés et bromés sont inactifs *in vivo* sur les souris.

2.2.6. Composés halogénés, non réduits, possédant un bras espaceur à cinq atomes de carbone et présentant la 1,4-diaminobutane ou la diéthylènetriamine en bout de chaîne latérale

| Produit | Modèle | Activité <i>in vitro</i> (µM) | | | | | | Criblage TR (%) | | | Activité <i>in vivo</i> | |
|------------|-------------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|-----------------|-------|-------|-------------------------|-------|
| | | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 | 1 E-5 | 3 E-6 | 1 E-6 | 40mpk | 20mpk |
| 38b | <i>T.brucei</i> | | | 84 | 0 | 0 | | 57 | | | | |
| | <i>T.cruzi</i> | | 0 | | 0 | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | | 0 | | 0 | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |
| 40b | <i>T.brucei</i> | | | 0 | 0 | 0 | | 86 | | | | |
| | <i>T.cruzi</i> | | 0 | | 0 | | | | | | | |
| | <i>L.infantum</i> | | 0 | | 0 | | | | | | | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |

Tous ces composés sont inactifs sur la GR. De plus, tous ces composés sont inactifs *in vitro* sur *T. cruzi*.

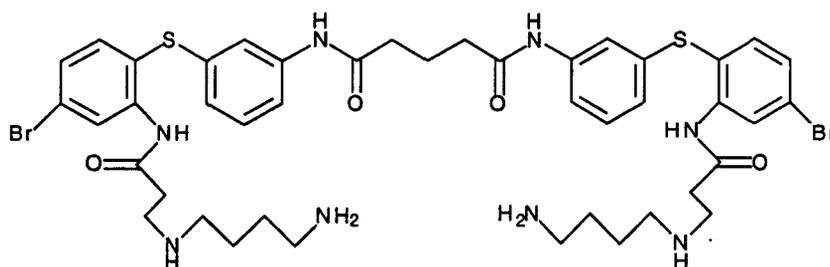
Conclusion

Deux générations de composés ont été synthétisées : une première constituée de 2-aminodiphénylsulfures portant deux chaînes latérales aminées et une deuxième constituée de bis 2-aminodiphénylsulfures portant deux chaînes latérales aminées.

Différentes variations structurales ont été étudiées et ont permis de déduire les critères structuraux permettant d'optimiser l'activité inhibitrice de cette famille de molécules sur la trypanothion réductase :

- importance de la présence de deux parties hydrophobes séparées par un bras espaceur,
- orientation optimale en *mé*ta et longueur optimale de cinq atomes de carbone pour le bras espaceur,
- importance de l'atome d'halogène, quel qu'il soit, en *para* de l'atome de soufre et en *mé*ta de la chaîne latérale aminée,
- 1,4-diaminobutane comme amine optimale en position terminale sur la chaîne latérale.

Ainsi, le composé **38b** s'est révélé être le meilleur inhibiteur de la trypanothion réductase synthétisé à ce jour avec une IC_{50} de **350 nM**.



composé **38b** (IC_{50} = 350 nM)

Tous les composés synthétisés sont inactifs sur la glutathion réductase. Les dérivés de 2-aminodiphénylsulfures présentant une activité inhibitrice sur la TR sont donc spécifiques de cette enzyme.

Les tests réalisés *in vitro* sur les parasites ne montrent pas de corrélation franche entre les activités TR et les activités, *in vitro*, sur *Trypanosoma cruzi*. Les quelques composés testés *in vivo* sur les souris sont totalement inactifs.

La mesure du K_i a été réalisée pour l'inhibiteur le plus puissant **38b**. La valeur de **700 nM** obtenue n'est pas corrélée avec le K_i de 175 nM, calculé (à l'aide de la formule de Cheng-Prusoff) d'après l' IC_{50} mesurée. Cette différence est due au comportement non classique en solution des inhibiteurs de cette famille des 2-aminodiphénylesulfures. Ce phénomène fait l'objet du troisième chapitre.

Nous avons donc gagné en affinité vis-à-vis du site actif de la trypanothion réductase, avec un **K_i de 700 nM**.

Les courbes donnant les IC_{50} ont été déterminées avec soin et avaient des allures tout à fait correctes. Mais, le comportement particulier des bis(2-aminodiphénylesulfures) en solution nous empêche de corréler, avec précision, les valeurs des IC_{50} et les valeurs des K_i .

Dans la suite de ce travail, nous avons tenté d'optimiser l'affinité sur la trypanothion réductase. De plus, la modélisation moléculaire ne permettant pas de déterminer le rôle exact de la deuxième entité noyau aromatique - chaîne latérale des bis(2-aminodiphénylesulfures), nous avons décidé de synthétiser des dérivés dissymétriques.

Cette étude fait l'objet du quatrième chapitre.

Troisième chapitre

Des inhibiteurs partiellement compétitifs

Un phénomène d'aggrégation à forte concentration

Introduction

Un inhibiteur a un caractère essentiel : sa présence ralentit ou empêche la réaction catalysée par l'enzyme. Selon son mode d'action, il peut ou non être transformé par l'enzyme. Dans ce chapitre, nous parlerons d'inhibiteurs qui ne sont pas transformés par l'enzyme et qui, de plus, ne forment pas de liaisons covalentes avec la protéine. L'inhibition est donc réversible.

Dans notre famille de composés, les bis(2-aminodiphénylsulfures) présentent un comportement particulier en solution. Ce comportement non décelable lors de la mesure des IC_{50} a pu être mis en évidence lors de la mesure des K_i et a fait l'objet d'une étude approfondie de modélisation, réalisée par le Docteur Dragos Horvath au sein de notre laboratoire.

I. Inhibition compétitive, non compétitive ou incompétitive

Il existe deux grands types d'inhibitions en enzymologie : l'inhibition compétitive et l'inhibition non compétitive. Elles se traduisent par des comportements différents au niveau des modèles utilisés pour mesurer les constantes d'inhibition (K_i). L'inhibition incompétitive est un phénomène plus rare.

Un inhibiteur compétitif s'attache à l'enzyme au niveau du même site que le substrat. Un même site ne peut donc recevoir simultanément le substrat et l'inhibiteur. L'association entre enzyme et substrat S engendre un complexe fertile puisqu'il conduit à la formation d'un produit P. Par contre, le complexe fait avec l'inhibiteur I est stérile.

Un inhibiteur non compétitif se fixe en dehors du site actif de l'enzyme selon des modalités très variées. En général, il n'y a pas de relation de forme entre le substrat et l'inhibiteur.

Un inhibiteur incompétitif ne peut se placer dans son site que si le substrat est en place dans le site actif de l'enzyme.

1. Modèle de Michaelis-Menten

Pour la plupart des enzymes, la vitesse de la catalyse varie en fonction de la concentration en substrat. Pour une concentration donnée en enzyme, la courbe représentant la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat [S] est linéaire, lorsque cette dernière est faible. Lorsque [S] est grande, la vitesse de réaction tend vers un maximum V_{\max} indépendant de la concentration en substrat. En 1913, Michaelis et Menten ont proposé un modèle simple pour expliquer les caractéristiques cinétiques.¹³¹

Une enzyme E se combine avec un substrat S pour former un complexe ES, avec une constante de vitesse k_1 . Le complexe ES peut évoluer ensuite de deux manières : il peut se redissocier en E et S avec une constante de vitesse k_{-1} ou évoluer pour former le produit P avec une constante de vitesse k_2 .



La vitesse initiale de la réaction enzymatique est proportionnelle à la concentration en complexe ES :

$$V = k_2 [ES] \quad (1)$$

Lorsqu'on met un grand excès de substrat, la vitesse maximale de réaction est proportionnelle à la quantité d'enzyme E_t présente initialement dans le milieu car on peut considérer que toute l'enzyme est sous forme ES :

$$V_{\max} = k_2 [E_t] \quad (2)$$

La vitesse de formation du complexe ES peut s'écrire sous la forme suivante :

$$d[ES] / dt = k_1 [E] [S]$$

La vitesse de disparition de ce même complexe est donnée par la formule suivante :

$$d[ES] / dt = k_2 [ES] + k_{-1} [E] [S]$$

Dans l'état stationnaire, la concentration en complexe reste constante : les vitesses de disparition et de formation de ES sont identiques. On peut donc écrire :

$$k_1 [E] [S] = k_2 [ES] + k_{-1} [E] [S]$$

$$\text{d'où, } [ES] = k_1 [E] [S] / (k_{-1} + k_2) = [E] [S] / K_m \text{ avec } K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1 \quad (3)$$

K_m est appelée constante de Michaelis.

Sachant que $[E] = [E_t] - [ES]$ et en combinant les trois équations (1), (2) et (3), on obtient l'équation de Michaelis-Menten :

$$V = V_{\max} [S] / ([S] + K_m)$$

Cette équation permet d'expliquer les deux caractéristiques cinétiques citées précédemment :

- Lorsque $[S]$ est beaucoup plus faible que K_m , la vitesse est proportionnelle à la concentration en substrat. En effet, on a $V = V_{\max} [S] / K_m$.

- Lorsque [S] est beaucoup plus grande que K_m , la vitesse est indépendante de la concentration en substrat. En effet, on a $V = V_{max}$.

Les valeurs de K_m varient beaucoup selon les enzymes. Pour une même enzyme, la valeur de la constante de Michaelis dépend du substrat ainsi que des conditions expérimentales dans lesquelles s'effectue la réaction, telles que la température et la force ionique. Cette constante correspond :

- d'une part, à la concentration en substrat pour laquelle la moitié des sites de l'enzyme sont occupés,
- d'autre part, à la constante de dissociation du complexe ES lorsque k_2 est beaucoup plus petit que k_{-1} . En effet, si k_2 est beaucoup plus petit que k_{-1} (c'est le cas de nombreuses enzymes), la constante K_m est une mesure de l'affinité du substrat pour l'enzyme : un K_m élevé indique une liaison faible et un K_m faible, une liaison forte.

La constante cinétique k_2 est appelée le *turnover*. Le *turnover* d'une enzyme est le nombre de molécules de substrat transformées en produit par unité de temps lorsque l'enzyme est totalement saturée par le substrat. Le rapport k_2/K_m indique l'efficacité de la catalyse enzymatique (parfois appelée "spécificité dynamique").

2. Représentation de Lineweaver-Burk

La constante de Michaelis K_m et la vitesse maximum de la réaction enzymatique V_{max} peuvent être déterminées à partir des vitesses de réaction correspondant à différentes concentrations en substrat lorsqu'on est dans les conditions de Michaelis-Menten. L'équation de Michaelis-Menten peut alors s'écrire :

$$1 / V = (K_m / [S] + 1) / V_{max}$$

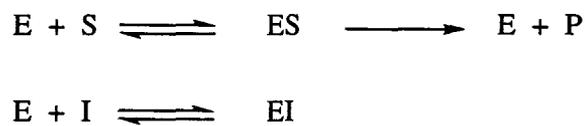
La représentation en double inverse de Lineweaver-Burk ($1/V$ en fonction de $1/[S]$) donne une droite qui coupe l'axe des ordonnées en $1/V_{\max}$ et dont la pente est K_m/V_{\max} . L'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses se fait en $-1/K_m$.

3. Inhibition réversible

Les mesures des vitesses de catalyse à différentes concentrations en substrat et en inhibiteur permettent de faire la distinction entre l'inhibition compétitive et l'inhibition non compétitive.

3.1. Inhibition compétitive

Le substrat et l'inhibiteur sont en compétition pour occuper le même site dans l'enzyme :



On définit K_i la constante de dissociation du complexe formé par l'enzyme et l'inhibiteur. On a :

$$K_i = [E] [I] / [EI] \quad (4)$$

De plus, le complexe enzyme-inhibiteur intervient dans la définition de la concentration en enzyme présente dans le milieu :

$$[E] = [E_0] - [ES] - [EI] \quad (5)$$

En prenant en compte la compétition entre le substrat et l'inhibiteur (par l'intermédiaire des équations (4) et (5)), l'équation de Michaelis-Menten peut alors s'écrire :

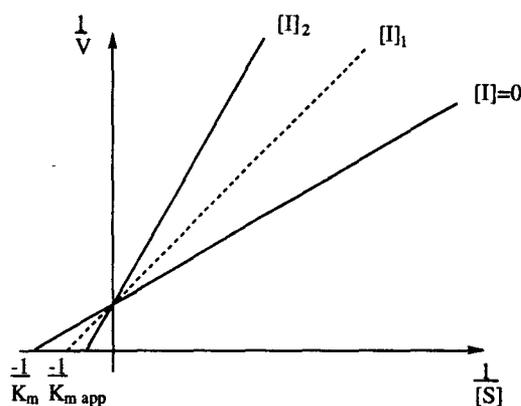
$$1 / V = 1 / V_{\max} + (K_m (1 + [I] / K_i) / V_{\max}) / [S]$$

L'intersection de la droite donnée par la représentation de Lineweaver-Burk ($1/V$ en fonction de $1/[S]$) avec l'axe des ordonnées est la même en présence et en absence d'inhibiteurs, bien que la pente soit différente. Cela traduit le fait que la vitesse maximale de la réaction enzymatique n'est pas modifiée par un inhibiteur compétitif : l'inhibition peut être levée par une concentration suffisamment élevée en substrat, car, alors, tous les sites actifs de l'enzyme sont occupés par le substrat et l'enzyme est totalement active.

L'augmentation de la pente de la droite donnant $1/V$ en fonction de $1/[S]$ indique la force avec laquelle se lie l'inhibiteur compétitif dans le site actif de l'enzyme.

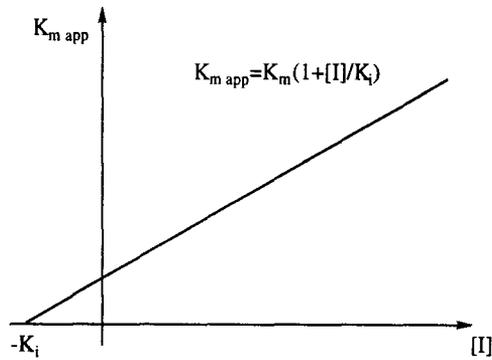
En présence d'inhibiteur, l'intersection de la droite donnant $1/V$ en fonction de $1/[S]$ avec l'axe des abscisses se fait en $-1/K_{m\text{ app}}$ avec

$$K_{m\text{ app}} = K_m (1 + [I] / K_i)$$

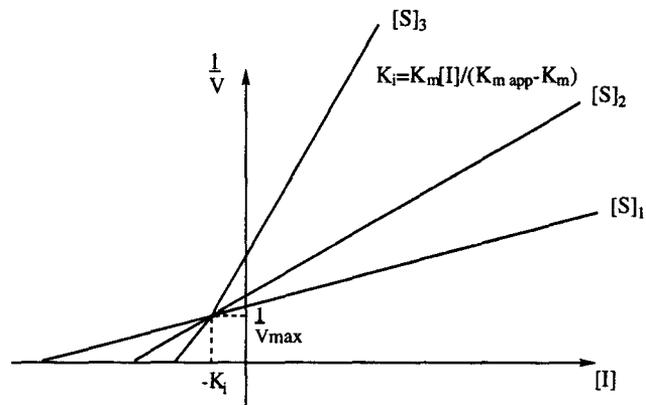


représentation de Lineweaver-Burk

Le K_i est obtenu en traçant la droite $K_{m\text{ app}}$ en fonction de la concentration en inhibiteur $[I]$.



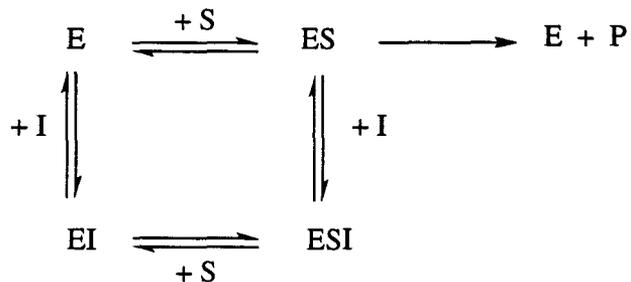
La représentation de Dixon ($1/V$ en fonction de $[I]$) permet également de déterminer le K_i . Les droites tracées pour différentes concentrations en substrats se coupent toutes au point $(-K_i ; 1/V_{\max})$.



représentation de Dixon

3.2. Inhibition non compétitive

L'inhibiteur se fixe en dehors du site actif, selon des modalités très variées suivant l'enzyme :



On définit les constantes correspondantes à la dissociation de chaque complexe :

- K_i constante de dissociation du complexe EI,
- K_i' constante de dissociation du complexe ESI formé à partir de ES,
- K_s constante de dissociation du complexe ES,
- K_s' constante de dissociation du complexe ESI formé à partir de EI.

$$K_i' = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = K_m \quad K_s' = \frac{[EI][S]}{[ESI]}$$

Tous ces complexes : enzyme-inhibiteur, enzyme-substrat et enzyme-substrat-inhibiteur, interviennent dans la définition de la concentration en enzyme présente dans le milieu :

$$[E] = [E_t] - [ES] - [EI] - [ESI]$$

En prenant en compte la formation de tous ces complexes, l'équation de Michaelis-Menten peut alors s'écrire :

$$1 / V = [(1 + [I] / K_i) K_m / [S] + (1 + [I] / K_i')] / V_m$$

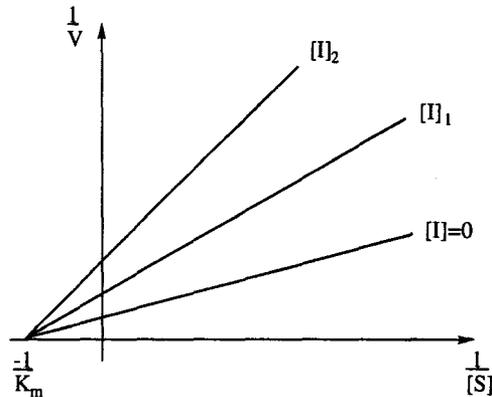
Dans le cas d'une inhibition purement non compétitive, l'inhibiteur se fixe de la même façon que le substrat soit présent ou non. On a donc $K_i = K_i'$. L'équation de Michaelis-Menten devient alors :

$$1 / V = (1 + [I] / K_i) (K_m / [S] + 1) / V_m$$

La vitesse maximale de la réaction enzymatique V_{\max}^I , en présence d'un inhibiteur non compétitif est donnée par :

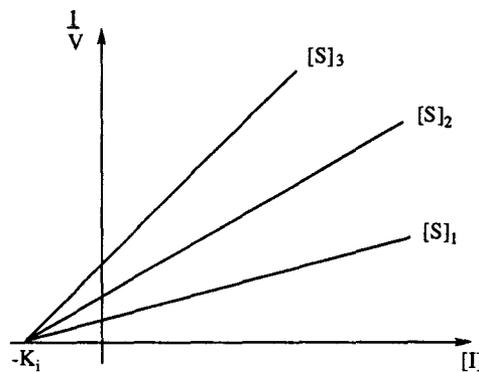
$$V_{\max}^I = V_{\max} / (1 + [I] / K_i)$$

Ainsi, en présence d'un inhibiteur non compétitif, la vitesse maximale de la réaction enzymatique est diminuée. L'intersection avec l'axe des ordonnées se fait en $1/V_{\max}^i$ à un niveau plus élevé. La pente, égale à K_m/V_{\max}^i , est augmentée du même facteur. Contrairement à V_{\max} , K_m n'est pas modifié par ce type d'inhibition.



représentation de Lineweaver-Burk

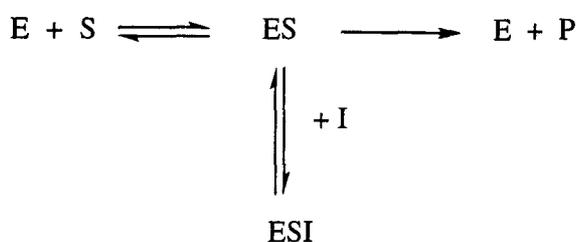
La représentation de Dixon ($1/V$ en fonction de $[I]$) permet de déterminer le K_i . Les droites tracées pour différentes concentrations en substrats se coupent toutes sur l'axe des abscisses en $-K_i$.



représentation de Dixon

3.3. Inhibition incompétitive

L'inhibiteur ne peut se fixer à l'enzyme que lorsque le substrat est déjà présent :



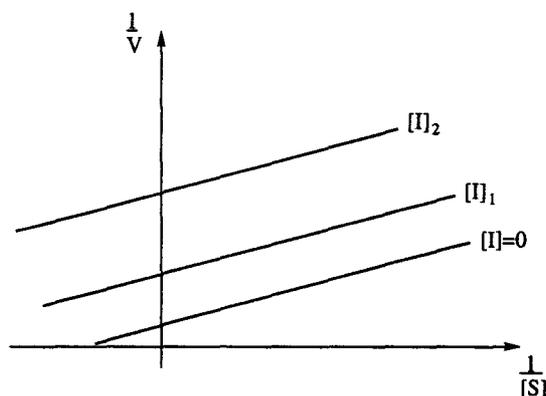
La définition de la concentration en enzyme présente dans le milieu est la suivante :

$$[E] = [E_t] - [ES] - [ESI]$$

L'équation de Michaelis-Menten devient alors :

$$1 / V = (1 + [I] / K_i + K_m / [S]) / V_m$$

La pente des droites donnant $1/V$ en fonction de $1/[S]$ est constante quelle que soit la concentration en inhibiteur.



représentation de Lineweaver-Burk

II. Nature de l'inhibition pour les bis(2-aminodiphénylsulfures): Existence d'un phénomène d'aggrégation

Toute cette étude a été réalisée sur les composés **5a**, **5b** et **5c**, car ce sont les premières molécules qui ont présenté un tel comportement.

Pour déterminer la nature de l'inhibition de la TR pour les composés **5a**, **5b** et **5c**, la vitesse de réduction enzymatique a été mesurée en présence de plusieurs concentrations

de $T(S)_2$ et d'inhibiteur. Les vitesses initiales de disparition du NADPH, à 340 nm, en présence de différentes concentrations d'inhibiteur (**5a** : 0-500 μM ; **5b** : 0-40 μM ; **5c** : 0-80 μM), ont été mesurées et reportées sur le graphe de Lineweaver-Burk (figures 34, 35 et 36).

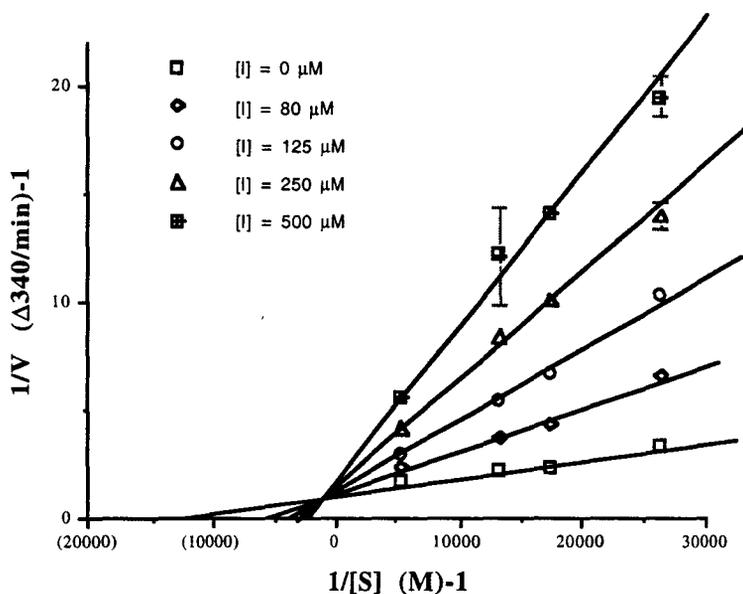


figure 34. Courbes $1/V = f(1/[S])$ pour différentes concentrations de **5a**

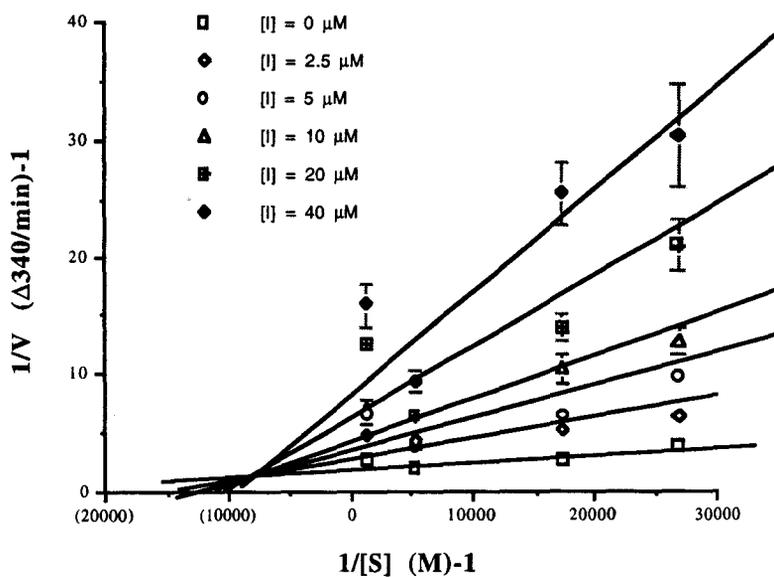


figure 35. Courbes $1/V = f(1/[S])$ pour différentes concentrations de **5b**

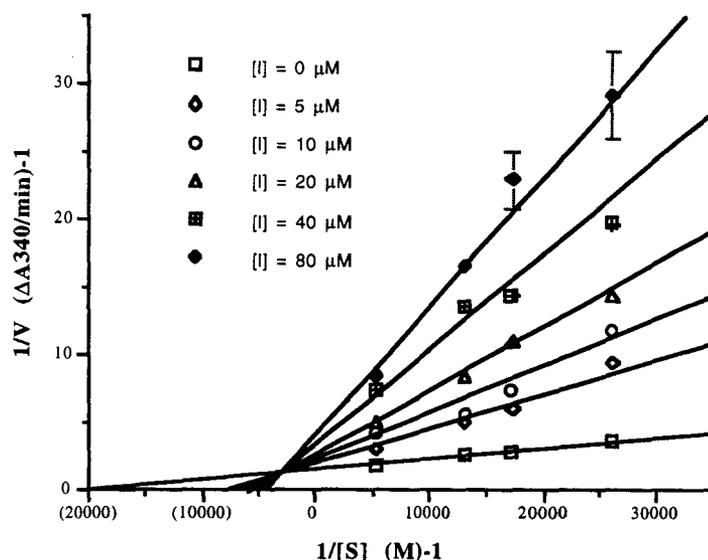
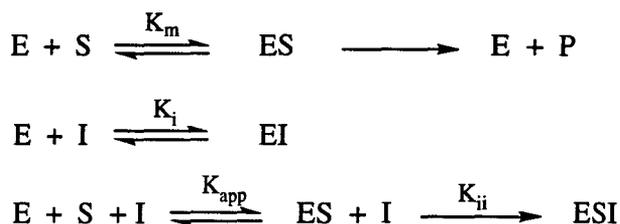


figure 36. Courbes $1/V = f(1/[S])$ pour différentes concentrations de **5c**

Pour les trois inhibiteurs **5a**, **5b**, et **5c**, les graphes obtenus ont permis de mettre en évidence le caractère compétitif mixte de l'inhibition observée.

Dans le cas d'un inhibiteur compétitif mixte, l'inhibition est régie par les réactions suivantes :



L'inhibiteur présente une affinité pour l'enzyme libre (représentée par la constante K_i) et peut avoir une affinité pour le complexe enzyme/substrat (représentée par la constante K_{ii}). Les valeurs K_i et K_{ii} pour chaque inhibiteur sont liées par la relation suivante :

$$V_{max}/V = \{K_m[1 + ([I]/K_i)].1/[S]\} + [1 + ([I]/K_{ii})] = \{A([I].1/[S])\} + B([I])$$

Dans ce cas, la pente $A([I])$ est une fonction linéaire de $[I]$, qui ne dépend que de K_1 , alors que l'intersection avec l'axe des ordonnées $B([I])$ dépend de $[I]$ à travers la valeur de K_{ii} .

Une approche par calcul de régression linéaire (mis en oeuvre à partir des données expérimentales) a été réalisée, au laboratoire, par le Dr D. Horvath, pour accéder aux valeurs de K_1 et K_{ii} . Les calculs ont montré que $A[I]$ et $B[I]$ n'étaient pas des fonctions linéaires de $[I]$, mais s'exprimaient mieux sous la forme d'une fonction parabolique :

$$A([I]) = a + b[I] + c[I]^2$$

avec un coefficient quadratique c négatif. Une équation analogue représente B en fonction de $[I]$. Ce phénomène est confirmé par les courbes k_{app} ou $k_{obs} = f([I])$ expérimentales, obtenues pour les composés **5a**, **5b** et **5c** (figures 37, 38 et 39).

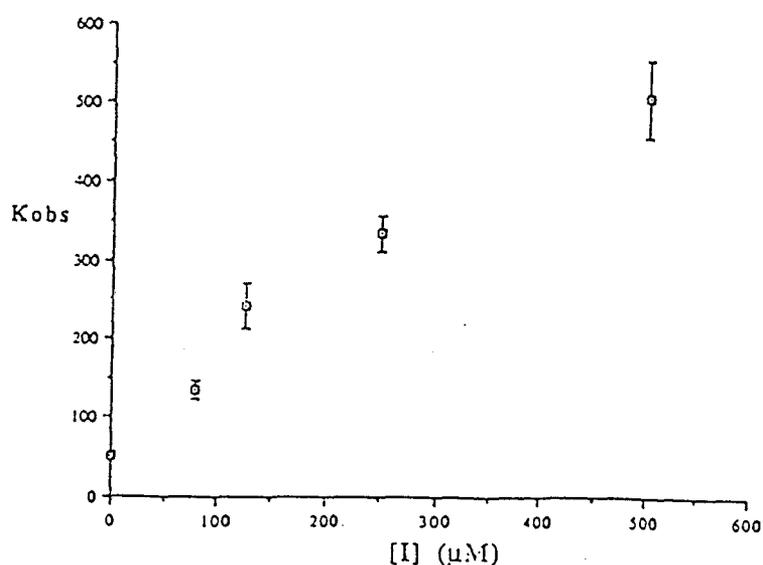


figure 37. Courbe $k_{obs} = f([I])$ pour le composé **5a**

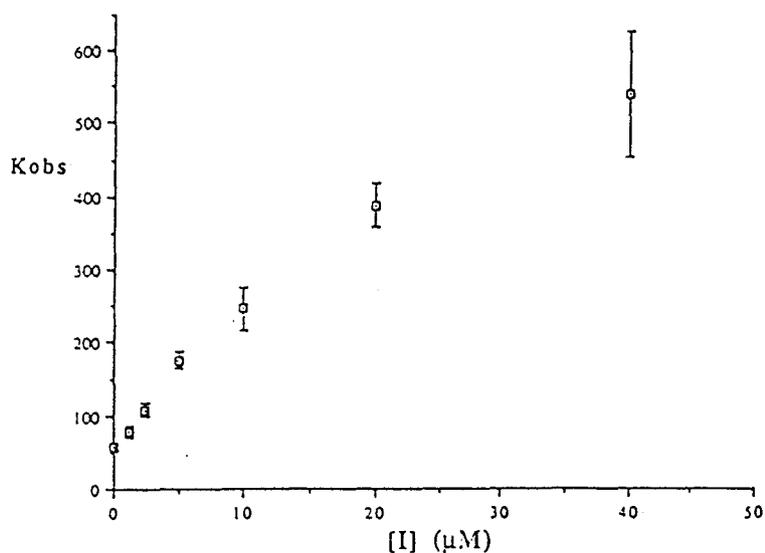


figure 38. Courbe $k_{obs} = f([I])$ pour le composé 5b

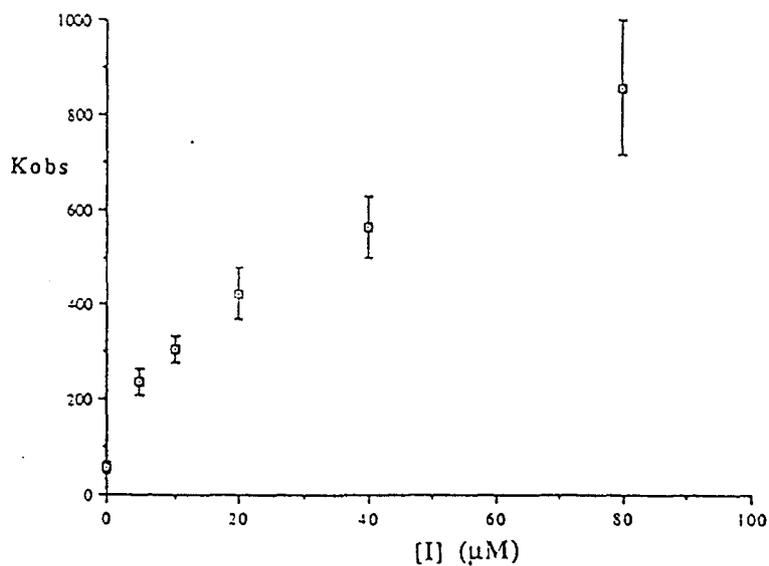


figure 39. Courbe $k_{obs} = f([I])$ pour le composé 5c

Dans le cas des inhibiteurs 5a, 5b et 5c, l'inhibition de la TR est, proportionnellement, plus importante aux faibles concentrations en inhibiteur qu'aux fortes concentrations (figure 40).

Ce comportement particulier pourrait s'expliquer en introduisant l'hypothèse d'un phénomène d'aggrégation.

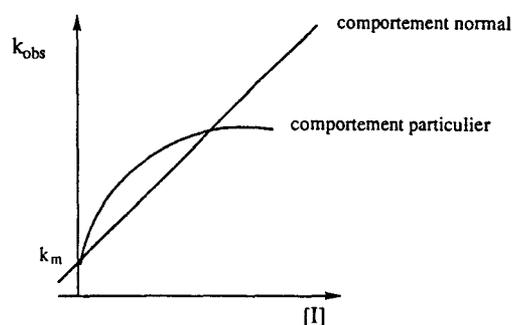
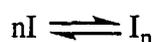


figure 40. Comparaison des courbes $k_{obs} = f([I])$

Nous avons essayé de modéliser ce phénomène d'aggrégation des inhibiteurs, régi par l'équation :



et caractérisé par la constante de dissociation K_d qui relie la concentration effective en inhibiteur libre $[I]$, la concentration initiale totale en inhibiteur $[I]_0$ et la concentration en agrégat $[I_n]$.

Comme le composé **5c** présentait l'effet le plus prononcé, des études de cinétique plus poussées ont été menées sur cet inhibiteur de la TR. Une confirmation expérimentale de l'hypothèse d'aggrégation a été fournie par l'observation du déplacement du maximum d'absorption (243-263 nm) dans les spectres UV du composé **5c** réalisés à 5, 10 et 40 μM (figure 41).

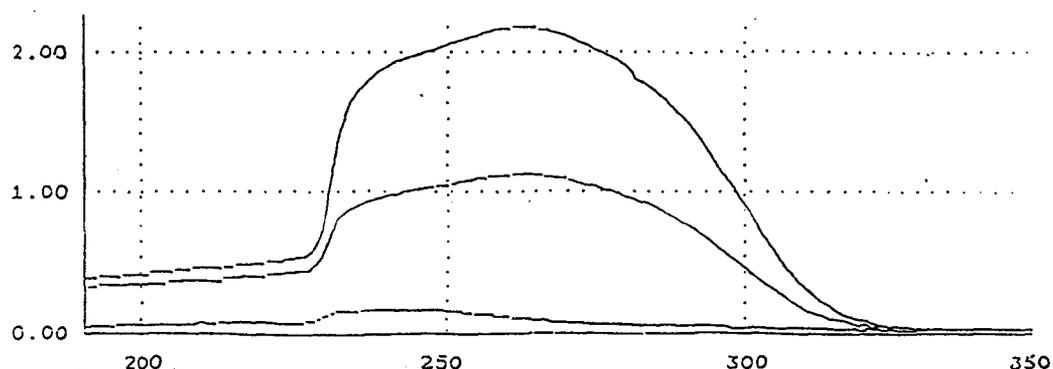


figure 41. Spectres UV du composé **5c** à 5, 10 et 40 μM
D.O. en fonction de λ (nm)

Des études sur les interactions entre des groupements amino protonés et des noyaux aromatiques ont déjà été publiées.^{119,132} De plus, des molécules analogues aux bis(2-aminodiphénylsulfures), constituées de deux entités aromatiques reliées par un bras espaceur aminé, présentent un tel phénomène d'aggrégation.¹³³ Ces études confirment notre hypothèse.

Le processus d'aggrégation ne se traduit pas nécessairement par la formation d'une espèce polymérique bien définie I_n (solution polydisperse).

Si les valeurs de n et de K_d sont connues, les concentrations effectives en inhibiteur $[I]$ peuvent être déterminées comme une fonction de la concentration totale $[I]_0$ et conduire à une linéarisation des équations exprimant A et B en fonction de $[I]$. Exprimer la valeur du coefficient quadratique c comme une fonction du log de K_d , pour différentes valeurs de n , permet de déterminer les valeurs optimales de K_d pour linéariser $A([I])$ ($c = 0$).

Le couple de valeurs (n , K_d), pour lequel la fonction devient linéaire et qui est le mieux corrélé avec les points expérimentaux, a été déterminé par une technique de recherche systématique, basée sur la variation du coefficient linéaire $r^2 = f(K_d)$.

D'après les données cinétiques du composé **5c**, la linéarisation de la fonction $A([I])$ est optimale pour des valeurs de n entre 2 et 2.5. Le coefficient linéaire des lignes de régression $A([I]) = a'[I] + b'$ décroît légèrement quand on passe de $n = 2$ ($r^2 = 0.995$) à $n = 3$ ($r^2 = 0.990$). Les mêmes couples de valeurs (n , K_d) permettent de linéariser $B([I])$ en fonction de $[I]$.

Cela confirme l'hypothèse que la non-linéarité de ces fonctions est due à une différence entre la concentration totale et la concentration effective en inhibiteur.

Conclusion

Les K_i calculés par le Dr D. Horvath sont supérieurs aux valeurs obtenues, à partir des IC_{50} mesurées, par l'équation de Cheng-Prusoff $K_i = IC_{50} / (1 + [S]/K_m)$ (tableau 11). Ces différences sont dues au phénomène d'aggrégation.

| Composé | K_d calculé | K_i (μM) calculé par D. Horvath | K_i (μM) calculé d'après les IC_{50} mesurées |
|-----------|---------------|--|--|
| 5b | 50 | 2.6 | 0.9 |
| 5c | 10 | 2.0 | 1.3 |

tableau 11.
Valeurs de K_i calculées et valeurs de K_i obtenues à partir des IC_{50} mesurées

Il semblerait que, plus le phénomène d'aggrégation est important, plus les différences entre les K_i sont importantes. Ce phénomène d'aggrégation nous empêche de corrélérer précisément, par l'équation de Cheng-Prusoff, les IC_{50} et les K_i de nos composés sur la trypanothion réductase.

En tenant compte du comportement particulier des bis(2-aminodiphénylsulfures) en solution, nos composés ne sont pas suffisamment actifs, sur la trypanothion réductase, pour tuer le parasite. Par la suite, nous avons donc essayé d'améliorer l'activité inhibitrice sur la TR en dérivant les bis(2-aminodiphénylsulfures).

Quatrième chapitre

**Détermination du rôle de la deuxième entité
noyau hydrophobe-chaîne latérale aminée**

**Dérivés dissymétriques de la famille des
2-aminodiphénylesulfures**

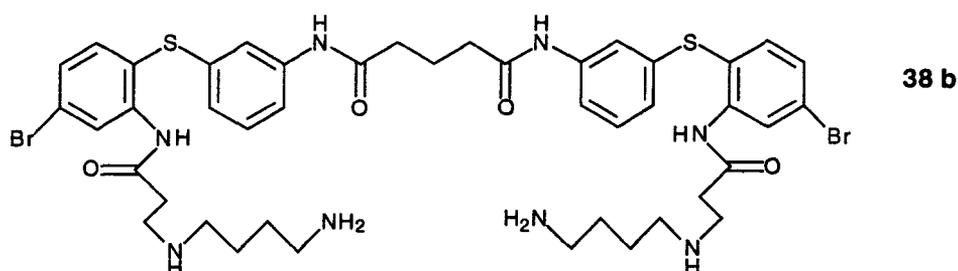
Une troisième génération d'inhibiteurs de la TR

Introduction

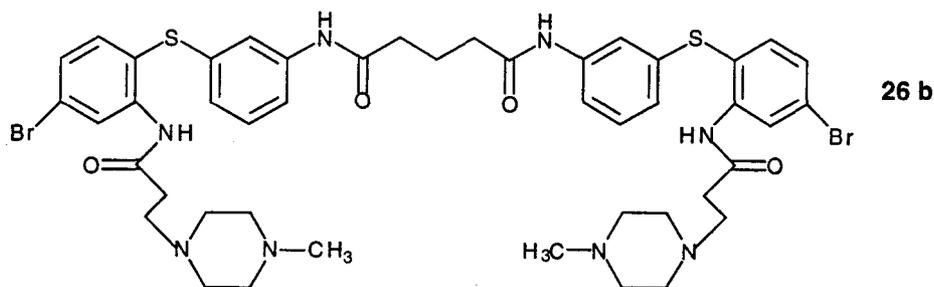
La position et la conformation d'un inhibiteur monomérique de la famille des 2-aminodiphénylsulfures dans le site actif de la TR ont été prédites par calcul de dynamique moléculaire. Ces déterminations ont été confortées par le groupe de Krauth-Siegel qui a élucidé la structure tridimensionnelle du complexe formé par la TR de *T. cruzi* et la mépacrine, un inhibiteur de la TR possédant lui aussi une partie hydrophobe et une chaîne latérale aminée.⁹¹

Ne pouvant connaître le rôle exact, à partir de la modélisation moléculaire, pour la reconnaissance dans le site actif de la TR, de la deuxième entité noyau aromatique-chaîne latérale aminée des bis(2-aminodiphénylsulfures), nous avons donc décidé de substituer cette partie par différents groupements et d'étudier les conséquences de la dissymétrie sur l'inhibition.

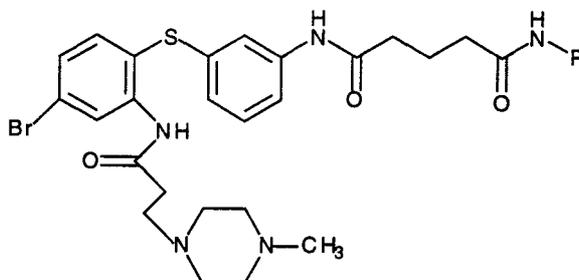
Le meilleur inhibiteur de la TR obtenu jusqu'ici dans notre série était le composé **38b** ($IC_{50} = 350 \text{ nM}$ à $57 \text{ }\mu\text{M}$ en $T(S)_2$). Du fait de la présence de nombreuses fonctions amines dans la chaîne latérale, ce produit ne peut être obtenu avec de bons rendements. Nous avons donc décidé de baser la structure de nos dérivés dissymétriques sur le composé **26b**, présentant une *N*-méthylpipérazine en bout de chaîne latérale.



meilleur inhibiteur de la série



inhibiteur plus aisément synthétisable et possédant la structure la plus proche de celle de **38b**



structure générale des dérivés dissymétriques

I. Remplacement de la deuxième entité noyau aromatique-chaîne latérale aminée par des amines aliphatiques ou aromatiques

1. Choix des amines

Nous avons décidé de remplacer cette partie de la molécule par différentes amines aliphatiques ou aromatiques.

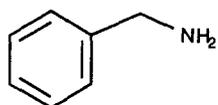
L'objectif était double :

- soit de remplacer cette partie de la molécule par différentes amines aliphatiques ou aromatiques pour déterminer l'influence des différents substituants sur la reconnaissance,
- soit de conjuguer deux actions sur le parasite : inhibition de la TR et libération d'espèces oxygénées réactives (propriété des substrats dits "subversifs" amenant l'enzyme à produire du stress oxydant) par introduction d'un groupement anthraquinonique dans la molécule.

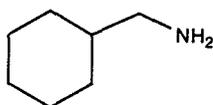
1.1. Variations structurales

Les amines utilisées permettent d'étudier différentes variations structurales :

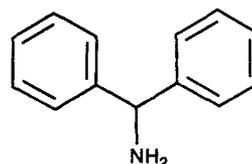
- cycle aromatique ou non, un ou plusieurs cycles, à une distance variable :



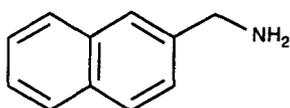
benzylamine



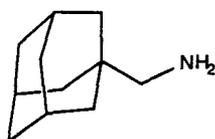
cyclohexaneméthylamine



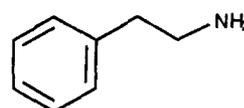
diphénylméthylamine



naphthalèneméthylamine

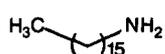


adamantaneméthylamine

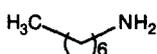


phénéthylamine

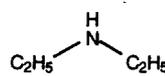
- chaînes grasses de différentes longueurs, une ou plusieurs chaînes :



hexadécylamine

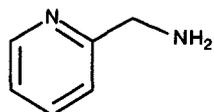


heptylamine

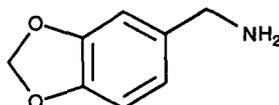


diéthylamine

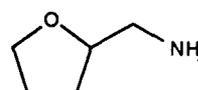
- hétérocycles :



pyridinométhylamine

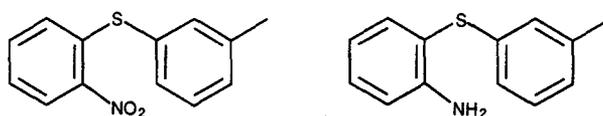


pipéronylamine



tétrahydrofurfurylamine

Pour déterminer l'influence de la chaîne latérale aminée de la deuxième entité, nous avons remplacé cette dernière par un reste aminodiphénylsulfure soit nitré, soit aminé :



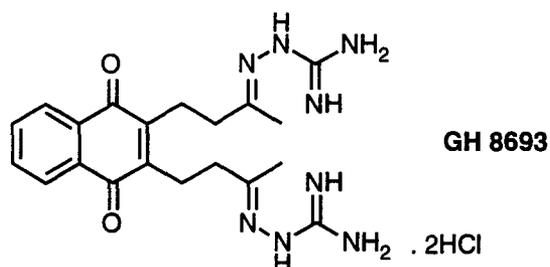
On fixe la 3-(2-nitro)phenylthiophenylamine, puis le composé obtenu est réduit pour obtenir le dérivé dissymétrique correspondant, avec une amine libre en α du noyau aromatique de la deuxième entité hydrophobe.

1.2. Substrats subversifs

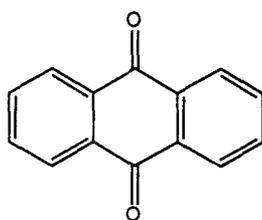
Le principe des substrats subversifs est d'inhiber la réaction physiologique de l'enzyme et de favoriser une réaction létale pour le parasite. Ainsi, de tels composés peuvent entraîner la production de métabolites toxiques de l'oxygène. Ce phénomène a déjà été décrit comme provoquant la mort des trypanostigotes de *T. cruzi*.¹³⁴

Les quinones (benzoquinones, naphthoquinones, anthraquinones), en présence d'oxygène, jouent le rôle de substrats subversifs en détournant l'activité antioxydante physiologique de la TR vers une activité prooxydante, par production de $O_2^{\cdot-}$.

Ainsi, dans le cas du GH 8693, la trypanothion réductase réduit la partie quinone qui se réoxyde en présence d'oxygène moléculaire, libérant ainsi le radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$.



Par le même phénomène, les anthraquinones peuvent être réduites par la TR puis réoxydées par l'oxygène.



anthraquinone

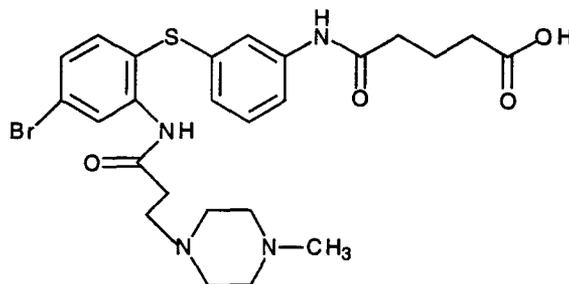
Ainsi, l'introduction d'un groupement anthraquinonyl, au sein de nos dérivés dissymétriques de la famille des 2-aminodiphénylsulfures, pouvait nous permettre de conjuguer deux actions sur le parasite : celle d'un inhibiteur de la TR et celle d'un substrat subversif.

2. Synthèse des composés dissymétriques

2.1. Cas des amines aliphatiques

2.1.1. Synthèse de l'acide

Nous avons d'abord synthétisé l'acide **45b**, possédant une chaîne latérale aminée avec une *N*-méthylpipérazine terminale et un bras à cinq atomes de carbone, pour les couplages acide/amine ultérieurs :



acide **45b**

Le premier schéma rétrosynthétique choisi repose sur la fixation de la chaîne centrale, puis, après réduction du groupement nitro, sur l'introduction de la chaîne latérale aminée (schéma 16).

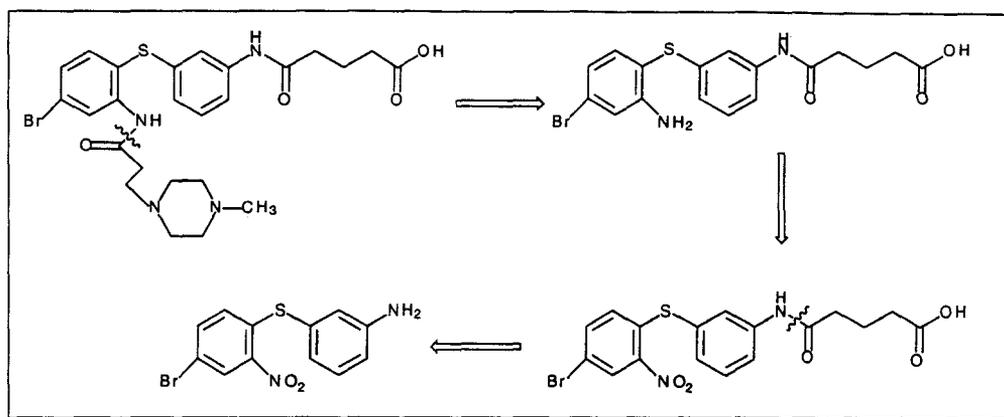


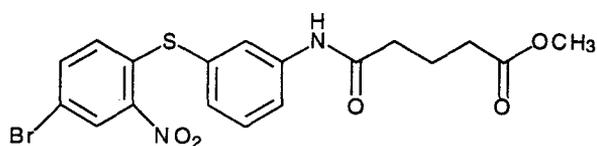
schéma 16. Rétrosynthèse de l'acide **45b**

La fixation de la chaîne centrale se fait par une méthode qui s'est avérée infructueuse dans le cas de la "dimérisation" des 2-aminodiphénylsulfures : réaction du diphénylsulfure aminé avec l'anhydride glutarique dans la pyridine (voir deuxième chapitre, § 2). L'amide nitré se forme quantitativement.

La réduction du groupement nitro en amine, selon la réaction de Clémmsen, est complète (voir deuxième chapitre, § 3).

Nous avons greffé, sur cette fonction amine, le chlorure de 3-chloropropanoyle, puis la *N*-méthylpipérazine selon le mode opératoire décrit dans le deuxième chapitre (§ 4.1.). Cependant, à cause de sa nature zwitterionique (présence de fonctions amines et d'une fonction acide), ce produit n'a pu être séparé, lors du traitement aqueux, des réactifs en excès (chlorure de 3-chloropropanoyle, acide 3-chloropropanoïque, *N*-éthylpipéridine et *N*-méthylpipérazine).

Pour éviter ce problème de charge, nous avons décidé de bloquer temporairement la fonction acide sous la forme d'une fonction ester méthylique (facilement hydrolysable par un traitement basique). Pour éviter une *N*-acétylation compétitive, la protection de la fonction acide doit être réalisée avant la réduction du groupement nitro. L'ester **42b** est obtenu par simple chauffage de l'acide au reflux du méthanol en présence d'acide chlorhydrique concentré (un demi équivalent).



Ester méthylique **42b**

La réduction, puis l'amidation de cet ester intermédiaire **42b** ont été réalisées suivant les conditions opératoires décrites précédemment (voir deuxième chapitre, § 4). Puis, l'ester méthylique est hydrolysé par une méthode douce utilisant du bicarbonate de sodium dans un mélange méthanol/eau pendant une nuit à température ambiante.¹³⁵

Les tentatives d'hydrolyse par la soude aqueuse ou méthanolique n'ont pas permis d'isoler l'acide carboxylique sous sa forme cristallisée contrairement à la méthode douce.

Le schéma de synthèse globale de l'acide à cinq atomes de carbone est représenté dans le schéma 17.

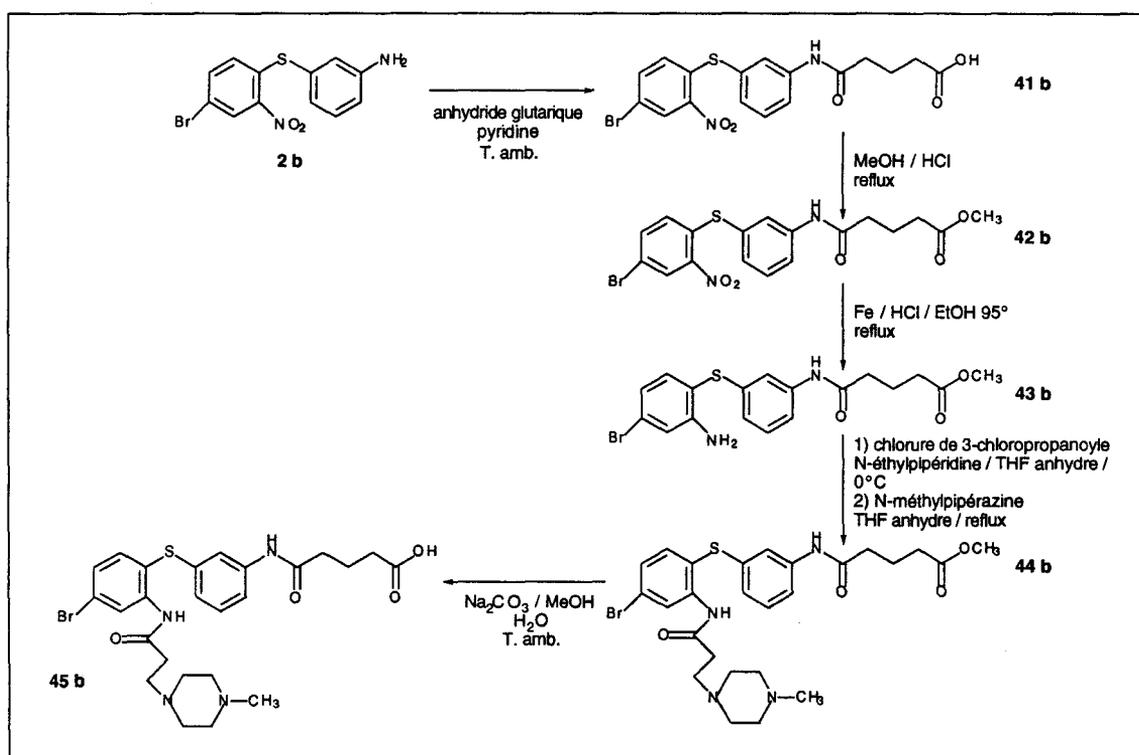
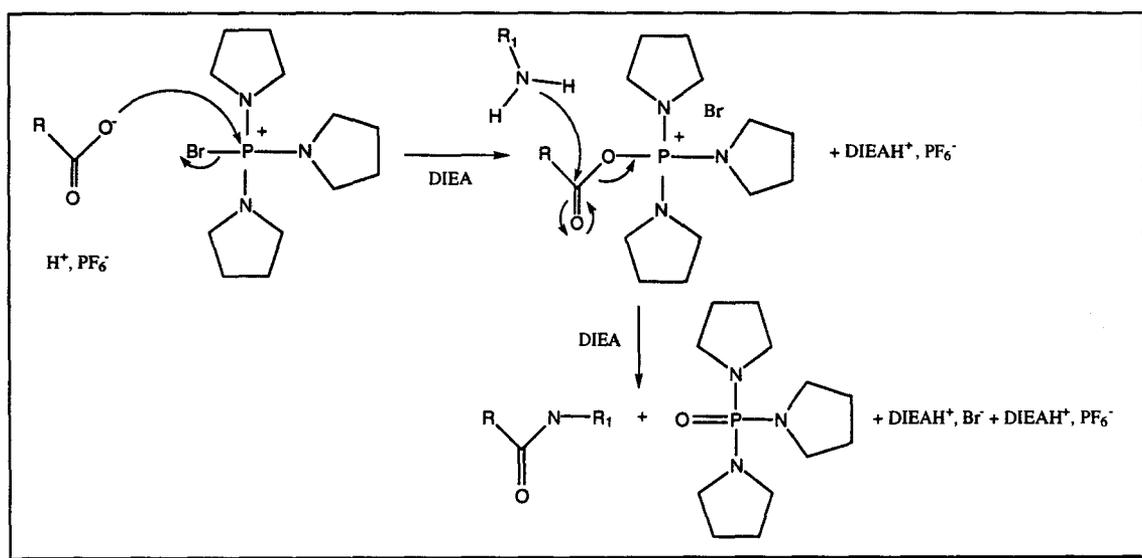
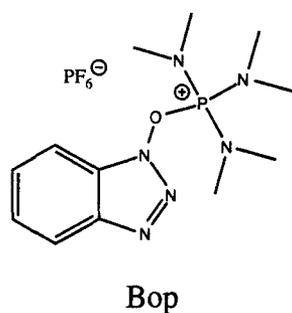


schéma 17. Synthèse globale de l'acide **45b** à cinq atomes de carbone

2.1.2. Couplage acide/amine

Une méthode de couplage acide/amine habituellement utilisée en synthèse peptidique, basée sur l'activation d'un acide par le PyBrop (bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate) a été décrite par Coste.¹³⁶

Son application à notre série de composés a permis de coupler l'acide **45b** avec les différentes amines non aromatiques. Le mécanisme d'activation par le PyBrop passe par la formation d'un ester activé qui réagit sur une amine (schéma 18). Il est analogue à celui du Bop (benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium hexafluoro phosphate),¹³⁷ mais le PyBrop est un meilleur agent de couplage que le Bop dans le cas des amines *N*-méthylées.¹³⁶



2.2. Cas des amines aromatiques

2.2.1. Couplage acide/amine aromatique

2.2.1.1. Méthode de couplage classique PyBrop/DIEA/DMF

Cette méthode a été appliquée à l'acide **45b** et à différentes amines : aniline, 3-(2-nitro-4-bromo)phénylthiophénylamine, 1- ou 2-aminoanthraquinone.

Nous avons constaté la formation partielle du dérivé dissymétrique dans le cas de l'aniline : le pic de masse correspondant est apparu en TOF mais le produit n'a pu être isolé sur CCM. Les autres amines aromatiques mises en jeu n'ont pas réagi du tout.

2.2.1.2. Passage par le chlorure d'acide

Dans le but d'optimiser le rendement de la réaction de formation du chlorure d'acide, nous avons réalisé différents essais sur l'acide hexadécanoïque (acide aliphatique de structure simple, présent en grande quantité au laboratoire). Le chlorure d'acide formé n'est pas isolé. Nous l'avons fait réagir directement sur l'aniline pour évaluer le rendement global des deux étapes successives (schéma 19).

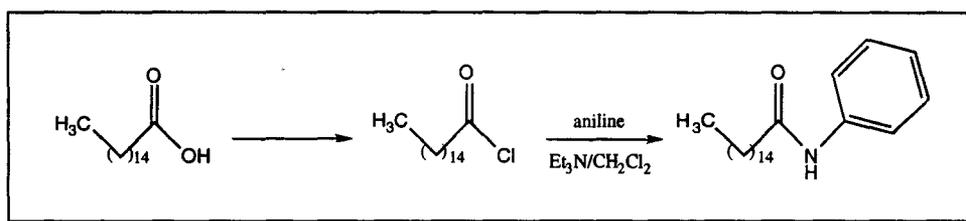


schéma 19. Essais de couplage à partir de l'acide hexadécanoïque

Le couplage est réalisé en présence de triéthylamine, dans CH₂Cl₂, et est suivi d'un traitement aqueux (basique, acide puis neutre). La pureté du solide obtenu et le rendement global des deux étapes sont déterminés par HPLC et pesée (tableau 12).

| Essai | Réactif | Nombre d'équivalents | Solvant | Température | Rendement global (%) |
|------------------|---|----------------------|---------------------------------|-------------|----------------------|
| 1 | C ₂ O ₂ Cl ₂ | 1.2 | CH ₂ Cl ₂ | T. amb. | 86 |
| 2 ¹³⁸ | C ₂ O ₂ Cl ₂ | 1.2 | CH ₂ Cl ₂ | reflux | 83 |
| 3 ¹³⁹ | SOCl ₂ | 5 | CH ₂ Cl ₂ | T. amb. | 89 |
| 4 ¹³⁹ | SOCl ₂ | - | SOCl ₂ | T. amb. | 92 |
| 5 ¹³⁹ | SOCl ₂ | 5 | CH ₂ Cl ₂ | reflux | 83 |
| 6 ¹³⁹ | SOCl ₂ | - | SOCl ₂ | reflux | 89 |

tableau 12. Essais de synthèse sur l'acide hexadécanoïque

Les durées de réaction sont comparables dans tous les cas (une heure à reflux et deux heures à température ambiante). Les rendements globaux sur les deux étapes varient entre 83 et 92%. Le traitement permet d'obtenir des produits quasiment purs (pureté > 90% en HPLC) sauf dans le cas où on utilise le chlorure de thionyle comme solvant.

Pour des raisons de facilité de conservation du réactif (le chlorure d'oxalyle est très instable), la méthode SOCl₂ 5 éq/CH₂Cl₂, à reflux, a été retenue.

Nous avons appliqué cette méthode à l'acide **45b** (schéma 20).

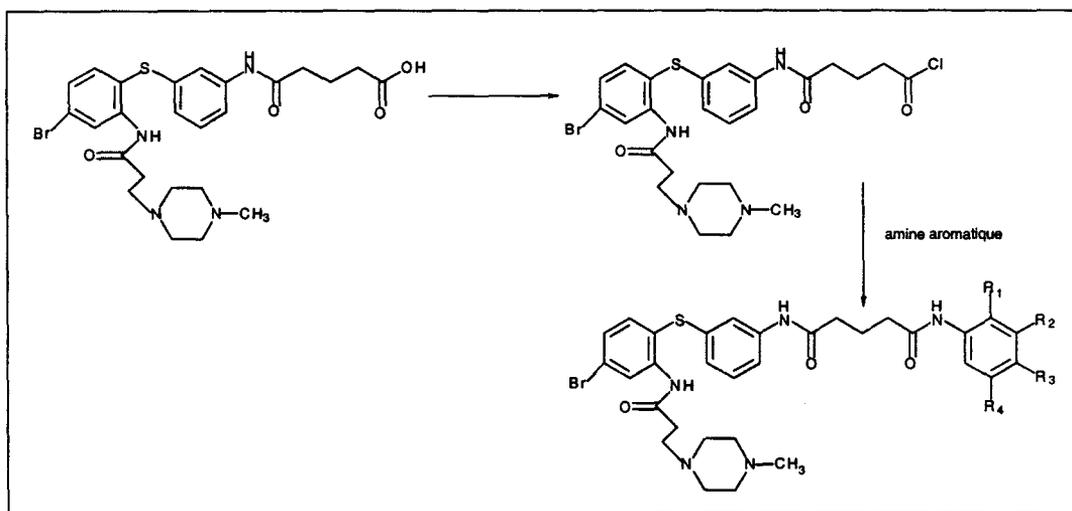


schéma 20. Couplage de l'acide **45b** avec des amines aromatiques

Malgré les nombreux essais réalisés sur l'acide hexadécanoïque, nous avons encore testé plusieurs méthodes de formation du chlorure d'acide sur notre produit pour être certains du résultat obtenu (le chlorure d'acide n'est jamais isolé) :

- $\text{SOCl}_2/\text{CHCl}_3$ à température ambiante,¹⁴⁰

- $\text{PCl}_5/\text{CHCl}_3$ à température ambiante.¹⁴¹

Mais, les produits de couplage, dans le DMF ou le dichlorométhane, en présence de triéthylamine, avec différentes amines aromatiques (aniline ou 3-(2-nitro-4-bromo)phénylthiophénylamine), ne se sont pas formés (tableau 13). Un essai comparatif de couplage avec la benzylamine tend à prouver que le chlorure d'acide ne s'est pas formé ou a été détruit.

| Réaction | Formation du chlorure | | | Couplage avec la benzylamine | | |
|----------|-----------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------|--|---|
| | Essai | Réactif | Solvant | Température | Solvant pour la solution de chlorure d'acide | Solvant pour la solution de benzylamine |
| 1 | | SOCl_2 | SOCl_2 | reflux | DMF | CH_2Cl_2 |
| 2 | | SOCl_2 (5 éq.) | CH_2Cl_2 | reflux | DMF | CH_2Cl_2 |
| 3 | | SOCl_2 (1 éq.) | CHCl_3 | reflux | DMF | CH_2Cl_2 |
| 4 | | PCl_5 (4 éq.) | CHCl_3 | T. amb. | DMF | CH_2Cl_2 |

tableau 13. Essais de couplage sur l'acide **45b**

En fait, dans toutes ces réactions de couplage, ayant pour intermédiaire le chlorure d'acide, on a observé la formation majoritaire du même produit. Le nombre d'atomes de la chaîne carboxylée (six) et la réactivité du chlorure d'acide formé nous conduisent à formuler l'hypothèse d'une attaque nucléophile intramoléculaire du doublet de l'azote sur le carbone du chlorure d'acide, pour former un dérivé du glutarimide (schéma 21).

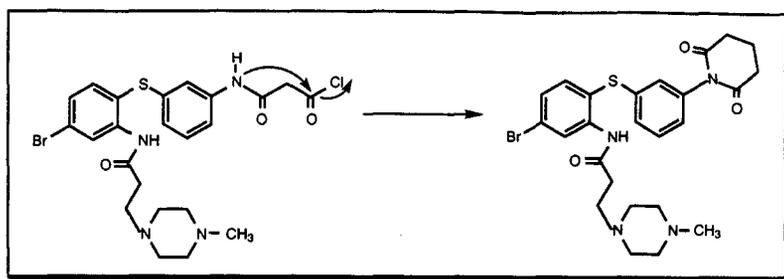


schéma 21. Réaction de cyclisation intramoléculaire

L'obtention du produit de cyclisation a été confirmée par RMN ¹H.

2.2.1.3. Passage par l'hydrazide et l'azide

Dans la chimie des peptides, le passage par l'hydrazide et l'azide est une méthode pour passer d'un ester méthylique à un amide (schéma 22).¹⁴²

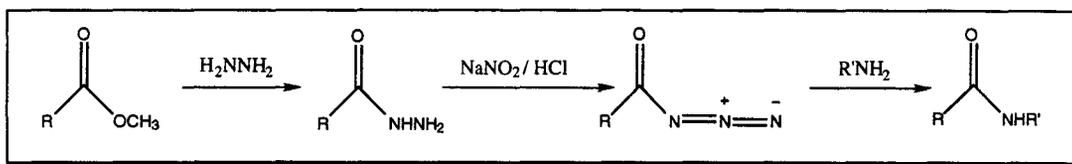


schéma 22. Formation de l'hydrazide, passage à l'azide et couplage avec l'amine

L'hydrazide correspondant à notre ester méthylique ne s'est pas formé (absence de réactivité prouvée par CCM et HPLC). La formation de l'hydrazide a ensuite été tentée à reflux mais sans succès (tableau 14). Cette méthode a donc été abandonnée.

| Essai | Réactif | Solvant | Température |
|-------|------------------------------|---------|-------------|
| 1 | hydrazine hydrate (3 éq.) | MeOH | T. amb. |
| 2 | hydrazine hydrate (3 éq.) | MeOH | reflux |

tableau 14. Synthèse de l'hydrazide

2.2.1.4. Réaction de couplage sur résine HOBt

La résine HOBt a été mise au point, au sein de notre laboratoire, par Iuliana POP.¹⁴³ L'avantage de cette méthode est l'élimination très facile des réactifs en excès et la pureté du produit final.

Un premier essai avec la diisopropylcarbodiimide comme activateur, la benzylamine, un mélange DMF/CH₂Cl₂ (1/3) comme solvant d'activation et un temps d'activation total de deux heures a été mis en oeuvre. Un ester activé intermédiaire se forme, est greffé sur la résine et réagit sur l'amine (schémas 23 et 24).

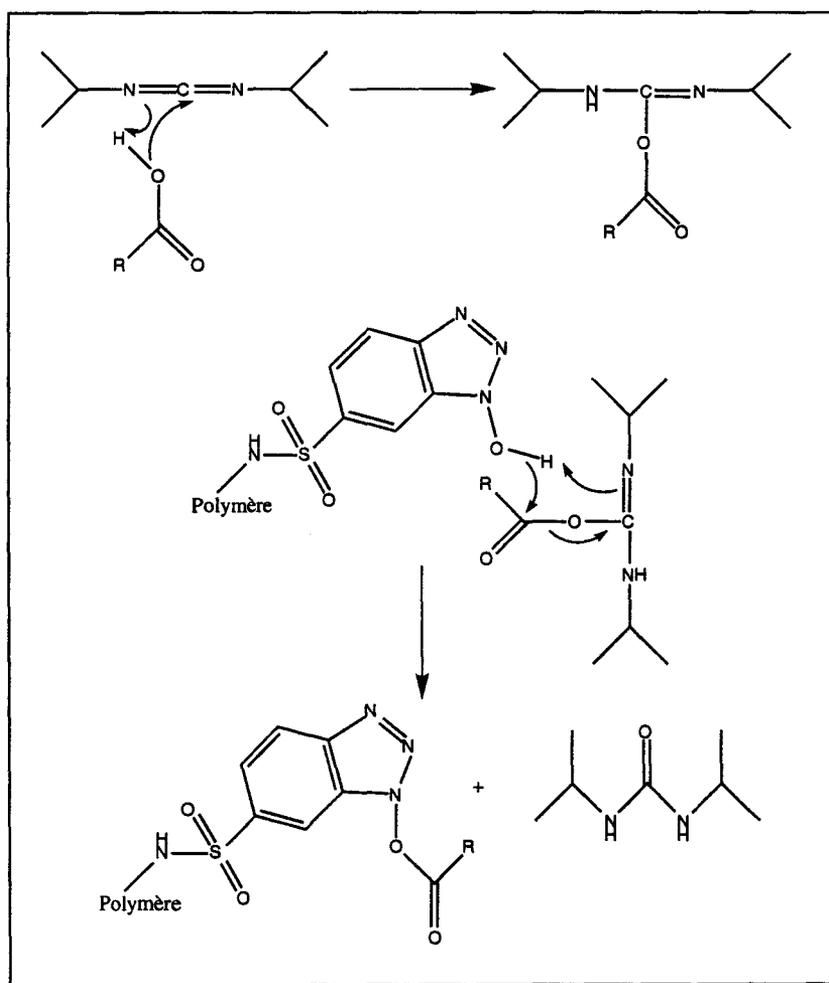


schéma 23. Réactions principales d'activation

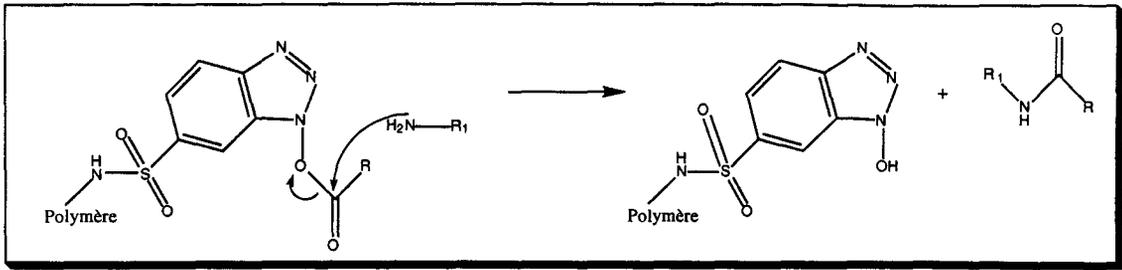


schéma 24. Mécanisme de couplage

La phase d'activation de l'acide s'accompagne de réactions secondaires qui conduisent, dans un premier temps, à un anhydride réactif, qui peut se greffer sur la résine en redonnant simultanément l'acide (schéma 25).

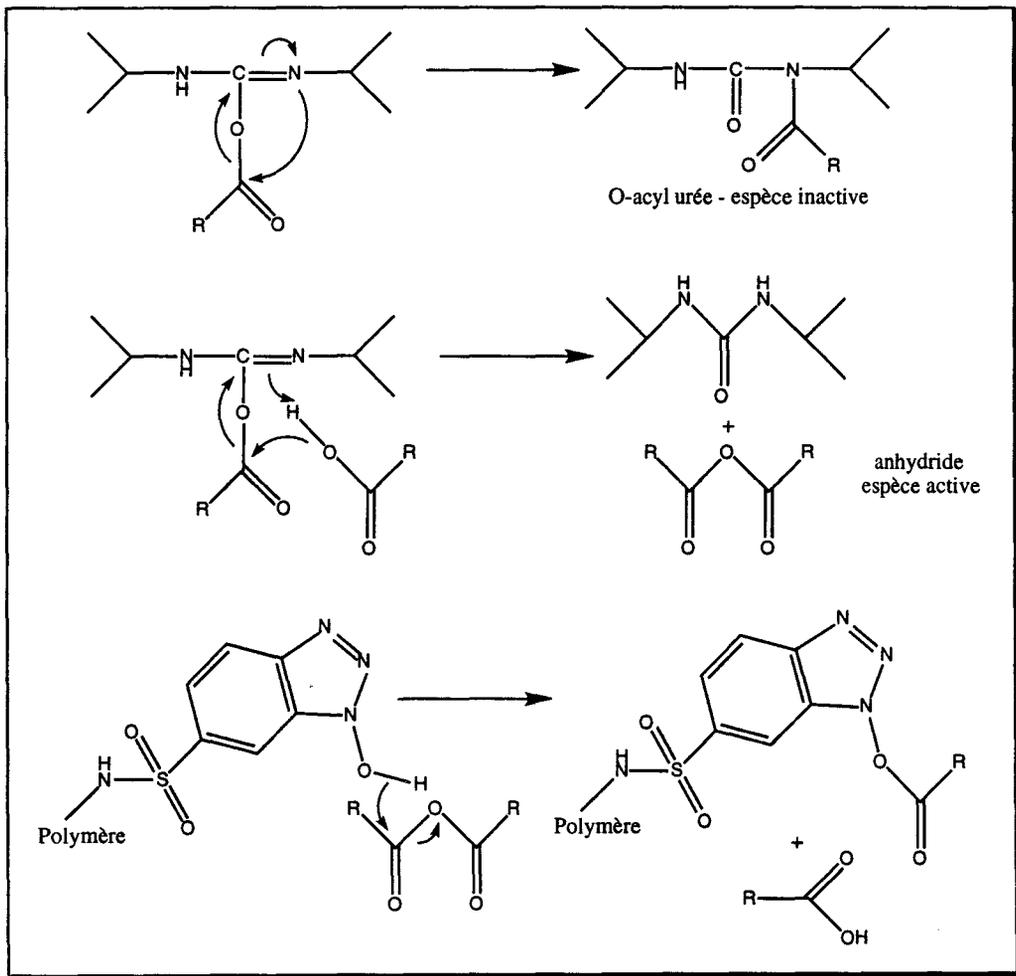


schéma 25. Réactions secondaires accompagnant la phase d'activation

Le couplage n'a pas eu lieu : le surnageant ne contenait pas de dérivé dissymétrique. Nous avons émis l'hypothèse que l'ester activé ne se formait pas. Cette hypothèse a été confirmée car la totalité de l'acide introduit dans le réacteur a été récupérée dans les eaux de lavage de la résine après activation.

Un deuxième essai avec le PyBrop activateur, la DIEA, la phényléthylamine, le DMF comme solvant et un temps d'activation total de 1 h 40 minutes a été mis en oeuvre. Le mécanisme de formation de l'ester activé intermédiaire est le même qu'en phase homogène (schéma 26).

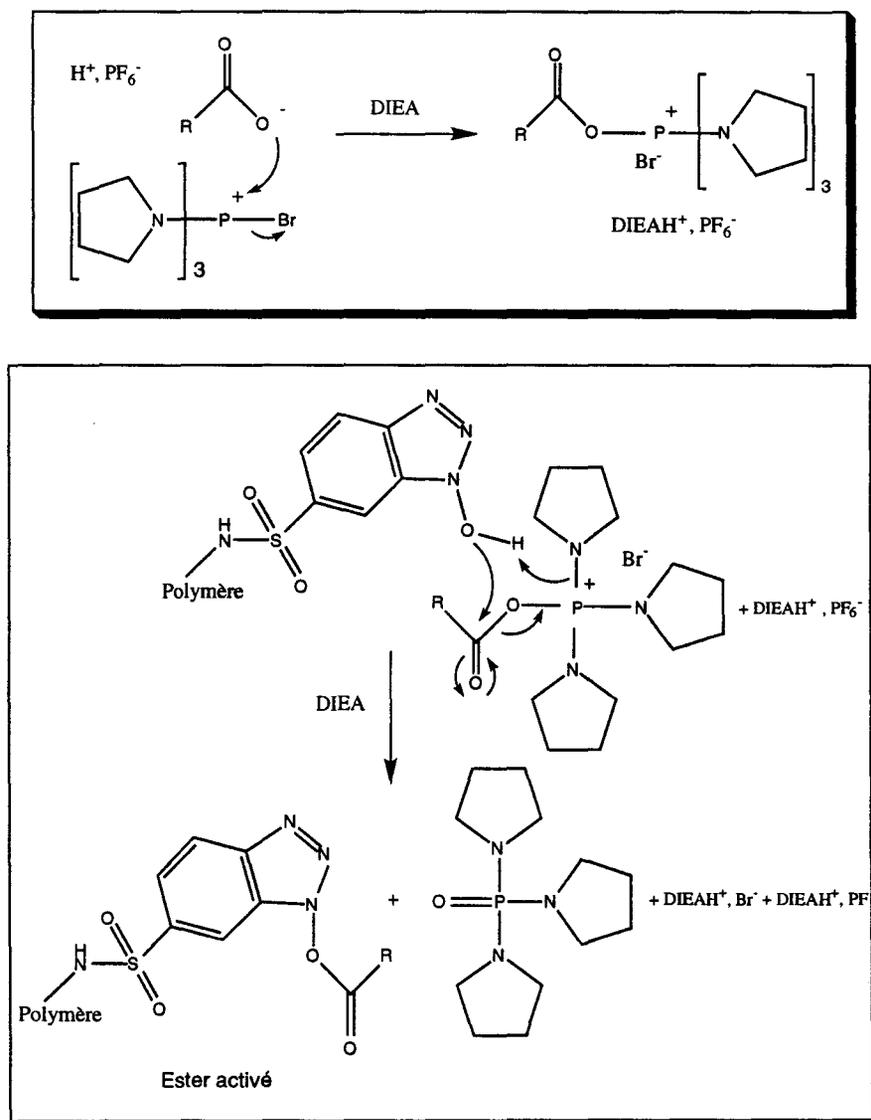


schéma 26. Mécanisme d'activation par le PyBrop sur résine

Le couplage s'étant effectué avec la phénylamine, un essai a été tenté avec l'aniline, mais s'est avéré négatif, d'où l'abandon de cette méthode.

2.2.1.5. Couplage ester méthylique/amine direct

Deux essais de couplage entre l'ester méthylique correspondant à l'acide **5** et une amine ont été tentés dans le toluène ou le *mé*ta-xylène à reflux (schéma 27).^{144,145} Les deux amines mises en jeu étaient l'aniline et la benzylamine. Aucune des deux amines n'a réagi.

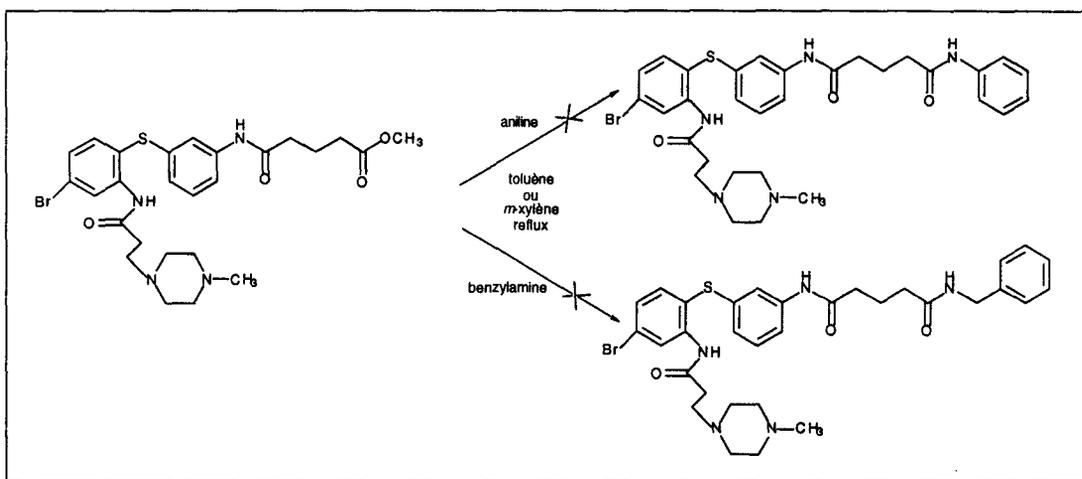


schéma 27. Couplage ester méthylique/amine direct

2.2.1.6. Couplage ester méthylique/amine avec le tribromure de bore

Le tribromure de bore réagit facilement avec les esters carboxyliques sous des conditions douces et l'addition d'amines, directement dans le milieu réactionnel, permet d'obtenir les amides avec d'excellents rendements.¹⁴⁶

La réaction de couplage entre l'ester méthylique correspondant à l'acide **45b** et l'aniline, en présence de tribromure de bore et dans CH_2Cl_2 , a été tentée (schéma 28). Le couplage n'a pas eu lieu : cette absence de produit final est peut-être dû à la trop forte

instabilité du réactif à l'air. En effet, dès l'ouverture de l'ampoule contenant le réactif pur, un dégagement gazeux important a eu lieu. Le même phénomène a été observé lors du transfert du réactif dans le milieu réactionnel. La présentation du réactif commercial ne nous a pas permis de le manipuler sous atmosphère inerte en l'absence d'une installation adaptée.

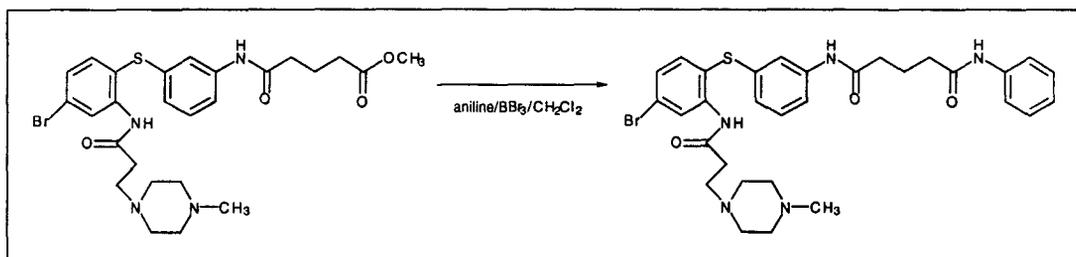


schéma 28. Couplage ester méthylique/aniline avec le tribromure de bore

2.2.1.7. Couplage ester méthylique/amine avec l'iodure de méthylmagnésium

Cette méthode de couplage tentée sur l'aniline et l'ester méthylique correspondant à l'acide carboxylique **45b** consiste en l'action de l'iodure de méthylmagnésium sur l'amine et en la réaction, à reflux, entre le complexe formé et l'ester (schéma 29).¹⁴⁷

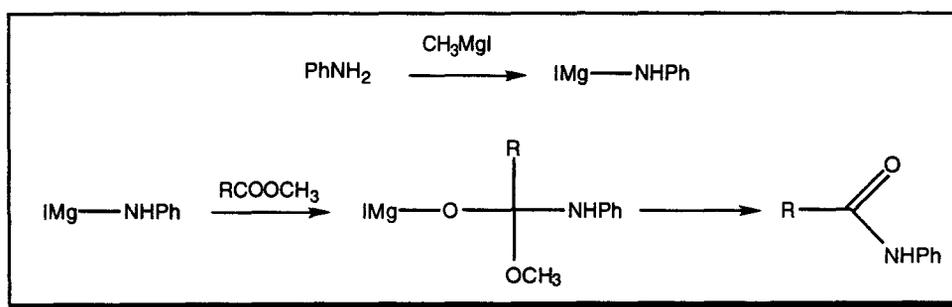


schéma 29. Couplage ester méthylique/aniline avec l'iodure de méthylmagnésium

Une solution commerciale d'iodure de méthylmagnésium dans l'éther a été utilisée. Dans tous les essais, malgré toutes les précautions mises en oeuvre pour éviter la présence d'eau dans le milieu, un précipité s'est formé à chaque ajout d'un réactif, en

particulier, lors de l'ajout de la solution commerciale de magnésien, dans le THF (solvant utilisé du fait de l'insolubilité de l'ester dans l'éther).

La formation du produit attendu a été observée (en HPLC et en TOF) mais en quantités trop faibles pour être isolé.

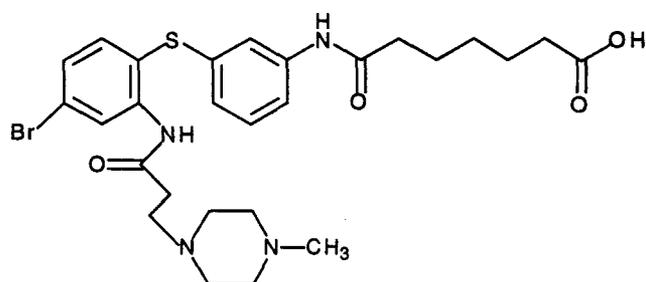
Les différentes méthodes tentées n'ont donc pas permis de coupler les amines aromatiques avec l'acide **45b** à cinq atomes de carbone.

Les résultats des tests enzymatiques effectués sur les bis(2-aminodiphénylsulfures) (voir deuxième chapitre) ayant montré que le bras espaceur à sept atomes de carbone ($n = 5$) donnait une IC_{50} du même ordre de grandeur (légèrement moins bonne) que le bras espaceur à cinq atomes de carbone ($n = 3$), nous avons décidé d'utiliser une chaîne à sept atomes de carbone pour éviter tout risque de cyclisation lors du couplage entre l'acide et l'amine considérée.

2.2.2. Couplage acide à sept atomes de carbone/amine aromatique

2.2.2.1. *Synthèse de l'acide à sept atomes de carbone*

Nous devons d'abord synthétiser l'acide **50b**, possédant une chaîne latérale aminée avec une *N*-méthylpipérazine terminale et un bras possédant sept atomes de carbone, pour les couplages ultérieurs acide/amine.



Acide **50b**

Une fois l'acide nitré formé, il ne resterait plus qu'à fixer la chaîne latérale aminée. Dans un premier temps, nous avons décidé de passer par le nitrile, hydrolysable ensuite en acide (schéma 30).¹⁴⁸

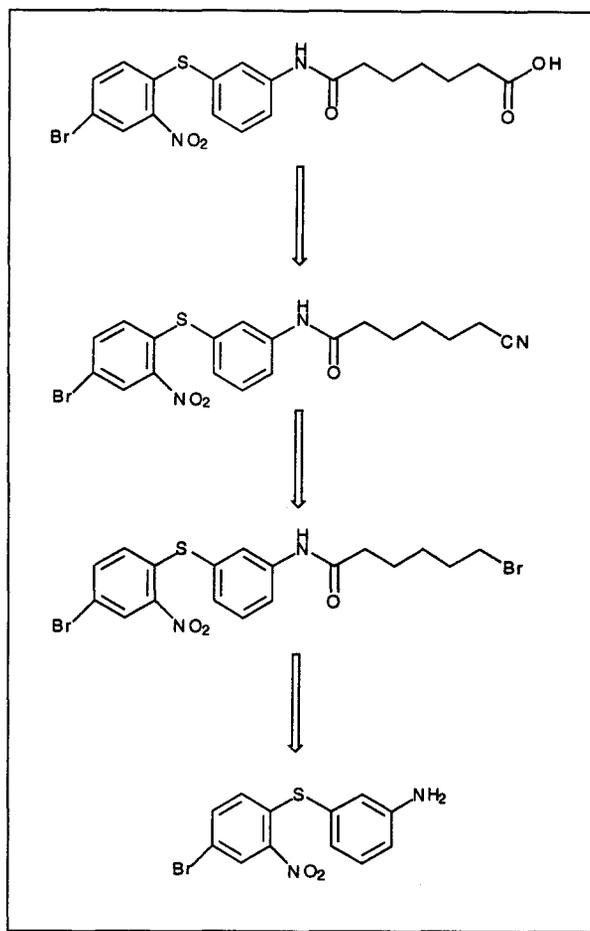


schéma 30. Rétrosynthèse de l'acide nitré

La synthèse du composé bromé se fait par acylation de la fonction amine de l'aminodiphénylsulfure par le chlorure 6-bromohexanoyle, dans le THF, en présence d'une base : la pyridine (schéma 31).

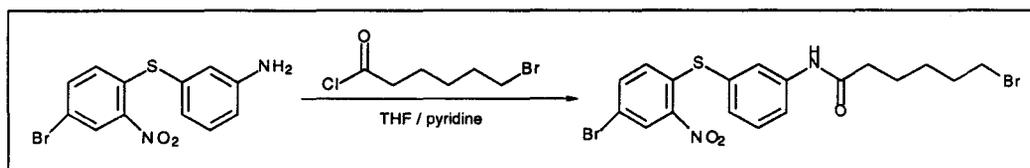


schéma 31. Formation du composé bromé

La substitution du brome par un nitrile se fait par traitement du composé bromé, dans le THF, par une solution de cyanure de potassium dans l'eau.¹⁴⁹

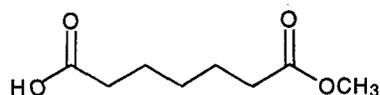
Différentes méthodes d'hydrolyse du nitrile ont été mises en oeuvre sans succès (tableau 15). Soit la coupure de la liaison amide, soit la formation de produits de décomposition, ou encore l'absence de réactivité du nitrile ont été observées.

| Essai | Réactif | Solvant | Température | Temps de réaction | Observations |
|----------------------|---------------------------------|-----------------------|-------------|-------------------|---|
| 1 | H ₂ SO ₄ | AcOH/H ₂ O | reflux | 4 h | formation de produits de décomposition |
| 2 | KOH (10 éq) | EtOH | T. amb. | 3 jours | absence de réaction du nitrile |
| 3 | KOH (10 éq.) | EtOH | reflux | 12 h | formation de produits de décomposition |
| 4 ¹⁵⁰ | KOH/H ₂ O (7 éq.) | EtOH | reflux | 12 h | formation de produits de décomposition |
| 5 ^{151,152} | HCl 12 N | HCl 12 N | reflux | 2 h ou 12 h | pas de réaction après 2 h coupure majoritaire de la liaison amide après 12 h |
| 6 ¹⁵³ | HCl 6 N | HCl 6 N | reflux | 2 h ou 12 h | pas de réaction après 2 h coupure majoritaire de la liaison amide après 12 h |
| 7 ¹⁵⁴ | NaOH (3 éq.) | H ₂ O | reflux | 12 h | absence de réaction du nitrile |

tableau 15. Essais d'hydrolyse du nitrile

De plus, nous avons essayé, sans succès, deux méthodes permettant de passer directement du nitrile à l'ester méthylique : acide chlorhydrique concentré/méthanol¹⁵⁵ ou acide sulfurique concentré/méthanol.¹⁵⁶

L'hydrolyse du nitrile n'ayant pu être réalisée, nous avons dû rechercher un autre produit de départ : l'acide 6-méthoxycarbonylhexanoïque.



acide 6-méthoxycarbonylhexanoïque

La formation du chlorure correspondant à cet acide, par le traitement avec du chlorure de thionyle dans le dichlorométhane, et le couplage de ce chlorure d'acide avec l'aminodiphénylsulfure considéré permet d'obtenir directement l'ester nitré (schéma 32) qui, après hydrolyse, donne l'acide voulu.

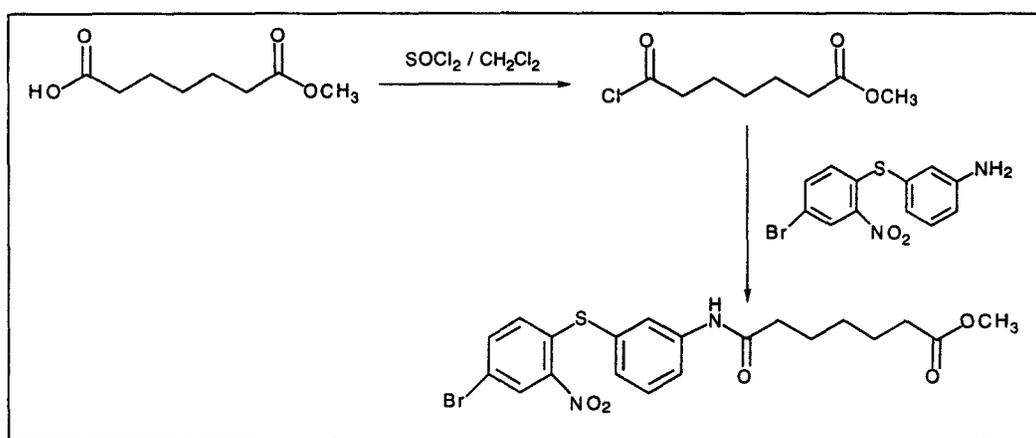


schéma 32. Formation du chlorure d'acide puis couplage avec l'amine

Les étapes suivantes se font de la même façon que dans le cas des bis(2-aminodiphénylsulfures) : réduction du groupement nitro par la méthode de Clémmsen, introduction de la chaîne latérale aminée par acylation de l'amine et substitution nucléophile par la *N*-méthylpipérazine, puis hydrolyse de l'ester méthylique par une méthode douce (bicarbonate de sodium).

Le schéma de synthèse global de l'acide **50b** à sept atomes de carbone est représenté dans le schéma 33.

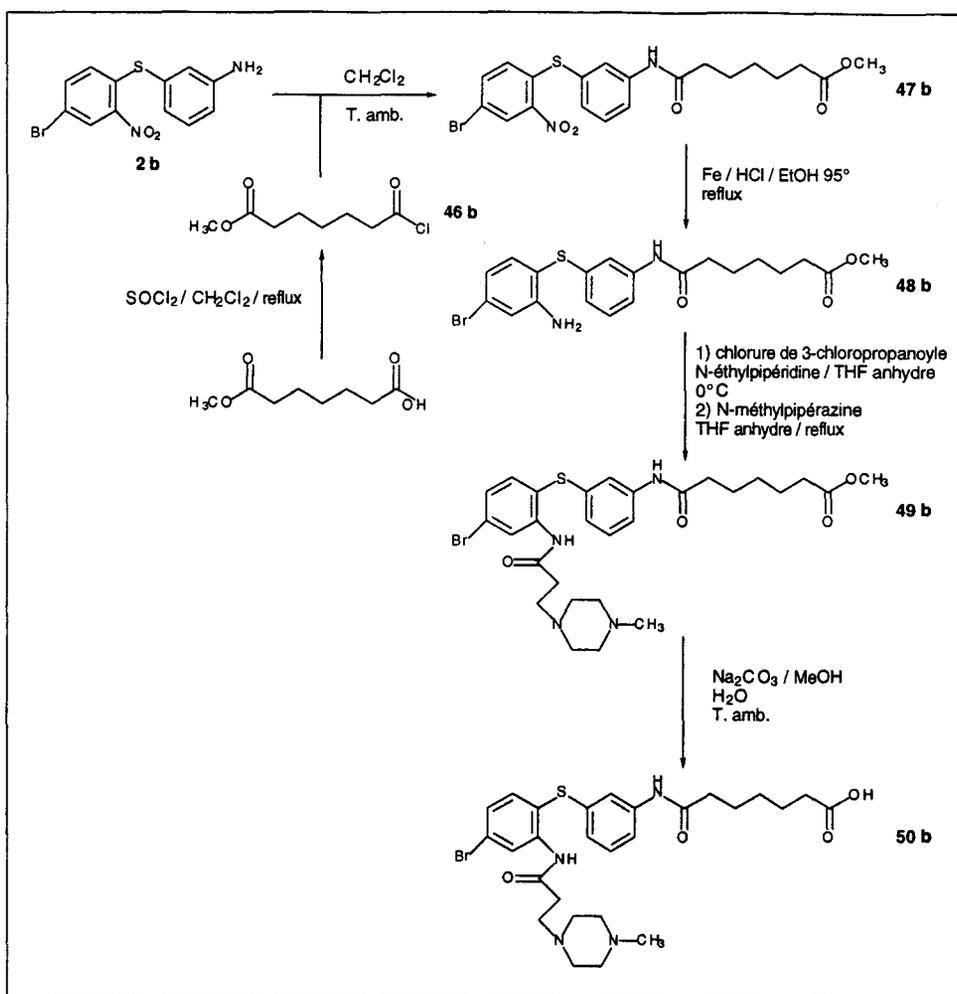


schéma 33. Synthèse globale de l'acide **50b** à sept atomes de carbone

2.2.2.2. Couplage acide/amine

a. Passage par le chlorure d'acide

Le risque de cyclisation de la chaîne étant éliminé, nous avons décidé de coupler l'acide avec les différentes amines aromatiques considérées *via* le chlorure d'acide. Nous avons réalisé différents essais utilisant le chlorure de thionyle pour former le chlorure d'acide (tableau 16). La méthode de couplage avec la 3-(2-nitro)phenylthiophenylamine est toujours la même : 1.1 équivalent d'amine et 1.5 équivalent de triéthylamine dans CH_2Cl_2 .

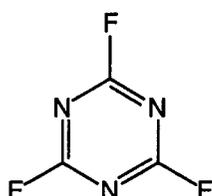
| Essai | Réactif | Nombre d'équivalents de réactif | Solvant | Température | Observations |
|-------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------|--|
| 1 | SOCl ₂ | 5 | CH ₂ Cl ₂ | reflux | pic de masse visible en TOF CCM complexe l'amine a peu réagi |
| 2 | SOCl ₂ | 5 | CH ₂ Cl ₂ | 30°C | pic de masse visible en TOF CCM complexe l'amine a peu réagi |
| 3 | SOCl ₂ | 20 | CH ₂ Cl ₂ | 30°C | pic de masse visible en TOF CCM complexe l'amine a réagi très peu de dérivé formé |
| 4 | SOCl ₂ | 40 | CH ₂ Cl ₂ | 30°C | pic de masse non visible en TOF CCM complexe l'amine a réagi produit de dégradation formé |

tableau 16. Essais de formation du chlorure d'acide

La dernière de ces méthodes a été réalisée avec l'aniline comme amine de couplage. On observe le même comportement et l'absence du dérivé attendu.

b. Passage par le fluorure d'acide

L'utilisation du chlorure de thionyle s'étant révélée infructueuse, nous avons décidé de passer intermédiairement par le fluorure d'acide. Les fluorures d'acide sont formés dans des conditions plus douces et sont plus stables que les chlorures d'acide, ils sont isolables après un traitement aqueux. Ils sont rarement utilisés en synthèse organique du fait de leur moindre réactivité supposée vis-à-vis de nucléophiles communs. En fait, certains fluorures peuvent réagir rapidement avec des amines aromatiques.¹⁵⁷ Le réactif de base est la 2,4,6-trifluoro-1,3,5-triazine ou fluorure de cyanuryle. Il a été introduit par Olah¹⁵⁸ comme réactif de conversion des acides carboxymiques en fluorures d'acide.



2,4,6-trifluoro-1,3,5-triazine ou fluorure de cyanuryle

Le fluorure d'acide se forme par action de la 2,4,6-trifluoro-1,3,5-triazine dans le dichlorométhane en présence de pyridine (schéma 34). La 2,4,6-trifluoro-1,3,5-triazine se transforme en 2,4,6-trihydroxy-1,3,5-triazine.

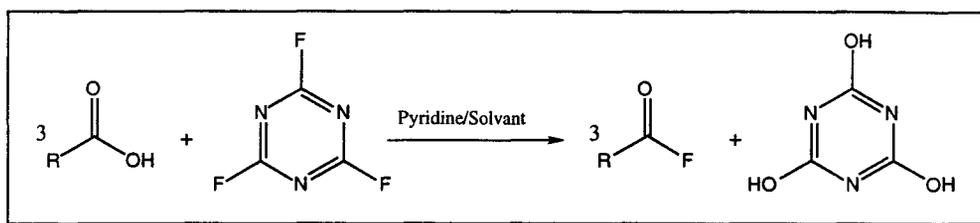


schéma 34. Formation d'un fluorure d'acide

La pyridine catalyse la réaction de fluorination des acides carboxyliques avec le fluorure de cyanuryle (schéma 35).¹⁵⁸ Cette dernière passe par la formation d'un ion carboxylate constitué de l'acide carboxylique et de la pyridine. Cet ion est déplacé par le fluorure de cyanuryle. Le dérivé monohydroxylé du fluorure de cyanuryle formé réagit avec une nouvelle molécule d'acide carboxylique. Il en résulte un dérivé dihydroxylé du réactif qui réagit de la même façon sur une molécule d'acide. Ainsi, une molécule de fluorure de cyanuryle permet de former trois molécules de fluorure d'acide.

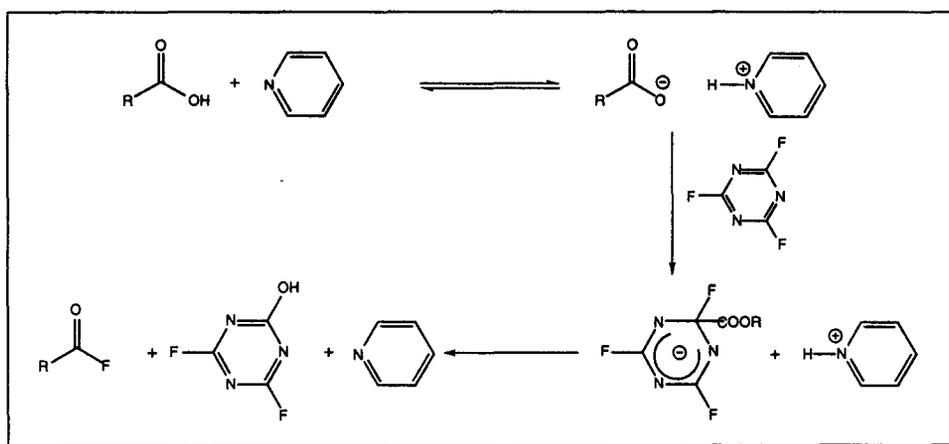


schéma 35. Mécanisme de formation du fluorure d'acide

Différentes méthodes de synthèse des fluorures d'acide ont déjà été publiées (tableau 17).

| Méthode | Acide | Pyridine | Fluorure de cyanuryle | Solvant | Température | Temps de réaction |
|------------------|-------|----------|-----------------------|---------------------------------|-------------|-------------------|
| 1 ¹⁵⁸ | 1 éq. | 1 éq. | 0.3 éq. | acétonitrile | T. amb. | 1 h |
| 2 ¹⁵⁹ | 1 éq. | 1 éq. | 1 éq. | CH ₂ Cl ₂ | T. amb | 2-3 h |
| 3 ¹⁶⁰ | 1 éq. | 1 éq. | 2 éq. | CH ₂ Cl ₂ | -20 à -10°C | 1 h |
| 4 ¹⁶¹ | 1 éq. | 1 éq. | 8 éq. | CH ₂ Cl ₂ | reflux | 2 h |

tableau 17. Différentes méthodes de synthèse d'un fluorure d'acide

En premier lieu, nous avons essayé la méthode 3, puis, le fluorure d'acide formé était ajouté à un mélange d'amine (2 équivalents) et de pyridine (3 équivalents) dans CH₂Cl₂. Lors du couplage, les rendements variaient de façon conséquente suivant l'amine aromatique mise en jeu (40% dans le cas de l'aniline à 10% dans le cas de la 1-aminoanthraquinone).

Cette méthode a été retenue pour le couplage de toutes les amines aromatiques considérées avec l'acide à sept atomes de carbone.

Nous avons également essayé de synthétiser le chlorure d'acide avec un réactif analogue au fluorure de cyanuryle : la 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine ou chlorure de cyanuryle¹⁶². Mais, le couplage avec la 3-(2-nitro)phenylthiophenylamine n'a pas eu lieu.

II. Résultats enzymatiques et Discussion

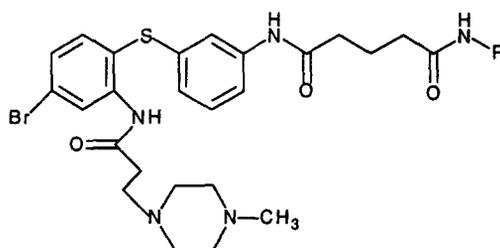
Nous avons mesuré les IC₅₀, sur la trypanothion réductase, de notre série de composés dissymétriques dans le but de déterminer le rôle des différents éléments de structure de la deuxième entité noyau hydrophobe-chaîne latérale aminée.

Pour cette série, les mesures des IC₅₀ ont été faites en présence d'une concentration en substrat T(S)₂ de 57 μM (correspondant au K_m du substrat pour l'enzyme). Le composé pris comme référence était le bis(2-aminodiphénylesulfure) **5b** présentant une IC₅₀ de 1.8 μM.

1. Amines aliphatiques

1.1. Tests spectrophotométriques

1.1.1. Résultats



| Molécule | - NHR | Amine | IC ₅₀ (μM) |
|----------|-------|-------------------------|-----------------------|
| 51b | | benzylamine | 35 |
| 52b | | cyclohexylamine | 47 |
| 53b | | diphénylméthylamine | 28 |
| 54b | | 2-naphtalèneméthylamine | 25 |
| 55b | | adamanthaneméthylamine | > 60 |
| 56b | | phénéthylamine | 20 |
| 57b | | hexadécylamine | > 60 |
| 58b | | heptylamine | 23 |
| 59b | | diéthylamine | > 60 |
| 60b | | 1-pyridineméthylamine | > 60 |
| 61b | | pipéronylamine | 33 |
| 62b | | tétrahydrofurfurylamine | > 60 |

[T(S)₂] = 57 μM

1.1.2. Discussion

Le remplacement de la seconde partie aromatique des bis(2-aminodiphénylesulfures) par différentes amines aliphatiques n'a pas permis d'optimiser l'activité inhibitrice sur la TR. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des cycles aromatiques :

- au nombre de un ou deux :

benzylamine ($IC_{50} = 35 \mu M$), diphenylamine ($IC_{50} = 28 \mu M$), naphthalèneméthylamine ($IC_{50} = 25 \mu M$), phénéthylamine ($IC_{50} = 20 \mu M$), pipéronylamine ($IC_{50} = 33 \mu M$) ;

- une fonction amide substituée en β ou γ :

benzylamine ($IC_{50} = 35 \mu M$), phénéthylamine ($IC_{50} = 20 \mu M$) ;

- une fonction amide substituée par une courte chaîne aliphatique :

heptylamine ($IC_{50} = 23 \mu M$).

La présence d'un cycle aliphatique, d'une longue chaîne aliphatique ou de deux chaînes courtes en α de la fonction amide entraîne une forte diminution de l'inhibition sur la TR ($IC_{50} = 47$ ou $> 60 \mu M$).

1.2. Tests Janssen

1.2.1. Résultats

| Produit | Modèle | Activité <i>in vitro</i> (μM) | | | | | |
|---------|--------------|--------------------------------------|------|------|------|------|------|
| | | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 |
| 51b | T.brucei | | | 100 | | 100 | |
| | T.cruzi | | T | | 0 | | |
| | L.infantum | | T | | 0 | | |
| | cytotoxicité | 100 | 100 | 100 | 0 | | |
| 52b | T.brucei | | | 100 | | 100 | |
| | T.cruzi | | T | | 0 | | |
| | L.infantum | | T | | 89 | | |
| | cytotoxicité | 100 | 100 | 100 | 13 | | |
| 53b | T.brucei | | | 100 | | 100 | |
| | T.cruzi | | T | | 0 | | |
| | L.infantum | | T | | 59 | | |
| | cytotoxicité | 88 | 89 | 88 | 0 | | |

| Produit | Modèle | Activité <i>in vitro</i> (µM) | | | | | |
|------------|----------------------------|-------------------------------|----------|------|----------|------|------|
| | | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 |
| 54b | T.brucei | | | 100 | | 100 | |
| | T.cruzi | | T | | 0 | | |
| | L.infantum cytotoxicité | 99 | T 98 | 98 | 94 98 | | |
| 55b | T.brucei | | | 100 | | 100 | |
| | T.cruzi | | T | | T | | |
| | L.infantum cytotoxicité | 97 | T 97 | 96 | T 96 | | |
| 56b | T.brucei | | | 100 | | 100 | |
| | T.cruzi | | T | | T | | |
| | L.infantum cytotoxicité | 100 | T 100 | 99 | T 98 | | |

| Produit | Modèle | Activité <i>in vitro</i> (µM) | | | | | |
|------------|----------------------------|-------------------------------|----------|------|---------|------|------|
| | | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 |
| 57b | T.brucei | | | 100 | | 70 | |
| | T.cruzi | | T | | 0 | | |
| | L.infantum cytotoxicité | 100 | T 100 | 100 | T 0 | | |
| 58b | T.brucei | | | 100 | | 100 | |
| | T.cruzi | | T | | 0 | | |
| | L.infantum cytotoxicité | 100 | T 100 | 100 | 0 73 | | |
| 59b | T.brucei | | | 100 | | 0 | |
| | T.cruzi | | T | | 0 | | |
| | L.infantum cytotoxicité | 98 | T 68 | 0 | 0 0 | | |
| 60b | T.brucei | | | 100 | | 70 | |
| | T.cruzi | | 79 | | 0 | | |
| | L.infantum cytotoxicité | 100 | T 0 | 0 | 0 0 | | |
| 61b | T.brucei | | | 100 | | 100 | |
| | T.cruzi | | T | | 0 | | |
| | L.infantum cytotoxicité | 100 | T 100 | 100 | 0 0 | | |
| 62b | T.brucei | | | 100 | | 80 | |
| | T.cruzi | | 39 | | 0 | | |
| | L.infantum cytotoxicité | 99 | 59 0 | 0 | 0 0 | | |

1.2.2. Discussion

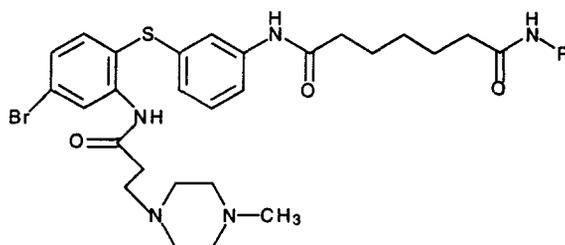
Tous ces composés sont inactifs sur la GR.

Tous ces composés se révèlent cytotoxiques. On ne peut donc rien en déduire quant à leur activité, *in vitro*, sur les parasites.

2. Amines aromatiques

2.1. Tests spectrophotométriques

2.1.1. Résultats



| Molécule | - NHR | Amine | IC ₅₀ (μM) |
|----------|-------|---|-----------------------|
| 63b | | aniline | 14 |
| 64b | | 3-(2-nitro)phénylsulfanylamine | > 30 |
| 65b | | 3-(2-amino)phénylsulfanylamine | 16 |
| 66b | | 1-anthraquinonylamine | * |
| 67b | | 2-anthraquinonylamine | * |
| 68b | | 1-(4-(<i>N</i> -(4-diméthylaminométhyl)phényl)anthraquinonyl)amine | 3.3 |

[T(S)₂] = 57 μM

2.1.2. Discussion

L'inhibition sur la TR est meilleure dans le cas des amines aromatiques que dans le cas des amines aliphatiques : par exemple, le remplacement par une simple aniline donne

une IC₅₀ (14 µM) meilleure que celle obtenue par remplacement par la benzylamine (35 µM).

La suppression d'une des deux chaînes latérales aminées confirme le rôle important de ces deux chaînes protonables dans l'interaction entre l'inhibiteur et le site actif de la TR : le remplacement de la deuxième partie entité aromatique-chaîne latérale par le 2-nitrodiphénylesulfure ou le 2-aminodiphénylesulfure correspondant entraîne une forte diminution de l'inhibition (IC₅₀ respectivement supérieure à 30 µM ou égale à 16 µM en comparaison avec une IC₅₀ de 1.8 µM pour le bis(2-aminodiphénylesulfure).

L'ajout d'une chaîne latérale aminée protonable sur une anthraquinone nous a permis d'obtenir un bon inhibiteur de la TR avec une IC₅₀ de 3.3 µM. Malheureusement, dans le cas des anthraquinones simples, des problèmes de solubilité nous ont empêché de mesurer les IC₅₀ correspondantes et de caractériser un comportement de type subversif.

2.2. Tests Janssen

2.2.1. Résultats

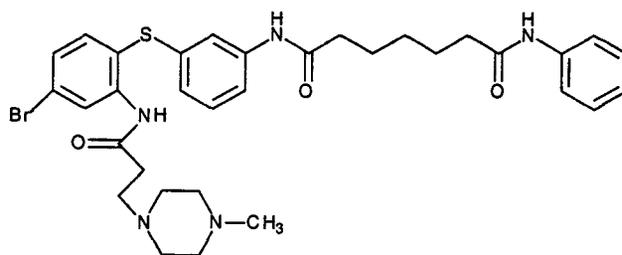
| Produit | Modèle | Activité <i>in vitro</i> (µM) | | | | | |
|---------|--------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|
| | | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 |
| 63b | T.brucei | | | 0 | | 0 | |
| | T.cruzi | | 60 | 40 | 0 | 0 | |
| | L.infantum | | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 64b | T.brucei | | | 0 | | 0 | |
| | T.cruzi | | 70 | 0 | 0 | 0 | |
| | L.infantum | | 40 | 0 | 0 | 0 | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 65b | T.brucei | | | 0 | | 0 | |
| | T.cruzi | | 70 | 0 | 0 | 0 | |
| | L.infantum | | T | 20 | 0 | 0 | |
| | cytotoxicité | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | |
| 66b | T.brucei | | | 0 | | 0 | |
| | T.cruzi | | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | L.infantum | | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 67b | T.brucei | | | 0 | | 0 | |
| | T.cruzi | | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | L.infantum | | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | cytotoxicité | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

2.2.2. Discussion

Tous ces composés sont inactifs sur la GR.

Seul le composé **65b** est cytotoxique. Cela est probablement dû à la fonction amine primaire portée par le noyau aromatique. Les composés **66b** et **67b** sont totalement inactifs. Le composé **64b** est faiblement actif mais pas spécifiquement sur *T. cruzi*.

In vitro, seul le composé **63b** présente une activité spécifique sur *T. cruzi* intéressante. Malheureusement, cette activité ne peut être corrélée avec une activité sur la TR.

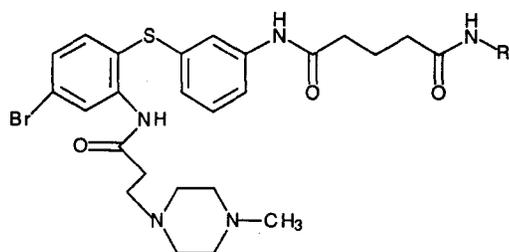


composé **63b**

Conclusion

La synthèse de dérivés dissymétriques formant une troisième génération d'inhibiteurs de la famille des 2-aminodiphénylsulfures n'a pas permis d'optimiser l'activité inhibitrice sur la trypanothion réductase.

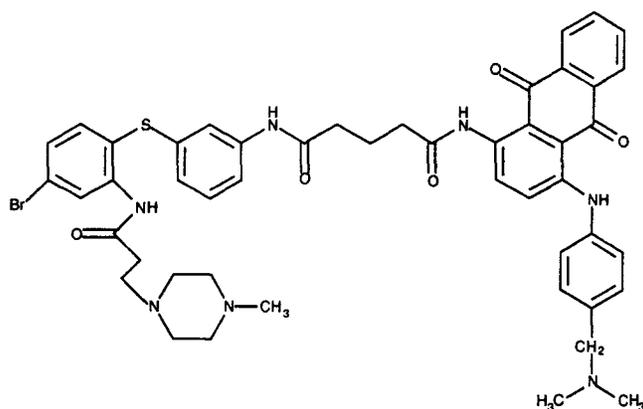
Mais, différentes caractéristiques structurales apparaissent comme plus favorables à l'inhibition. En effet, le dérivé dissymétrique constitue un inhibiteur plus actif sur la TR s'il possède les attributs structuraux suivants :



- l'amine RNH_2 est aromatique ; une amine aliphatique est beaucoup moins favorable.

- le groupement R est constitué d'un groupement hydrophobe (pouvant interagir avec la poche hydrophobe du site actif de la TR) portant une chaîne latérale aminée pouvant se protoner et ainsi interagir avec des résidus acides du site : la suppression d'une des deux chaînes latérales des bis 2-aminodiphénylsulfures entraîne une forte diminution de l'activité inhibitrice sur la TR.

- la meilleure inhibition a été obtenue avec un groupement anthraquinonyle portant une chaîne latérale aminée (composé **68b**).



composé **68b**

Du fait de la bonne activité du composé **68b**, des études sont actuellement en cours pour faire varier la quinone substituée par une chaîne latérale aminée qui jouera le rôle du groupement R. Ainsi, l'étude du caractère de substrat subversif de ce type

d'inhibiteurs de la trypanothion réductase pourra être approfondi. Ces études font l'objet d'une partie de la thèse de Laurence Salmon.

Les tests réalisés *in vitro* sur le parasite ne montrent pas de corrélation franche entre les activités TR et les activités, *in vitro*, sur *Trypanosoma cruzi*.

Cinquième chapitre

Les bis(2-aminodiphénylsulfures)

à trois chaînes latérales :

Une quatrième génération d'inhibiteurs de la TR



Introduction

Préalablement à ce travail, une étude de modélisation moléculaire, des calculs de dynamique moléculaire¹¹⁵ et l'élucidation par cristallisation et diffraction aux rayons X du complexe TR-mépacrine⁹¹ ont montré :

- d'une part, l'intérêt d'accroître le nombre de chaînes latérales aminées pour améliorer les interactions site-inhibiteur,
- d'autre part, la possibilité pour la poche hydrophobe du site actif de la TR d'accueillir une entité aromatique plus importante.

Ces résultats nous ont conduit à la synthèse de bis(2-aminodiphénylsulfures). Ces derniers se sont révélés être de très bons inhibiteurs de la trypanothion réductase de *Trypanosoma cruzi*. Bien que leur positionnement dans le site actif de la TR ne soit pas encore vraiment défini, leur bonne activité inhibitrice sur la TR a confirmé nos hypothèses de départ.

Pour tenter d'optimiser les interactions site actif-inhibiteur, nous avons synthétisé une quatrième génération d'inhibiteurs : des bis(2-aminodiphénylsulfures) portant une troisième chaîne latérale (figure 42).

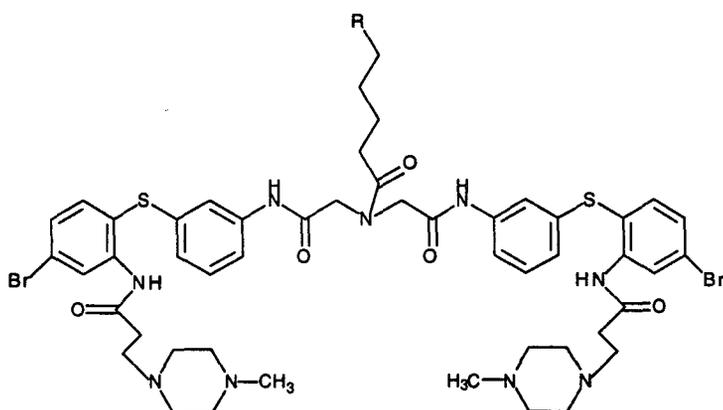


figure 42. Quatrième génération d'inhibiteurs de la TR

Pour étudier les interactions et le positionnement de cette chaîne supplémentaire vis-à-vis du site actif de la trypanothion réductase, différents groupements fonctionnels ont été choisis, pour justifier une certaine diversité, et placés en position terminale :

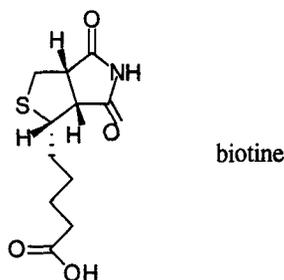
- un groupement acide carboxylique pouvant interagir avec un groupement aminé ou guanidinium,
- un groupement aminé pouvant interagir avec l'extrémité carboxylate d'un résidu glutamique,

Sur la fonction amine terminale ainsi obtenue ont été fixées quatre entités pouvant engendrer des interactions hydrophobes avec le site actif de la trypanothion réductase :

- un groupement 9-fluorénylméthylloxycarbonyle,
- un groupement *tert*-butylloxycarbonyle,
- un groupement naphthalénoyle,
- une longue chaîne grasse à 14 atomes de carbone (l'acide tétradécanoïque, ou acide myristique permet, de plus, de faciliter la pénétration intracellulaire),
- un groupement biotinyloxy pouvant établir des liaisons hydrogène, par ses azotes ou son carbonyle, ou des interactions hydrophobes par ses hétérocycles.

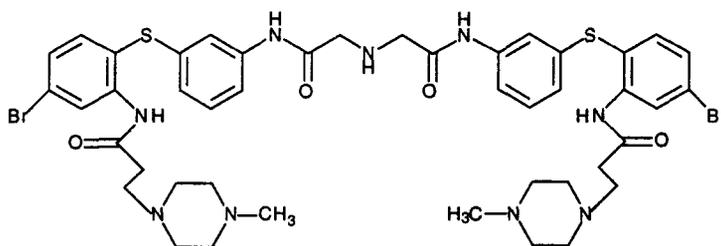
Ce dernier groupement possède de surcroît une potentialité de marqueur qui sera discutée dans le sixième chapitre.

Pour conserver la même distance entre la fonction amine tertiaire centrale et le groupement terminal, la longueur de chaîne correspondant à la biotine a été systématiquement conservée : une chaîne à cinq atomes.



I. Synthèse des composés

La synthèse des bis(2-aminodiphénylsulfures) de cette série passe, dans un premier temps, par l'obtention du bis(2-aminodiphénylsulfure) **75b** analogue du composé **26b** possédant une fonction amine secondaire au centre du bras espaceur. Cette fonction peut, ensuite, permettre la fixation d'une troisième chaîne de longueur constante, mais de groupement terminal variable.



composé **75b**
analogue de **26b** possédant une fonction amine secondaire au centre du bras espaceur

Du fait des mauvais rendements de synthèse du composé **38b**, dus aux nombreuses fonctions amines présentes dans les deux chaînes latérales, nous avons choisi de baser la structure de notre quatrième génération d'inhibiteurs de la TR sur l'analogue du composé **26b** possédant une fonction amine secondaire au centre du bras espaceur.

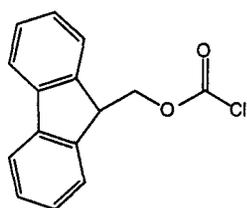
1. Synthèse du bis(2-aminodiphénylsulfure) possédant une fonction amine secondaire centrale

Le produit de départ de cette synthèse est l'acide iminodiacétique. Nous souhaitons coupler les fonctions acide de ce dernier avec deux molécules de 3-(4-bromo-2-nitro)phénylthiophénylamine.

Mais, préalablement, nous devons protéger la fonction amine secondaire centrale pour éviter toute réaction secondaire intra- ou intermoléculaire lors du couplage. Le groupement Boc (*tert*-butyloxycarbonyl) ne résistant pas au traitement acide¹⁶³ et la

réduction ultérieure des groupements nitro faisant intervenir l'acide chlorhydrique concentré, nous avons opté pour une protection avec le groupement Fmoc (9-fluorénylméthylloxycarbonyle).

Ce groupement¹⁶⁴ résiste à un traitement acide et aux hydrogénations catalytiques, contrairement à la plupart des groupements protecteurs classiquement utilisés dans le cas des amines. Il est facilement éliminé par un traitement doux : pipéridine, morpholine, DIEA pour donner l'amine déprotégée et du dibenzofulvène.¹⁶⁵ La protection se fait par un traitement par le chloroformate de 9-fluorénylméthyle (Fmoc-Cl) dans un mélange dioxanne/Na₂CO₃/H₂O.



chloroformate de 9-fluorénylméthyle

Différents essais de couplage ont été mis en oeuvre avec la 3-(4-bromo-2-nitro)phénylthiophénylamine (tableau 18).

| Essai | Réactif | Solvant | Température |
|----------------|--------------------------------|----------------------------------|-------------|
| 1 ^a | chlorure de thionyle | SOCl ₂ | reflux |
| 2 | 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine | CH ₂ Cl ₂ | -10°C |
| 3 ^b | 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine | DMF | -10°C |
| 4 ^b | 2,4,6-trifluoro-1,3,5-triazine | DMF | -10°C |
| 5 ^b | 2,4,6-trifluoro-1,3,5-triazine | <i>N</i> -méthyl-2-pyrrolidinone | -10°C |

^a : cette réaction a été faite dans SOCl₂ pur du fait de la faible solubilité de l'acide portant un groupement Fmoc dans CH₂Cl₂.

^b : l'utilisation de ces deux solvants (DMF et *N*-méthyl-2-pyrrolidinone) a été rendue nécessaire par la faible solubilité dans CH₂Cl₂ de l'acide portant un groupement Fmoc.

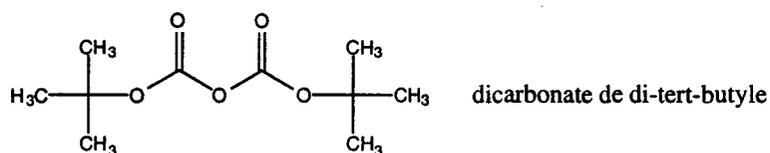
tableau 18. Essais de couplage acide/amine

Plusieurs réactifs ont été utilisés pour former le chlorure ou le fluorure d'acide à partir de l'acide iminodiacétique, dont la fonction amine secondaire était protégée par un groupement Fmoc. Ensuite, le couplage avec l'amine était toujours réalisé de la même façon : le chlorure ou le fluorure d'acide, repris dans CH_2Cl_2 , était ajouté à une solution de la 3-(4-bromo-2-nitro)phénylthiophénylamine (4 équivalents) et de pyridine (5 équivalents) dans CH_2Cl_2 .

Nous n'avons jamais observé la formation du bis(2-aminodiphénylsulfure) nitré attendu. La 3-(4-bromo-2-nitro)phénylthiophénylamine restait toujours présente ainsi que le diacide. Dans le cas du passage par un dichlorure d'acide, nous ne pouvions pas savoir si l'intermédiaire se formait du fait de son instabilité. Dans le cas du fluorure d'acide intermédiaire, ce dernier ne semble pas se former, le pic de masse attendu n'apparaissant pas en TOF.

Nous avons donc décidé d'essayer la protection de la fonction amine secondaire par un groupement Boc. Puis, une déprotection et une protection par un groupement Fmoc devaient nous permettre d'achever la synthèse du composé **75b**.

Cette réaction de protection par un groupement Boc est réalisée grâce au dicarbonate de di-*tert*-butyle (Boc_2O) dans un mélange dioxane/ NaOH 2 N/ H_2O .¹⁶⁶



Une fois le groupement Boc fixé sur la molécule, la méthode de couplage testée a consisté au passage intermédiaire par l'anhydride d'acide, formé par l'action de la dicyclohexylcarbodiimide sur le diacide, puis, à la réaction directe de cet anhydride sur la 3-(4-bromo-2-nitro)phénylthiophénylamine.¹⁶⁶ Une des deux fonctions acide se couple ainsi avec une amine (schéma 36).

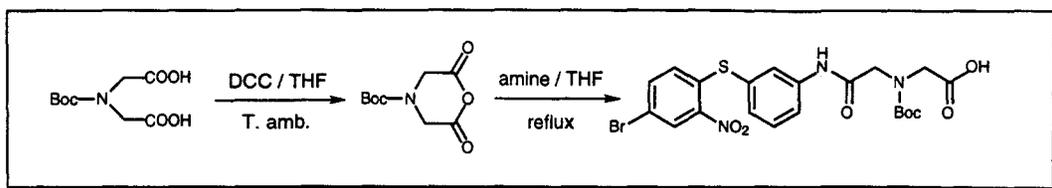


schéma 36. Passage par l'anhydride intermédiaire puis couplage d'une fonction amine

Puis, la formation du fluorure, à partir de l'acide obtenu, a permis de coupler la deuxième amine (schéma 37).

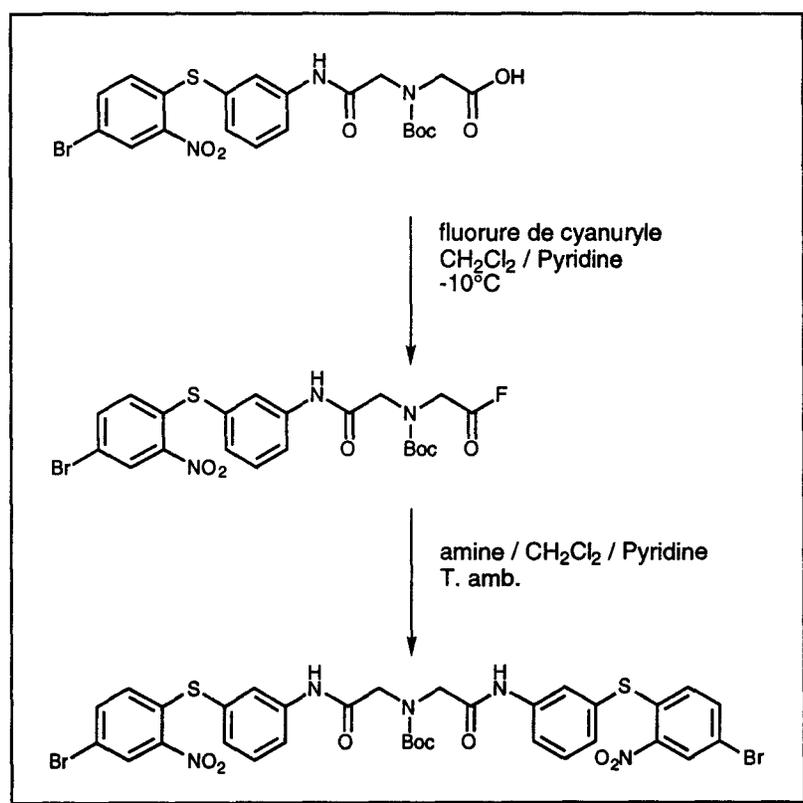


schéma 37. Couplage de la deuxième partie aromatique

Préalablement à la réduction des groupements nitro, qui se fait en présence d'acide chlorhydrique concentré, le groupement Boc, instable dans ces conditions, a été remplacé par le groupement Fmoc, la déprotection préalable de l'amine secondaire centrale se faisant par traitement avec un mélange CH₂Cl₂/CF₃COOH-1/1 (schéma 38).

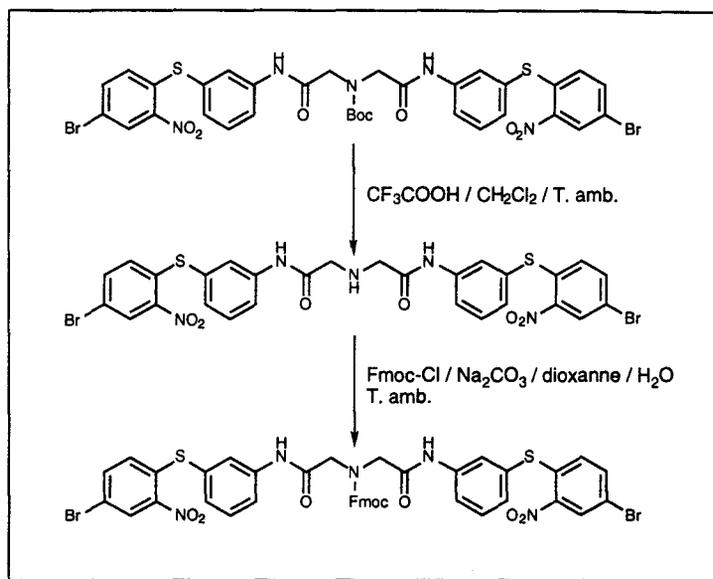


schéma 38. Changement de groupement protecteur de la fonction amine centrale

La réduction des groupements nitro se fait avec du fer en poudre, de l'acide chlorhydrique concentré dans l'éthanol à 95°.

Le protocole mis en oeuvre pour fixer les deux chaînes latérales aminées provoque, simultanément, la déprotection de la fonction amine secondaire (schéma 39). En effet, la dernière étape (amination) fait intervenir la *N*-éthylpipéridine, puis la *N*-méthylpipérazine, et le clivage d'un groupement Fmoc porté par une fonction amine se fait par un traitement doux avec une amine basique (pipéridine, morpholine, diisopropyléthylamine).¹⁶⁷

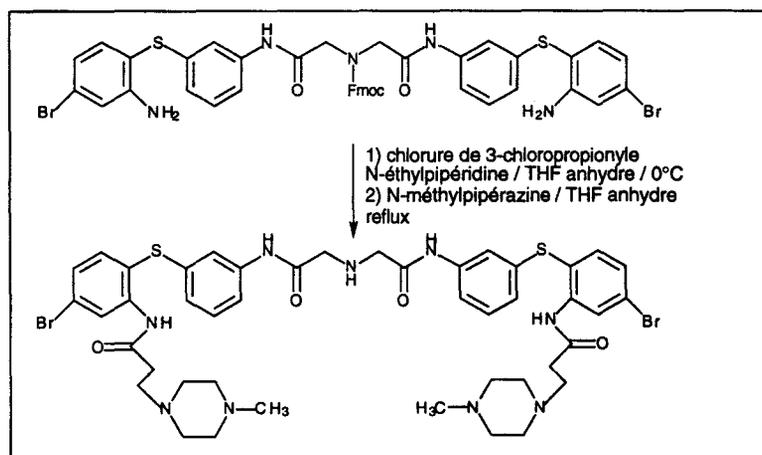


schéma 39.

Fixation des chaînes latérales aminées et déprotection simultanée de la fonction amine secondaire centrale

Le schéma de synthèse du bis(2-aminodiphénylsulfure), analogue de **26b** possédant une fonction amine secondaire au centre du bras espaceur est donc le suivant (schéma 40) :

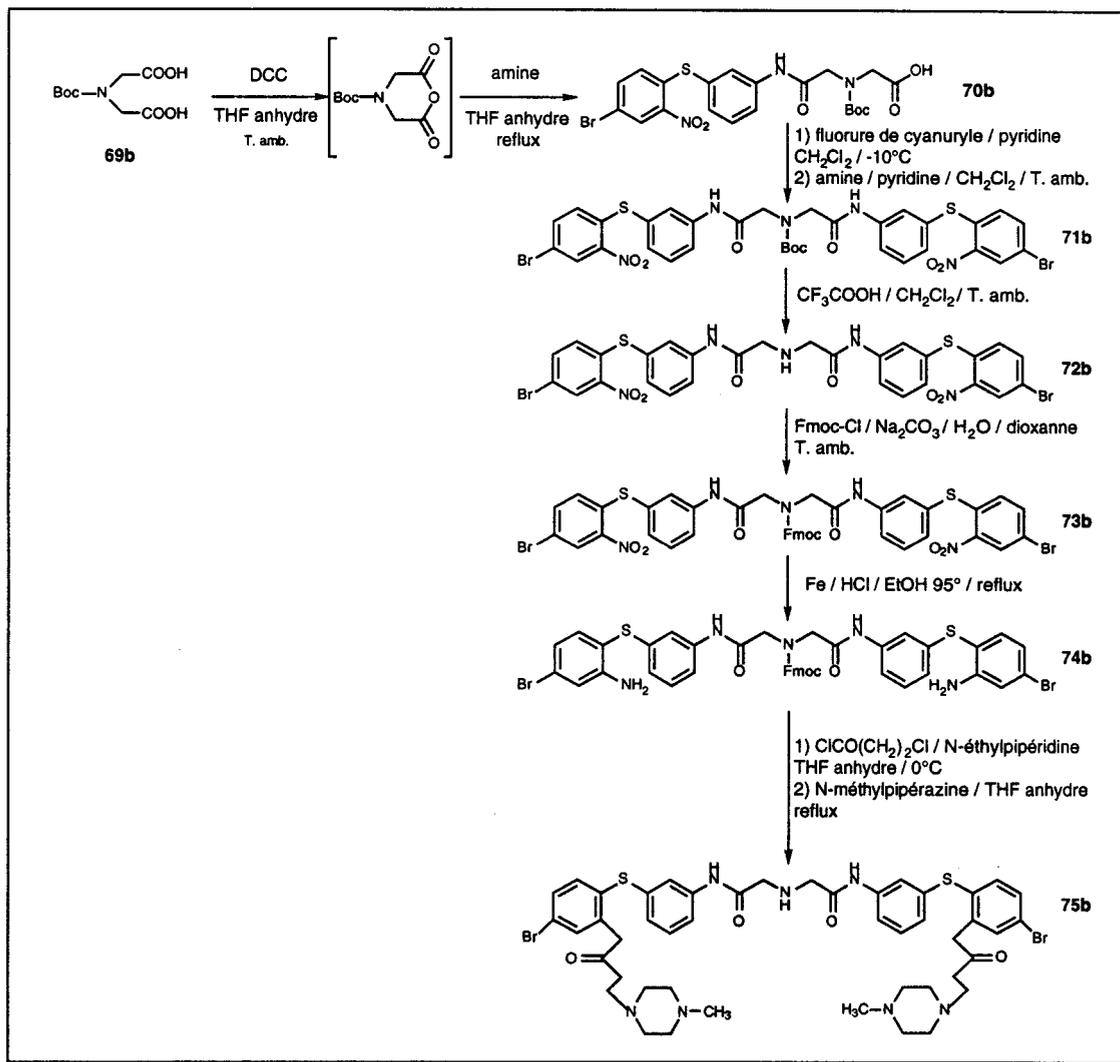


schéma 40. Synthèse globale du composé possédant une amine centrale

2. Acylation de la fonction amine secondaire libre

Dans le cadre de notre étude sur l'activité inhibitrice des composés substitués, dérivés des bis(2-aminodiphénylsulfures), pour ne faire varier qu'un seul paramètre de structure, nous avons choisi de fixer, sur la fonction amine secondaire centrale, une

chaîne carbonée de longueur fixe. Ainsi, seul varie le groupement terminal. La longueur de chaîne choisie correspond à celle de la biotine : elle compte cinq atomes.

2.1. Acide en position terminale

La longueur de chaîne choisie comprenant cinq atomes, le réactif utilisé est l'anhydride glutarique. La fixation de la chaîne possédant une fonction acide libre en position terminale se fait par action de l'anhydride glutarique sur le composé **75b** dans la pyridine (schéma 41).

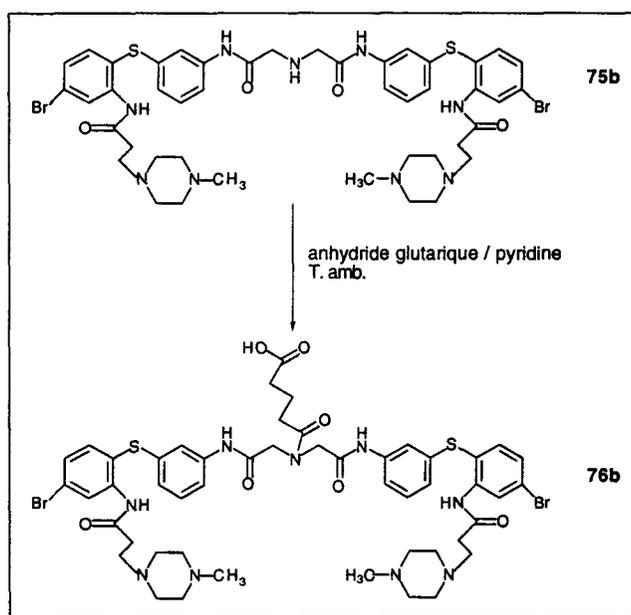


schéma 41.

Fixation de la chaîne possédant une fonction acide en position terminale

Dans le cas de tous les autres composés, la fixation de la chaîne se fait par la méthode utilisée dans le schéma de synthèse mis en oeuvre dans le cas des bis(2-aminodiphénylsulfures) (voir quatrième chapitre, & 2.1.2.) : PyBrop/DIEA/DMF.

2.2. Amine libre ou substituée en position terminale

La longueur de chaîne choisie comprenant cinq atomes, le réactif utilisé est l'acide 4-aminobutanoïque. La fixation de la chaîne possédant une fonction amine libre en position terminale nécessite la protection préalable de cette fonction amine. Un essai de protection a été réalisé avec un groupement Fmoc, mais le couplage acide/amine a été infructueux.

Finalement, la fonction amine de la chaîne a été protégée par un groupement Boc (traitement avec Boc_2O /dioxane/ H_2O / NaOH 2 N) ; l'acide a été couplé avec la fonction amine secondaire du composé **75b**, puis la fonction amine terminale a été déprotégée par un traitement avec $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (schéma 42).

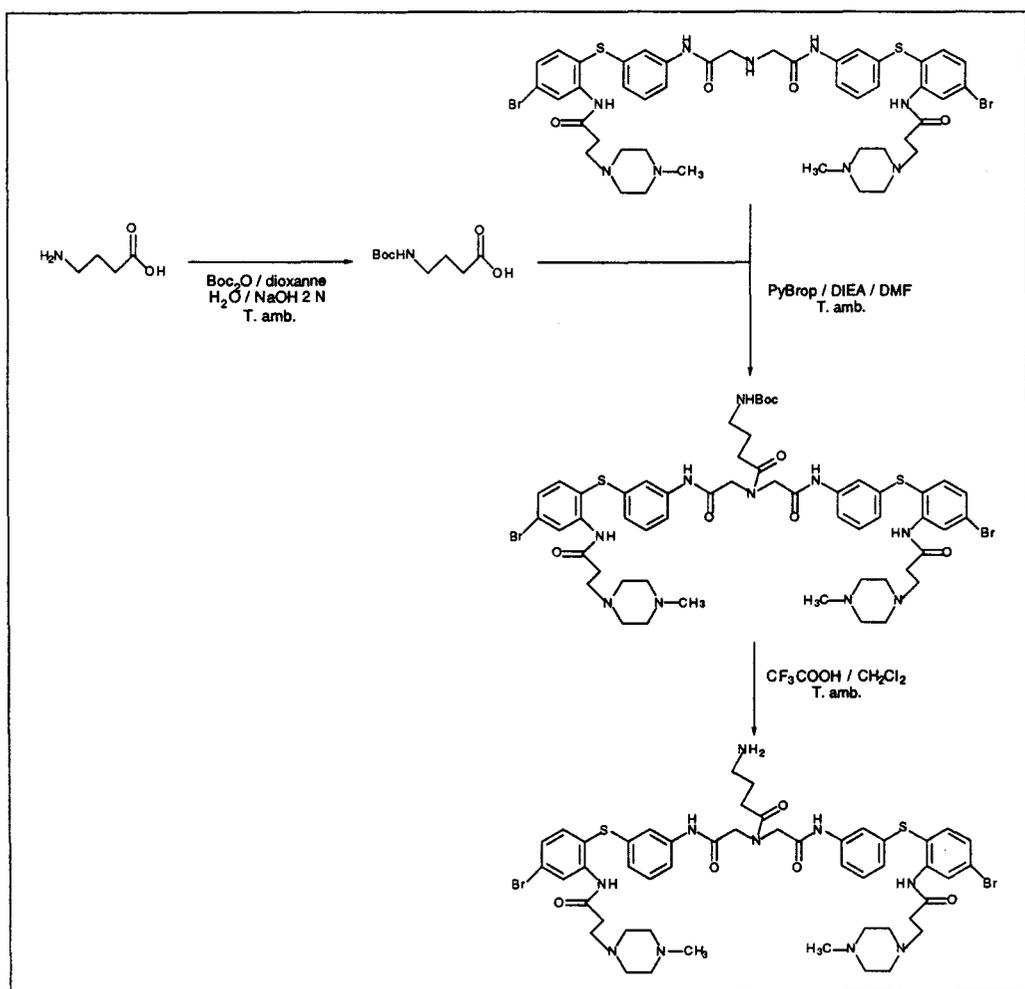


schéma 42.

Fixation de la chaîne possédant une fonction amine en position terminale

Les deux composés : fonction amine terminale libre et fonction amine terminale protégée par un groupement Boc, ont été évalués sur la TR.

D'autres groupements ont été fixés sur la fonction amine terminale et les composés correspondants évalués sur la TR :

- un groupement 9-fluorénylméthoxycarbonyle,
- une chaîne longue à 14 atomes de carbone,
- un groupement naphthalénoyle.

La fonction amine terminale du composé **78b** a été substituée par un groupement Fmoc selon la méthode Fmoc-Cl/dioxane/Na₂CO₃/H₂O (schéma 43).

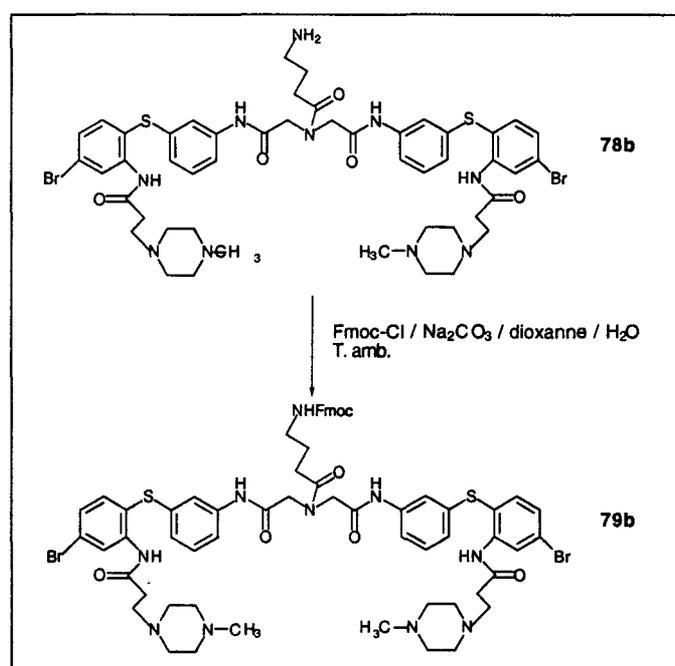


schéma 43.

Fixation d'un groupement Fmoc sur la fonction amine terminale

La chaîne longue à 14 atomes de carbone a été fixée par couplage entre le composé **75b** et l'acide tétradécanoïque par la méthode PyBrop/DIEA/DMF (schéma 44).

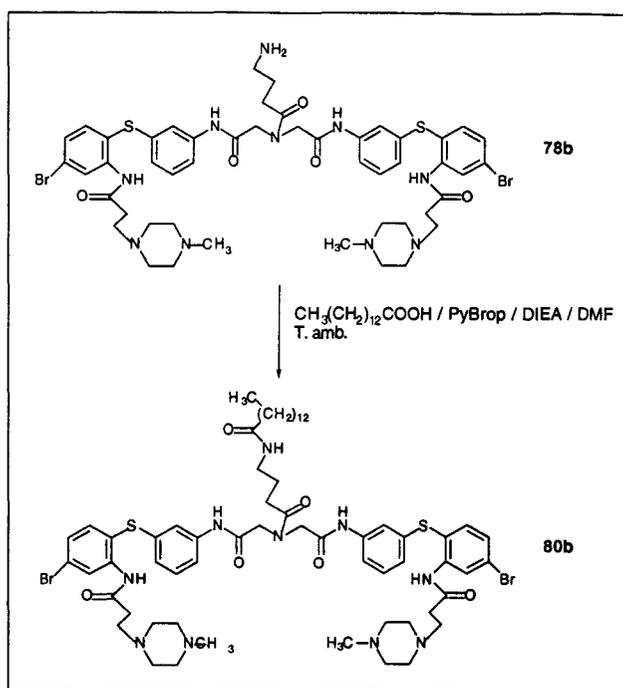


schéma 44.

Fixation d'une chaîne longue sur la fonction amine terminale

Enfin, la fixation du groupement naphthalénoyle est réalisée par couplage entre l'acide naphthalénoïque et le composé **78b** par la méthode PyBrop/DIEA/DMF (schéma 45).

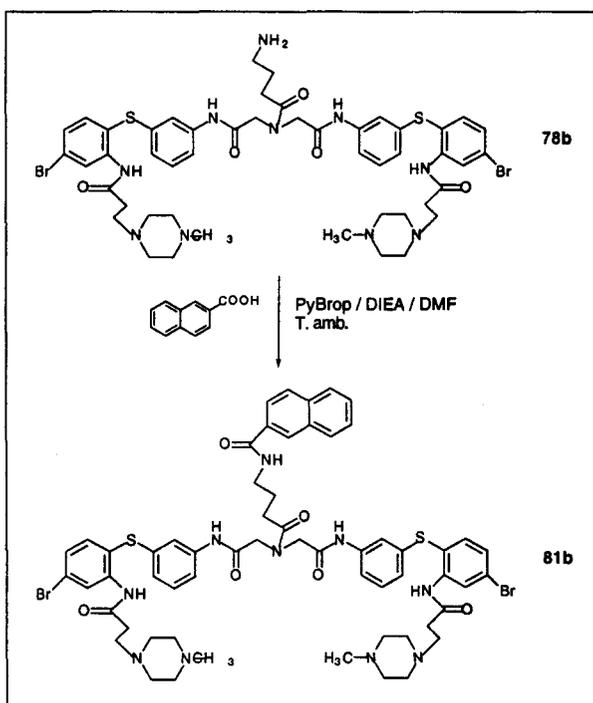


schéma 45.

Fixation du groupement naphthalénoyle sur la fonction amine terminale

2.3. Biotine

Dans le cas de la biotine, la fonction acide est activée par le PyBrop, puis, réagit sur l'amine secondaire centrale du bis(2-aminodiphénylsulfure) **75b** (schéma 46).

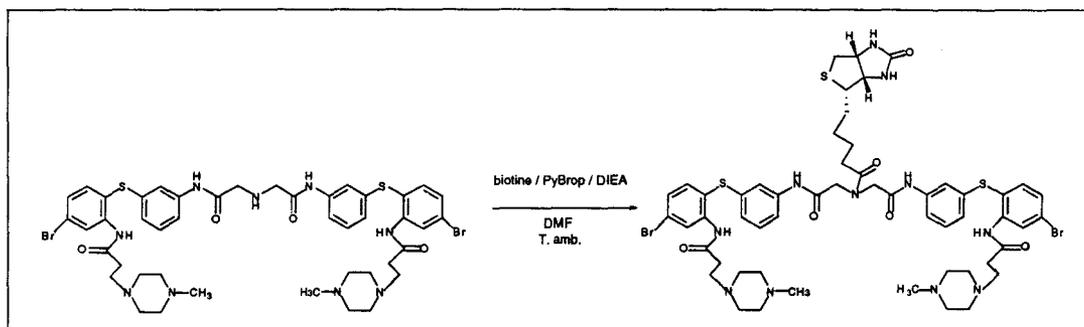


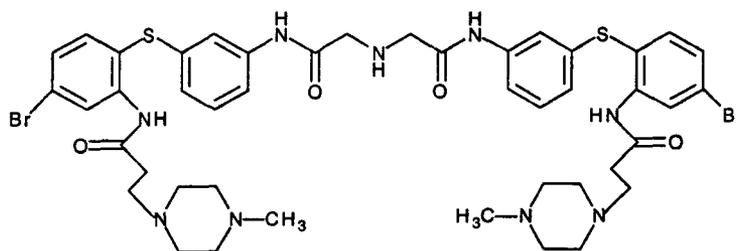
schéma 46. Fixation de la biotine

II. Résultats enzymatiques et Discussion

Tous les composés synthétisés ont été évalués par mesure de leur IC_{50} vis-à-vis de la typanothion réductase de *Trypanosoma cruzi*.

1. Résultats

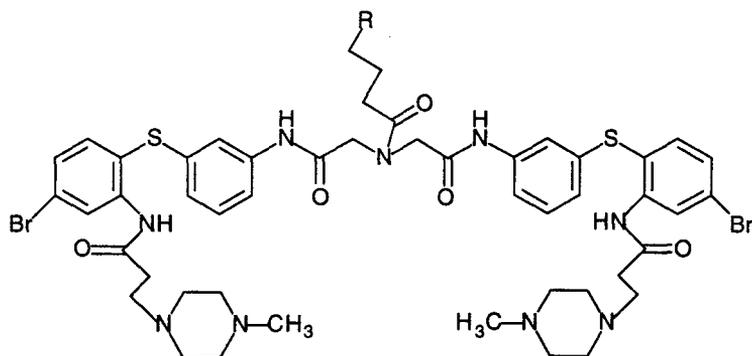
Le composé **75b**, analogue de **26b**, présente une IC_{50} de 1.5 μ M.



composé **75b**

$IC_{50} = 1.5 \mu$ M

Les IC_{50} des bis(2-aminodiphénylsulfures), portant une troisième chaîne latérale, vis-à-vis de la trypanothion réductase sont les suivantes :



| Molécule | - R | IC_{50} (μM) |
|------------|-------------------|-----------------------|
| 76b | - COOH | * |
| 77b | | 0.25* |
| 78b | - NH ₂ | 0.75* |
| 79b | | 0.6 |
| 80b | | 0.2 |
| 81b | | 0.3 |
| 82b | | 0.3 |

* : problème de solubilité à μM dans le DMSO

2. Discussion

Le remplacement d'un groupement CH_2 par une fonction amine secondaire, au centre du bras espaceur, provoque une diminution de l'activité inhibitrice (IC_{50} de $1.5 \mu\text{M}$ au lieu de $0.55 \mu\text{M}$).

Ce site protonable, au centre de la molécule, n'est donc pas favorable à l'activité inhibitrice sur la trypanothion réductase

La fixation d'une troisième chaîne latérale, par modification du bras espaceur, n'entraîne pas de chute de l'activité inhibitrice sur la trypanothion réductase. Au contraire, les composés synthétisés présentent une activité inhibitrice sur la TR équivalente ou même meilleure que celle du composé **38b** (meilleur inhibiteur de la famille des bis(2-aminodiphénylsulfures) avec une IC_{50} de $350 \mu\text{M}$).

L'ajout d'une troisième chaîne latérale semble permettre d'améliorer l'interaction entre l'inhibiteur et le site actif de la TR :

- la présence de la fonction acide a posé de gros problèmes de solubilité, mais le produit correspondant semble peu actif ;
- la fonction amine libre terminale est favorable pour l'inhibition ($\text{IC}_{50} = 750 \text{ nM}$) ; la fonction amine terminale protégée par un groupement hydrophobe ou une longue chaîne grasse (groupement Boc, Fmoc ou tétradécanoyle) est encore plus favorable avec des IC_{50} entre 200 et 600 nM ;
- la fixation de la biotine permet également d'obtenir une bonne inhibition de la TR avec une IC_{50} de 300 nM.

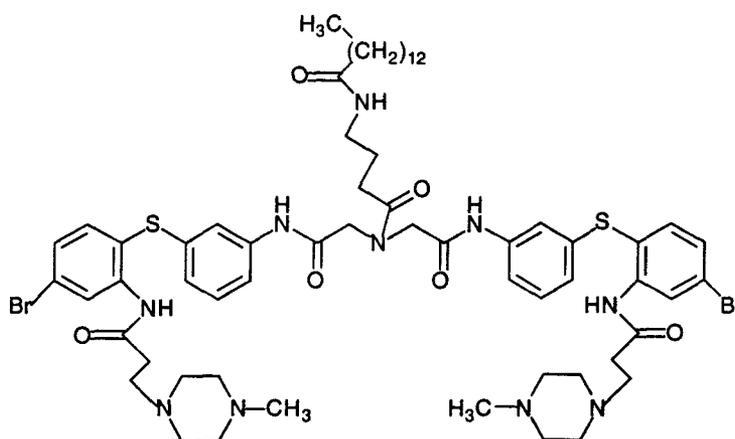
A l'extrémité de la troisième chaîne latérale, les interactions hydrophobes, avec le site actif, semblent les plus favorables, à l'inhibition de la trypanothion réductase, que les interactions ioniques.

Conclusion

La plupart des composés, présentant une entité hydrophobe à l'extrémité de la troisième chaîne latérale, donnent des IC_{50} meilleures que le bis(2-aminodiphénylsulfure) **75b** ($IC_{50} = 1.5 \mu\text{M}$), aminé au centre du bras espaceur, et que le bis(2-aminodiphénylsulfure) **26b** ($IC_{50} = 0.55 \mu\text{M}$), non aminé au centre du bras espaceur.

Les composés, pouvant engager des interactions ioniques par l'intermédiaire de cette extrémité, sont de moins bons inhibiteurs de la TR.

Le meilleur inhibiteur est obtenu avec la longue chaîne hydrophobe ($IC_{50} = 200 \text{ nM}$).



composé **80b**
 $IC_{50} = 200 \text{ nM}$

La bonne activité inhibitrice du composé **82b** sur la TR ($IC_{50} = 300 \text{ nM}$) nous a permis de commencer notre étude quant à l'évolution de ce type de molécules à l'intérieur du parasite *Trypanosoma cruzi*. Toute cette étude sera développée dans le sixième chapitre.

Sixième chapitre

Conception d'un marqueur d'affinité de la TR

Etude de sa pénétration dans le parasite

et de sa localisation ultérieure

Introduction

Dans notre série de dérivés de 2-aminodiphénylsulfures, les meilleures DL_{50} (concentration en composé qui provoque 50% de létalité sur le parasite) sur *Trypanosoma cruzi* sont de 10 μM . Sur la trypanothion réductase, le K_i du plus puissant inhibiteur est de 700 nM (composé **38b**). Compte tenu de la forte concentration intracellulaire en $T(S)_2$ et $T(SH)_2$ dans le parasite, il faudrait encore gagner en activité pour la TR pour tuer le parasite.

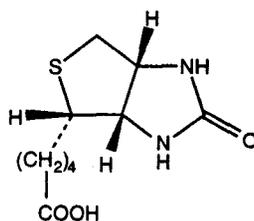
Mais, cette faible activité trypanocide peut également être due à des problèmes de pénétration dans le parasite ou à la métabolisation de l'inhibiteur par d'autres enzymes. Nous avons donc décidé d'étudier la pénétration dans le parasite et la localisation ultérieure d'un inhibiteur de cette famille, par marquage non radioactif.

Pour réaliser ce marquage, nous avons choisi de fixer un groupement biotinyle sur un bis(2-aminodiphénylsulfure) par modification du bras espaceur. Préalablement à toute étude biologique, nous avons vérifié que le composé ainsi synthétisé présentait une bonne activité inhibitrice vis-à-vis de la TR.

I. Conception d'un inhibiteur marqué

1. Principe du marquage à la biotine

La biotine ou vitamine H est un coenzyme attaché par liaison covalente à des carboxylases et plus généralement à des enzymes effectuant des transferts de CO_2 .



biotine

En plus de cette fonction de fixation du CO₂, de nombreux travaux de marquage de macromolécules sont basés sur la grande affinité de la biotine pour l'avidine ou la streptavidine, associée à une activité peroxydase ou phosphatase pouvant générer une réaction colorée *in situ*. Ces protéines sont capables de lier la biotine, qu'elle soit libre ou fixée sur une molécule par un lien covalent. Leur affinité est très importante, puisqu'elle atteint 10¹⁵. La première est présente dans le blanc d'oeuf, la seconde est produite par une bactérie (*Streptomyces avidinii*). Ces deux protéines, de 67 et 60 kDa respectivement, se ressemblent et se comportent de la même façon. Les données cristallographiques de chaque site permettent d'expliquer la forte affinité de ces protéines avec la biotine : leur association étroite avec la biotine met à contribution des interactions hydrophobiques, de nombreux ponts hydrogène, et un verrouillage par une boucle polypeptidique qui vient se refermer sur le substrat.^{168,169}

Dans la pratique, la streptavidine est souvent préférée à l'avidine car elle n'est pas glycosylée et donne moins d'effets secondaires.

La biotine peut être fixée sur une cible ou sur un substrat. Dans le premier cas, il est très facile de fixer un radical biotinyloxy sur une protéine et l'opération est souvent réalisable sans qu'il en résulte d'inconvénients sur les propriétés de la cible. En outre, la biotine est une molécule très stable. Une protéine marquée par biotinylation sera donc reconnue avec une grande efficacité par l'avidine, tout en conservant sa fonction biologique. Dans le deuxième cas, la biotine est fixée sur une fonction adaptée du substrat. Ce groupement supplémentaire peut entraîner des variations de l'affinité entre le substrat ainsi modifié et la cible.

2. Synthèse d'un inhibiteur marqué de la famille des bis(2-aminodiphénylsulfures)

Dans le cadre de notre étude, le groupement biotinyloxy est fixé sur la fonction amine secondaire d'un inhibiteur symétrique de la famille des bis(2-aminodiphénylsulfures) (figure 43).

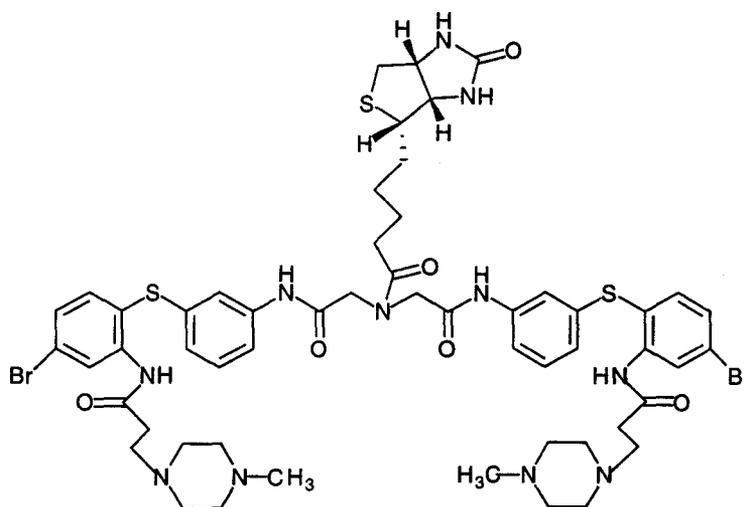


figure 43. Bis(2-aminodiphénylsulfure) biotinylé **82b**

Le schéma de synthèse de ce composé est décrit dans le cinquième chapitre, portant sur les bis(2-aminodiphénylsulfures) à trois chaînes latérales.

Ce composé présente une bonne activité inhibitrice vis-à-vis de la trypanothion réductase de *Trypanosoma cruzi* avec une IC_{50} de **300 nM**, qui s'est révélée être bien meilleure que celle du composé **75b** ne possédant pas de troisième chaîne latérale. Ce groupement supplémentaire n'entraîne pas de variations de l'affinité entre l'inhibiteur ainsi modifié et la cible.

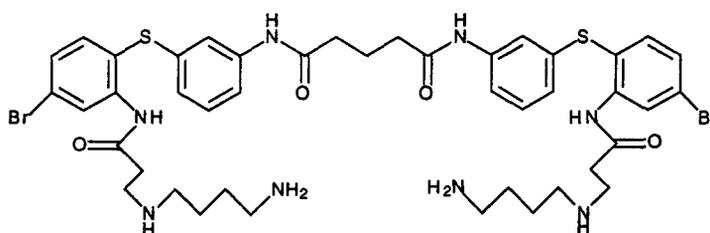
II. Pénétration et suivi dans le parasite

La mise en oeuvre et les résultats de cette étude sont en cours et seront présentés lors de la soutenance.

Conclusion

L'objectif de ce travail était la recherche d'une chimiothérapie contre la maladie de Chagas. L'enzyme qui a été choisie comme cible thérapeutique est la trypanothion réductase, flavoprotéine NADPH-dépendante, qui régénère le trypanothion sous sa forme active T(SH)₂. Cette enzyme remplace, chez *Trypanosoma cruzi*, la glutathion réductase et semble jouer un rôle essentiel dans le métabolisme du parasite.

En nous basant sur les résultats d'un test de criblage enzymatique, sur des calculs de dynamique moléculaire et sur des études de modélisation moléculaire, nous avons synthétisé des bis(2-aminodiphénylsulfures), constitués de deux entités diphénylsulfures reliées par un bras espaceur et portant chacune une chaîne latérale polyaminée, et des mono 2-aminodiphénylsulfures portant deux chaînes latérales polyaminées. Nous avons étudié différents paramètres structuraux. L'inhibiteur de la TR le plus puissant s'est révélé être le composé suivant avec une **IC₅₀ de 350 nM** :



composé **38b**

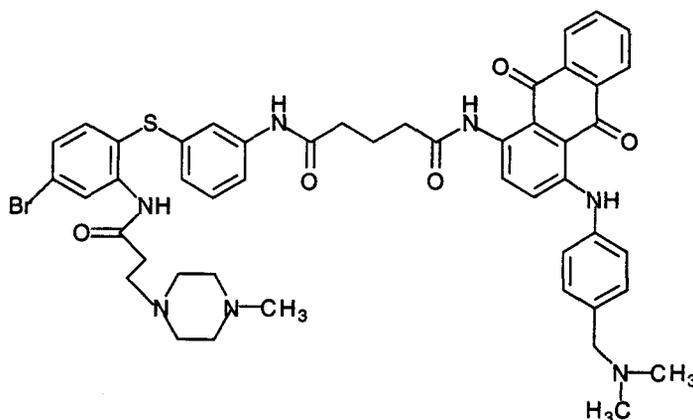
IC₅₀ = 350 nM

Comme pour d'autres analogues de la famille des bis(2-aminodiphénylsulfures), la mesure du K_i de ce composé ($K_i = 700 \text{ nM}$) nous a permis de mettre en évidence un phénomène d'aggrégation en solution.

Ces deux premières générations d'inhibiteurs nous ont donc permis d'améliorer fortement, par rapport à la tête de série, l'activité inhibitrice sur la trypanothion réductase, mais ces composés ne se sont pas révélés suffisamment actifs pour éliminer le parasite.

Pour tenter d'optimiser davantage l'inhibition de la TR et d'étudier le rôle exact de la deuxième entité noyau aromatique - chaîne latérale aminée des bis(2-aminodiphénylsulfures), nous avons synthétisé une troisième génération d'inhibiteurs constituée de dérivés dissymétriques des 2-aminodiphénylsulfures. Parallèlement à cette étude, l'introduction d'un groupement de type anthraquinonique devait nous permettre d'accroître le stress oxydant sur le parasite par l'action conjuguée d'un inhibiteur de la TR et d'un substrat subversif.

L'activité inhibitrice sur la TR n'a pu être améliorée mais les études des relations structure-activité ont montré l'importance du couple noyau aromatique - chaîne latérale aminée pour une meilleure inhibition. Le meilleur inhibiteur de la série s'est révélé être le composé suivant avec une IC_{50} de 3.3 μ M:



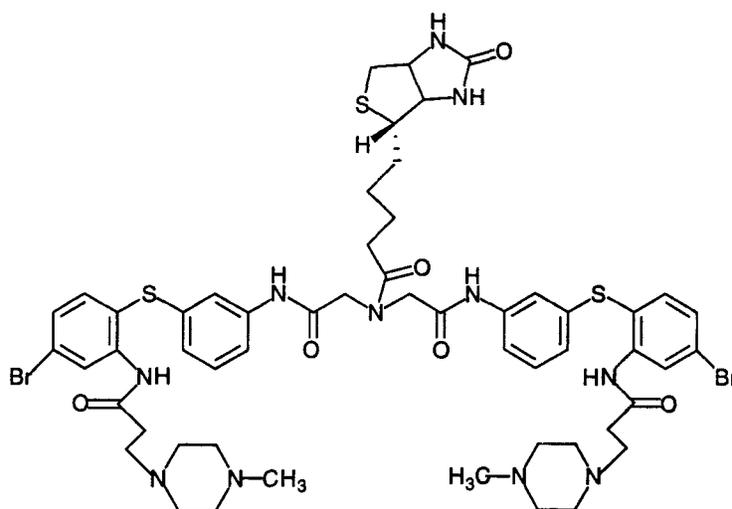
La vérification du caractère substrat subversif de ce composé est actuellement en cours d'étude au laboratoire.

Les activités trypanocides de cette famille de composés se sont révélées assez décevantes ($DL_{50} \geq 10 \mu$ M). Vue la forte concentration en $T(S)_2$ et $T(SH)_2$ dans le parasite, l'activité TR de nos inhibiteurs est peut-être encore insuffisante?

Mais, la faible activité trypanocide peut également être due à des problèmes de pénétration dans le parasite ou à la métabolisation de l'inhibiteur par d'autres enzymes.

Nous avons donc décidé d'étudier la pénétration dans le parasite et la localisation subcellulaire d'un inhibiteur de la famille des bis(2-aminodiphénylsulfures), par marquage non radioactif.

Pour réaliser ce marquage, nous avons choisi de fixer un groupement biotinyne sur un bis(2-aminodiphénylsulfure) par modification du bras espaceur. Le composé **82b** obtenu présente une bonne activité inhibitrice sur la TR ($IC_{50} = 300 \text{ nM}$) justifiant une étude de suivi biologique. Cette étude est en cours.



composé **82b**

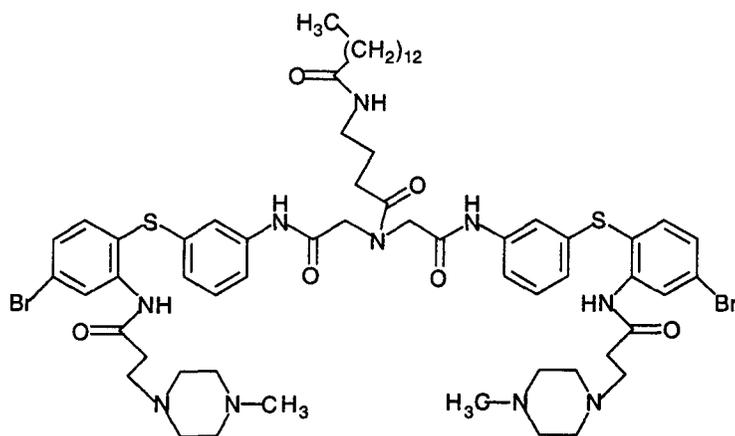
$IC_{50} = 300 \text{ nM}$

La bonne activité inhibitrice de ce composé nous a amené à synthétiser et à évaluer une quatrième génération d'inhibiteurs de la TR, constituée de bis(2-aminodiphénylsulfures) portant trois chaînes latérales et obtenue par modification du bras espaceur.

L'introduction d'une fonction amine secondaire, au centre du bras espaceur, a permis de montrer l'influence négative d'un site protonable en cette position ($IC_{50} = 1.5 \mu\text{M}$ au lieu de $0.55 \mu\text{M}$).

Ces composés "trisubstitués" se sont révélés être de bons inhibiteurs de la TR. L'ajout d'une troisième chaîne latérale, portant un groupement hydrophobe en position terminale, a permis d'améliorer l'inhibition de la trypanothion réductase. Les interactions

hydrophobes semblent préférables aux interactions ioniques entre l'extrémité de la troisième chaîne latérale et le site actif de la TR. Le meilleur inhibiteur s'est révélé être le composé **80b** avec une IC_{50} de 200 nM.



composé **80b**

$IC_{50} = 200 \text{ nM}$

Nous avons réussi à améliorer l'activité inhibitrice sur la trypanothion réductase de *Trypanosoma cruzi* et obtenu les meilleurs inhibiteurs décrits à ce jour. Si les activités trypanocides, *in vitro*, se sont révélées décevantes, la TR reste une cible d'intérêt thérapeutique certain, les expériences de knock-out (même partiel, 80% maximum seulement) du gène de la TR démontrant l'incapacité pour le parasite de survivre dans de telles conditions.

Partie expérimentale

I. Généralités

1. Méthodes de purification et d'analyse des produits

1.1. Chromatographie sur couche mince de silice

Les réactions ont été suivies et la pureté des différents produits vérifiée par chromatographie sur couche mince de silice (CCM). Les couches minces utilisées sont des plaques d'aluminium recouvertes d'une couche, de 0.25 mm d'épaisseur, d'un gel de silice 60 PF₂₅₄ Merck, contenant un révélateur fluorescent des groupements chromophores dans l'ultra-violet (254 nm).

Deux tests de révélation ont été utilisés : test à la ninhydrine (révélateur des fonctions amines primaires) et le test de Reindel-Hoppe (révélateur des fonctions amides). Un test ninhydrine positif donne une coloration marron et un test Reindel-Hoppe positif donne une coloration bleu-vert.

Le test à la ninhydrine est réalisé de la façon suivante : vaporisation d'une solution de ninhydrine à 10% dans l'acétone et chauffage rapide.

Le test de Reindel-Hoppe est réalisé de la façon suivante : vaporisation de la solution de ninhydrine, chauffage rapide, vaporisation d'eau javel pure, puis d'une solution aqueuse d'acide acétique à 20%, chauffage intense et vaporisation de la solution de tétraméthyl-diaminodiphénylméthane (TDM). La solution de TDM est préparée en mélangeant, dans des proportions 1/1, une solution à 5% de TDM dans de l'acide acétique aqueux à 20% et une solution aqueuse à 5% de iodure de potassium.

1.2. Chromatographie sur colonne de silice

La purification de certains produits a été effectuée par chromatographie sur colonne de silice (gel de silice 60 PF₂₅₄ Merck, granulométrie entre 0.04 et 0.063 mm). Cette méthode repose sur les mêmes principes de choix d'éluants que la CCM.

1.3. Chromatographie sur couche épaisse de silice

La purification de certains produits (essentiellement ceux obtenus en faible quantité) a été effectuée par chromatographie sur couche épaisse (CCE).

Les chromatographies sont réalisées sur des plaques de verre (20x20 cm) recouvertes d'une couche de silice de 0.1 cm d'épaisseur (gel de silice 60 PF₂₅₄ Merck

pour chromatographie sur plaques). Cette méthode repose sur les mêmes principes de choix d'éluants que la CCM.

1.4. Spectrométrie de masse "Temps de Vol" (TOFMS)

Les spectres de masse ont été obtenus sur un appareil BIOION 20 qui utilise la technique de "temps de vol" ou "time of flying" (TOF).

1.5. Chromatographie liquide à haute performance

La pureté des différents produits a également été contrôlée par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Elle est effectuée sur une colonne de silice sur laquelle sont greffés des groupements alkylycyano (phase "cyano nucléosil" ou "CN").

Les deux éluants utilisés sont :

- solvant A : eau milliQ / acide trifluoroacétique - 99.5 / 0.5,
- solvant B : acétonitrile / eau milliQ / acide trifluoroacétique - 80 / 20 / 0.5.

Le système d'analyse est constitué de deux pompes Shimadzu LC-10 AS, d'un injecteur automatique Shimadzu SIL-10 A, d'un spectrophotomètre Shimadzu SPD-10 A et d'un système de contrôle Shimadzu SCL-10 A. Il est géré par un logiciel Mac Intosh.

1.6. Résonance Magnétique Nucléaire

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER DRX 300 (^1H , 300 MHz).

Les déplacements chimiques sont donnés en ppm. Les spectres sont décrits avec les abréviations suivantes : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, qt = quintuplet, m = multiplet.

1.7. Mesure des points de fusion

Les points de fusion des solides obtenus ont été déterminés sur un appareil BÜCHI 530.

2. Formation des sels d'oxalates

Les composés synthétisés ont, ensuite, été évalués en tant qu'inhibiteurs de la trypanothion réductase . Pour des raisons de solubilité dans le tampon enzymatique, les produits sont testés sous la forme de sels d'oxalates.

Les sels d'oxalates ont été obtenus selon le protocole suivant : à une solution du composé, sous forme de base, dans le minimum d'acétate d'éthyle (ou d'isopropanol en cas de problèmes de solubilité) est ajoutée, goutte à goutte, une solution saturée d'acide oxalique dans l'acétate d'éthyle ; après une heure à 4°C, le précipité formé est filtré sur fritté, lavé avec de l'acétate d'éthyle froid, puis avec de l'éther et séché au dessiccateur en présence de P₂O₅.

3. Préparation des solvants de réaction

3.1. Distillation du tétrahydrofurane

La distillation du tétrahydrofurane est effectuée sur des billes de sodium en présence de benzophénone. Une fois distillé, le solvant est conservé sur tamis moléculaire 4 Å activé.

3.2. Autres solvants

Pour certaines des réactions mises en oeuvre, les solvants suivants ont été préalablement mis sur du tamis moléculaire 4 Å activé pendant une nuit : diméthylformamide, éther éthylique et dichlorométhane.

II. Synthèse des Inhibiteurs

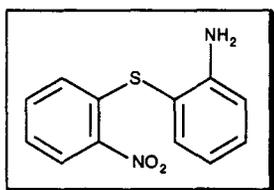
1. Aminodiphénylesulfures de départ

Le mode opératoire suivant concerne les composés **2a**, **2b** et **2c**.

A une solution d'acétate de sodium anhydre (10.9 g, 133 mmol, 5 éq) dans 80 mL d'éthanol absolu sont ajoutés l'aminothiophénol adéquat (5 g, 40 mmol, 1.5 éq) et du 2-chloronitrobenzène (4.2 g, 26.7 mmol, 1 éq). Après 36 heures d'agitation à reflux, l'éthanol est évaporé. Le solide orange obtenu est traité par un mélange AcOEt/H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée. A l'huile orange obtenue sont ajoutés 10 mL d'éthanol absolu. Après une nuit à 4°C, le mélange est filtré et lavé avec de

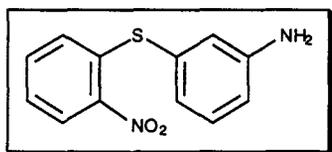
l'éthanol pour donner le diphénylsulfure correspondant qui est utilisé ensuite sans autre purification.

2-[(2-nitro)phénylsulfanyl]phénylamine 2a



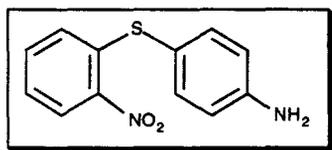
solide jaune (5.3 g, 81%) ; Rf(CH₂Cl₂/éther de pétrole-5/5) : 0.5 ; P.F. : 75°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 8.30-8.26 (m, 1H, Ph), 7.50-7.25 (m, 4H, Ph), 6.93-6.82 (m, 3H, Ph), 4.35 (large, 2H, NH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 4.35 échangé ; TOF m/z : 246.

3-[(2-nitro)phénylsulfanyl]phénylamine 2b



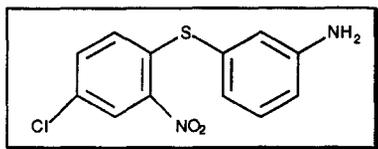
solide orange (4.6 g, 70%) ; Rf(CH₂Cl₂/éther de pétrole-5/5) : 0.5 ; P.F. : 115°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 8.24-8.20 (m, 1H, Ph), 7.44-7.38 (m, 1H, Ph), 7.31-7.22 (m, 2H, Ph), 7.06-7.02 (m, 1H, Ph), 6.99-6.91 (m, 2H, Ph), 6.85-6.80 (m, 1H, Ph), 3.90 (large, 2H, NH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 3.90 échangé ; TOF m/z : 246.

4-[(2-nitro)phénylsulfanyl]phénylamine 2c



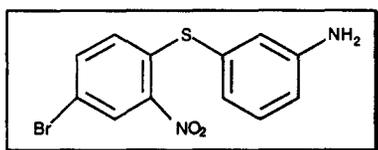
solide orange (4.9 g, 74%) ; Rf(CH₂Cl₂/éther de pétrole-5/5) : 0.6 ; P.F. : 100°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 8.24-8.20 (m, 1H, Ph), 7.42-7.34 (m, 3H, Ph), 7.26-7.19 (m, 1H, Ph), 6.97-6.92 (m, 1H, Ph), 6.83-6.77 (m, 2H, Ph), 4.07 (large, 2H, NH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 4.07 échangé ; TOF m/z : 246.

3-[(4-chloro-2-nitro)phénylsulfanyl]phénylamine 18b



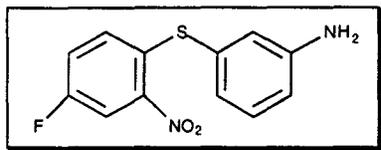
A une solution d'acétate de sodium anhydre (21.8 g, 266 mmol, 5 éq) dans 160 mL d'éthanol absolu sont ajoutés le 3-aminothiophénol (10 g, 80 mmol, 1.5 éq) et du 2,5-dichloronitrobenzène (10.2 g, 53.4 mmol, 1 éq). Après 36 heures d'agitation à reflux, l'éthanol est évaporé. Le solide obtenu est traité par un mélange AcOEt/H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée. A l'huile orange obtenue sont ajoutés 20 mL d'éthanol absolu. Après une nuit à 4°C, le mélange est filtré et lavé avec de l'éthanol pour donner le diphenylsulfure **18b** sous la forme d'un solide orange (5.7 g, 68%), qui est utilisé ensuite sans autre purification ; Rf(CH₂Cl₂) : 0.6 ; P.F. : 94°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 8.24-8.23 (m, 1H, Ph), 7.39-7.34 (m, 1H, Ph), 7.31-7.26 (m, 1H, Ph), 6.99-6.90 (m, 3H, Ph), 6.86-6.81 (m, 1H, Ph), 3.93 (large, 2H, NH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 3.93 échangé ; TOF m/z : 280.5.

3-[(4-bromo-2-nitro)phénylsulfanyl]phénylamine 23b



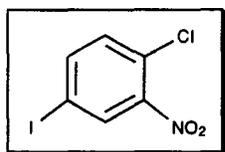
A une solution d'acétate de sodium anhydre (21.8 g, 266 mmol, 5 éq) dans 160 mL d'éthanol absolu sont ajoutés le 3-aminothiophénol (10 g, 80 mmol, 1.5 éq) et du 2,5-dibromonitrobenzène (15 g, 53.4 mmol, 1 éq). Après 36 heures d'agitation à reflux, l'éthanol est évaporé. Le solide obtenu est traité par un mélange AcOEt/H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée. A l'huile orange obtenue sont ajoutés 20 mL d'éthanol absolu. Après une nuit à 4°C, le mélange est filtré et lavé avec de l'éthanol pour donner le diphenylsulfure **23b** sous la forme d'un solide orange (14.5 g, 84%), qui est utilisé ensuite sans autre purification ; Rf(CH₂Cl₂) : 0.55 ; P.F. : 105°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 8.38-8.37 (m, 1H, Ph), 7.52-7.48 (m, 1H, Ph), 7.32-7.26 (m, 1H, Ph), 6.96-6.82 (m, 4H, Ph), 3.93 (large, 2H, NH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 3.93 échangé ; TOF m/z : 325.

3-[(4-fluoro-2-nitro)phénylsulfanyl]phénylamine 28b



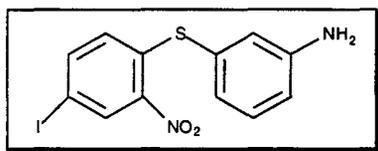
A une solution d'acétate de sodium anhydre (23.4 g, 285 mmol, 5 éq) dans 170 mL d'éthanol absolu sont ajoutés le 3-aminothiophénol (10.7 g, 85.5 mmol, 1.5 éq) et du 2-chloro-5-fluoronitrobenzène (10 g, 57 mmol, 1 éq). Après 36 heures d'agitation à reflux, l'éthanol est évaporé. Le solide obtenu est traité par un mélange AcOEt/H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée. A l'huile orange obtenue sont ajoutés 30 mL d'éthanol absolu. Après une nuit à 4°C, le mélange est filtré et lavé avec de l'éthanol pour donner le diphénylsulfure **28b** sous la forme d'un solide orange (12.2 g, 81%), qui est utilisé ensuite sans autre purification ; Rf(CH₂Cl₂) : 0.6 ; P.F. : 78°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 7.97-7.93 (m, 1H, Ph), 7.30-7.24 (m, 1H, Ph), 7.22-7.14 (m, 1H, Ph), 7.05-7.00 (m, 1H, Ph), 6.96-6.90 (m, 2H, Ph), 6.84-6.81 (m, 1H, Ph), 3.94 (large, 2H, NH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 3.94 échangé ; TOF m/z : 264.

2-chloro-5-iodonitrobenzène



A un mélange d'acide sulfurique concentré (8 mL) et d'eau (59 mL) est ajoutée la 4-chloro-3-nitroaniline (12.2 g, 70.55 mmol, 1 éq). Après une heure d'agitation à température ambiante, la solution est refroidie à 0°C et y sont ajoutés, goutte à goutte, 15 mL d'une solution aqueuse de nitrite de sodium (4.87 g, 70.55 mmol, 1 éq). Après 30 minutes d'agitation à 0°C, le milieu réactionnel est filtré et le filtrat ajouté, goutte à goutte, à 0°C, à 59 mL d'une solution aqueuse d'iodure de potassium (19.4 g, 117 mmol, 6 éq). Après 1h30 d'agitation à 0°C, la solution est filtrée. Le solide obtenu est traité par un mélange CH₂Cl₂/H₂O, la phase organique séchée sur MgSO₄ et évaporée pour donner le 2-chloro-5-iodonitrobenzène sous la forme d'un solide rouge brique (15.5 g, 77%) ; Rf(CH₂Cl₂/éther de pétrole-7/3) : 0.9 ; P.F. : 55°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 8.23-8.22 (m, 1H, Ph), 7.91-7.87 (m, 1H, Ph), 7.36-7.32 (m, 1H, Ph) ; TOF m/z : 283.5.

3'-[(4-iodo-2-nitro)phénylsulfanyl]phénylamine 33b



A une solution d'acétate de sodium anhydre (23.4 g, 285 mmol, 5 éq) dans 170 mL d'éthanol absolu sont ajoutés le 3-aminothiophénol (10.7 g, 85.5 mmol, 1.5 éq) et du 2-chloro-5-iodonitrobenzène (16.2 g, 57 mmol, 1 éq). Après 36 heures d'agitation à reflux, l'éthanol est évaporé. Le solide obtenu est traité par un mélange AcOEt/H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée. A l'huile orange obtenue sont ajoutés 30 mL d'éthanol absolu. Après une nuit à 4°C, le mélange est filtré et lavé avec de l'éthanol pour donner le diphénylsulfure **33b** sous la forme d'un solide rouge brique (10.9 g, 55%), qui est utilisé ensuite sans autre purification ; R_f(CH₂Cl₂) : 0.55 ; P.F. : 130°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 8.54-8.53 (m, 1H, Ph), 7.68-7.64 (m, 1H, Ph), 7.31-7.25 (m, 1H, Ph), 6.96-6.89 (m, 2H, Ph), 6.85-6.81 (m, 1H, Ph), 6.77-6.74 (m, 1H, Ph), 3.93 (large, 2H, NH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 3.93 échangé ; TOF m/z : 372.

2. Bis(2-aminodiphénylsulfures)

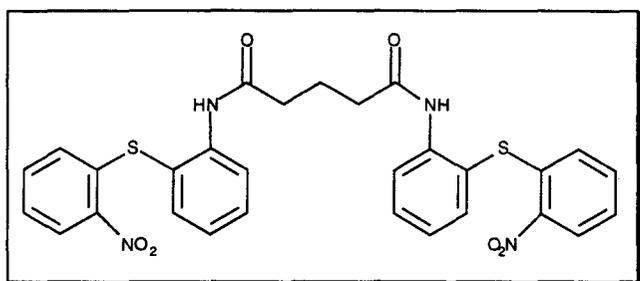
2.1. Variation simultanée de l'orientation du bras espaceur et de l'amine (diméthylamine ou *N*-méthylpipérazine) en bout de chaîne latérale

"Dimérisation"

Le mode opératoire suivant concerne les composés **3a**, **3b** et **3c**.

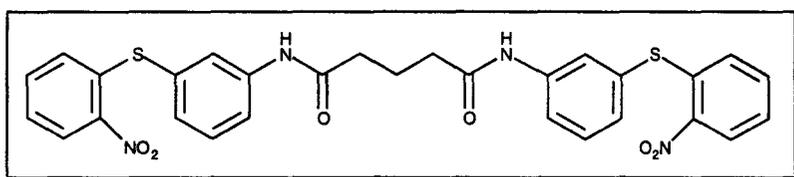
Sous azote et à 0°C, à une solution du diphénylsulfure adéquate (1 g, 4.06 mmol, 2 éq) dans 7 mL de pyridine distillée est ajouté, goutte à goutte, du dichlorure de pentanoyle (260 µL, 2.03 mmol, 1 éq). Après une heure d'agitation à 0°C et 7 heures à température ambiante, la pyridine est évaporée. Le solide résiduel est lavé à l'eau et le filtrat est extrait par CH₂Cl₂. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée pour donner le bis(2-aminodiphénylsulfure) nitré correspondant qui est utilisé ensuite sans autre purification.

***N,N'*-{2-[(2-nitro)phénylsulfanyl]phényl}pentane-1,5-diamide 3a**



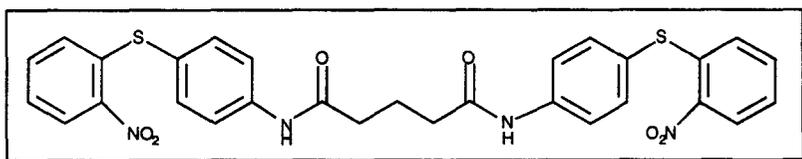
solide jaune (561 mg, 47%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.8, R.H. positif ; P.F. : 135°C ; RMN ¹H, δ(DMSO-d₆) : 9.35 (large, 2H, NH), 8.26-8.19 (m, 2H, Ph), 7.65-7.61 (m, 1H, Ph), 7.57-7.50 (m, 5H, Ph), 7.37-7.30 (m, 5H, Ph), 6.86-6.78 (m, 1H, Ph), 6.71-6.65 (m, 2H, Ph), 2.08-2.02 (t, J = 7.4Hz, 4H, CH₂), 1.51-1.43 (dd, J = 7.4Hz, 2H, CH₂) ; δ(DMSO-d₆ + D₂O) : 9.35 échangé ; TOF m/z : 588.

***N,N'*-{3-[(2-nitro)phénylsulfanyl]phényl}pentane-1,5-diamide 3b**



solide jaune (2.44 g, 83%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.6, R.H. positif ; P.F. : 110°C ; RMN ¹H, δ(DMSO-d₆) : 10.14 (large, 2H, NH), 8.27-8.23 (m, 2H, Ph), 7.92-7.91 (m, 1H, Ph), 7.61-7.57 (m, 1H, Ph), 7.48 (m, 2H, Ph), 7.42-7.38 (m, 4H, Ph), 7.29 (m, 2H, Ph), 6.96-6.92 (m, 2H, Ph), 6.82-6.80 (m, 2H, Ph), 2.42-2.37 (t, J = 7.1Hz, 4H, CH₂), 1.93-1.87 (dd, J = 7.2Hz, 2H, CH₂) ; δ(DMSO-d₆ + D₂O) : 10.14 échangé ; TOF m/z : 588.

***N,N'*-{4-[(2-nitro)phénylsulfanyl]phényl}pentane-1,5-diamide 3c**



solide jaune (4.25 g, 69%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.7, R.H. positif ; P.F. : 160°C ; RMN ¹H, δ(DMSO-d₆) : 10.25 (large, 2H, NH), 8.26-8.22 (m, 2H, Ph), 7.82-7.78 (m, 4H, Ph), 7.59-7.54 (m, 6H, Ph), 7.40-7.37 (m, 2H, Ph), 6.86-6.82 (m, 2H, Ph), 2.50-

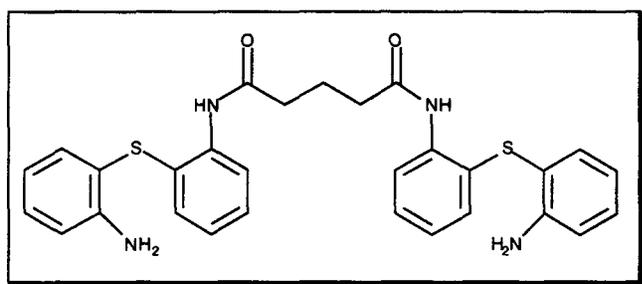
2.42 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 4H, CH_2), 1.98-1.92 (dd, $J = 7.5\text{Hz}$, 2H, CH_2) ; $\delta(\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O})$: 10.25 échangé ; TOF m/z : 588.

Réduction des groupements nitro

Le mode opératoire suivant concerne les composés **4a**, **4b** et **4c**.

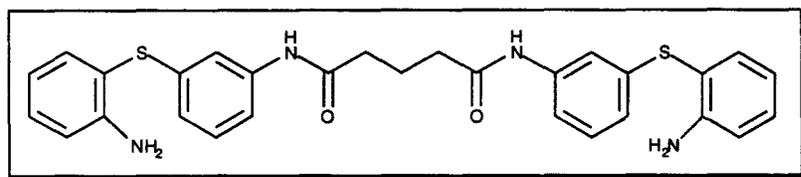
Du nickel de Raney est préalablement lavé trois fois par de l'éthanol à 95° et trois fois par de l'éthanol absolu. A une solution du composé nitré (9 g, 15.4 mmol) dans 200 mL d'éthanol absolu est ajouté le nickel traité précédemment (1 g). Après 5 heures d'agitation à 80°C et sous une pression d'hydrogène de 100 bars, le nickel est éliminé par filtration et l'évaporation du filtrat donne le dérivé amino correspondant qui est utilisé ensuite sans autre purification.

N,N'*-{2-[(2-amino)phénylsulfanyl]phényl}pentane-1,5-diamide **4a*



huile incolore (6.5 g, 80%) ; $R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH-9/1})$: 0.5, R.H. positif ; RMN ^1H , $\delta(\text{DMSO-d}_6)$: 9.83 (large, 2H, NH), 7.65-7.61 (m, 1H, Ph), 7.33-7.27 (m, 4H, Ph), 7.17-7.03 (m, 6H, Ph), 6.83-6.71 (m, 3H, Ph), 6.60-6.52 (m, 2H, Ph), 5.29 (large, 4H, NH_2), 2.42-2.37 (t, $J = 7.3\text{Hz}$, 4H, CH_2), 1.99-1.94 (dd, $J = 7.4\text{Hz}$, 2H, CH_2) ; $\delta(\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O})$: 9.83 et 5.29 échangés ; TOF m/z : 528.

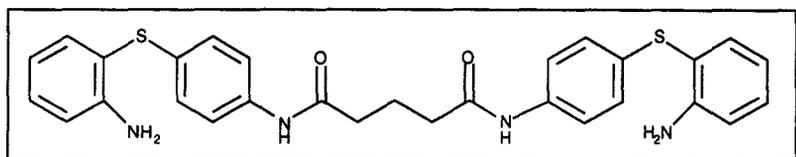
N,N'*-{3-[(2-amino)phénylsulfanyl]phényl}pentane-1,5-diamide **4b*



solide incolore (3.04 g, 80%) ; $R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH-9/1})$: 0.5, R.H. positif ; P.F. : 90°C ; RMN ^1H , $\delta(\text{DMSO-d}_6)$: 9.89 (large, 2H, NH), 7.61-7.57 (m, 1H, Ph), 7.41-7.37 (m,

3H, Ph), 7.31-7.25 (m, 2H, Ph), 7.20-7.14 (m, 3H, Ph), 7.04-6.99 (m, 1H, Ph), 6.82-6.78 (m, 2H, Ph), 6.70-6.66 (m, 2H, Ph), 6.62-6.56 (m, 2H, Ph), 5.34 (large, 4H, NH₂), 2.33-2.28 (t, J = 7.4Hz, 4H, CH₂), 1.89-1.80 (dd, J = 7.4Hz, 2H, CH₂) ; δ (DMSO-d₆ + D₂O) : 9.89 et 5.34 échangés ; TOF m/z : 528.

***N,N'*-{4-[(2-amino)phénylsulfanyl]phényl}pentane-1,5-diamide 4c**



solide incolore (2.24 g, 80%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.5, R.H. positif ; P.F. : 175°C ; RMN ¹H, δ (DMSO-d₆) : 9.92 (large, 2H, NH), 7.58 (m, 1H, Ph), 7.53-7.49 (m, 3H, Ph), 7.29-7.26 (m, 3H, Ph), 7.14-7.05 (m, 6H, Ph), 6.80-6.60 (m, 1H, Ph), 6.58-6.57 (m, 2H, Ph), 5.30 (large, 4H, NH₂), 2.36-2.31 (t, J = 7.3Hz, 4H, CH₂), 1.92-1.81 (dd, J = 7.3Hz, 2H, CH₂) ; δ (DMSO-d₆ + D₂O) : 9.92 et 5.3 échangés ; TOF m/z : 528.

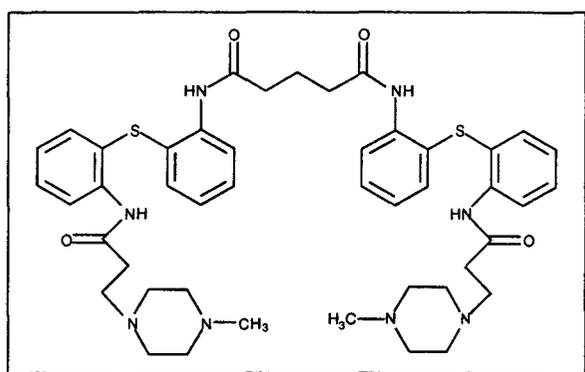
Addition des deux chaînes latérales aminées

Cas de la N-méthylpipérazine

Le mode opératoire suivant concerne les composés **5a**, **5b** et **5c**.

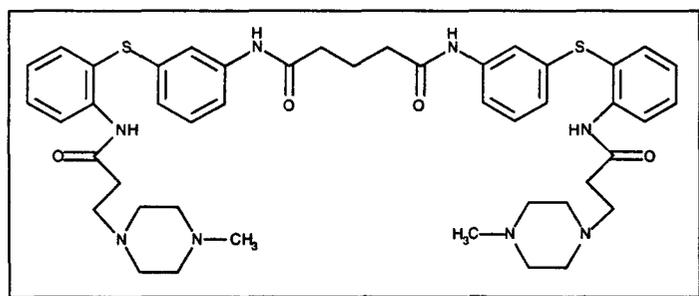
Sous azote et à 0°C, à une solution du dérivé amino (1 g, 1.9 mmol, 1éq) dans 35 mL de THF anhydre sont ajoutés, goutte à goutte, 5 équivalents de chlorure de 3-chloropropanoyle (904 μ L, 9.47 mmol). Après 30 minutes d'agitation à 0°C, sont ajoutés 3 équivalents de *N*-éthylpipéridine (781 μ L, 5.69 mmol). Ensuite, à 30 minutes d'intervalle, sont ajoutés deux fois 3 équivalents de *N*-éthylpipéridine. Après une heure d'agitation à 0°C et 30 minutes à température ambiante est ajouté un large excès de *N*-méthylpipérazine (4.2 mL, 37.88 mmol, 20 éq). Après 4 heures d'agitation à reflux, le solvant est évaporé et l'huile résiduelle est traitée par un mélange CH₂Cl₂/H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄, évaporée et l'huile obtenue est purifiée par CCE (CH₂Cl₂/MeOH-85/15) pour donner le produit correspondant.

***N,N'*-[2-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]pentane-1,5-diamide 5a**



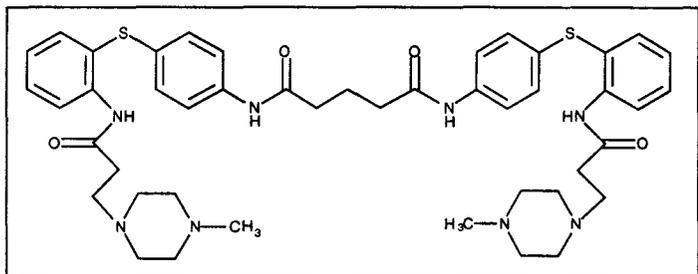
huile incolore (635 mg, 40%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH- 85/15) : 0.4, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.40 (large, 2H, NH), 8.51 (large, 2H, NH), 8.20-8.17 (m, 2H, Ph), 7.72-7.69 (m, 2H, Ph), 7.44-7.37 (m, 4H, Ph), 7.25-6.95 (m, 8H, Ph), 2.76-2.72 (t, J = 6Hz, 4H, CH₂), 2.64-2.47 (m, 24H, CH₂), 2.26 (s, 6H, CH₃), 2.18-2.15 (dd, J = 5.2Hz, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.40 et 8.51 échangés ; TOF m/z : 836 ; Anal C₅₃H₆₄N₈O₂₀S₂ (C, H, N).

***N,N'*-[3-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]pentane-1,5-diamide 5b**



solide incolore (1.22 g, 40%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-85/15) : 0.4, R.H. positif ; P.F. : 82°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.54 (large, 2H, NH), 8.48 (large, 2H, NH), 8.19-8.15 (m, 2H, Ph), 7.59-7.55 (m, 2H, Ph), 7.45-7.39 (m, 4H, Ph), 7.26-7.12 (m, 6H, Ph), 6.91-6.87 (m, 2H, Ph), 2.55-2.39 (m, 24H, CH₂), 2.38-2.33 (t, J = 6.9Hz, 4H, CH₂), 2.23 (s, 6H, CH₃), 2.07-1.99 (dd, J = 7Hz, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.54 et 8.48 échangés ; TOF m/z : 836 ; Anal C₅₃H₆₄N₈O₂₀S₂ (C, H, N).

***N,N'*-[4-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]pentane-1,5-diamide 5c**



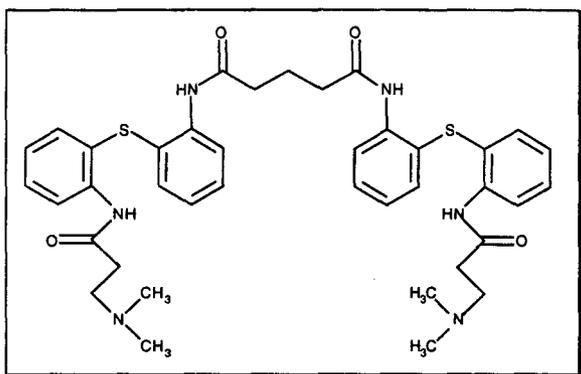
solide incolore (1.22 g, 59%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-85/15) : 0.4, R.H. positif ; P.F. : 68°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.38 (large, 2H, NH), 8.23 (large, 2H, NH), 8.20-8.16 (m, 2H, Ph), 7.51-7.48 (m, 4H, Ph), 7.43-7.36 (m, 4H, Ph), 7.13-7.07 (m, 6H, Ph), 2.64-2.42 (m, 28H, CH₂), 2.22 (s, 6H, CH₃), 2.08-2.03 (dd, J = 6.9Hz, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.38 et 8.23 échangés ; TOF m/z : 836 ; Anal C₅₃H₆₄N₈O₂₀S₂ (C, H, N).

Cas de la diméthylamine

Le mode opératoire suivant concerne les composés **5'a**, **5'b** et **5'c**.

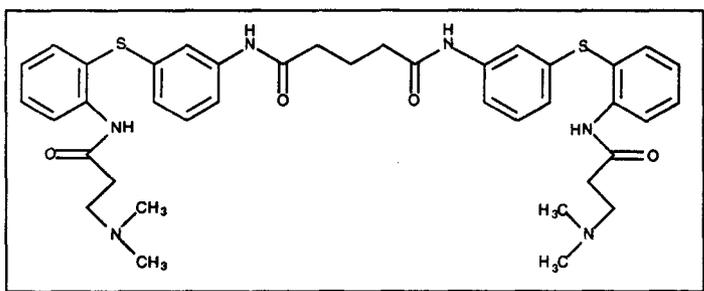
Sous azote et à 0°C, à une solution du dérivé amino (1 g, 1.9 mmol, 1éq) dans 35 mL de THF anhydre sont ajoutés, goutte à goutte, 5 équivalents de chlorure de 3-chloropropanoyle (904 µL, 9.47 mmol). Après 30 minutes d'agitation à 0°C sont ajoutés 3 équivalents de *N*-éthylpipéridine (781 µL, 5.69 mmol). Ensuite, à 30 minutes d'intervalle, sont ajoutés deux fois 3 équivalents de *N*-éthylpipéridine. Après une heure d'agitation à 0°C et 30 minutes à température ambiante est ajouté un large excès de diméthylamine (solution 2 M dans MeOH, 19 mL, 37.88 mmol, 20 éq). Après 4 heures d'agitation à reflux, le solvant est évaporé et l'huile résiduelle est traitée par un mélange CH₂Cl₂/H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄, évaporée et l'huile obtenue est purifiée par CCE (CH₂Cl₂/MeOH-85/15) pour donner le produit correspondant.

***N,N'*-(2-{2-[3-(diméthylamino)propanoylamino]phénylsulfanyl}phényl)pentane-1,5-diamide 5'a**



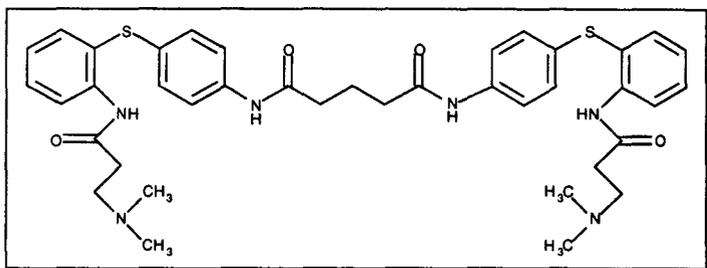
huile incolore (579 mg, 42%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-85/15) : 0.5, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.77 (large, 2H, NH), 8.57 (large, 2H, NH), 8.12-8.09 (m, 2H, Ph), 7.90-7.87 (m, 2H, Ph), 7.39-7.22 (m, 6H, Ph), 7.14-7.03 (m, 6H, Ph), 2.79-2.71 (t, J = 6.6Hz, 6H, CH₂), 2.64-2.60 (t, J = 6Hz, 4H, CH₂), 2.56-2.51 (t, J = 6.3Hz, 2H, CH₂), 2.37 (s, 12H, CH₃), 1.88-1.80 (dd, J = 7.2Hz, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.77 et 8.57 échangés ; TOF m/z : 726 ; Anal C₄₃H₅₀N₆O₁₂S₂ (C, H, N).

***N,N'*-(3-{2-[3-(diméthylamino)propanoylamino]phénylsulfanyl}phényl)pentane-1,5-diamide 5'b**



solide incolore (286 mg, 54%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH- 85/15) : 0.5, R.H. positif ; P.F. : 56°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 11.21 (large, 2H, NH), 8.40-8.36 (m, 2H, Ph), 8.27 (large, 2H, NH), 7.61-7.57 (m, 2H, Ph), 7.47-7.39 (m, 4H, Ph), 7.24-7.10 (m, 6H, Ph), 6.88-6.84 (m, 2H, Ph), 2.55-2.33 (m, 12H, CH₂), 2.15 (s, 12H, CH₃), 2.04-1.99 (dd, J = 6.9Hz, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 11.21 et 8.27 échangés ; TOF m/z : 726 ; Anal C₄₃H₅₀N₆O₁₂S₂ (C, H, N).

***N,N'*-(4-{2-[3-(diméthylamino)propanoylamino]phénylesulfanyl}phényl)pentane-1,5-diamide 5'c**



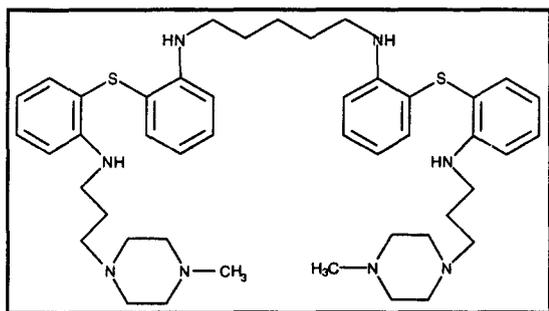
solide incolore (1.4 g, 68%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-85/15) : 0.5, R.H. positif ; P.F. : 48°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 11.17 (large, 2H, NH), 8.68 (large, 2H, NH), 8.35-8.31 (m, 2H, Ph), 7.51-7.34 (m, 8H, Ph), 7.11-7.02 (m, 6H, Ph), 2.61-2.55 (m, 4H, CH₂), 2.49-2.40 (m, 8H, CH₂), 2.37 (s, 12H, CH₃), 2.05-2.00 (dd, J = 7.2Hz, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 11.17 et 8.68 échangés ; TOF m/z : 726 ; Anal C₄₃H₅₀N₆O₁₂S₂ (C, H, N).

Réduction des fonctions amides

Le mode opératoire suivant concerne les composés **6a**, **6b**, **6c**, **6'a**, **6'b** et **6'c**.

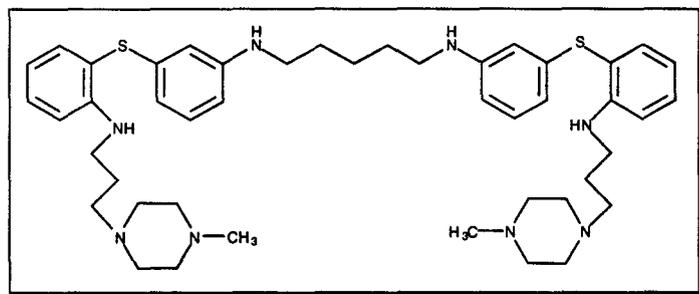
Sous azote et à 0°C, à une solution de l'amide (1 g, 1.4 mmol) dans 15 mL de THF anhydre sont ajoutés, goutte à goutte, pendant une heure, 7.5 mL d'une solution commerciale de BH₃/THF 1M (21mL, 21mmol, 15 éq). Le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes à 0°C, une heure à température ambiante puis 4 heures à reflux. L'excès de BH₃ est neutralisé, à 0°C, par une solution aqueuse 1 M de Na₂CO₃ et le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le solide résiduel est traité par un mélange CH₂Cl₂/NaOH 1M. La phase organique est isolée, séchée sur MgSO₄ et évaporée ; l'huile résiduelle est purifiée par CCE (CH₂Cl₂/AcOEt-10/0.15) pour donner l'amine correspondante.

***N,N'*-[2-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propylamino}phénylsulfanyl)phényl]pentane-1,5-diamine 6a**



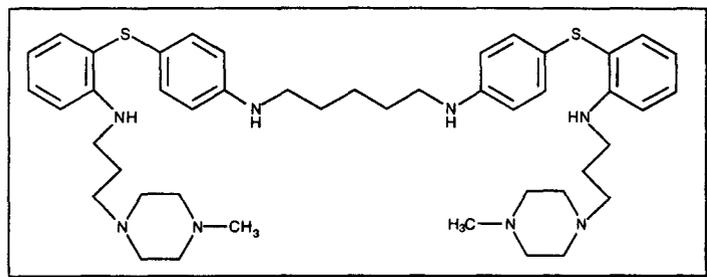
huile incolore (209 mg, 50%) ; Rf(CH₂Cl₂/AcOEt-10/0.15) : 0.3 ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 7.30-7.15 (m, 8H, Ph), 6.67-6.60 (m, 8H, Ph), 3.27-3.22 (t, J = 6.4Hz, 4H, CH₂), 3.12-3.09 (m, 8H, CH₂), 2.82-2.76 (m, 10H, CH₂), 2.56 (s, 6H, CH₃), 2.53-2.49 (m, 8H, NH et CH₂), 1.83-1.79 (dd, J = 6.4Hz, 4H, CH₂), 1.60-1.57 (dd, J = 7.3Hz, 4H, CH₂), 1.37-1.36 (m, 4H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 2.53-2.49 (m, 4H, CH₂) ; TOF m/z : 780 ; Anal C₅₃H₇₂N₈O₁₆S₂ (C, H, N).

***N,N'*-[3-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propylamino}phénylsulfanyl)phényl]pentane-1,5-diamine 6b**



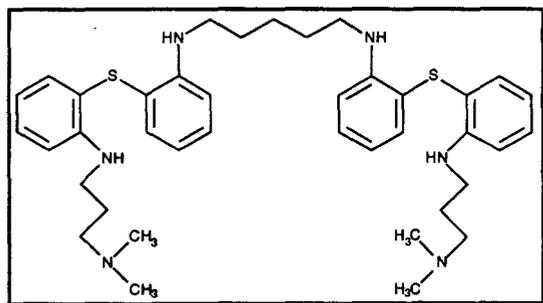
huile incolore (524 mg, 56%) ; Rf(CH₂Cl₂/AcOEt-10/0.15) : 0.3 ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 7.84-7.44 (m, 2H, Ph), 7.35-7.28 (m, 2H, Ph), 7.04-6.99 (m, 2H, Ph), 6.73-6.64 (m, 4H, Ph), 6.41-6.31 (m, 6H, Ph), 3.24-3.19 (t, J = 6.4Hz, 4H, CH₂), 3.06-3.01 (t, J = 6.8Hz, 4H, CH₂), 2.80-2.60 (m, 4H, CH₂), 2.44-2.30 (m, 20H, NH et CH₂), 2.29 (s, 6H, CH₃), 1.76-1.70 (m, 4H, CH₂), 1.61-1.56 (dd, J = 7.4Hz, 4H, CH₂) 1.50-1.40 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 2.44-2.30 (m, 20H, CH₂) ; TOF m/z : 780 ; Anal C₅₃H₇₂N₈O₁₆S₂ (C, H, N).

***N,N'*-[4-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propylamino}phénylsulfanyl)phényl]pentane-1,5-diamine 6c**



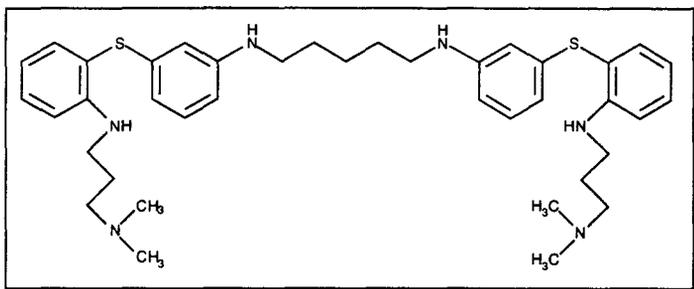
huile incolore (489 mg, 59%) ; Rf(CH₂Cl₂/AcOEt-10/0.15) : 0.3 ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 7.37-7.31 (m, 2H, Ph), 7.25-7.18 (m, 2H, Ph), 7.13-7.08 (m, 4H, Ph), 6.66-6.59 (m, 4H, Ph), 6.56-6.50 (m, 4H, Ph), 3.25-3.19 (m, 4H, CH₂), 3.13-3.03 (m, 8H, CH₂), 2.83-2.71 (m, 8H, CH₂), 2.58 (s, 6H, CH₃), 2.51-2.43 (m, 8H, NH et CH₂), 2.39-2.34 (t, J = 6.8Hz, 4H, CH₂), 1.82-1.75 (m, 4H, CH₂), 1.69-1.61 (dd, J = 7.1Hz, 4H, CH₂), 1.53-1.51 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 2.51-2.43 (m, 8H, CH₂) ; TOF m/z : 780 ; Anal C₅₃H₇₂N₈O₁₆S₂ (C, H, N).

***N,N'*-(2-[2-[3-(diméthylamino)propylamino]phénylsulfanyl]phényl)pentane-1,5-diamine 6'a**



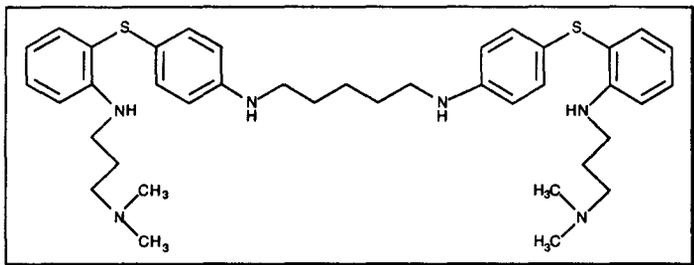
huile incolore (563 mg, 60%) ; Rf(CH₂Cl₂/AcOEt-10/0.15) : 0.3 ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 7.32-7.16 (m, 8H, Ph), 6.72-6.61 (m, 8H, Ph), 4.60 (large, 4H, NH), 3.25-3.14 (m, 8H, CH₂), 2.75-2.69 (m, 4H, CH₂), 2.52 (s, 12H, CH₃), 2.07-1.98 (m, 6H, CH₂), 1.68-1.62 (dd, J = 7.3Hz, 4H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 4.60 échangé ; TOF m/z : 670 ; Anal C₄₃H₅₈N₆O₈S₂ (C, H, N).

***N,N'*-(3-{2-[3-(diméthylamino)propylamino]phénylsulfanyl}phényl)
pentane-1,5-diamine 6'b**



huile incolore (554 mg, 60%) ; Rf(CH₂Cl₂/AcOEt-10/0.15) : 0.3 ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 7.54-7.46 (m, 2H, Ph), 7.39-7.29 (m, 2H, Ph), 7.07-7.00 (m, 2H, Ph), 6.77-6.65 (m, 4H, Ph), 6.45-6.34 (m, 6H, Ph), 4.90 (large, 2H, NH), 3.75 (large, 2H, NH), 3.24-3.17 (m, 4H, CH₂), 3.07-3.01 (t, J = 6.9Hz, 4H, CH₂), 2.67-2.61 (m, 4H, CH₂), 2.48 (s, 12H, CH₃), 2.32-2.27 (t, J = 6.9Hz, 2H, CH₂), 2.03-1.94 (m, 4H, CH₂), 1.76-1.71 (dd, J = 6.7Hz, 4H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 4.90 et 3.75 échangés ; TOF m/z : 670 ; Anal C₄₃H₅₈N₆O₈S₂ (C, H, N).

***N,N'*-(4-{2-[3-(diméthylamino)propylamino]phénylsulfanyl}phényl)
pentane-1,5-diamine 6'c**

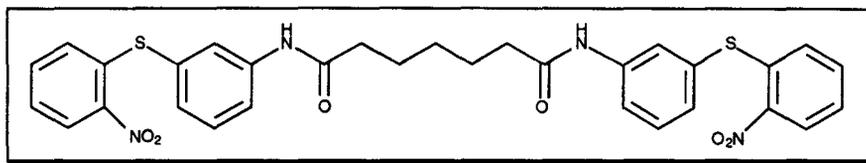


huile incolore (277 mg, 60%) ; Rf(CH₂Cl₂/AcOEt-10/0.15) : 0.3 ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 7.45-7.41 (m, 2H, Ph), 7.29-7.22 (m, 2H, Ph), 7.13-7.08 (m, 4H, Ph), 6.70-6.62 (m, 4H, Ph), 6.56-6.50 (m, 4H, Ph), 4.90 (large, 2H, NH), 3.80 (large, 2H, NH), 3.23-3.16 (t, J = 6.1Hz, 4H, CH₂), 3.12-3.07 (t, J = 6.9Hz, 4H, CH₂), 2.72-2.66 (m, 4H, CH₂), 2.50 (s, 12H, CH₃), 2.16-2.14 (m, 2H, CH₂), 2.04-1.92 (m, 4H, CH₂), 1.68-1.60 (dd, J = 7.1Hz, 4H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 4.90 et 3.80 échangés ; TOF m/z : 670 ; Anal C₄₃H₅₈N₆O₈S₂ (C, H, N).

2.2. Variation de la longueur du bras espaceur

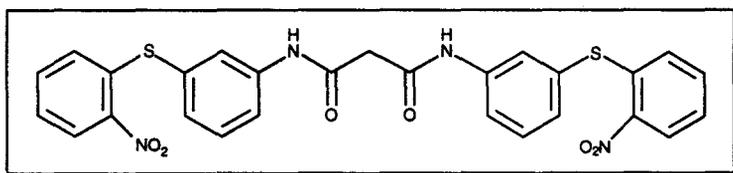
"Dimérisation"

***N,N'*-{3-[(2-nitro)phénylsulfanyl]phényl}heptane-1,7-diamide 10b**



Sous azote et à 0°C, à une solution du diphénylsulfure **2b** (4.6 g, 18.7 mmol, 2 éq) dans 50 mL de pyridine distillée est ajouté, goutte à goutte, du dichlorure d'heptanoyle (1.53 mL, 9.35 mmol, 1 éq). Après une heure d'agitation à 0°C et 7 heures à température ambiante, la pyridine est évaporée. Le solide résiduel est traité par un mélange CH₂Cl₂/HCl 1 M. La phase organique est isolée, séchée sur MgSO₄ et évaporée pour donner le bis(2-aminodiphénylsulfure) nitré correspondant sous la forme d'un solide orange (5.34 g, 93%), qui est utilisé ensuite sans autre purification ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.8, R.H. positif ; P.F. : 58°C ; RMN ¹H, δ(CD₃COCD₃) : 9.12 (large, 2H, NH), 8.26-8.20 (m, 2H, Ph), 8.01-7.99 (m, 2H, Ph), 7.84-7.80 (m, 2H, Ph), 7.58-7.27 (m, 8H, Ph), 7.06-7.01 (m, 2H, Ph), 2.43-2.37 (t, J = 7.3Hz, 4H, CH₂), 1.76-1.60 (dd, J = 7.6Hz, 4H, CH₂), 1.48-1.38 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₃COCD₃ + D₂O) : 9.12 échangé ; TOF m/z : 616.

***N'*-{3-[(2-nitro)phénylsulfanyl]phényl}propane-1,3-diamide 14b**



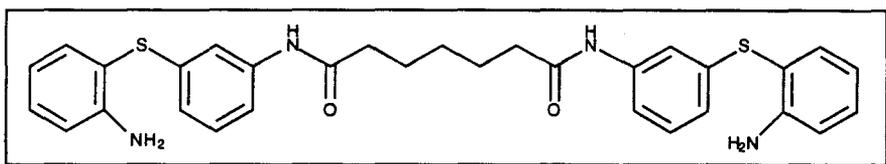
Sous azote et à 0°C, à une solution du diphénylsulfure **2b** (1 g, 4.06 mmol, 2 éq) dans 80 mL d'éther et 326 µL de pyridine distillée (4.06 mmol, 2 éq) est ajouté, goutte à goutte, du dichlorure de propanoyle (198 µL, 2.03 mmol, 1 éq). Après une heure d'agitation à 0°C et 7 heures à température ambiante, l'éther est évaporé. Le solide résiduel est traité par un mélange CH₂Cl₂/HCl 1 M. La phase organique est isolée, séchée sur MgSO₄ et évaporée pour donner le bis(2-aminodiphénylsulfure) nitré correspondant sous la forme d'un solide jaune (832 mg, 73%), qui est utilisé ensuite sans autre purification ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.75, R.H. positif ; P.F. : 68°C ; RMN ¹H, δ(CD₃COCD₃) :

9.30 (large, 2H, NH), 8.26-8.20 (m, 2H, Ph), 8.05-8.03 (m, 2H, Ph), 7.85-7.81 (m, 2H, Ph), 7.59-7.34 (m, 8H, Ph), 7.10-7.02 (m, 2H, Ph), 3.60 (s, 2H, CH₂) ; $\delta(\text{CD}_3\text{COCD}_3 + \text{D}_2\text{O})$: 9.30 échangé ; TOF m/z : 560.

Réduction des groupements nitro

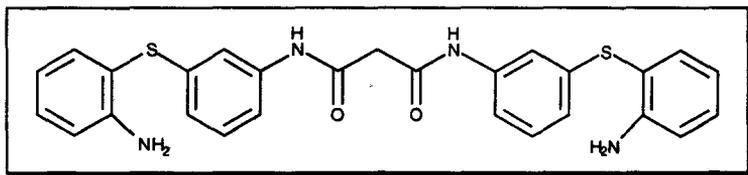
Le mode opératoire pour les composés **11b** et **15b** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **4a**.

***N,N'*-{3-[(2-amino)phénylsulfanyl]phényl}heptane-1,7-diamide 11b**



huile incolore (3.54 g, 88%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.5 ; RMN ¹H, $\delta(\text{CD}_3\text{COCD}_3)$: 9.16 (large, 2H, NH), 7.69-7.66 (m, 2H, Ph), 7.55-7.50 (m, 1H, Ph), 7.43 (m, 1H, Ph), 7.39-7.35 (m, 1H, Ph), 7.31-7.13 (m, 4H, Ph), 7.07-7.02 (m, 2H, Ph), 6.90-6.86 (m, 1H, Ph), 6.77-6.74 (m, 1H, Ph), 6.69-6.59 (m, 3H, Ph), 5.04 (large, 4H, NH₂), 2.37-2.32 (m, 4H, CH₂), 1.80-1.77 (m, 4H, CH₂), 1.50-1.40 (m, 2H, CH₂) ; $\delta(\text{CD}_3\text{COCD}_3 + \text{D}_2\text{O})$: 9.16 et 5.04 échangés ; TOF m/z : 556.

***N,N'*-{3-[(2-amino)phénylsulfanyl]phényl}propane-1,3-diamide 15b**

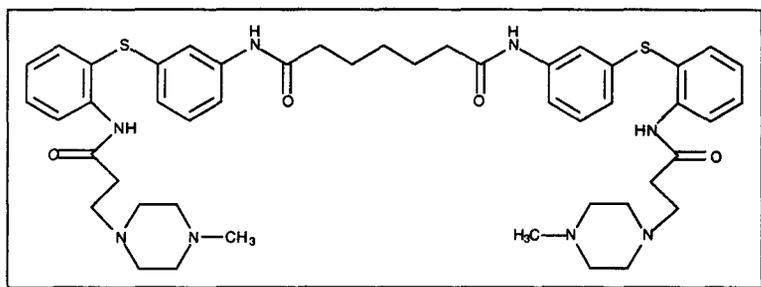


huile incolore (814 mg, 80%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.55, R.H. positif ; RMN ¹H, $\delta(\text{CD}_3\text{COCD}_3)$: 9.72 (large, 2H, NH), 7.71-7.66 (m, 3H, Ph), 7.51-7.29 (m, 6H, Ph), 7.12-7.02 (m, 3H, Ph), 6.78-6.77 (m, 1H, Ph), 6.68-6.54 (m, 3H, Ph), 5.10 (large, 4H, NH₂), 3.57 (s, 2H, CH₂) ; $\delta(\text{CD}_3\text{COCD}_3 + \text{D}_2\text{O})$: 9.72 et 5.10 échangé ; TOF m/z : 500.

Addition des deux chaînes latérales aminées

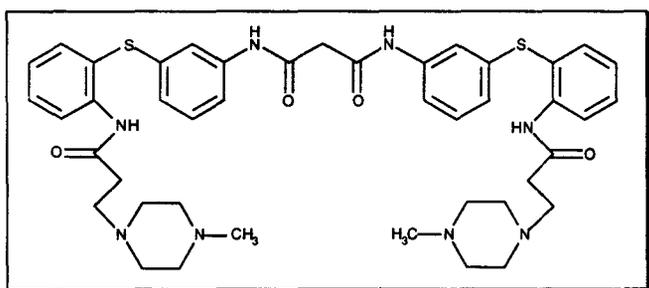
Le mode opératoire pour les composés **12b** et **16b** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **5a**.

N,N'*-[3-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]heptane-1,7-diamide **12b*



solide jaune clair (2 g, 44%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-85/15) : 0.3, R.H. positif ; P.F. : 55°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.30 (large, 2H, NH), 8.22-8.18 (m, 1H, Ph), 8.05 (large, 2H, NH), 7.60-7.53 (m, 4H, Ph), 7.48-7.42 (m, 2H, Ph), 7.34-7.31 (m, 1H, Ph), 7.24-7.06 (m, 6H, Ph), 6.86-6.80 (m, 2H, Ph), 2.58-2.37 (m, 28H, CH₂), 2.21 (s, 6H, CH₃), 1.75-1.65 (m, 4H, CH₂), 1.41-1.38 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.30 et 8.05 échangés ; TOF m/z : 864 ; Anal C₅₅H₆₈N₈O₂₀S₂ (C, H, N).

N,N'*-[3-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]propane-1,3-diamide **16b*

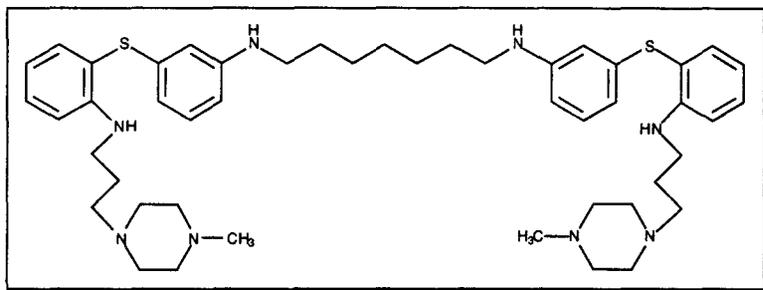


huile orange clair (621 mg, 64%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-85/15) : 0.45, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.43 (large, 2H, NH), 9.47 (large, 2H, NH), 8.26-8.22 (m, 1H, Ph), 7.61-7.52 (m, 3H, Ph), 7.44-7.32 (m, 7H, Ph), 7.23-7.12 (m, 4H, Ph), 6.88-6.85 (m, 1H, Ph), 3.51 (s, 2H, CH₂), 2.64-2.47 (m, 12H, CH₂), 2.27 (s, 6H, CH₃) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.43 et 9.47 échangés ; TOF m/z : 808 ; Anal C₅₁H₆₀N₈O₂₀S₂ (C, H, N).

Réduction des fonctions amides

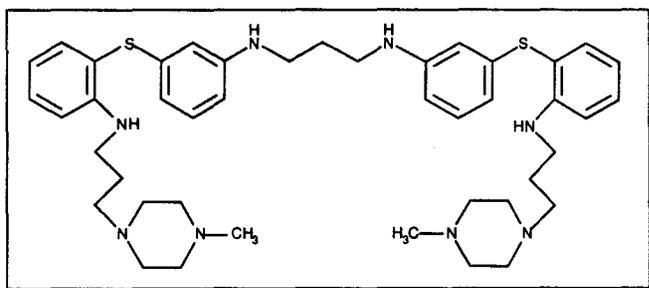
Le mode opératoire pour les composés **13b** et **17b** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **6a**.

N,N'*-[3-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propylamino}phénylesulfanyl)phényl]heptane-1,7-diamine **13b*



huile incolore (505 mg, 54%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-100/5) : 0.6 ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 7.47-7.46 (m, 2H, Ph), 7.34-7.31 (m, 2H, Ph), 7.03-7.00 (m, 2H, Ph), 6.73-6.67 (m, 4H, Ph), 6.40-6.32 (m, 6H, Ph), 3.25-3.21 (m, 4H, CH₂), 3.05-3.02 (m, 10H, NH et CH₂), 2.76-2.68 (m, 10H, NH et CH₂), 2.58 (s, 6H, CH₃), 2.42-2.39 (m, 4H, CH₂), 1.77-1.72 (m, 6H, CH₂), 1.59-1.55 (m, 4H, CH₂), 1.40-1.37 (m, 8H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 3.05-3.02 (m, 8H, CH₂), 2.76-2.68 (m, 8H, CH₂) ; TOF m/z : 808 ; Anal C₅₅H₇₆N₈O₁₆S₂ (C, H, N).

N,N'*-[3-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propylamino}phénylesulfanyl)phényl]propane-1,3-diamine **17b*



huile incolore (232 mg, 66%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-100/5) : 0.3 ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 7.48-7.44 (m, 1H, Ph), 7.36-7.32 (m, 1H, Ph), 7.24-7.15 (m, 4H, Ph), 7.02-6.99 (m, 1H, Ph), 6.81-6.61 (m, 7H, Ph), 6.41-6.35 (m, 2H, Ph), 3.24-3.18 (m, 6H, NH et CH₂), 3.11-3.07 (m, 8H, CH₂), 2.84-2.76 (m, 4H, CH₂), 2.71-2.69 (m, 2H, CH₂), 2.62 (s, 6H, CH₃), 2.51-2.45 (m, 6H, CH₂), 2.41-2.37 (m, 6H, NH et CH₂), 1.76-1.69

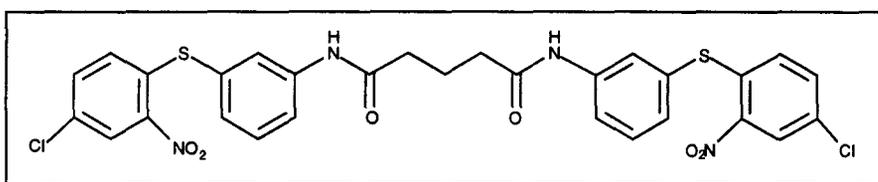
(m, 6H, CH₂) ; $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2 + \text{D}_2\text{O})$: 3.24-3.18 (m, 4H, CH₂) et 2.41-2.37 (m, 4H, CH₂) ;
TOF m/z : 752 ; Anal C₅₁H₆₈N₈O₁₆S₂ (C, H, N).

2.3. Variation de l'atome d'halogène

"Dimérisation"

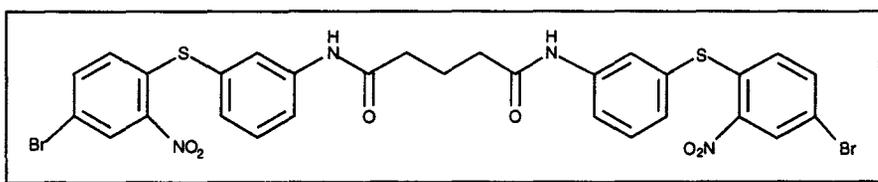
Le mode opératoire pour les composés **19b**, **24b**, **29b** et **34b** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **3b**.

***N,N'*-{3-[(4-chloro-2-nitro)phénylsulfanyl]phényl}pentane-1,5-diamide 19b**



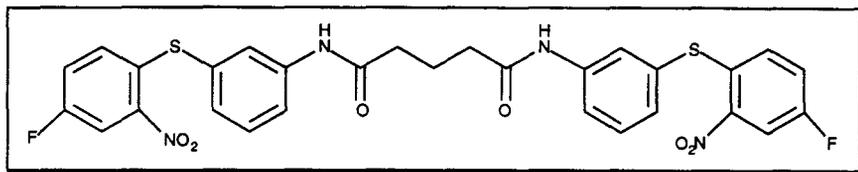
solide jaune (3.18 g, 68%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.6, R.H. positif ; P.F. : 145°C ;
RMN ¹H, $\delta(\text{DMSO-d}_6)$: 10.25 (large, 2H, NH), 8.88-8.85 (m, 2H, Ph), 7.95-7.93 (m, 2H, Ph), 7.77-7.67 (m, 4H, Ph), 7.52-7.46 (m, 2H, Ph), 7.30-7.26 (m, 2H, Ph), 6.94-6.90 (m, 2H, Ph), 2.43-2.38 (m, 4H, CH₂), 1.92-1.87 (dd, J = 7.2Hz, 2H, CH₂) ;
 $\delta(\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O})$: 10.25 échangé ; TOF m/z : 657.

***N,N'*-{3-[(4-bromo-2-nitro)phényl]sulfanyl}phényl}pentane-1,5-diamide 24b**



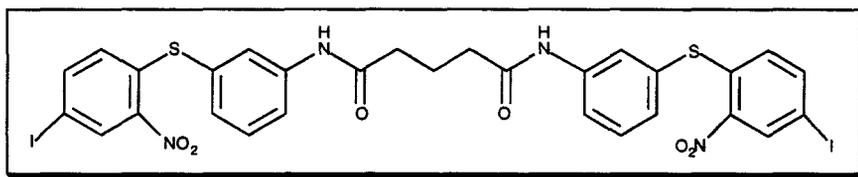
solide orange (8.72 g, 95%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.5, R.H. positif ; P.F. : 110°C ;
RMN ¹H, $\delta(\text{DMSO-d}_6)$: 10.23 (large, 2H, NH), 8.41-8.40 (m, 2H, Ph), 7.94-7.92 (m, 2H, Ph), 7.83-7.73 (m, 4H, Ph), 7.52-7.46 (m, 2H, Ph), 7.30-7.26 (m, 2H, Ph), 6.87-6.83 (m, 2H, Ph), 2.43-2.37 (t, J = 7.4Hz, 4H, CH₂), 1.93-1.87 (dd, J = 7.8Hz, 2H, CH₂) ;
 $\delta(\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O})$: 10.23 échangé ; TOF m/z : 746.

***N,N'*-{3-[(4-fluoro-2-nitro)phénylesulfanyl]phényl}pentane-1,5-diamide 29b**



solide jaune (9.45 g, 100%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.55, R.H. positif ; P.F. : 130°C ; RMN ¹H, δ(DMSO-d₆) : 10.24 (large, 2H, NH), 8.18-8.14 (m, 2H, Ph), 7.92-7.90 (m, 2H, Ph), 7.75-7.71 (m, 2H, Ph), 7.60-7.44 (m, 4H, Ph), 7.27-7.23 (m, 2H, Ph), 7.01-6.96 (m, 2H, Ph), 2.42-2.37 (t, J = 7.3Hz, 4H, CH₂), 1.91-1.86 (dd, J = 7.3Hz, 2H, CH₂) ; δ(DMSO-d₆ + D₂O) : 10.24 échangé ; TOF m/z : 624.

***N,N'*-{3-[(4-iodo-2-nitro)phénylesulfanyl]phényl}pentane-1,5-diamide 34b**



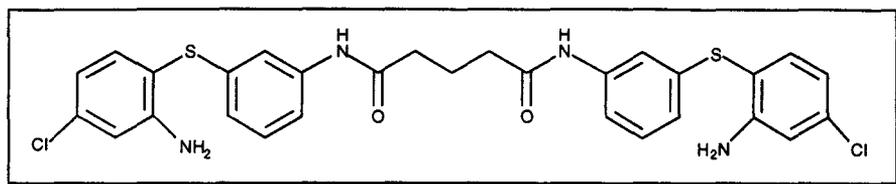
solide marron (8.02 g, 71%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.6, R.H. positif ; P.F. : 80°C ; RMN ¹H, δ(DMSO-d₆) : 10.37 (large, 2H, NH), 8.94-8.91 (m, 3H, Ph), 8.58-8.53 (m, 1H, Ph), 8.48-8.47 (m, 1H, Ph), 8.06-8.01 (m, 3H, Ph), 7.95-7.89 (m, 2H, Ph), 7.78-7.75 (m, 1H, Ph), 7.50-7.44 (m, 1H, Ph), 7.27-7.24 (m, 1H, Ph), 6.74-6.66 (m, 1H, Ph), 2.44-2.36 (t, J = 7.3Hz, 4H, CH₂), 1.94-1.85 (dd, J = 7.3Hz, 2H, CH₂) ; δ(DMSO-d₆ + D₂O) : 10.37 échangé ; TOF m/z : 840.

Réduction des groupements nitro

Le mode opératoire suivant concerne les composés **20b**, **25b**, **30b** et **35b**.

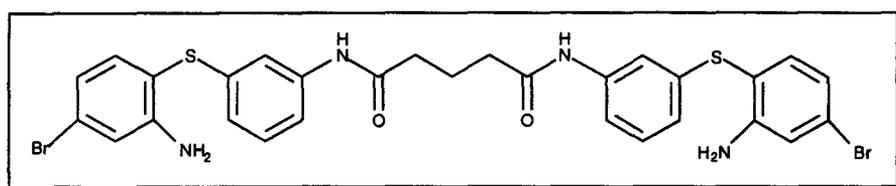
A une solution du composé nitré (1.5 g, 2.3 mmol, 1éq) et de fer (765 mg, 13.7 mmol, 6éq) dans 15 mL d'éthanol à 95°C sont ajoutés 474 µL d'acide chlorhydrique concentré (5.7 mmol, 2.5 éq). Après une heure d'agitation à reflux, le fer est éliminé par filtration sur célite et l'évaporation du filtrat donne le dérivé amino correspondant qui est utilisé ensuite sans autre purification.

***N,N'*-{3-[(2-amino-4-chloro)phénylsulfanyl]phényl}pentane-1,5-diamide
20b**



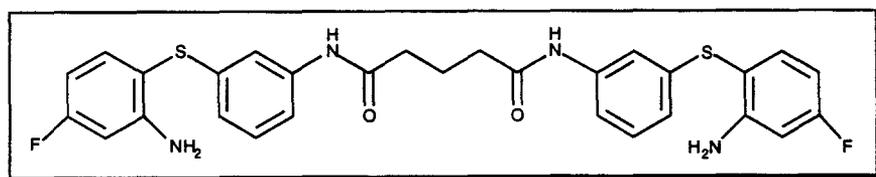
solide incolore (1.31 g, 96%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.55, R.H. positif ; P.F. : 75°C ;
RMN ¹H, δ(CD₃COCD₃) : 9.23 (large, 2H, NH), 7.56-7.53 (m, 2H, Ph), 7.41-7.35 (m, 4H, Ph), 7.23-7.17 (m, 2H, Ph), 6.93 (m, 2H, Ph), 6.80-6.77 (m, 2H, Ph), 6.73-6.66 (m, 2H, Ph), 5.32 (large, 4H, NH₂), 2.42-2.37 (t, J = 7Hz, 4H, CH₂), 1.99-1.94 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₃COCD₃ + D₂O) : 9.23 et 5.32 échangés ; TOF m/z : 597.

***N,N'*-{3-[(2-amino-4-bromo)phénylsulfanyl]phényl}pentane-1,5-diamide
25b**



solide incolore (3.68 g, 100%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.5, R.H. positif ; P.F. : 55°C ;
RMN ¹H, δ(DMSO-d₆) : 9.91 (large, 2H, NH), 8.00-7.98 (m, 2H, Ph), 7.41-6.69 (m, 8H, Ph), 6.71-6.68 (m, 4H, Ph), 5.63 (large, 4H, NH₂), 2.30-2.26 (m, 4H, CH₂), 1.83-1.79 (m, 2H, CH₂) ; δ(DMSO-d₆ + D₂O) : 9.91 et 5.63 échangés ; TOF m/z : 686.

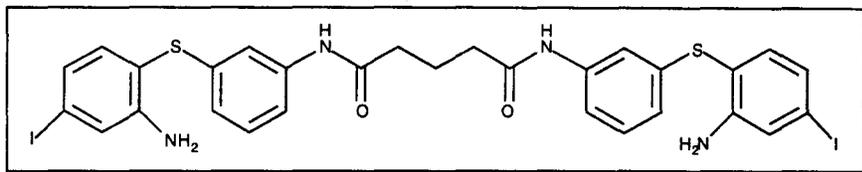
***N,N'*-{3-[(2-amino-4-fluoro)phénylsulfanyl]phényl}pentane-1,5-diamide
30b**



solide doré (9.1 g, 98%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.45, R.H. positif ; P.F. : 78°C ;
RMN ¹H, δ(DMSO-d₆) : 9.89 (large, 2H, NH), 7.39-7.14 (m, 8H, Ph), 6.65-6.37 (m,

6H, Ph), 5.66 (large, 4H, NH₂), 2.30-2.26 (m, 4H, CH₂), 1.83-1.81 (m, 2H, CH₂) ;
 δ (DMSO-d₆ + D₂O) : 9.89 et 5.66 échangés ; m/z : 564.

***N,N'*-{3-[(2-amino-4-iodo)phénylesulfanyl]phényl}pentane-1,5-diamide
 35b**

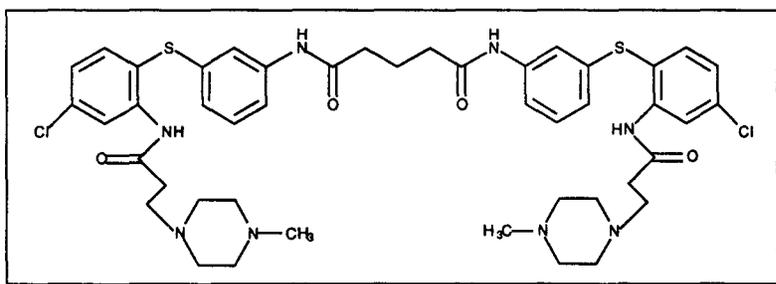


solide marron (11.1 g, 100%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.5, R.H. positif ; P.F. : 95°C ;
 RMN ¹H, δ (DMSO-d₆): 9.91 (large, 2H, NH), 7.47-7.43 (m, 2H, Ph), 7.35-7.33 (m,
 2H, Ph), 7.22-7.16 (m, 4H, Ph), 7.06-7.03 (m, 4H, Ph), 6.74-6.71 (m, 2H, Ph), 5.57
 (large, 4H, NH₂), 2.35-2.29 (m, 4H, CH₂), 1.89-1.84 29 (m, 2H, CH₂) ; δ (DMSO-d₆ +
 D₂O) : 9.91 et 5.57 échangés ; TOF m/z : 780.

Addition des deux chaînes latérales aminées

Le mode opératoire pour les composés **21b**, **26b**, **31b** et **36b** est le même que celui mis
 en oeuvre pour le composé **5b**.

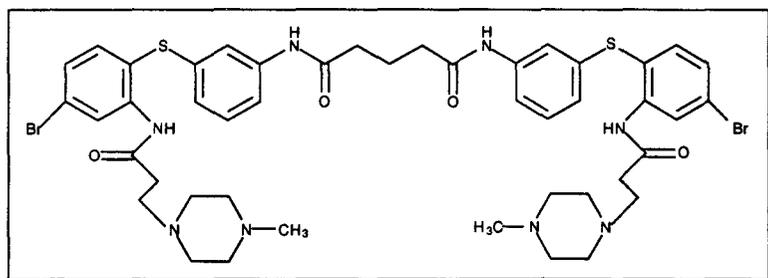
***N,N'*-[3-(2-{4-chloro-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}
 phénylesulfanyl]phényl}pentane-1,5-diamide **21b****



solide incolore (1.61 g, 59%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-7/3) : 0.25, R.H. positif ; P.F. : 75°C ;
 RMN ¹H, δ (CD₂Cl₂) : 10.69 (large, 2H, NH), 8.44 (large, 2H, NH), 8.34-8.33 (m, 2H,
 Ph), 7.52-7.48 (m, 2H, Ph), 7.41-7.38 (m, 2H, Ph), 7.31 (m, 2H, Ph), 7.27-7.21 (m,
 2H, Ph), 7.13-7.09 (m, 2H, Ph), 6.90-6.86 (m, 2H, Ph), 2.54-2.41 (m, 24H, CH₂),
 2.40-2.35 (t, J = 7Hz, 4H, CH₂), 2.24 (s, 6H, CH₃), 2.05-2.00 (dd, J = 6.8Hz, 2H,

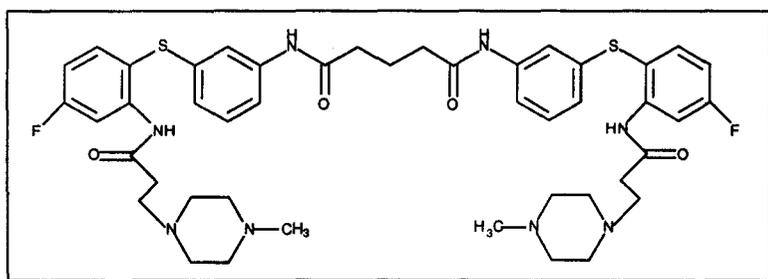
CH₂) ; $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2 + \text{D}_2\text{O})$: 10.69 et 8.44 échangés ; TOF m/z : 905 ; Anal C₅₃H₆₂Cl₂N₈O₂₀S₂ (C, H, N).

***N,N'*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]pentane-1,5-diamide 26b**



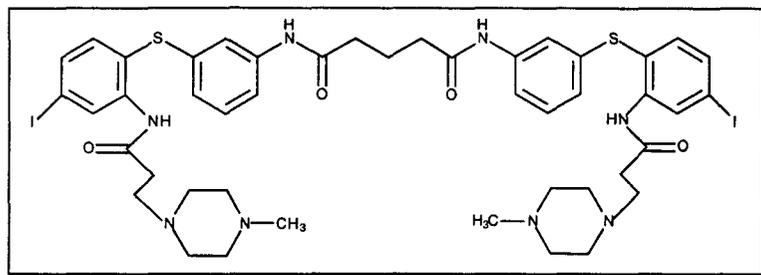
solide incolore (1.2 g, 62%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-7/3) : 0.3, R.H. positif ; P.F. : 70°C ; RMN ¹H, $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2)$: 10.65 (large, 2H, NH), 8.47 (large, 2H, NH), 7.45-7.25 (m, 13H, Ph), 6.89-6.86 (m, 3H, Ph), 2.64-2.34 (m, 20H, CH₂ and CH₃), 2.33-2.20 (m, 10H, CH₂), 2.15-2.05 (m, 4H, CH₂), 1.45-1.35 (m, 2H, CH₂) ; $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2 + \text{D}_2\text{O})$: 10.65 et 8.47 échangés ; TOF m/z : 994 ; Anal C₅₃H₆₂Br₂N₈O₂₀S₂ (C, H, N).

***N,N'*-[3-(2-{4-fluoro-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]pentane-1,5-diamide 31b**



solide incolore (1.4 g, 80%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-7/3) : 0.3, R.H. positif ; P.F. : 55°C ; RMN ¹H, $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2)$: 10.65 (large, 2H, NH), 8.41 (large, 2H, NH), 8.22-8.16 (m, 2H, Ph), 7.62-7.55 (m, 2H, Ph), 7.41-7.19 (m, 6H, Ph), 6.90-6.83 (m, 4H, Ph), 2.55-2.47 (m, 20H, CH₂), 2.41-2.35 (m, 4H, CH₂), 2.25 (s, 6H, CH₃), 2.29-2.25 (m, 4H, CH₂), 2.08-1.96 (m, 2H, CH₂) ; $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2 + \text{D}_2\text{O})$: 10.65 et 8.41 échangés ; TOF m/z : 872 ; Anal C₅₃H₆₂F₂N₈O₂₀S₂ (C, H, N).

***N,N'*-[3-(2-{4-iodo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]pentane-1,5-diamide 36b**

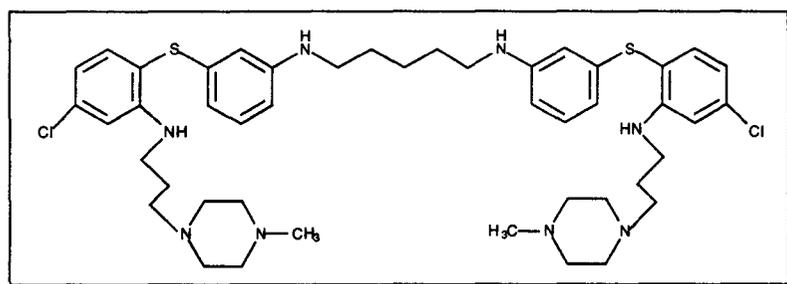


solide incolore (4.77 g, 64%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-7/3) : 0.25, R.H. positif ; P.F. : 58°C ;
RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.60 (large, 2H, NH), 8.62-8.60 (m, 2H, Ph), 8.40 (large, 2H, NH), 7.49-7.41 (m, 4H, Ph), 7.32-7.23 (m, 6H, Ph), 6.91-6.87 (m, 2H, Ph), 2.66-2.43 (m, 20H, CH₂), 2.42-2.37 (t, J = 7Hz, 4H, CH₂), 2.25 (s, 6H, CH₃), 2.18-2.15 (m, 4H, CH₂), 2.09-2.01 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.60 et 8.40 échangés ;
TOF m/z : 1088 ; Anal C₅₃H₆₂I₂N₈O₂₀S₂ (C, H, N).

Réduction des fonctions amides

Le mode opératoire pour les composés **22b**, **27b**, **32b** et **37b** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **6b**.

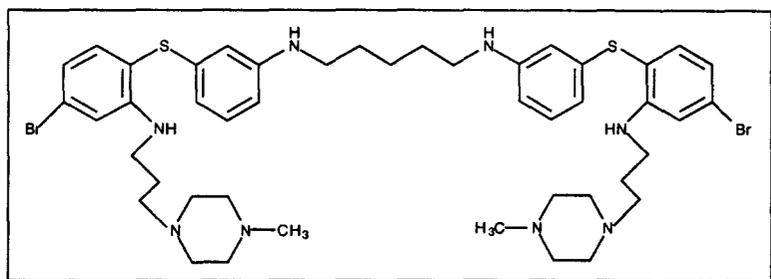
***N,N'*-[3-(2-{4-chloro-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propylamino}phénylesulfanyl)phényl]pentane-1,5-diamine 22b**



huile incolore (276 mg, 49%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-100/5) : 0.35 ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) :
7.40-7.37 (m, 2H, Ph), 7.05-6.99 (m, 2H, Ph), 6.70-6.62 (m, 4H, Ph), 6.41-6.30 (m, 6H, Ph), 5.60 (large, 2H, NH), 3.24-3.17 (m, 4H, CH₂), 3.07-2.98 (m, 8H, NH and CH₂), 2.78-2.63 (m, 8H, CH₂), 2.57 (s, 6H, CH₃), 2.42-2.36 (t, J = 6.5Hz, 8H, CH₂), 1.77-1.70 (dd, J = 6.4Hz, 8H, CH₂), 1.62-1.57 (dd, J = 7.1Hz, 4H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ +

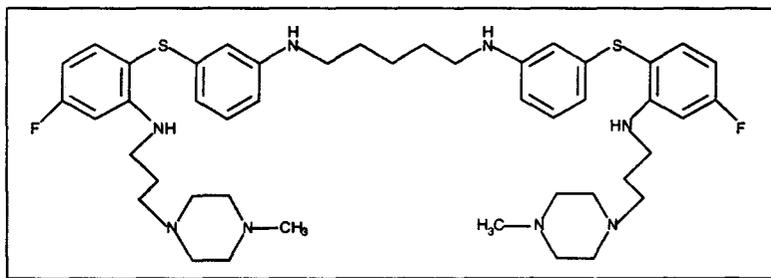
D₂O) : 5.60 échangé et 3.07-2.98 (m, 6H, CH₂) ; TOF m/z : 849 ; Anal C₅₃H₇₀Cl₂N₈O₁₆S₂ (C, H, N).

***N,N'*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propylamino} phénylesulfanyl)phényl]pentane-1,5-diamine 27b**



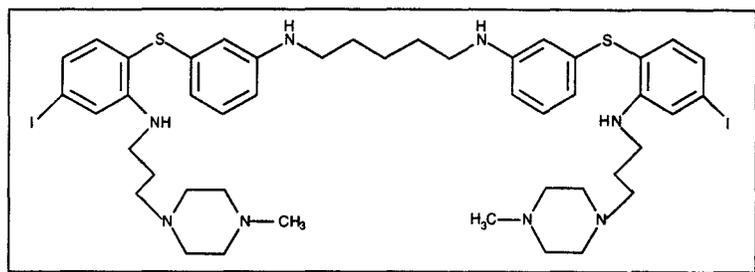
solide incolore (250 mg, 60%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-100/5) : 0.35 ; P.F. : 50°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 7.33-7.30 (m, 2H, Ph), 7.05-6.99 (m, 2H, Ph), 6.85-6.76 (m, 4H, Ph), 6.42-6.29 (m, 6H, Ph), 3.83 (large, 4H, NH), 3.24-3.17 (m, 4H, CH₂), 3.07-2.98 (m, 6H, CH₂), 2.78-2.63 (m, 8H, CH₂), 2.57 (s, 6H, CH₃), 2.44-2.28 (m, 10H, CH₂), 1.75-1.70 (dd, J = 6.4Hz, 8H, CH₂), 1.62-1.55 (q, J = 7.2Hz, 4H, CH₂), 1.47-1.44 (dd, J = 6.4Hz, 2H, CH₂); δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 3.83 échangé ; TOF m/z : 938 ; Anal C₅₃H₇₀Br₂N₈O₁₆S₂ (C, H, N).

***N,N'*-[3-(2-{4-fluoro-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propylamino} phénylesulfanyl)phényl]pentane-1,5-diamine 32b**



huile incolore (473 mg, 50%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-100/3) : 0.1 ; RMN H, δ(CD₂Cl₂) : 7.48-7.39 (m, 2H, Ph), 7.05-6.97 (m, 2H, Ph), 6.45-6.35 (m, 8H, Ph), 6.31-6.27 (m, 2H, Ph), 5.64 (large, 2H, NH), 3.23-3.18 (m, 4H, CH₂), 3.07-2.99 (m, 8H, CH₂), 2.80-2.60 (m, 16H, CH₂), 2.57 (s, 6H, CH₃), 2.41-2.36 (m, 8H, NH and CH₂), 1.76-1.71 (dd, J = 6.4Hz, 4H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 5.64 échangé et 2.41-2.36 (m, 6H, CH₂) ; TOF m/z : 816 ; Anal C₅₃H₇₀F₂N₈O₁₆S₂ (C, H, N).

***N,N'*-[3-(2-{4-iodo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propylamino}phénylesulfanyl)phényl]pentane-1,5-diamine 37b**



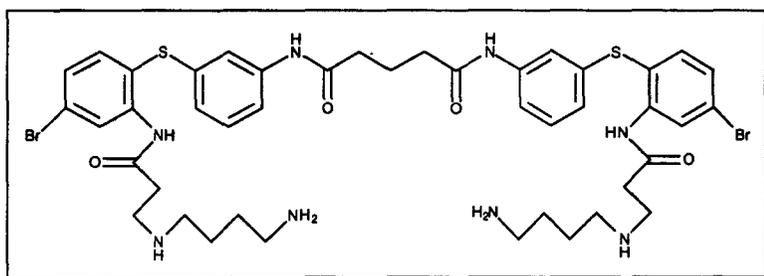
huile incolore (254 mg, 40%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-100/3) : 0.25 ; RMN H, δ(CD₂Cl₂) : 7.17-7.13 (m, 2H, Ph), 7.06-6.98 (m, 6H, Ph), 6.47-6.30 (m, 6H, Ph), 5.45 (large, 2H, NH), 3.23-3.16 (m, 4H, CH₂), 3.08-3.00 (m, 8H, CH₂), 2.78-2.62 (m, 16H, CH₂), 2.57 (s, 6H, CH₃), 2.41-2.36 (m, 8H, NH and CH₂), 1.76-1.69 (dd, J = 6.4Hz, 4H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 5.45 échangé et 2.41-2.36 (m, 6H, CH₂) ; TOF m/z : 1032 ; Anal C₅₃H₇₀I₂N₈O₁₆S₂ (C, H, N).

2.4. Variation finale de l'amine (1,4-diaminobutane ou diéthylènetriamine) en bout de chaîne latérale

2.4.1. Cas du 1,4-diaminobutane

Addition des deux chaînes latérales aminées

***N,N'*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-amino)butylamino]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]pentane-1,5-diamide 38b**



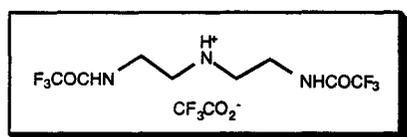
Sous azote et à 0°C, à une solution du dérivé amino **25b** (1 g, 1.9 mmol, 1éq) dans 35 mL de THF anhydre sont ajoutés, goutte à goutte, 5 équivalents de chlorure de 3-chloropropanoyle (904 µL, 9.47 mmol). Après 30 minutes d'agitation à 0°C sont ajoutés 3 équivalents de *N*-éthylpipéridine (781 µL, 5.69 mmol). Ensuite, à 30 minutes d'intervalle, sont ajoutés deux fois 3 équivalents de *N*-éthylpipéridine. Après une heure

d'agitation à 0°C et 30 minutes à température ambiante est ajouté un large excès de 1,4-diaminobutane (3.8 mL, 37.88 mmol, 20 éq). Après 4 heures d'agitation à reflux, le solvant est évaporé et l'huile résiduelle est traitée par un mélange CH₂Cl₂/H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄, évaporée et l'huile obtenue est purifiée par CCE (CH₂Cl₂/MeOH-85/15) pour donner le dérivé **38b** sous la forme d'un solide incolore (553 mg, 30%) ; Rf(acétone/NH₄OH-95/5) : 0.4, R.H. positif ; P.F. : 53°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 11.14 (large, 2H, NH), 9.93 (large, 2H, NH), 8.66-8.60 (m, 2H, Ph), 7.59-7.56 (m, 2H, Ph), 7.45-7.40 (m, 3H, Ph), 7.27-7.13 (m, 5H, Ph), 6.68-6.64 (m, 2H, Ph), 2.77-2.73 (m, 4H, CH₂), 2.54-2.43 (m, 6H, 2NH et 2CH₂), 2.39-2.35 (m, 8H, CH₂), 2.05-1.92 (m, 4H, CH₂), 1.61-1.38 (m, 12H, 2NH₂ et 4CH₂), 1.36-1.32 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 11.14 et 9.93 échangés, 2.60-2.47 (m, 4H, CH₂), 1.61-1.38 (m, 8H, CH₂) ; TOF m/z : 970 ; Anal C₅₁H₆₂Br₂N₈O₂₀S₂ (C, H, N).

2.4.2. Cas de la diéthylènetriamine

Protection des amines primaires

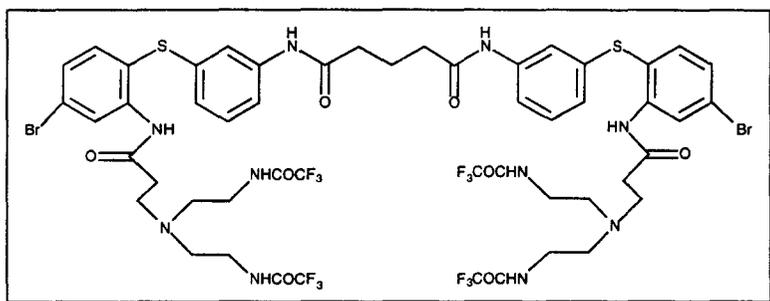
trifluoroacétate de *N,N*-di-[2-(trifluoroacétamide)éthyl]amine



A une solution de diéthylènetriamine (3.5 g, 33.9 mmol, 1 éq) dans 100 mL d'acétonitrile sont ajoutés le trifluoroacétate d'éthyle (19.3 g, 135.7 mmol, 4 éq) et 730 µL d'eau distillée. Après une nuit d'agitation à reflux, l'acétonitrile est évaporé et le résidu solide recristallisé dans l'acétate d'éthyle pour donner le produit diprotégé sous la forme d'un solide blanc (12.7 g, 94%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-8/2) : 0.6, R.H. positif ; P.F. : 84°C ; RMN ¹H, δ(MeOH) : 3.66-3.61 (t, J = 6.1Hz, 4H, CH₂), 3.29-3.24 (t, J = 6.1Hz, 4H, CH₂) ; TOF m/z : 408.

Addition des deux chaînes latérales aminées

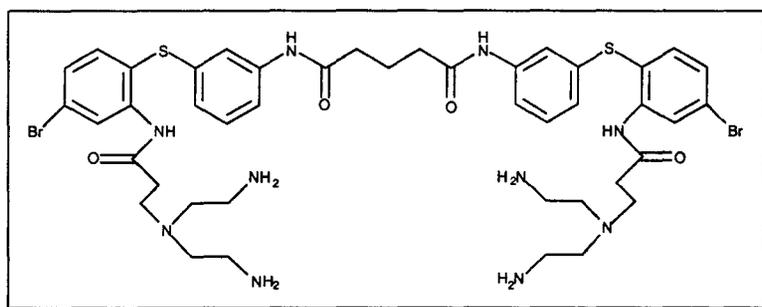
***N,N'*-{3-[2-(4-bromo-3-{*N,N*-di-[2-(trifluoroacétamido)éthyl]amino} propanoylamino)phénylsulfanyl]phényl}pentane-1,5-diamide 39b**



Sous azote et à 0°C, à une solution du dérivé amino **25b** (1.7 g, 2.5 mmol, 1 éq) dans 47 mL de THF anhydre sont ajoutés, goutte à goutte, 5 équivalents de chlorure de 3-chloropropanoyle (1.2 mL, 12.4 mmol). Après 30 minutes d'agitation à 0°C, sont ajoutés 3 équivalents de *N*-éthylpipéridine (1 mL, 7.5 mmol). Ensuite, à 30 minutes d'intervalle, sont ajoutés deux fois 3 équivalents de *N*-éthylpipéridine. Après une heure d'agitation à 0°C et 30 minutes à température ambiante est ajoutée une solution du trifluoroacétate de *N,N*-di-[2-(trifluoroacétamide)éthyl]amine (10 g, 25 mmol, 10 éq) et de triéthylamine (10.5 mL, 75 mmol, 30 éq) dans 10 mL de THF. Après une nuit d'agitation à reflux, le solvant est évaporé et l'huile résiduelle est traitée par un mélange CH₂Cl₂/H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄, évaporée et l'huile obtenue est purifiée par CCE (CH₂Cl₂/MeOH-9/1) pour donner le composé **39b** protégé sous la forme d'une huile orange (1.8 g, 52%) ; R_f(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.4, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 8.65-8.64 (m, 2H, Ph), 8.57 (large, 2H, NH), 8.34 (large, 2H, NH), 7.84 (large, 2H, NH), 7.78 (large, 2H, NH), 7.52-7.49 (m, 2H, Ph), 7.41-7.31 (m, 6H, Ph), 7.27-7.21 (m, 2H, Ph), 6.91-6.88 (m, 2H, Ph), 3.48-3.41 (m, 8H, CH₂), 3.35-3.29 (m, 8H, CH₂), 2.64-2.55 (m, 8H, CH₂), 2.48-2.36 (m, 4H, CH₂), 2.06-2.02 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 8.57, 8.34, 7.84 et 7.78 échangés ; TOF m/z : 1384.

Déprotection des amines primaires

N,N'*-[3-(2-{4-bromo-3-[*N,N*-di-(2-aminoéthyl)amino]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]pentane-1,5-diamide **40b*



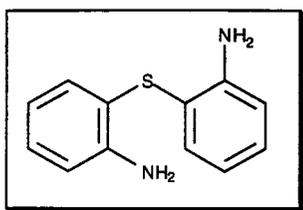
A une solution du composé **39b** (500 mg, 0.36 mmol, 1 éq) dans 10 mL de THF sont ajoutés 5 mL d'eau distillée et de la lithine (152 mg, 3.6 mmol, 10 éq). Après 1 heure dans un bain à ultrasons maintenu à température constante, le THF est évaporé et la phase aqueuse est extraite par CH_2Cl_2 . La phase organique est séchée sur MgSO_4 , puis évaporée et l'huile résiduelle est purifiée par CCE (acétone/ NH_4OH -9/1) pour donner le produit polyaminé **40b** sous la forme d'une huile jaune clair (100 mg, 28%) ; Rf(acétone/ NH_4OH -95/5) : 0.1, R.H. positif ; RMN ^1H , $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2)$: 8.60-8.43 (m, 2H, Ph), 7.75-7.42 (m, 4H, Ph), 7.35-7.10 (m, 6H, Ph), 6.90-6.70 (m, 2H, Ph), 2.80-2.35 (m, 24H, CH_2), 2.30-2.20 (m, 4H, CH_2), 2.10-2.04 (m, 2H, CH_2) ; $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2 + \text{D}_2\text{O})$: spectre inchangé ; TOF m/z : 1000 ; Anal $\text{C}_{55}\text{H}_{68}\text{Br}_2\text{N}_{10}\text{O}_{28}\text{S}_2$ (C, H, N).

3. 2-aminodiphénylsulfures à deux chaînes latérales aminées

Réduction du groupement nitro

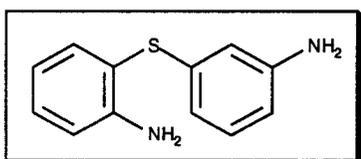
Le mode opératoire pour les composés **7a**, **7b** et **7c** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **4a**.

2-[(2-amino)phénylsulfanyl]phénylamine 7a



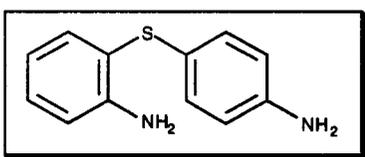
solide incolore (2.5 g, 75%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.9 ; P.F. : 60°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 7.26-7.13 (m, 4H, Ph), 6.78-6.68 (m, 4H, Ph), 4.30 (large, 2H, NH₂), 3.73 (large, 2H, NH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 4.30 et 3.73 échangés ; TOF m/z : 216.

2-[(3-amino)phénylsulfanyl]phénylamine 7b



huile incolore (2.66 g, 80%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.8 ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 7.23-7.15 (m, 2H, Ph), 6.85-6.69 (m, 4H, Ph), 6.56-6.41 (m, 2H, Ph), 4.39 (large, 2H, NH₂), 3.73 (large, 2H, NH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 4.39 et 3.73 échangés ; TOF m/z : 216.

2-[(4-amino)phénylsulfanyl]phénylamine 7c

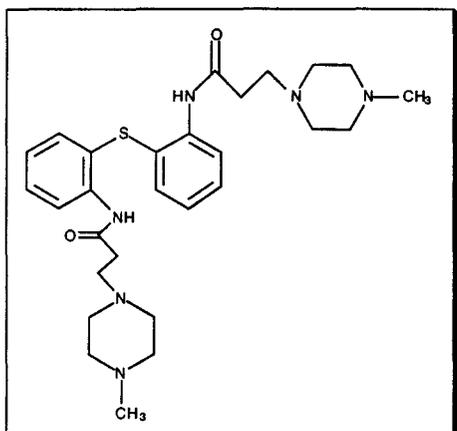


huile incolore (3.06 g, 92%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.75 ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 7.38-7.33 (m, 1H, Ph), 7.19-7.07 (m, 3H, Ph), 6.84-6.59 (m, 4H, Ph), 4.32 (large, 2H, NH₂), 3.74 (large, 2H, NH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 4.32 et 3.74 échangés ; TOF m/z : 216.

Addition des deux chaînes latérales aminées

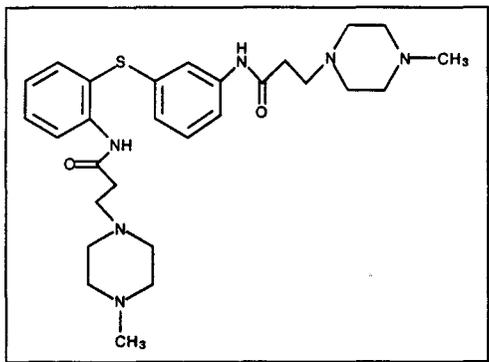
Le mode opératoire pour les composés **8a**, **8b** et **8c** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **5a**.

***N*-[2-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanamide 8a**



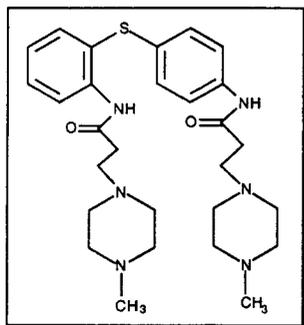
solide jaune (1.75 g, 72%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-85/15) : 0.2, R.H. positif ; P.F. : 84°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.43 (large, 4H, NH), 8.11-8.07 (m, 2H, Ph), 7.35-7.29 (m, 2H, Ph), 7.17-7.04 (m, 4H, Ph), 2.67-2.44 (m, 24H, CH₂), 2.29 (s, 3H, CH₃), 2.25 (s, 3H, CH₃) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.43 échangé ; TOF m/z : 524 ; Anal C₃₆H₄₈N₆O₁₈S (C, H, N).

***N*-[2-(3-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanamide 8b**



huile orange clair (2.16 g, 64%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-85/15) : 0.2, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 11.00 (large, 2H, NH), 10.47 (large, 2H, NH), 8.31-8.28 (m, 1H, Ph), 7.59-7.53 (m, 1H, Ph), 7.45-7.39 (m, 2H, Ph), 7.33-7.31 (m, 1H, Ph), 7.24-7.10 (m, 2H, Ph), 6.83-6.79 (m, 1H, Ph), 2.69-2.42 (m, 24H, CH₂), 2.29 (s, 3H, CH₃), 2.19 (s, 3H, CH₃) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O): 11.00 et 10.47 échangés ; m/z : 524 ; Anal C₃₆H₄₈N₆O₁₈S (C, H, N).

***N*-[2-(4-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanamide 8c**

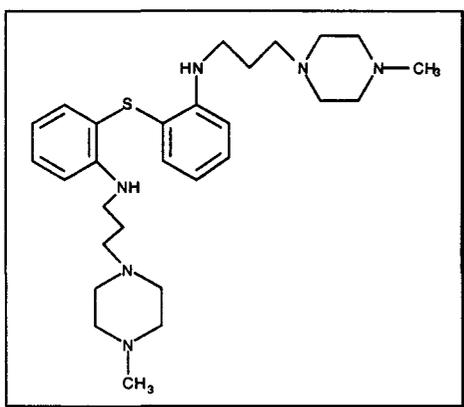


huile orange clair (849 mg, 50%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-85/15) : 0.15, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 11.12 (large, 2H, NH), 10.35 (large, 2H, NH), 8.24-8.20 (m, 1H, Ph), 7.56-7.51 (m, 2H, Ph), 7.40-7.32 (m, 2H, Ph), 7.19-7.06 (m, 3H, Ph), 2.74-2.47 (m, 24H, CH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.23 (s, 3H, CH₃) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 11.12 et 10.35 échangés ; TOF m/z : 524 ; Anal C₃₆H₄₈N₆O₁₈S (C, H, N).

Réduction des fonctions amides

Le mode opératoire pour les composés **9a**, **9b** et **9c** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **6a**.

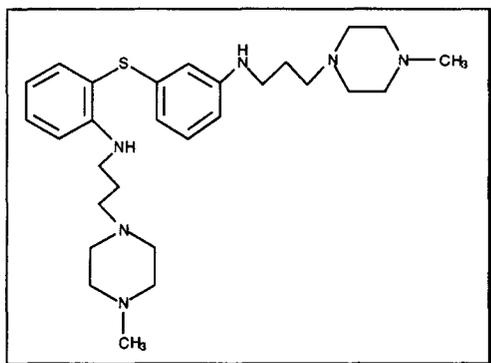
***N*-[2-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propylamino}phénylesulfanyl)phényl]-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propylamine 9a**



huile jaune clair (473 mg, 50%) ; Rf(CH₂Cl₂/AcOEt-100/2) : 0.7 ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 7.22-7.17 (m, 4H, Ph), 6.69-6.59 (m, 4H, Ph), 3.26-3.22 (t, J = 6.4Hz, 4H, CH₂), 3.10-3.02 (m, 4H, CH₂), 2.84-2.74 (m, 8H, CH₂), 2.58 (s, 6H, CH₃), 2.56-2.41 (m,

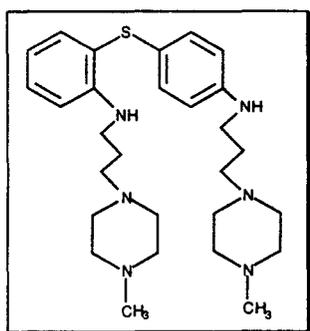
10H, NH et CH₂), 1.86-1.75 (tt, J = 6.5Hz, 4H, CH₂) ; δ (CD₂Cl₂ + D₂O) : 2.56-2.41 (m, 8H, CH₂) ; TOF m/z: 496 ; Anal C₃₆H₅₂N₆O₁₆S (C, H, N).

***N*-[2-(3-[3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propylamino}phénylsulfanyl)phényl]-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propylamine 9b**



huile jaune clair (473 mg, 50%) ; Rf(CH₂Cl₂/AcOEt-100/2) : 0.7 ; RMN ¹H, δ (CD₂Cl₂) : 7.48-7.44 (m, 1H Ph), 7.35-7.29 (m, 1H, Ph), 7.04-6.98 (m, 1H, Ph), 6.74-6.62 (m, 2H, Ph), 6.41-6.32 (m, 3H, Ph), 3.25-3.01 (m, 8H, CH₂), 2.81-2.68 (m, 8H, CH₂), 2.62 (s, 3H, CH₃), 2.58 (s, 3H, CH₃), 2.55-2.39 (m, 10H, NH et CH₂), 1.81-1.69 (tt, J = 6.4Hz, 4H, CH₂) ; δ (CD₂Cl₂ + D₂O) : 2.55-2.39 (m, 8H, CH₂) ; TOF m/z : 496 ; Anal C₃₆H₅₂N₆O₁₆S (C, H, N).

***N*-[2-(4-[3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propylamino}phénylsulfanyl)phényl]-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propylamine 9c**



huile jaune clair (570 mg, 60%) ; Rf(CH₂Cl₂/AcOEt-100/2) : 0.65 ; RMN ¹H, δ (CD₂Cl₂) : 7.37-7.30 (m, 1H, Ph), 7.25-7.17 (m, 1H, Ph), 7.14-7.08 (m, 2H, Ph), 6.67-6.50 (m, 4H, Ph), 3.24-3.06 (m, 8H, CH₂), 2.86-2.72 (m, 8H, CH₂), 2.62 (s, 3H, CH₃), 2.58 (s, 3H, CH₃), 2.56-2.38 (m, 10H, NH et CH₂), 1.83-1.74 (tt, J = 6.5Hz, 4H, CH₂) ;

$\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2 + \text{D}_2\text{O})$: 2.56-2.38 (m, 8H, CH_2) ; TOF m/z : 496 ; Anal $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{O}_{16}\text{S}$ (C, H, N).

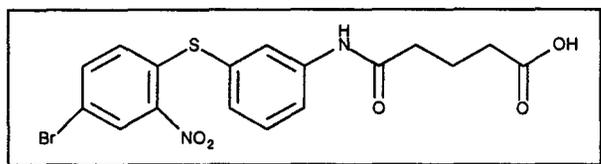
4. Dérivés dissymétriques

4.1. Couplage des amines aliphatiques

4.1.1. Acide à cinq atomes de carbone ($n = 3$)

Ajout de la chaîne centrale

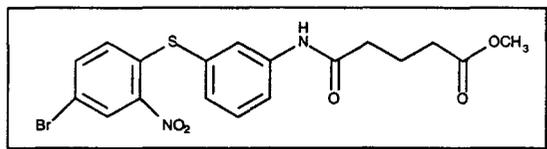
acide 4-{*N*-[3-(4-bromo-2-nitro)phénylsulfanyl]phényl}carbamoyle butanoïque 41b



A 0°C, à une solution de diphénylsulfure **23b** (6.38 g, 19.6 mmol, 1 éq) dans 100 mL de pyridine distillée est ajoutée l'anhydride glutarique (4.5 g, 39.2 mmol, 2 éq). Après 3 h d'agitation à reflux, la pyridine est évaporée et l'huile résiduelle traitée par un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{HCl}$ 1 M. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis évaporée pour donner l'acide carboxylique **41b** sous la forme d'un solide jaune (8.34 g, 97%) ; Rf(CH_2Cl_2) : 0.1, R.H. positif ; P.F. : 73°C ; RMN ^1H , $\delta(\text{CD}_3\text{COCD}_3)$: 8.38-8.37 (m, 1H, Ph), 8.03-8.01 (m, 1H, Ph), 7.86-7.82 (m, 1H, Ph), 7.75-7.70 (m, 1H, Ph), 7.52-7.46 (m, 1H, Ph), 7.33-7.30 (m, 1H, Ph), 6.98-6.94 (m, 1H, Ph), 2.51-2.45 (t, $J = 7.4\text{Hz}$, 2H, CH_2), 2.42-2.36 (m, 2H, CH_2), 2.00-1.90 (tt, $J = 7.4\text{Hz}$, 2H, CH_2) ; TOF m/z : 439.

Formation de l'ester méthylique

4-{N-[3-(4-bromo-2-nitro)phénylsulfanyl]phényl}carbamoylebutylate de méthyle **42b**

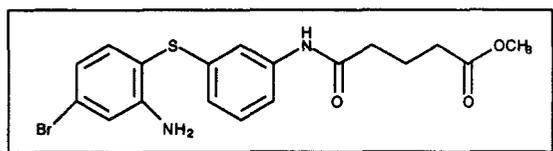


A une solution de l'acide **41b** (10 g, 22.78 mmol, 1 éq) dans 100 mL de méthanol absolu est ajouté 1 mL d'acide chlorhydrique concentré (11.39 mmol, 0.5 éq). Après 1 heure d'agitation à reflux, le méthanol est évaporé et l'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne (CH_2Cl_2) pour donner l'ester méthylique **42b** sous la forme d'un solide jaune (8.35 g, 81%) ; Rf(CH_2Cl_2) : 0.15, R.H. positif ; P.F. : 110°C ; RMN ^1H , $\delta(\text{DMSO-d}_6)$: 10.15 (large, 1H, NH), 8.41-8.37 (m, 1H, Ph), 7.92-7.90 (m, 1H, Ph), 7.84-7.78 (m, 1H, Ph), 7.76-7.71 (m, 1H, Ph), 7.52-7.46 (m, 1H, Ph), 7.31-7.26 (m, 1H, Ph), 6.87-6.83 (m, 1H, Ph), 3.60 (s, 3H, CH_3), 2.40-2.32 (m, 4H, CH_2), 1.89-1.72 (m, 2H, CH_2) ; $\delta(\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O})$: 10.15 échangé ; TOF m/z : 453.

Réduction du groupement nitro

Le mode opératoire pour le composé **43b** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **25b**.

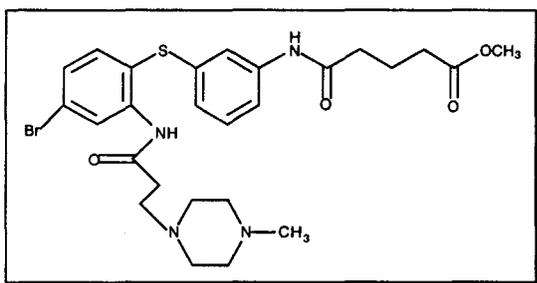
4-{N-[3-(2-amino-4-bromo)phénylsulfanyl]phényl}amidobutylate de méthyle **43b**



huile orange clair (4.2 g, 100%) ; Rf($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH-95/5}$) : 0.35, R.H. positif ; RMN ^1H , $\delta(\text{DMSO-d}_6)$: 9.94 (large, 1H, NH), 7.47-7.43 (m, 1H, Ph), 7.34-7.33 (m, 1H, Ph), 7.24-7.16 (m, 2H, Ph), 7.02-7.01 (m, 1H, Ph), 6.76-6.71 (m, 2H, Ph), 5.67 (large, 2H, NH_2), 3.60 (s, 3H, CH_3), 2.38-2.30 (m, 4H, CH_2), 1.92-1.76 (tt, J = 7.4Hz, 2H, CH_2) ; $\delta(\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O})$: 9.94 et 5.67 échangés ; TOF m/z : 423.

Addition d'une chaîne latérale aminée

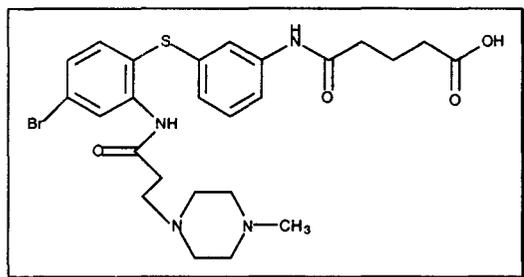
4-{*N*-[2-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]}carbamoylbutylate de méthyle 44b



Sous azote et à 0°C, à une solution du **43b** (5 g, 20.32 mmol, 1 éq) dans 150 mL de THF anhydre sont ajoutés, goutte à goutte, 2.5 équivalents de chlorure de 3-chloropropanoyle (4.85 mL, 50.8 mmol). Après 30 minutes d'agitation à 0°C est ajoutée la *N*-éthylpipéridine (4.2 mL, 30.5 mmol, 1.5 éq). Ensuite, à 30 minutes d'intervalle, sont ajoutés deux fois 1.5 équivalents de *N*-éthylpipéridine. Après une heure d'agitation à 0°C et 30 minutes à température ambiante est ajouté un large excès de *N*-méthylpipérazine (34 mL, 305 mmol, 15 éq). Après 4 heures d'agitation à reflux, le solvant est évaporé et l'huile résiduelle est traitée par un mélange CH₂Cl₂/H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄, évaporée et l'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne (CH₂Cl₂/MeOH-85/15) pour donner le composé **44b** sous la forme d'une huile orange clair (2.6 g, 78%) ; R_f(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.45, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.60 (large, 1H, NH), 8.55-8.54 (m, 1H, Ph), 7.60 (large, 1H, NH), 7.55-7.45 (m, 1H, Ph), 7.41-7.37 (m, 1H, Ph), 7.29-7.21 (m, 3H, Ph), 6.86-6.82 (m, 1H, Ph), 3.68 (s, 3H, CH₃), 2.62-2.25 (m, 16H, CH₂), 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.02-1.96 (tt, J = 7.1Hz, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.60 et 7.60 échangés ; TOF m/z : 577 ; Anal C₃₀H₃₇BrN₄O₁₂S (C, H, N).

Hydrolyse de la fonction ester méthylique

acide 4-{N-[2-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]}carbamoylbutanoïque **45b**



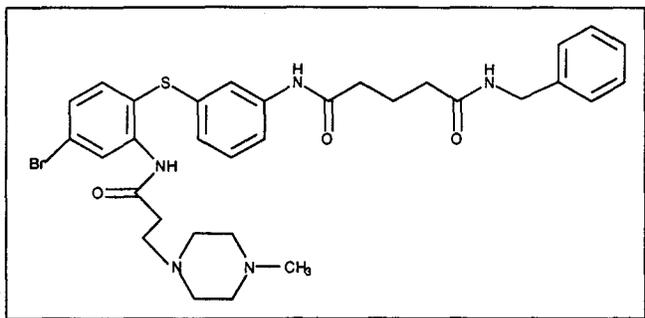
A une solution d'ester **44b** (12.3 g, 21.3 mmol) dans 110 mL de méthanol est ajoutée une solution aqueuse de Na_2CO_3 (4.5 g, 42.6 mmol, 2 éq dans 110 mL d'eau distillée). Après 24 heures d'agitation à température ambiante, le carbonate de sodium en excès est neutralisé par une solution aqueuse de HCl 1 M (42.6 mL, 42.6 mmol, 2 éq). Puis, le méthanol et l'eau sont évaporés. L'huile résiduelle est reprise dans CH_2Cl_2 , puis filtrée sur MgSO_4 et le filtrat est évaporé pour donner le sel de sodium de l'acide carboxylique **45b** sous la forme d'un solide incolore (12 g, 100%) ; Rf(acétone/ NH_4OH -9/1) : 0.5, R.H. positif ; P.F. : 130°C ; RMN ^1H , $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2)$: 10.62 (large, 1H, NH), 9.02 (large, 1H, NH), 8.56-8.54 (m, 1H, Ph), 7.51-7.47 (m, 1H, Ph), 7.43-7.40 (m, 1H, Ph), 7.37-7.33 (m, 1H, Ph), 7.25-7.18 (m, 2H, Ph), 6.82-6.79 (m, 1H, Ph), 3.62-3.57 (t, J = 5Hz, 2H, CH_2), 3.50-3.46 (t, J = 4.9Hz, 2H, CH_2), 2.57-2.34 (m, 12H, CH_2), 2.27 (s, 3H, CH_3), 1.99-1.93 (m, 2H, CH_2) ; $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2 + \text{D}_2\text{O})$: 10.62, 9.02 échangés et 7.55-7.51 (m, 1H, Ph) ; TOF m/z : 563 ; Anal $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{BrN}_4\text{O}_{12}\text{S}$ (C, H, N).

4.1.2. Couplage acide/amine

Le mode opératoire suivant concerne les composés **51b**, **52b**, **53b**, **54b**, **55b**, **56b**, **57b**, **58b**, **59b**, **60b**, **61b** et **62b**.

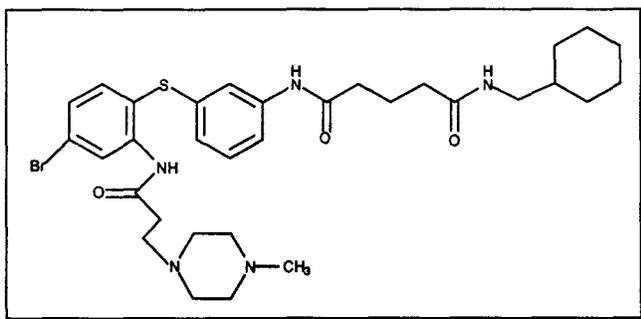
A 0°C , à une solution d'acide **45b** (200 mg, 0.355 mmol, 1 éq) dans 4 mL de DMF sont ajoutés le PyBrop (166 mg, 0.355 mmol, 1 éq) et la DIEA (190 μL , 1.066 mmol, 3 éq). Après 10 minutes d'agitation à 0°C est ajoutée l'amine considérée (0.426 mmol, 1.2 éq). Après 10 minutes d'agitation à 0°C puis deux heures à température ambiante, le DMF est évaporé, l'huile résiduelle est traitée par un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0.5 M. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , puis évaporée et l'huile résiduelle est purifiée par CCE ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ -8/2) pour donner l'amide correspondant.

***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]-*N'*-(benzyl)pentane-1,5-diamide 51b**



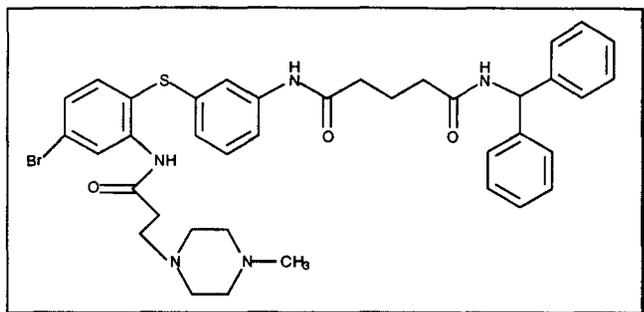
huile incolore (100 mg, 79%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-8/2) : 0.7, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.56 (large, 1H, NH), 8.50-8.49 (m, 1H, Ph), 8.47 (large, 1H, NH), 7.47-7.19 (m, 10H, Ph), 6.85-6.81 (m, 1H, Ph), 6.50 (large, 1H, NH), 4.45-4.42 (m, 2H, CH₂), 2.54-2.30 (m, 16H, CH₂), 2.24 (s, 3H, CH₃), 2.06-1.95 (tt, J = 7Hz, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.56, 8.47 et 6.50 échangés ; TOF m/z : 652 ; Anal C₃₆H₄₂BrN₅O₁₁S (C, H, N).

***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]-*N'*-(cyclohexaneméthyl)pentane-1,5-diamide 52b**



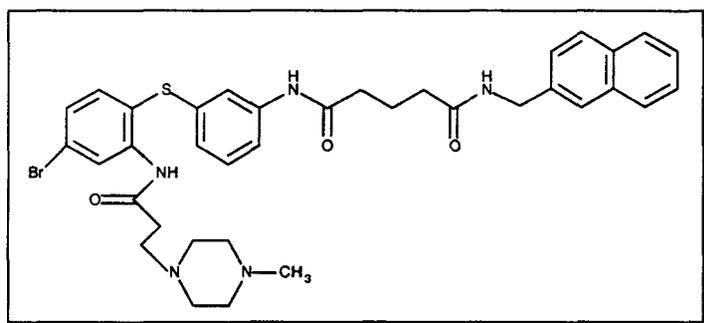
huile incolore (97 mg, 77%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.35, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.49 (large, 1H, NH), 8.71 (large, 1H, NH), 8.58-8.54 (m, 1H, Ph), 7.49-7.19 (m, 5H, Ph), 6.82-6.78 (m, 1H, Ph), 6.15 (large, 1H, NH), 3.11-3.06 (t, J = 6.3Hz, 2H, CH₂), 2.65-2.49 (m, 12H, CH₂), 2.43-2.38 (t, J = 7Hz, 2H, CH₂), 2.30-2.25 (m, 5H, CH₃ et CH₂), 1.98-1.96 (m, 2H, CH₂), 1.75-1.70 (m, 4H, CH₂), 1.25-1.20 (m, 4H, CH₂), 1.00-0.80 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.49, 8.71 et 6.15 échangés ; TOF m/z : 658 ; Anal C₃₆H₄₈BrN₅O₁₁S (C, H, N).

***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]-*N'*-(diphénylméthyl)pentane-1,5-diamide 53b**



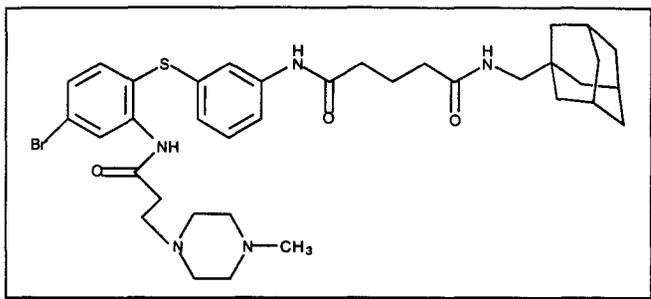
huile incolore (80 mg, 63%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-85/15) : 0.7, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.74 (large, 1H, NH), 8.54-8.47 (m, 1H, Ph), 8.22 (large, 1H, NH), 7.38-7.21 (m, 14H, Ph), 6.95-6.84 (m, 2H, Ph), 6.20 (large, 1H, NH), 3.67 (s, 1H, CH), 2.78-2.73 (m, 2H, CH₂), 2.53-2.31 (m, 14H, CH₂), 2.19 (s, 3H, CH₃), 2.02-1.96 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.74, 8.22 et 6.20 échangés ; TOF m/z : 728 ; Anal C₄₂H₄₆BrN₅O₁₁S (C, H, N).

***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]-*N'*-(2-naphtalèneméthyl)pentane-1,5-diamide 54b**



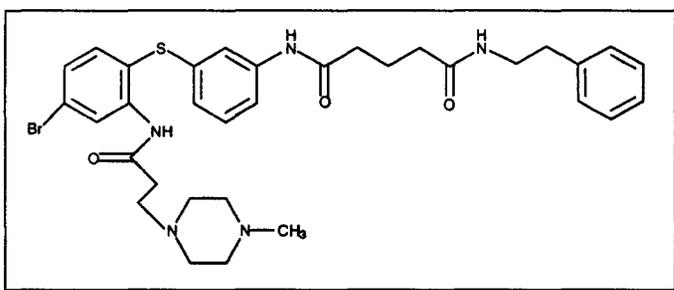
huile incolore (81 mg, 64%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.5, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.65 (large, 1H, NH), 8.56 (large, 1H, NH), 8.52-8.47 (m, 1H, Ph), 8.05-8.02 (m, 1H, Ph), 7.92-7.88 (m, 1H, Ph), 7.84-7.80 (m, 1H, Ph), 7.55-7.31 (m, 6H, Ph), 7.23-7.16 (m, 3H, Ph), 6.85-6.79 (m, 1H, Ph), 6.71 (large, 1H, NH), 2.80-2.73 (m, 2H, CH₂), 2.56-2.36 (m, 16H, CH₂), 2.34-2.28 (m, 2H, CH₂), 2.17 (s, 3H, CH₃), 2.00-1.91 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.65, 8.56 et 6.71 échangés ; TOF m/z : 702 ; Anal C₄₀H₄₄BrN₅O₁₁S (C, H, N).

***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]-*N'*-(adamantaneméthyl)pentane-1,5-diamide 55b**



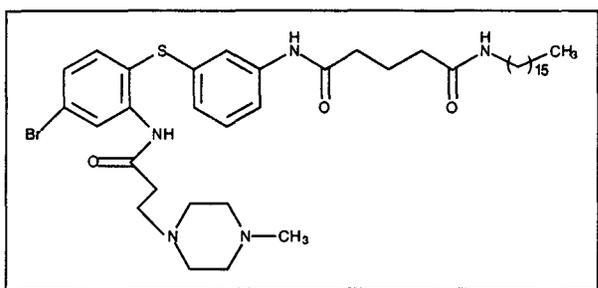
solide blanc (101 mg, 80%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.25, R.H. positif ; P.F. : 65°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.60 (large, 1H, NH), 9.24 (large, 1H, NH), 8.55-8.43 (m, 1H, Ph), 7.50-7.47 (m, 2H, Ph), 7.37-7.33 (m, 1H, Ph), 7.25-7.17 (m, 2H, Ph), 6.83-6.79 (m, 1H, Ph), 6.40 (large, 1H, NH), 2.95-2.85 (m, 2H, CH₂), 2.64-2.48 (m, 12H, CH₂), 2.44-2.37 (m, 4H, CH₂), 2.33-2.28 (m, 4H, CH₂), 2.23 (s, 3H, CH₃), 2.00-1.95 (m, 6H, CH₂ et CH), 1.75-1.60 (m, 7H, CH₂ et CH) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.60, 9.24 et 6.40 échangés ; m/z : 710 ; Anal C₄₀H₅₂BrN₅O₁₁S (C, H, N).

***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]-*N'*-(phénéthyl)pentane-1,5-diamide 56b**



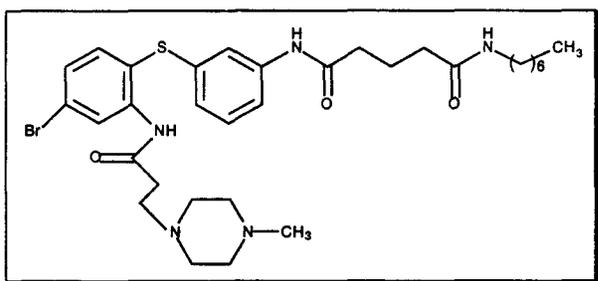
huile incolore (96 mg, 76%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.3, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.64 (large, 1H, NH), 8.75 (large, 1H, NH), 8.51-8.50 (m, 1H, Ph), 7.50-7.48 (m, 1H, Ph), 7.46-7.19 (m, 9H, Ph), 6.85-6.82 (m, 1H, Ph), 6.33 (large, 1H, NH), 3.50-3.45 (tt, J = 6Hz, 2H, CH₂), 2.84-2.79 (t, J = 7.1Hz, 2H, CH₂), 2.56-2.46 (m, 14H, CH₂), 2.34-2.29 (t, J = 7.1Hz, 2H, CH₂), 2.22 (s, 3H, CH₃), 2.00-1.87 (tt, J = 7Hz, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.64, 8.75 et 6.33 échangés ; TOF m/z : 666 ; Anal C₃₇H₄₄BrN₅O₁₁S (C, H, N).

***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]-*N'*-(hexadecyl)pentane-1,5-diamide 57b**



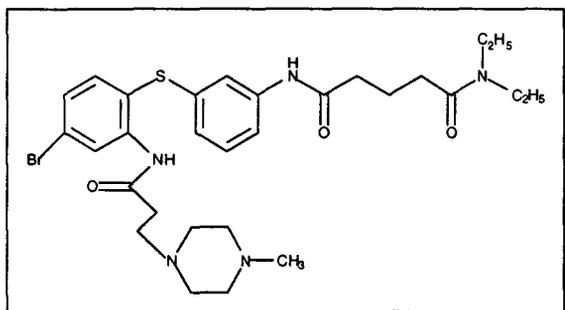
solide blanc (97 mg, 77%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.35, R.H. positif ; P.F. : 110°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.53 (large, 1H, NH), 8.79 (large, 1H, NH), 8.44-8.38 (m, 1H, Ph), 7.38-7.22 (m, 3H, Ph), 7.17-7.09 (m, 2H, Ph), 6.73-6.69 (m, 1H, Ph), 6.13 (large, 1H, NH), 3.12-3.07 (m, 2H, CH₂), 2.46-2.24 (m, 14H, CH₂), 2.17-2.13 (m, 2H, CH₂), 2.11 (s, 3H, CH₃), 1.87-1.81 (tt, J = 7Hz, 2H, CH₂), 1.40-1.35 (m, 2H, CH₂), 1.20-1.15 (m, 25H, 1 CH₃ et 11CH₂), 0.82-0.77 (m, 4H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.53, 8.79 et 6.13 échangés ; TOF m/z : 786 ; Anal C₄₅H₆₈BrN₅O₁₁S (C, H, N).

***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]-*N'*-(heptyl)pentane-1,5-diamide 58b**



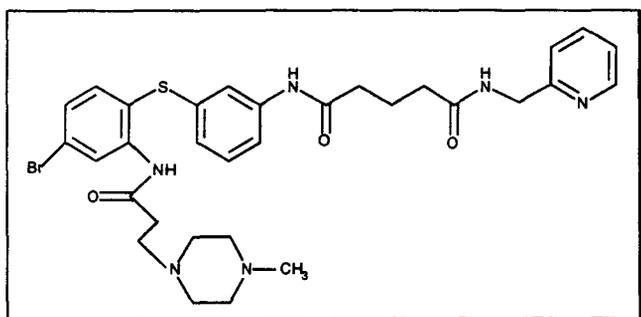
huile incolore (92 mg, 73%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.35, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.51 (large, 1H, NH), 8.82 (large, 1H, NH), 8.40-8.39 (m, 1H, Ph), 7.39-7.27 (m, 3H, Ph), 7.21-7.11 (m, 2H, Ph), 6.77-6.73 (m, 1H, Ph), 6.08 (large, 1H, NH), 3.17-3.10 (m, 2H, CH₂), 2.62-2.31 (m, 14H, CH₂), 2.21-2.18 (m, 2H, CH₂), 2.15 (s, 3H, CH₃), 1.91-1.86 (tt, J = 7Hz, 2H, CH₂), 1.45-1.42 (m, 2H, CH₂), 1.27-1.21 (m, 7H, 1CH₃ et 2CH₂), 0.85-0.80 (m, 4H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.51, 8.82 et 6.08 échangés ; TOF m/z : 660 ; Anal C₃₆H₅₀BrN₅O₁₁S (C, H, N).

***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]-*N'*-(diéthyl)pentane-1,5-diamide 59b**



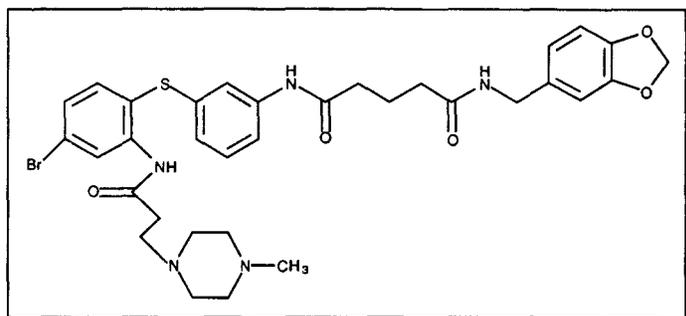
huile incolore (112 mg, 89%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH, 9/1) : 0.4, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.57 (large, 1H, NH), 9.27 (large, 1H, NH), 8.55-8.54 (m, 1H, Ph), 7.50-7.47 (m, 2H, Ph), 7.37-7.33 (m, 1H, Ph), 7.28-7.18 (m, 2H, Ph), 6.81-6.78 (m, 1H, Ph), 3.42-3.29 (m, 4H, CH₂), 2.60-2.37 (m, 16H, CH₂), 2.22 (s, 3H, CH₃), 2.02-1.92 (tt, J = 6.9Hz, 2H, CH₂), 1.21-1.15 (t, J = 7.1Hz, 3H, CH₃), 1.13-1.08 (t, J = 7.1Hz, 3H, CH₃) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O): 10.57 et 9.27 échangés ; TOF m/z : 618 ; Anal C₃₃H₄₄BrN₅O₁₁S (C, H, N).

***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]-*N'*-(1-pyridineméthyl)pentane-1,5-diamide 60b**



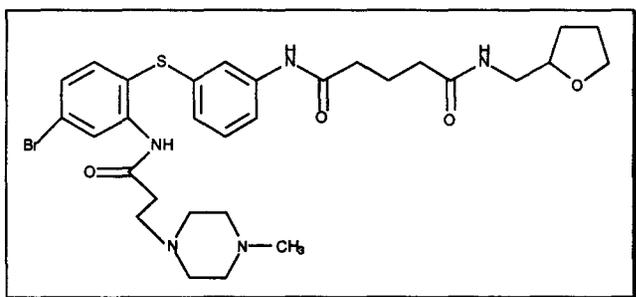
huile incolore (108 mg, 86%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.35, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.68 (large, 1H, NH), 9.93 (large, 1H, NH), 8.29-8.26 (m, 1H, Ph), 8.11-8.10 (m, 1H, Ph), 7.88-7.84 (m, 1H, Ph), 7.73-7.67 (m, 1H, Ph), 7.61 (large, 1H, NH), 7.36-7.32 (m, 1H, Ph), 7.28-7.22 (m, 2H, Ph), 7.20-7.14 (m, 1H, Ph), 7.05-7.01 (m, 1H, Ph), 6.91-6.87 (m, 1H, Ph), 6.75-6.73 (m, 1H, Ph), 4.57-4.55 (d, J = 5.9Hz, 2H, CH₂), 2.51-2.42 (m, 8H, CH₂), 2.40-2.27 (m, 8H, CH₂), 2.26 (s, 3H, CH₃), 2.03-1.98 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.68, 9.93 et 7.61 échangés ; TOF m/z : 653 ; Anal C₃₅H₄₁BrN₆O₁₁S (C, H, N).

***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]-*N'*-(pipéronyl)pentane-1,5-diamide 61b**



huile incolore (102 mg, 81%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.4, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.59 (large, 1H, NH), 8.73 (large, 1H, NH), 8.50-8.49 (m, 1H, Ph), 7.42-7.34 (m, 3H, Ph), 7.25-7.18 (m, 2H, Ph), 6.85-6.73 (m, 5H, Ph et NH), 5.94 (s, 2H, CH₂), 4.31-4.29 (d, J = 5.8Hz, 2H, CH₂), 2.56-2.47 (m, 12H, CH₂), 2.40-2.34 (t, J = 7.1Hz, 2H, CH₂), 2.31-2.27 (t, J = 7.2Hz, 2H, CH₂), 2.23 (s, 3H, CH₃), 2.02-1.93 (tt, J = 7Hz, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.59, 8.73 échangés et 6.85-6.73 (m, 4H, Ph) ; TOF m/z : 696 ; Anal C₃₇H₄₂BrN₅O₁₃S (C, H, N).

***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]-*N'*-(furfuryl)pentane-1,5-diamide 62b**



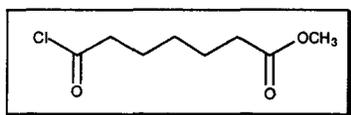
huile incolore (104 mg, 83%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.25, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.66 (large, 1H, NH), 9.12 (large, 1H, NH), 8.39-8.38 (m, 1H, Ph), 7.57-7.54 (m, 1H, Ph), 7.41-7.37 (m, 1H, Ph), 7.28-7.17 (m, 3H, Ph), 6.88-6.82 (m, 2H, NH et Ph), 3.93-3.84 (m, 2H, CH₂), 3.78-3.61 (m, 3H, CH₂ et CH), 3.46-3.36 (m, 2H, CH₂), 3.22-3.10 (m, 2H, CH₂), 2.56-2.31 (m, 12H, CH₂), 2.23 (s, 3H, CH₃), 1.99-1.85 (m, 4H, CH₂), 1.55-1.48 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.66 et 9.12 échangés, 6.84-6.81 (m, 1H, Ph) ; TOF m/z : 646 ; Anal C₃₄H₄₄BrN₅O₁₂S (C, H, N).

4.2. Couplage des amines aromatiques

4.2.1. Acide à sept atomes de carbone (n = 5)

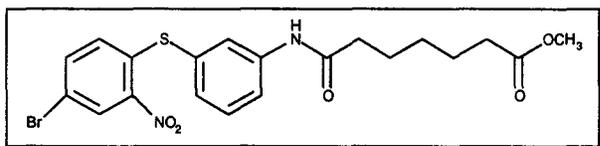
Ajout de la chaîne centrale en passant par le chlorure d'acide

6-(chlorocarbonyl)hexanoate de méthyle **46b**



A une solution d'acide 6-méthoxypropanoïque (5 g, 28.7 mmol, 1 éq) dans 60 mL de CH_2Cl_2 , préalablement séché sur tamis, est ajouté le chlorure de thionyle (10.5 mL, 143.3 mmol, 5 éq). Après deux heures d'agitation à reflux, le solvant est évaporé et le brut obtenu utilisé directement dans l'étape de couplage avec la 3-(4-bromo-2-nitro)phénylthiophénylamine. Le rendement est évalué globalement sur les deux étapes.

6-{N-[3-(4-bromo-2-nitro)phénylsulfanyl]phényl}carbamoylexylate de méthyle **47b**

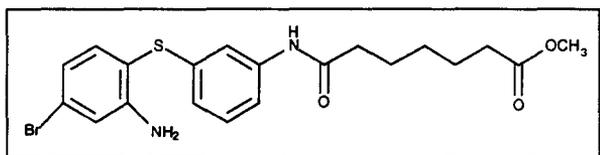


A 0°C , à une solution de 3-(4-bromo-2-nitro)phénylthiophénylamine (10.3 g, 31.57 mmol, 1.1 éq) et de triéthylamine (6 mL, 43.05 mmol, 1.5 éq) dans 110 mL de CH_2Cl_2 , préalablement séché sur tamis, est ajoutée, goutte à goutte, une solution du chlorure d'acide **46b** (5.5 g, 28.7 mmol, 1 éq) dans 20 mL de CH_2Cl_2 , préalablement séché sur tamis. Après 15 minutes d'agitation à 0°C et une nuit à température ambiante, le solvant est évaporé et l'huile résiduelle traitée par un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 1 M, HCl 1 M et H_2O . La phase organique est séchée sur MgSO_4 , puis évaporée et le résidu huileux purifié par chromatographie sur colonne (CH_2Cl_2) pour donner le composé **47b** sous la forme d'une huile orange (9.58 g, 83%) ; $R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2)$: 0.35, R.H. positif ; RMN ^1H , $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2)$: 8.40-8.37 (m, 1H, Ph), 7.82-7.81 (m, 1H, Ph), 7.76-7.72 (m, 1H, Ph), 7.52-7.45 (m, 3H, Ph et NH), 7.35-7.31 (m, 1H, Ph), 6.92-6.84 (m, 1H, Ph), 3.66 (s, 3H, CH_3), 2.42-2.32 (m, 4H, CH_2), 1.77-1.61 (m, 4H, CH_2), 1.46-1.39 (m, 2H, CH_2) ; $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2 + \text{D}_2\text{O})$: 7.56 (large, 1H, NH) et 7.52-7.45 (m, 2H, Ph) ; TOF m/z : 481.

Réduction du groupement nitro

Le mode opératoire pour le composé **48b** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **25b**.

6-{N-[3-(2-amino-4-bromo)phénylsulfanyl]phényl}carbamoylhexylate de méthyle **48b**

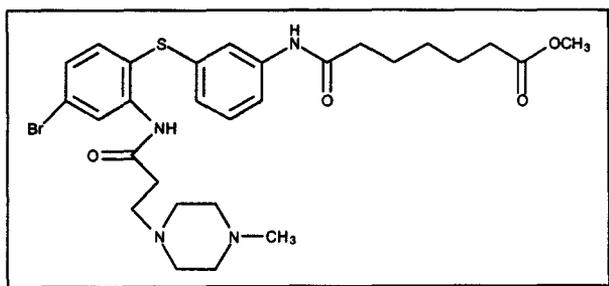


huile marron clair (15 g, 100%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-95/5) : 0.7, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(DMSO-d₆) : 9.89 (large, 1H, NH), 7.47-7.44 (m, 1H, Ph), 7.35-7.34 (m, 1H, Ph), 7.25-7.16 (m, 2H, Ph), 7.02-7.01 (m, 1H, Ph), 6.75-6.71 (m, 2H, Ph), 5.67 (large, 2H, NH₂), 3.58 (s, 3H, CH₃), 2.33-2.24 (m, 4H, CH₂), 1.62-1.49 (m, 4H, CH₂), 1.34-1.21 (m, 2H, CH₂) ; δ(DMSO-d₆ + D₂O) : 9.89 et 5.67 échangés ; TOF m/z : 451.

Addition de la chaîne latérale aminée

Le mode opératoire pour le composé **49b** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **44b**.

6-{N-[2-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]}carbamoylhexylate de méthyle **49b**



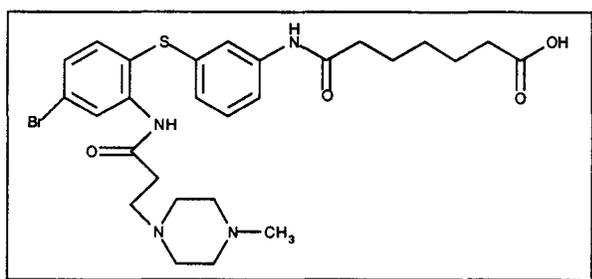
huile orange (10 g, 86%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.45, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.67 (large, 1H, NH), 8.53-8.51 (m, 1H, Ph), 8.01 (large, 1H, NH), 7.50-7.46 (m, 1H, Ph), 7.37-7.18 (m, 4H, Ph), 6.85-6.81 (m, 1H, Ph), 3.65 (s, 3H, CH₃), 2.68-2.65 (m, 2H, CH₂), 2.55-2.27 (m, 14H, CH₂), 2.18 (s, 3H, CH₃), 1.69-

1.61 (m, 4H, CH₂), 1.38-1.35 (m, 2H, CH₂) ; δ (CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.67 et 8.01 échangés ; TOF m/z : 605.

Hydrolyse de l'ester méthylique

Le mode opératoire pour les composés **50b** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **45b**.

acide 6-{N-[2-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]}carbamoylhexanoïque 50b



solide incolore (10 g, 80%) ; Rf(actétone/NH₄OH-9/1) : 0.1, R.H. positif ; P.F. : 85°C ; RMN ¹H, δ (DMSO-d₆) : 10.39 (large, 1H, NH), 10.18 (large, 1H, NH), 8.25-8.23 (m, 1H, Ph), 7.59-7.57 (m, 1H, Ph), 7.47-7.44 (m, 1H, Ph), 7.35-7.21 (m, 3H, Ph), 6.78-6.75 (m, 1H, Ph), 3.44-3.40 (t, J = 5Hz, 2H, CH₂), 2.53-2.43 (m, 4H, CH₂), 2.37-2.24 (m, 8H, CH₂), 2.06 (s, 3H, CH₃), 2.06-1.92 (t, J = 7.2Hz, 2H, CH₂), 1.57-1.44 (m, 4H, CH₂), 1.30-1.23 (tt, J = 6.8Hz, 2H, CH₂) ; δ (DMSO-d₆ + D₂O) : 10.39 et 10.18 échangés ; TOF m/z : 591.

4.2.2. Couplage acide/amine

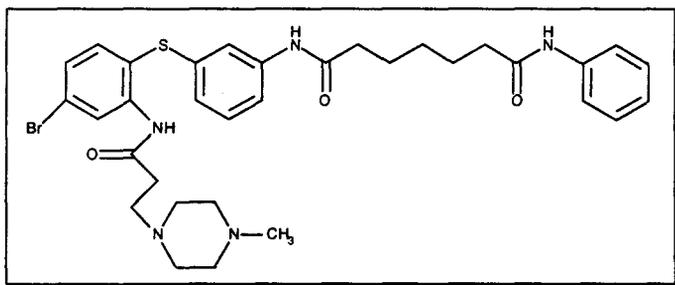
Le mode opératoire suivant concerne les composés **63b**, **64b**, **65b**, **66b**, **67b** et **68b**.

A -10°C, à une solution de l'acide **50b** (500 mg, 0.846 mmol, 1 éq) et de pyridine (68 μ L, 0.846 mmol, 1 éq) dans 10 mL de CH₂Cl₂, préalablement séché sur tamis, est ajoutée de la 2,4,6-trifluoro-1,3,5-triazine (229 mg, 1.692 mmol, 2 éq). Après 5 heures d'agitation en laissant remonter la température, le milieu réactionnel est filtré sur fritté puis évaporé à sec. Le fluorure d'acide brut ainsi obtenu est utilisé directement dans la réaction de couplage avec diverses amines aromatiques selon le mode opératoire suivant :

A 0°C, à une solution d'amine (1.692 mmol, 2 éq) et de pyridine (205 μ L, 2.538 mmol, 3 éq) dans 10 mL de CH₂Cl₂, préalablement séché sur tamis, est ajoutée une solution du

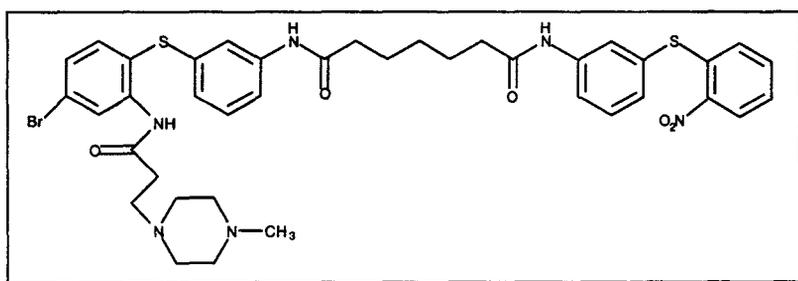
fluorure d'acide brut (0.846 mmol, 1 éq) dans 3 mL de CH₂Cl₂, préalablement séché sur tamis. Après 30 minutes d'agitation à 0°C et une nuit à température ambiante, le solvant est évaporé et l'huile résiduelle traitée par un mélange CH₂Cl₂/H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis évaporée et l'huile résiduelle purifiée par CCE (CH₂Cl₂/MeOH-9/1) pour donner l'amide correspondant.

***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]-*N'*-(phényl)heptane-1,7-diamide 63b**



huile jaune clair (200 mg, 40%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.25, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.54 (large, 1H, NH), 8.53-8.52 (m, 1H, Ph), 8.38 (large, 1H, NH), 8.31 (large, 1H, NH), 7.65-7.55 (m, 2H, Ph), 7.47-7.02 (m, 8H, Ph), 6.82-6.79 (m, 1H, Ph), 2.54-2.48 (m, 8H, CH₂), 2.39-2.27 (m, 8H, CH₂), 2.24 (s, 3H, CH₃), 1.74-1.64 (tt, J = 7.1Hz, 4H, CH₂), 1.44-1.38 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.54, 8.38 et 8.31 échangés ; TOF m/z : 666 ; Anal C₃₇H₄₄BrN₅O₁₁S (C, H, N).

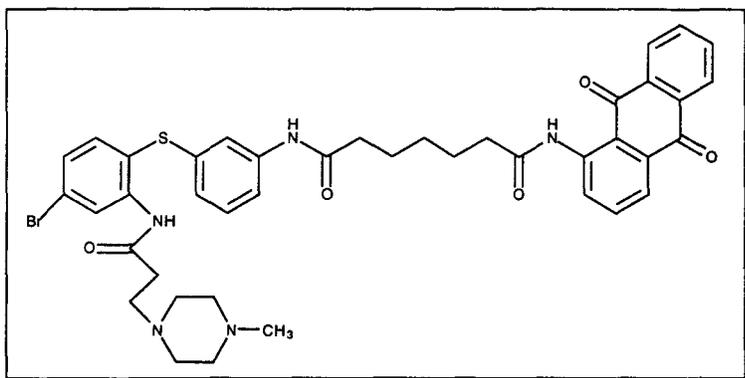
***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]-*N'*-[3-(2-nitro)phénylsulfanyl]phényl]heptane-1,7-diamide 64b**



solide jaune (600 mg, 38%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.35, R.H. positif ; P.F. : 75°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.33 (large, 1H, NH), 8.59-8.56 (m, 1H, Ph), 8.36 (large, 1H, NH), 8.24-8.20 (m, 1H, Ph), 7.86-7.79 (m, 3H, NH et Ph), 7.48-7.36 (m, 4H, Ph), 7.32-7.16 (m, 5H, Ph), 6.99-6.95 (m, 1H, Ph), 6.82-6.74 (m, 1H, Ph), 2.75-2.36 (m, 16H, CH₂), 2.35 (s, 3H, CH₃), 1.77-1.70 (m, 4H, CH₂), 1.45-1.37 (tt, J = 6.9Hz, 2H,

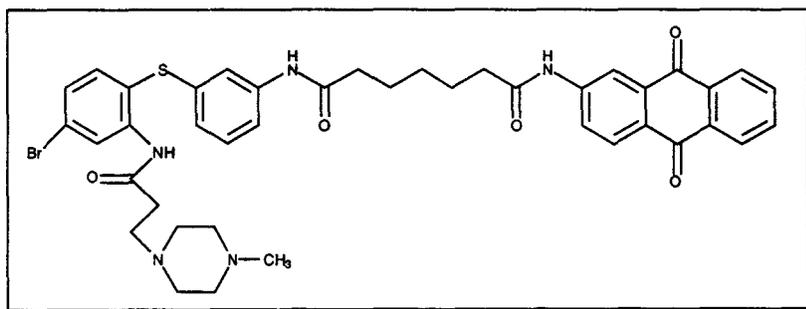
CH₂) ; δ (CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.33 et 8.36 échangés, 7.86-7.79 (m, 2H, Ph) ; TOF m/z : 819 ; Anal C₄₃H₄₇BrN₆O₁₃S₂ (C, H, N).

***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]-*N'*-(1-anthraquinonyl)heptane-1,7-diamide 66b**



huile orange (40 mg, 10%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.5, R.H. positif ; RMN ¹H, δ (CD₂Cl₂) : 10.37 (large, 1H, NH), 9.17-9.13 (m, 1H, Ph), 8.59-8.56 (m, 1H, Ph), 8.34-8.27 (m, 2H, Ph), 8.08-8.04 (m, 1H, Ph), 7.87-7.77 (m, 2H, Ph), 7.74 (large, 1H, NH), 7.46-7.38 (m, 3H, Ph), 7.33 (large, 1H, NH), 7.29-7.18 (m, 3H, Ph), 6.81-6.80 (m, 1H, Ph), 2.62-2.49 (m, 12H, CH₂), 2.39-2.31 (tt, J = 7.7Hz, 4H, CH₂), 2.28 (s, 3H, CH₃), 1.80-1.60 (m, 4H, CH₂), 1.58-1.50 (m, 2H, CH₂) ; δ (CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.37, 7.74 et 7.33 échangés ; TOF m/z : 796 ; Anal C₄₅H₄₆BrN₅O₁₃S (C, H, N).

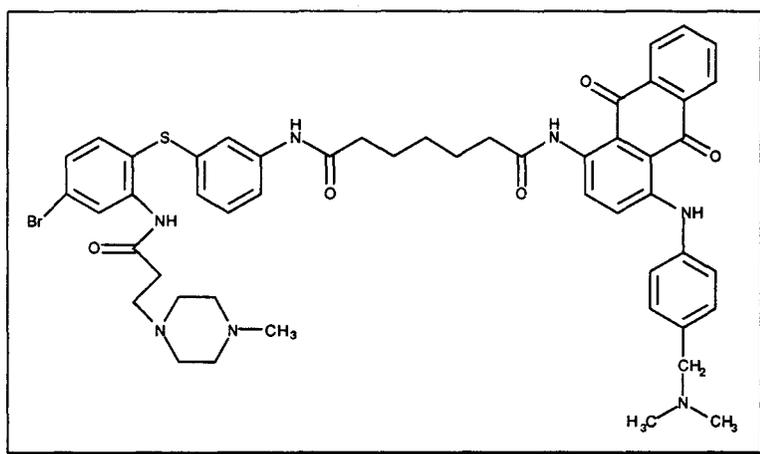
***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]-*N'*-(2-anthraquinonyl)heptane-1,7-diamide 67b**



huile orange (80 mg, 20%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.45, R.H. positif ; RMN ¹H, δ (CD₂Cl₂) : 10.62 (large, 1H, NH), 8.85 (large, 1H, NH), 8.51-8.49 (m, 1H, Ph), 8.38-8.36 (m, 1H, Ph), 8.30-8.21 (m, 3H, Ph), 8.18-8.13 (m, 1H, Ph), 7.85-7.77 (m, 3H, Ph), 7.45-7.41 (m, 1H, Ph), 7.39-7.35 (m, 1H, Ph), 7.28 (large, 1H, NH), 7.25-7.18 (m, 2H, Ph), 6.85-6.81 (m, 1H, Ph), 2.64-2.44 (m, 14H, CH₂), 2.38-2.33 (t, J =

7.2Hz, 2H, CH₂), 2.27 (s, 3H, CH₃), 1.80-1.68 (m, 4H, CH₂), 1.48-1.40 (m, 2H, CH₂) ; $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2 + \text{D}_2\text{O})$: 10.62, 8.85 et 7.28 échangés ; TOF m/z : 796 ; Anal C₄₅H₄₆BrN₅O₁₃S (C, H, N).

***N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino} phénylesulfanyl)phényl]-*N'*-(1-(4-(*N*-(4-diméthylaminométhyl)phényl)aminoanthraquinonyl)heptane-1,7-diamide 68b**

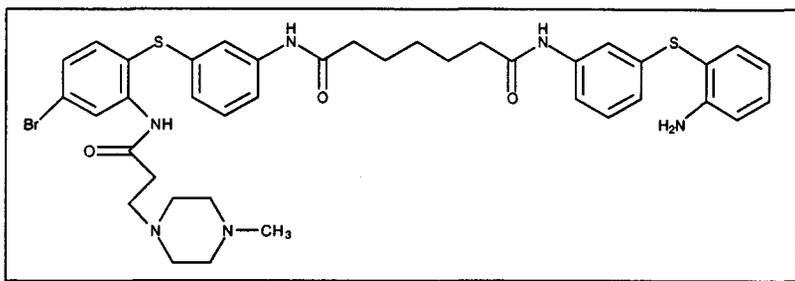


huile orange (50 mg, 10%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.45, R.H. positif ; RMN ¹H, $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2)$: 10.10 (large, 1H, NH), 8.62-8.60 (m, 2H, Ph), 8.40-8.33 (m, 2H, Ph), 8.07 (large, 1H, Ph), 7.89-7.76 (m, 2H, Ph), 7.52-7.36 (m, 6H, Ph et NH), 7.31-7.17 (m, 4H, Ph), 6.76-6.72 (m, 2H, Ph), 2.90 (large, 1H, NH), 2.75-2.70 (m, 6H, CH₂), 2.68-2.59 (m, 8H, CH₂), 2.54-2.51 (m, 4H, CH₂), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.39-2.28 (m, 6H, CH₂), 2.20 (s, 3H, CH₃), 1.71-1.66 (dd, J = 6.7Hz, 2H, CH₂) ; $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2 + \text{D}_2\text{O})$: 10.10, 8.07 et 2.90 échangés, 7.52-7.34 (m, 4H, Ph), 7.31-7.20 (m, 5H, Ph) ; TOF m/z : 945 ; Anal C₅₆H₆₀BrN₇O₁₇S (C, H, N).

Réduction du groupement nitro

Le mode opératoire pour les composés **65b** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **25b**.

N*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylesulfanyl)phényl]-*N'*-(3-(2-amino)phénylesulfanyl)phényl]heptane-1,7-diamide **65b*



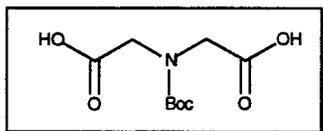
solide incolore (482 mg, 100%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.25, R.H. positif ; P.F. : 70°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.30 (large, 1H, NH), 9.06 (large, 1H, NH), 8.94 (large, 1H, NH), 8.52-8.50 (m, 1H, Ph), 7.61-7.59 (m, 1H, Ph), 7.47-7.33 (m, 5H, Ph), 7.24-7.11 (m, 4H, Ph), 6.82-6.69 (m, 4H, Ph), 4.50 (large, 1H, NH), 2.64-2.40 (m, 10H, CH₂), 2.39-2.31 (m, 6H, CH₂), 2.30 (s, 3H, CH₃), 1.70-1.60 (m, 4H, CH₂), 1.38-1.32 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.30, 9.06 et 8.36 échangés ; TOF m/z : 789 ; Anal C₄₃H₄₉BrN₆O₁₁S₂ (C, H, N).

5. Bis(2-aminodiphénylesulfures) à trois chaînes latérales

5.1. Bis(2-aminodiphénylesulfure) possédant une fonction amine secondaire centrale

Protection de la fonction amine secondaire

acide *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)iminodiacétique **69b**

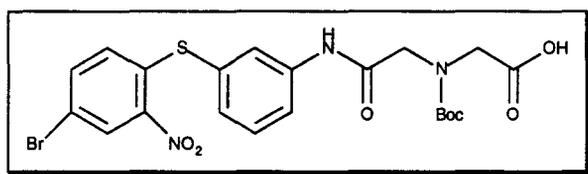


A une solution d'acide iminodiacétique (10 g, 75.13 mmol, 1 éq) dans 145 mL de dioxanne sont ajoutés de l'eau distillée (50 mL), de la soude aqueuse 2 N (50 mL, 100 mmol, 1.3 éq) et, à 0°C, du (Boc)₂O (18 g, 82.6 mmol, 1.1 éq). Après 30 minutes d'agitation à 0°C et 18 heures à température ambiante, les solvants sont évaporés à sec et le résidu est traité par un mélange AcOEt/HCl 1 N. La phase organique est séchée sur MgSO₄, puis évaporée pour donner le produit protégé **69b**, sous la forme d'un solide blanc (11.3 g, 65%) ; Rf(CH₂Cl₂) : 0.3 ; P.F. : 125°C ; RMN ¹H, δ(DMSO-d₆) : 12.50

(large, 2H, COOH), 3.93-3.89 (d, J = 9.9Hz, CH₂, 4H), 1.37 (s, 9H, CH₃) ; δ (DMSO-d₆ + D₂O) : 12.50 échangé ; TOF m/z : 233.

Addition de la chaîne centrale

acide *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-({*N'*-[3-(4-bromo-2-nitro)phénylsulfanyl]phényl}acétamido)aminoacétique **70b**

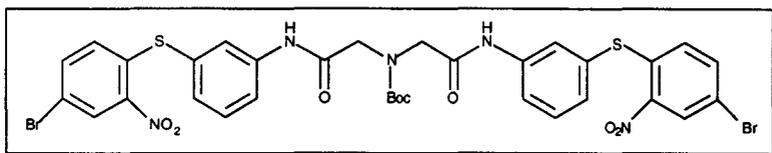


A une solution d'acide *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)iminodiacétique (1.48 g, 6.63 mmol, 1 éq) dans 50 mL de THF fraîchement distillé est ajoutée la DCC (1.3 g, 6.35 mmol, 1 éq). Après 24 heures d'agitation à température ambiante est ajoutée la 3-(4-bromo-2-nitro)phénylthiophénylamine (2.07 g, 6.35 mmol, 1 éq). Après 24 heures d'agitation à reflux, le solvant est évaporé ; le solide résiduel est traité par un mélange CH₂Cl₂/acide citrique 20%, la phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée ; le résidu est purifié par chromatographie sur colonne (CH₂Cl₂/MeOH-9/1) pour donner l'acide **70b** sous la forme d'un solide orange (1.96 g, 57%) ; R_f(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.3 ; RMN ¹H, δ (CD₂Cl₂) : 12.28 (large, 1H, COOH), 8.38-8.37 (m, 1H, Ph), 7.94-7.93 (m, 1H, Ph), 7.89-7.88 (m, 1H, Ph), 7.70 (large, 1H, NH), 7.48-7.41 (m, 2H, Ph), 7.29-7.25 (m, 1H, Ph), 6.83-6.80 (m, 2H, Ph), 3.96-3.82 (d, 4H, CH₂), 1.38 (s, 9H, CH₃) ; δ (CD₂Cl₂ + D₂O) : 12.28 et 7.70 échangés ; TOF m/z : 540.

Couplage acide/amine

Le mode opératoire pour le composé **71b** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **63b**.

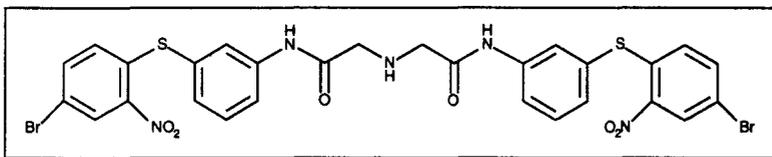
2-(*tert*-butoxycarbonyl)imino-*N,N'*-[3-(4-bromo-2-nitro)phénylsulfanyl]phényldiacétylamide 71b



solide jaune (5 g, 58%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9.5/0.5) : 0.5, R.H. positif ; P.F. : 115°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.04 (large, 1H, NH), 9.11 (large, 1H, NH), 8.39-8.38 (m, 2H, Ph), 8.04-8.03 (m, 1H, Ph), 7.90-7.89 (m, 1H, Ph), 7.81-7.78 (m, 2H, Ph), 7.51-7.42 (m, 4H, Ph), 7.38-7.33 (m, 2H, Ph), 6.88-6.83 (m, 2H, Ph), 4.16-4.06 (d, 4H, CH₂), 1.41 (s, 9H, CH₃) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.04 et 9.11 échangés ; TOF m/z : 847.

Déprotection de l'amine secondaire

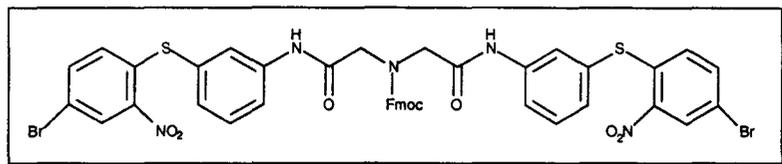
2-imino-*N,N'*-[3-(4-bromo-2-nitro)phénylsulfanyl]phényldiacétylamide 72b



Une solution du composé **71b** (5 g, 5.9 mmol, 1 éq) dans 87 mL d'un mélange CH₂Cl₂/CF₃COOH-1/1 est agitée pendant 4 heures à température ambiante. Puis, le solvant est évaporé ; l'huile résiduelle est traitée par un mélange AcOEt/NaOH 2.5 N ; la phase organique est lavée par une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée sur MgSO₄ et évaporée pour donner le produit **72b** non protégé sous la forme d'un solide jaune (4 g, 100%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-9/1) : 0.5, R.H. positif ; P.F. : 75°C ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 8.71 (large, 1H, NH), 8.20-8.19 (m, 2H, Ph), 7.72-7.70 (m, 2H, Ph), 7.65-7.61 (m, 2H, Ph), 7.33-7.27 (m, 4H, Ph), 7.17-7.13 (m, 2H, Ph), 6.68-6.63 (m, 2H, Ph), 3.39 (s, 4H, CH₂), 1.75 (large, 1H, NH) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 8.71 et 1.75 échangés ; TOF m/z : 747.

Protection de l'amine secondaire par un groupement Fmoc

2-(9-fluorénylméthoxycarbonyl)imino-*N,N'*-[3-(4-bromo-2-nitro)phénylsulfanyl]phényldiacétylamide 73b

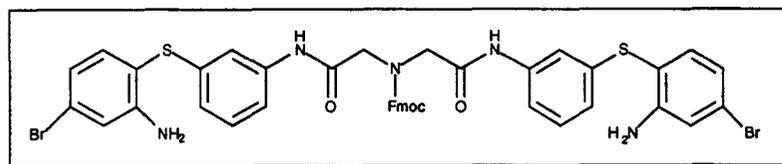


A une solution de Na_2CO_3 (6.07 g, 57.3 mmol, 10 éq) dans 35 mL d'eau distillée sont ajoutés l'amine **72b** (4.28 g, 5.73 mmol, 1 éq), 130 mL de dioxane et, à 0°C, du chloroformate de 9-fluorenylméthyle (1.5 g, 5.73 mmol, 1 éq). Après 4 heures d'agitation à 0°C et une nuit à température ambiante sont ajoutés 50 mL de HCl 1 N (115 mmol, 20 éq). Les solvants sont évaporés à sec ; le résidu est traité par un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{HCl}$ 1 N ; la phase organique est séchée sur MgSO_4 et évaporée pour donner le produit protégé **73b** sous la forme d'un solide jaune (5 g, 90%) ; Rf($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ -9/1) : 0.55, R.H. positif ; P.F. : 65°C ; RMN ^1H , $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2)$: 10.17 (large, 1H, NH), 9.67 (large, 1H, NH), 8.37-8.34 (m, 2H, Ph), 8.07-8.03 (m, 1H, Ph), 7.92-7.88 (m, 1H, Ph), 7.86-7.80 (m, 2H, Ph), 7.73-7.70 (m, 2H, Ph), 7.67-7.64 (m, 1H, Ph), 7.56-7.53 (m, 2H, Ph), 7.49-7.30 (m, 7H, Ph), 7.18-7.12 (m, 2H, Ph), 6.81-6.77 (m, 2H, Ph), 4.47-4.42 (m, 2H, CH_2), 4.23-4.07 (m, 5H, CH_2 et CH) ; $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2 + \text{D}_2\text{O})$: 10.17 et 9.67 échangés ; TOF m/z : 970.

Réduction du groupement nitro

Le mode opératoire pour le composé **74b** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **25b**.

2-(9-fluorénylméthoxycarbonyl)imino-*N,N'*-[3-(2-amino-4-bromo)phénylsulfanyl]phényldiacétylamide 74b



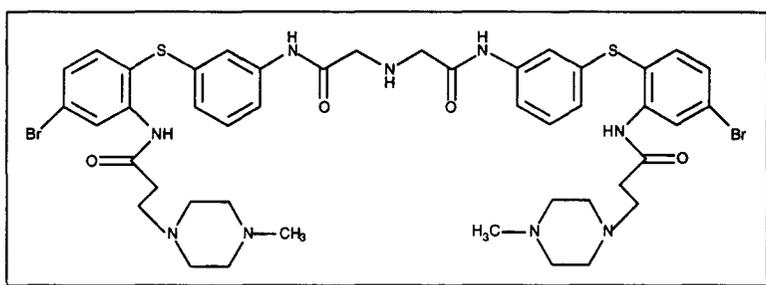
huile marron (4 g, 100%) ; Rf($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ -9/1) : 0.6, R.H. positif ; RMN ^1H , $\delta(\text{CD}_3\text{COCD}_3)$: 7.90-7.50 (m, 8H, Ph), 7.55-7.25 (m, 10H, Ph), 7.20-7.10 (m, 2H,

Ph), 7.03-6.90 (m, 2H, Ph), 4.45-4.17 (m, 4H, CH₂), 4.07-3.95 (m, 3H, CH et CH₂) ;
 $\delta(\text{CD}_3\text{COCD}_3 + \text{D}_2\text{O})$: spectre inchangé ; TOF m/z : 910.

Addition des deux chaînes latérales aminées

Le mode opératoire pour le composé **75b** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **5b**.

2-imino-*N,N'*-[3-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino-4-bromo}phénylesulfanyl)phényl]diacétylamide 75b



solide incolore (1 g, 50%) ; Rf(CH₂Cl₂/MeOH-8/2) : 0.05, R.H. positif ; P.F. : 60°C ;
RMN ¹H, $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2)$: 10.66 (large, 2H, NH), 9.08 (large, 2H, NH), 8.41-8.40 (m, 2H, Ph), 7.58-7.55 (m, 2H, Ph), 7.43-7.38 (m, 2H, Ph), 7.29-7.20 (m, 6H, Ph), 6.91-6.87 (m, 2H, Ph), 3.39 (s, 4H, CH₂), 2.59-2.47 (m, 24H, CH₂), 2.22 (s, 6H, CH₃) ;
 $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2 + \text{D}_2\text{O})$: 10.66 et 9.08 échangés ; TOF m/z : 995 ; Anal C₅₄H₆₃Br₂N₉O₂₄S₂ (C, H, N).

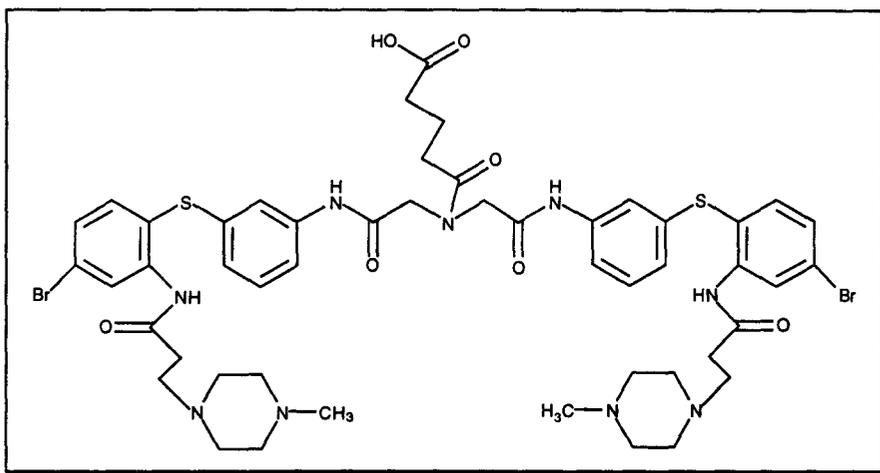
5.2. Acylation de l'amine secondaire centrale

Différents groupements fonctionnels ont été obtenus, en position terminale, sur la troisième chaîne latérale :

- fonction acide,
- fonction amine protégée par un groupement Boc,
- fonction amine libre,
- fonction amine protégée par un groupement Fmoc,
- groupement tétradécanoyle,
- groupement naphthalénoyle,
- groupement biotinyle.

Fonction acide terminale

acide 4-(*N,N*-{*N',N''*-[3-(2-{4-bromo-3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino}phénylsulfanyl)phényl]acétylamido}amido)butanoïque
76b

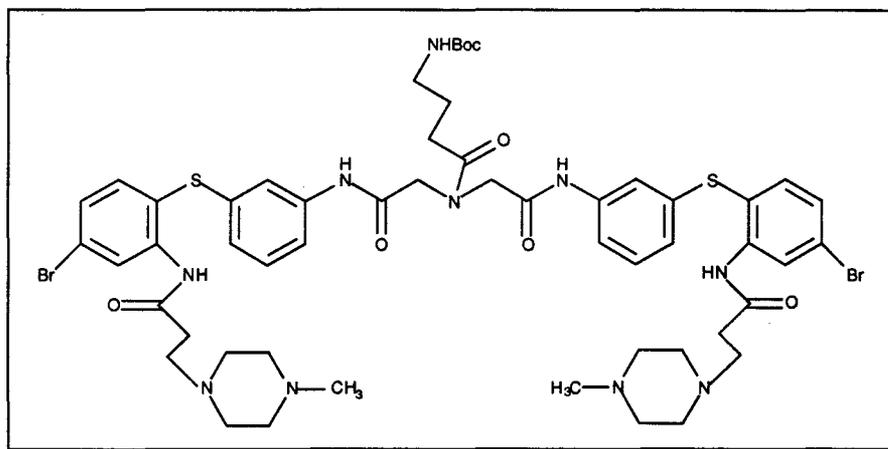


A 0°C, à une solution du composé amino **75b** (127 mg, 0.128 mmol, 1 éq) dans 1 mL de pyridine est ajouté l'anhydride glutarique (14.6 mg, 0.128 mmol, 1 éq). Après une nuit d'agitation à température ambiante, la pyridine est évaporée et le résidu huileux traité par un mélange CH₂Cl₂/H₂O glacée ; la phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée ; l'huile résiduelle est purifiée par CCE (acétone/NH₄OH-100/1) pour donner l'acide **76b**, sous la forme d'une huile incolore (100 mg, 70%) ; R_f(acétone/NH₄OH-100/1) : 0.25, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 11.04 (large, 1H, NH), 10.27 (large, 1H, NH), 10.04 (large, 1H, NH), 10.02 (large, 1H, NH), 8.60-8.56 (m, 2H, Ph), 7.86-7.83 (m, 1H, Ph), 7.71-7.68 (m, 1H, Ph), 7.52-7.41 (m, 4H, Ph), 7.29-7.19 (m, 4H, Ph), 6.72-6.68 (m, 2H, Ph), 4.34 (s, 2H, CH₂), 4.17 (s, 2H, CH₂), 2.71-2.42 (m, 24H, CH₂), 2.34 (s, 6H, CH₃), 2.28-2.23 (m, 4H, CH₂), 1.89-1.86 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 11.04, 10.27, 10.04 et 10.02 échangés ; TOF m/z : 1109 ; Anal C₅₇H₆₇Br₂N₉O₂₃S₂ (C, H, N).

Fonction amine terminale

Fixation de la chaîne possédant une fonction amine terminale protégée

2-(*N*-{4-[*N'*-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]butanoyl}imino)-*N,N*-[3-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoyl}amino-4-bromo)phénylsulfanyl]phényl]diacétamide 77b

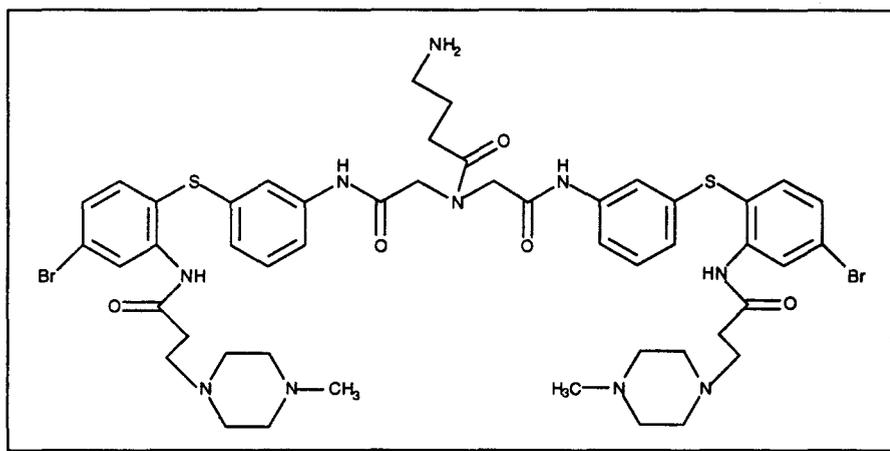


A 0°C, à une solution d'acide *N*-*t*-Boc- γ -aminobutanoïque (203 mg, 1 mmol, 1 éq) dans 20 mL de DMF sont ajoutés le PyBrop (466 mg, 1 mmol, 1 éq) et la DIEA (540 μ L, 3 mmol, 3 éq). Après 10 minutes d'agitation à 0°C est ajouté le composé amino **75b** (995 mg, 1 mmol, 1 éq). Après 10 minutes d'agitation à 0°C puis deux heures à température ambiante, le DMF est évaporé, l'huile résiduelle est traitée par un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0.5 M. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , puis évaporée et l'huile résiduelle est purifiée par CCE ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ -95/5) pour donner le composé **77b** sous la forme d'un solide incolore (944 mg, 80%) ; Rf(acétone/ NH_4OH -95/5) : 0.4, R.H. positif ; P.F. : 60°C ; RMN ^1H , $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2)$: 10.75 (large, 1H, NH), 10.65 (large, 1H, NH), 10.57 (large, 1H, NH), 9.63 (large, 1H, NH), 8.58-8.49 (m, 2H, Ph), 7.68 (large, 1H, NH), 7.57-7.53 (m, 2H, Ph), 7.42-7.35 (m, 2H, Ph), 7.30-7.21 (m, 6H, Ph), 6.86-6.83 (m, 2H, Ph), 4.20 (s, 2H, CH_2), 4.08 (s, 2H, CH_2), 2.54-2.30 (m, 24H, CH_2), 2.26-2.17 (m, 4H, CH_2), 2.15 (s, 6H, CH_3), 1.88-1.84 (m, 2H, CH_2), 1.24 (s, 9H, CH_3) ; $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2 + \text{D}_2\text{O})$: 10.75, 10.65, 10.57, 9.63 et 7.68 échangés ; TOF m/z : 1180 ; Anal $\text{C}_{61}\text{H}_{76}\text{Br}_2\text{N}_{10}\text{O}_{23}\text{S}_2$ (C, H, N).

Déprotection de l'amine primaire terminale

Le mode opératoire pour le composé **78b** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **72b**.

2-[N-(4-aminobutanoyl)imino]-N,N'-[3-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino-4-bromo}phénylsulfanyl)phényl]diacétamide 78b

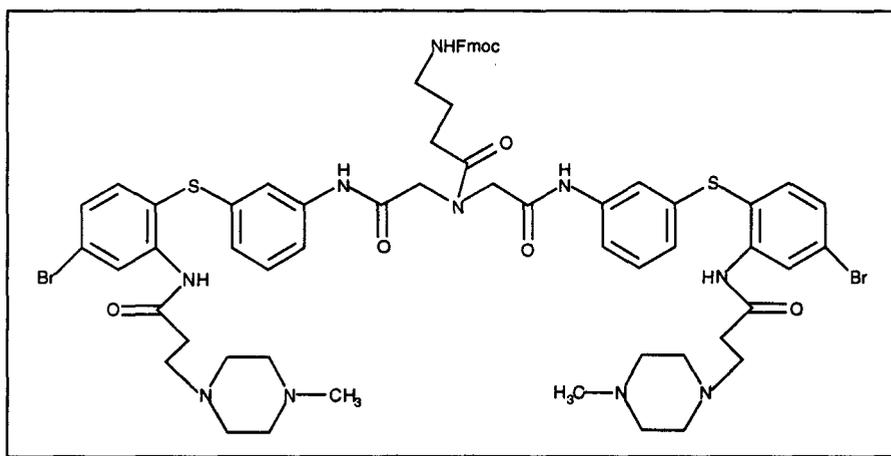


huile incolore (780 mg, 90%) ; Rf(acétone/NH₄OH-90/10) : 0.5 , R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.65 (large, 1H, NH), 10.58 (large, 1H, NH), 10.55 (large, 1H, NH), 8.90 (large, 1H, NH), 8.40-8.27 (m, 2H, Ph), 7.48-7.37 (m, 2H, Ph), 7.33-7.25 (m, 2H, Ph), 7.16-7.09 (m, 6H, Ph), 6.76-6.73 (m, 2H, Ph), 4.12 (s, 2H, CH₂), 3.96 (s, 2H, CH₂), 3.75 (large, 2H, NH₂), 2.45-2.25 (m, 24H, CH₂), 2.11-2.06 (m, 4H, CH₂), 2.03 (s, 6H, CH₃), 1.75-1.72 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.65, 10.58, 10.55 et 8.90 échangés ; TOF m/z : 1080 ; Anal C₅₈H₇₀Br₂N₁₀O₂₅S₂ (C, H, N).

Groupement Fmoc terminal

Le mode opératoire pour le composé **79b** est le même que celui mis en oeuvre pour le composé **73b**.

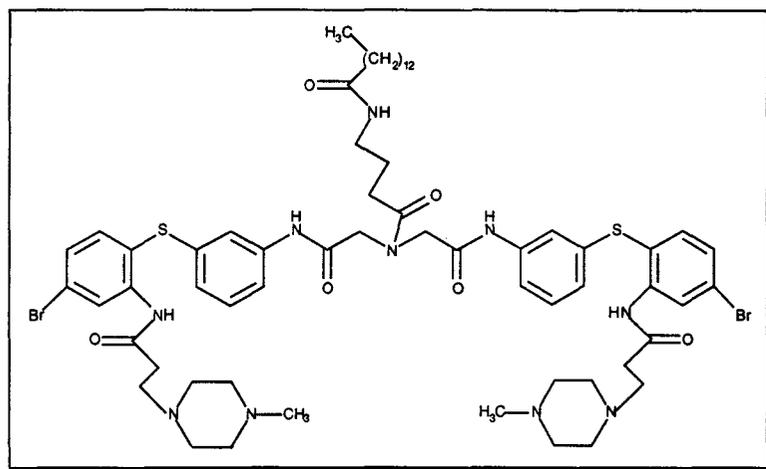
2-(N-{4-[N'-(9-fluorénylméthoxy-carbonyl)amino]butanoyl}imino)-N,N-[3-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino-4-bromo}phénylesulfanyl)phényl]diacétylamide 79b



huile incolore (200 mg, 60%) ; Rf(acétone/NH₄OH-95/5) : 0.55, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 10.57 (large, 1H, NH), 10.51 (large, 1H, NH), 10.45 (large, 1H, NH), 9.43 (large, 1H, NH), 8.42-8.33 (m, 3H, Ph), 7.67-7.62 (m, 2H, Ph), 7.52 (large, 1H, NH), 7.45-7.42 (m, 2H, Ph), 7.31-7.23 (m, 5H, Ph), 7.17-7.09 (m, 7H, Ph), 6.73-6.69 (m, 3H, Ph), 4.33 (s, 2H, CH₂), 4.02 (m, 3H, CH et CH₂), 2.49-2.25 (m, 24H, CH₂), 2.11-2.05 (m, 6H, CH₂), 2.04 (s, 6H, CH₃), 1.60-1.50 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂ + D₂O) : 10.57, 10.51, 10.45, 9.43 et 7.52 échangés ; TOF m/z : 1302 ; Anal C₇₁H₇₈Br₂N₁₀O₂₃S₂ (C, H, N).

Chaîne longue terminale

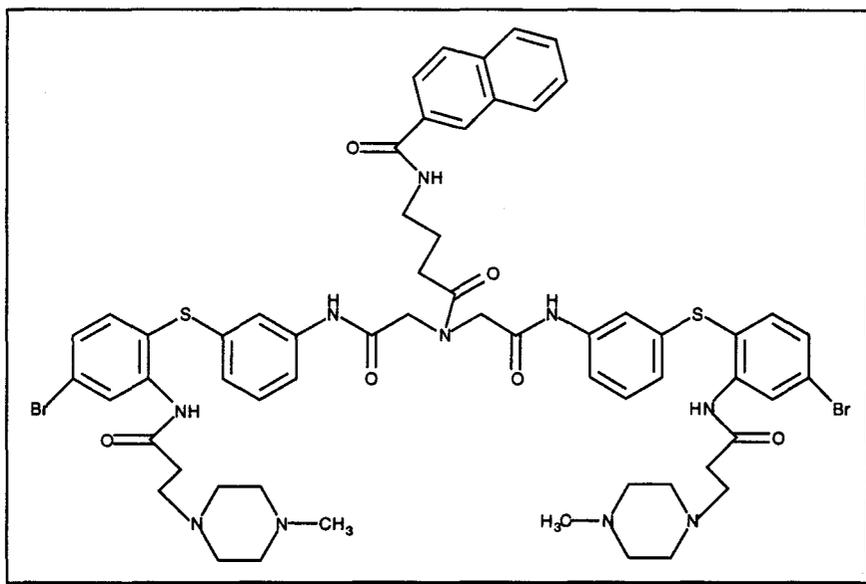
2-{*N*-[4-(*N*-tétradécanoyl)aminobutanoyl]imino}-*N,N'*-[3-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino-4-bromo}phénylesulfanyl)phényl]diacétylamide **80b**



A 0°C, à une solution d'acide tétradécanoïque (22.9 mg, 0.1 mmol, 1 éq) dans 2 mL de DMF sont ajoutés le PyBrop (46.6 mg, 0.1 mmol, 1 éq) et la DIEA (54 μ L, 0.3 mmol, 3 éq). Après 10 minutes d'agitation à 0°C, est ajouté le composé amino **78b** (108 mg, 0.1 mmol, 1 éq). Après 10 minutes d'agitation à 0°C, puis deux heures à température ambiante, le DMF est évaporé, l'huile résiduelle est traitée par un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , puis évaporée et l'huile résiduelle est purifiée par CCE (acétone/ NH_4OH -95/5) pour donner le composé **80b** sous la forme d'une huile incolore (40 mg, 31%) ; Rf(acétone/ NH_4OH -95/5) : 0.3, R.H. positif ; RMN ^1H , $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2)$: 10.93 (large, 1H, NH), 10.32 (large, 1H, NH), 10.21 (large, 1H, NH), 9.99 (large, 1H, NH), 8.59-8.56 (m, 2H, Ph), 7.71-7.67 (m, 2H, Ph), 7.54-7.41 (m, 4H, Ph), 7.30-7.21 (m, 4H, Ph), 6.82-6.72 (m, 2H, Ph), 6.56 (large, 1H, NH), 4.31 (s, 2H, CH_2), 4.17 (s, 2H, CH_2), 3.20-3.17 (m, 2H, CH_2), 2.76-2.45 (m, 32H, CH_2), 2.44 (s, 3H, CH_3), 2.36-2.32 (m, 7H, 2 CH_2 et 1 CH_3), 1.85-1.70 (m, 4H, CH_2), 1.64-1.57 (m, 2H, CH_2), 1.46-1.41 (m, 2H, CH_2), 1.28 (s, 3H, CH_3), 1.24-1.20 (m, 4H, CH_2), 1.12-1.11 (m, 4H, CH_2) ; $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2+\text{D}_2\text{O})$: 10.93, 10.32, 10.21, 9.99 et 6.56 échangés ; TOF m/z : 1290 ; Anal $\text{C}_{70}\text{H}_{94}\text{Br}_2\text{N}_{10}\text{O}_{22}\text{S}_2$ (C, H, N).

Groupe ment naphtalène terminal

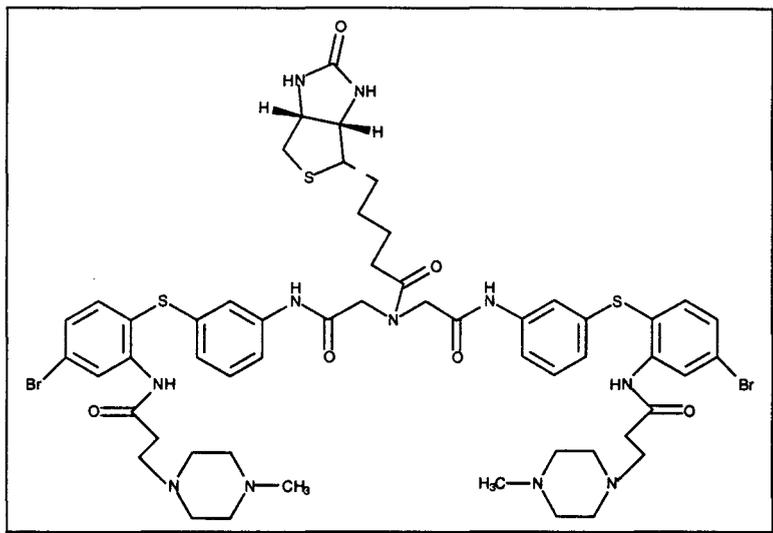
2-(*N*-{4-[*N*-(2-naphtalénoyl)]aminobutanoyl}imino)-*N,N'*-[3-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino-4-bromo}phénylsulfanyl)phényl]diacétylamide **81b**



A 0°C, à une solution d'acide naphtalénoïque (17.2 mg, 0.1 mmol, 1 éq) dans 2 mL de DMF sont ajoutés le PyBrop (46.6 mg, 0.1 mmol, 1 éq) et la DIEA (54 μ L, 0.3 mmol, 3 éq). Après 10 minutes d'agitation à 0°C, est ajouté le composé amino **78b** (108 mg, 0.1 mmol, 1 éq). Après 10 minutes d'agitation à 0°C puis deux heures à température ambiante, le DMF est évaporé, l'huile résiduelle est traitée par un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , puis évaporée et l'huile résiduelle est purifiée par CCE (acétone/ NH_4OH -95/5) pour donner le composé **81b** sous la forme d'une huile jaune clair (50 mg, 40%) ; Rf(acétone/ NH_4OH -95/5) : 0.25, R.H. positif ; RMN ^1H , $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2)$: 10.64 (large, 1H, NH), 10.26 (large, 1H, NH), 10.04 (large, 1H, NH), 9.81 (large, 1H, NH), 8.45-8.41 (m, 2H, Ph), 7.79-7.71 (m, 3H, Ph), 7.57 (large, 1H, NH), 7.49-7.25 (m, 10H, Ph), 7.15-7.07 (m, 4H, Ph), 6.70-6.60 (m, 2H, Ph), 4.23 (s, 2H, CH_2), 4.07 (s, 2H, CH_2), 2.45-2.35 (m, 24H, CH_2), 2.05-2.03 (m, 10H, 2 CH_3 et 2 CH_2), 1.74-1.69 (m, 2H, CH_2) ; $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2+\text{D}_2\text{O})$: 10.64, 10.26, 10.04, 9.81 et 7.57 échangés ; TOF m/z : 1234 ; Anal $\text{C}_{67}\text{H}_{74}\text{Br}_2\text{N}_{10}\text{O}_{22}\text{S}_2$ (C, H, N).

Fonction biotinyle terminale

2-[N-(butanoyl)imino]-N,N'-[3-(2-{3-[1-(4-méthyl)pipérazinyl]propanoylamino-4-bromo}phénylesulfanyl)phényl]diacétylamide 82b



A 0°C, à une solution de biotine (122 mg, 0.5 mmol, 1 éq) dans 8 mL de DMF sont ajoutés le PyBrop (233 mg, 0.5 mmol, 1 éq) et la DIEA (260 µL, 1.5 mmol, 3 éq). Après 10 minutes d'agitation à 0°C, est ajouté le composé amino **75b** (497.5mg, 0.5 mmol, 1 éq). Après 10 minutes d'agitation à 0°C, puis deux heures à température ambiante, le DMF est évaporé, l'huile résiduelle est traitée par un mélange CH₂Cl₂/H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄, puis évaporée et l'huile résiduelle est purifiée par CCE (acétone/NH₄OH-95/5) pour donner le composé **82b** sous la forme d'une huile incolore (305 mg, 50%) ; Rf(acétone/NH₄OH-95/5) : 0.15, R.H. positif ; RMN ¹H, δ(CD₂Cl₂) : 11.04 (large, 1H, NH), 10.52 (large, 1H, NH), 10.46 (large, 1H, NH), 10.34 (large, 1H, NH), 8.47-8.40 (m, 2H, Ph), 7.74-7.72 (m, 1H, Ph), 7.60-7.53 (m, 1H, Ph), 7.49 (large, 1H, NH), 7.46-7.42 (m, 2H, Ph), 7.31-7.25 (m, 2H, Ph), 7.18-7.10 (m, 4H, Ph), 6.72-6.69 (m, 2H, Ph), 6.27 (large, 1H, NH), 4.26 (s, 2H, CH₂), 4.21 (s, 2H, CH₂), 3.50-3.45 (m, 2H, CH₂), 3.38-3.34 (m, 2H, CH₂), 2.60-2.38 (m, 27H, 3CH er 12CH₂), 2.33-2.22 (m, 2H, CH₂), 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.17 (s, 3H, CH₃), 1.84-1.79 (m, 2H, CH₂), 1.50-1.44 (m, 2H, CH₂) ; δ(CD₂Cl₂+D₂O) : 11.04, 10.52, 10.46, 10.34, 7.49 et 6.27 échangés ; TOF m/z : 1221 ; Anal C₆₂H₇₅Br₂N₁₁O₂₂S₃ (C, H, N).

III. Tests enzymatiques

1. Activité sur la trypanothion réductase

Les IC_{50} ont été mesurées avec de la trypanothion réductase produite et purifiée au laboratoire par Valérie Landry. La souche surproductrice de TR nous a été envoyée par les Docteurs Christopher Walsh et Kari Nadeau (Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, USA).

1.1. Production et purification de la trypanothion réductase recombinante

1.1.1. La souche surproductrice de la TR

La TR recombinante de *T. cruzi* est produite dans des cellules d'*Escherichia coli*, déficientes en GR (souche SG5 PTR),¹⁷⁰ en utilisant le vecteur de surexpression pIBITczTR (figure 44).⁶⁹ La production de la TR se fait dans le système T7 RNA polymérase/promoteur (PG1-2), mis au point par Tabor et Richardson.¹⁷¹ Le gène codant pour la TR est placé sous contrôle d'un promoteur T7 RNA polymérase, avec une sélection ampicilline. Un second plasmide permet de surproduire la T7 RNA polymérase ; le gène de la T7 RNA polymérase est placé sous le contrôle d'un répresseur thermosensible c1857 λ , avec une sélection kanamycine.

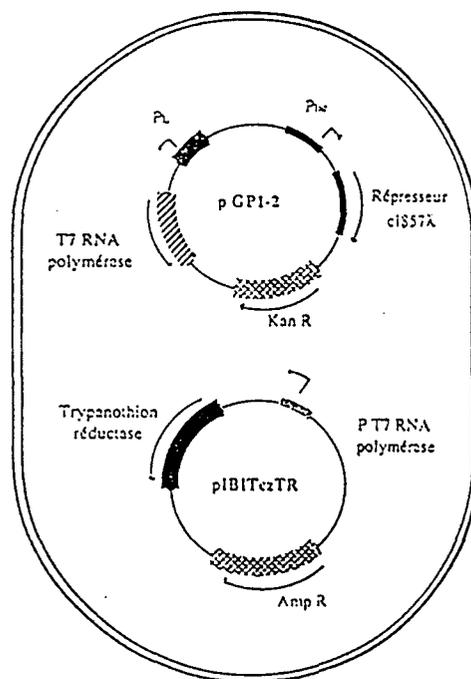


figure 44. Production de la trypanothion réductase

1.1.2. Culture de la souche

La souche est cultivée en alternance sur milieu solide et liquide deux fois concentré en Yeast Extract et Tryptone (2XTY) en présence de kanamycine et d'ampicilline à 100 µg/ml.

| | | |
|---------------|-------------------|-------------|
| Milieu 2XTY : | bactotryptone | 16 g |
| | extrait de levure | 10 g |
| | NaCl | 5 g |
| | H ₂ O | qsp 1 litre |
| | pH = 7.8 | |

Une préculture de 2 mL estensemencée dans 10 litres de 2XTY, puis agitée, à 30°C, jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 1.6 à 595 nm (environ pendant une nuit). On induit alors l'expression de la T7 RNA polymérase, et par voie de conséquence de la TR, par un choc thermique. Le milieu de culture est brusquement porté à 43°C, par addition de 3 litres de milieu 2XTY bouillant. Les antibiotiques sont ajoutés de manière à conserver une concentration de 100 µg/mL. La température est maintenue à 43°C pendant 30 minutes. On revient brusquement à 37°C et on agite pendant trois heures. La TR est produite pendant ce laps de temps. Les cellules sont alors collectées par centrifugation à 3000 tr/min, pendant 20 minutes. Les culots sont séchés et conservés à -80°C. On obtient 50 g de bactéries pour 10 litres de culture.

1.1.3. Purification de la TR

Les culots bactériens (25 g) sont repris dans un tampon Hepes 100 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoéthanol 5 mM, pH 7.5. Avant lyse, du FAD et du PMSF sont ajoutés à une concentration finale de 50 µg/mL et 0.1 mM respectivement. Les bactéries, congelées à -20°C, sont écrasées dans une X-Press (figure 45) : un bras fait descendre le poids et une pression de 10 bars s'exerce sur les bactéries. Cette manipulation est réalisée deux fois à une heure d'intervalle.

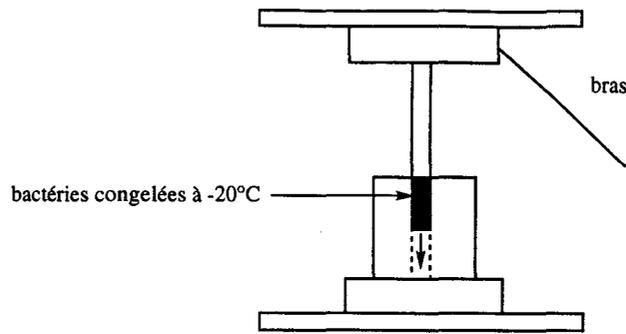


figure 45. X-Press

Les cellules écrasées sont ensuite soumise à une sonication. Puis, une ultracentrifugation à 15000 trs/min pendant 30 minutes permet d'obtenir un culot composé des membranes de cellules. On récupère le surnageant.

A partir de ce surnageant, différentes étapes de purification sont réalisées successivement :

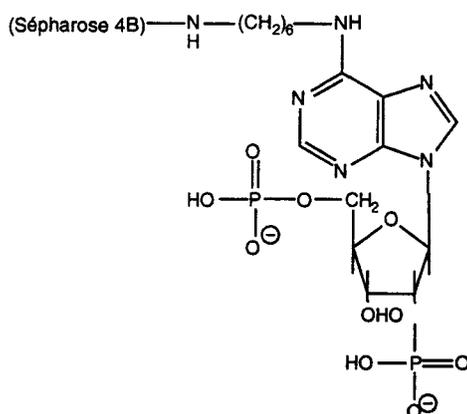
-Précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation au sulfate d'ammonium est l'une des méthodes les plus courantes pour isoler les protéines d'une solution. Des liaisons hydrogène se forment entre les molécules d'eau et les groupements polaires ou ioniques de surface des protéines en solution. Des petits ions fortement chargés, comme les ions ammonium ou sulfate, si leur concentration est suffisamment élevée, entrent en compétition avec les molécules d'eau. Ils dissocient alors les molécules d'eau des protéines, ce qui diminue la solubilité de ces dernières et provoque leur précipitation. Cette précipitation est réversible si l'on abaisse la concentration en sulfate d'ammonium. Divers paramètres déterminent la concentration ionique à laquelle une protéine donnée précipite : nombre et position des groupements polaires, poids moléculaire de la protéine, pH de la solution et température choisie pour précipiter la protéine.

Dans le cas de la TR, on effectue une première précipitation des petites protéines, à 25% en sulfate d'ammonium. Après centrifugation à 15000 trs/min pendant 20 minutes, on récupère le surnageant. Une deuxième précipitation est effectuée à 80% en sulfate d'ammonium. A cette concentration en sels, la TR, entre autres, précipite. Après centrifugation à 15000 trs/min pendant 20 minutes, la TR est récupérée dans le culot. Ce dernier est repris dans un volume minimum de tampon Hepes 100 mM et est dialysé, une nuit, contre un tampon bistrispropane 10 mM, β -mercaptoéthanol 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5 (tampon A).

- *Passage sur une colonne 2',5' ADP Sépharose 4B*

La colonne 2',5' ADP Sépharose 4B est utilisée pour la purification des enzymes qui ont une affinité pour le NADP⁺ ou pour les déshydrogénases NADP⁺-dépendantes.



phase 2',5' ADP Sépharose 4B

La solution de protéines est passée sur cette colonne préalablement équilibrée dans le tampon A. On utilise généralement 5 mL de colonne pour 2 litres de culture de bactéries. La colonne est ensuite lavée toute la nuit avec le tampon A. Le second tampon utilisé est un tampon bistripropane 10 mM, β-mercaptoéthanol 5 mM, EDTA 1 mM, KCl 2 M, pH 7.5. L'élution se fait par un gradient de KCl.

Dans chaque fraction, la quantité de TR est déterminée par mesure de l'activité enzymatique. En effet, la vitesse de réaction enzymatique de réduction du T(S)₂ est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente. Une droite d'étalonnage, en présence de 32.2 μM de T(S)₂ et de 200 μM de NADPH, permet d'estimer la quantité de TR à partir de la vitesse initiale de la réaction pour chaque fraction. Enfin, la composition en protéines des fractions d'intérêt est examinée sur gel de polyacrylamide coloré au nitrate d'argent.

Les fractions d'intérêt sont regroupées et dialysées une nuit contre du tampon A.

- *Passage sur une colonne échangeuse d'anion Mono Q*

Les protéines sont passées sur une colonne Mono Q équilibrée comme précédemment. La colonne est lavée toute la nuit avec le tampon A. Puis, l'élution se fait par un gradient de KCl. Après analyse, les fractions contenant la TR sont récupérées, puis concentrées et dialysées par centrifugation sur Centripep 10.

Un gel d'électrophorèse permet de déterminer la pureté de la TR obtenue par cette méthode de purification.

On obtient ainsi 10 mg de TR à partir de 10 litres de culture. Cette quantité d'enzyme permet de réaliser 40000 tests au spectrophotomètre

1.2. Tests de criblage sur microplaques

Le test s'effectue en microplaques de 96 puits (Nunc). On utilise les solutions mères suivantes : une solution de $T(S)_2$ et de NADPH, respectivement de 3 mM et de 5 mM, dans le tampon enzymatique et une solution de 2-vinyl pyridine (2VP) 0.2 M dans le tampon. Les concentrations en $T(S)_2$ et en NADPH sont vérifiées spectrophotométriquement avant chaque screening. On détermine par spectrophotométrie la dilution de la TR dans le tampon enzymatique à utiliser par puits, de manière à ce que 300 μ M de $T(S)_2$ soient réduits en 15 minutes. Lors d'un test de criblage "classique", 10 μ L de la solution de $T(S)_2$ et de NADPH sont déposés dans chaque puits, ainsi que 10 μ L d'une solution d'inhibiteur à 570 μ M à 10% de DMSO dans l'eau. La réaction est initialisée par l'ajout de 80 μ L de la solution de TR diluée dans le tampon enzymatique. Après 15 minutes, la réaction enzymatique est arrêtée par dénaturation de l'enzyme. La dénaturation se fait par ajout de 40 μ L d'acétonitrile. Le piégeage du $T(SH)_2$ formé durant la réaction enzymatique se fait par addition de 130 μ L de 2-vinylpyridine 0.2 M. La réaction d'alkylation dure 20 minutes à température ambiante. On ajoute ensuite successivement 15 μ L du réactif R1 du kit GSH-400 de Bioxytech (sel de 4-chloro-1-méthyl-7-trifluorométhylquinolinium, 12 mM dans HCl 0.2 N) et 15 μ L de NaOH 30%. Le volume final est de 300 μ L. La microplaque est placée 10 minutes, à 30°C, dans l'obscurité. L'absorbance des puits est ensuite lue à 405 nm avec un lecteur de plaques MR600 (Dynatech). Différents témoins sont effectués pour chaque série de tests : un essai sans TR qui permet d'obtenir la D.O. correspondant à 100% d'inhibition, un essai sans inhibiteur qui donne la D.O. correspondant à 0% d'inhibition, un essai sans $T(S)_2$ qui fournit la valeur du bruit de fond et enfin un essai avec un inhibiteur de référence : la clomipramine. Tous les inhibiteurs donnant un meilleur pourcentage d'inhibition que la clomipramine sont soumis à un second test dans lequel on regarde si les composés n'interfèrent pas avec les réactifs du test coloré en effectuant la réaction en absence de $T(S)_2$. Le pouvoir inhibiteur des composés issus du double screening est ensuite confirmé ou infirmé par test spectrophotométrique.

En faisant varier les concentrations en inhibiteur, ce test coloré peut également être utilisé pour faire une mesure d' IC_{50} .

1.3. Tests spectrophotométriques

L'activité de la TR est détectée grâce au protocole mis au point par Krauth-Siegel.⁶⁸ La réaction s'effectue dans un tampon Hepes, en présence de NADPH en excès par rapport aux concentrations en substrat utilisées. La concentration initiale en NADPH est vérifiée par mesure de la D.O. à 340 nm (ϵ de $6220 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). Les concentrations en substrat trypanothion disulfure sont déterminées précisément à partir de la variation de la D.O. à 340 nm, après complète réduction par la TR : une molécule de NADPH permet la réduction d'un équivalent de disulfure. La vitesse de la réaction est mesurée à 28°C (spectrophotomètre thermostaté UVIKON 930, KONTRON instruments) en suivant la disparition du NADPH à 340 nm. Après équilibration de la température, la réaction est initialisée par ajout de l'enzyme à une concentration finale dans la cuve de $0.8 \mu\text{g/mL}$. Les profils de vitesse en fonction des concentrations en substrat sont analysés dans les conditions de Michaelis-Menten et permettent de déterminer les paramètres cinétiques de la réaction.

Le même protocole est utilisé pour estimer le pouvoir inhibiteur des molécules. Une première indication est obtenue en mesurant un pourcentage d'inhibition pour des concentrations fixes en enzyme ($0.8 \mu\text{g/mL}$), en substrat ($57 \mu\text{M}$) et en inhibiteur ($57 \mu\text{M}$). Puis, suivant les résultats obtenus, des tests à des concentrations plus faibles en inhibiteur sont effectués. Pour les meilleurs inhibiteurs, on détermine l' IC_{50} .

La formule de Cheng-Prusoff¹⁷² permet alors d'obtenir, à partir de l' IC_{50} , une estimation du K_i pour les molécules.

Formule de Cheng-Prusoff : $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + [S] / K_m)$

Pour les tests, le tampon enzymatique utilisé est le suivant :

| | |
|-------|--|
| Hepes | 20 mM |
| EDTA | 1 mM |
| KCl | 0.15 M |
| NADPH | en excès par rapport à la quantité de substrat ($> 200 \mu\text{M}$) |
| pH | = 7,25 |

2. Tests Janssen

Ce programme de criblage, réalisé à l'aide d'automates, de nos inhibiteurs de la trypanothion réductase est financé par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Les différents composés sont envoyés chez Janssen Pharmaceutica, au Département de Parasitologie dirigé par le Docteur Louis Maes, dans le but d'être incorporés au criblage robotisé TDR-ICHEM. Ce criblage inclut une évaluation des inhibiteurs :

- *in vitro* sur la trypanothion réductase,
- *in vitro* sur la glutathion réductase,
- *in vitro* sur *T. cruzi*,
- *in vitro* sur *L. infantum*,
- *in vitro* et *in vivo* sur *T. brucei*.

2.1. Test *in vitro* sur la trypanothion réductase

Les tests sont réalisés sur la trypanothion réductase de *Trypanosoma cruzi*. Une solution initiale d'inhibiteur à 20 mM dans 100% de DMSO est préparée préalablement. Les dilutions successives sont ensuite réalisées dans les tampons appropriés.

2.2. Test *in vitro* sur la glutathion réductase

Les tests sont réalisés sur la glutathion réductase humaine. Une solution initiale d'inhibiteur à 20 mM dans 100% de DMSO est préparée préalablement. Les dilutions successives sont ensuite réalisées dans les tampons appropriés.

Pour les tests *in vitro* sur les parasites, une solution initiale d'inhibiteur à 20 mM dans 100% de DMSO est préparée préalablement. Les dilutions successives sont ensuite réalisées dans les milieux de culture appropriés.

2.3. Test *in vitro* sur *Trypanosoma brucei*

Les conditions et la procédure du test sont les suivantes :

- conditions de culture : culture axénique dans du milieu HMI-18

- échelle des concentrations en inhibiteur : 6.25-1.56 μ M

- procédure du test :

Les trypomastigotes de *T. brucei* sont issus d'une culture axénique continue dans du milieu HMI-18, d'après les conditions décrites par Hirumi et al.¹⁷³ Ils sont incubés dans des solutions de milieu HMI, à différentes concentrations en inhibiteur, la manipulation se faisant dans une microplaque de culture de tissus à 96 puits. La

multiplication des parasites est mesurée après quatre jours d'incubation à 37°C et sous 5% de CO₂.

L'activité de l'inhibiteur est quantifiée par la mesure du pourcentage de diminution de la multiplication des parasites par rapport à des cultures non traitées. Cette dernière se fait par microscopie ou par des tests colorimétriques. Puis, les valeurs des DL₅₀ sont extrapolées.

2.4. Test *in vitro* sur *Trypanosoma cruzi*

La méthode, décrite par Neal et Croft¹⁷⁴ pour les drogues anti-leishmania, a été adaptée à *T. cruzi*. Les conditions et la procédure du test sont les suivantes :

- conditions de culture : macrophages de péritonéale de souris



- échelle des concentrations en inhibiteur : 50-6.25 µM

- procédure du test :

Des macrophages de péritonéale de souris sontensemencés dans des microplaques à 96 puits : 30000 cellules par puits. Après 24 heures, environ 100000 trypomastigotes de *T. cruzi* et un inhibiteur, à une certaine concentration (deux fois diluée), sont ajoutés, simultanément, dans chaque puits. Les cultures sont ensuite incubées, à 37°C et sous 5% de CO₂, pendant 4 jours. Pour prendre en compte, dans l'évaluation de l'inhibiteur, la toxicité aspécifique de ce dernier, des cultures non infectées sont traitées de la même façon. Ainsi, un index de sélectivité de l'inhibiteur peut être déterminé.

L'activité de l'inhibiteur est quantifiée par la mesure du pourcentage de diminution du nombre total de parasites (trypomastigotes libres et amastigotes intracellulaires) par rapport à des cultures non traitées. Cette dernière se fait par microscopie. Puis, les valeurs des DL₅₀ sont extrapolées.

2.5. Test *in vitro* sur *Leishmania infantum*

Les conditions et la procédure du test sont les suivantes :

- conditions de culture : macrophages de péritonéale de souris

- échelle des concentrations en inhibiteur : 50-6.25 µM

- procédure du test :

Des macrophages de péritonéale de souris sontensemencés dans des plaques de culture LABTEK à 96 puits : 30000 cellules par puits. Après 24 heures, des amastigotes de *Leishmania infantum* (issus de la rate d'un animal infecté), dans un ratio de 10 pour 1, ainsi qu'un inhibiteur, à une certaine concentration (deux fois diluée), sont ajoutés simultanément. Les cultures sont ensuite incubées, à 37°C et sous 5% de CO₂, pendant 7 jours. Le traitement similaire sur des cultures de cellules non infectées permet de déterminer un index de sélectivité de l'inhibiteur.

L'activité de l'inhibiteur est quantifiée par la mesure du pourcentage de diminution du nombre total de parasites ou par celle du nombre de macrophages infectés (détermination par des préparations de Wright). La mesure se fait par microscopie. Puis, les valeurs des DL₅₀ sont extrapolées.

2.6. Test *in vivo* sur *Trypanosoma brucei*

Pour les tests *in vivo*, la solution d'inhibiteur est à 16 mg/mL dans 100% de DMSO.

Les conditions et la procédure du test sont les suivantes :

- animal : souris

- nombre d'animaux par test : 3

- dose d'inhibiteur : 80 mg/kg, cinq fois de suite

- voie utilisée : orale-intrapéritonéale

- procédure du test :

Des souris femelles, âgées de 4 semaines (20-25 g), sont infectées, intrapéritonéalement, par environ 10^{6.5} haemoflagellates dans 0.2 mL d'inoculum. Au même moment, les animaux sont traités oralement par une dose de 80 mg/kg du composé testé. Le traitement est poursuivi pendant 4 jours par la voie intrapéritonéale.

Des animaux de contrôle non traités meurent, généralement, entre 6 et 7 jours après l'infection. L'activité de l'inhibiteur est évaluée par la mesure de la prolongation de la durée de vie des souris traitées par rapport aux animaux de contrôle. L'expérience se termine au bout de 30 jours, les survivants sont alors examinés pour déterminer leur parasitémie.

Références

1. **OMS, Comité d'experts**
Lutte contre la maladie de Chagas
OMS, série de rapports techniques **1991**, 811
2. **Grant I.H., Gold J.W.M., Wittner M., Tanovitz H.B., Nathan C., Mayer K., Reich L., Wollner N., Steinherz L., Ghavimi F., O'Reilly O., Amstrong D.**
Transfusion-associated acute Chagas' disease acquired in the United-States
Ann. Intern. Med. **1989**, *111*, 849-851
3. **Nickerson P., Orr P., Schroeder M.L., Sekle L., Johnson J.B.**
Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in non-endemic area
Ann. Intern. Med. **1989**, *111*, 851-853
4. **Milei J., Mautner B., Storino R., Sanchez J.A., Ferrans V.G.**
Does Chagas' disease exist as an undiagnosed form of cardiomyopathy in the United-States
Am. Heart J. **1992**, *123*, 1732-1735
5. La Recherche, **1997**, 296, 9
6. UNDP/World BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases
Brazil : Reduction of 97% in Chagas disease
TDR news **1997**, 52, 2
7. **Fairlamb A.H.**
Biochemistry of trypanosomiasis and rational approach to chemotherapy
TIBS **1982**, 249-253
8. **de Castro S.L.**
The challenge of Chagas' disease chemotherapy : an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*
Acta Tropica **1993**, *53*, 83-98
9. **Lancastre F.**
Médicaments des parasitoses et des mycoses
Références en pharmacologie clinique ; Expansion scientifique **1993**, 62-70
10. **Cançado J.R., Brener Z.**
Trypanosoma cruzi e doença de Chagas
Terapeutica **1979**, 362-424, In : Brener and Andrade (Eds, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
11. **Docampo R.**
Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs
Chem. Biol. Interact. **1990**, *73*, 1-27
12. **Diaz de Toranzo E.G., Castro J.A., Franke de Cazzulo B.M., Cazzulo J.J.**
Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*
Experientia **1976**, *32*, 972-975

13. **Castro J.A., Diaz de Toranzo E.G.**
Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease)
Biomed. Environ. Sci. **1988**, *1*, 19-33
14. **Nagel R.**
Genotoxicity studies with two antichagasic drugs
Mutation Res. **1987**, *191*, 17-20
15. **Souza S.C., Takahashi C.S., da Silva J.S.**
Evaluation of the mutagenic potential of the antichagasic drug Rochagan in healthy and chagasic rodents
Mutation Res. **1991**, *259*, 139-145
16. **Gorla N.B., Ledesma O.S., Barbieri G., Larripa I.B.**
Assesment of cytogenic damage in chagasic children treated with benznidazole
Mutation Res. **1988**, *206*, 212-220
17. **Gorla N.B., Ledesma O.S., Barbieri G., Larripa I.B.**
Thirteen increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox
Mutation Res. **1989**, *224*, 263-267
18. **Kirchoff L.V.**
Is Trypanosoma cruzi a new threat to our blood supply?
Ann. Intern. Med. **1989**, *111*, 773-775
19. **Nussensweig V., Biancalana A., Amato Neto V., Sontag R., Freitas J.L.P., Kloetzel J.**
Ação da violeta de genciana sobre o *Trypanosoma cruzi* in vitro : sua importância na esterilização de sangue destinado à transfusão
Revta. Paul. Med. **1953**, *42*, 57-58
20. **Docampo R., Moreno S.N.J.**
The metabolism and mode of action of violet gentian
Drug. Met. Rev. **1991**, *22*, 161-178
21. **Pryor W.A.**
Oxy-radicals and related species : their formation, lifetimes and reactions
Ann. Rev. Physiol. **1986**, *48*, 657-667
22. **Deby C.**
La biochimie de l'oxygène
La recherche **1991**, *22*, 56-64
23. **Coatgreave I.A., Moldéus P., Orrenius S.**
Host biochemical defense mechanisms against prooxidants
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. **1988**, *28*, 189-212
24. **Fridovich I.**
Mel B in the treatment of human trypanosomiasis
Am. J. Trop. Med. Hyg. **1949**, *29*, 173-180
25. **Rose R.C., Bode A.M.**
Biology of free radical scavengers : an evaluation of ascorbate
FASEB J. **1993**, *7*, 1135-1142

26. **Meister A., Anderson M.E.**
Glutathione
Annu. Rev. Biochem. **1983**, *52*, 711-760
27. **Wilce M.C.J., Parker M.W.**
Structure and function of glutathione S-transferases
Biochem. Biophys. Acta **1994**, *1205*, 1-18
28. **Repetto Y., Opazo E., Maya J.D., Agosin M., Morello A.**
Glutathione and Trypanothione in Several Strains of *Trypanosoma cruzi* : Effect of Drugs
Comp. Biochem. Physiol. **1996**, *115B*, 2, 281-285
29. **Fairlamb A.H., Cerami A.**
Identification of novel thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids
Mol. Biochem. Parasitol. **1985**, *14*, 187-98
30. **Fairlamb A.H., Blackburn P., Ulrich P., Chait B.T., Cerami A.**
Trypanothione : a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids
Science **1985**, *227*, 1485-1487
31. **Hunter K.J., Le Quesne S.A., Fairlamb A.H.**
Identification and biosynthesis of N¹,N⁹-bis(glutathionyl)aminopropylcadaverine (homotrypanothione) in *Trypanosoma cruzi*
Eur. J. Biochem. **1994**, *226*, 1019-1027
32. **Henderson G.B., Glushka J., Cowburn D., Cerami A.**
Synthesis and NMR characterization of the trypanosomatid metabolite, N¹,N⁸-bis(glutathionyl)spermidine disulphide (trypanothione disulfide)
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I **1990**, 911-914
33. **Fairlamb A.H., Henderson G.B.**
Metabolism of trypanothione and glutathionylspermidine in trypanosomatids
In Host-Parasite Cellular and Molecular Interactions in Protozoal Infections **1987**, *Vol. III*, ed.K.P. Chang, D. Snary, pp. 29-40, Berlin : Springer-Verlag/NATO ASI Series
34. **Fairlamb A.H., Henderson G.B., Cerami A.**
Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes
Proc. Natl. Acad. Sci. **1989**, *86*, 2607-2611
35. **Moutiez M., Meziane-Cherif D., Aumercier M., Sergheraert C., Tartar A.**
Compared Reactivities of Trypanothione and Glutathione in Conjugation Reactions
Chem. Pharm. Bull. **1994**, *42*, 12, 2641-2644
36. **Schwarcz de Tarlovsky M.N., Hernandez S.M., Bedoya A.M., Lammel E.M., Isola E.L.D.**
Polyamines in *Trypanosoma cruzi*
Biochem. Mol. Biol. Int. **1993**, *30*, 547-558

37. **Fairlamb A.H., Cerami A.**
Metabolism and function of trypanothione in the Kinetoplastidae
Annu. Rev. Microbiol. **1992**, *46*, 695-729
38. **Bitonti A.J., Bacchi C.J., McCann P.P., Sjoerdsma A.**
Catalytic irreversible inhibition of *Trypanosoma brucei brucei* ornithine decarboxylase by substrate and product analogs and their effect in murine trypanosomiasis
39. **Philips M.A., Coffino P., Wang C.C.**
Cloning and sequencing of the ornithine decarboxylase gene from *Trypanosoma brucei* : implications for enzyme turnover and selective difluoromethylornithine inhibition
J. Biol. Chem. **1987**, *262*, 8721-8727
40. **Philips M.A., Coffino P., Wang C.C.**
Trypanosoma brucei ornithine decarboxylase : enzyme purification, characterization and expression in *Escherichia coli*
J. Biol. Chem. **1988**, *263*, 17933-17941
41. **Yarlett N., Bacchi C.J.**
Effect of D,L- α -difluoromethylornithine on methionine cycle intermediates in *Trypanosoma brucei brucei*
Mol. Biochem. Parasitol. **1988**, *27*, 1-10
42. **Bitonti A.J., Dumont J.A., McCann P.P.**
Characterization of *Trypanosoma brucei brucei* S-adenosyl-L-methionine decarboxylase and its inhibition by Berenil, pentamidine and methylglyoxal bis(guanylhydrazone)
Biochem. J. **1986**, *237*, 685-689
43. **Byers T.L., Bush T.L., McCann P.P., Bitonti A.J.**
Antitrypanosomal effects of polyamine biosynthesis inhibitors correlate with increases in *Trypanosoma brucei brucei* S-adenosyl-L-methionine
Biochem. J. **1991**, *274*, 527-533
44. **Bitonti A.J., Kelly S.E., McCann P.P.**
Characterization of spermidine synthase from *Trypanosoma brucei brucei*
Mol. Biochem. Parasitol. **1984**, *13*, 21-28
45. **Schechter P.J., Sjoerdsma A.**
Difluoromethylornithine in the treatment of African trypanosomiasis
Parasitol. Today **1986**, *2*, 223-224
46. **Kierzenbaum F., Wirth J.J., McCann P.P., Sjoerdsma A.**
Arginine decarboxylase inhibitors reduce the capacity of *Trypanosoma cruzi* to infect and multiply in mammalian host cells
Proc. Natl. Acad. Sci. **1987**, *84*, 4278-4282
47. **Bitonti A.J., Casara P.J., McCann P.P., Bey P.**
Catalytic irreversible inhibition of bacterial and plant arginine decarboxylase activities by novel substrate and product analogues
Biochem. **1987**, *242*, 69-74

48. **Tabor C.W., Tabor H.**
Polyamines
Annu. Rev. Biochem. **1984**, *53*, 749-790
49. **Fairlamb A.H., Henderson G.B., Cerami A.**
The biosynthesis of trypanothione and N1-glutathionylspermidine in *Crithidia fasciculata*
Mol. Biochem. Parasitol. **1986**, *21*, 247-257
50. **Smith K., Nadeau K., Bradley M., Walsh C. Fairlamb A.H.**
Purification of glutathionylspermidine and trypanothione synthetase from *Crithidia fasciculata*
Protein Science **1992**, *1*, 874-883
51. **Le Trang N., Meshnick S.R., Kitchener K., Eaton J.W., Cerami A.**
Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata* : purification, characterization and similarity to leishmanial and trypanosomal enzymes
J. Biol. Chem. **1983**, *258*, 125-130
52. **Carnieri E.G.S., Moreno S.N.J., Docampo R.**
Trypanothione dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages
Mol. Biochem. Parasitol. **1993**, *61*, 79-86
53. **Docampo R., de Boiso J., Boveris A., Stoppani A.**
Localization of peroxidase activity in *Trypanosoma cruzi* microbodies
Experimentia **1976**, *32*, 972-975
54. **Clark C., Albrecht M., Arevalo J.**
Ascorbate variations and dehydroascorbate reductase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and trypomastigotes
Mol. Biochem. Parasitol. **1994**, *66*, 143-145
55. **Carnegie P.R.**
Structure and properties of a homologue of glutathione
Biochem. **1963**, *89*, 471-478
56. **Tabor H., Tabor C.W.**
Isolation, characterization and turnover of glutathionylspermidine from *Escherichia coli*
J. Biol. Chem. **1975**, *250*, 2648-2654
57. **Newton G.L., Javor B.**
 γ -Glutamylcysteine and thiosulfate are the major low-molecular-weight thiols in Halobacteria
J. Bacteriol. **1985**, *161*, 438-441
58. **Fahey R.C., Newton G.L.**
Occurrence of low molecular weight thiols in biological systems **1983**, See Rf.130a, pp 251-260
59. **Moutiez M., Aumercier M., Schöneck R., Meziane-Cherif D., Lucas V., Aumercier P., Ouaisi A., Sergheraert C., Tartar A.**
Purification and characterization of a trypanothione-glutathione transferase from *Trypanosoma cruzi*
Biochem. J. **1995**, *310*, 433-437

60. **Moutiez M., Quémeneur E., Sergheraert C., Lucas V., Tartar A., Davioud-Charvet E.**
Glutathione-dependent activities of *Trypanosoma cruzi* p52 makes it a new member of the thiol:disulphide oxidoreductase family
Biochem. J. **1997**, *322*, 43-48
61. **Morrow C.S., Cowan K.H.**
Glutathione S-transferases and drug resistance
Cancer Cells **1990**, *2*, 15-22
62. **Yawetz A., Agosin M.**
Purification of the glutathione S-transferase of *Trypanosoma cruzi*
Comp. Biochem. Physiol. **1981**, *68B*, 237-243
63. **Etah E.A.O., Smith K., Fairlamb A.H.**
Trypanothione detoxication systems in trypanosomatids
Abstract, Spring Meeting of the British Society for Parasitology, **1993**, London
64. **Shim H., Fairlamb A.H.**
Levels of polyamines, glutathione and glutathionylspermidine conjugates during growth of the insect trypanosomatid *Crithidia fasciculata*
J. Gen. Microbiol. **1988**, *134*, 807-817
65. **Algranati I.D., Sanchez C., Gonzales N.S.**
Polyamines in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*
The Biology and Chemistry of Polyamines **1989**, ed. S.H. Goldengerg, I.D. Algranati, pp. 137-146, Oxford: Oxford Univ. Press
66. **Singhal R.K., Anderson M.E., Meister A.**
Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity
FASEB J. **1987**, *1*, 220-223
67. **Shames S.L., Fairlamb A.H., Cerami A., Walsh C.T.**
Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly discovered member of the family of disulphide-containing flavoprotein reductases
Biochemistry **1986**, *25*, 3519-3526
68. **Krauth-Siegel R.L., Enders B., Henderson G.B., Fairlamb A.H., Schirmer R.H.**
Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi* : purification and characterization of the crystalline enzyme
Eur. J. Biochem. **1987**, *164*, 123-128
69. **Sullivan F.X., Walsh C.T.**
Cloning, sequencing, overproduction and purification of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*
Mol. Biochem. Parasitol. **1991**, *44*, 145-148
70. **Shames S.L., Kimmel B.E., Peoples O.P., Agabian N., Walsh C.T.**
Trypanothione reductase of *Trypanosoma congolense* : gene isolation, primary sequence determination, and comparison to glutathione reductase
Biochemistry **1988**, *27*, 5014-5019

71. **Field H., Cerami A., Henderson G.B.**
Cloning, sequencing, and demonstration of polymorphism in trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*
Mol. Biochem. Parasitol. **1992**, *50*, 47-56
72. **Aboagye-Kwarteng T., Smith K., Fairlamb A.H.**
Molecular characterization of the trypanothione reductase gene from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei* : comparison with other flavoprotein disulfide oxidoreductases with respect to substrate specificity and catalytic mechanism
Mol. Microbiol. **1992**, *6*, 3089-3099
73. **Taylor M.C.**
The trypanothione reductase gene of *Leishmania donovani*
Ph. D thesis **1992**, Univ.London, London
74. **Henderson G.B., Murgolo N.J., Osapay K., Kominos D.**
Engineering the substrate-specificity of glutathione reductase toward that of trypanothione reduction
Proc. Natl. Acad. Sci. **1991**, *88*, 8769-8773
75. **Berry A., Scrutton N.S., Perham R.N.**
Switching kinetic mechanism and putative proton donor by directed mutagenesis of glutathione reductase
Biochemistry **1992**, *28*, 1264-1269
76. **Pai E.F., Schulz G.E.**
The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from X-ray diffraction analyses of reaction intermediates
J. Biol. Chem. **1983**, *258*, 1752-1757
77. **Karplus P.A., Schultz G.E.**
Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme : substrate crystal structure at 2 Å resolution
J. Mol. Biochem. **1989**, *210*, 163-180
78. **Deonarain M.P., Berry A., Scrutton N.S., Perham R.N.**
Alternative proton donors/acceptors in the catalytic mechanism of the glutathione reductase of *Escherichia coli* : the role of histidine-439 and tyrosine-99
Biochemistry **1989**, *28*, 9602-9607
79. **Hunter W.N., Bailey S., Habash J., Harrop S.J., Helliwell J.R., Aboagye-Kwarteng T., Smith K., Fairlamb A.H.**
Active site of trypanothione reductase, a target for rational drug design
J. Mol. Biol. **1992**, *227*, 322-323
80. **Lantwin C.B., Schlichting I., Kabsch W., Pai E.F., Krauth-Siegel R.L.**
The structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in the oxidized and NADPH reduced state
Proteins Struct. Funct. Genet. **1994**, *18*, 161-173
81. **Bailey S., Fairlamb A.H., Hunter W.N.**
Structure of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata* at 2.6 Å resolution; enzyme-NADPH interactions at 2.8 Å resolution
Acta crystallogr. **1994**, *b50*, 139-154

82. **Henderson G.B., Fairlamb A.H., Ulrich P., Cerami A.**
Substrate specificity of the flavoprotein trypanothione disulfide reductase from *Crithidia fasciculata*
Biochemistry **1987**, *26*, 3023-3027
83. **El-Waer A., Douglas K.T., Smith K., Fairlamb A.H.**
Synthesis of N-benzyloxycarbonyl-L-cysteinylglycine 3-dimethylaminopropylamide disulfure : a cheap and convenient assay for trypanothione reductase
Anal.Biochem. **1991**, *198*, 212-216
84. **Janes W., Schulz G.E.**
Role of the charged groups of glutathione disulfide in the catalysis of glutathione reductase : crystallographic and kinetic studies with synthetic analogues
Biochemistry **1990**, *29*, 4022-4030
85. **Karplus P.A., Pai E.F., Schultz G.E.**
A crystallographic study of the glutathione binding site of glutathione reductase at 0.3 nm resolution
Eur. J. Biochem. **1989**, *178*, 693-703
86. **Sullivan F.X., Sobolov S.B., Bradley M., Walsh C.T.**
Mutational analysis of parasite trypanothione reductase : acquisition of glutathione reductase activity in a triple mutant
Biochemistry **1991**, *30*, 2761-2767
87. **Henderson G.B., Murgalo N.J., Kuriyan J., Osapay K., Kominos D., Berry A., Scrutton N.S., Hinchliffe N.W., Perham R.N., Cerami A.**
Engineering the substrate specificity of glutathione reductase toward that of trypanothione reductase
Proc. Natl. Acad. Sci. **1991**, *88*, 8769-8773
88. **Krauth-Siegel R.B., Sticherling C., Jöst I., Walsh C.T., Pai E.F., Kabsch W., Lantwin C.B.**
Crystallization and preliminary crystallographic analysis of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*, the causative of Chagas' disease
FEBS lett. **1993**, *317*, 105-108
89. **Kuriyan J., Kong X.P., Krishna T.S.R., Sweet R.M., Murgolo N.J., Field H., Cerami A., Henderson G.B.**
X-ray structure of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata* at 2.4 Å resolution
Proc. Natl. Acad. Sci. **1991**, *88*, 8764-8768
90. **Zhang Y., Bond C.S., Bailay S., Cunningham M.L., Fairlamb A.H., Hunter W.N.**
The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi*
Protein Science **1996**, *5*, 52-61
91. **Jacoby E.M., Schlichting I., Lantwin C.B., Kabsch W., Krauth-Siegel R.L.**
Crystal structure of the *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase-mepacrine complex
Proteins Struct. Funct. Gen. **1996**, *24*, 73-80

92. **Walsh C., Bradley M., Nadeau K.**
Molecular studies on trypanothione reductase, a target for antiparasitic drugs
TIBS **1991**, *16*, 309-309
93. **Bailey S., Smith K., Fairlamb A.H., Hunter W.N.**
Substrate interactions between trypanothione reductase and N¹-
glutathionylspermidine disulphide at 0.28 nm resolution
Eur. J. Biochem. **1993**, *213*, 67-75
94. **Birkof J.J., Blow D.M.**
Structure of crystalline α -chymotrypsin
J. Mol. Biochem. **1972**, *68*, 187-240
95. **Schirmer R.H., Müller J.G., Krauth-Siegel R.L.**
Disulfide-reductase inhibitors as chemotherapeutic agents : the design of drugs for
trypanosomiasis and malaria
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1995**, *34*, 141-154
96. **Goodford P.J.**
A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on
biologically important macromolecules
J. Med. Chem. **1985**, *28*, 849-857
97. **Benson T.J., McKie J.H., Garforth J., Borges A., Fairlamb A.H.,
Douglas K.T.**
Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase; phenothiazines
and related tricyclics as lead structures
Biochem. J. **1992**, *286*, 9-11
98. **de Castro S.L., Soeiro M.N.C., de Nazareth Leal de Meirelles M.**
Trypanosoma cruzi : Effect of phenothiazines on the parasite and its interaction
with host cells
Mem. Inst. Oswaldo Cruz **1992**, *87*, 209-215
99. **Hammod D.J., Cover B., Gutteridge W.E.**
A novel series of chemical structures active *in vitro* against the trypomastigote
form of *Typanosoma cruzi*
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **1984**, *78*, 91-95
100. **Baert-Viau C.**
Etude de quelques dérivés de l'Amino-2 Diphénylsulfure Halogéné
Thèse de Doctorat **1975**, Université de Lille II, France
101. **Cunningham M.L., Zvelebil M.J.J.M., Fairlamb A.H.**
Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by
trivalent organic arsenicals
Eur. J. Biochem. **1994**, *221*, 285-295
102. **Pegg A.E.**
Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes
Biochem. **1986**, *234*, 249-262
103. **Karplus P.A., Krauth-Siegel R.L., Schirmer R.H., Schulz G.E.**
Inhibition of human glutathione reductase by the nitrosourea drugs 1,3-*bis*(2-
chloroethyl)-1-nitrosourea and 1-(2-chloroethyl)-3-(2-hydroxyethyl)-1-nitrosourea
Eur. J. Biochem. **1988**, *171*, 193-198

104. **Davis M.R., Kassahun K., Jochheim C.M., Brandt K.M., Baillie T.A.**
 Glutathione and N-acylcysteine conjugates of 2-chloroethyl isocyanate. Identification as metabolites of N,N'-bis-(chloroethyl)-N-nitrosourea in the rat and inhibitory properties toward glutathione reductase *in vitro*
 Chem. Res. Toxicol. **1993**, *6*, 376-383
105. **Garforth J., McKie J.H., Jaouhari R., Benson T.J., Fairlamb A.H., Douglas K.T.**
 Rational design of peptide-based inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal drugs
 Amino Acids **1994**, *6*, 295-299
106. **Tromelin A., Moutiez M., Meziane-Cherif D., Aumercier M., Tartar A., Sergheraert C.**
 Synthesis of Non Reducible Inhibitors for Trypanothione Reductase from *Trypanosoma cruzi*
 Bioorg. Med. Chem. Lett. **1993**, *3*, 10, 1971-1976
107. **Cenas N., Bironaite D., Dickancaite E., Anusevicius Z., Sarlauskas J., Blanchard J.S.**
 Chinifur, a selective inhibitor and "subversive substrate" for *Trypanosoma congolense* trypanothione reductase
 Biochem. Biophys. Res. Comm. **1994**, *204*, 224-229
108. **Cornish-Bowden A.**
 Why is uncompetitive inhibition so rare?
 A possible explanation, with implications for the design of drugs and pesticides
 FEBS Lett. **1986**, *203*, *1*, 3-6
109. **Moreno S.N.J., Carnieri E.G.S., Docampo R.**
 Inhibition of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by cristal violet
 Mol. Biochem. Parasitol. **1994**, *67*, 313-320
110. **Jockers-Scherübl M.C., Schirmer R.H., Krauth-Siegel R.L.**
 Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*, catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds
 Eur. J. Biochem. **1989**, *180*, 267-272
111. **Krauth-Siegel R.L., Lohrer H., Bücheler U.S., Schirmer R.H.**
 The antioxidant enzymes glutathione reductase and trypanothione reductase as drug targets
 Biochemical Protozoology (Combe G.H. and North M.J. eds) **1991**, pp 493-505, Taylor and Francis, London
112. **McClements W., Yamanaka G., Garsky V., Perry H., Bacchetti S., Colonna R., Stein R.B.**
 Oligopeptides inhibits the ribonucleotide reductase of Herpes simplex virus by causing subunit separation
 Virology **1988**, *162*, 270-273
113. **Nordhoff A., Bücheler A.S., Werner D., Schirmer R.H.**
 Folding of the four domains and dimerization are impaired by the Gly₄₄₆->Glu exchange in human glutathione reductase. Implications for the design of antiparasitic drugs
 Biochemistry **1993**, *32*, 4060-4066

114. **Aumercier M., Meziane-Cherif D., Moutiez M., Tartar A., Sergheraert C.**
A microplaste assay for trypanothione reductase inhibitors
Analytical Biochemistry **1994**, *223*, 161-164
115. **Baillet S., Buisine E., Horvath D., Maes L., Bonnet B., Sergheraert C.**
2-Amino Diphenylsulfides as Inhibitors of Trypanothione Reductase : Modification of the Side Chain
Bioorg. Med. Chem. **1996**, *4*, 891-899
116. **Savigne W.E., McLaren J.A.**
Organic Sulphur Compounds (éd. par Pergamon Press, Oxford) **1966**, *vol II*, 367-402
117. **Moutiez M.**
Recherche d'inhibiteurs de la trypanothion réductase chez *Trypanosoma cruzi* - Identification de nouvelles cibles thérapeutiques
Thèse de Doctorat **1995**, Université de Lille II, France
118. **Fernandez-Gomez R., Moutiez M., Aumercier M., Bethegnies G., Luyckx M., Ouassi A., Tartar A., Sergheraert C.**
2-Amino diphenylsulfides as new inhibitors of trypanothione reductase
International Journal of Antimicrobial Agents **1995**, *6*, 111-118
119. **Dougherty D.A.**
Cation- Interactions in Chemistry and Biology : A New View of Benzene, Phe, Tyr, and Trp
Science **1996**, *271*, 163-168
120. **Ponasik J.A., Strickland C., Faerman C., Savvides S., Karplus P.A., Ganem B.**
Biochem. J. **1995**, *311*, 371
121. **Sullivan M.C., Zhou Q.**
Novel polyamine derivatives as competitive inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase
Bioorg. Med. Chem. Lett. **1995**, *5*, 1957
122. **Greene T.W., Wuts P.G.M.**
Protective Groups in Organic Synthesis (éd. par John Wiley & Sons, Inc., USA) **1991**, 298 et 355,
123. **Zervas L., Photaki I., Ghelis N.**
On cysteine and cystine peptides. II. S-acylcysteines in peptide synthesis
J. Am. Chem. Soc. **1963**, *85*, 1337
124. **Bodansky M., Bodansky A.**
The Practice of Peptide Synthesis (éd. par Springer-Verlag, Berlin) **1984**, 193-194
125. **Evans B.J., Takahashi Doi J., Musker W.K.**
¹⁹F NMR Study of the Reaction of p-Fluorobenzenethiol and Disulfide with Periodate and Other Selected Oxidizing Agents
J. Org. Chem. **1990**, *55*, 2337-2344

126. **Sharma H.L., Sharma V.N., Mital R.L.**
 Studies on nitrophenothiazines
 Their synthesis and an explanation for the peculiar behaviour of halonitrobenzenes with *o*-aminothiophenol
 Aust. J. Chem. **1968**, *21*, 3081-3086
127. **Sharma H.L., Sharma V.N., Mital R.L.**
 Studies on the synthesis of nitrophenothiazines by smiles rearrangement behaviour of halonitrobenzenes with *o*-aminothiophenol
 Tetrahedron Letters **1967**, *17*, 1657
128. **Furniss B.S., Hannaford A.J., Smith P.W.G., Tatchell A.R.**
 VOGEL's, Textbook of Practical Organic Chemistry **1989**, Fifth Edition, 890-891
129. **March J.**
 Advanced Organic Chemistry **1992**, Fourth Edition, 1217
130. **Brown H.C., Heim P.**
 The fast reactions of primary, secondary and tertiary amides with diborane. A simple convenient procedure for conversion of amides to the correspondent amines
 J. Org. Chem. **1973**, *385*, 912-916
131. **Pelmont Jean**
 Enzymes (éd. par les Presses Universitaires de Grenoble, France) **1995**, 351
132. **Scrutton N.S., Raine A.R.C.**
 Cation- π bonding and amino-aromatic interactions in the biomolecular recognition of substituted ammonium ligands
 Biochem. J. **1996**, *319*, 1-8
133. **Trinquier M.**
 Etude conformationnelle de l'hexokinase par spectroscopie IR
 Etude d'un phénomène d'aggrégation par spectroscopie UV
 Mémoire de stage **1990**, Université Paul Sabatier, Toulouse, France
134. **Henderson G.B., Ulrich P., Fairlamb A.H., Rosenberg I., Pereira M., Sela M., Cerami A.**
 Subversive substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase :
 Alternative approach to chemotherapy of Chagas disease
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1988**, *85*, 5374-5378
135. **Kaestle K.L., Anwer M.K., Audhya T.K., Goldstein G.**
 Cleavage of esters using carbonates and bicarbonates of alkali metals: synthesis of thymopentin
 Tetrahedron Lett. **1991**, *32*, 327
136. **Coste J., Frérot E., Jouin P.**
 Coupling N-Methylated Amino Acids Using PyBrop and PyClop
 Halogenophosphonium Salts : mechanism and Fields of Application
 J. Org. Chem. **1994**, *59*, 2437-2446
137. **Kim M.H., Patel D.V.**
 "Bop" as a reagent for mild and efficient preparation of esters
 Tetrahedron Lett. **1994**, *35*, 31, 5603-5606

138. **Hancock J.E.H., Linstead R.P.**
2-Dicarboxylic Acids. Positional Isomerides Derived from Methylsuccinic Acid ;
with a Note on the Rearrangement of Unsymmetrical Compounds of this Type
J. Chem. Soc. **1953**, 3490
139. **Furniss B.S., Hannaford A.J., Smith P.W.G., Tatchell A.R.**
VOGEL's, Textbook of Practical Organic Chemistry (Fifth Edition, éd. par John
Wiley & Sons, Inc., New York) **1989**, 692-693
140. **Melissaris A.P., Litt M.H.**
Economical and Convenient Synthesis of *p*-Ethylbenzoic Acid and *p*-
Ethynylbenzoyl Chloride
J. Org. Chem. **1992**, *57*, 6998-6999
141. **Bauman J.G., Hawley R.C., Rapoport J.**
J. Org. Chem. **1984**, *49*, 20, 3791
142. **Bodansky M., Bodansky A.**
The Practice of Peptide Synthesis (éd. par Springer-Verlag, Berlin) **1984**, 91 et
96-97
143. **Pop I.E., Deprez B., Tartar A.**
Versatile Acylation of *N*-Nucleophiles using a New polymer-Supported
1-Hydroxybenzotriazole
J. Org. Chem. **1997**, *62*, 2594-2603
144. **Szczepankiewicz B.G., Heathcock C.H.**
Total Synthesis of Diplamine, a Cytotoxic Pyridoacridine Alkaloid from a Pacific
Tunicat
J. Org. Chem. **1994**, *59*, 13, 3512-3513
145. **Mylari B.L., Carty T.J., Moore P.F., Zembrowski W.J.**
1,2-Dihydro-1-oxopyrrolo[3,2,1-*kl*]phenothiazine-carboxamides and Congeners,
Dual Cyclooxygenase/5-Lipoxygenase Inhibitors with Antiinflammatory Activity
J. Med. Chem. **1990**, *33*, 7, 2019-2024
146. **Yazawa H., Tanaka K., Kariyone K.**
The reaction of carboxylic esters with boron tribromide a convenient method for
the synthesis of amides and transesterification
Tetrahedron Lett. **1974**, 3995
147. **Basset H.L., Thomas C.R.**
The Bodroux Reaction
J. Chem. Soc. **1954**, 1188
148. **Minabe M., Yoshida M., Takayanagi T.**
A Facile Synthesis of 4H-Cyclopenta[*def*]phenanthrene
Bull. Chem. Soc. Jpn. **1988**, *61*, 995-996
149. **Effenberg F., Drauz K., Förster S., Müller W.**
Darstellung von Aminosäuren aus Halogencarbonsäure-alkyl-estern mit
Alkalimetallcyanaten
Chem. Ber. **1981**, *114*, 173

150. **Bartolomev D., Stocks M.J.**
Intramolecular Cyclisation-N-Dealkylation of Azetidine-3-Acetic acids
Tetrahedron Lett. **1991**, 32, 36, 4799-4800
151. **Newkome G.R., Arai S., Fronczek F.R., Moorefield C.N., Lin X., Weis C.D.**
Synthesis of Functionalized Cascade Cores : Tetrakis(ω -bromoalkyl)methanes
J. Org. Chem. **1993**, 58, 898-903
152. **Gmeiner P.**
General Synthesis of Enantiomerically Pure- β -Amino-Acids
Tetrahedron Lett. **1990**, 31, 40, 5717-5720
153. **Erion M.D., Niwas S., Rose J.D., Anathan S., Allen M., Secrist III J.A., Sudhakar Babu Y., Bugg C.E., Guida W.C., Ealick S.E., Montgomery J.A.**
Structured-Based Design of Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase.
9-Arylmethyl Derivatives of 9-Deazaguanine Substitued on the Methylene Group
J. Med. Chem. **1993**, 36, 3771-3783
154. **Blanchard-Desce M., Fosset B., Guyot F., Jullien L., Palacin S.**
Chimie Organique Expérimentale (éd. par Hermann), 325-327
155. **Danek S.K., Kelly D.P.**
Synthesis of Precursors to Model Styrene/Methyl Metacrylate Copolymer
Radicals. α , α' -Bis(methoxycarbonyl)azoalkanes
J. Org. Chem. **1991**, 56, 2031-2039
156. **Plobeck N.A., Bäckvall J.A.**
Synthesis of 2(*E*),4(*E*)-Dienamides and 2(*E*),4(*E*)-Dienoates from 1,3-Dienes *via*
2-Phenylsulfonyl 1,3-Dienes
J. Org. Chem. **1991**, 56, 4508-4512
157. **Rajeswari S., Jones R.J., Cava M.P.**
A new synthesis of amides from acyl fluorides and N-silylamines
Tetrahedron Lett. **1987**, 28, 43, 5099-5102
158. **Olah G.A., Nojima M., Kerkes I.**
Synthetic Methods and Reactions ; IV. Fluorination of Carboxylic Acids with
Cyanuric Fluoride
Synthesis **1973**, 487
159. **Bertho J.N., Loffet A., Pinel C., Reuther F., Sennyey G.**
Amino acid fluorids : their preparation and use in peptide synthesis
Tetrahedron Lett. **1991**, 32, 10, 1303-1306
160. **Kokotos G., Noula C.**
Selective One-Pot Conversion of Carboxylic Acids into Alcohols
J. Org. Chem. **1996**, 61, 6994-6996
161. **Carpino L.A., Sadat-Aalae D., Chao H. G., De Selms R.H.**
(9-Fluorenylmethyl)oxy carbonyl (Fmoc) Amino Acid Fluorides. Convenient
Method New Peptide Coupling Reagents Applicable to the Fmoc/*tert*-Butyl
Strategy for Solution and Solid-Phase Syntheses
J. Am. Chem. Soc. **1990**, 112, 9651-9652

162. **Venkataraman K., Wagle D.R.**
Cyanuric Chloride : A Useful Reagent for Converting Carboxylic Acids into Chlorides, Esters, Amides and Peptides
Tetrahedron Lett. **1979**, 32, 3037-3040
163. **Greene T.W., Wuts P.G.M.**
Protective Groups in Organic Chemistry (éd. par John Wiley & Sons, Inc., USA)
1991, 327-330
164. **Carpino L.A., Han G.Y.**
The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group
J. Org. Chem. **1972**, 37, 22, 3404-3409
165. **Carpino L.A., Sadat-Aalae D., Beyermann M.**
Tris(2-aminoethyl)amine as a Substitute for 4-(Aminomethyl)piperidine in the Fmoc/Polyamine Approach to Rapid Peptide Synthesis
J. Org. Chem. **1990**, 55, 1673-1675
166. **Cathala B., Raouf-Benchekroun K., Galaup C., Picard C., Cazaux L., Tisnès P.**
Synthesis and Structure of Macrocyclic Dioxo-, Dithia-, Diazatetralactams and Derivatives
Tetrahedron **1996**, 52, 29, 9793-9804
167. **Greene T.W., Wuts P.G.M.**
Protective Groups in Organic Chemistry (éd. par John Wiley & Sons, Inc., USA)
1991, 318-319
168. **Weber P.C.,**
Science **1989**, 243, 85-88
169. **Livnah O.,**
Proc. Natl. Acad. Sci. **1993**, 90, 5076-5080
170. **Greer S., Perham R.N.**
Glutathione reductase from *Escherichia coli* : cloning and sequence analysis of the gene and relationship to other flavoprotein disulfide oxidoreductases
Biochemistry **1986**, 25, 2736-2742
171. **Tabor S., Richardson C.C.**
A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1985**, 82, 1074-1078
172. **Craig D.A.**
The Cheng-Prusoff relationship : something lost in the translation
Trends Pharmacol. Sci. **1993**, 14, 89-91
173. **Hirumi H., Hirumi K.**
Parasitology **1991**, 102, 225
174. **Neal R.A., Croft S.L.J.**
Antimicrob. Chemother. **1976**, 14, 463