



HAL
open science

Conception et Synthèse d'Hétérocycles Azotés Polyfonctionnalisés Biologiquement Actifs: Des Acridines aux Quinazolines

Walid Zeghida

► **To cite this version:**

Walid Zeghida. Conception et Synthèse d'Hétérocycles Azotés Polyfonctionnalisés Biologiquement Actifs: Des Acridines aux Quinazolines. Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00221136v1

HAL Id: tel-00221136

<https://theses.hal.science/tel-00221136v1>

Submitted on 28 Jan 2008 (v1), last revised 31 Jan 2008 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : Chimie-Biologie

Présentée par

Walid ZEGHIDA

**CONCEPTION ET SYNTHÈSE D'HÉTÉROCYCLES AZOTES
POLYFONCTIONNALISÉS BIOLOGIQUEMENT ACTIFS :
DES ACRIDINES AUX QUINAZOLINES**

Directeur de Thèse : **Dr. Martine DEMEUNYNCK**

Soutenue le 30 novembre 2007, devant le jury composé de :

| | |
|---|---------------|
| Dr. Daniel Dauzonne (CNRS, UMR 176, Institut Curie, Paris) | Rapporteur |
| Dr. Jacques Fahy (Pierre Fabre Médicament, Toulouse) | Rapporteur |
| Dr. Alain Croisy (INSERM, Institut Curie, Orsay) | Examinateur |
| Dr. Alice Kanazawa (UMR 5250, DCM, Grenoble) | Examinateur |
| Dr. Martine Demeunynck (CNRS, UMR 5250, DCM, Grenoble) | Examinateur |
| Pr. Pascal Dumy (UMR 5250, DCM, Grenoble) | Membre invité |

Thèse préparée au Département de Chimie Moléculaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : Chimie-Biologie

Présentée par

Walid ZEGHIDA

**CONCEPTION ET SYNTHÈSE D'HÉTÉROCYCLES AZOTES
POLYFONCTIONNALISÉS BIOLOGIQUEMENT ACTIFS :
DES ACRIDINES AUX QUINAZOLINES**

Directeur de Thèse : **Dr. Martine DEMEUNYNCK**

Soutenue le 30 novembre 2007, devant le jury composé de :

| | |
|---|---------------|
| Dr. Daniel Dauzonne (CNRS, UMR 176, Institut Curie, Paris) | Rapporteur |
| Dr. Jacques Fahy (Pierre Fabre Médicament, Toulouse) | Rapporteur |
| Dr. Alain Croisy (INSERM, Institut Curie, Orsay) | Examineur |
| Dr. Alice Kanazawa (UMR 5250, DCM, Grenoble) | Examineur |
| Dr. Martine Demeunynck (CNRS, UMR 5250, DCM, Grenoble) | Examineur |
| Pr. Pascal Dumy (UMR 5250, DCM, Grenoble) | Membre invité |

Thèse préparée au Département de Chimie Moléculaire

Remerciements

Cette thèse a été effectuée au sein du Département de Chimie Moléculaire (DCM), dans l'équipe Ingénierie et Interaction Biomoléculaires (I2BM) dirigée par le Professeur Pascal Dumy. Je tiens à le remercier de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir donné les moyens de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance aux membres du jury : Monsieur Alain Croisy, pour avoir accepté de présider ce jury de thèse; Messieurs Daniel Dauzonne et Jacques Fahy pour avoir accepté la lourde tâche de juger ce travail ainsi que Madame Kanazawa pour avoir participé à ce jury. Merci pour tous vos commentaires qui m'ont permis d'enrichir ce manuscrit.

J'exprime ma profonde gratitude aussi à Mademoiselle Martine Demeunynck pour m'avoir encadré durant ces trois années. Tes précieux conseils pour la thèse et l'après-thèse ont toujours tenu une place extrêmement importante. Merci encore pour ton amitié, ta gentillesse, ta disponibilité et tout ce que tu m'as appris.

Je remercie toutes les personnes qui ont collaboré aux différents projets :

- Monsieur Alain Croisy, Madame Danielle Carrez et Monsieur Jean-Luc Guerquin-Kern de l'Institut Curie à Orsay.*
- Madame Amélie Lansiaux et Monsieur Paul Peixoto de l'Institut de Recherche sur le Cancer à Lille.*
- Madame Marie-Paule Teulade-Fichou et Monsieur David Monchaud de l'Institut Curie à Orsay.*
- Mademoiselle Anne Milet, Mademoiselle Carine Michel et Madame Marie-Louise Dheu-Andries de l'équipe Chimie Théorique du DCM.*

Je remercie également :

- Le ministère de la recherche pour m'avoir financé durant ces trois années.*
- Les services communs du Département de Chimie Moléculaire, en commençant par le service RMN (Sylvette, Corinne, Béatrice et Catherine) pour leurs écoutes et leurs conseils, le service informatique (Pedro, Denis), le service Microanalyse (Elisabeth,*

Solange et Martine) ainsi que le service Spectrométrie de Masse (Merci au passage à Monsieur Yves Gimbert pour les masses Haute Résolution).

- Tous mes collègues de l'équipe I2BM : Olivier, Eric, Miguel, Julian, Nico, Didier, Nathalie, William, Gunnar, Sumana, Pascale, Muriel, Jeff, Laurent (merci pour tous tes conseils et les discussions très enrichissantes que l'on a pu avoir) et plus particulièrement Sabine (un grand merci pour ton aide et tes précieux conseils).

- Elisabeth, Régine et Véronique pour leur efficacité et leurs nombreux services rendus toujours dans la bonne humeur.

- Stéphane et Jérémie de l'équipe Chimie Inorganique Redox du DCM (merci pour les calculs de pKa).

Sans oublier bien sûr, mes camarades avec qui j'ai passé de très bons moments : Stéphanie, Mathilde, Myriam, Sophie, Julien, Pierre, Mathieu, Vincent (Forza Juve !!) et Nabil (exactement !!).

Et enfin un grand merci à tous les membres du Département de Chimie Moléculaire que j'ai pu côtoyé : Sandrine (merci de m'avoir présenté ce laboratoire et pour tous tes conseils avisés), Fred, Pierre-Yves, Bernard, Jean-Noël et tous les autres.....

Je dédie très sincèrement ce manuscrit de thèse à mes parents, ma famille et plus particulièrement à ma mère, qui m'a toujours aidé, soutenu et encouragé tout au long de mes études. Je ne vous remercierai jamais assez....

A ma mère,

A mon père,

| | |
|--|------------|
| PARTIE B/ SYNTHÈSES | 52 |
| B-1. Synthèse des aminoalcools comportant un motif guanidine. | 52 |
| 1. <i>Rappels bibliographiques sur la synthèse du motif guanidine.</i> | 52 |
| 1.1. <i>Présentation générale des trois voies de synthèse.</i> | 53 |
| 1.2. <i>Choix de la méthode de synthèse: via une thiourée N-substituée-N'-Z activée par l'EDCI.</i> | 57 |
| 1.3. <i>Synthèse de la thiourée N-substituée-N'-Z : choix de l'isothiocyanate Z-NCS.</i> | 60 |
| 1.4. <i>Conclusion.</i> | 64 |
| 2. <i>Choix de la Stratégie de synthèse.</i> | 65 |
| 3. <i>Voie A.</i> | 71 |
| 3.1. <i>Synthèse du motif guanidine.</i> | 71 |
| 3.1.1. <i>Synthèse des thiourées <u>8</u> et <u>9</u>.</i> | 72 |
| 3.1.2. <i>Synthèse des guanidines protégées <u>10</u> et <u>11</u>.</i> | 73 |
| 3.2. <i>Synthèse du motif oxazine à partir de la thiourée <u>8</u>.</i> | 75 |
| 3.3. <i>Synthèse du motif oxazine à partir de la guanidine <u>10</u>.</i> | 76 |
| 3.4. <i>Essai de synthèse du motif oxazine avec un acide de Lewis.</i> | 78 |
| 3.5. <i>Conclusion.</i> | 79 |
| 4. <i>Voie B.</i> | 80 |
| 4.1. <i>Généralités.</i> | 80 |
| 4.2. <i>Synthèse de l'intermédiaire-clé par la voie B1: Introduction du groupement chlorométhoxycarbone.</i> | 85 |
| 4.3. <i>Synthèse de l'intermédiaire-clé par la voie B2.</i> | 86 |
| 4.3.1. <i>Protection de l'amine libre de la proflavine mono-acétylée <u>6</u>.</i> | 86 |
| 4.3.2. <i>Synthèse du motif oxazine.</i> | 90 |
| 4.3.3. <i>Introduction d'un groupement éthoxycarbone sur l'azote de l'oxazine <u>21</u>.</i> | 93 |
| 4.3.4. <i>Synthèse de l'intermédiaire-clé à partir du composé <u>22</u>.</i> | 94 |
| 4.3.5. <i>Schéma définitif de synthèse : Voie B2-1'.</i> | 102 |
| 4.4. <i>Synthèse du motif guanidine à partir de l'intermédiaire-clé <u>24</u>.</i> | 105 |
| 4.4.1. <i>Synthèse de la thiourée <u>29</u>.</i> | 105 |
| 4.4.2. <i>Synthèse des guanidines protégées <u>30-32</u>.</i> | 105 |
| 4.5. <i>Ouverture du cycle oxazinone : obtention des amino-alcools <u>33-35</u>.</i> | 106 |
| 5. <i>Conclusion.</i> | 108 |
| B-2. Synthèse de l' aminoalcool <u>36</u>. | 108 |

| | |
|---|------------|
| B-3. Synthèse de l'aminoalcool iodé <u>41</u>. | 109 |
| 1. <i>Choix de la Stratégie de synthèse.</i> | 109 |
| 2. <i>Iodation et hydrolyse de la fonction acétamide de la proflavine mono-acétylée <u>6</u>.</i> | 111 |
| 3. <i>Introduction d'un groupement éthoxycarbonyle sur l'amine du composé <u>37</u>.</i> | 113 |
| 4. <i>Synthèse du motif oxazinone.</i> | 113 |
| 5. <i>Ouverture du cycle oxazinone : obtention de l'aminoalcool <u>41</u>.</i> | 114 |
| PARTIE C/ ETUDES BIOLOGIQUES | 115 |
| C-1. Résultats biologiques des composés <u>33</u>, <u>34</u> et <u>36</u>. | 116 |
| 1. <i>Activité cytostatique.</i> | 116 |
| 2. <i>Interactions avec l'ADN.</i> | 118 |
| 2.1. <i>Détermination de la température de fusion (T_m).</i> | 118 |
| 2.2. <i>Tests enzymatiques (topoisomérases).</i> | 119 |
| 3. <i>Distribution cellulaire.</i> | 122 |
| 4. <i>Conclusion.</i> | 125 |
| C-2. Résultats biologiques du composé <u>41</u>. | 126 |
| 1. <i>Activité cytostatique.</i> | 126 |
| 2. <i>Distribution cellulaire.</i> | 127 |
| 3. <i>Conclusion.</i> | 130 |
| CHAPITRE II. SYNTHÈSE DE GUANIDINOACRIDINES ET ÉTUDE DE L'INFLUENCE DU MOTIF GUANIDINE SUR LE PKA DE L'ACRIDINE. | 132 |
| PARTIE A/ INTRODUCTION | 133 |
| PARTIE B/ SYNTHÈSES | 133 |
| 1. <i>Synthèse des guanidinoacridines <u>46</u>, <u>47</u> et <u>48</u>.</i> | 133 |
| 1.1. <i>Synthèse des guanidines protégées <u>44</u>, <u>45</u> et <u>10</u>.</i> | 134 |
| 1.2. <i>Déprotection des guanidinoacridines <u>44</u>, <u>45</u> et <u>10</u>.</i> | 136 |
| PARTIE C/ CALCUL DES PKA | 138 |
| 1. <i>Données bibliographiques et calculs théoriques.</i> | 138 |
| 2. <i>Calculs expérimentaux.</i> | 141 |
| 3. <i>Conclusion.</i> | 142 |

| | |
|---|------------|
| CHAPITRE III. SYNTHÈSE ET ÉTUDE BIOLOGIQUES DE NOUVEAUX HÉTÉROCYCLES COMPORTANT UN MOTIF QUINAZOLINONE. | 147 |
| PARTIE A/ INTRODUCTION | 149 |
| 1. <i>Données bibliographiques.</i> | 149 |
| PARTIE B/ SYNTHÈSES | 155 |
| 1. <i>Synthèse d'un dérivé de 2-amino-4(3H)-quinazolinone à partir de la 5-aminophénantroline.</i> | 155 |
| 1.1. <i>Préparation de la guanidinophénantroline <u>51</u>.</i> | 156 |
| 1.2. <i>Cyclisation de la guanidinophénantroline <u>51</u>.</i> | 157 |
| 1.3. <i>Optimisation de la réaction de cyclisation.</i> | 158 |
| 2. <i>Synthèse de dérivés de 2-amino-4(3H)-quinazolinone à partir des guanidinoacridines <u>44</u>, <u>45</u> et <u>10</u>.</i> | 160 |
| 3. <i>Extension de la nouvelle méthodologie à d'autres amines aromatiques et hétérocycliques.</i> | 163 |
| 3.1. <i>Préparation des dérivés guanidines <u>56</u>, <u>57</u> et <u>58</u>.</i> | 164 |
| 3.2. <i>Cyclisation des dérivés guanidines <u>56</u>, <u>57</u> et <u>58</u>.</i> | 165 |
| 4. <i>Conclusion.</i> | 167 |
| PARTIE C/ ÉTUDES BIOLOGIQUES | 167 |
| 1. <i>Activité cytostatique.</i> | 168 |
| 2. <i>Test sur les G-quaduplexes.</i> | 170 |
| 2.1. <i>Le test « G4-FID ».</i> | 170 |
| 2.2. <i>Résultats du test « G4-FID ».</i> | 171 |
| CONCLUSION GÉNÉRALE | 175 |
| PARTIE EXPÉRIMENTALE | 181 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 225 |

| | |
|------------------------|--|
| Ac | Acétyle |
| AcOEt | Acétate d'Ethyle |
| AcOH | Acide acétique |
| ADN | Acide DésoxyriboNucléique |
| Alloc | Allyloxycarbonyle |
| aq. | aqueux |
| ARN | Acide RiboNucléique |
| Boc | <i>tert</i> -Butoxycarbonyle |
| CCM | Chromatographie sur Couche Mince |
| CDK | Cyclin Dependant-Kinase |
| CLHP | Chromatographie Liquide Haute Performance |
| DCA | DiChloroAcétate |
| DCI | Desorption Chemical Ionisation |
| DBU | 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-ène |
| DFT | Density Functional Theory |
| DIEA | <i>N,N</i> -DiIsopropylEthylAmine |
| DMF | <i>N,N</i> -DiMéthylFormamide |
| DMF anh. | <i>N,N</i> -DiméthylFormamide anhydre |
| DMSO | DiMéthylSulfOxide |
| EDCI | Ethyl- <i>N</i> -diméthylamino-propyl-carbodiimide |
| éq. | équivalent molaire |
| ESI | ElectroSpray Ionisation |
| EtOH | Ethanol |
| EtOH abs. | Ethanol absolu |
| Fmoc | 9-fluorénylméthoxycarbonyle |
| HCl | Acide chlorhydrique |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus |
| IC₅₀ | Concentration d'inhibition de 50% |
| MeOH | Méthanol |
| Msoc | acide méthanesulfonique |
| MsOH | Méthylsulfonylethoxycarbonyle |
| Pyr. | Pyridine |
| RMN | Résonance Magnétique Nucléaire |

| | |
|-------------|--------------------------------------|
| SEar | Substitution Electrophile aromatique |
| SIMS | Secondary Ion Mass Spectrometry |
| t.a. | température ambiante |
| TFA | Acide trifluoroacétique |
| THF | TétraHydroFuranne |
| Tm | Température de fusion |
| Topo | Topoisomérase |
| Troc | 2,2,2-Trichloroéthoxycarbonyle |
| UV | Ultra Violet |
| Vis | Visible |

Introduction générale

1. Généralités sur le cancer.

Le cancer est le résultat de la prolifération anarchique de cellules tumorales de l'un de nos organes ou tissus. Les tumeurs qui en résultent sont dites malignes. Leurs cellules peuvent essayer dans l'organisme. Quand une telle cellule arrive dans un organe à distance, elle peut : Soit être acceptée et se multiplier en donnant une tumeur « fille », cette tumeur secondaire est appelée métastase de la tumeur de départ, dite primitive ; soit être détruite par le système de défense immunitaire.

Si rien n'arrête la prolifération de la cellule cancéreuse, celle-ci va se diviser avec un rythme de doublement moyen compris entre 60 et 100 jours. La longue vie cachée du cancer et la diminution des défenses immunitaires avec le temps expliquent l'augmentation statistique de l'incidence des cancers au cours de la vie. C'est pourquoi la cancérologie se trouve aujourd'hui confrontée à un double enjeu : d'une part, le diagnostic doit gagner en précocité et de nouveaux outils doivent être développés dans ce sens et, d'autre part, l'arsenal thérapeutique dont nous disposons doit gagner en potentialité, diversité et spécificité tout en limitant les effets secondaires liés à l'utilisation de produits toxiques pour l'organisme.

Le cancer est un problème majeur de santé publique dans l'ensemble de l'Europe; il est la première cause de mortalité chez les hommes et chez les femmes.

L'agence de Recherche sur le Cancer de l'Organisation mondiale de la Santé estime qu'en 2006, il y avait 3,2 millions de nouveaux cas de cancer (par rapport à 2,9 millions en 2004) et 1,7 millions de décès liés au cancer dans la totalité de l'Europe. Sur ces nouveaux cas, 53% affectaient les hommes et 47% les femmes, et sur les décès par cancer, 56% touchaient les hommes et 44% les femmes¹.

Le Dr Peter Doyle, directeur du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), à Lyon, publiait en 2005 un rapport² dans lequel il prévenait qu'en dépit d'une meilleure prévention et de meilleures traitements, l'Europe faisait face à une augmentation majeure de la prévalence du cancer, principalement en raison du vieillissement de la population.

¹ Ferlay, J.; Autier, P.; Boniol, M.; Heanue, M.; Colembet, M.; Boyle, P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology*. **2006**, 18, 581-592.

² Boyle, P.; Ferlay, J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Annals of Oncology*. **2005**, 16, 481-488.

Actuellement, le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué globalement, avec 429 900 nouveaux cas en 2006 (13,5% de tous les cas de cancer), avant le cancer du poumon. Il est suivi par le cancer colorectal (412 900 cas soit 12,9%) et le cancer du poumon (386 300 cas soit 12,1%) qui est le plus meurtrier de tous avec 334 800 décès en 2006.

2. Mode d'action des principaux médicaments.

Les traitements du cancer se sont développés depuis un demi-siècle et ont vécu plusieurs révolutions. Globalement, les cibles moléculaires jusqu'en 1990 étaient essentiellement les nucléotides, l'ADN, l'ARN, la réplication et la transcription.

Ces quinze dernières années, l'identification de nouvelles cibles a permis le développement de nouveaux médicaments visant des protéines nucléaires, cytoplasmiques ou membranaires impliquées dans les cascades de la transduction des signaux, des récepteurs membranaires aux protéines du cycle cellulaire.

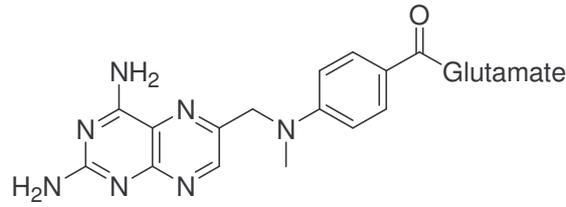
2.1. Les traitements traditionnels.

On distingue plusieurs classes de médicaments utilisés en chimiothérapie anticancéreuse, selon leurs modes d'action et leurs cibles cellulaires. Nous allons présenter les classes les plus importantes.

2.1.1. Les antimétabolites.

Ils inhibent la synthèse des acides nucléiques, première étape nécessaire à toute multiplication cellulaire. On peut classer ces antimétabolites en deux sous-classes. :

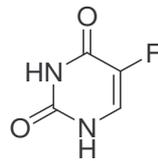
- Les inhibiteurs d'enzymes indispensables à la vie cellulaire avec, comme exemple, le méthotrexate (Figure 1). Ce dernier inhibe la voie métabolique de l'acide folique indispensable pour la synthèse des bases nucléiques (uridine et thymidine) en se recombinaut à la dihydrofolate réductase.



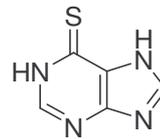
Méthotrexate

Figure 1

- Les substances leurres : qui en raison d'une structure chimique semblable à celle de composants métaboliques intermédiaires (purine et pyrimidine), sont acceptées comme substrats, et inhibent la biosynthèse des acides nucléiques. On peut citer le 5-fluorouracile (ou fluorouracile), un anti-pyrimidinique et la 6-mercapto-purine, un anti-purique (Figure 2).



5-Fluoro-Uracile



6-Mercapto-Purine

Figure 2

2.1.2. Les alkylants.

Les agents alkylants induisent la formation de liaisons covalentes avec, entre autres, les sites nucléophiles des bases nucléiques de l'ADN (mais aussi avec les groupes phosphates, voire les protéines associées à l'ADN). Ils sont capables de générer des dommages structuraux et fonctionnels importants, pouvant conduire à la mort cellulaire programmée par « saturation » des systèmes enzymatiques de réparation³.

Le mode d'action des agents alkylants est basé sur la (les) réaction(s) entre une ou des fonction(s) électrophile(s) de la drogue et un ou des sites nucléophiles des bases nucléiques de l'ADN.

On distingue les alkylants mono-fonctionnels, comme le cyclophosphamide (Endoxan[®]), et les agents bi-fonctionnels pontant les deux brins d'ADN, comme le cisplatine (Cisplatyl[®]) (Figure 3). Appartiennent également à cette classe de molécules les nitrosourées comme la carmustine (BICNU[®]), et la mitomycine (Amétycine[®]) (Figure 3).

³ Berthet, N.; Boturyn, D.; Constant, J.-F. DNA repair inhibitors. *Exp. Opin. Ther. Patents* **1999**, 9, 401-415.

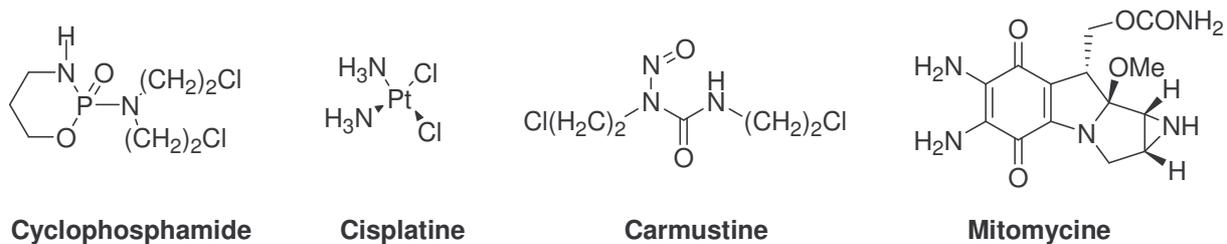


Figure 3

2.1.3. Les intercalants.

Le mécanisme d'action initial supposé de cette famille de produits est une intercalation entre les paires de bases de l'ADN du fait de leur structure plane. Certains sont des dérivés de la famille des anthracyclines comme la doxorubicine (Adriamycine®), daunorubicine (daunimycine, Cerubidine®), épirubicine (Farmorubicine®). La mitoxantrone (Novantrone®), l'actinomycine D (Dactinomycine®) et l'amsacrine (Amsidine®) appartiennent aussi à cette classe des composés intercalants (Figure 4).

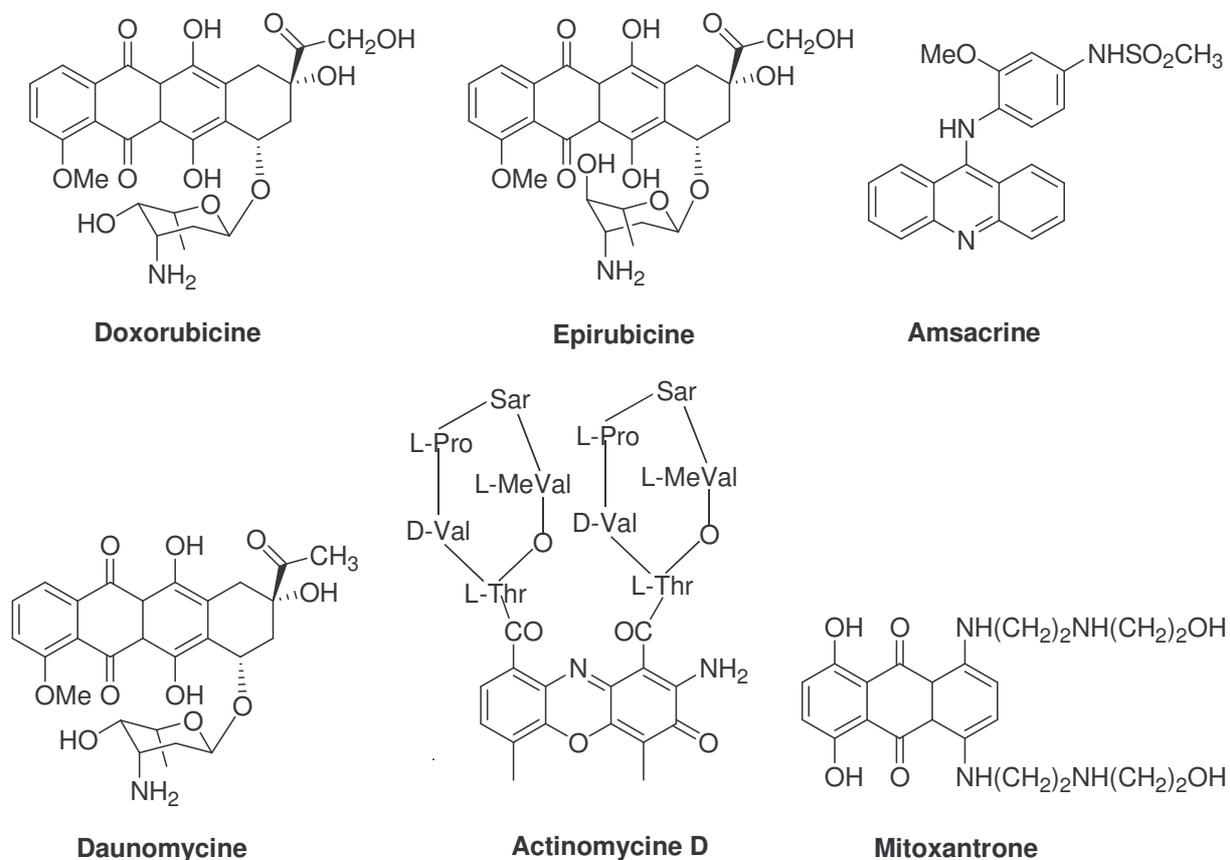


Figure 4

En fait, il semble que l'intercalation seule ne puisse pas rendre compte de l'activité biologique de ces molécules. Le mécanisme d'action le plus probable des intercalants implique des enzymes, comme par exemple, les topoisomérases.

2.1.4. Les inhibiteurs de topoisomérases.

Les topoisomérases sont des enzymes nucléaires essentielles pour la régulation de la topologie de l'ADN. Elles interviennent en se liant de manière transitoire avec l'ADN.

Selon le mode de fonctionnement de ces enzymes, on distingue :

- Les topoisomérases I qui coupent un seul brin d'ADN permettant le relâchement des brins d'ADN. Il existe actuellement deux médicaments capables d'interférer avec ce processus, l'irinotécan (Campto[®]) et le topotécan (Hycamtin[®]) (Figure 5).

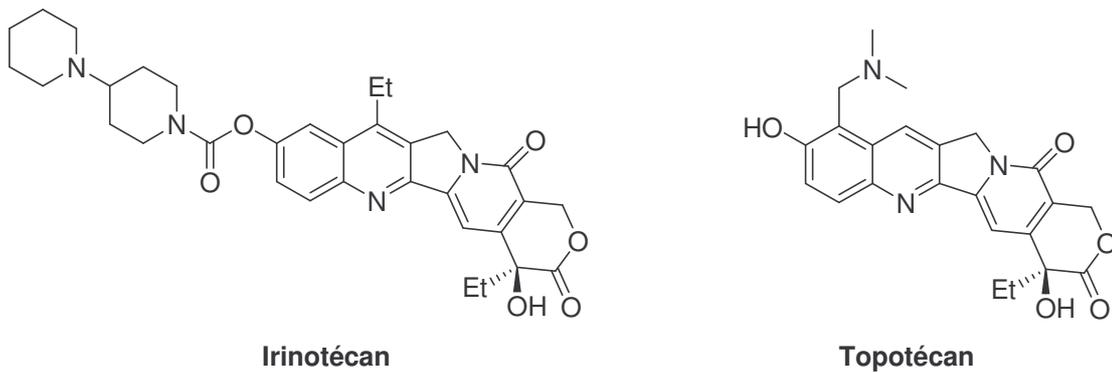


Figure 5

L'action des anti-topoisomérases de type I consiste à empêcher la reconstitution du brin d'ADN après la coupure, inhibant ainsi la synthèse correcte de l'ADN.

- Les topoisomérases II, ATP dépendantes, qui catalysent la coupure simultanée de deux brins d'ADN et le passage d'une hélice d'ADN à travers l'autre, ce qui assure le déenroulement de la double hélice d'ADN. La présence d'une molécule agissant sur la topoisomérase II aboutit à la rupture des brins d'ADN, puisque ceux-ci ne peuvent plus être ressoudés. Parmi les nombreuses molécules agissant sur la Topo II, on peut citer le VP-16 ou l'étoposide (Vepeside[®]) et le VM-26 ou téniposide (Vehem[®]) appartenant à la famille des épipodophyllotoxines (Figure 6).

2.1.6. Les poisons du fuseau cellulaire.

Ces substances agissent pendant la mitose elle-même, quand les chromosomes dédoublés doivent migrer le long des tubules du fuseau cellulaire vers un de ses pôles, avant la séparation des cellules filles. Elles peuvent être classées en deux groupes selon leur mécanisme d'action :

- les inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline, qui empêchent la formation du fuseau. On peut citer la vinblastine (vincalécoblastine), la vincristine, la vindésine ou encore la vironelbine (Navelbine[®], développée par la société Pierre Fabre) (Figure 8).

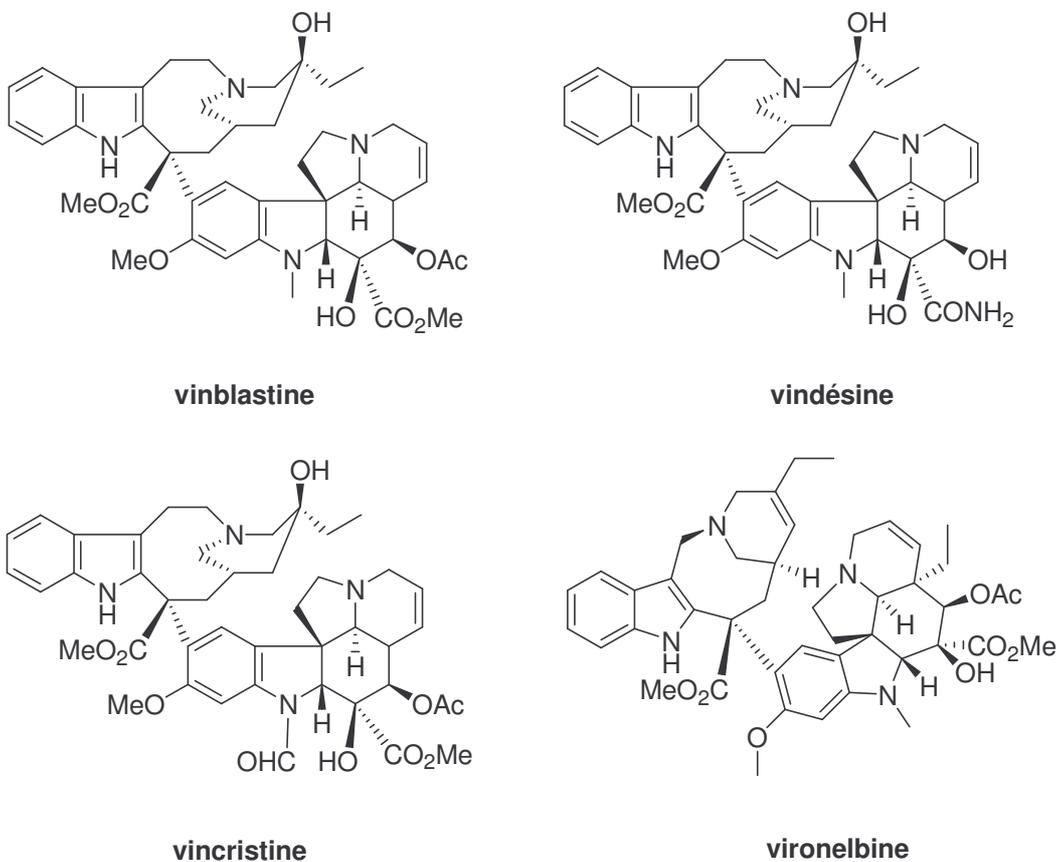


Figure 8

- Les inhibiteurs de la dépolymérisation. Ainsi les taxanes entraînent un rassemblement et une stabilisation des microtubules cellulaires, normalement en équilibre avec la tubuline soluble. Un certain nombre de fonctions cellulaires sont ainsi perturbées: mitose, maintenance de la morphologie cellulaire, formation des neurones. Deux drogues sont aujourd'hui utilisés en clinique : le paclitaxel (Taxol[®]) et le docétaxel (Taxotère[®]) (Figure 9).

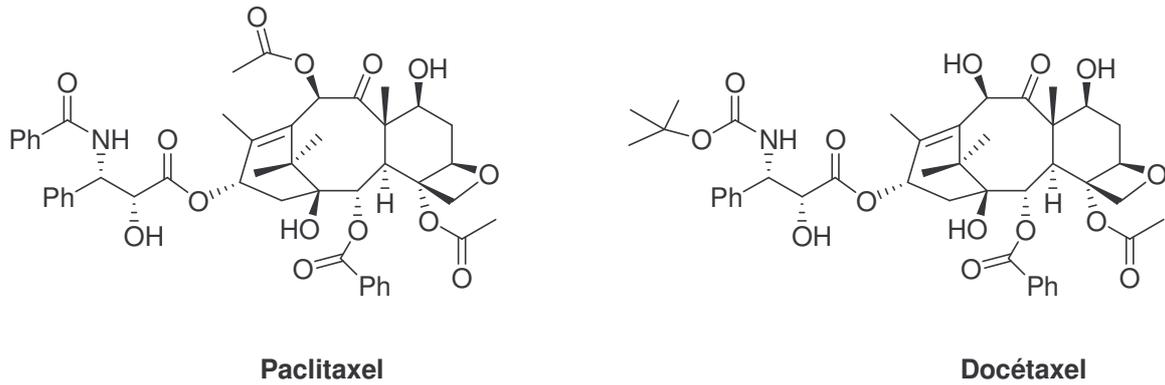


Figure 9

2.1.7. Conclusion.

L'inconvénient majeur de ces traitements est leur manque de sélectivité vis-à-vis des cellules malignes. Les effets secondaires, observés sur les tissus sains, sont dus à l'effet des drogues sur les cellules qui se multiplient rapidement, notamment les cellules sanguines, les cellules de la moelle osseuse, des cheveux, de la peau, des muqueuses et de la bouche. Ils limitent l'utilisation de posologies suffisamment élevées pour éliminer toutes les cellules tumorales de l'organisme. Par ailleurs, les phénomènes de résistance, spontanée ou acquise, de certaines tumeurs aux drogues utilisées en chimiothérapie limitent leur efficacité thérapeutique. Il apparaît donc essentiel de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces et de mettre au point des agents anti-cancéreux ciblés, adaptés au phénotype tumoral. Ceci de façon à diminuer les effets indésirables des chimiothérapies sur les organes sains, tout en les concentrant dans les tissus à détruire.

Actuellement de nombreux analogues de médicaments déjà utilisés en clinique ont été développés. Certains dérivés présentent une meilleure efficacité et une toxicité différente par rapport au médicament référent. A titre d'exemples, on peut citer la capécitabine (Xeloda[®], développée par la société Roche), une prodrogue du fluorouracile ou encore l'Oxaliplatine[®], un dérivé du cisplatine, qui est actif sur les tumeurs digestives sans toxicité rénale, contrairement au cisplatine⁴ lui-même (Figure 10).

⁴ O' Dwyer, P. J.; Johnson, S. W. Current status of oxaliplatin in colorectal cancer. *Semin. Oncol.* **2003**, 30, 78-87.

Une attention particulière a été portée ces dernières années au ciblage moléculaire de ces régulateurs, plus particulièrement aux inhibiteurs⁷ de CDK. Plusieurs molécules de structures chimiques variées sont connues aujourd'hui pour être des inhibiteurs de CDK, comme le flavopiridol ou la roscovitine (Figure 11) qui ont été testés en clinique. Ces molécules agissent par inhibition compétitive de la fixation de l'ATP (substrat naturel des CDK).

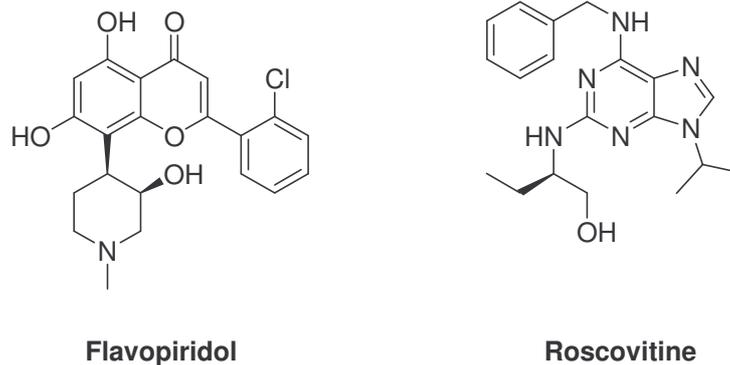


Figure 11

➤ Le protéasome

Le protéasome est un complexe enzymatique, dont le rôle principal est la dégradation de protéines qui interviennent dans la régulation du cycle cellulaire. Ainsi, un grand nombre de protéines intracellulaires peuvent être des substrats pour le protéasome, en particulier celles impliquées dans l'apoptose, la transcription de facteurs de croissance, la production de récepteurs de facteurs de croissance et de molécules de signalisation.

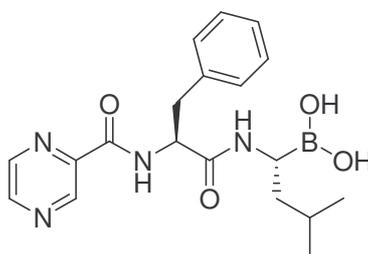
Un défaut de régulation de ces protéines-clés peut stimuler la prolifération cellulaire, la croissance tumorale, l'angiogénèse et favoriser la survenue de métastases.

L'inhibition du protéasome⁸, dont l'une des conséquences est de sensibiliser les cellules malignes à l'apoptose, a attiré depuis ces dernières années une très grande attention comme cible potentielle de nouvelles thérapies ciblées.

⁷ a) Knockaert, M.; Greengard, P.; Meijer, L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependant kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, 23, 417, b) Ruetz, S.; Fabbro, D.; Zimmerman, J.; Meyer, T.; Gray, N. Chemical and biological profile of dual Cdk1 and Cdk2 inhibitors. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer. Agents* **2003**, 3, 1-14.

⁸ a) L'Allemain, G. Actualités sur...l'inhibiteur du protéasome PS341. *Bull. Cancer* **2002**, 89, 29-30, b) Vorhees, P. M.; Dees, E. C.; O'Neil, B.; Orłowski, R. Z. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **2003**, 9, 6316-6325.

Le bortezomib (Velcade®) fut le premier médicament inhibant le protéasome, à être commercialisé (Figure 12). Il est utilisé en monothérapie dans le traitement du myélome multiple.



Bortezomib

Figure 12

2.2.2. Les médicaments inducteurs de l'apoptose.

L'espace membranaire de la mitochondrie contient des molécules solubles dont la libération vers le noyau ou le cytoplasme aboutit à la mort cellulaire ou apoptose. La perméabilité de la mitochondrie est régulée par des protéines de la famille bcl-2. Le démantèlement des mécanismes associés à ces régulations a conduit au développement de molécules destinées à restituer ou induire la sensibilité à l'apoptose des cellules cancéreuses. C'est le cas d'oligonucléotides antisens⁹ de bcl-2, comme le Genasense® développé par la société Genta, dont les résultats en phase 2 étaient encourageants mais qui n'a pas obtenu d'autorisation de mise sur le marché.

Plus récemment, de nouvelles drogues ont démontré leur impact mitochondrial comme le trioxyde d'arsenic (actif dans la leucémie promyélocytaire).

2.2.3. Les agents bloquant la transduction des signaux des récepteurs membranaires vers leurs cibles nucléaires.

Il est aujourd'hui bien établi que le cancer est une maladie liée à des changements dynamiques dans le génome et que la tumorigenèse est un processus multi-étape mettant en jeu plusieurs altérations géniques successives. Celles-ci affectent principalement les gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, dans les phénomènes d'adhérence cellulaire, ainsi que dans les processus de réparation des lésions de l'ADN.

⁹ Bettaieb, A.; Dubrez-Daloz, L.; Launay, S.; Plenchette, S.; Rebe, C.; Cathelin, S.; Solary, E. Bcl-2 proteins: targets and tools for chemosensibilisation of tumour cells. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents* **2003**, *3*, 307-318.

Les gènes impliqués dans la cancérogenèse sont habituellement classés en deux familles :

➤ Les oncogènes

Lorsqu'ils sont stimulés lors de la transformation maligne d'une cellule, ils codent pour des facteurs qui entraînent la perte du contrôle de la croissance cellulaire. Certains oncogènes codent pour des facteurs de croissance ou leur récepteurs, d'autres pour des protéines kinases cytoplasmiques, des facteurs de transcription, des protéines inductrices de l'apoptose ou encore les protéines impliquées dans les processus de réparation de l'ADN.

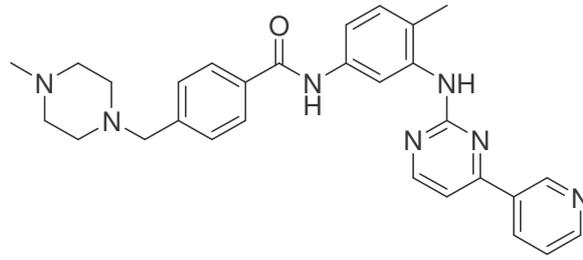
La première cible a été le protooncogène cellulaire HER2/Neu, codant pour un récepteur membranaire¹⁰ (« human epidermal growth factor receptor family »). Ce récepteur membranaire à activité tyrosine kinase est amplifié dans environ 20-30% des cancers du sein. Son ciblage par l'anticorps Herceptin[®] (développé par la société Roche) dans les tumeurs qui surexpriment HER2 a une efficacité surtout en association avec des cytotoxiques¹¹. D'autres anticorps ont été développés depuis, ciblant le récepteur de l'EGF (récepteur du facteur de croissance épithélial, HER1), ou encore les différents récepteurs des VEGF (*vascular endothelial growth factor receptor*), les récepteurs du PDGF (*platelet derived growth factor receptor*) et les récepteurs de l'IGF (*insulin like growth factor receptor*).

Une autre stratégie consiste à inhiber l'activité de ces différents récepteurs (à activité tyrosine kinase) de facteurs de croissance en interagissant avec les sites de l'ATP des kinases. Parmi les médicaments les plus prometteurs utilisant cette stratégie, on peut citer :

- L'imatinib (Glivec[®]) qui cible la kinase intracellulaire de la protéine de fusion bcr-abl dans la leucémie myéloïde chronique (Figure 13). L'inhibition de l'activité kinase aboutit à la mort des cellules ayant la kinase bcr-abl et à des rémissions de la maladie.

¹⁰ Witton, C. J.; Reeves, J. R.; Going, J. J.; Cooke, T. G.; Bartlett, J. M. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J. Pathol.* **2003**, 200, 290-297.

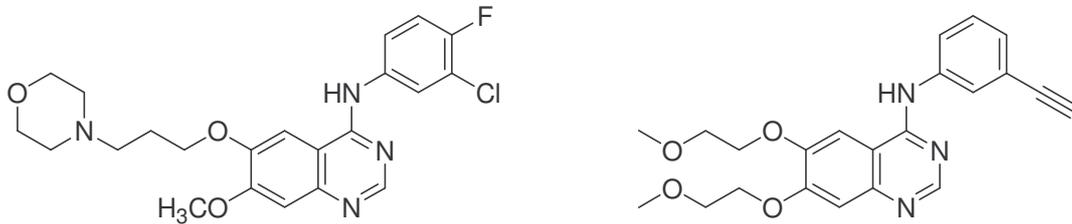
¹¹ Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.; Pegram, M.; Baselga, J.; Norton, L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* **2001**, 344, 783-792.



Imatinib

Figure 13

- Le gefitinib (Iressa[®]) et l'erlotinib (Tarceva[®]), des inhibiteurs du récepteur de l'EGF qui sont utilisés pour traiter des cancers du poumon non-à-petites cellules (Figure 14).



Gefitinib

Erlotinib

Figure 14

➤ Les gènes suppresseurs de tumeur

Ces gènes sont, à l'inverse, réprimés lors de la transformation maligne de la cellule. Le plus connu de ces gènes est le suppresseur de tumeur p53 qui code pour une protéine de 53 Kd. La forme sauvage non mutée de la protéine p53 est induite dans le cas de lésions de l'ADN et s'accompagne de l'arrêt du cycle cellulaire suivi de sa reprise en cas de réparation, ou sinon, de l'induction de la mort cellulaire (apoptose). Dans 50% des cancers ce gène suppresseur de tumeur est altéré. Les mutants de p53 perdent leur activité principale et semblent responsables de l'accumulation de lésions non réparées et d'une mutagenicité accrue.

Des tentatives thérapeutiques visent soit à réintroduire dans les cellules tumorales une protéine p53 sauvage, soit à rétablir une conformation sauvage dans la protéine mutée.

2.2.4. Les cibles vasculaires et l'inhibition de la formation des métastases.

La néo-angiogenèse est un processus physiopathologique clé de la progression tumorale. Dans les phases précoces de la croissance de la tumeur, les phénomènes de diffusion permettent l'alimentation de la tumeur en oxygène et en nutriments. Lorsque la taille de la tumeur dépasse 2mm, le simple apport en nutriments par diffusion ne suffit plus. La tumeur rentre alors dans une phase dite vasculaire, au cours de laquelle les cellules cancéreuses vont libérer des stimuli angiogéniques qui vont provoquer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et le développement d'un nouveau réseau vasculaire autour de la tumeur¹². La formation des ramifications vasculaires rapproche les vaisseaux nourriciers et soutient la croissance de la tumeur, en lui apportant les nutriments nécessaires à sa croissance et en permettant aux cellules les plus invasives de passer dans la circulation et de coloniser d'autres sites.

Les phénomènes de néo-angiogenèse tumorale passent par la transcription et la sécrétion par les cellules tumorales, de facteurs pro-angiogéniques qui sont principalement : le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), les FGF (*fibroblast growth factor*), le PDGF (*platelet-derived growth factor*) et le TNF α (*tumour necrosis factor α*). Ces différents facteurs vont altérer la perméabilité des vaisseaux environnants et permettre la libération de protéases matricielles, la migration et la prolifération des cellules endothéliales.

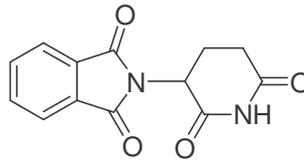
En 1971, Judah Folkman a suggéré l'inhibition de l'angiogenèse comme stratégie anti-tumorale¹³. Aujourd'hui, une soixantaine de composés inhibiteurs de l'angiogenèse sont en cours d'évaluation dans des protocoles cliniques de cancérologie.

A titre d'exemples on peut citer :

- L'angiostatine ou l'endostatine, inhibiteurs naturels de la prolifération des cellules endothéliales.
- Le Bevacizumab[®], anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF.
- La thalidomide (Figure 15), dont le mécanisme d'action n'est pas complètement identifié à ce jour (réduction de l'expression du VEGF, du TNF α).

¹² Garanger, E. Conception, synthèse et caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation pour la cancérologie. Université Joseph Fourier, Grenoble, 2005.

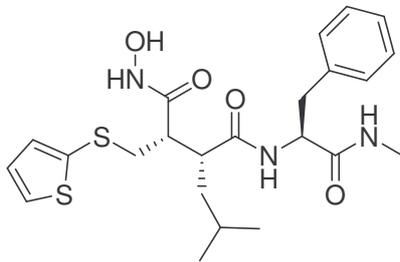
¹³ Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **1971**, 285, 1182-1186.



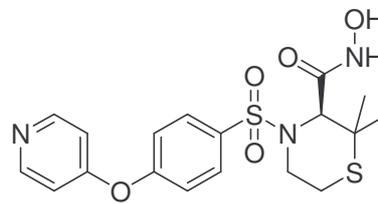
Thalidomide

Figure 15

- Le batimastat, le prinomastat (AG3340), inhibiteurs synthétiques de la plupart des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMP, enzymes jouant un rôle crucial dans le remodelage périvasculaire permettant la migration des cellules endothéliales) (Figure 16).



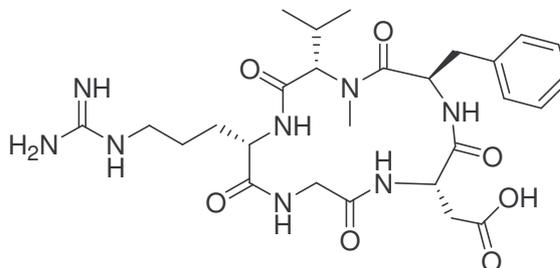
Batimastat



Prinomastat

Figure 16

- Le cilengitide (MD121974, développé par la société Merck), un petit peptide cyclique contenant le motif –RGD- (-Arg-Gly-Asp-) qui interagit avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Figure 17). Cette protéine, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, est sur-exprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux angiogéniques et joue un rôle dans la migration et l'adhésion des cellules endothéliales sur la matrice extracellulaire pour la formation des ramifications vasculaires.



Cilengitide

Figure 17

Indispensable à la progression de la tumeur, la néo-angiogénèse est une cause fondamentale de la malignité des cancers et donc une cible thérapeutique intéressante.

2.2.5. Télomères et inhibiteurs des télomérases.

Les télomères sont des séquences répétitives d'ADN (TTAGGG) en simple brin situées à l'extrémité des chromosomes. Ils jouent un rôle important dans l'intégrité des chromosomes empêchant les phénomènes de fusion interchromosomiques. A chaque division cellulaire, l'ADN télomérique se raccourcit jusqu'à arriver à une taille critique provoquant ainsi la sénescence puis le « vieillissement » de la cellule (arrêt des divisions cellulaires). L'intégrité des télomères est assurée par une enzyme complexe, la télomérase, responsable de la synthèse des séquences répétitives. Dans les cellules somatiques adultes, cette enzyme qui a une activité transcriptase inverse et dont l'ADN simple est le substrat, est absente ou présente en très faible quantité. En revanche, elle est surexprimée dans la majorité des cellules cancéreuses et participe au processus de tumorigénèse¹⁴.

Les séquences de l'ADN simple brin télomérique sont riches en guanine et adoptent des structures particulières comme la « T-loop » ou le G-quadruplexe (Figure 18).

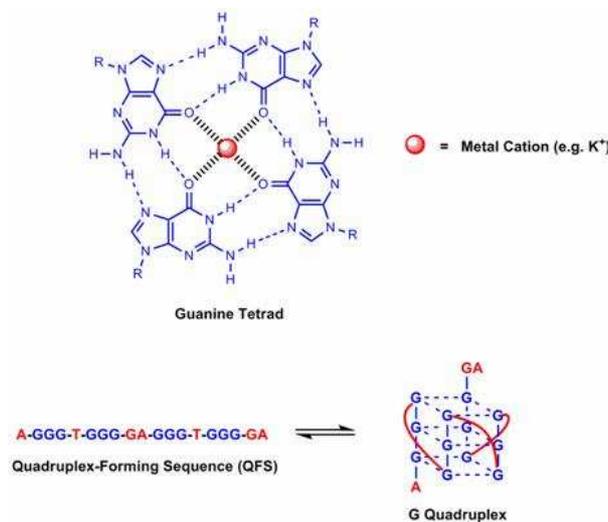


Figure 18

La formation d'un G-quadruplexe au niveau du télomère bloque l'activité de la télomérase et représente une stratégie originale pour rechercher des nouveaux agents anticancéreux. Plusieurs séries de molécules (dérivés de porphyrines cationiques,

¹⁴ Burger, A. M.; Dai, F.; Schultes, C. M.; Reszka, A. P.; Moore, M. J.; Neidle, S. A G-quadruplex binding telomerase inhibitor with in vivo anticancer activity. *Cancer Research* **2005**, 65, 1489-1496.

hétérocycles¹⁵ (Figure 19)) ont montré des affinités et des sélectivités intéressantes pour ces quadruplexes télomériques. Ces dérivés dénommés sous le terme générique de « ligands de l'ADN G-quadruplexe », sont capables de bloquer la réplication des télomères dans les cellules cancéreuses et provoquent la sénescence répliquative et/ou l'apoptose après un délai de plusieurs cycles cellulaires.

D'autres stratégies sont aussi envisagées comme l'utilisation d'oligonucléotides « antisens » visant à bloquer la transcription des gènes codant pour le complexe enzymatique de la télomérase ou l'utilisation d'inhibiteurs de transcriptase inverse interagissant directement avec l'enzyme et inhibant l'activité de cette dernière.

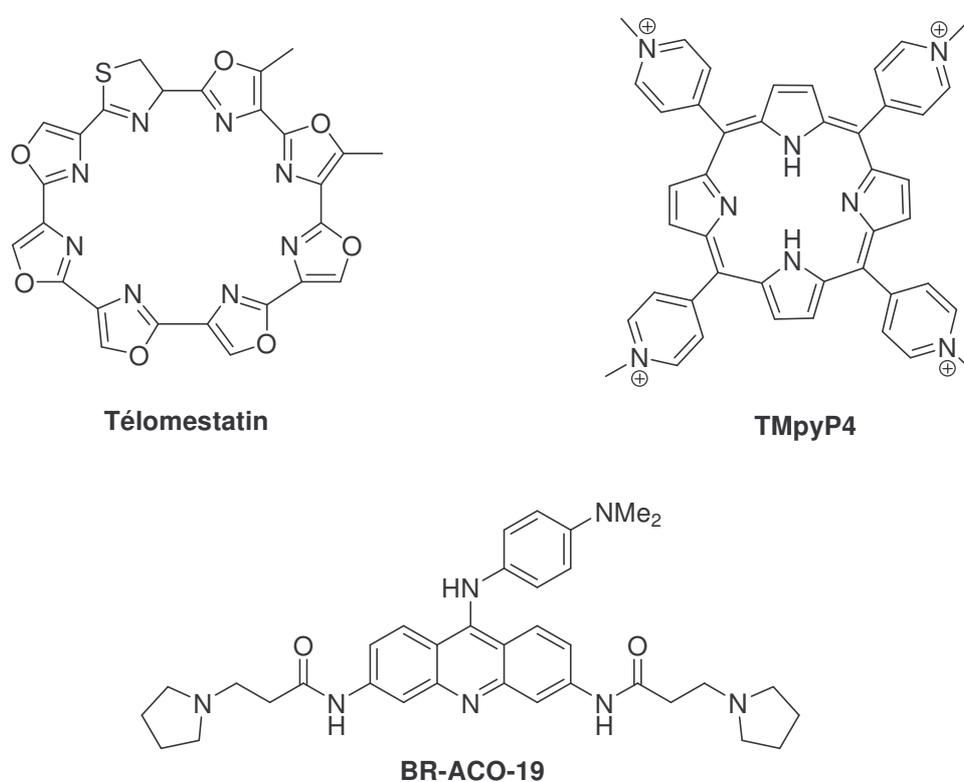


Figure 19

2.2.6. Conclusion.

Aujourd'hui, ces thérapies ciblées représentent les avancées les plus prometteuses dans les traitements contre le cancer. En chimiothérapie, les protocoles actuels associent, le plus souvent, des molécules ayant des mécanismes d'action différents (polychimiothérapie),

¹⁵ Neidle, S.; Parkinson, G. Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. *Nature Rev. Drug Discovery* **2002**, 1, 383-393.

Nous allons examiner quelques exemples de ces dérivés que nous avons classés selon leur mode d'action :

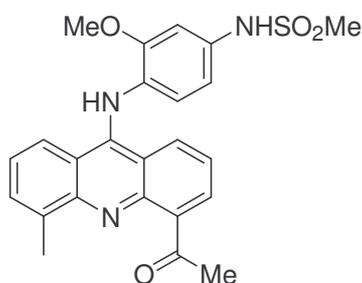
❖ Les inhibiteurs de topoisomérase.

Deux grandes familles d'acridine sont connues aujourd'hui pour être des inhibiteurs de topoisomérase :

1) Les dérivés de 9-anilinoacridine.

Le dérivé en tête de file de cette famille est l'amsacrine (Figure 4), qui fut préparée en 1974 par Cain et al. Historiquement, ce fut le premier dérivé d'acridine à être testé sur la topoisomérase II. Des études ont montré que cette molécule interagissait, d'une part avec l'ADN en s'intercalant entre les paires de bases et, d'autre part, avec l'enzyme par l'intermédiaire de la chaîne latérale, formant ainsi un complexe ternaire drogue-enzyme-ADN très stable¹⁸. Ce phénomène aurait pour conséquence l'inhibition de la religation assistée par l'enzyme¹⁹. La partie anilino²⁰ serait très importante à la fois pour observer la cytotoxicité *in vitro*, mais aussi pour induire l'activité *in vivo*.

Ce médicament fut assez fréquemment utilisé dans les années quatre-vingt-dix pour le traitement de leucémies aiguës et de certains lymphomes. Suite au succès de l'amsacrine, d'autres dérivés comme l'asulacrine²¹ ont été préparés (Figure 21).



Asulacrine

Figure 21

¹⁸ Denny, W. A.; Cain, B. F.; Atwell, G. J.; Hansch, C.; Panthanickal, A.; Leo, A. Potential antitumor agents. 36. Quantitative relationships between experimental antitumor activity, toxicity, and structure for the general class of 9-anilinoacridine antitumor agents. *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 276-315.

¹⁹ Robinson, M. J.; Osheroff, N. Stabilization of the topoisomerase II-DNA cleavage complex by antineoplastic drugs: inhibition of enzyme-mediated DNA religation by 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-*m*-anisidine. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2511-2515.

²⁰ Finlay, G. J.; Atwell, G. J.; Baguley, B. C. Inhibition of the action of the topoisomerase II poison amsacrine by simple aniline derivatives: evidence for drug-protein interactions. *Oncol. Res.* **1999**, *11*, 249-254.

²¹ a) Harvey, V. J.; Hardy, J. R.; Smith, S.; Grove, W.; Baguley, B. C. Phase II study of the amsacrine analogue CI-921 (NSC 343499) in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* **1991**, *27*, 1617-1620, b) Sklarin, N. T.; Wiernik, P. H.; Grove, W. R.; Benson, L.; Mittelman, A.; Maroun, J. A.; Stewart, J. A.; Robert, F.; Doroshow, J. H.; Rosen, P. J.; et al. A phase II trial of CI-921 in advanced malignancies. *Invest New Drugs* **1992**, *10*, 309-312.

Cependant, des études ont mis en évidence la formation par oxydation d'un intermédiaire de type quinone-diimine, due à la présence d'une fonction amine en position *para* sur le cycle aniline. Cet intermédiaire serait ensuite piégé dans la cellule par divers nucléophiles, dont le glutathion, puis éliminé (Figure 22).

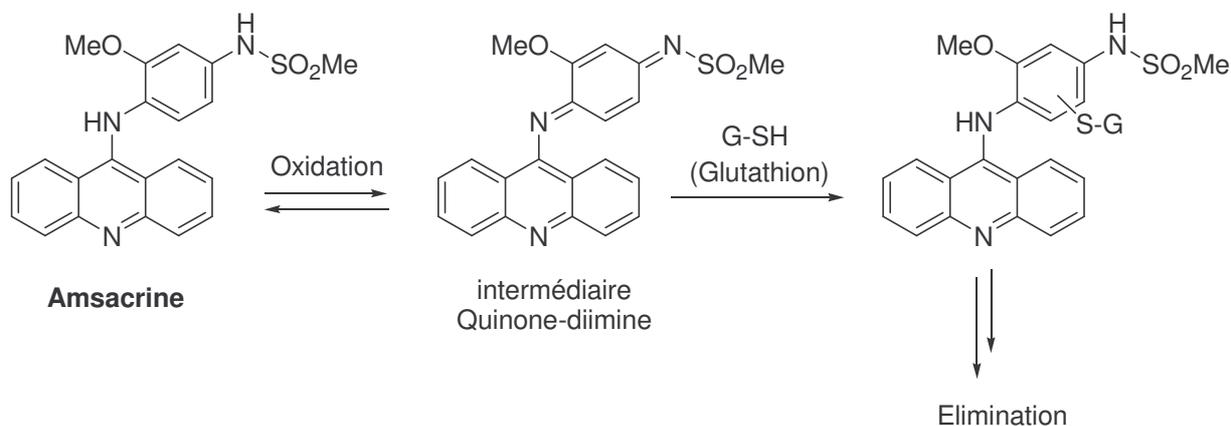
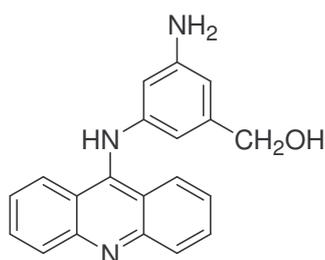


Figure 22

Afin d'améliorer l'efficacité et la stabilité de ces molécules, de nombreux composés dérivant de la structure de base de l'amsacrine ont été synthétisés par l'équipe de Su²². On peut citer, à titre d'exemple, le composé AHMA (dérivé testé en clinique), dont le cycle aniline est substitué en position *meta* (Figure 23).



AHMA

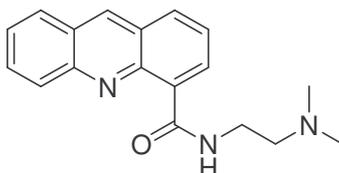
Figure 23

Ce composé est plus stable et moins toxique que l'amsacrine.

²² a) Su, T. L. Development of DNA topoisomerase II-mediated anticancer agents, 3-(9-acridinylamino)-5-hydroxymethylanilines (AHMAs) and related compounds. *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 1677-1688, b) Su, T. L.; Chen, C. H.; Huang, L. F.; Basu, M. K.; Zhang, X. G.; Chou, T. C. Synthesis and structure-activity relationships of potential anticancer agents: alkylcarbamates of 3-(9-acridinylamino)-5-hydroxymethylaniline. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4741-4748.

2) Les dérivés de 4-carboxamidoacridine.

Dans cette famille de dérivés, le composé DACA ou *N*-(2-(diméthylamino)éthyl)acridine-4-carboxamide, est la tête de série (Figure 24). Ce composé, développé par l'équipe de Denny²³, inhibe l'activité des topoisomérases I et II. Des études de relation structure-activité ont permis de mettre en avant l'importance de la présence d'un groupe électroattracteur en position 5 sur les propriétés antitumorales de ces composés.



DACA

Figure 24

Des études cliniques²⁴ (phase I et II) ont été menées sur ce dérivé (dénommé XR5000 par la société Xenova), ainsi que sur d'autres analogues du DACA, mais sans résultats probants.

❖ Inhibiteur de télomérases/téломères.

Dans la recherche d'inhibiteurs de télomérases, l'équipe de Neidle²⁵ a développé une série de dérivés d'acridines trisubstituées et d'acridones disubstituées qui ont montré de très bonnes affinités pour les quadruplexes télomériques.

Les structures générales de quelques uns de ces dérivés sont représentées dans la figure ci-dessous (Figure 25).

²³ a) Atwell, G. J.; Rewcastle, G. W.; Baguley, B. C.; Denny, W. A. Potential antitumor agents. 50. In vivo solid-tumor activity of derivatives of *N*-[2-(diméthylamino)éthyl]acridine-4-carboxamide. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 664-669, b) Denny, W. A.; Atwell, G. J.; Rewcastle, G. W.; Baguley, B. C. Potential antitumor agents. 49. 5-Substituted derivatives of *N*-[2-(diméthylamino)éthyl]-9-aminoacridine-4-carboxamide with in vivo solid-tumor activity. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 658-663.

²⁴ a) Schofield, P. C.; Robertson, I. G.; Paxton, J. W.; McCrystal, M. R.; Evans, B. D.; Kestell, P.; Baguley, B. C. Metabolism of *N*-[2-(diméthylamino)éthyl]acridine-4-carboxamide in cancer patients undergoing a phase I clinical trial. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1999**, 44, 51-58, b) Twelves, C. J.; Gardner, C.; Flavin, A.; Sludden, J.; Dennis, I.; de Bono, J.; Beale, P.; Vasey, P.; Hutchison, C.; Macham, M. A.; Rodriguez, A.; Judson, I.; Bleehen, N. M. Phase I and pharmacokinetic study of DACA (XR5000): a novel inhibitor of topoisomerase I and II. *Br. J. Cancer* **1999**, 80, 1786-1791.

²⁵ a) Harrison, R. J.; Gowan, S. M.; Kelland, L. R.; Neidle, S. Human telomerase inhibition by substituted acridine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2463-2468, b) Read, M.; Harrison, R. J.; Romagnoli, B.; Tanious, F. A.; Gowan, S. H.; Reszka, A. P.; Wilson, W. D.; Kelland, L. R.; Neidle, S. Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, 98, 4844-4849.

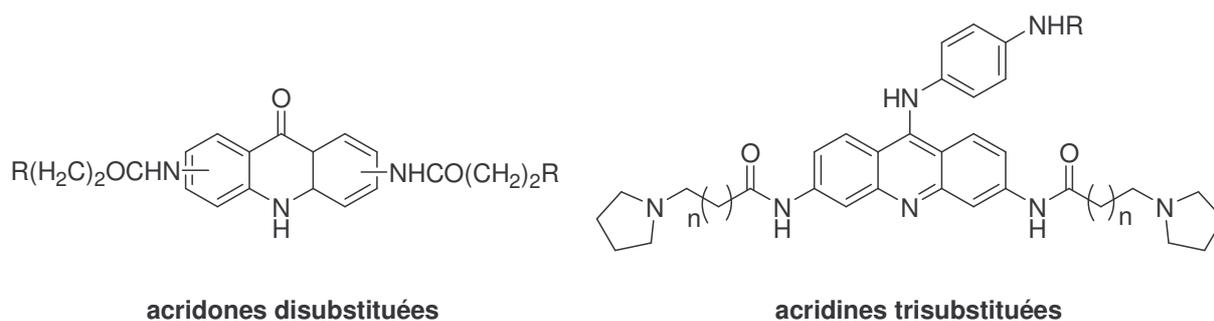


Figure 25

Le chef de file des dérivés d'acridine trisubstituées, BR-ACO-19 (Figure 19) est actuellement en essais cliniques.

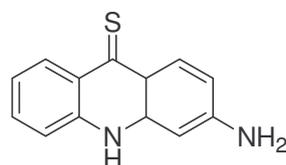
❖ Inhibiteur de kinases.

Certains dérivés d'acridine, connus pour interagir avec l'ADN par intercalation, se sont révélés être de bons inhibiteurs de kinases. C'est notamment le cas de l'acridine orange, utilisée jusqu'ici comme colorant de l'ADN ou encore de l'acridine yellow G (Figure 26). Des études²⁶ ont montré que ces dérivés étaient capables d'inhiber l'activité de la protéine kinase C, avec une IC₅₀ de 40μM pour l'acridine yellow G.



Figure 26

Des dérivés de thioacridone, dont la 3-amino-10H-acridine-9-thione (Figure 27), ont montré aussi des résultats très intéressants en terme d'inhibition et de sélectivité sur des CDK³⁶.



3-amino-10H-acridine-9-thione

Figure 27

²⁶ Hannun, Y. A.; Bell, R. M. Aminoacridines, potent inhibitors of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 5124-5131.

❖ Les intercalants-alkylants.

Depuis de nombreuses années, bon nombre d'intercalants-alkylants²⁷ ont été synthétisés avec l'idée de conférer à un vecteur ayant une bonne affinité pour l'ADN (par exemple par intercalation) des propriétés alkylantes, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter à la fois l'affinité et la sélectivité des molécules pour l'ADN.

L'équipe de Denny²⁸ a développé toute une série de composés hétérocycliques intercalants-alkylants, ayant une forte affinité pour l'ADN et /ou des propriétés cytotoxiques. Ainsi, l'une des approches du groupe de Denny a porté sur l'utilisation de moutardes à l'azote (*N,N*-bis(chloroéthyl)amines) ou d'analogues de cisplatine comme agent de pontage interbrins de l'ADN (Figure 28).

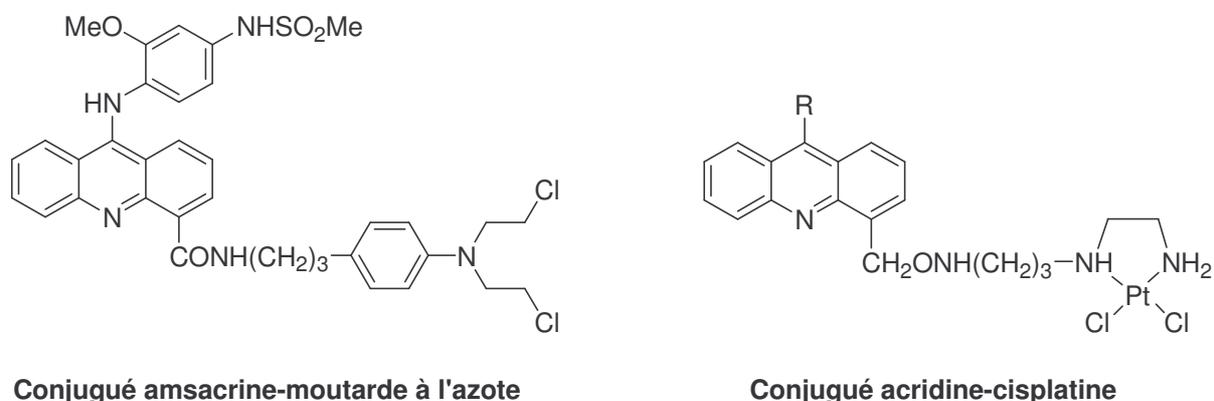
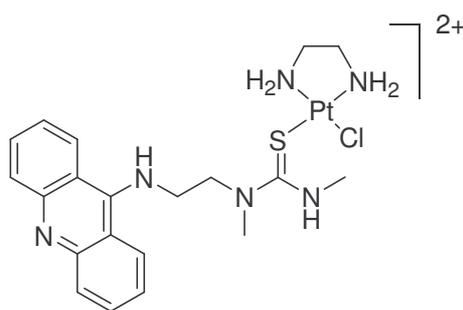


Figure 28

Dans la même stratégie, on peut citer aussi les travaux récents de Bierbach et coll.²⁹ dans lesquels l'analogue de cisplatine est conjugué au dérivé acridine par une fonction thiourée (dérivé PT-ACRAMTU, Figure 29).

²⁷ a) Kohn, K. W.; Orr, A.; O'Connor, P. M. Synthesis and DNA-sequence selectivity of a series of mono- and difunctional 9-aminoacridine nitrogen mustards. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 67-72, b) Konakahara, T.; Wurdeman, R. L.; Gold, B. Synthesis of an *N*-methyl-*N*-nitrosourea linked to a methidium chloride analogue and its reactions with 32P-end-labeled DNA. *Biochemistry* **1988**, *27*, 8606-8613, c) Mehta, P.; Church, K.; Williams, J.; Chen, F.-X.; Encell, L.; Shuker, D. E. G.; Gold, B. The design of agents to control DNA methylation adducts. Enhanced major groove methylation of DNA by an *N*-methyl-*N*-nitrosourea functionalized phenyl Neutral Red intercalator. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 939-948, d) Sundquist, W. J.; Bancroft, D. P.; Lippard, S. J. Synthesis, characterization, and biological activity of cis-diammineplatinum(II) complexes of the DNA intercalators 9-aminoacridine and chloroquine. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1590-1596, c) Takahashi, K.; Ciszewska, G.; Watanabe, K. A. Potential anticancer agents derived from acridine. Intercalating agents with covalent bond forming capabilities. 3. *Drugs of the Future* **1990**, *15*, 605-610, d) Wickham, G.; Prakash, A. S.; Wakelin, L. P. G.; McFadyen, W. D. DNA-binding properties and antitumor activity of monofunctional alkylating groups attached to the DNA-intercalating chromophore phenanthridine: *n*-bromoalkylphenanthridinium bromides. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1073*, 528-537.

²⁸ Gourdie, T. A.; Prakash, A. S.; Wakelin, L. P. G.; Woodgate, P. D.; Denny, W. A. Synthesis and evaluation of DNA-targeted spatially separated bis(aniline mustards) as potential alkylating agents with enhanced DNA cross-linking capability. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 240-248.



PT-ACRAMTU

Figure 29

En général, la cytotoxicité observée pour ces hybrides est plus importante que celle évaluée par l'intercalant et l'alkylant pris séparément. Néanmoins, à notre connaissance, aucun intercalant-alkylant de synthèse n'est utilisé en clinique.

Comme autre exemple d'acridines présentant ce mode d'action, on peut citer aussi les dérivés d'acridones appartenant à la famille de l'acronycine.

L'acronycine est un alcaloïde naturel qui a été étudié par le passé pour ses propriétés pharmacologiques³⁰ (Figure 30). Malheureusement les résultats cliniques se sont révélés décevants (problème de solubilité et d'efficacité). Différents analogues ont été synthétisés afin d'évaluer la corrélation entre la(les) substitution(s) et la cytotoxicité observée³¹. Un point marquant ressort de cette étude : Il s'agit de l'importance de la double liaison 1-2 de l'acronycine pour observer l'activité biologique.

²⁹ Ackley, M. C.; Barry, C. G.; Mounce, A. M.; Farmer, M. C.; Springer, B.-E.; Day, C. S.; Wright, M. W.; Berners-Price, S. J.; Hess, S. M.; Bierbach, U. Structure-activity relationships in platinum-acridinylthiourea conjugates: effect of the thiourea nonleaving group on drug stability, nucleobase affinity, and in vitro cytotoxicity. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, 9, 453-461.

³⁰ Tillequin, F.; Michel, S.; Skaltsounis, A.-L. Acronycine-type alkaloids: chemistry and biology. In *Alkaloids: chemical and biological properties*, Pelletier, S. W., Ed. Pergamon: Oxford, 1998; Vol. 12, pp 1-102.

³¹ a) Costes, N.; Le Deit, H.; Michel, S.; Tillequin, F.; Koch, M.; Pfeiffer, B.; Renard, P.; Léonce, S.; Guilbaud, N.; Kraus-Berthier, L.; Pierré, A.; Atassi, G. Synthesis and cytotoxic and antitumor activity of benzo[*b*]pyrano[3,2-*h*]acridin-7-one analogue of acronycine. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2395-2402, b) Elomri, A.; Mitaku, S.; Michel, S.; Skaltsounis, A.-L.; Tillequin, F.; Koch, M.; Pierré, A.; Guilbaud, N.; Léonce, S.; Kraus-Berthier, L.; Rolland, Y.; Atassi, G. Synthesis and cytotoxic and antitumor activity of esters in the 1,2-dihydroxy-1,2-dihydroacronycine series. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 4762-4766.

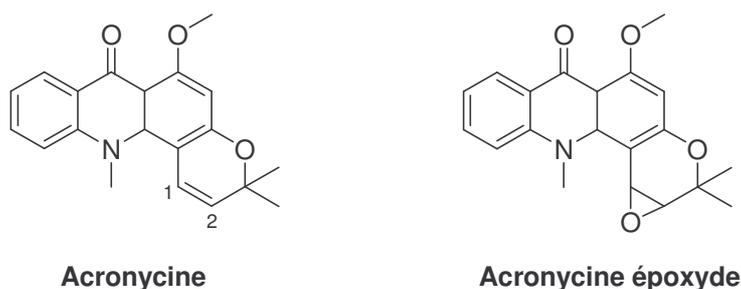
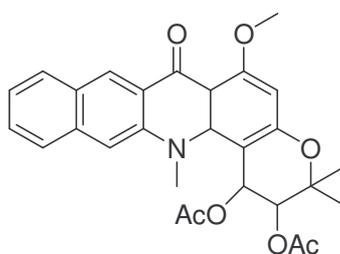


Figure 30

Par ailleurs, une acronycine instable, substituée au niveau de la double liaison par un époxyde, a été isolée de *Sarcomelicop sp*, plante endémique de Nouvelle Calédonie (Figure 30).

Cette découverte a été à l'origine de nouveaux développements dans la recherche de composés plus stables que l'époxyde mais ayant une réactivité analogue vis-à-vis de nucléophiles.

On peut citer les travaux de l'équipe de Tillequin³² dont la stratégie a consisté à développer des composés analogues possédant un chromophore plus étendu de type benzo[*b*]pyrano[3,2-*h*]acridin-7-one ; ceci afin d'augmenter les propriétés d'intercalation des molécules. Certains de ces composés ont montré des cytotoxicités très intéressantes dont notamment un analogue diacétate (S-23906-1) de l'acronycine (1000 fois plus actif que l'acronycine sur l'inhibition de la croissance des cellules L1210 en culture) (Figure 31).



S-23906-1

Figure 31

Des études ont montré que ce composé diacétate se fixait de manière covalente à l'ADN en formant des adduits avec la guanine (réaction avec l'amine en position 2 de la guanine).

³² Costes, N.; Le Deit, H.; Michel, S.; Tillequin, F.; Koch, M.; Pfeiffer, B.; Renard, P.; Léonce, S.; Guilbaud, N.; Kraus-Berthier, L.; Pierré, A.; Atassi, G. Synthesis and cytotoxic and antitumor activity of benzo[*b*]pyrano[3,2-*h*]acridin-7-one analogue of acronycine. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2395-2402.

4. Molécules développées au laboratoire : travaux antérieurs et objectifs de ce travail.

4.1. Travaux antérieurs.

Au sein de notre laboratoire, F.Charmantray³³ a synthétisé au cours de sa thèse toute une série de molécules dérivées de la 3-aminoacridine et de la 3,6-diaminoacridine (proflavine) qui ont été testées *in vitro* sur des cellules tumorales L1210 (leucémie murine), A549 (poumon) et HT29 (colon). Plusieurs dérivés se sont révélés être des molécules très cytotoxiques et ont présenté des IC₅₀ inférieures au micromolaire (Tableau 1).

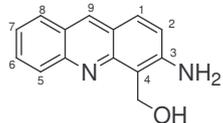
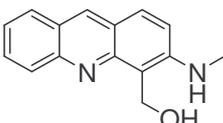
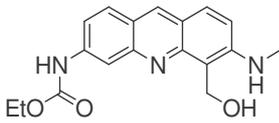
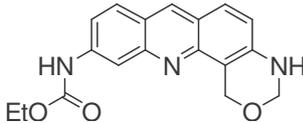
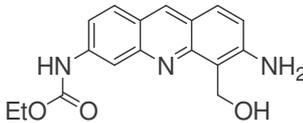
| N° | Composé | Activité cytostatique (IC ₅₀ en µM) | | |
|----------|---|--|-------|-------|
| | | L1210 | A549 | HT29 |
| <u>1</u> |  | 0,02 | 0,005 | 0,025 |
| <u>2</u> |  | 1,1 | 1,4 | 2,5 |
| <u>3</u> |  | 0,09 | 0,03 | 0,35 |
| <u>4</u> |  | 0,08 | >0,05 | 1,3 |
| <u>5</u> |  | 0,01 | 0,01 | 0,04 |

Tableau 1

³³ a) Charmantray, F.; Demeunynck, M.; Carrez, D.; Croisy, A.; Lansiaux, A.; Bailly, C.; Colson, P. 4-Hydroxymethyl-3-aminoacridine derivatives as a new family of anticancer agents. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 967-977, b) Charmantray, F.; Duflos, A.; Lhomme, J.; Demeunynck, M. Synthesis and study of 4-hydroxymethyl-3-alkylaminoacridines as models of a new class of DNA intercalating-alkylating agents. *J. Chem. Soc, Perkin Trans.1* **2001**, 2962-2968.

Comme on peut le voir dans le tableau ci-dessus, les molécules les plus cytotoxiques sont actives à des concentrations nanomolaires et portent un groupement hydroxyméthyle en *ortho* de la fonction amine en position 3 de l'acridine.

Des études complémentaires menées avec le composé **2**, ainsi que sur l'analogue *N,N*-diméthylé, ont montré que ces molécules étaient capables de s'intercaler (étude par dichroïsme linéaire) et de se fixer de manière covalente à l'ADN, mais qu'elles n'inhibaient pas l'activité des topoisomères I et II. En regardant de plus près la structure de ces composés, il a été émis l'hypothèse suivante : Ces molécules, intercalantes de l'ADN, seraient également des précurseurs d'intermédiaires de type quinone-imine-méthide, hautement électrophiles, susceptibles de réagir avec un nucléophile tel que l'ADN (Schéma 1). Ces propriétés pourraient alors rendre compte de la cytotoxicité observée.

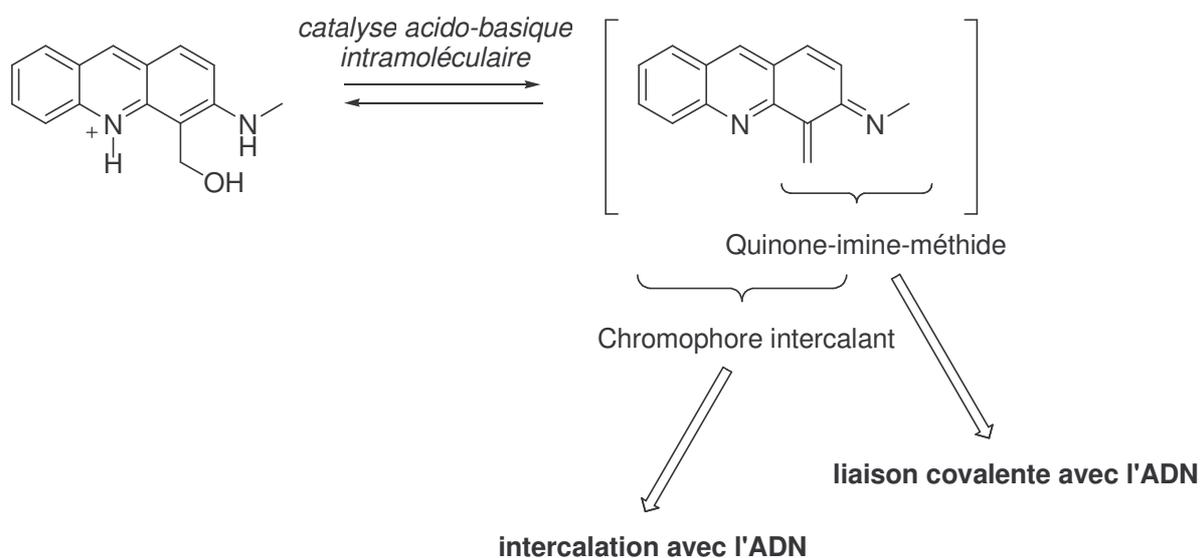


Schéma 1

Cependant des études de microscopie confocale³³ effectuées sur des cellules tumorales HT29 ont montré que les dérivés **1** et **2** étaient localisés uniquement dans le cytoplasme et pas dans le noyau des cellules, alors que le dérivé **5** se distribuait dans toute la cellule (aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme) (Figure 32).

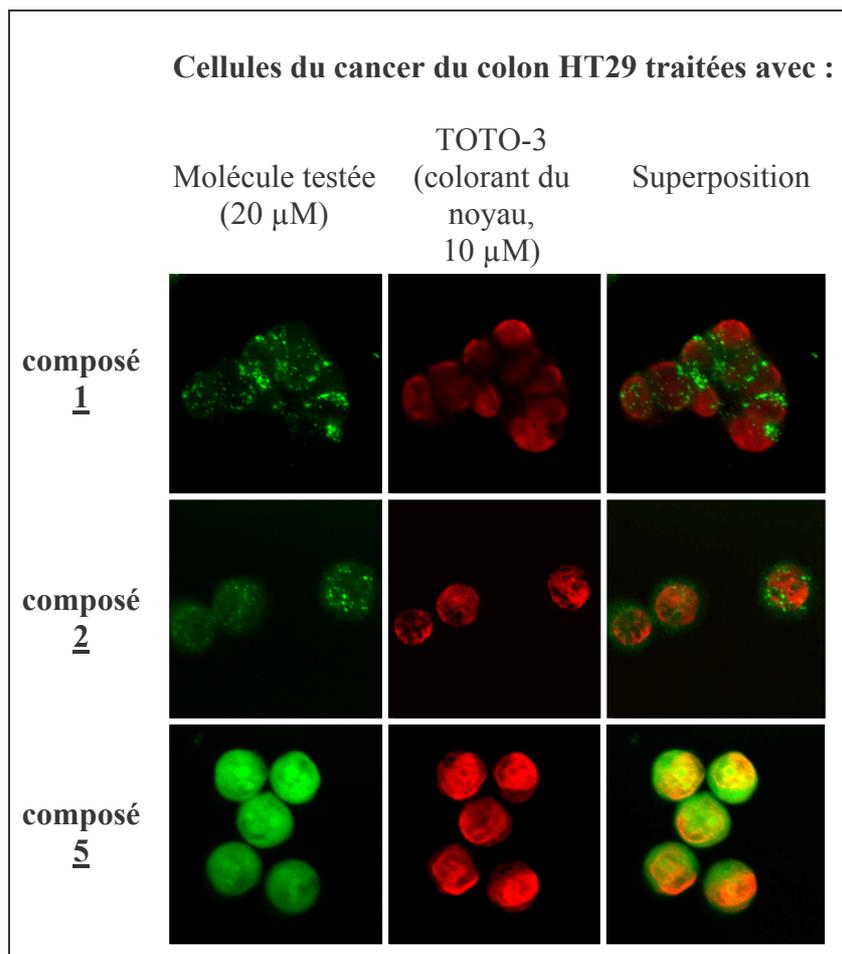


Figure 32

Il apparaît donc que l'ADN nucléaire n'est pas la cible des composés 1 et 2.

Au vu des résultats intéressants obtenus en cytotoxicité et afin d'approfondir nos connaissances sur cette nouvelle famille de composés, 2 stratégies ont alors été envisagées :

- 1) Dans une première stratégie, des prodrogues du dérivé 1 ont été préparées par C. Asche³⁴ et M. Ouberaï³⁵. Ces prodrogues sont soit de type dihydrooxazine et activable par voie chimique ou enzymatique, soit de type nitrobenzylcarbamate et activable par voie enzymatique (Schéma 2).

³⁴ Asche, C.; Dumy, P.; Carrez, D.; Croisy, A.; Demeunynck, M. Nitrobenzylcarbamate prodrugs of cytotoxic acridines for potential use with nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1990-1994.

³⁵ Ouberaï, M.; Asche, C.; Carrez, D.; Croisy, A.; Dumy, P.; Demeunynck, M. 3,4-Dihydro-1H-[1,3]oxazino[4,5-c]acridines as a new family of cytotoxic drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4641-4643.

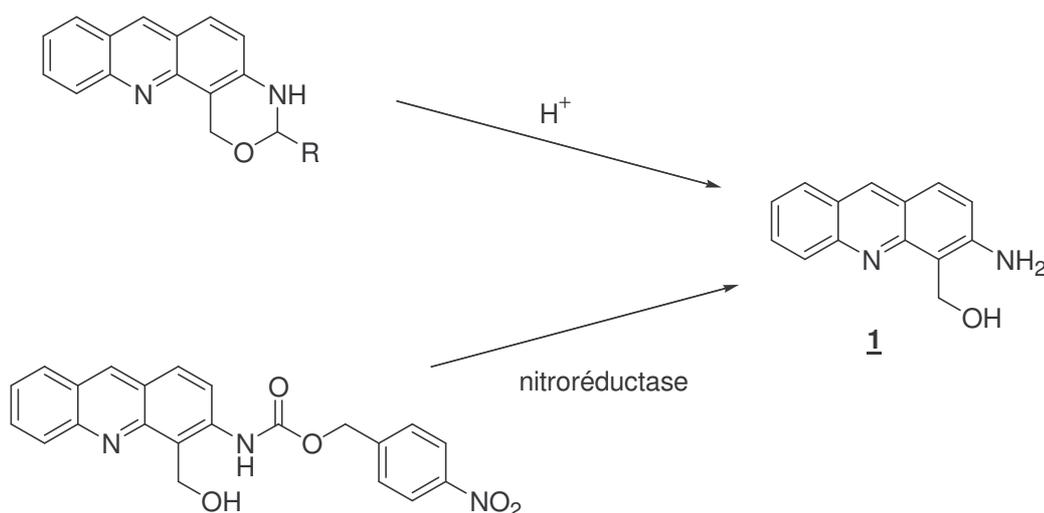


Schéma 2

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de deux publications^{35,34}.

- 2) Dans une seconde stratégie, dont les résultats sont présentés dans le chapitre I de ce manuscrit, nous avons préparé des analogues du composé **5**, en fonctionnalisant l'amine en position 6 de l'acridine. Ce travail a été effectué dans le but de moduler les propriétés physico-chimiques de la molécule, et donc ses propriétés biologiques. Plusieurs dérivés ont été synthétisés et en particulier des composés comportant en position 6 soit un motif guanidine, soit une fonction amine libre. Nous avons aussi préparé un analogue du composé **1**, substitué par un atome d'iode en position 6, afin d'étudier sa distribution cellulaire par microscopie ionique (SIMS, imagerie par spectrométrie d'ions secondaires).

4.2. Objectifs et plan de ce travail.

Ce manuscrit comprend trois chapitres :

- Dans le premier chapitre, sont présentés la synthèse de nouveaux dérivés d'acridine *ortho*-hydroxyméthylée* (Figure 33) et les résultats des études biologiques effectuées à partir de ces dérivés.

* nous emploierons aussi le terme aminoalcool pour désigner ces dérivés.

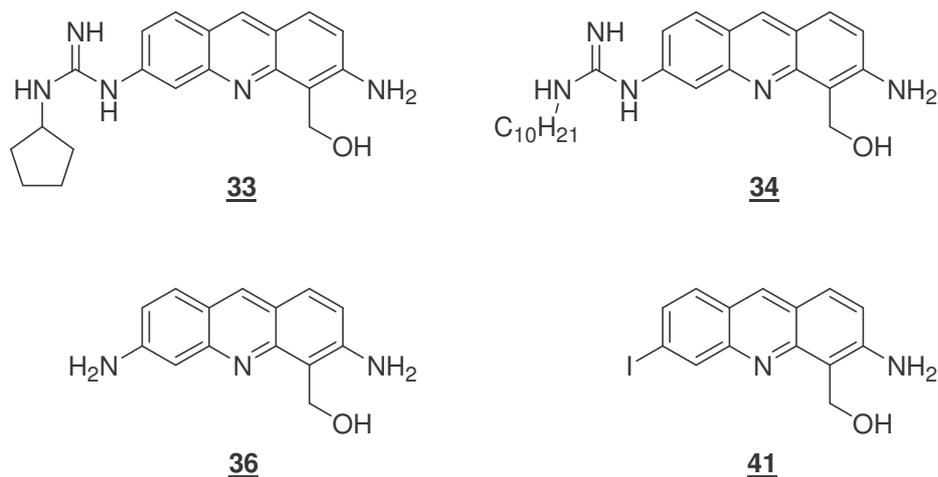


Figure 33

- Il existe peu d'exemples, dans la littérature, d'hétérocycles azotés fonctionnalisés par un motif guanidine. Cependant nous pouvons prévoir un effet important de ce type de substituant très basique sur les propriétés chimiques et physicochimique des hétérocycles. Nous avons donc étudié l'influence du motif guanidine sur le pKa de l'acridine à partir de 3 guanidinoacridines (Figure 34). La synthèse de ces dérivés ainsi que les résultats obtenus pour les calculs de pKa, sont développés dans le deuxième chapitre.

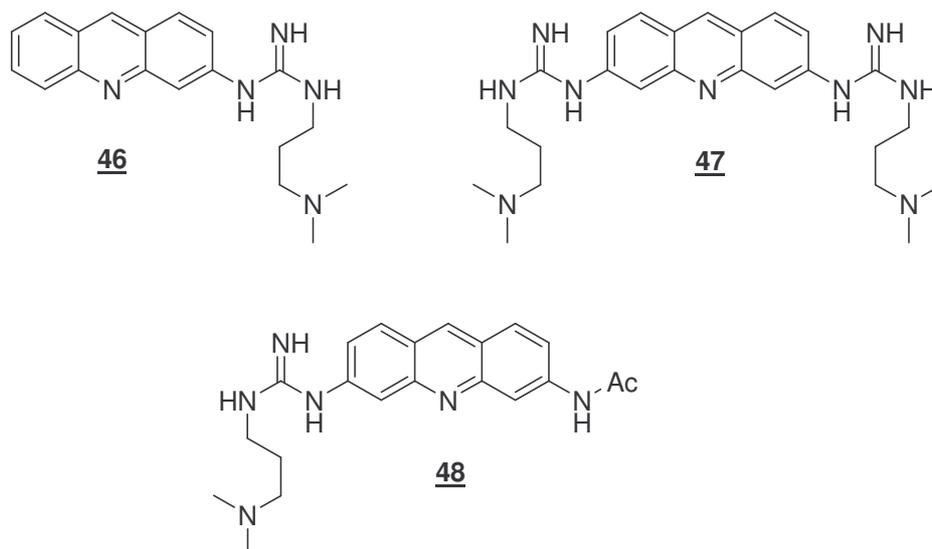


Figure 34

- Durant ce travail de thèse, nous avons aussi mis au point une nouvelle méthodologie de synthèse de dérivés de 2-amino-4(3*H*)-quinazolinones à partir d'amines

aromatiques et hétérocycliques (Schéma 3). Certains de ces dérivés ont été testés sur des quadruplexes de guanine (G4). Leur cytotoxicité a aussi été évaluée sur des cellules tumorales. La synthèse de ces nouveaux dérivés, ainsi que les résultats des études biologiques, sont présentés dans le troisième chapitre.

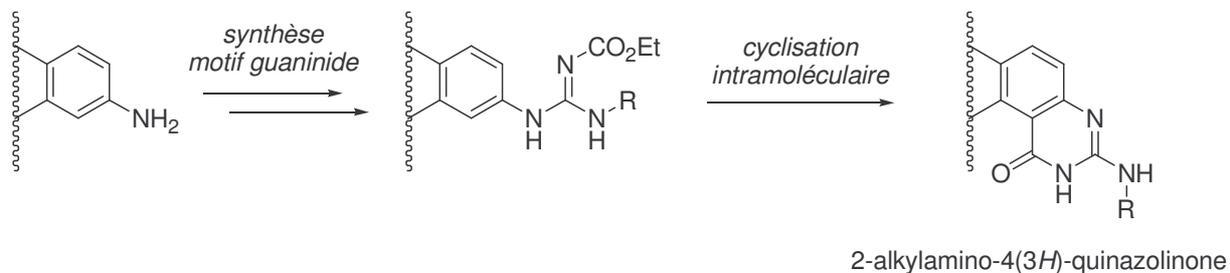
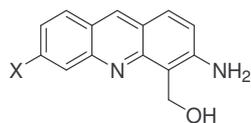


Schéma 3

Chapitre I

**Synthèse et études biologiques d'aminoalcools dérivés
d'acridine.**

PARTIE A/ PLAN DU CHAPITRE



La synthèse des nouveaux dérivés aminoalcools **33**, **34**, **36** et **41** est présentée dans la partie B :

- Partie B-1 : synthèse des dérivés aminoalcools comportant un motif guanidine **33** et **34** (X= guanidine).

Si on considère le schéma général de rétrosynthèse représenté ci-dessous, on peut voir que différentes stratégies sont possibles selon l'ordre dans lequel sera construite la molécule : synthèse de la partie aminoalcool ou synthèse du motif guanidine.

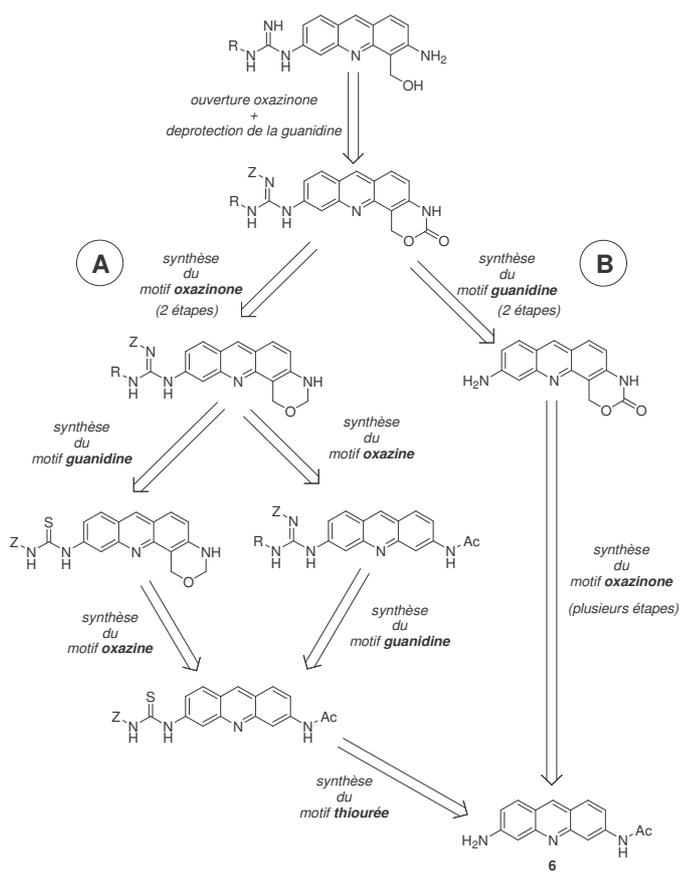


Schéma général

Nous avons exploré ces différentes voies qui sont décrites ci-dessous dans le détail.

- Partie B-2 : synthèse du dérivé aminoalcool **36** (X= NH₂).
- Partie B-3 : synthèse du dérivé aminoalcool iodé **41** (X= I).

Les études biologiques menées sur ces dérivés sont présentées dans la Partie C.

PARTIE B/ SYNTHÈSES

B-1. Synthèse des aminoalcools comportant un motif guanidine.

1. Rappels bibliographiques sur la synthèse du motif guanidine.

Il existe plusieurs méthodes de synthèse de guanidines dans la littérature³⁶. Nous nous limiterons aux méthodes permettant l'obtention de guanidines *N,N'*-disubstituées non symétriques dans lesquelles Z est un atome d'hydrogène ou, plus généralement, un groupement protecteur qui sera éliminé par la suite. Ces différentes méthodes peuvent être regroupées selon trois grandes voies (schéma 4).

Nous allons examiner maintenant ces différentes voies et leur compatibilité avec la synthèse et la grande réactivité des aminoacridines *ortho*-hydroxyméthylées.

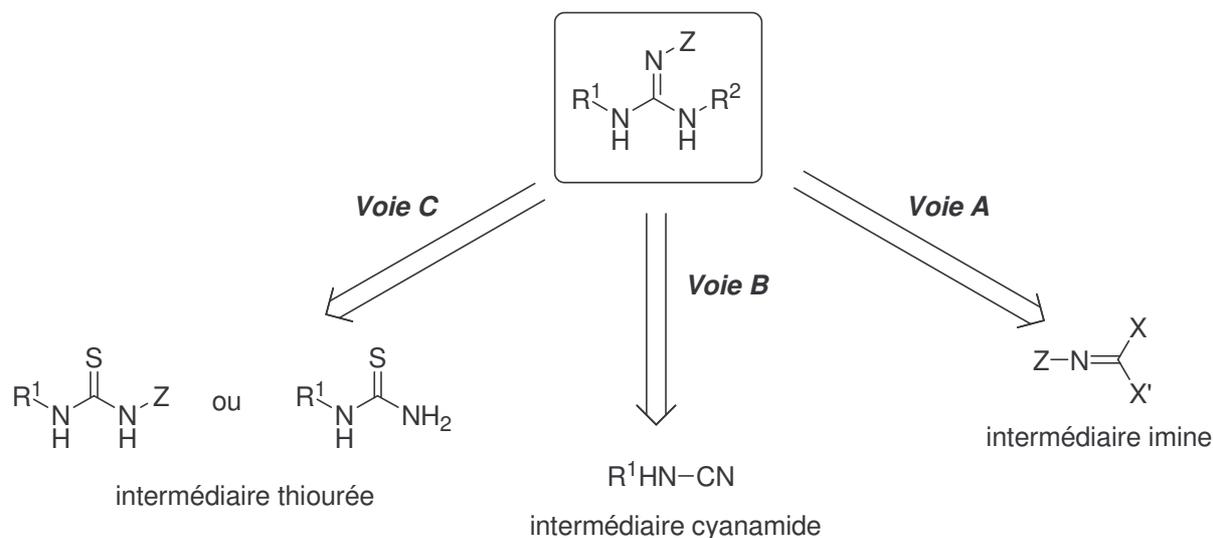


Schéma 4

Par ailleurs, au sein de notre laboratoire, K. Alarcon³⁷ s'est intéressée durant sa thèse à la synthèse de guanidines *N,N'*-dialkylées et a pu tester quelques unes de ces voies de synthèse. Ces travaux ont été très utiles quant au choix de la méthode que nous avons utilisée.

³⁶ Katritzky, A. R.; Rogovoy, B. V. Recent developments in guanidylating agents. *Arkivoc* **2005**, iv, 49-87.

³⁷ Alarcon, K. Synthèse et étude d'hétérodimères spécifiques des sites abasiques de l'ADN - Potentialisation d'agents alkylants anticancéreux. Université Joseph Fourier, Grenoble, 2000.

1.1. Présentation générale des trois voies de synthèse.

1) Synthèse via un intermédiaire imine : **voie A**.

La **voie A** fait intervenir des dérivés de type imine activée par des substituants X, X' électro-attracteurs (avec X, X' = SMe, OPh, OMe ou Cl)³⁸. L'intermédiaire imine peut être ensuite mis en réaction avec des diamines pour la synthèse de guanidines cycliques ou avec deux amines différentes (Schéma 5) pour obtenir des guanidines di (après élimination du groupement Z) ou trisubstituées (cas où Z est un groupement alkyle ou aryle). Dans ce dernier exemple les intermédiaires monosubstitués ne sont en général pas isolables et les produits finaux sont contaminés par la présence de guanidines symétriques. Ce qui explique les rendements moyens généralement obtenus par cette voie.

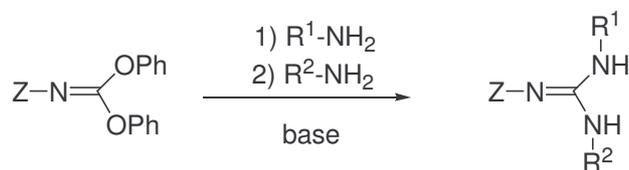


Schéma 5

Il existe dans la littérature peu d'exemples de synthèse de guanidines N,N'-disubstituées non symétriques utilisant cette méthodologie et les rendements moyens avancés ne nous ont pas encouragé à utiliser cette voie de synthèse.

2) Synthèse via un intermédiaire cyanamide: **voie B**.

Dans la **voie B**, l'intermédiaire nécessaire à la synthèse du motif guanidine est de type cyanamide. Il est obtenu par substitution nucléophile de l'amine sur le bromure de cyanogène³⁹. Cet intermédiaire cyanamide peut être préparé *in situ* et couplé ensuite à une seconde amine ajoutée en large excès. On peut ainsi obtenir directement, sans groupe protecteur, des guanidines N,N'-disubstituées non symétriques (Schéma 6).

³⁸ a) Atkins, P. R.; Glue, S. E. J.; Kay, I. T. Heterocyclic syntheses with isothiocyanatoformic esters and their derivatives. *J. C. S. Perkin I* **1973**, 22, 2644-2646, b) Buschauer, A. Synthesis and in vitro pharmacology of apromidine and related phenyl(pyridylalkyl)guanidines, a potential new class of positive inotropic drugs. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1963-1970, c) Nagarajan, S.; Ho, T.-L.; DuBois, G. E. A simple method for the synthesis of unsymmetrical trisubstituted guanidines. *Synthetic Commun.* **1992**, 22, 1191-1198, d) Pannecouque, C.; Wigerinck, P.; Van Aerschot, A.; Herdewijn, P. Dimeric building blocks with N-cyanoguanidine linkage for oligonucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 7609-7612.

³⁹ Reddy, N. L.; Fan, W.; Magar, S. S.; Perlman, M. E.; Yost, E.; Zhang, L.; Berlove, D.; Fischer, J. B.; Burke-Howie, K.; Wolcott, T.; Durant, G. J. Synthesis and pharmacological evaluation of N,N'-Diarylguanidines as potent sodium channel blockers and anticonvulsant agents. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 3298-3302..

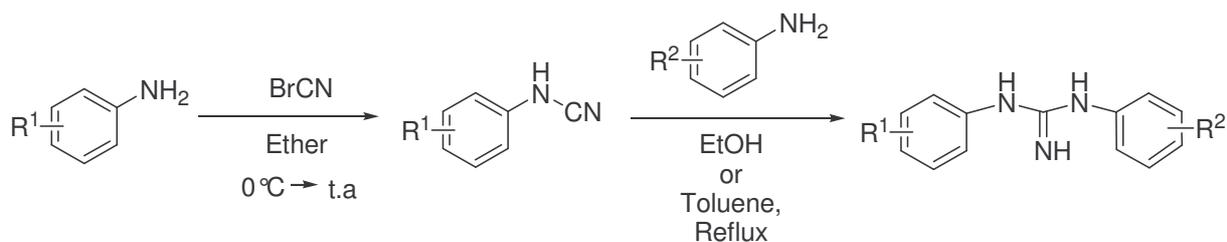


Schéma 6

Dépendant de la nature du groupement, les rendements sont généralement moyens. De plus, cette technique nécessite l'utilisation d'amine suffisamment nucléophile ce qui n'est pas le cas des amines exocycliques des dérivés de proflavine.

3) Synthèse via un intermédiaire thiourée activé : voie C.

La voie C, qui est la plus utilisée, met en jeu des dérivés comportant une fonction thiourée qui doit être préalablement activée par différents groupements avant d'être opposée à une amine. Il est en effet connu dans la littérature que le couplage entre la thiourée et la seconde amine est plus efficace (meilleurs rendements, réaction plus rapide) avec des thiourées substituées par des groupements électro-attracteurs.

Selon qu'elle est mono- ou disubstituée, la thiourée peut être activée de différentes manières:

- Par oxydation en acide aminoiminosulfonique⁴⁰ à l'aide de NaIO₄ ou de NaClO₂ :

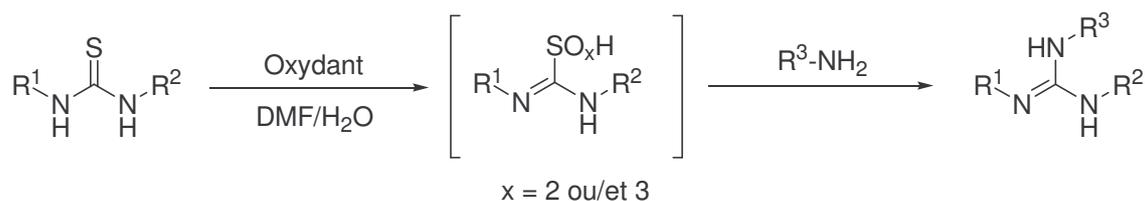


Schéma 7

Dans la littérature, les applications se limitent aux thiourées monosubstituées (R^1 ou $R^2 = H$) ou disubstituées symétriquement ($R^1 = R^2$). De plus, les conditions d'oxydation sont peu compatibles avec la réactivité de nos composés.

⁴⁰ Ramadas, K.; Janarthanan, N.; Pritha, R. A short and concise synthesis of guanidines. *Synlett* **1997**, 1053-1054.

- Par méthylation, activation la plus courante pour les thiourées monosubstituées (R^1 ou $R^2 = H$), avec formation d'un intermédiaire *S*-méthylisothiourée⁴¹ :

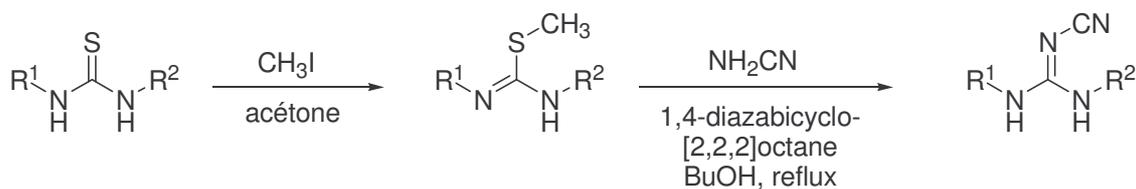


Schéma 8

Cette technique a été testée au sein de notre laboratoire pour synthétiser des guanidines dialkylées et s'est révélée inappropriée pour des molécules poly-azotées, en raison de problèmes de régiosélectivité lors de la méthylation.

- A l'aide du réactif de Sanger⁴² :

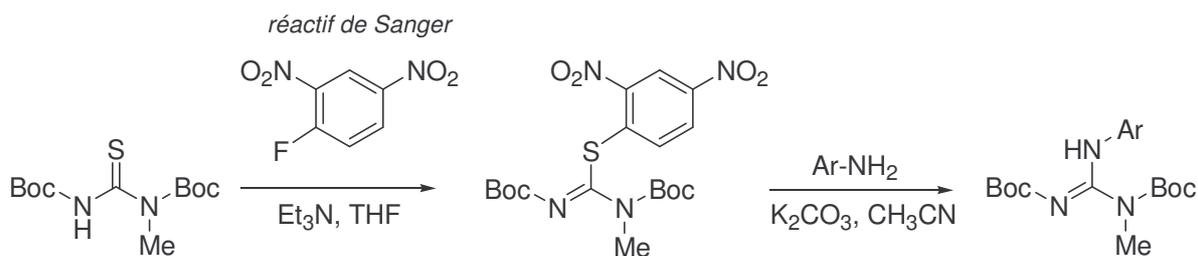
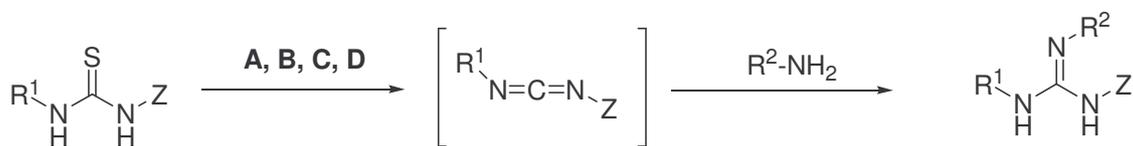


Schéma 9

⁴¹ King, H.; Tonkin, I. M. Antiplasmodial action and chemical constitution. Part VIII. Guanidines and diguanides. *J. Chem. Soc.* **1946**, 1063-1069.

⁴² Lammin, S. G.; Pedgrift, B. L.; Ratcliffe, A. J. Conversion of anilines to bis-Boc protected N-methylguanidines. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6815-6818.

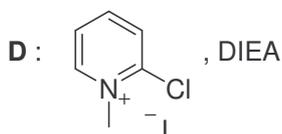
- A l'aide de sels cuivriques⁴³ (CuSO₄ ou CuCl₂), de sels mercuriques⁴⁴ (HgCl₂), d'un agent de couplage de type carbodiimide (EDCI ou éthyl-*N*-diméthylamino-propyl-carbodiimide⁴⁵ par exemple) ou encore du réactif de Mukaiyama⁴⁶ (iodure de 2-chloro-1-méthylpyridinium) :



méthode **A** : CuSO₄, SiO₂, Et₃N

B : HgCl₂ ou CuCl₂, Et₃N

C : EDCI ou DCC ou DIC, Et₃N



réactif de mukaiyama

Schéma 10

Le mécanisme postulé pour tous ces agents de désulfuration est le passage par un intermédiaire carbodiimide (R-N=C=N-Z). Cet intermédiaire, qui est instable, ne peut pas être isolé. Il faut aussi noter que ces différentes méthodes ne sont pas utilisables avec des thiourées monosubstituées. La présence d'un groupe électro-attracteur est nécessaire pour que l'intermédiaire carbodiimide formé puisse réagir avec la seconde amine.

Manimala et Anslyn ont montré, grâce à une étude comparative de divers agents de couplage (réactif de Mukaiyama, de Sanger et EDCI) menée sur différentes thiourées (N-substituées, N-CO₂Et), que le couplage avec l'EDCI permet d'obtenir les guanidines désirées avec de meilleurs rendements et une meilleure pureté. C'est plus particulièrement à cette voie que nous nous sommes intéressés et que nous allons maintenant détailler.

⁴³ Ramadas, K.; Srinivasan, N. An expedient synthesis of substituted guanidines. *Tetrahedron Lett* **1995**, 36, 2841-2844.

⁴⁴ a) Kim, K. S.; Qian, L. Improved method for the preparation of guanidines. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7677-7680, b) Levallet, C.; Lerpiniere, J.; Ko, S. Y. The HgCl₂-promoted guanylation reaction: the scope and limitations. *Tetrahedron* **1997**, 53, 5291-5304.

⁴⁵ Manimala, J. C.; Anslyn, E. V. A highly efficient method for the synthesis of guanidinium derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 565-567.

⁴⁶ Yong, Y. F.; Kowalski, J. A.; Lipton, M. A. Facile and efficient guanylation of amines using thioureas and Mukaiyama's reagent. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 1540-1542.

1.2. Choix de la méthode de synthèse : via une thiourée N-substituée-N'-Z activée par l'EDCI.

Cette méthode a été développée pour la première fois en 1989 par Atwal et al⁴⁷. Ce dernier a préféré utiliser l'EDCI plutôt que le DCC (ou dicyclohexylcarbodiimide) pour deux raisons. La première est que la thiourée correspondante formée (Schéma 11) est soluble dans l'eau, et donc plus facile à éliminer.

La seconde raison, est que le groupement diméthylamino de l'EDCI interviendrait dans la réaction de couplage en formant un intermédiaire tétraédrique activé comme indiqué ci-dessous :

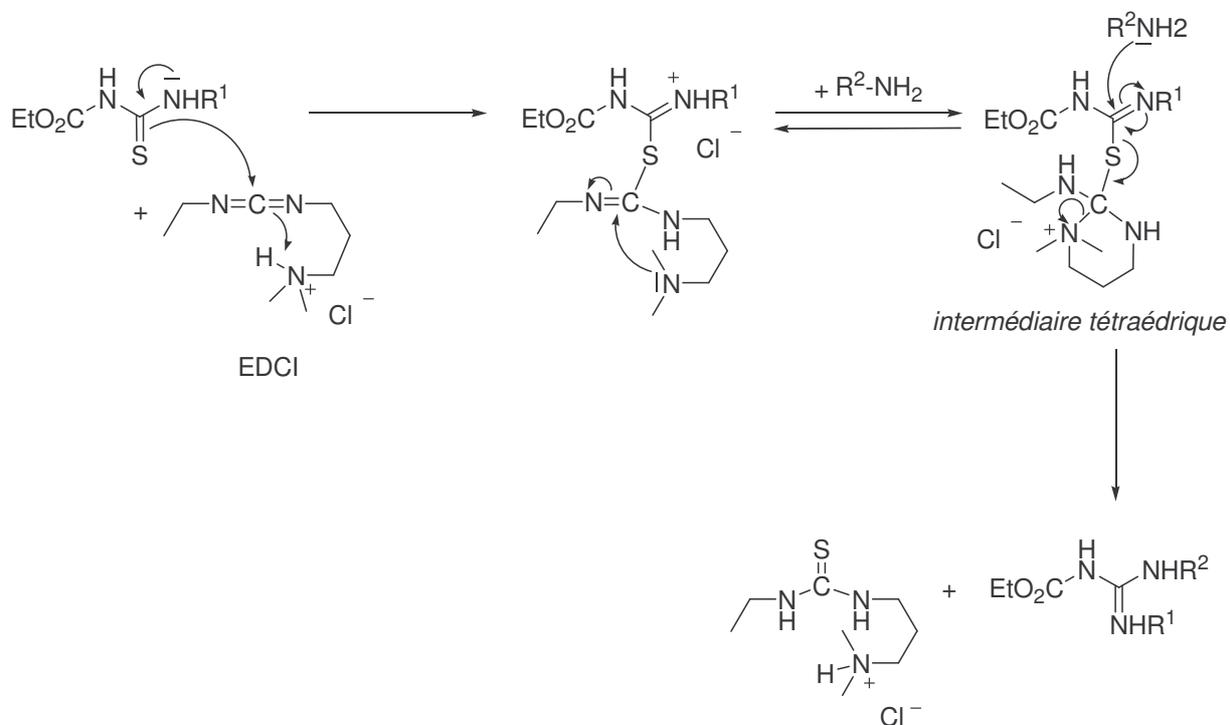


Schéma 11

Remarque : A partir de l'intermédiaire tétraédrique, on peut aussi écrire un intermédiaire carbodiimide sur lequel vient s'ajouter la seconde amine.

⁴⁷ Atwal, K. S.; Ahmed, S. Z.; O'Reilly, B. C. A facile synthesis of cyanoguanidines from thioureas. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 7313-7316.

Cette méthode a été reprise par la suite en 1999 par Hamilton et coll.⁴⁸ qui l'ont appliquée à la synthèse de motifs guanidines protégés à partir d'amines aliphatiques primaires (**A**, **B**), secondaires (**C**, **D**) ou d'amines aromatiques (**E**, **F**, **G**) (Schéma 12).

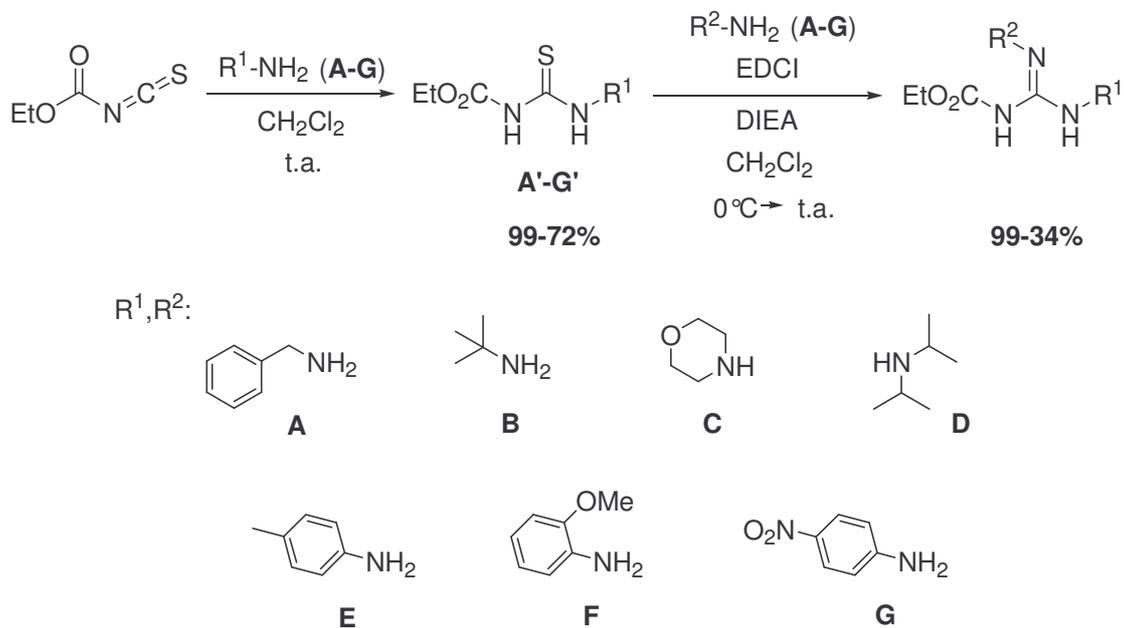


Schéma 12

De ces résultats on peut tirer les informations suivantes :

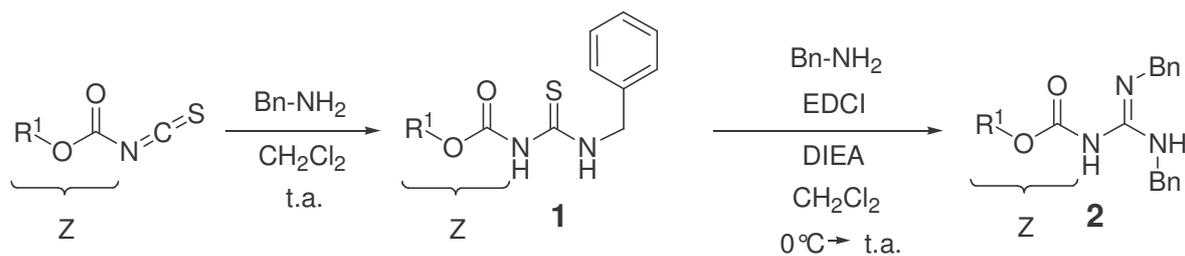
- Les thiourées (**A'-G'**) sont obtenues avec de bons rendements, de 72% à partir de l'amine aromatique la moins nucléophile **G** à 99 % avec l'amine aliphatique **A**. De plus, l'utilisation d'une quantité stoechiométrique d'isothiocyanate EtO₂C-NCS rend la synthèse du motif guanidine, en un seul pot, envisageable.
- La réaction de couplage permettant d'obtenir les guanidines, dépend à la fois de la nature de la thiourée (**A'-G'**) et de la nature de la seconde amine (**A-G**). Par exemple le couplage des thiourées formées à partir d'amines secondaires (**C'** et **D'**) n'est pas possible. Hamilton supposait que cela était dû, soit à l'encombrement, soit à l'absence d'un proton labile sur l'un des azotes de ces thiourées, qui jouerait un rôle important lors du couplage (cette dernière hypothèse a été confirmée plus tard par Ohfuné et coll.⁴⁹).

⁴⁸ Linton, B. R.; Carr, A. J.; Orner, B. P.; Hamilton, A. D. A versatile one-pot synthesis of 1,3-disubstituted guanidines from carbamoyl isothiocyanates. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 1566-1568.

⁴⁹ Shinada, T.; T., U.; Ando, T.; Kozuma, H.; Ohfuné, Y. A new entry for the synthesis of *N*-acyl-*N'*-substituted guanidines. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 1945-1947.

- Les rendements de couplage, sont moins bons lorsque la seconde amine est encombrée ou peu nucléophile comme les amines aromatiques (**E**, **F** et surtout **G**). De même, si la thiourée (**A'**-**G'**) est encombrée ou trop appauvrie en électrons (par exemple **G'**), le couplage avec une seconde amine encombrée ou peu nucléophile s'effectue moins bien voire pas du tout (cas du couplage entre la thiourée **G'** et l'amine **G**).

Hamilton et ses collaborateurs ont aussi fait varier la nature du groupement protecteur **Z** de type carbamate (Schéma 13).



| R¹ | Z | Rendement | |
|----------------------|--------------------|-----------|--|
| | | 1 | 2 |
| | CO ₂ Et | 99% | 99% |
| | CBz | 97% | 99% |
| | TcBoc | 97% | 75% |
| | Fmoc | 97% | élimination du groupe protecteur |
| | CO ₂ Ph | 95% | élimination du groupe protecteur |

Schéma 13

Les meilleurs rendements, que ce soit pour l'obtention de la thiourée ou de la guanidine, sont obtenus avec **Z** = CO₂Et ou CBz (benzyloxycarbonyle).

Par contre lorsque **Z** est un Fmoc (9-fluorénylméthylloxycarbonyl) ou un CO₂Ph (phényloxycarbonyl), le couplage entre la thiourée et la seconde amine ne se produit pas en

raison de l'instabilité de ces groupements protecteurs dans ces conditions jugées trop basiques.

Cette étude approfondie du groupe d'Hamilton nous a permis de cerner quelques limites de cette voie de synthèse avec l'EDCI. Dans notre cas, comme il a été dit précédemment, les amines exocycliques des dérivés de proflavine étant peu nucléophiles, il nous a semblé alors préférable de synthétiser l'intermédiaire thiourée à partir de l'aminoacridine puis de le coupler avec la seconde amine qui est aliphatique et donc plus nucléophile (Schéma 14).

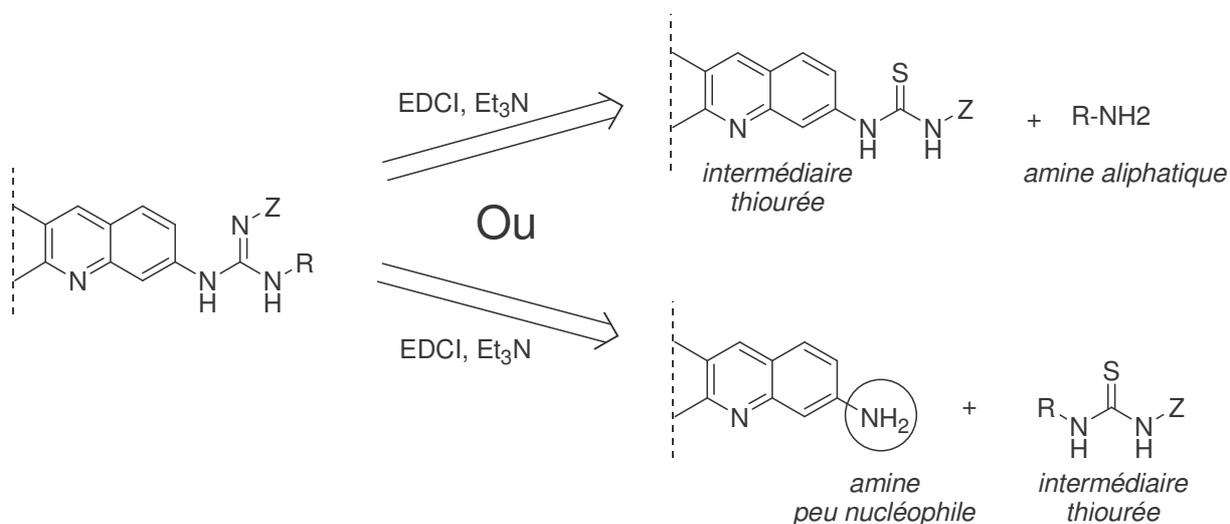


Schéma 14

Quant à la thiourée *N*-acridinyl-*N'*-Z, elle devrait être obtenue à partir de l'isothiocyanate Z-NCS correspondant.

1.3. Synthèse de la thiourée *N*-substituée-*N'*-Z : choix de l'isothiocyanate Z-NCS.

- Les isothiocyanates Z-NCS commerciaux.

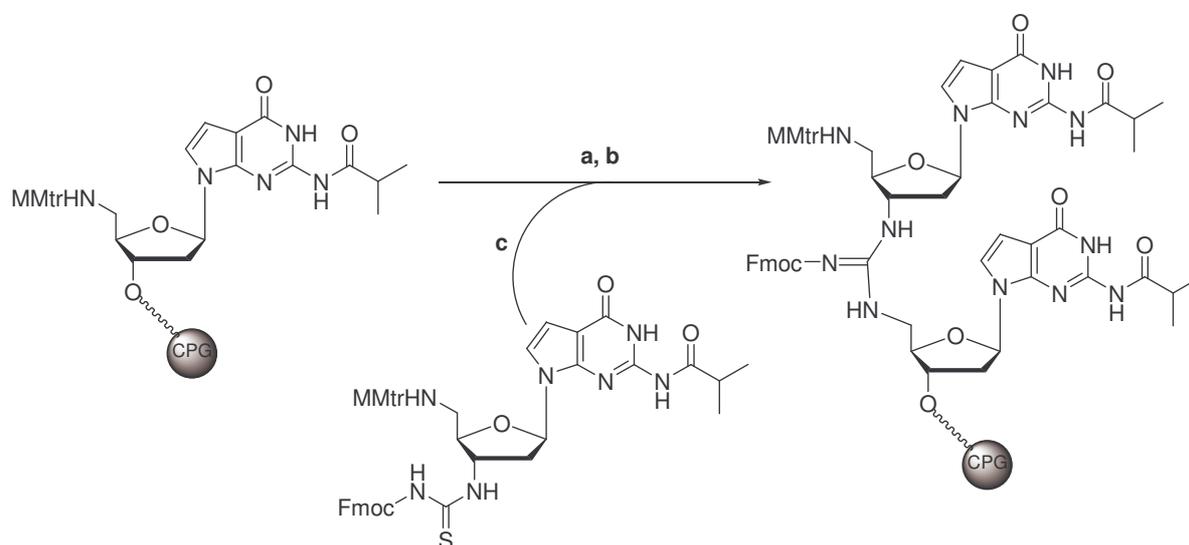
Parmi les nombreux isothiocyanates utilisés pour la synthèse de guanidines disubstituées et décrits dans la littérature, trois seulement sont commerciaux : l'éthoxycarbonyl d'isothiocyanate (EtO₂C-NCS), le fluorénylméthoxycarbonyl d'isothiocyanate (Fmoc-NCS) pour lesquels les groupes protecteurs sont de type carbamate, et le benzoyl d'isothiocyanate (Bz-NCS) où le groupe protecteur Bz (PhCO) est de type amide.

Cependant, les dérivés benzoylés ont été peu utilisés à cause des conditions drastiques nécessaires à leur déprotection.

Hamilton et coll. ont montré que les groupements protecteurs Fmoc et CO₂Ph n'étaient pas stables dans les conditions de couplage d'Atwal (EDCI, amine tertiaire employée comme base).

Toutefois nous avons trouvé dans la littérature, deux alternatives applicables à notre stratégie permettant l'utilisation de ce groupe protecteur Fmoc :

- 1) La première alternative a été développée par Jain et Bruice⁵⁰ qui ont su contourner cette limitation dans la synthèse sur support solide d'oligomères modifiés comportant un motif guanidine. Pour ce faire ils ont opéré à partir de thiourées *N*-substituées-*N'*-Fmoc en utilisant un sel mercurique (HgCl₂) comme agent de couplage (Schéma 15).



conditions: (a) Capping: (CH₃CO)₂O, TFA, DMF, 10min

(b) Déprotection: 4% DCA dans CH₂Cl₂, 1min

(c) Couplage: HgCl₂, TEA, DMF, 3h après 20% PhSH dans DMF, 1min

Schéma 15

- 2) L'autre alternative est basée sur une méthode développée par Poss et al.⁵¹. Elle consiste, à partir d'intermédiaires thiourées *N*-substituées-*N'*-Bz, à remplacer ce groupement protecteur benzoylé par un groupement Boc (*tert*-butoxycarbonyle), qui est quant à lui, stable dans les conditions de couplage avec l'EDCI (Schéma 16).

⁵⁰ Jain, M. L.; Bruice, T. C. Solid-phase synthesis of positively charged deoxynucleic guanidine (DNG) oligonucleotide incorporating 7-deazaguanine bases. *Biorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 7333-7346.

⁵¹ Poss, M. A.; Iwanowicz, E. J.; Reid, J. A.; Lin, J.; Gu, Z. A mild and efficient method for the preparation of guanidines. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5933-5936.

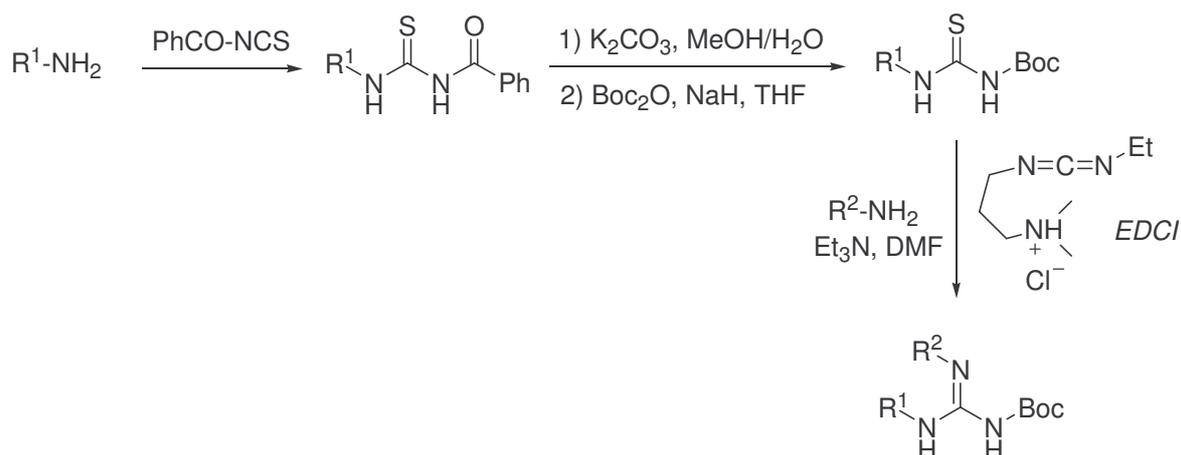


Schéma 16

A partir d'une thiourée *N*-substituée-*N'*-Fmoc, il serait possible de procéder de manière analogue en déprotégeant le groupement Fmoc, puis en reprotégeant l'amine libre par un groupement Boc dans les conditions décrites par Poss et al.

Cependant K. Alarcon³⁷ avait testé cette méthode et avait noté qu'elle était délicate à mettre en œuvre. A partir de la thiourée déprotégée, il est en effet difficile de reprotéger l'amine libre sélectivement.

Au cours de ses essais, K. Alarcon a obtenu différents produits issus d'une bis-protection sur l'amine libre ou même d'une substitution sur l'atome du soufre, mais pas le dérivé mono-protégé recherché (Schéma 17).

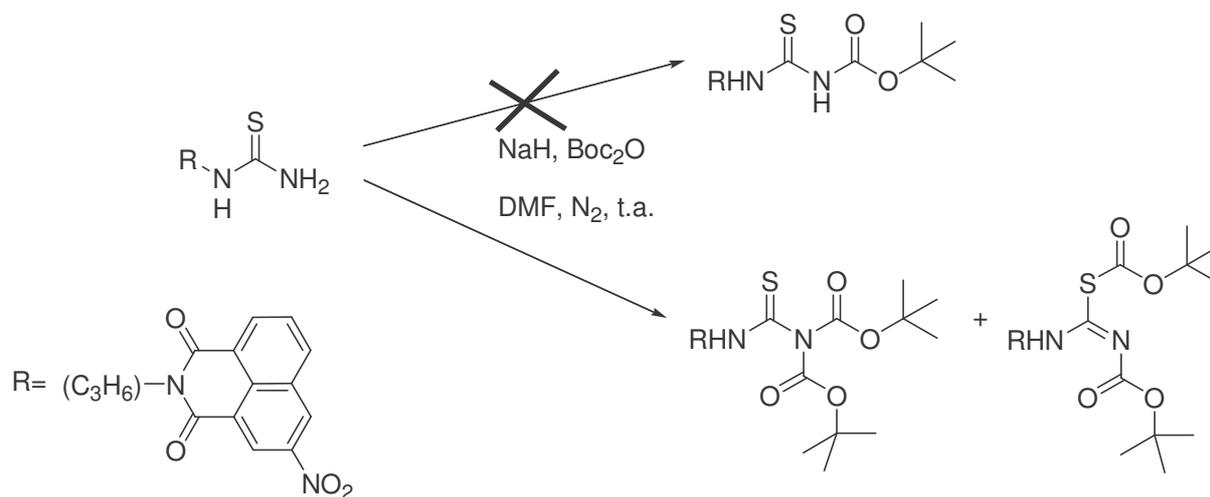


Schéma 17

➤ Préparation des isothiocyanates Z-NCS non commerciaux.

Il est possible de préparer d'autres isothiocyanates Z-NCS non commerciaux par réaction entre le thiocyanate de potassium (KSCN) et un chlorure d'acyle (RCOCl) ou un chloroformiate (RO₂CCl) (Schéma 18).

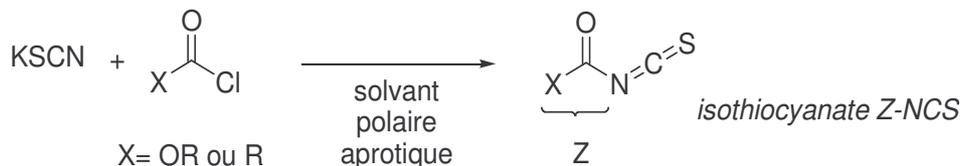


Schéma 18

Notons que KSCN ne réagit pas avec les anhydrides et, en particulier, avec le bis(*tert*-butoxy)carbonate (Boc₂O).

Généralement les isothiocyanates Z-NCS ne sont pas isolés à cause de leur instabilité mais engagés directement en réaction avec l'amine requise.

Schroif-Gregoire et al.⁵² ont récemment utilisé cette méthode pour préparer à partir de l' α -(+)-méthylbenzylamine la thiourée *N*-Troc correspondante (Troc ou trichloroéthoxycarbonyle) (Schéma 19). L'isothiocyanate Troc-NCS est préparé *in-situ* et la thiourée *N*-méthylbenzyl-*N'*-Troc est obtenue avec un rendement de 51%. Ce rendement moyen s'explique par la présence d'un sous-produit : le dérivé carbamate correspondant et ceci implique des étapes de purification.

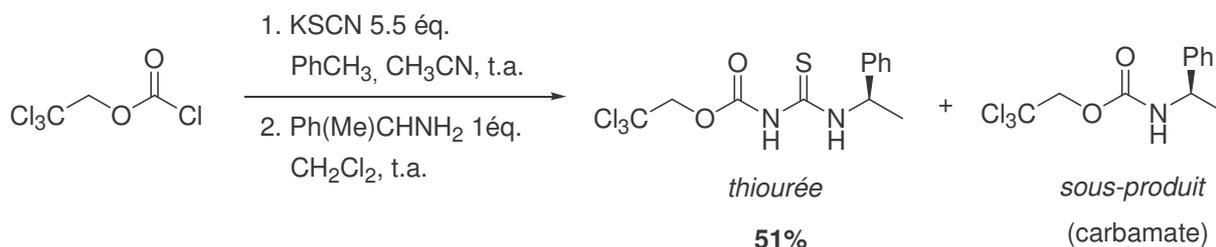
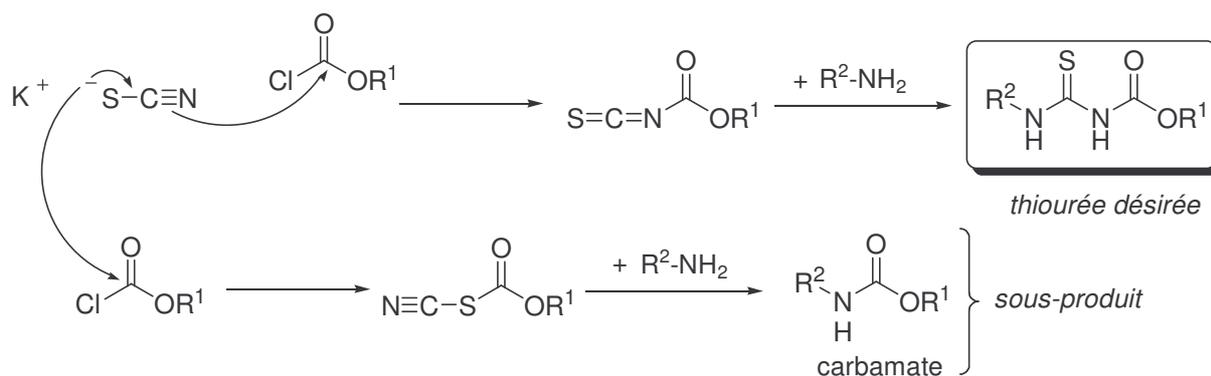


Schéma 19

⁵² Schroif-Gregoire, C.; Barale, K.; Zaparucha, A.; Al-Mourabit, A. Preparation of N-alkyl-N'-carboalkoxy guanidines: unexpected effective trans-alkoxylation transforming the 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl into various carbamates. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 2357-2359.

K. Alarcon avait aussi utilisé cette méthodologie pour préparer des thiourées *N*-alkyles-*N'*-Troc. Elle avait noté que les thiourées recherchées étaient obtenues avec des rendements très moyens, et ceci pour les mêmes raisons que celles évoquées par Schroif-Gregoire et al.

Si l'on considère qu'au moment de rajouter l'amine, le 2,2,2-trichloroéthyle chloroformiate (Troc-Cl) est totalement consommé, l'explication la plus plausible pour justifier la présence de ce sous-produit carbamate est la réactivité de l'atome de soufre du thiocyanate de potassium avec le chloroformiate qui donne, après ajout de l'amine, le carbamate correspondant et non la thiourée voulue (Schéma 20).



Ce caractère nucléophile ambident du thiocyanate de potassium avait déjà été discuté auparavant par Elmore et al.⁵³

La préparation et l'utilisation d'isothiocyanates Z-NCS non commerciaux nécessitent donc des étapes délicates de purification pour éliminer le sous-produit carbamate. Les dérivés d'acridine étant très polaires et peu solubles, il est préférable d'éviter des étapes de purification par chromatographies sur colonne.

C'est pourquoi nous nous sommes limités à l'utilisation d'isothiocyanates Z-NCS commerciaux.

1.4. Conclusion.

En se basant sur les études faites par K. Alarcon durant sa thèse³⁷ et les données de la littérature, il nous a semblé judicieux de synthétiser le motif guanidine de la manière suivante (Schéma 21) :

⁵³ Elmore, D. T.; Ogle, J. R.; Fletcher, W.; Toseland, P. A. 858. Acyl isothiocyanates. Part I. The synthesis of esters *N*-Acyl dithiocarbamic acids. *J. Chem. Soc.* **1956**, 4458-4463.

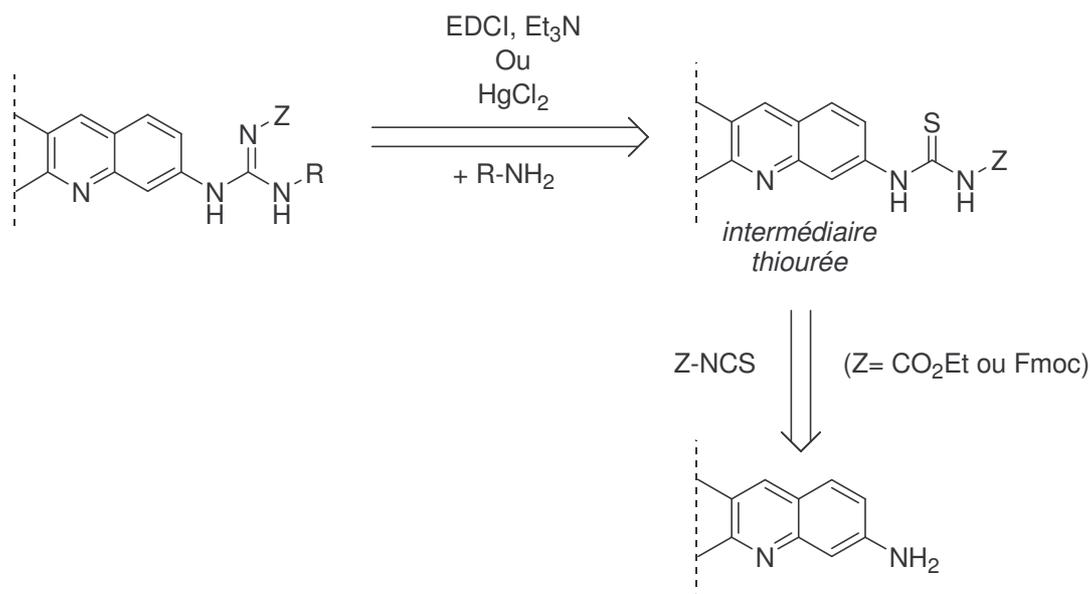


Schéma 21

A partir de la thiourée *N*-acridinyl-*N'*-Z (Z= CO₂Et ou Fmoc), le couplage avec la seconde amine aura lieu soit en présence d'EDCI (méthode d'Atwal) lorsque Z= CO₂Et soit en présence d'HgCl₂ lorsque Z= Fmoc (méthode de Bruice).

2. Choix de la stratégie de synthèse.

Pour synthétiser le dérivé aminoalcool **5** à partir de la 3,6-diaminoacridine (proflavine), F. Charmantray⁵⁴ avait mis au point une stratégie de synthèse en 6 étapes à partir de la proflavine (Schéma 22) :

⁵⁴ Charmantray, F. Une Nouvelle Famille d'Intercalants-Alkylants de l'ADN. Synthèse et Etude de Dérivés d'Acridines. Université Joseph Fourier, Grenoble, 2001.

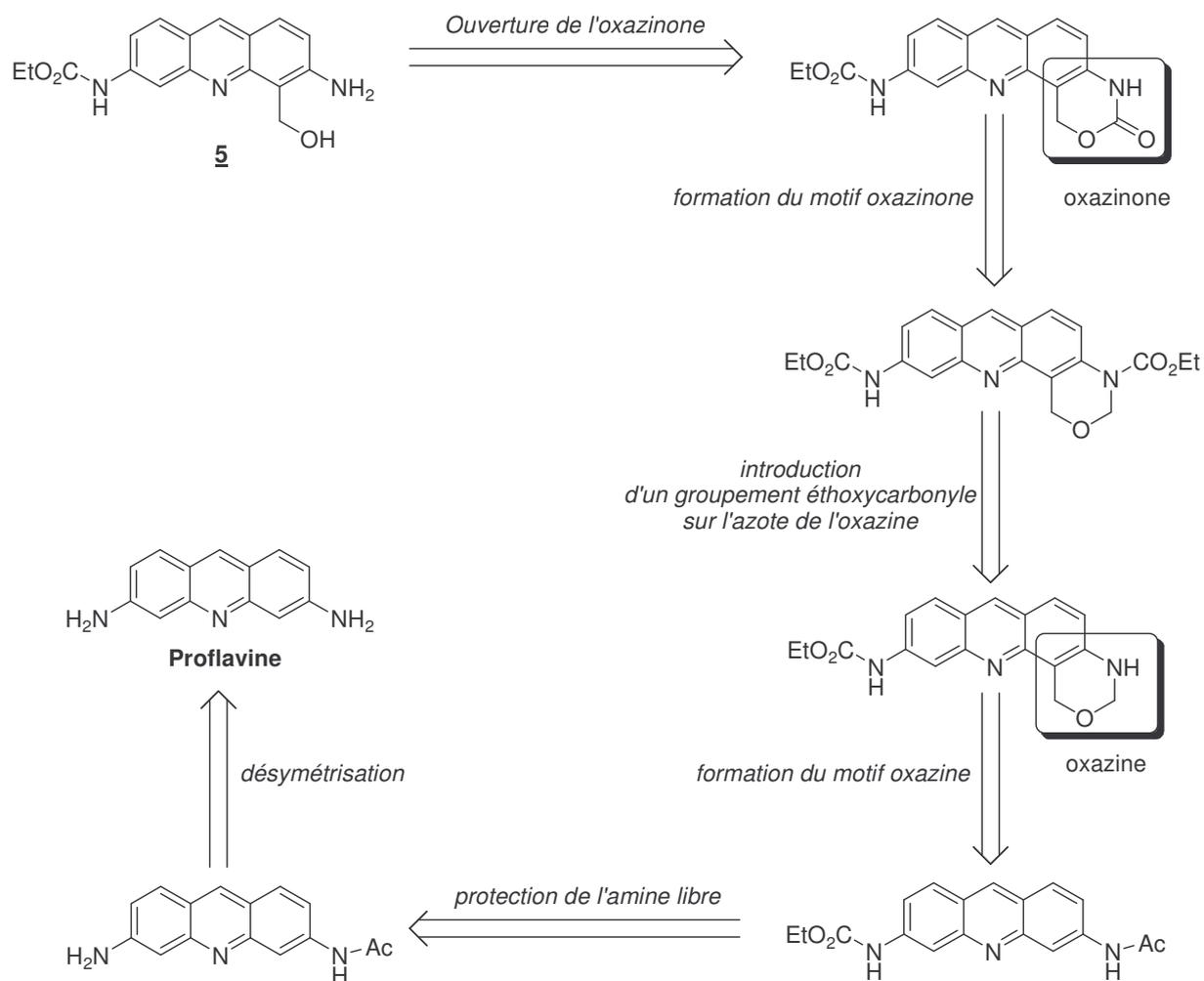


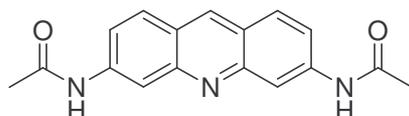
Schéma 22

- 1) Désymétrisation de la proflavine par monoacétylation réalisée dans l'acide propionique à -12°C en présence d'anhydride acétique (Ac_2O).
- 2) Protection de la fonction amine libre par un carbamate, l'éthoxycarbonyle (ou CO_2Et), introduit par action de chloroformiate d'éthyle dans la pyridine à température ambiante.
- 3) Formation en milieu acide (HCl 11N) du motif oxazine (ou cycle dihydrooxazine), obtenu par substitution électrophile aromatique, en présence d'un large excès de formaldéhyde aqueux à 37% en chauffant 45°C .
- 4) Introduction sur l'azote de l'oxazine d'un groupement éthoxycarbonyl par action de chloroformiate d'éthyle à 0°C .
- 5) Formation de l'oxazinone (ou cycle dihydrooxazinone) par une réaction de transcarbamoxylation réalisée dans l'acide méthanesulfonique 99% (ou MsOH) en chauffant à 80°C .

- 6) Ouverture du cycle oxazinone par hydrolyse basique dans un mélange THF/NaOH 0,4N en chauffant à 60°C.

Cette voie de synthèse étant le point de départ de nos travaux, il nous paraît utile de faire quelques commentaires :

- L'introduction d'un groupe hydroxyméthyle en position *ortho* de la fonction amine nécessite quatre étapes dont les étapes-clés sont la synthèse du cycle oxazine, précurseur du cycle oxazinone, et la synthèse de ce dernier, précurseur du motif aminoalcool. Les conditions opérationnelles mises en jeu lors de ces deux étapes sont drastiques (milieux acides forts). Le reste de la voie de synthèse met en jeu des réactions de protection/déprotection des fonctions amines.
- La première étape de monoacétylation de la proflavine a été mise au point par A. Wardani⁵⁵. Elle peut être effectuée sur plusieurs grammes de proflavine. Le dérivé monoacétylé est généralement obtenu avec de bons rendements (70-80%). Cependant on observe souvent la formation de la bis-acétamidoacridine comme produit secondaire (Figure 35).



bis-acétamidoacridine

Figure 35

Les deux composés étant de polarité très voisine, il est très difficile de les séparer. La purification est souvent effectuée lors d'une étape ultérieure. Ce groupe acétyle est hydrolysé dans les conditions de synthèse du motif oxazine. D'autres groupes protecteurs (Boc, éthoxycarboxyle) ont aussi été utilisés pour mono-protéger la proflavine⁵⁶. Cependant, les réactions se sont avérées peu reproductibles et nécessitent toujours une étape délicate de purification par chromatographie sur colonne.

- La formation régiosélective du cycle oxazine (étape 3) par substitution électrophile nécessite la protection de la seconde amine par un groupement stable en milieu acide

⁵⁵ Wardani, A. Recherche de Nouveaux Intercalants à Propriétés Antitumorales : Synthèse, Etudes Physicochimiques et Biologiques en Série Benzo [b] Phenanthroline-1,7. Thèse de doctorat, Bruxelles, 1989.

⁵⁶ a) Lorente, A.; Fernandez-Saiz, M.; Espinosa, J. F.; Jaime, C.; Lehn, J. M.; Vigneron, J. P. Cyclo-bis-intercalands with acridine subunits linked by rigid spacers. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 5261-5264, b) Lorente, A.; Espinosa, J. F.; Fernandez-Saiz, M.; Lehn, J.-M.; Wilson, D. W.; Zhong, Y. Y. Synthesis of imidazole-acridine conjugates as ribonuclease A mimics. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 4417-4420.

(HCl 6N à 11N), et désactivant la position *ortho* vis-à-vis de la substitution électrophile. Plusieurs groupements ont été utilisés (mésyle, tosyle, éthoxycarbone). Dans la stratégie de synthèse présentée sur le schéma 22, c'est le groupe éthoxycarbone qui est représenté (étape 2). Le composé monoacétylé-monoéthoxycarbone est facilement séparable du sous-produit bis-acétylé, ce qui justifie la mise en œuvre de la synthèse en deux étapes.

On notera que ce groupe est conservé dans la molécule finale. Il n'est pas hydrolysé dans les conditions basiques d'ouverture du cycle oxazinone (étape 6).

- La transformation du cycle oxazine en oxazinone met en jeu une réaction de transcarbamylation intramoléculaire (étape 5). Elle nécessite l'introduction d'un groupement alkyloxycarbone sur l'azote de l'oxazine (étape 4). Plusieurs groupements ont été testés : 2,2,2-trichloroéthoxycarbone (Troc), *tert*-butoxycarbone (Boc) ou éthoxycarbone (CO₂Et). C'est ce dernier groupe qui s'est avéré le plus intéressant.

La 3(4*H*)-one-[1,3]oxazino[4,5-*c*]acridine obtenue est un analogue hétérocyclique des dérivés de type [1,3]benzoxazin-2-one qui possèdent des propriétés biologiques intéressantes⁵⁷ (antagonistes d'oxytocine, anxiolytiques, inhibiteurs de la transcriptase inverse du virus HIV). Ces dérivés sont généralement préparés à partir d'alcools benzyliques *ortho*-aminés, par cyclisation avec le phosgène⁵⁸. On trouve aussi une voie de synthèse qui met en jeu la lithiation en *ortho* de dérivés *tert*-butoxycarbonylaniline suivie de la réaction avec des cétones, des aldéhydes ou du DMF⁵⁹ (Schéma 23). D'autres réactions de cyclisation intramoléculaire ont aussi été

⁵⁷ a) Diouf, O.; Carato, P.; Depreux, P.; Bonte, J. P.; Caignard, D. H.; Guardiola-Lemaitre, B.; Rettori, M. C.; Belzung, C.; Lesieur, D. 5-HT1A and 5-HT2A ligands with anxiolytic and antipanic-like properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2579-2584, b) Thompson, L. A.; Ellman, J. A. Straightforward and general method for coupling alcohols to solid supports. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 50, 9333-9336, c) Williams, P. D.; Clineschmidt, B. V.; Erb, J. M.; Freidinger, R. M.; Guidotti, M. T.; Lis, E. V.; Pawluczyk, J. M.; Pettibone, D. J.; Reiss, D. R.; Veber, D. F.; Woyden, C. J. 1[1-[(*N*-acetyl-4-piperidinyloxy]-2-methoxybenzoyl]piperidin-4-yl]-4*H*-3,1-benzoxazin-2(1*H*)-one. A new orally bioavailable, non-peptide oxytocin antagonist. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 4634-4636.

⁵⁸ a) Consonni, R.; Dalla Croce, P.; Ferraccioli, R.; La Rosa, C. Diels-Alder reactions of *N*-sulfonyl substituted aza-ortho-xylylenes generated from the corresponding 1,4-dihydro-2*H*-3,1-benzoxazin-2-one derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 1809-1814, b) Nikam, S. S.; Yuen, P.-W.; Kornberg, B. E.; Tobias, B.; Rafferty, M. F. Novel use of substituted 1,4-dihydrobenz[d][1,3]oxazin-2-ones in the synthesis of important aminomethyl *o*-nitroanilines. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 9331-9334.

⁵⁹ a) Carretero, J. C.; Ruano, J. L. G.; Vicioso, M. A practical route to C-8 substituted fluoroquinolone. *Tetrahedron* **1992**, 48, 7373-7382, b) Tye, H.; Eldred, C.; Wills, M. The synthesis of a synthetic receptor via directed lithiations of dibenzofuran and bibenzothiophene. *Synlett* **1995**, 770-772.

proposées⁶⁰. Toutefois, à notre connaissance, aucune méthode impliquant une substitution électrophile aromatique n'a été publiée.

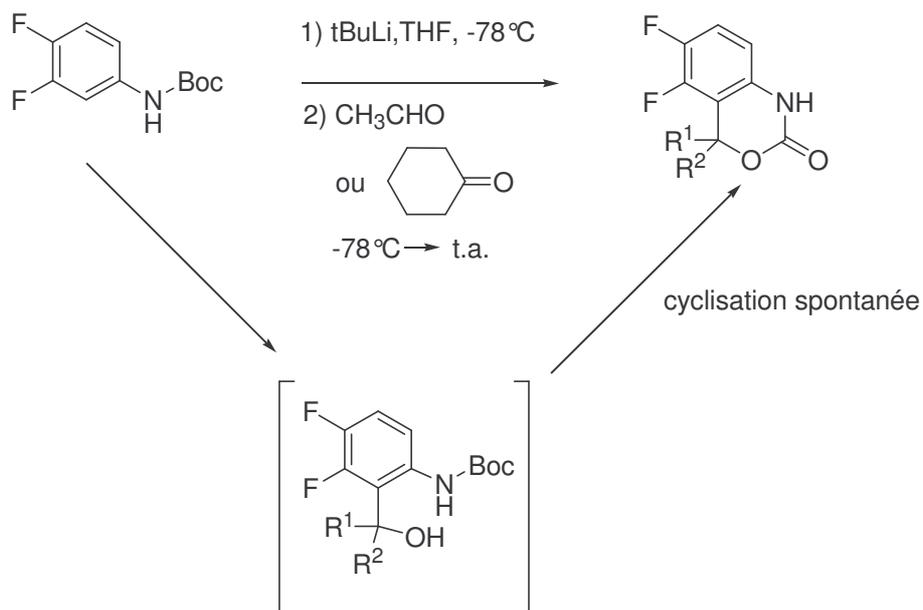


Schéma 23

Notre stratégie de synthèse mettra en jeu les deux étapes-clés citées ci-dessus (synthèse des motifs oxazine et oxazinone). Cependant, il nous faudra pouvoir éliminer le groupe protecteur de la seconde fonction amine pour la transformer en guanidine, et ceci dans des conditions douces compatibles avec la réactivité des cycles oxazine ou oxazinone. Il sera donc impératif de remplacer le groupement éthoxycarbonyle par un autre groupe protecteur.

Deux grandes voies étaient alors envisageables à partir de la proflavine mono-acétylée **6**:

- 1) soit la synthèse dans un premier temps, du motif guanidine (voie **A**, Schéma 24) en considérant que celui-ci (ou son intermédiaire thiourée) servirait aussi de groupement protecteur de l'amine libre et qu'il résisterait aux diverses conditions acides. Le motif oxazinone, via le motif oxazine, serait ensuite synthétisé dans les conditions précédemment décrites.
- 2) soit la synthèse initiale du motif oxazinone (voie **B**, Schéma 24) puis celle du motif guanidine sur l'autre partie de la molécule.

⁶⁰ a) Barton, J. W.; Pearson, N. D. Cinnolines. Part 1. Widman-Stoermer reactions of functionalised 2-phenylbut-2-enes to give cinnolinecarbaldehydes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1987**, 1541-1545, b) Molina, P.; Arques, A.; Molina, A. A novel and efficient synthesis of 4*H*-[3,1]benzoxazines by a tandem Aza-Wittig/heterocumulene mediated annulation strategy. *Synthesis* **1991**, 21-23.

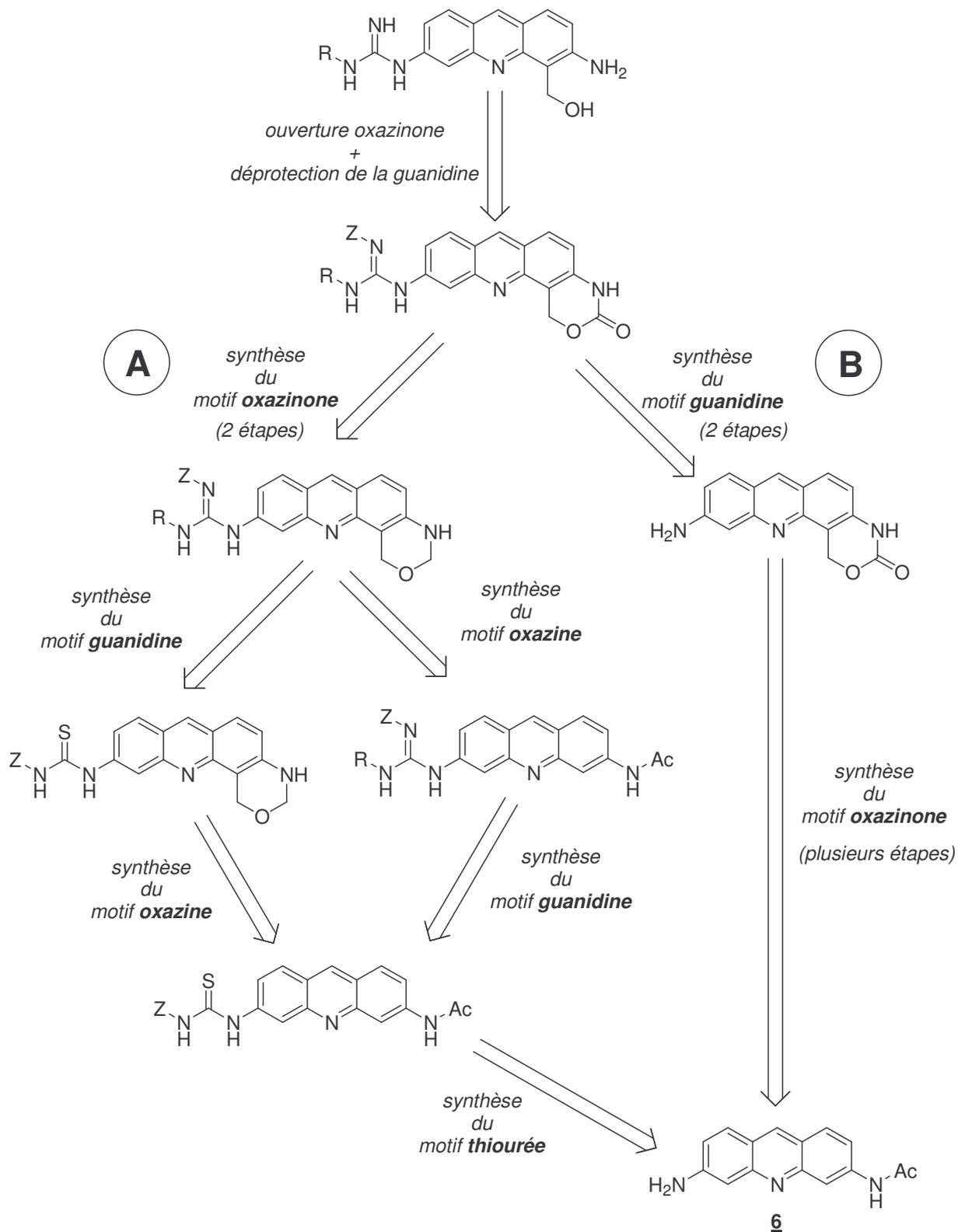


Schéma 24

La première étape, commune aux deux stratégies, est la désymétrisation de la proflavine. Cette dernière est réalisée par monoacétylation en présence d'anhydride acétique dans l'acide propionique à -12°C (Schéma 25). Le choix de l'acide propionique comme solvant réside dans le fait que celui-ci permet d'effectuer la réaction à -12°C .

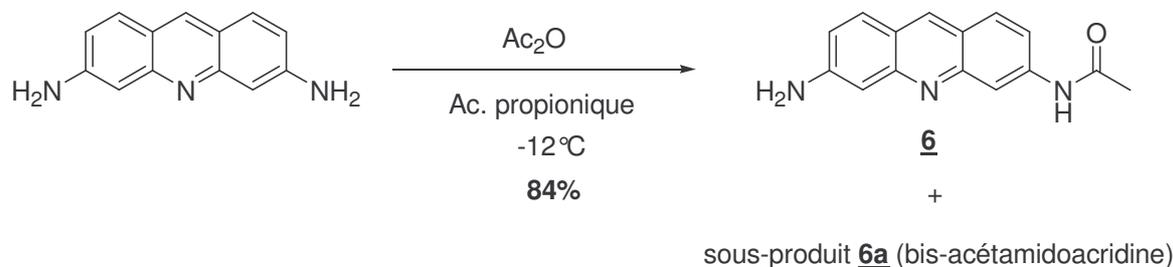


Schéma 25

Nous avons ensuite testé successivement les deux voies de synthèse (**A** et **B**).

3. Voie A.

3.1. Synthèse du motif guanidine.

Rappelons que le motif guanidine est synthétisé en deux étapes. Dans un premier temps on synthétise un intermédiaire de type thiourée en faisant réagir l'amine libre du dérivé **6** sur un isothiocyanate Z-NCS (ou Z est un groupe protecteur). Cette thiourée est ensuite couplée avec une seconde amine en présence d'un agent de couplage (EDCI (lorsque Z=CO₂Et) ou HgCl₂ (lorsque Z= Fmoc)) et d'une base (une amine tertiaire, généralement la triéthylamine (Et₃N)).

Dans cette voie, nous avons choisi de synthétiser le motif guanidine avant les motifs oxazine et oxazinone. Pour éviter d'éventuelles réactions secondaires entre la guanidine déprotégée et les différents réactifs utilisés dans la suite de la synthèse (comme par exemple le formaldéhyde lors de l'élaboration du motif oxazine) et pour faciliter les étapes de purification, il s'avère plus judicieux de garder ce groupement protecteur Z jusqu'à la synthèse du motif oxazinone (Schéma 24). On pourra ainsi déprotéger la guanidine avant ou pendant l'étape d'ouverture de l'oxazinone.

Pour ces raisons le groupement protecteur Z doit être stable en milieu acide (HCl concentré et MsOH 99%) et sa déprotection doit pouvoir être réalisée soit dans des conditions compatibles avec la stabilité du motif oxazinone soit, idéalement, dans des conditions

basiques. Ceci permettrait d'ouvrir par la même occasion, l'oxazinone et d'obtenir ainsi les dérivés aminoalcools souhaités.

Les deux isothiocyanates Z-NCS commerciaux (avec Z= CO₂Et ou Fmoc) répondent à ces critères puisque ces deux groupes protecteurs d'amines sont connus pour être stables en milieu acide et présentent, dans notre cas l'avantage, d'être clivables en milieu basique.

Bien que l'isothiocyanate Fmoc-NCS soit commercial, nous avons préféré le synthétiser par la méthode classique consistant à faire réagir le chloroformiate correspondant avec le thiocyanate de potassium⁶¹ (Schéma 26). Cet isothiocyanate Z-NCS présente l'avantage d'être stable et peut être purifié par chromatographie sur colonne de silice.

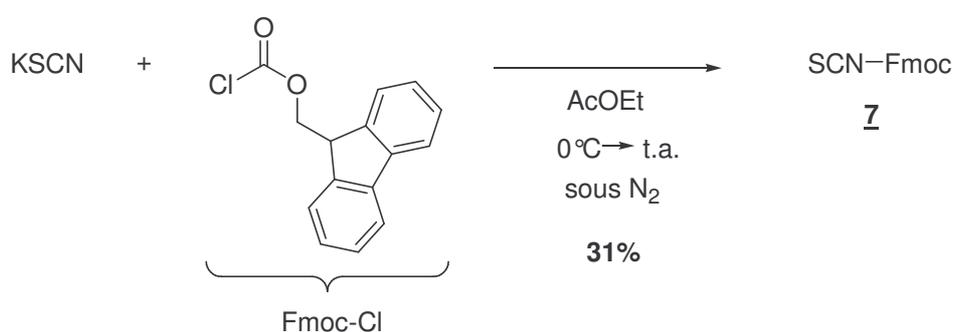


Schéma 26

Le traitement du chloroformiate de fluorénylméthyle avec le thiocyanate de potassium dans l'acétate d'éthyle (AcOEt) permet d'obtenir l'isothiocyanate Fmoc-NCS 7 avec un rendement de 31% après purification sur colonne de silice. Le rendement est faible mais la synthèse peut être réalisée sur une échelle importante.

3.1.1. Synthèse des thiourées 8 et 9.

Pour des raisons de solubilité du produit de départ 6, les réactions (Schéma 27) ont été effectuées dans le DMF anhydre. Les réactions sont suivies par CLHP.

⁶¹ Kearney, P. C.; Fernandez, M.; Flygare, J. A. Solid-phase Synthesis of 2-Aminothiazoles. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 196-200.

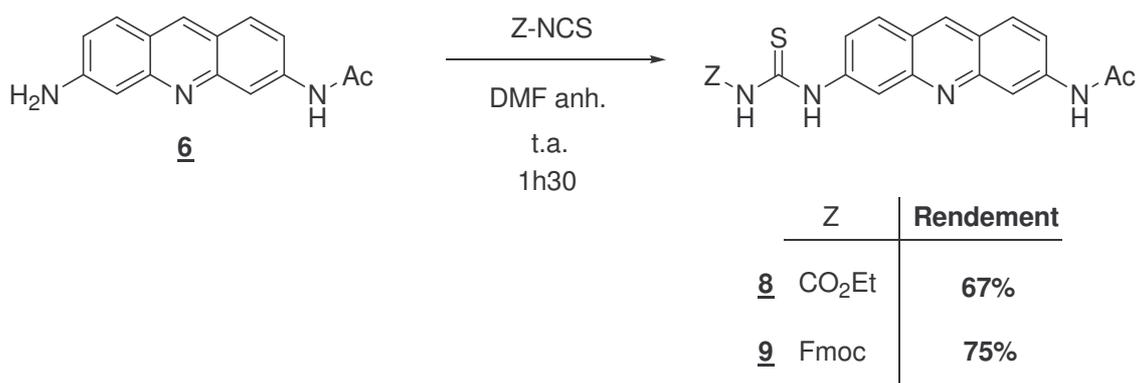


Schéma 27

Malgré la faible nucléophilie de l'amine libre du dérivé **6**, la réaction se produit sans problème et 1,1 équivalents d'isothiocyanate Z-NCS (Z= CO₂Et ou Fmoc) suffisent pour qu'elle soit totale. Après précipitation dans l'eau, les thiourées **8** et **9** sont obtenues avec des rendements satisfaisants.

En RMN du proton, dans le DMSO-*d*₆, on peut constater l'apparition pour les deux dérivés **8** et **9** des signaux des deux NH du motif thiourée qui sont plus déblindés que le NH de l'amide (NHAc), ainsi que la disparition du signal sous forme de singulet des protons portés par l'amine libre NH₂ en position 6. Ceci confirme bien la présence du motif thiourée.

3.1.2. Synthèse des guanidines protégées **10** et **11**.

Les premiers essais de couplage des thiourées **8** et **9** ont été réalisés avec la 3-(diméthylamino)propylamine dans le DMF et en présence de Et₃N. L'avancement des réactions a été suivi par CLHP.

➤ Synthèse de la guanidine **10**.

Le couplage de la thiourées **8** (Schéma 28) avec la 3-(diméthylamino)propylamine a été réalisé en présence d'EDCI comme agent de couplage à 60°C.

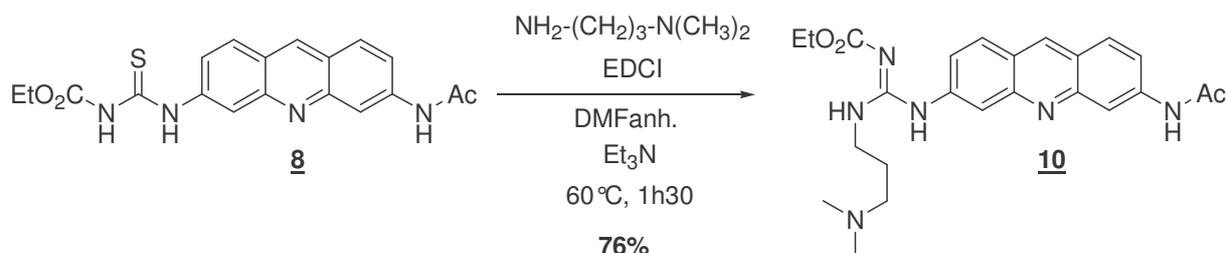


Schéma 28

Le dérivé guanidine **10** est obtenu par précipitation en milieu basique aqueux avec une pureté estimée supérieure à 90% par CLHP.

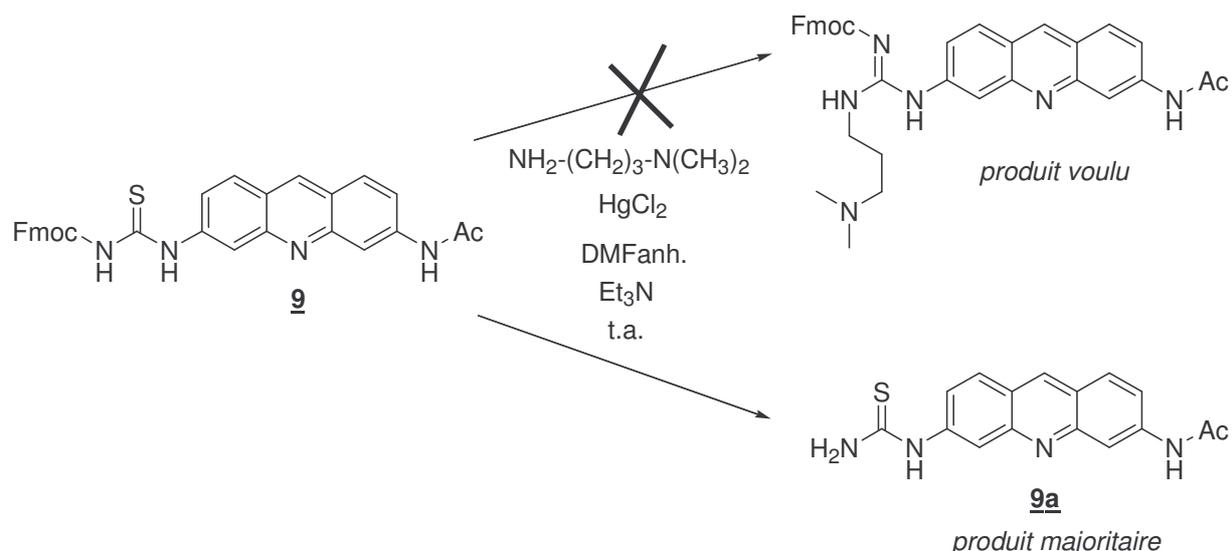
Malgré la présence du groupement protecteur CO₂Et, le composé **10** reste trop polaire pour pouvoir être purifié par chromatographie sur gel de silice ou d'alumine et trop peu soluble pour pouvoir être recristallisé. Après plusieurs lavages à l'éthanol pour éliminer les impuretés, le composé **10** est obtenu avec un rendement de 76%.

En RMN du proton, dans le MeOH-*d*₄, on observe l'apparition des signaux de la chaîne propyle ainsi que celui correspondant aux deux résidus méthyles N(CH₃)₂ sous la forme d'un singulet intégrant pour 6 protons.

➤ Synthèse de la guanidine **11**.

En traitant la thiourée **9** avec la 3-(diméthylamino)propylamine en présence d'HgCl₂ à température ambiante, on observe en CLHP, après 4 heures la formation de plusieurs produits dont un majoritaire (Schéma 29). Notons que ce dernier présente le même temps de rétention que le produit déprotégé **9a**, déjà synthétisé auparavant au laboratoire. Contrairement à la méthode impliquant l'EDCI, l'utilisation d'HgCl₂ nécessite une destruction du dérivé de mercure issu de la désulfuration (HgS). Après traitement de la réaction, le produit brut est directement analysé en spectrométrie de masse.

L'analyse en spectrométrie de masse ESI de ce produit brut de réaction révèle la présence de l'ion moléculaire (M+H⁺) à 310,9 correspondant au produit **9a**. Ceci confirme bien qu'une coupure du groupement Fmoc se produit dans ces conditions.



Parallèlement, nous avons vérifié qu'en mettant la thiourée **9** en présence d'une amine aliphatique primaire sans agent de couplage on observait la coupure du groupement Fmoc. Cette méthode de couplage de thiourée *N*-substituée-*N'*-Fmoc avec HgCl_2 n'est apparemment valable que pour la synthèse de guanidine sur support solide⁶², permettant l'utilisation d'un très large excès de réactif (excès de thiourée/amine).

A partir de là, nous avons réalisé les essais de synthèse du motif oxazine à partir des dérivés de la thiourée **8** et de la guanidine **10** (pour laquelle $\text{Z} = \text{CO}_2\text{Et}$).

3.2. Synthèse du motif oxazine à partir de la thiourée **8**.

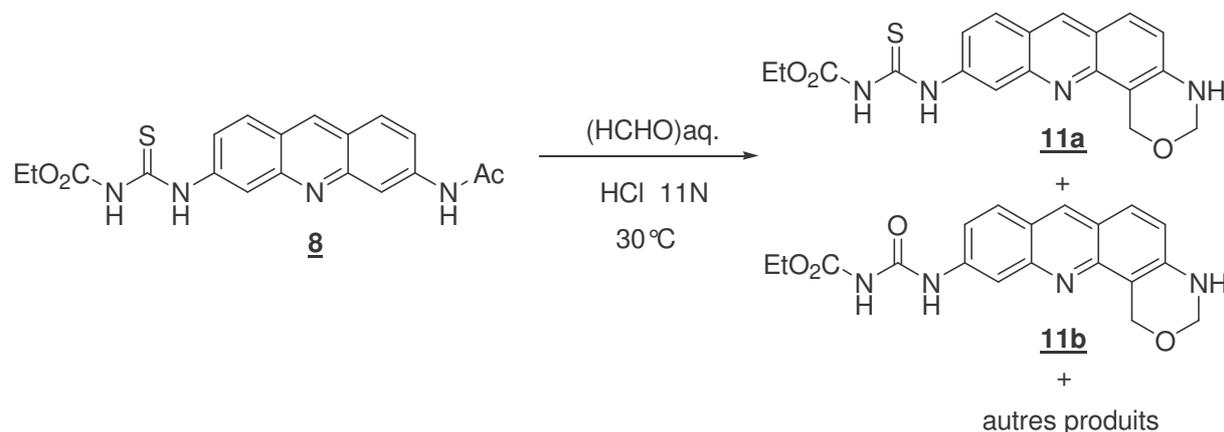
Pour synthétiser le motif oxazine à partir de la thiourée **8**, nous avons employé les conditions mises au point par F. Charmantray⁵⁴.

En traitant la thiourée **8** dans HCl 11N par un large excès de formaldéhyde aqueux et en chauffant à 30°C, on observe par CCM la formation de plusieurs produits. Après disparition totale du produit de départ, la solution est rendue basique et le produit extrait dans l'acétate d'éthyle. Une chromatographie sur colonne de silice nous a permis d'isoler un produit majoritaire contaminé de sous-produits (Schéma 30).

L'analyse en spectrométrie de masse ESI du produit majoritaire montre la présence de l'ion moléculaire ($\text{M} + \text{H}^+$) à 382,9 correspondant au produit recherché **11a** accompagné de

⁶² Jain, M. L.; Bruce, T. C. Solid-phase synthesis of positively charged deoxynucleic guanidine (DNG) oligonucleotide incorporating 7-deazaguanine bases. *Biorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 7333-7346.

plusieurs autres ions moléculaires dont l'un correspondant à la masse du produit souhaité diminué de 16 ((M+H⁺) à 366,9). Ceci laisse penser que nous avons parmi les produits obtenus, un dérivé de type urée **11b**. Deux autres sous-produits, qui se sont révélés difficiles à solubiliser, n'ont pu être identifiés (que ce soit par RMN du proton ou par spectrométrie de masse). Ils pourraient résulter d'une polymérisation.



La présence de l'urée **11b**, accompagnée de plusieurs autres produits, montre que le motif thiourée n'est pas stable dans ces conditions et qu'il ne peut pas être utilisé comme groupement protecteur. Nous avons alors essayé de synthétiser le motif oxazine à partir du dérivé guanidine **10**.

3.3. Synthèse du motif oxazine à partir de la guanidine **10**.

Le dérivé guanidine **10** est soluble dans HCl 6N. Ne connaissant pas la stabilité du motif guanidine en milieu acide, nous avons effectué la réaction dans HCl 6N au lieu d' HCl 11N (Schéma 31). La réaction est suivie par CLHP. En présence d'un large excès de formaldéhyde aqueux et en chauffant à 45°C, on observe en CLHP qu'après 6h le produit de départ **10** a totalement disparu. Il est difficile d'évaluer le nombre de produits formés car le chromatogramme est mal résolu : on ne voit qu'un seul pic large avec un épaulement.

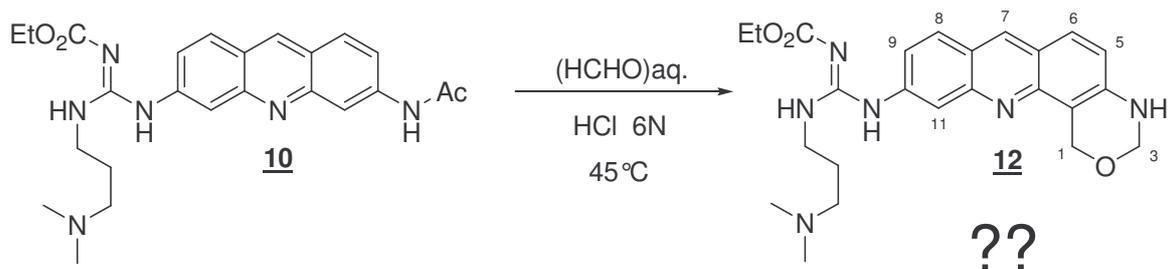


Schéma 31

L'examen en RMN du proton dans le DMSO- d_6 du produit brut obtenu après neutralisation et extraction, montre la présence entre 4 et 6 ppm des signaux caractéristiques du motif oxazine (un singulet et un doublet) à côté d'autres signaux. Au niveau des déplacements chimiques des protons aromatiques on peut voir la superposition des signaux de plusieurs produits. L'intégration du signal du proton H-7, qui apparaît sous forme de singulet et qui est le plus déblindé des protons aromatiques, montre qu'aucun produit n'est majoritaire. On note aussi la présence des signaux caractéristiques du groupement CO₂Et, un quadruplet et un triplet.

L'analyse en spectrométrie de masse ESI de ce produit brut montre la présence de l'ion moléculaire correspondant au produit recherché **12** ($M+H^+$) à 451,0, accompagné d'autres ions moléculaires dont notamment ($M+H^+$) à 379,0, qui correspond au produit voulu mais sans le groupement CO₂Et (**12a**) et ($M+H^+$) à 853,3 correspondant à la base de Tröger (**12b**) (Figure 36).

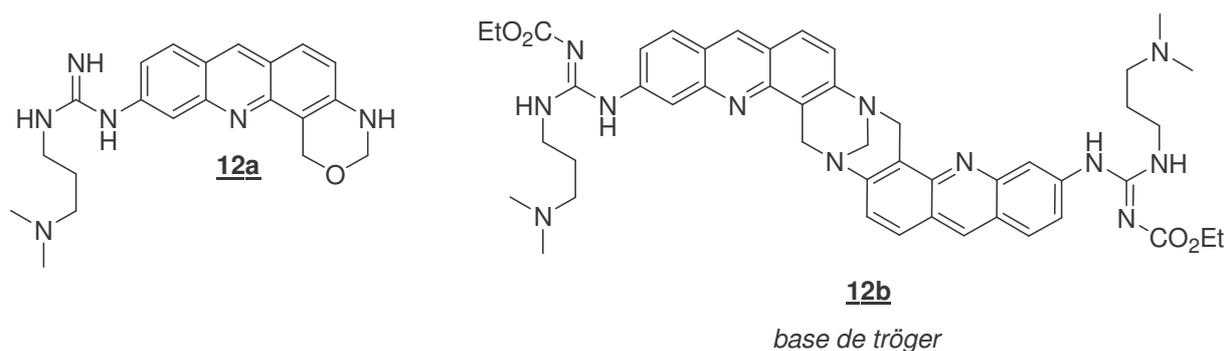


Figure 36

La formation de la base de Tröger dans ces conditions avait déjà été constatée par F.Charmantray⁵⁴.

Il semble que le motif guanidine résiste à ces conditions acides, mais le groupement protecteur CO₂Et ne serait pas stable.

Nous avons alors recherché des conditions plus douces pour synthétiser ce motif oxazine, en employant par exemple un acide de Lewis, qui serait capable de catalyser des réactions de substitution électrophile aromatique.

3.4. Essai de synthèse du motif oxazine avec un acide de Lewis.

Dans la littérature, il existe différents acides de Lewis capables de catalyser des réactions d'acylation ou d'alkylation de type Friedel-Crafts. Récemment, Mohan et coll.⁶³ ont utilisé du triflate de bismuth ($\text{Bi}(\text{OTf})_3$) comme acide de Lewis pour synthétiser, à partir de résorcinol et de différents aldéhydes, des dérivés de résorcinarène par substitution électrophile aromatique en position *ortho* des groupements hydroxyles du résorcinol (Schéma 32).

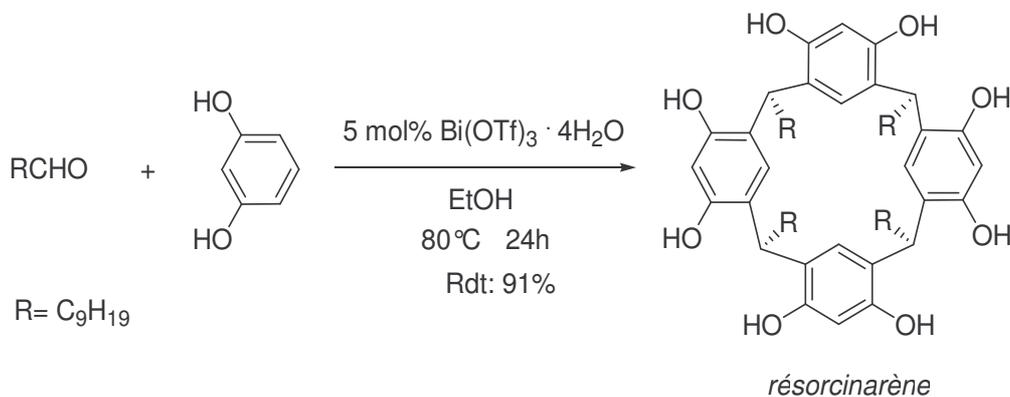


Schéma 32

Nous avons alors testé la réactivité de la proflavine mono-acétylée **6** en présence de formaldéhyde aqueux dans ces mêmes conditions (Schéma 33). En traitant le dérivé **6** avec un large excès de formaldéhyde en présence d'une quantité catalytique de $\text{Bi}(\text{OTf})_3$, on forme majoritairement trois produits que nous avons séparés sur colonne de silice.

⁶³ Peterson, K. E.; Smith, R. C.; Mohan, R. S. Bismuth compounds in organic synthesis. Synthesis of resorcinarenes using bismuth triflate. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 7723-7725.

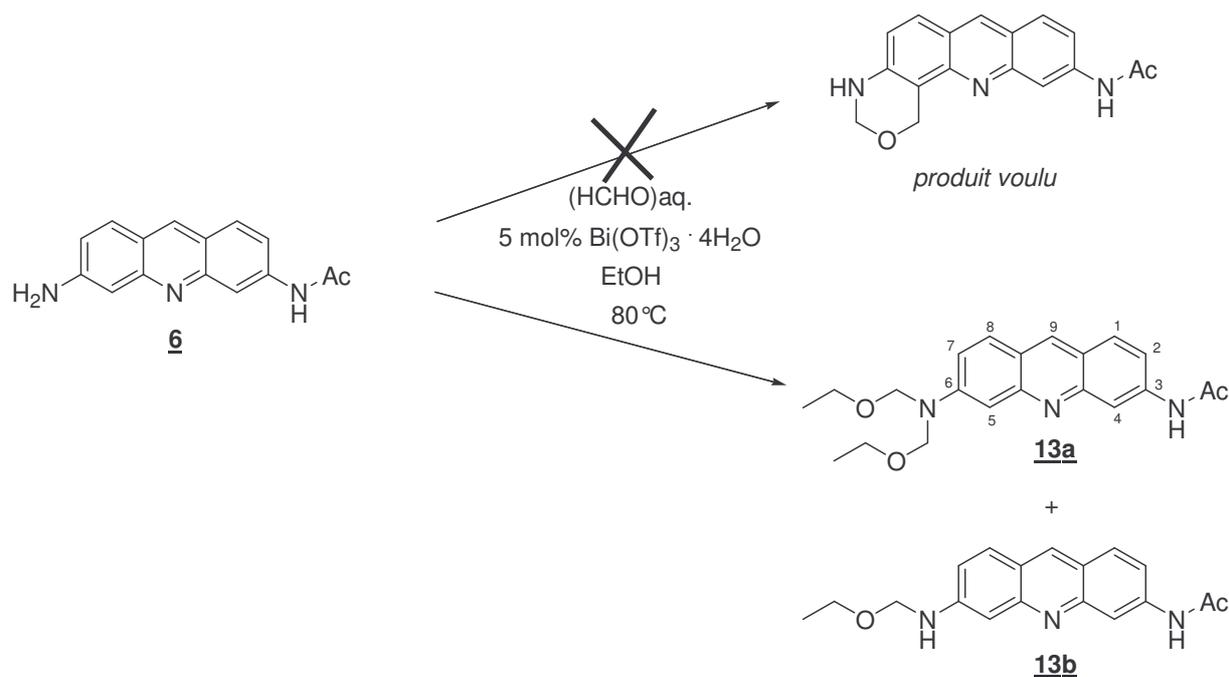


Schéma 33

L'analyse des spectres de RMN du proton dans le DMSO-*d*₆ de ces différents produits montre que nous avons obtenu deux dérivés de type héli-aminal **13b** et **13a**. Malheureusement pour des raisons de solubilité, le troisième produit n'a pu être identifié.

Pour les produits **13a** et **13b** la présence des deux singulets correspondant aux protons H-4 et H-5 montre que la substitution électrophile aromatique en *ortho* de l'amine libre ou de l'amine NHAc, n'a pas eu lieu. On note cependant la disparition d'un proton (**13b**) ou deux protons (**13a**) échangeables portés par l'amine libre. Ceci confirme que nous avons bien une substitution sur cette dernière.

En présence de Bi(OTf)₃, dans ces conditions, nous avons donc bien formation d'un intermédiaire imine qui est nécessaire dans la formation du motif oxazine, mais pas de substitution électrophile aromatique. L'éthanol viendrait ensuite se condenser sur cet intermédiaire imine pour former les produits **13a** et **13b**.

3.5. Conclusion.

Cette manière de procéder n'est pas applicable puisque les fonctions thiourée et guanidine ne sont pas compatibles avec les conditions de synthèse requises pour la formation du cycle oxazine.

Nous nous sommes donc tournés vers la voie **B**.

4. Voie B.

4.1. Généralités.

La voie B présente l'avantage d'être plus modulable que la première voie. La synthèse du motif guanidine étant prévue après la synthèse du motif oxazinone, nous ne sommes pas limités par les conditions acides requises pour la synthèse des motifs oxazine et oxazinone. Cette stratégie met en jeu la synthèse d'un intermédiaire-clé qui peut être préparé selon 2 voies de synthèse **B1** et **B2** (Schéma 34).

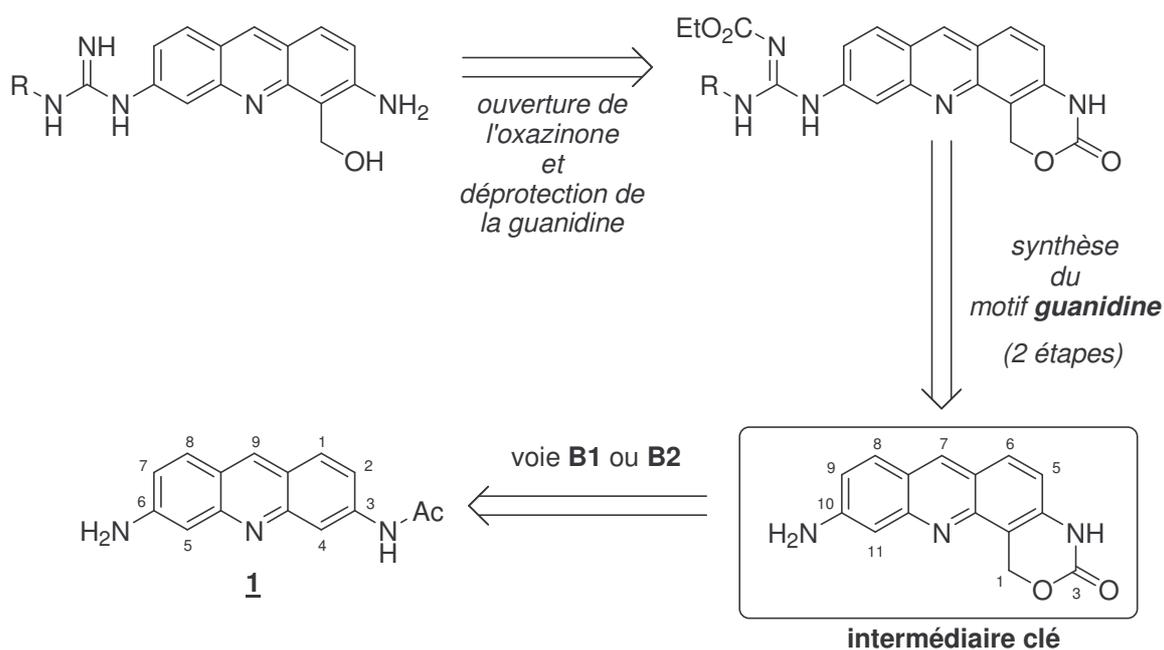


Schéma 34

Dans la voie **B1** (Schéma 35) nous avons appliqué une nouvelle méthodologie pour synthétiser le motif oxazinone. Celle-ci consiste à introduire, dans un premier temps, un groupement chlorométhoxycarbone sur l'amine libre de la proflavine mono-acétylée **6**. Le motif oxazinone pourra être ensuite obtenu par un réarrangement (substitution électrophile aromatique intramoléculaire) du carbamate résultant. L'élimination du groupement acétyle permettra ultérieurement d'obtenir l'intermédiaire-clé voulu.

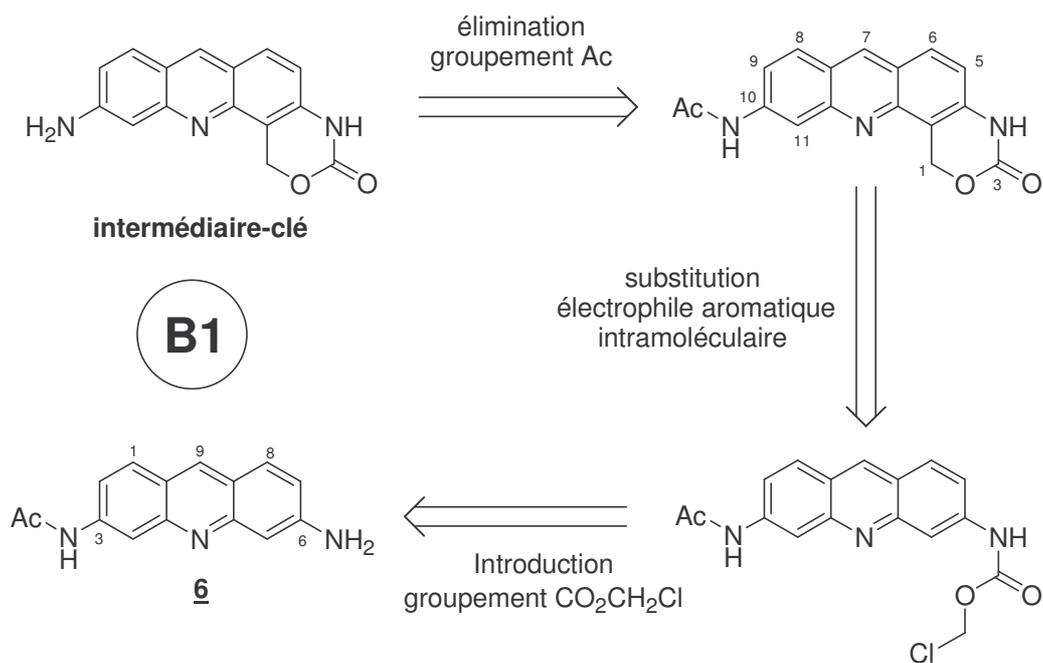
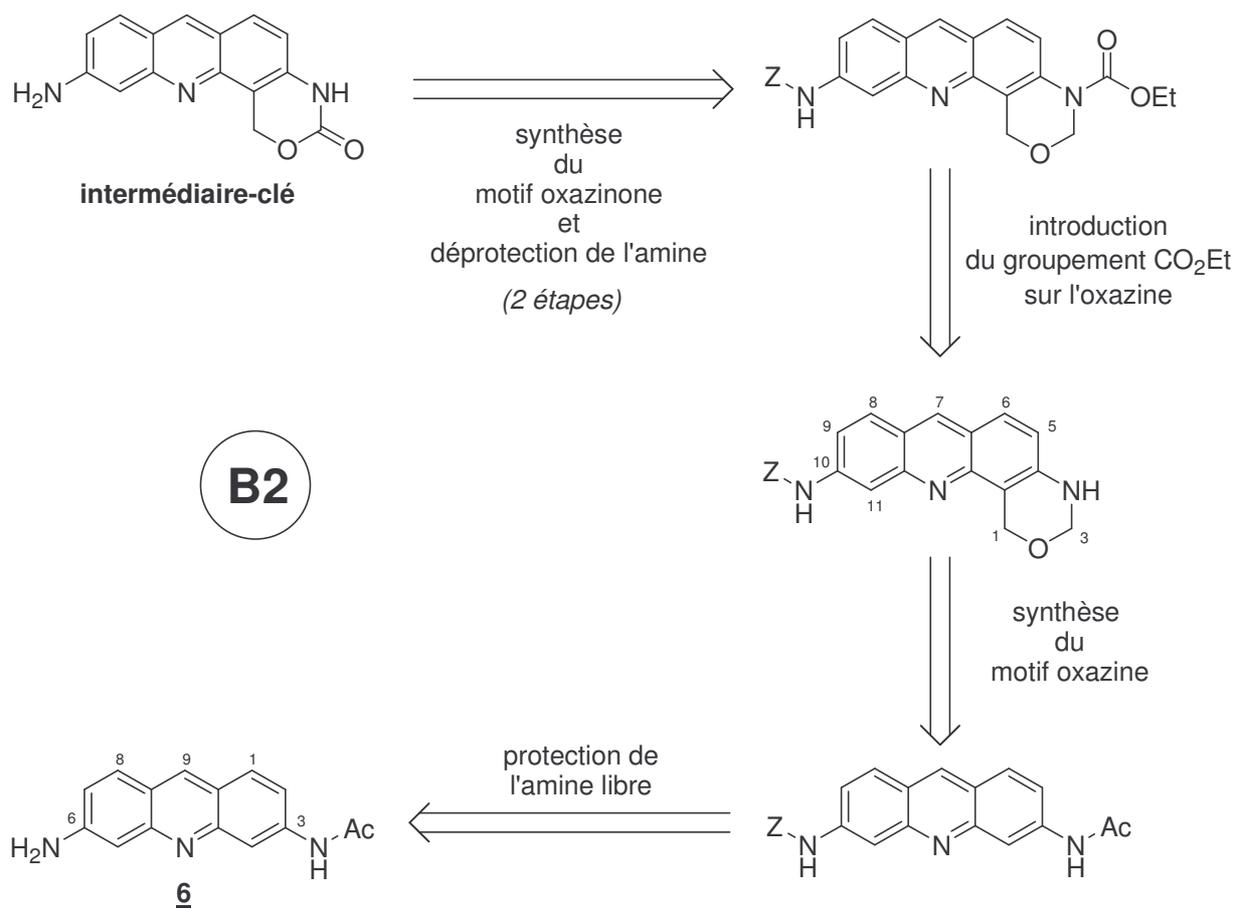


Schéma 35

Dans la voie **B2** (Schéma 36), le motif oxazinone est obtenu à partir du motif oxazine. La synthèse de l'intermédiaire-clé repose essentiellement sur un choix judicieux du groupement protecteur Z.



Voici les grandes lignes de cette stratégie:

- 1) Protection de l'amine libre de la proflavine mono-acétylée **6** par un groupement Z.
- 2) Synthèse du motif oxazine en milieu acide.
- 3) Introduction de manière régiosélective d'un groupement éthoxycarboxyle (CO₂Et) sur l'oxazine.
- 4) Synthèse de l'intermédiaire-clé par formation de l'oxazinone et élimination du groupement protecteur Z. Cette élimination peut avoir lieu avant, pendant ou après l'étape de formation de l'oxazinone.
- 5) Synthèse du motif guanidine en deux étapes par la méthode d'Atwal, à partir de l'amine libre de l'intermédiaire-clé.
- 6) Ouverture de l'oxazinone et déprotection du groupement CO₂Et de la guanidine.

Le groupement protecteur Z de l'amine en position 6 doit répondre à plusieurs critères:

- La réactivité de son précurseur vis-à-vis d'amines aromatiques peu nucléophiles.

- Sa stabilité dans les conditions acides requises pour former le motif oxazine (HCl 6N à 11N).
- Son effet désactivant sur la position en *ortho* de l'amine portée par le carbone C-6.
- Son influence sur la polarité de la molécule. Les dérivés proflavine étant polaires, il est préférable d'utiliser des groupements protecteurs rendant la molécule moins polaire pour d'éventuelles purifications par chromatographie sur colonne de silice.
- Les conditions de son élimination doivent être compatibles avec la stabilité du groupement CO₂Et (déprotection avant la synthèse du motif oxazinone), ou du motif oxazinone (déprotection après la synthèse du motif oxazinone) ou idéalement dans les conditions de formation de l'oxazinone (acide méthanesulfonique).

A ce jour il existe environ trois cents cinquante différents groupements protecteurs d'amines décrits dans la littérature⁶⁴. Notre recherche s'est limitée aux groupements protecteurs les plus couramment utilisés. On note ainsi que les amines peuvent être protégées sous forme d'amides, de phthalimides, de carbamates, de sulfonamides, par alkylation (*N*-alkyl ou plus généralement les N,O acétals), par silylation (*N*-silyl) ou sous forme d'imines ou d'énamines.

Si l'on considère la stabilité de ces groupements protecteurs en milieu acide, alors on peut déjà exclure: les imines et énamines, les dérivés *N*-silylés ou *N*-alkylés, les amides et les phthalimides qui ne sont pas stables en milieu acide.

Par contre, dans la classe des carbamates, il existe des groupements protecteurs qui conviennent à notre stratégie comme le trichloroéthoxycarbonyle (Troc), le fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc), le méthylsulfonyléthoxycarbonyle (Msoc) ou l'allyloxycarbonyle (Alloc). Dans le tableau 2, nous avons dressé une liste non exhaustive des conditions décrites dans le livre « *Protective groups in organic synthesis* » de Greene et Wuts⁶⁵, pour ce qui concerne l'introduction et la coupure des groupes protecteurs de l'amine.

⁶⁴ Kocienski, P. J. *Protecting groups*. Thieme: New York, 2005.

⁶⁵ Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective groups in organic synthesis*. Third ed.; John Wiley and sons, Inc.: 1999.

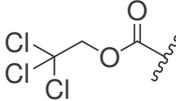
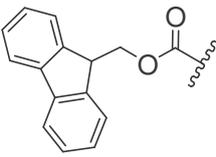
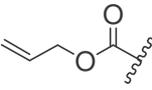
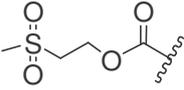
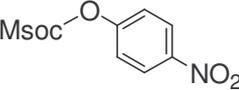
| Abréviations | Groupe protecteur | Conditions d'introduction | Conditions de coupure |
|--------------|--|---|--|
| Troc |  | Troc-Cl pyridine | Zn, AcOH |
| Fmoc |  | Fmoc-Cl Na ₂ CO ₃ , dioxanne | 20% pipéridine/ DMF |
| Alloc |  | Alloc-Cl pyridine | Pd(PPh ₃) ₄ , PhSiH ₃ DMF anhydre |
| Msoc |  | Carbonate activé :  Et ₃ N, DMF | NaOH 0,1 N |

Tableau 2

Quant aux sulfonamides, ils sont connus pour être stables en milieu acide mais cela dépend de la nature de l'amine protégée. Les conditions de déprotection peuvent être drastiques.

F.Charmantray⁵⁴ avait utilisé un groupement mésyle (méthylsulfonyle ou Ms) pour protéger l'amine en position 6 (Schéma 37) et avait noté que celui-ci n'était pas stable dans les conditions d'obtention du motif oxazinone (MsOH).

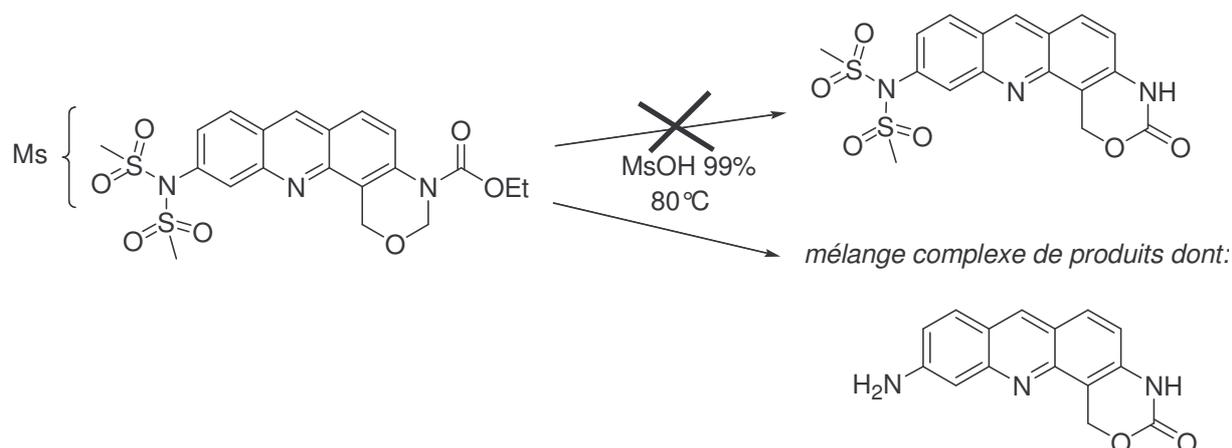


Schéma 37

Nous nous sommes d'abord limités à tester l'introduction sur l'amine en position 6 de la proflavine mono-acétylée **6** des groupements protecteurs Troc, Fmoc et Msoc puis à évaluer la stabilité des dérivés ainsi protégés en milieu acide (HCl 11N).

Concernant le groupement Alloc, nous avons préféré tester, dans un premier temps, la stabilité du cycle oxazine dans les conditions nécessaires à son élimination.

4.2. Synthèse de l'intermédiaire-clé par la voie B1 : Introduction du groupement chlorométhoxycarbone.

Le traitement de la proflavine mono-acétylée **6** par le chloroformiate de chlorométhyle (6 équivalents), dans la pyridine à 0°C ou à -10°C, conduit à un mélange complexe de produits (Schéma 38).

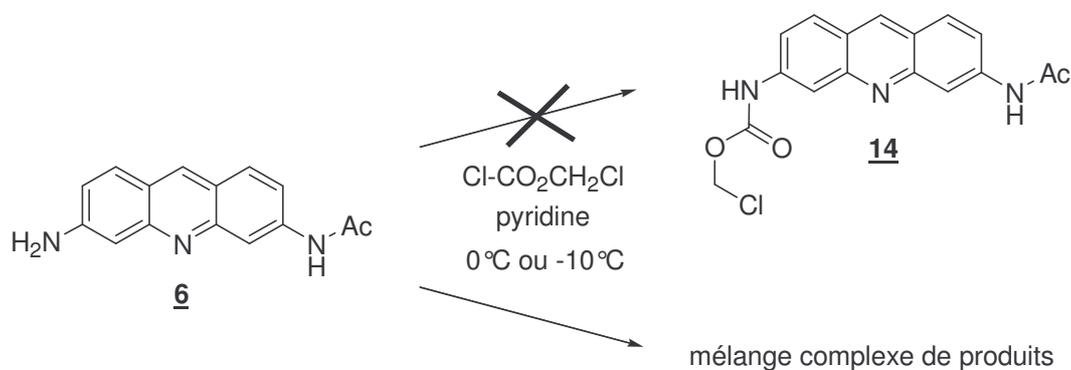


Schéma 38

L'analyse du produit brut, obtenu par précipitation en milieu aqueux basique, en spectrométrie de masse ESI montre qu'il n'existe aucun ion moléculaire correspondant à des produits chlorés. L'ion moléculaire ($M+H^+$) du produit voulu **14** (MW= 343,76) n'est pas observé.

N'ayant pas réussi à synthétiser le produit **14**, nous avons alors abandonné cette voie et poursuivie la synthèse en employant la voie **B2**.

4.3. Synthèse de l'intermédiaire-clé par la voie B2.

4.3.1. Protection de l'amine libre de la proflavine mono-acétylée **6**.

➤ Par un groupement fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) :

Pour protéger l'amine libre de la proflavine mono-acétylée **6** (Schéma 39) à partir du chloroformiate de fluorénylméthyle (Fmoc-Cl) nous avons utilisé des conditions décrites dans la littérature⁶⁶. La réaction est suivie en CLHP.

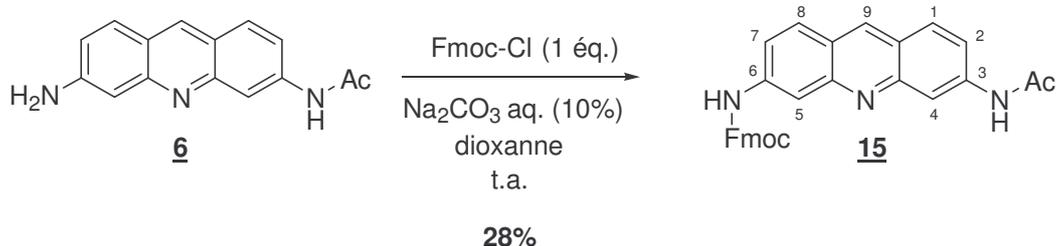


Schéma 39

En traitant la proflavine mono-acétylée **6** avec une quantité stoechiométrique de chloroformiate de fluorénylméthyle, on peut voir en CLHP qu'après 6h le produit le départ a totalement disparu et que l'on forme un nouveau produit moins polaire. Après traitement et purification par chromatographie sur colonne, le composé **15** est obtenu avec un rendement de 28 %.

Ce faible rendement est essentiellement dû à des problèmes rencontrés lors de la purification où nous avons observé que le produit désiré **15** restait partiellement adsorbé sur la

⁶⁶ Carpino, L. A.; Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3401-3406.

silice. Ce rendement peut être optimisé mais nous avons préféré tester la stabilité de ce composé **15** dans les conditions acides de l'étape suivante avant de chercher à l'améliorer.

En RMN du proton, dans le DMSO-*d*₆, l'apparition d'un singulet déblindé à 10,2 ppm et intégrant pour un proton échangeable montre que nous avons bien une substitution sur l'amine en position 6 du composé **15**. On peut constater aussi entre 4,6 et 4,4 ppm la présence d'un triplet pour le CH et d'un doublet pour le CH₂ du groupement Fmoc.

➤ Par un groupement méthylsulfonyléthoxycarbone (Msoc) :

Le méthylsulfonyléthoxycarbone (Msoc) est introduit sous forme de carbonate activé (Schéma 40). La réaction est suivie par CLHP.

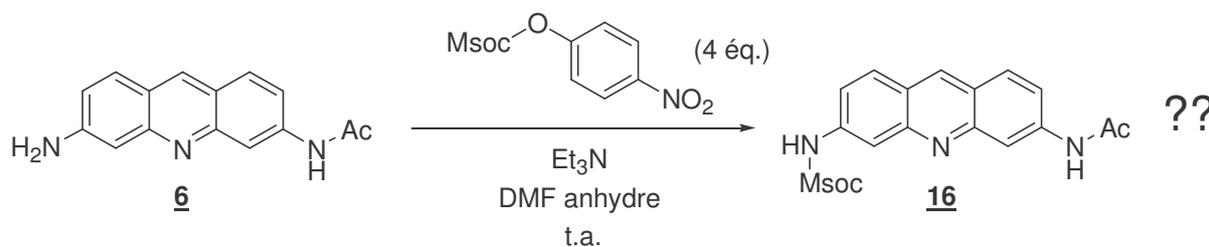


Schéma 40

Il faut plus de 4 équivalents de carbonate activé, pour observer en CLHP une disparition totale du produit de départ.

Toutefois, après traitement, de la réaction nous n'avons pas réussi à isoler le produit voulu **16**, ce dernier étant trop polaire pour être purifié par chromatographie sur colonne de silice.

La faible réactivité de la proflavine mono-acétylée **6** vis-à-vis du carbonate activé, ajoutée au prix élevé de ce réactif, ne nous ont pas encouragé à tenter d'améliorer cette réaction. C'est pourquoi nous avons préféré abandonner l'utilisation de ce groupement protecteur.

➤ Par un groupement trichloroéthoxycarbone (Troc) :

Pour réaliser cette réaction nous avons utilisé, dans un premier temps, des conditions similaires à celles qu'avait utilisées F. Charmantray⁵⁴ pour protéger l'amine en position 6 de la proflavine mono-acétylée **6** par un groupement éthoxycarbone (Cl-CO₂Et (12 équivalents), pyridine, t.a.)(Schéma 41).

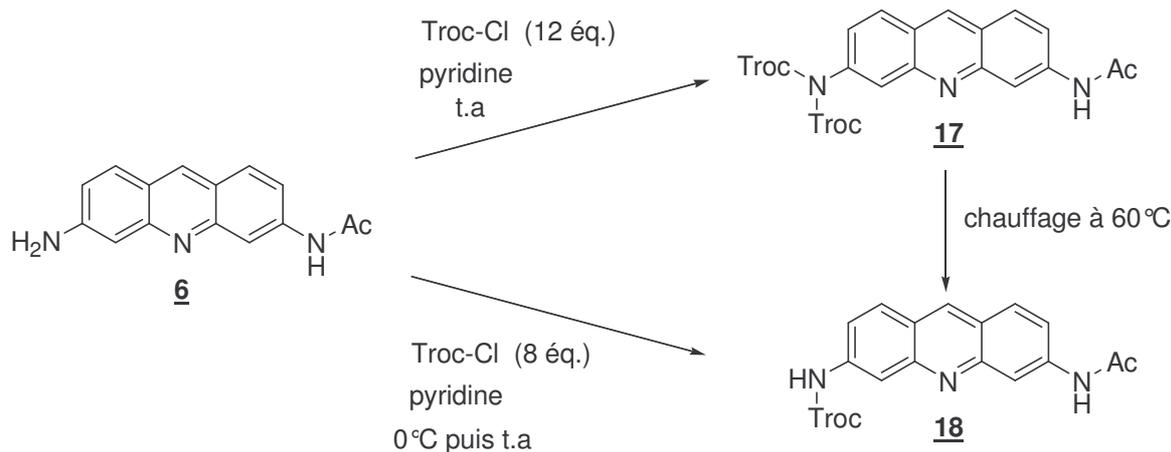


Schéma 41

Dans ces conditions, la réaction entre la proflavine mono-acétylée **6** et le chloroformiate de trichloroéthyle (Troc-Cl, 12 équivalents) à température ambiante est très rapide. Au bout de quelques minutes, on peut voir en CLHP qu'il s'est formé très majoritairement un nouveau produit moins polaire. Après précipitation en milieu aqueux basique, nous avons isolé avec un rendement de 44 % (non optimisé) le composé **17** qui s'est révélé être après analyse par RMN et spectrométrie de masse, un produit issu d'une bis-protection sur l'amine libre de la proflavine mono-acétylée **1**.

Bien que ce produit **17** ne soit pas celui attendu (produit mono-protégé **18**), il est intéressant puisque la présence des deux groupements Troc sur l'amine permet a priori d'engendrer une plus grande désactivation de la position en *ortho* de l'amine et de s'affranchir d'éventuels problèmes de régiosélectivité lors de l'introduction du groupement CO₂Et sur le cycle oxazine (étape suivant la formation du cycle oxazine).

En RMN du proton, dans le DMSO-*d*₆, on peut observer, par ajout de quelques gouttes de D₂O, que l'unique signal de proton échangeable présent est celui du proton porté par l'amine NH-Ac à 10,3 ppm ce qui démontre une bis-substitution uniquement du côté de l'amine libre. De plus, l'intégration pour 4 protons du singulet à 5 ppm, correspondant au méthylène du groupement Troc, confirme bien la présence de deux groupements Troc sur la molécule **17**.

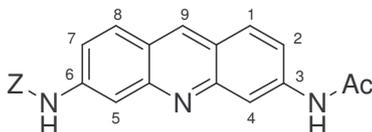
Cette bis-substitution sur l'amine libre peut être expliquée par le caractère acide du proton porté par le trichloroéthoxycarbamate issu de la première réaction.

Par la suite, nous nous sommes aperçus que le composé **18** pouvait être obtenu soit en effectuant la réaction à 0°C et en utilisant une quantité moindre de réactif (8 équivalents de Troc-Cl), soit en chauffant le produit bis-protégé **17** à 60°C, en fin de réaction (Schéma 41). Celui-ci se dégrade dans ces conditions pour donner le produit mono-protégé **18**.

Après précipitation en milieu aqueux basique et recristallisation dans l'isopropanol, le produit **18** est obtenu avec un rendement de 77%.

En RMN du proton, dans le DMSO-*d*₆, l'apparition d'un singulet déblindé à 10,6 ppm et intégrant pour un proton échangeable montre que nous avons bien une seule substitution sur l'amine libre en position 6. De plus, l'intégration du signal du méthylène du groupement Troc pour deux protons montre qu'il n'existe bien qu'un seul groupement Troc sur le composé **18**.

Nous avons remarqué aussi en RMN du proton que le signal échangeable du proton porté par le NH-Troc est légèrement plus déblindé que celui du proton porté par le NH-Ac. Ce fait confirme bien le caractère plus acide du proton NH-Troc comparé à celui du proton NH-Ac. Comme le montre le tableau ci-dessous (Tableau 3), par comparaison avec d'autres groupements protecteurs qui ont déjà été utilisés (Fmoc et CO₂Et⁶⁷), ce déblindage plus important du proton porté par le carbamate NH-Z n'est observable qu'avec le groupement protecteur Troc.



| Z | déplacement chimique δ (ppm) du ¹ H | |
|--------------------|---|-------|
| | NH-Z | NH-Ac |
| CO ₂ Et | 10,1 | 10,3 |
| Fmoc (15) | 10,2 | 10,3 |
| Troc (18) | 10,6 | 10,3 |

Tableau 3

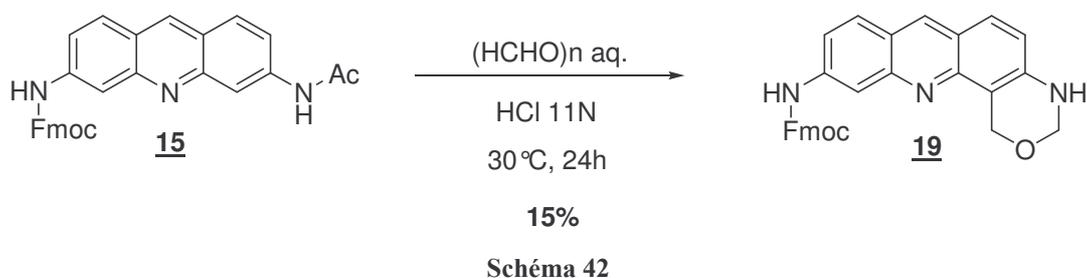
⁶⁷ Fixler, N. Recherche de Nouveaux Agents Anticancéreux Dérivés d'Acridine et de Benzo[*b*][1,7]Phénanthroline. Synthèse et Etude de Réactivité. 1994.

4.3.2. Synthèse du motif oxazine.

Le motif oxazine est obtenu en chauffant entre 30° et 50°C les dérivés **15**, **17** ou **18** avec un excès de formaldéhyde aqueux dans l'acide chlorhydrique 11N. Après un traitement en milieu basique, les dérivés oxazines sont purifiés par chromatographie sur colonne de silice. Dans ces conditions, la réaction est très régiosélective. La cyclisation en oxazine se produit du côté de l'acétamide, avec perte du groupe acétyle.

Toutes les réactions décrites ci-après ont été suivies par CCM car en CLHP les dérivés N-acétylés (produits de départ) et les oxazines (produits finaux) ont des polarités trop voisines.

➤ A partir du composé **15** (Schéma 42).



Après traitement et purification par chromatographie sur colonne nous avons pu isoler l'oxazine **19** avec un rendement de 15%.

Ce faible rendement peut s'expliquer, en majeure partie, par la faible solubilité du produit de départ **15** dans HCl 11N (réaction incomplète).

En RMN du proton, dans le CDCl₃, les deux signaux du cycle oxazine apparaissent sous forme d'un singulet à 5,2 ppm pour le méthylène benzylique et un doublet à 4,8 ppm pour l'autre groupement méthylène (couplage avec le NH).

➤ A partir du composé **17** (Schéma 43).

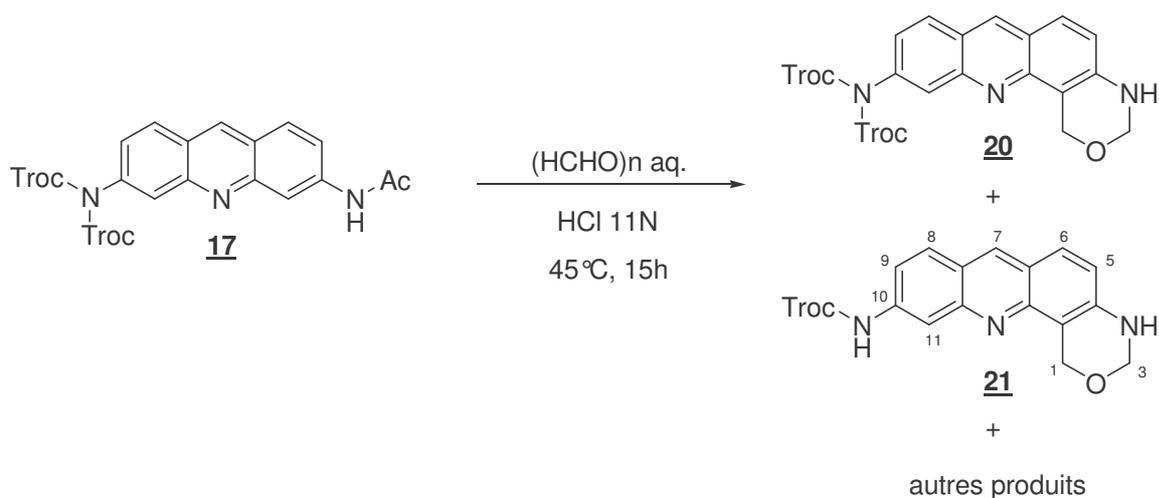


Schéma 43

Après traitement et purification par chromatographie sur colonne de silice, nous avons isolé plusieurs produits dont deux majoritaires, **20** et **21**.

Le produit bis-protégé **17** s'est révélé instable dans HCl 11N. En effet dans ces conditions on observe une hydrolyse partielle d'un groupement Troc, qui se traduit par un mélange de sous-produits issus à la fois du composé **20** et du composé **17**.

En RMN du proton, dans le DMSO- d_6 , les signaux caractéristiques : un singulet et un doublet attribués au cycle oxazine sont bien présents dans les spectres des deux produits **20** et **21**.

En revanche, pour le produit **21**, on note l'apparition à 10,5 ppm d'un singulet intégrant pour le proton de l'amine NH-Troc ; ce qui confirme bien que l'amine en position 10 est mono-substituée.

➤ A partir du composé **18** (Schéma 44).

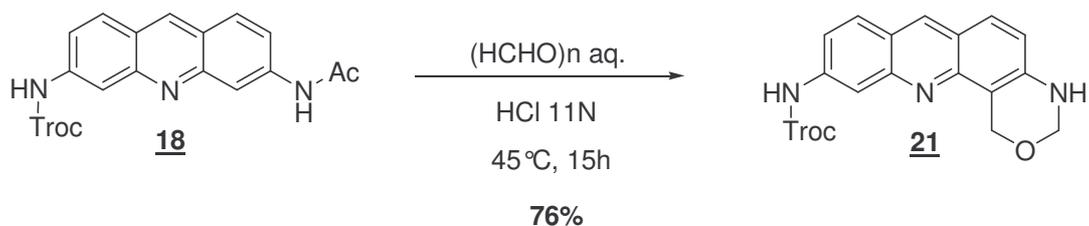


Schéma 44

Après traitement et purification par chromatographie sur colonne de silice le composé **21** est obtenu avec un assez bon rendement de 76%.

La séparation sur colonne de silice est réalisée en employant un mélange d'éluants éther/pentane (7:3), alors qu'en série éthoxycarbonyle ou Fmoc ($Z = \text{CO}_2\text{Et}$ ou Fmoc) il faut utiliser des mélanges d'éluants plus polaires comme AcOEt/MeOH. Comparé à ces deux groupes protecteurs, Fmoc et CO_2Et , le groupement Troc a donc un effet plus prononcé sur la polarité des dérivés d'acridine en les rendant moins polaires.

Parmi les sous-produits isolés, on note la présence d'un produit *N*-méthylé **21a** (Figure 3), qui pourrait se former à partir du produit **21** selon un mécanisme comparable à celui d'Eschweiler-Clark (N-méthylation par le formaldéhyde en présence d'acide formique).

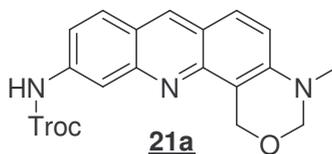


Figure 37

Un sous-produit similaire avait déjà été remarqué par F.Charmantray⁵⁴ en série éthoxycarbonyle sans que toutefois le mécanisme de sa formation ait été élucidé.

Par comparaison avec le spectre RMN du proton du produit **21**, les signaux caractéristiques du cycle oxazine observés avec le composé **21a** apparaissent sous forme de deux singulets. La disparition du signal caractéristique du proton NH de l'oxazine à 7 ppm et l'apparition d'un singulet à 3,1 ppm, intégrant pour trois protons, montre qu'une méthylation de l'azote du cycle oxazine s'est bien produite.

➤ Conclusion.

Que ce soit en terme d'introduction ou de formation de l'oxazine, les meilleurs rendements ont été obtenus avec le groupement trichloroéthoxycarbonyle.

A partir du composé **21**, nous avons testé la stabilité du cycle oxazine dans les conditions d'élimination du groupement protecteur Alloc (allyloxycarbonyle).

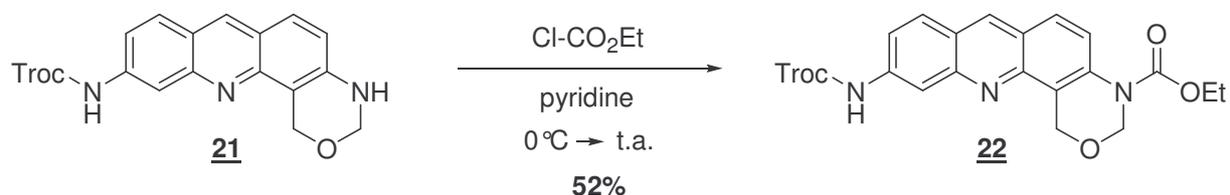
Dans ces conditions ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, PhSiH_3 dans le DMF anhydre à température ambiante), on peut constater qu'il se forme plusieurs produits. L'analyse RMN du produit brut obtenu après traitement montre que les signaux caractéristiques du cycle oxazine : un singulet et un

doublet, ont disparu. Ceci montre que le cycle oxazine n'est pas stable dans les conditions d'élimination du groupement Alloc.

Nous avons donc continué la synthèse en employant le composé **21**.

4.3.3. Introduction d'un groupement éthoxycarboxyle sur l'azote de l'oxazine **21**.

Il convient de souligner que, dans ces conditions, si en série éthoxycarboxyle (CO₂Et au lieu de Troc), quatre équivalents de chloroformiate d'éthyle suffisent pour introduire régiosélectivement le groupement éthoxycarboxyle du côté de l'oxazine ; en série trichoroéthoxycarboxyle, il est nécessaire d'utiliser plus de vingt équivalents de chloroformiate d'éthyle pour avoir un taux de conversion quantitatif (Schéma 45).



Après extraction à l'acétate d'éthyle et purification sur colonne de silice le produit recherché (**22**) est obtenu avec un rendement de 52 %.

Parmi les produits isolés on note la présence du composé **22a** (Figure 38), issu d'une bis-substitution: sur le NH-Troc et sur l'azote de l'oxazine.

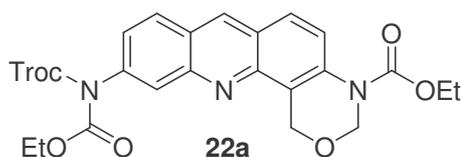


Figure 38

La présence de ce composé **22a** montre que l'introduction du groupement CO₂Et est peu régiosélective dans ces conditions. Ceci peut être expliqué en invoquant l'acidité du proton porté par le NH-Troc.

Dans les spectres de RMN du proton enregistrés dans le DMSO-*d*₆ on note, pour les produits **22** et **22a**, la disparition du signal caractéristique du proton NH de l'oxazine et

l'apparition des signaux caractéristiques du groupement éthoxycarbone : un quadruplet à 4,3 ppm pour le CH₂ et un triplet à 1,3 ppm pour le CH₃. Pour le produit **22a** on remarque la présence de deux quadruplets et de deux triplets correspondant aux signaux de deux groupements éthoxycarbonyles. La disparition du signal caractéristique du proton du NH-Troc à 10,7 ppm montre que cette amine est aussi substituée.

4.3.4. Synthèse de l'intermédiaire-clé à partir du composé **22**.

A partir du composé **22**, pour obtenir l'intermédiaire-clé, deux possibilités se présentent (Schéma 46):

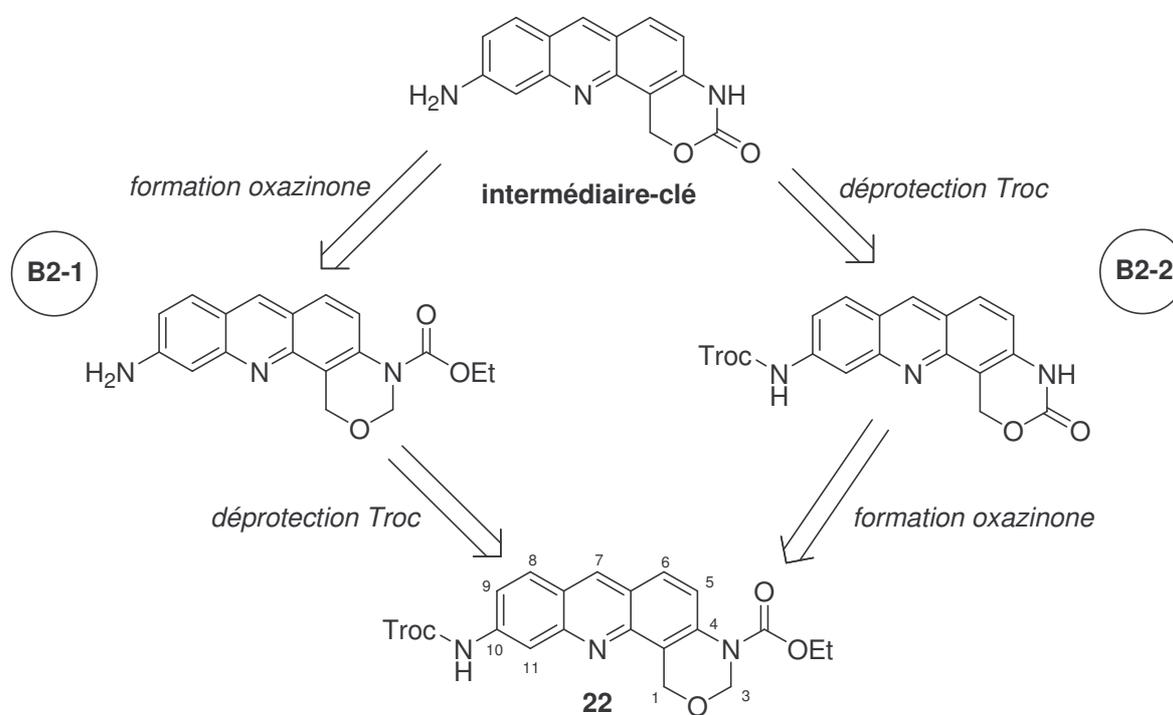


Schéma 46

Pour générer l'amine libre en position 10 à partir du composé **22** (Schéma 46), l'élimination du groupement trichloroéthoxycarbone (Troc) peut être effectuée avant (voie **B2-1**) ou après la formation du motif oxazinone (voie **B2-2**).

Nous avons testé parallèlement les voies **B2-1** et **B2-2**.

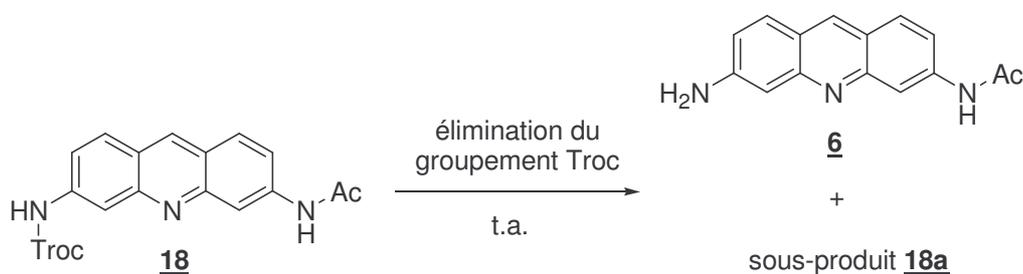
4.3.4.1. Voie B2-1.

4.3.4.1.1. Elimination du groupement Troc.

Il existe, dans la littérature, différentes méthodes d'élimination du groupement Troc utilisé comme groupement protecteur d'amines^{68,69,70,71,72}. Toutefois, très peu d'exemples portant sur des amines aromatiques ont été décrits.

Nous avons effectué, dans un premier temps, une étude comparative (Schéma 47) des méthodes qui nous paraissaient les plus compatibles avec notre stratégie (Zn, AcOH glacial (A)⁶⁸; Cd, DMF/AcOH (B)⁶⁹; Cd/Pb 10%, THF/AcONH₄ (C)⁷⁰).

Cette étude a été réalisée sur un dérivé moins élaboré, le composé **18**.



| | méthode utilisée | Stoechiométrie | produit déprotégé 6 (%) ^a | sous-produit 18a (%) ^a |
|----------|---|----------------|---|--|
| A | Zn AcOH glacial | 120 éq. | 86 | 14 |
| B | Cd DMF/ AcOH (1:1) | 100 éq. | 88 | 12 |
| C | Cd/ Pb 10% THF/ AcONH ₄ 1M, pH=7 | 15 éq. | 84 | 16 |

^a déterminé par RMN

Schéma 47

⁶⁸ Woodward, R. B.; Heusler, K.; Gosteli, J.; Naegeli, P.; Oppolzer, W.; Ramage, R.; Ranganathan, S.; Vorbrüggen, H. The total synthesis of Cephalosporin C. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 852-853.

⁶⁹ Hancock, G.; Galpin, I. J.; Morgan, B. A. Side reactions and cadmium catalysed removal of the trichloroethoxycarbonyl (Troc) protecting group. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 249-252.

⁷⁰ Dong, Q.; Anderson, C. E.; Ciufolini, M. A. Reductive cleavage of TROC groups under neutral conditions with Cadmium-Lead couple. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 5681-5682.

⁷¹ Mineno, T.; Choi, S-R.; Avery, M. A. A mild deprotection of trichloethyl carbamates using Indium metal. *Synlett* **2002**, 883-886.

⁷² Semmelhack, M.F.; Heinsohn, G. E. Selective removal of protecting groups using controlled potential electrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 5139-5140.

Les trois méthodes (A, B, C) donnent très majoritairement le produit déprotégé **6** recherché (Schéma 47). Cependant, il est systématiquement accompagné d'un sous-produit **18a** moins polaire (d'après les analyses de CLHP) et cela nécessite des étapes de purification supplémentaires.

Après séparation sur colonne d'alumine neutre, nous avons pu isoler et identifier par RMN et spectrométrie de masse ce sous-produit **18a** (Figure 39), comme étant issu d'une mono-déchloration du produit de départ **18**. Ce sous-produit, que nous appellerons « Dioc » dans la suite de ce manuscrit, avait déjà été observé dans la littérature mais jamais décrit.

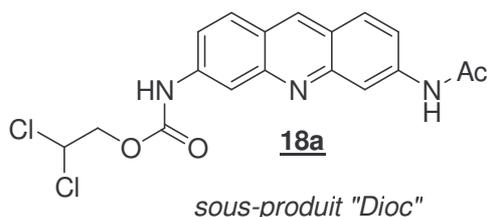


Figure 39

Comme le montre le schéma 48, la formation de ce sous-produit « Dioc » peut être expliquée par un piégeage de l'intermédiaire anionique, formé au cours de la réaction, par un proton.

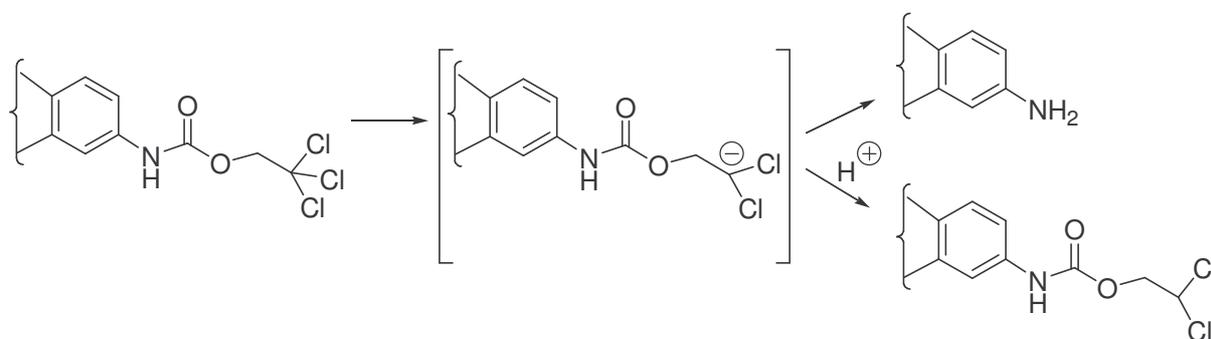


Schéma 48

En RMN du proton, dans le DMSO- d_6 , on peut constater que, pour le produit **18a**, le singulet correspondant aux protons CH_2 caractéristique du groupement trichloroéthoxycarbonyl a été remplacé par un doublet à 4,5 ppm. On peut aussi observer que ce doublet est couplé avec un triplet déblindé à 6,6 ppm qui intègre pour le proton du CHCl_2 .

Nous avons remarqué que la méthode **C** (Schéma 47), qui est la plus douce (tampon AcONH_4 à $\text{pH}=7$), était la plus commode à utiliser : quantité de réactif (Cd/Pb 10%) moindre et traitement en fin de réaction plus facile à mettre en oeuvre (filtration suivie directement d'une extraction).

Nous avons donc choisi cette méthodologie pour éliminer le groupement Troc du composé **22** (Schéma 49).

L'amalgame Cd/Pb 10% est préalablement préparé selon la méthode décrite par Cuifolini⁷⁰, à partir de cadmium et d'oxyde de plomb (litharge, PbO).

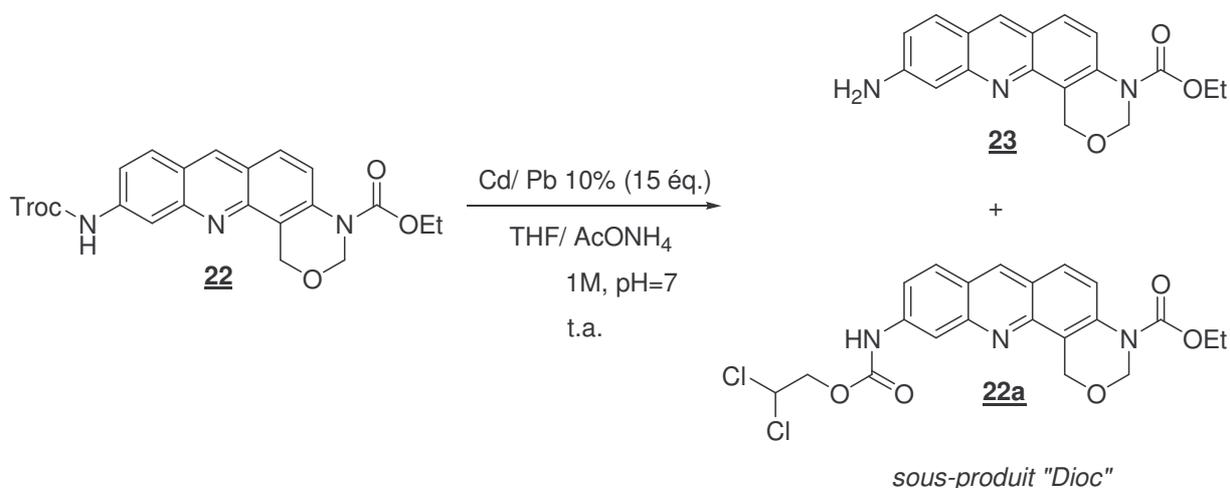


Schéma 49

En fin de réaction au bout d'1h30, on peut voir par CLHP que l'on forme deux produits **23** et **22a** dont l'un est majoritaire à plus de 75% (composé **23**).

L'analyse en spectrométrie de masse ESI du produit brut réactionnel révèle la présence de l'ion moléculaire ($\text{M}+\text{H}^+$) à 340,0 correspondant au produit souhaité **23** mais aussi l'ion moléculaire ($\text{M}+\text{H}^+$) à 464,07 (³⁵Cl), correspondant au sous-produit « Dioc » **22a** (Schéma 46).

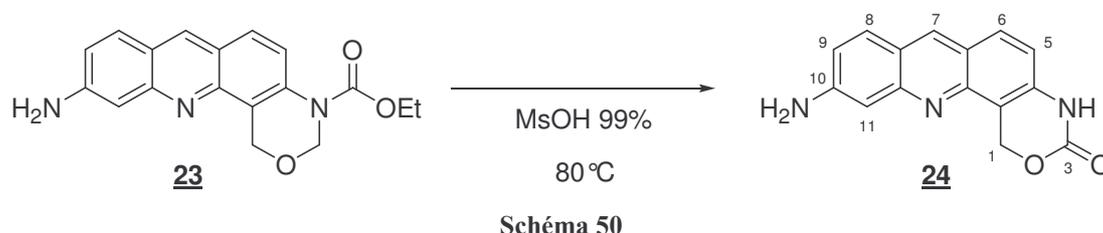
Après séparation sur colonne de silice, nous avons isolé le produit recherché **23** avec un rendement de 49%. En raison de sa forte polarité, et ceci est valable de manière générale pour tous les dérivés d'acridine comportant une amine libre (NH_2), le composé **23** reste partiellement adsorbé sur la silice, ce qui explique le rendement moyen obtenu après purification.

En RMN du proton, dans le CDCl_3 , on note la disparition du singulet caractéristique du groupement trichloroéthoxycarbonyl, et l'apparition d'un singulet large à 4,2 ppm qui

intègre pour deux protons échangeables. Ceci montre que l'amine en position 10 est bien déprotégée.

4.3.4.1.2. Synthèse du motif oxazinone à partir du composé 23.

La transformation du cycle oxazine *N*-éthoxycarboxylé en oxazinone met en jeu un mécanisme d'ouverture du cycle oxazine catalysé par le milieu acide (MsOH), suivi d'une fermeture (ou cyclisation) par transcarbamoxylation intramoléculaire. F.Charmantay⁵⁴ avait montré, par une étude approfondie, que la réaction de formation du cycle oxazinone était thermodynamiquement contrôlée, alors que l'obtention du cycle oxazine résultait d'un processus cinétiquement contrôlé.



Le chauffage du composé 23 (Schéma 50) dans l'acide méthanesulfonique à 80°C (Schéma 47) conduit très majoritairement, après 12 heures, au produit voulu 24 avec une pureté estimée par CLHP supérieure à 90%. Les sous-produits qui se forment au cours de la réaction sont essentiellement des polymères. Après précipitation en milieu aqueux basique et plusieurs lavages au méthanol (qui permet d'éliminer une partie des impuretés), le composé 24 est obtenu avec un rendement de 80%.

Ce composé 24 s'est révélé extrêmement difficile à purifier car les techniques traditionnelles de purification comme la chromatographie sur colonne de silice ou d'alumine, ou la recristallisation ne peuvent pas être envisagées pour les raisons suivantes:

- La présence de l'amine libre en position 10 rend la molécule trop polaire.
- F.Charmantay⁵⁴ avait remarqué que les dérivés de type oxazinone restaient absorbés sur la silice et l'alumine, et se décomposaient partiellement à chaud dans les solvants classiques de recristallisation (AcOEt, CH₂Cl₂).
- Ce composé 24 est peu soluble, que ce soit en milieu aqueux ou en milieu organique (AcOEt, CH₂Cl₂, MeOH).

D'autres techniques ont alors été envisagées comme la chromatographie d'exclusion ou la lyophilisation afin d'améliorer le rendement et la pureté du composé **24**, mais malheureusement sans résultat probant.

En RMN du proton, dans le DMSO-*d*₆, on peut constater que les signaux caractéristiques des protons du groupement éthoxycarboxyle ont disparu et qu'il ne subsiste plus qu'un des deux singulets caractéristiques du cycle oxazine (composé **23**) à 5,9 ppm.

4.3.4.2. Voie B2-2.

Parallèlement, nous avons aussi testé la **voie B2-2** dans laquelle on forme, dans un premier temps, le motif oxazinone à partir du composé **22** avant d'éliminer le groupement Troc de l'amine en position 10.

4.3.4.2.1. Synthèse du motif oxazinone à partir du composé **22**.

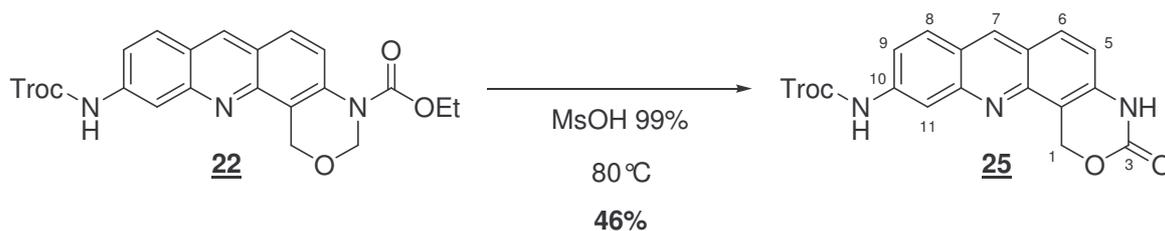


Schéma 51

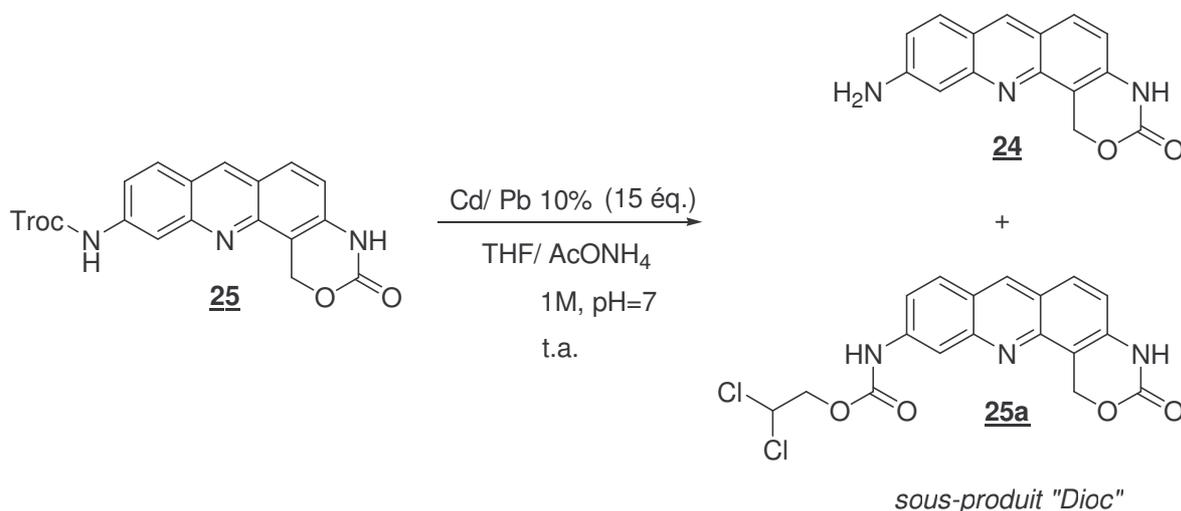
Le traitement du composé **22** (Schéma 51) dans l'acide méthanesulfonique à 80°C conduit majoritairement au produit recherché **25**, mais on observe par CLHP que ce dernier est toujours accompagné de produits secondaires. Après traitement et purification par chromatographie sur colonne de silice, le composé **25** est obtenu avec un rendement de 46 %.

Malgré la présence du groupement Troc sur l'amine en position 10, le composé **25** reste partiellement adsorbé sur la silice à cause du motif oxazinone. Ceci explique le faible rendement obtenu.

L'analyse du spectre RMN du proton, dans le DMSO-*d*₆, montre la disparition des signaux caractéristiques du groupement éthoxycarboxyle et l'apparition d'un singulet à 10,5 ppm qui intègre pour le proton NH du cycle oxazinone. On peut également constater que le

signal des protons (CH₂) benzyliques du cycle oxazinone à 6 ppm sont plus déblindés que ceux du cycle oxazine (5,5 ppm pour le composé **22**).

4.3.4.2.2. Elimination du groupement Troc du composé **25**.



Comme il a été observé pour les dérivés **18** (Schéma 47) et **22** (Schéma 49), le traitement du composé **25** par un amalgame de Cd/Pb (Schéma 52), conduit à la formation de deux produits dont l'un est majoritaire à plus de 75% (produit **24**), d'après l'analyse CLHP.

L'analyse, en spectrométrie de masse, du solide isolé après traitement révèle la présence de l'ion moléculaire (M+H⁺) à 266,10 correspondant au produit déprotégé **24** mais aussi de l'ion moléculaire (M+H⁺) à 406,05 (³⁵Cl) correspondant au sous-produit Dioc **25a** (Schéma 49).

Rappelons qu'à ce stade il n'est pas possible de purifier le composé **24** par chromatographie ou par recristallisation. Malgré sa faible solubilité en milieu organique, nous avons essayé d'extraire sélectivement le composé désiré **24** en modulant le pH d'extraction, mais cette méthode n'a malheureusement pas donné de résultat probant.

4.3.4.3. Conclusion sur les deux voies B2-1 et B2-2.

Nous venons de voir que seule la voie **B2-1** permet d'obtenir l'intermédiaire-clé **24** « proprement ». Mais, à partir du composé **21**, les rendements sont moyens et ce principalement pour deux raisons:

- L'introduction du groupement éthoxycarbonyle sur l'oxazine **21** est peu régiosélective à cause de l'acidité du proton porté par le NH-Troc.
- La coupure du groupement Troc est accompagnée d'un sous-produit (dérivé « Dioc ») nécessitant des étapes de purification de produits polaires.

Pour palier ces problèmes, il nous a alors semblé judicieux de modifier la voie **B2-1** en ajoutant une étape de protection du carbamate NH-Troc du composé **21** en employant un autre groupement protecteur *Z* orthogonal aux groupements Troc et CO₂Et (Schéma 53). L'élimination de ce groupement protecteur *Z* devra être réalisée après celle du groupement trichloroéthoxycarbonyle. Ceci afin de faciliter les étapes de purification en gardant l'amine en position 10 substituée.

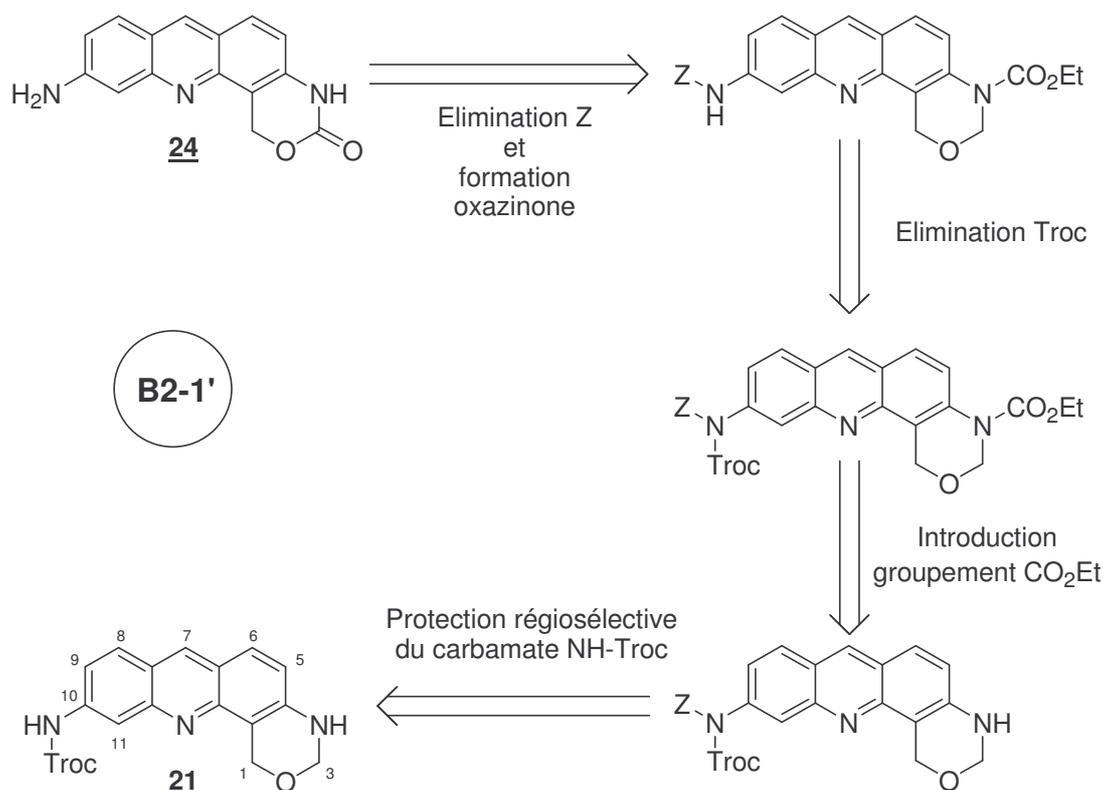


Schéma 53

Nous avons choisi le groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc) qui est connu pour être hydrolysé en milieu acide, sans donner de produits secondaires. Ce groupement protecteur pourra être ensuite hydrolysé lors de la formation du motif oxazinone dans MsOH et permettre ainsi d'éviter une étape supplémentaire de déprotection. Il présente aussi l'avantage

de rendre la molécule moins polaire ce qui devrait faciliter les purifications par chromatographie sur colonne.

4.3.5. Schéma définitif de synthèse : Voie B2-1'.

4.3.5.1. Protection de l'azote du NH-Troc du composé 21 par un Boc.

Pour introduire de manière régiosélective le groupement *tert*-butoxycarbonyle sur l'azote du carbamate NH-Troc, nous avons fait réagir le composé 21 avec le bis(*tert*-butoxy)carbonate (Boc₂O) dans la pyridine (Schéma 54).

Après avoir essayé différentes stoechiométries de réactif, nous avons observé qu'en présence de 5 équivalents de Boc₂O (Schéma 54) nous avons une réaction sélective sur le NH-Troc, avec un rendement quantitatif.

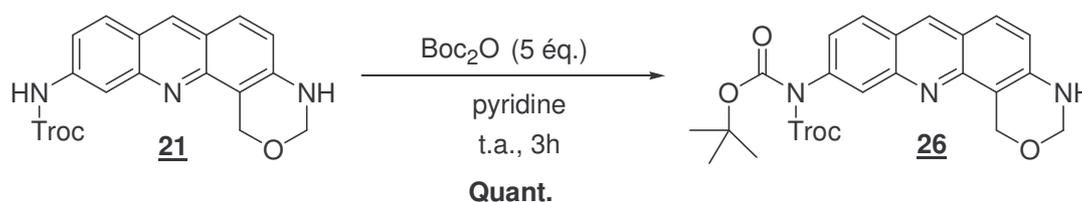


Schéma 54

En RMN du proton, dans le DMSO-*d*₆, on note la disparition du signal du proton du NH-Troc alors que le signal du proton de l'amine NH de l'oxazine est toujours présent. Ceci indique que cette substitution est totalement régiosélective.

4.3.5.2. Introduction du groupement CO₂Et sur l'azote du motif oxazine 26.

L'introduction du groupement éthoxycarbonyle est réalisée dans les conditions décrites auparavant (pyridine, 0°C) (Schéma 55).

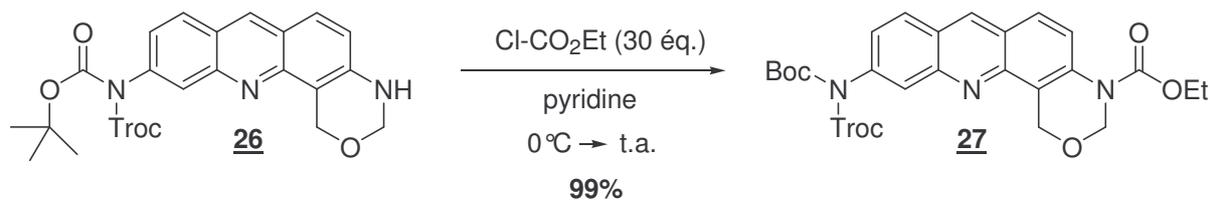
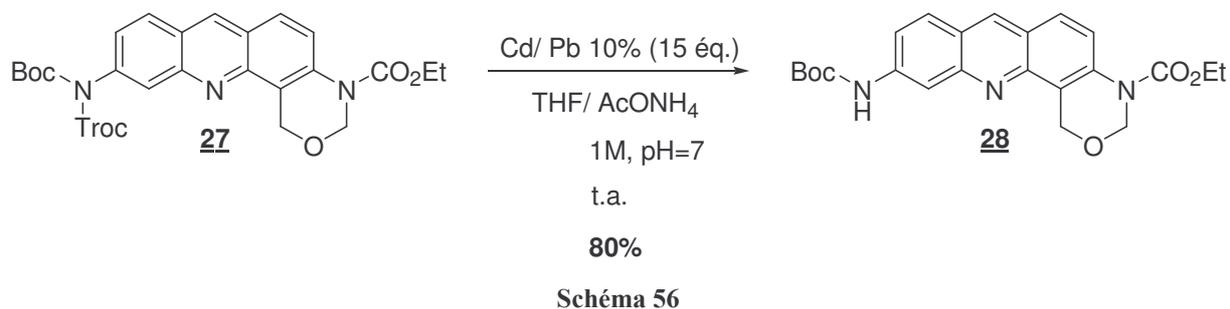


Schéma 55

Notons qu'il faut utiliser un très large excès de Cl-CO₂Et pour observer une réaction totale. Après extraction dans l'acétate d'éthyle, le composé **27** est obtenu pur avec un rendement de 99%.

En RMN du proton, enregistrée dans le DMSO-*d*₆, on peut constater que le signal du proton de l'amine NH de l'oxazine a disparu et que le doublet caractéristique de l'oxazine est devenu un singulet, ce qui montre que la substitution sur l'amine de l'oxazine s'est bien produite.

4.3.5.3. Déprotection du groupement Troc du composé **27**.



En utilisant les mêmes conditions que celles décrites auparavant (Cd/Pb 10%), nous avons observé en CLHP que le produit déprotégé **28** (Schéma 56) était majoritaire à plus de 95%. L'analyse en spectrométrie de masse du produit brut obtenu après traitement montre qu'il n'existe aucun produit chloré, et donc pas de sous-produit « Dioc » (ou dichloroéthoxycarbonyle).

Le composé **28** est obtenu avec un rendement de 80% après recristallisation dans l'isopropanol. Il peut aussi être directement employé, sans purification, dans la suite de la synthèse.

L'absence de sous-produit Dioc peut être expliquée par l'importance du proton porté par le trichloroéthoxycarbamate (schéma 48).

Pour valider cette approche, nous avons alors appliqué cette méthode à deux autres acridines⁷³ portant des amines protégées par des groupements Troc. Là aussi, nous avons observé qu'en présence d'un groupement Boc, la déprotection du groupement Troc ne conduisait pas à la formation de sous-produit « Dioc ».

⁷³ Zeghida, W.; Demeunynck, M. Application of 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl protection of aminoacridines. *Synthesis* **2007**, 231-234.

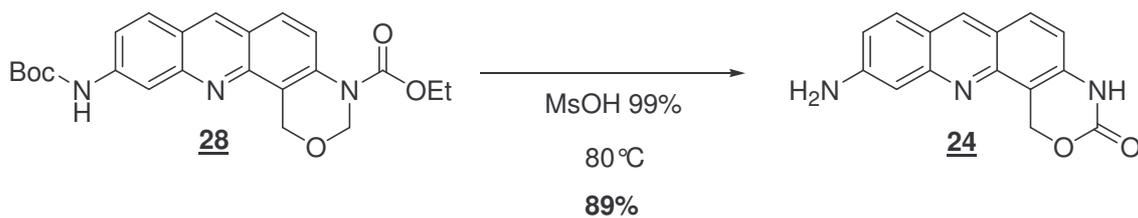
4.3.5.4. Cyclisation du composé **28** : synthèse de l'intermédiaire-clé **24**.

Schéma 57

Dans les conditions de transcarbamylation (MsOH) on peut constater, par CLHP, que la déprotection du groupement Boc (Schéma 57) est instantanée. Après précipitation en milieu basique et plusieurs lavages au méthanol, le composé **24** est obtenu avec un rendement de 89%.

4.3.5.5. Conclusion sur la voie B2-1'.

Cette voie **B2-1'** s'est révélée efficace puisqu'elle permet d'obtenir l'intermédiaire-clé **24** à partir de l'oxazine **21** avec un rendement global de 70%, au lieu de 21% par la voie **B2-1** (Schéma 58). Notons aussi que, dans cette nouvelle voie, aucune chromatographie sur colonne de silice n'est nécessaire.

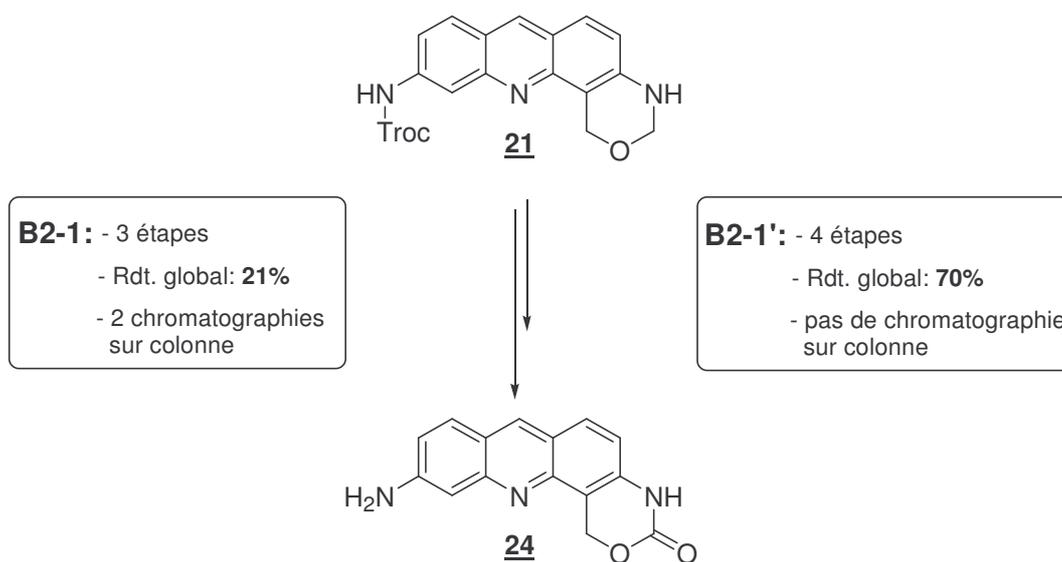


Schéma 58

4.4. Synthèse du motif guanidine à partir de l'intermédiaire-clé **24**.

La synthèse du motif guanidine à partir du composé **24** est réalisée selon la méthode d'Atwal⁴⁷ décrite précédemment et dans laquelle on synthétise, dans un premier temps, un intermédiaire de type thiourée. Ce dernier est ensuite couplé à une amine en présence d'EDCI et de Et₃N.

4.4.1. Synthèse de la thiourée **29**.

Suite aux différents essais effectués selon la voie **A**, nous avons utilisé le groupement protecteur éthoxycarbone pour la thiourée.

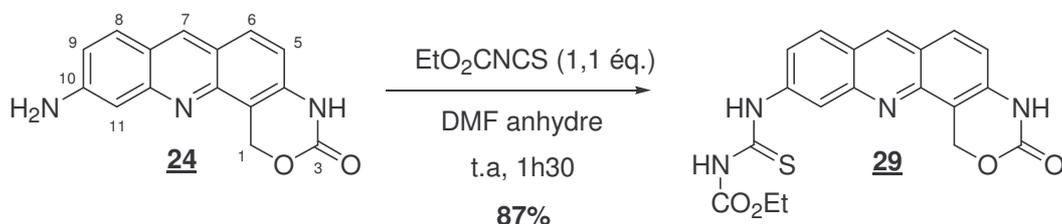


Schéma 59

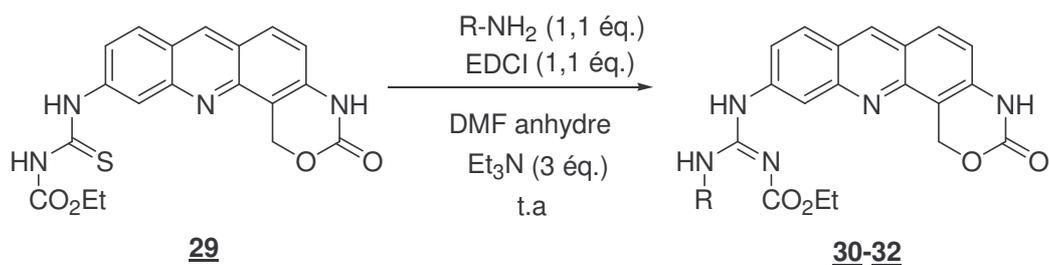
Le traitement du composé **24** par 1,1 équivalents d'isothiocyanate EtO₂C-NCS dans le DMF conduit à la formation du produit voulu **29** (Schéma 59).

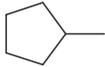
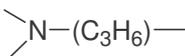
Après précipitation dans l'eau et plusieurs lavages à l'éthanol afin d'éliminer les impuretés, la thiourée **29** est obtenue avec un rendement de 87%.

En RMN du proton, dans le DMSO-*d*₆, on peut constater l'apparition des signaux caractéristiques du groupement éthoxycarbone : un quadruplet à 4,3 ppm et un triplet à 1,3 ppm. La substitution sur l'amine en position 10 est confirmée par la disparition du signal à 6,1 ppm des protons NH₂ remplacé par deux singulets déblindés à 12,9 ppm et à 11,4 ppm et intégrant pour les protons NH de la fonction thiourée.

4.4.2. Synthèse des guanidines protégées **30-32**.

Dans un premier temps, nous avons choisi de coupler la thiourée **29** avec les trois amines suivantes: la cyclopentylamine, la décylamine et la 3-(diméthylamino)propylamine (Schéma 60).



| N° | R | Rdt. brut |
|-----------|---|-----------|
| 30 |  | 97% |
| 31 | (C ₁₀ H ₂₁)— | 99% |
| 32 |  | 76% |

Sch\u00e9ma 60

Apr\u00e8s pr\u00e9cipitation dans l'eau, les guanidines **30-32** sont obtenus avec des rendements bruts de 76 \u00e0 99% et des puret\u00e9s sup\u00e9rieures \u00e0 90% (estim\u00e9es par CLHP).

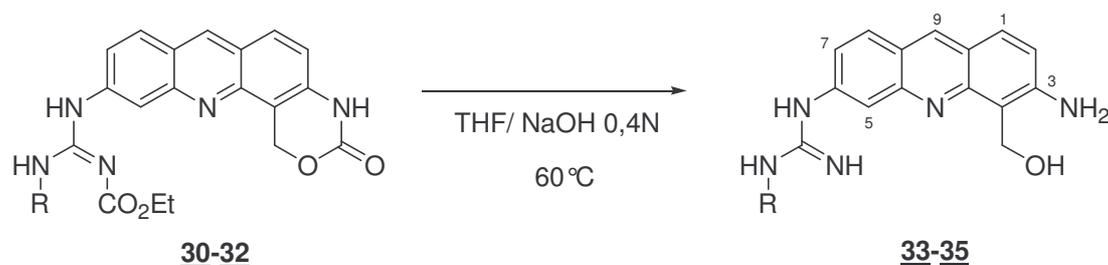
Rappelons que ces d\u00e9riv\u00e9s **30-32** comportant un motif oxazinone ne peuvent pas \u00eatre purifi\u00e9s par chromatographie ou par recristallisation.

En RMN du proton, dans le DMSO-*d*₆, la pr\u00e9sence des signaux caract\u00e9ristiques des diff\u00e9rentes cha\u00eenes alkyles (R) confirme bien la structure propos\u00e9e. On note aussi la disparition des signaux des protons NH du motif thiour\u00e9e. Les protons NH du motif guanidine ne sont pas visibles dans ces conditions.

4.5. Ouverture du cycle oxazinone : obtention des aminoalcools **33-35**.

En employant les conditions d'ouverture du cycle oxazinone d\u00e9crites par F.Charmantray⁵⁴ (THF/NaOH 0,4N), nous avons observ\u00e9, que ce soit en chauffant \u00e0 60\u00b0C ou \u00e0 temp\u00e9rature ambiante, que le groupement \u00e9thoxycarbone s'hydrolysait pour donner le motif guanidine d\u00e9prot\u00e9e (Sch\u00e9ma 61).

Cependant, cette d\u00e9protection est lente (plusieurs jours) et, au cours du temps, il se forme d'autres sous-produits.



| N° | R | Rdt. |
|-----------|-------------------------------------|------|
| 33 | | 83% |
| 34 | (C ₁₀ H ₂₁)— | 52% |
| 35 | N-(C ₃ H ₆)— | — |

Schéma 61

Contrairement aux composés **30** et **31** à partir desquels il se forme en fin de réaction un produit majoritaire (**33** ou **34**), nous avons observé en CLHP que dans le cas du composé **32** il se formait deux produits majoritaires. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à isoler ces deux produits en raison de leur forte solubilité en milieu aqueux.

Après extraction dans l'AcOEt, les aminoalcools **33** et **34** sont obtenus avec des rendements de 83% et 52% respectivement, et des puretés estimées par CLHP de l'ordre de 90%.

De manière générale, les dérivés aminoalcools sont photo-sensibles et très réactifs, ce qui limite les possibilités de purification.

En RMN du proton, dans le DMSO-*d*₆, pour les composés **33** et **34**, on note la disparition des signaux du groupement éthoxycarbone. Le singulet déblindé du proton NH de l'oxazinone à 10,5 ppm a été remplacé par un singulet à 6 ppm pour les composés **33** et **34**, intégrant pour les deux protons échangeables de l'amine NH₂ en position 3. On note également le déplacement du signal des protons benzyliques (CH₂) du groupement hydroxyméthyle vers les champs forts (blindés) pour les aminoalcools (**33** et **34**).

La structure des composés **33** et **34** a été confirmée par spectrométrie de masse ESI avec la présence de l'ion moléculaire (M+H)⁺ à 350,0 pour le composé **33**, et à 422,1 pour le composé **34**.

Afin de faciliter le traitement de ces réactions, nous avons alors essayé d'employer une résine basique (Amberlyst® 26 OH⁻, base forte) à la place de la soude mais sans résultat probant : le groupement éthoxycarboxyle et le motif oxazinone ne sont pas hydrolysés dans ces conditions.

5. Conclusion.

Les dérivés aminoalcools **33** et **34** ont été synthétisés à partir de la proflavine mono-acétylée **6** en 9 étapes (Schéma 62) avec de bons rendements à chaque étape (Rendements moyens de 88% et 75 %, à chaque étape, pour **33** et **34** respectivement).

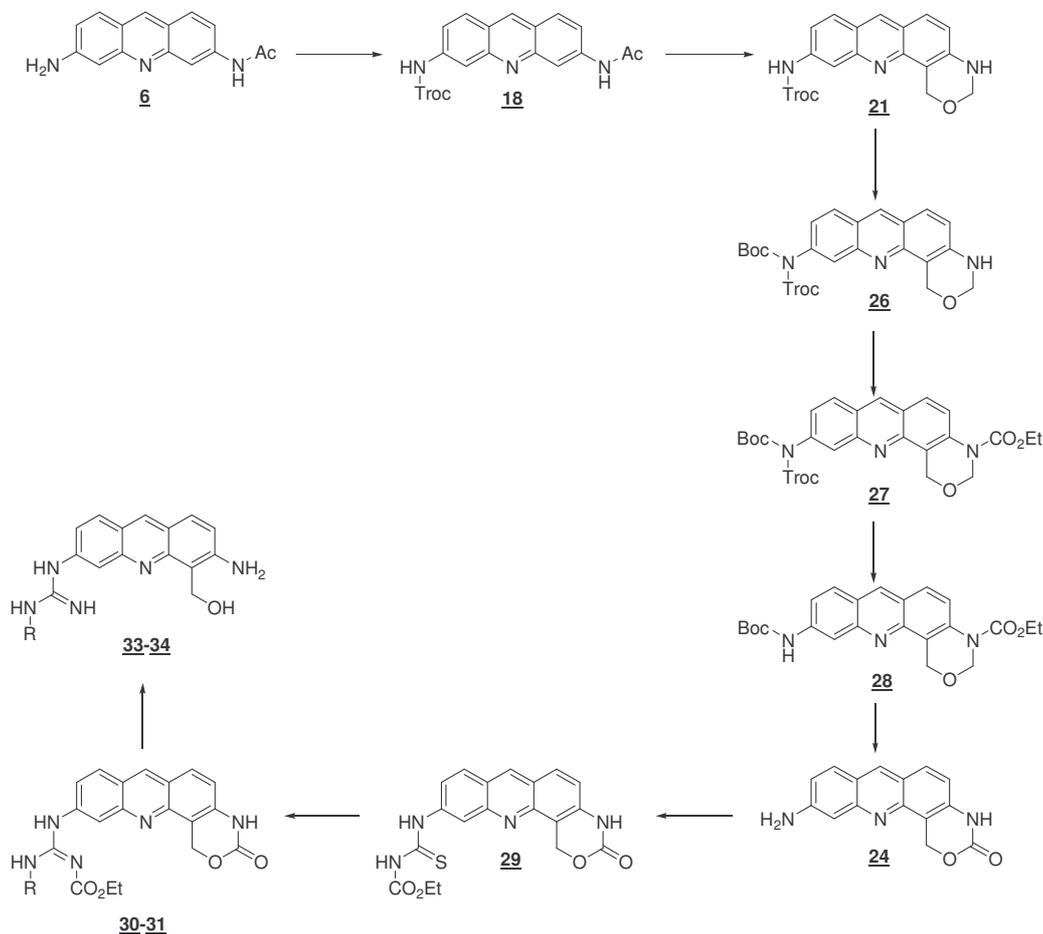


Schéma 62

B.2. Synthèse de l'acidoalcoole **36**.

A partir de l'intermédiaire-clé **24**, nous avons synthétisé l'acidoalcoole **36** (Schéma 63), par hydrolyse basique (THF/ NaOH 0,4 N).

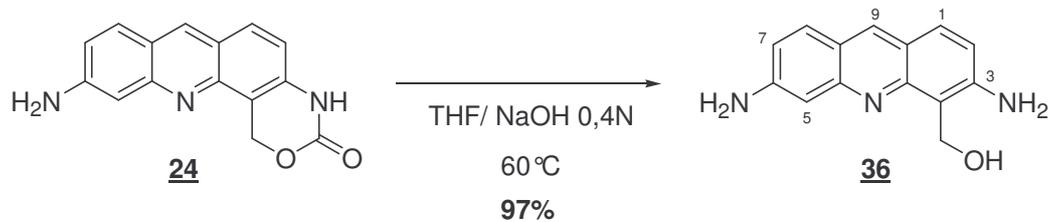


Schéma 63

Après extraction dans l'acétate d'éthyle, l'aminoalcool **36** est obtenu avec un rendement de 97% et une pureté supérieure à 95%.

En RMN du proton, dans le DMSO- d_6 , le singulet déblindé du proton NH de l'oxazinone **24** à 10,3 ppm a été remplacé par un singulet à 5,8 ppm intégrant pour les deux protons échangeables correspondant à l'amine NH₂ en position 3. On note aussi que le signal des protons benzyliques (CH₂) du cycle l'oxazinone **24** à 5,9 ppm est déplacé à 5,1 ppm pour l'aminoalcool **36**.

Ce composé **36** a été caractérisé par spectrométrie de masse haute résolution EI, avec la présence de l'ion moléculaire (M+H)⁺ à 240,11.

B-3. Synthèse de l'aminoalcool iodé **41**.

1. Choix de la stratégie de synthèse.

Pour synthétiser l'aminoalcool en série 3-amino-6-iodo-acridine (X= I) à partir de la proflavine mono-acétylée **6**, nous avons appliqué la même stratégie de synthèse qu'avait mise au point N.Fixler⁶⁷ pour synthétiser l'aminoalcool en série 3-amino (X= H) (Schéma 64).

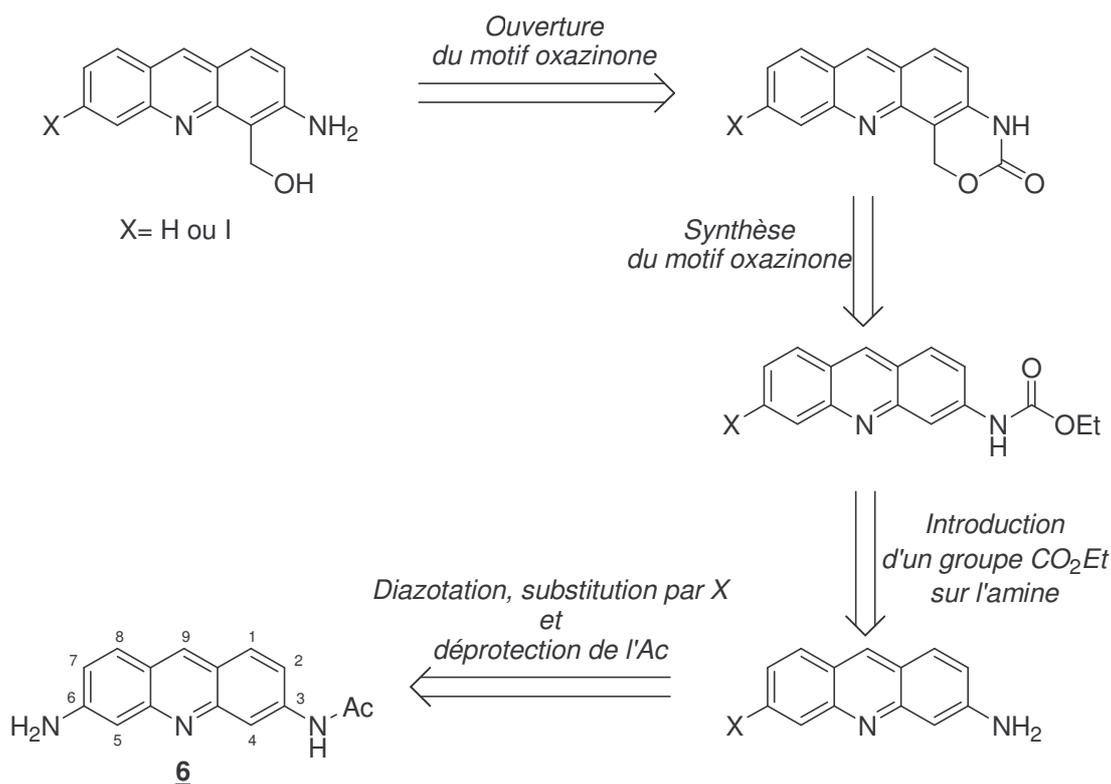


Schéma 64

La première étape de cette stratégie est une iodation de la proflavine mono-acétylée **6**, qui est réalisée par diazotation.

Pour obtenir la 3-aminoacridine (X= H), cette diazotation est réalisée en présence d'acide hypophosphoreux (H_3PO_4). Pour la synthèse du dérivé iodé (X= I), cette diazotation est réalisée en présence d'iodure de sodium (NaI) ou de potassium (KI).

Le groupement acétyle (Ac) est ensuite remplacé par un groupement éthoxycarbone (CO_2Et) qui est indispensable pour la synthèse du motif oxazinone.

Remarquons que, dans cette stratégie, pour synthétiser le motif oxazinone, nous n'isolons pas le motif oxazine (contrairement à la stratégie employée auparavant). En présence d'une quantité stoechiométrique de formaldéhyde et dans l'acide méthane sulfonique, il est possible de former directement le motif oxazinone à partir du dérivé carbamoylé. Dans ces conditions, la substitution électrophile aromatique est suivie d'une transcarbamoxylation.

Cependant pour que cette stratégie de synthèse du motif oxazinone soit efficace, il faut que le substituant en position 6 de l'acridine n'active pas la position en *ortho* vis-à-vis de la substitution électrophile aromatique (réaction uniquement du coté de l'amine $NH-CO_2Et$). Pour le dérivé 3-amino, le substituant en position 6 est un hydrogène, nous n'avons donc pas eu de problème de régiosélectivité. Nous verrons qu'avec un atome d'iode en position 6, on

retrouve aussi cette régiosélectivité (les halogènes sont connus pour être desactivants vis-à-vis des réactions de substitution électrophile aromatique).

Enfin, la dernière étape impliquée dans cette stratégie est l'ouverture de l'oxazinone en milieu basique, dans les conditions employées précédemment, pour générer ainsi le motif aminoalcool sur le dérivé iodé.

2. Iodation et hydrolyse de la fonction acétamide de la proflavine mono-acétylée 6.

Dans la littérature, une méthode permettant de synthétiser en un seul pot le dérivé 37 à partir de la proflavine mono-acétylée 6 a été décrite par Martin et Kelly⁷⁴ (Schéma 65).

Le principe de cette synthèse est le suivant : la proflavine mono-acétylée 6 est traitée, dans l'acide chlorhydrique 5N (HCl 5N), par un excès de nitrite de sodium (NaNO₂) pour former un intermédiaire diazonium. L'addition d'urée, suivie d'une filtration de la solution, permet d'éliminer le nitrite de sodium n'ayant pas réagi. Le filtrat est ensuite placé en réaction avec de l'iodure de potassium puis chauffé pour former le dérivé 37.

L'avantage de cette méthode est qu'elle peut être mise en oeuvre sur des quantités importantes de produit de départ 6 (2g). Par contre, les rendements obtenus sont généralement faibles en raison, principalement, de l'instabilité de l'intermédiaire diazonium et des réactions secondaires possibles dans l'acide chlorhydrique (échange entre I et Cl).

⁷⁴ Martin, R. F.; Kelly, D. P. Synthesis and NMR spectra of substituted aminoiodoacridine. *Aust. J. Chem.* **1979**, *32*, 2637-2646.

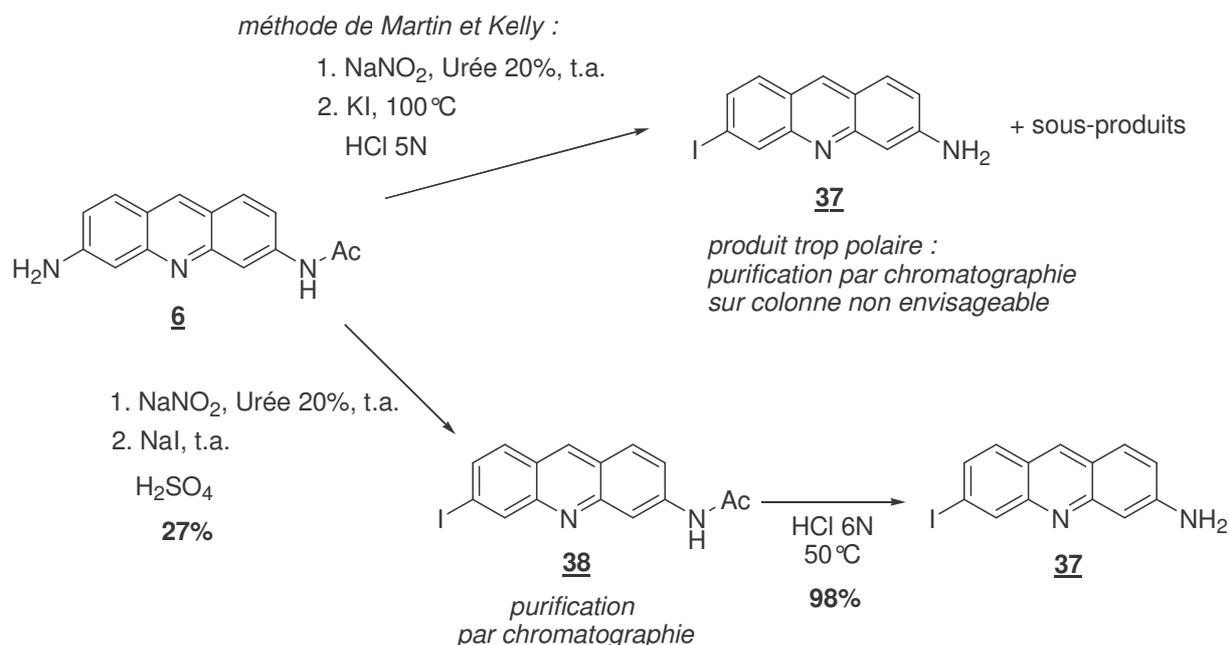


Schéma 65

Nous avons reproduit cette méthode plusieurs fois et, à chaque fois, le produit recherché **37** était accompagné de sous-produits. Ce produit **37** étant trop polaire, il n'est pas possible de le purifier par chromatographie sur colonne. Nous avons alors préféré réaliser cette réaction en deux étapes: synthétiser le dérivé iodé acétylé **38**, moins polaire que le dérivé **37**, l'isoler, puis hydrolyser le groupement acétyle.

La diazotation de la proflavine mono-acétylée **6** a été effectuée dans des conditions similaires mais en remplaçant l'acide chlorhydrique 5N (HCl) par de l'acide sulfurique 1N (H₂SO₄), ceci afin de limiter les réactions secondaires. Après ajout de l'iodure de sodium, la réaction est laissée à température ambiante (Schéma 65). Le dérivé **38** est obtenu après traitement, puis purification sur colonne de silice, avec un rendement de 27%.

Durant la purification sur colonne de silice, nous avons observé une dégradation du produit iodé **38**, ce qui expliquerait en partie ce faible rendement. Martin et Kelly avaient observé aussi que les dérivés iodés d'acridine étaient photo-sensibles⁷⁴.

Le dérivé **38** est ensuite traité dans HCl 6N (Schéma 65) à l'obscurité et, après traitement, la 3-amino-6-iodo-acridine **37** est obtenue avec un rendement de 98% sans aucune étape de purification.

La RMN du proton de ce produit **37**, dans le DMSO-*d*₆ est tout à fait en accord avec celle décrite dans la littérature⁷⁴.

3. Introduction d'un groupement éthoxycarbone sur l'amine du composé 37.

L'introduction du groupement CO₂Et sur l'amine libre du composé 37 (Schéma 66) a été réalisée dans des conditions décrites par N. Fixler⁶⁷. La réaction est suivie par CLHP.

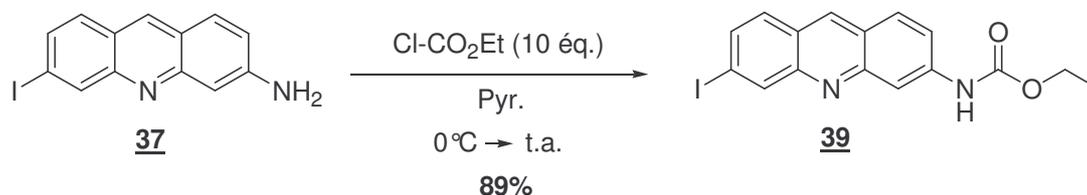


Schéma 66

Après précipitation en milieu basique, le produit 39 est obtenu avec un rendement de 89% sans aucune étape de purification supplémentaire.

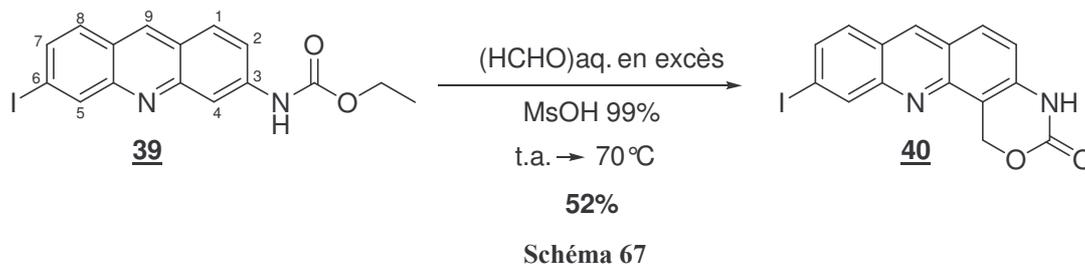
En RMN du proton, dans le DMSO-*d*₆, l'apparition des signaux caractéristiques du groupe éthoxycarbone : un quadruplet à 4,2 ppm et un triplet couplé à 1,3 ppm, ainsi que le signal très déblindé du proton échangeable porté par l'amine NH-CO₂Et à 10,2 ppm confirme la structure proposée pour le composé 39.

4. Synthèse du motif oxazinone.

Pour obtenir directement le motif oxazinone à partir d'une 3-aminoacridine N-éthoxycarboxylée, F. Charmantray⁵⁴ utilisait une quantité stoechiométrique de formaldéhyde et chauffait le mélange dans l'acide méthanesulfonique.

En reproduisant ces conditions, nous avons observé que les rendements étaient moyens et que la réaction n'était pas totale. De plus, nous avons observé que le dérivé 39 pouvait se dégrader à 80°C dans l'acide méthanesulfonique.

Après plusieurs essais, nous avons optimisé cette réaction en employant les conditions suivantes (Schéma 67): le dérivé iodé 39 est traité par un excès de formaldéhyde dans l'acide méthanesulfonique à température ambiante (Schéma 67). Après quelques heures, on peut vérifier en CLHP que le produit de départ a totalement disparu et que l'on forme très majoritairement un nouveau produit moins polaire (probablement le dérivé oxazine-N-CO₂Et correspondant). La solution est ensuite chauffée pendant 12 heures à 70°C.



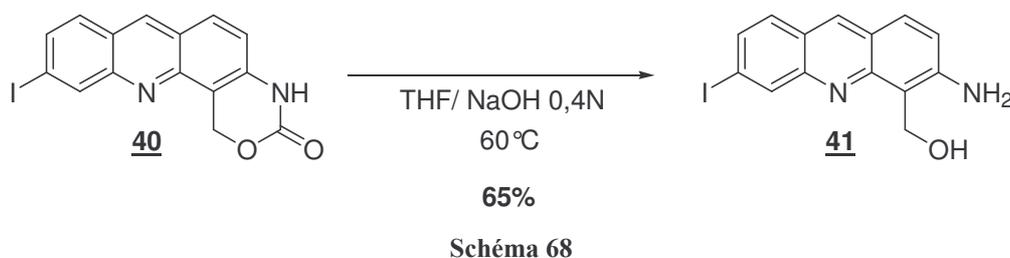
Après traitement et purification par chromatographie sur colonne, l'oxazinone **40** est obtenue avec un rendement de 52%. Ce rendement moyen est essentiellement dû à l'instabilité du produit **40** sur colonne de silice.

La régiosélectivité de la substitution électrophile aromatique peut être confirmée par analyse des données de RMN du carbone 13. En effet, la RMN du carbone 13 du produit **39** montre que l'iode induit un effet déblindant sur le signal du carbone 5 plus important que le groupement NH-CO₂Et sur le signal du carbone 4, puisque une différence de 20 ppm entre les signaux des deux carbones considérés est observé. Cette différence de déplacement chimique est corrélée à une densité électronique plus importante sur le carbone 4 que sur le carbone 5.

En RMN du proton, dans le DMSO-*d*₆, la présence du motif oxazinone dans le composé **40** est confirmée par la disparition des signaux caractéristiques du groupement CO₂Et et l'apparition d'un singulet à 5,9 ppm intégrant pour les deux protons du méthylène du cycle oxazinone. La disparition du signal du proton en position 4, alors que le signal du proton en position 5, est toujours présent confirme la régiosélectivité.

5. Ouverture du cycle oxazinone : obtention de l'ainoalcool **41**.

L'ouverture du cycle oxazinone en milieu basique (Schéma 68) a été réalisée dans les conditions précédemment décrites (THF/ NaOH 0,4N).



Après traitement, l'aminoalcool **41** est obtenu avec un rendement de 65 % et une pureté estimée, en CLHP, à plus de 95%. Cette pureté peut être améliorée par des lavages au pentane et à l'éther.

En RMN du proton, dans le DMSO-*d*₆, l'apparition d'un signal sous forme d'un singulet large à 6,2 ppm, et intégrant pour deux protons échangeables montre que l'amine n'est pas substituée. On note également que le signal correspondant aux protons benzyliques (CH₂) du cycle oxazinone **40** à 5,9 ppm est déplacé à 5,2 ppm pour l'aminoalcool **41**.

L'aminoalcool **41** a été caractérisé par spectrométrie de masse EI avec la présence de l'ion moléculaire (M+H)⁺ à 350,99.

PARTIE C/ ETUDES BIOLOGIQUES

Les propriétés biologiques des composés aminoalcool **33**, **34**, **36** et **41** ont été étudiées. Les résultats de ces études sont présentés en deux parties distinctes (C-1, C-2).

La première partie C-1 porte sur les dérivés **33** et **34** comportant un motif guanidine et le dérivé **36** (amine libre en position 6).

Pour ces composés, les propriétés biologiques étudiées sont :

- L'activité cytostatique.
- Les interactions avec l'ADN (détermination de la température de fusion (T_m) et tests enzymatiques (topoisomérases)).
- La distribution cellulaire (étude par microscopie optique de fluorescence et par microscopie confocale).

La seconde partie C-2 porte sur le dérivé **41** (composé iodo) qui, rappelons le, a été synthétisé dans le but d'étudier sa distribution par microscopie ionique.

Les propriétés biologiques étudiées pour ce composé sont :

- L'activité cytostatique.
- La distribution cellulaire (étude par microscopie optique de fluorescence et par microscopie ionique (SIMS)).

- Les mesures d'activité cytostatique, ainsi que l'étude de la distribution cellulaire (par microscopie ionique) ont été réalisées par l'équipe d'A. Croisy de l'Institut Curie à Orsay.

Les interactions avec l'ADN, ainsi que la distribution cellulaire (par microscopie optique de fluorescence ou confocale) ont été étudiées par le groupe d'A. Lansiaux de l'Institut de Recherche sur le Cancer à Lille.

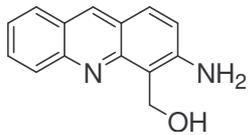
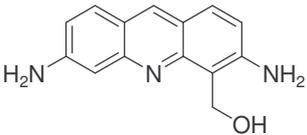
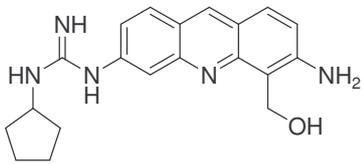
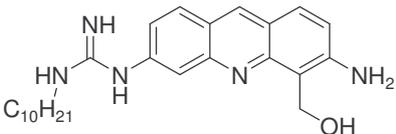
C-1. Résultats biologiques des composés 33, 34 et 36.

1. Activité cytostatique.

Les tests d'inhibition de croissance cellulaire ont été réalisés sur trois lignées cellulaires humaines :

- HeLa (carcinome du col de l'utérus (ATC CCL 2)).
- A549 (lignée cellulaire dérivant d'une tumeur humaine de type carcinome pulmonaire (ATC CCL 185)).
- HT29 (adénocarcinome de colon humain (ATCC HTB 38)).

Les résultats (Tableau 4) sont exprimés en IC_{50} , ce qui correspond à la concentration en drogue nécessaire pour inhiber la croissance cellulaire de 50%.

| N° | Composé | Activité cytostatique (IC ₅₀ en µM) | | |
|-----------|---|--|------------------|-------------------|
| | | HeLa | A549 | HT29 |
| <u>1</u> |  | 0,07 | 0,06 (0,005)* | 0,034 (0,025)* |
| <u>36</u> |  | 0,1 | 0,16 | 0,08 ± 0,01 |
| <u>33</u> |  | 0,29 | 0,14 | 0,2 ± 0,1 |
| <u>34</u> |  | 8,3 | 0,8 | 2,15 ± 0,9 |

* Valeurs obtenues en « clonage »

Tableau 4

Ces tests d'inhibition ont été effectués par cytotoxicité directe alors que les premiers tests portant sur les dérivés 1-5 ont été réalisés par clonogénicité (résultats présentés en introduction générale). Pour pouvoir comparer les valeurs d'IC₅₀ de ces nouveaux composés à celle du composé de référence 1, ce dernier a été testé dans les mêmes conditions.

De manière générale, les nouveaux composés testés montrent des activités cytostatiques très intéressantes, sur les trois lignées, avec des valeurs d'IC₅₀ inférieures au micromolaire (entre 0,08 et 0,29 µM) à l'exception près du dérivé 34 qui montre une activité plus faible comparée aux autres composés sur les lignées HeLa et HT29.

Si l'on compare les activités des dérivés comportant un motif guanidine, 33 et 34, on peut constater que le composé 33 qui possède une chaîne latérale cyclopentyle moins encombrée que le composé 34 (chaîne décyle) présente une meilleure activité cytostatique sur les trois lignées.

Nous pouvons aussi établir un ordre d'activité en fonction de la nature du groupement en position 6 de l'acridine : H (composé **1** le plus cytostatique) > NH₂ (composé **36**) > guanidine (composés **33** et **34** les moins cytostatiques).

2. Interactions avec l'ADN.

2.1. Détermination de la température de fusion (T_m).

La température de fusion (ou melting temperature, T_m) est la température pour laquelle 50% de l'ADN se trouve sous forme bicaténaire et 50% sous forme mono-brin. Elle dépend des conditions expérimentales ainsi que de la séquence de l'ADN utilisé. Les interactions d'une substance avec l'ADN (intercalant ou ligand du petit sillon) peuvent provoquer une stabilisation de la double hélice d'ADN vis-à-vis de la température. Donc, en mesurant pour un composé donné la différence de température de dénaturation thermique de l'ADN (ΔT_m), nous pouvons évaluer l'influence du composé sur la double hélice et la quantifier. En effet, plus l'affinité du composé pour l'ADN est élevée, plus la différence de température est importante. Ces mesures (Tableau 5) ont été réalisées sur de l'ADN de thymus de veau (CT-DNA, composé des couples de base AT/GC dans une proportion 50/50) et sur un polynucléotide : poly(dAdT)₂.

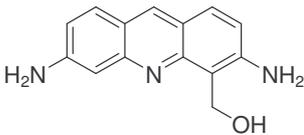
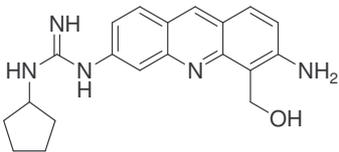
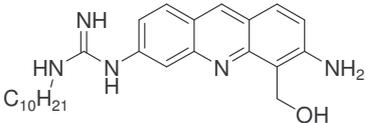
| N° | Composé | ΔT_m (°C) | |
|-----------|---|-------------------|-------------------------|
| | | CT-DNA | poly(dAdT) ₂ |
| 36 |  | 4,7 | 11,5 |
| 33 |  | 9,3 | 14,5 |
| 34 |  | 5,9 | 5,5 |

Tableau 5

Les valeurs ΔT_m obtenues pour les deux types d'ADN montrent que tous les composés testés interagissent de manière significative avec la macromolécule.

Cependant, on observe une différence significative entre les deux composés, **33** et **34**, possédant un motif guanidine. Cette différence peut être expliquée par l'encombrement lié à la chaîne décyle du composé **34** qui se traduit par une stabilisation plus faible des oligonucléotides. On remarque également une différence notable entre les deux types d'ADN, pour les composés **33** et **36**.

2.2. Tests enzymatiques (topoisomérases).

Ce test permet de visualiser l'effet potentiel des ligands sur l'activité catalytique des topoisomérases I et II. Cette technique consiste à induire la relaxation de l'ADN plasmidique superenroulé par la topoisomérase I ou II pour aboutir à une forme relaxée où l'ADN est totalement déroulé. Les molécules testées peuvent avoir un effet sur la relaxation. Puisque la relaxation de l'ADN implique la formation d'intermédiaires covalents transitoires, des formes coupées de l'ADN sont également générées lors de cette expérience. Une forme dite « nicked », dans laquelle l'ADN plasmidique est coupé sur l'un des deux brins et qui est obtenue en présence de topoisomérase I, ou une forme linéaire correspondant à une coupure des deux brins de l'ADN plasmidique qui est observée en présence de topoisomérase II. La présence de bromure d'éthidium (BET), composé fluorescent intercalant permet de visualiser, et parfois de séparer, ces différentes formes.

La topoisomérase I ne coupe qu'un seul des deux brins de l'ADN. Dans les gels dépourvus d'éthidium, les formes « nicked » et relaxées migrent à la même vitesse du fait de leurs structures globales similaires. En revanche, ces deux formes peuvent être séparées en utilisant des gels contenant de l'éthidium lors de l'électrophorèse. En effet, les formes « nicked » incorporent l'éthidium mais ne changent pas de conformation. Leur niveau de migration reste inchangé dans les gels avec ou sans BET. Par contre les formes relaxées qui incorporent de l'éthidium s'enroulent dans le sens opposé (+), leur migration est légèrement plus rapide que la forme superenroulée (-) initiale (Figure 40).

La topoisomérase II coupe les deux brins de l'ADN plasmidique. On retrouve les formes « nicked », relaxées et une forme linéaire spécifique de la coupure de la topoisomérase II.

L'inhibition des topoisomérases I et II a été testée sur l'ADN du plasmide pLAZ (130 ng) en présence de concentrations croissantes en composé testé.

➤ Tests sur topoisomérase I.

Les résultats obtenus avec les composés **33**, **34** et **36** en présence de topoisomérase I sont présentés sur la figure 40.

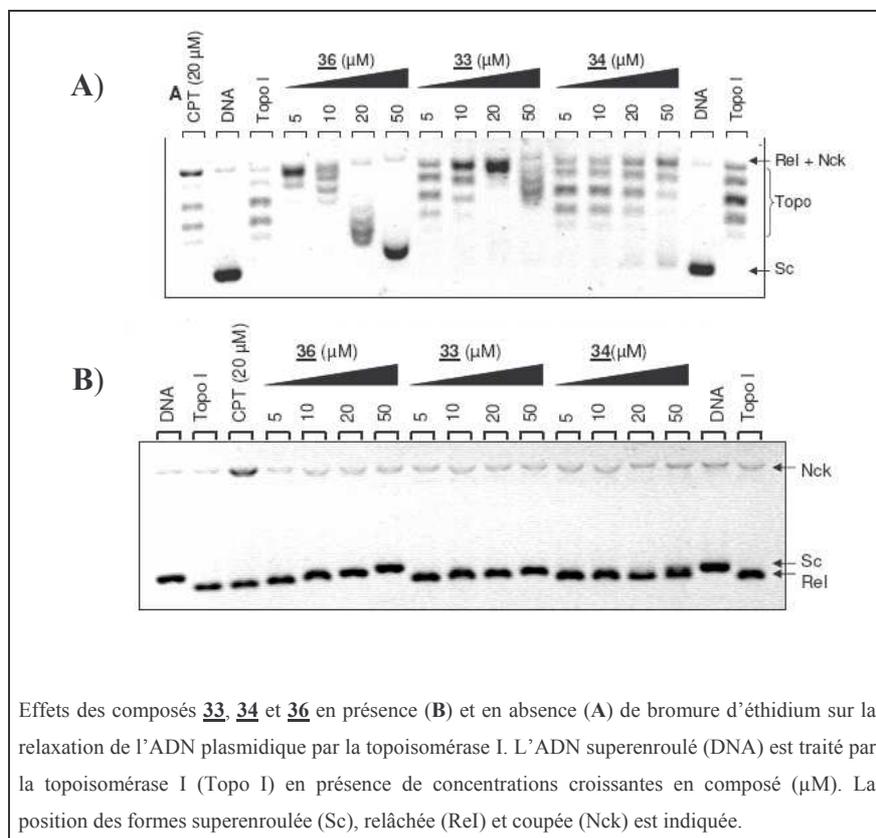


Figure 40

Dans ces expériences menées, la camptothécine (CPT sur les gels A et B) utilisée comme témoin positif provoque une forte augmentation de l'intensité de la bande d'ADN correspondant à la forme coupée (Nck). L'amplification de cette bande caractérise la capacité de la camptothécine à stabiliser les complexes covalents ADN-topoisomérase I.

Le gel **A** montre une inhibition de la relaxation de l'ADN pour les composés **33** et **36**. L'inhibition de la relaxation d'une molécule d'ADN plasmidique peut résulter soit d'une interaction directe avec le complexe de clivage covalent, soit d'une fixation à la double hélice d'ADN, empêchant ainsi l'enzyme de se fixer et d'exercer son rôle. Pour ces composés **33** et **36**, le gel **B** montre que cette inhibition est non spécifique. Il n'y a pas d'augmentation de la bande correspondant à l'ADN coupé (Nck).

D'après ces résultats, on peut conclure que les composés **33**, **34** et **36** ne sont pas des inhibiteurs de topoisomérase I. En revanche pour les composés **33** et **36**, on observe un effet non spécifique avec la topoisomérase I. L'intercalation de ces composés avec l'ADN est vraisemblablement à l'origine de ce phénomène.

➤ Test sur topoisomérase II.

Les résultats obtenus avec les composés **33**, **34** et **36** en présence de topoisomérase II sont présentés sur la figure 41.

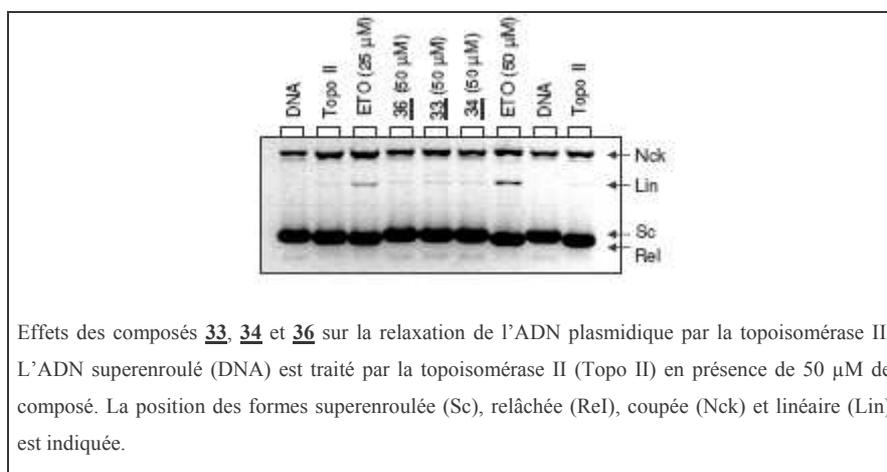


Figure 41

Dans ce test, le produit utilisé comme témoin positif est l'étoposide (ETO sur le gel). L'activité inhibitrice de ce produit se traduit par l'apparition d'une bande située entre les formes superenroulée (Sc) et coupée (Nck) ; il s'agit d'une bande d'ADN linéaire (Lin) due aux coupures doubles brins et correspondant à une stabilisation du complexe ternaire ADN-topoisomérase II-inhibiteur et à l'inhibition de l'étape de religation de l'ADN.

Sur le gel de la figure 41, on peut voir que les composés testés n'induisent pas l'apparition de la bande d'ADN linéaire (Lin).

On peut donc conclure que les composés **33**, **34** et **36** ne sont pas des inhibiteurs de topoisomérase II.

3. Distribution cellulaire.

La distribution cellulaire des molécules testées a été étudiée sur des cellules HT29. Cette distribution a été étudiée par microscopie optique de fluorescence et par microscopie confocale.

- Microscopie optique de fluorescence

Le marqueur de l'ADN utilisé est le DB 75 (bleu sur les clichés) et les composés testés fluorescent dans le vert (Tableau 6).

Les cellules HT29 ont été incubées pendant 5h en présence de 10 μ M de drogue (molécule testée).

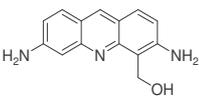
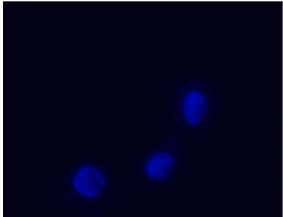
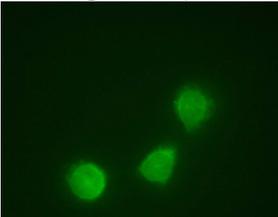
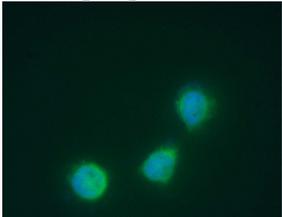
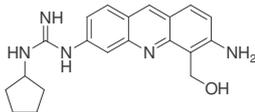
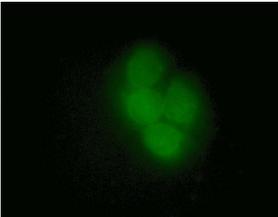
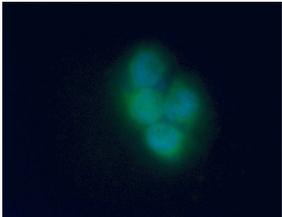
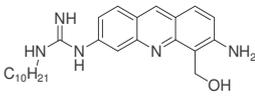
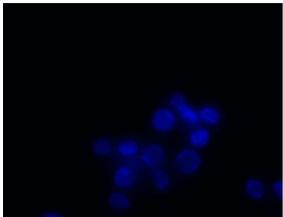
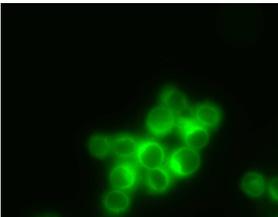
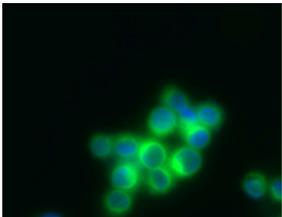
| N° | Composé | DB 75 (5 μ M) | Droque (10 μ M) | Superposition |
|-----------|---|---|--|---|
| <u>36</u> |  |  |  |  |
| <u>33</u> |  |  |  |  |
| <u>34</u> |  |  |  |  |

Tableau 6

Ces premiers résultats de microscopie suggèrent que :

- Les composés 36 et 33 se retrouvent partout dans la cellule ; à la fois dans le noyau (superposition du bleu et du vert) et dans le cytoplasme.

- Et le composé **34** est localisé uniquement dans le cytoplasme (pas de superposition du bleu et du vert)

Des études plus approfondies en microscopie confocale ont été réalisées afin de confirmer ces premiers résultats.

- Microscopie confocale

Le principe de la microscopie confocale est de capter l'image non pas de toute l'épaisseur de l'objet (cas de la microscopie optique de fluorescence), mais uniquement d'un plan donné (sur une coupe). Il permet ainsi d'augmenter la qualité de l'image.

On peut aussi quantifier la fluorescence des différents fluorophores dans une cellule donnée (marqué par un trait rouge sur les photos des Figures 42 et 43). L'intensité de fluorescence est représentée par les courbes de droite sur les figures 42 et 43. On peut ainsi voir très nettement si les différents fluorophores sont co-localisés.

Pour réaliser ces études, deux marqueurs ont été utilisés : un marqueur de l'ADN (Tropo-3, bleu) et un marqueur des mitochondries (Mito Fluo Red, rouge) utilisé pour marquer le cytoplasme.

Les cellules HT29 ont été incubées pendant 6h en présence de 5 μ M de molécule testée.

Seuls les résultats obtenus pour les composés **36** et **34** sont présentés ici (Figures 42 et 43). Le composé **33** est actuellement en cours d'étude.

➤ Composé **36**

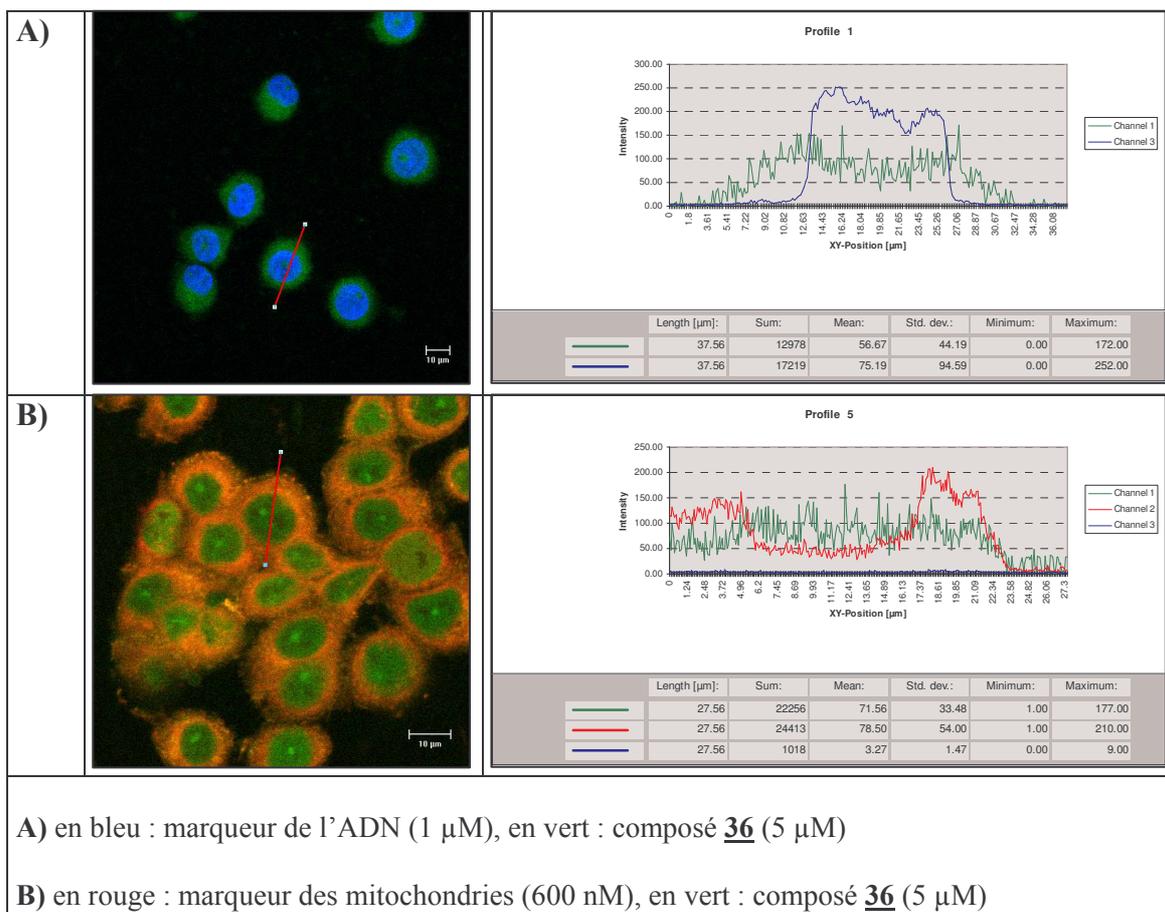


Figure 42

D'après les courbes d'intensité de fluorescence, on peut voir que le composé **36** est localisé à la fois dans le noyau (superposition du bleu et du vert) et dans le cytoplasme (superposition du rouge et du vert). Ce qui confirme le résultat obtenu en microscopie optique de fluorescence.

➤ Composé **34**

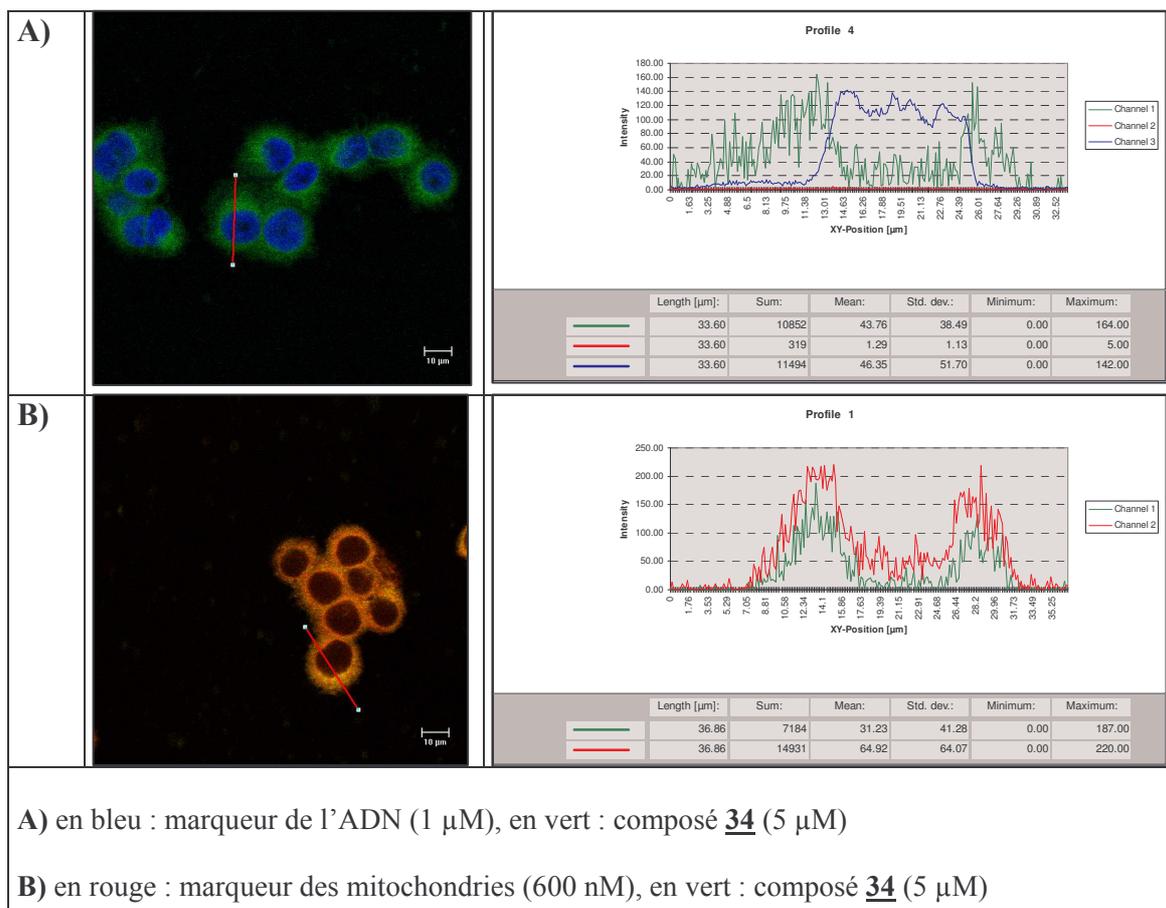


Figure 43

Pour le composé **34**, il apparaît clairement qu'il n'est pas co-localisé avec le marqueur du noyau (courbe de droite, figure A). En revanche, on peut voir sur la figure B que nous avons une co-localisation avec le marqueur des mitochondries. Le composé **34** aurait donc une localisation uniquement dans le cytoplasme, ce qui confirme une nouvelle fois le résultat obtenu en microscopie optique de fluorescence.

4. Conclusion.

De manière générale, tous les résultats des études biologiques sont cohérents entre eux, à savoir :

- Les composés les plus cytostatiques **33** et **36** présentent de très bonne affinité pour l'ADN (Tm). Ce sont de bons intercalants de l'ADN mais ils n'inhibent pas l'activité des topoisomères I et II. Ils sont localisés de manière diffuse dans la

cellule, aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme. L'ADN est donc une cible potentielle pour ces deux composés.

- Le composé **34** présente l'activité cytostatique la plus faible, une affinité pour l'ADN faible par rapport aux autres composés **33** et **36**. Il n'apparaît pas comme un bon intercalant comparé aux deux autres molécules. Il n'est pas non plus inhibiteur de topoisomérases I et II. Dans la cellule, il est localisé uniquement dans le cytoplasme. On peut dire que l'ADN n'est pas la cible de ce composé.

L'ensemble de ces résultats est tout à fait comparable aux données obtenues pour les molécules du même type précédemment décrites. La présence d'une fonction guanidine ne semble pas affecter de façon significative les propriétés biologiques des molécules.

C-2. Résultats biologiques du composé **41**.

1. Activité cytostatique.

L'activité cytostatique du composé iodé **41** a été mesurée sur trois lignées cellulaires humaines (HeLa, HT29, A549) (Tableau 7).

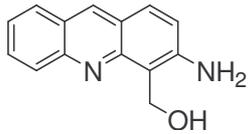
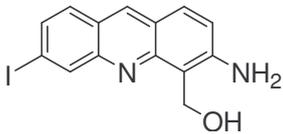
| N° | Composé | Activité cytostatique (IC ₅₀ en μM) | | |
|-----------|---|--|-------------|-------------|
| | | HeLa | A549 | HT29 |
| 1 |  | 0,07 | 0,06 | 0,034 |
| 41 |  | 0,07 ± 0,08 | 0,13 ± 0,01 | 0,07 ± 0,03 |

Tableau 7

Sur la lignée HeLa, le composé **41** présente une activité cytostatique comparable à celle du composé de référence **1**. Sur les lignées A549 et HT29, son activité est plus faible que

le composé **1**, mais reste très intéressante avec des valeurs d'IC₅₀ inférieures au micromolaire (de 0,07 à 0,13 µM).

2. Distribution cellulaire.

La distribution cellulaire du composé **41** a été étudiée par microscopie optique de fluorescence sur des cellules HT29 et par microscopie ionique (SIMS) sur des cellules A549.

- Microscopie optique de fluorescence (Figure 44).

Les conditions utilisées pour cette étude sont les mêmes que pour les dérivés aminoalcools précédents.

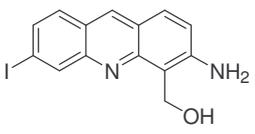
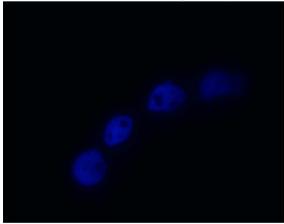
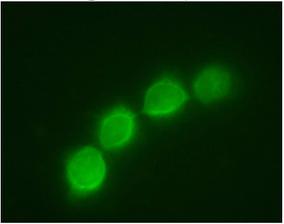
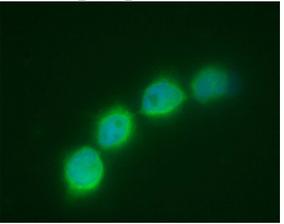
| N° | Composé | DEB 75 (5µM) | Droque (10µM) | Superposition |
|-----------|---|--|---|--|
| 41 |  |  |  |  |

Figure 44

Ces premiers résultats de microscopie suggèrent que le composé **41** est localisé uniquement dans le cytoplasme puisque sur le cliché de « superposition », on ne voit pas de co-localisation entre le marqueur bleu de l'ADN et le composé **41** (vert). Pour confirmer ce résultat une étude en microscopie confocale est en cours, mais se heurte à une faible émission de fluorescence de ce composé iodé **41**.

- Microscopie ionique (SIMS, Figure 46).

Développée initialement à l'Université d'Orsay (par Castaing et Slodzian⁷⁵ en 1962), l'imagerie par spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) est basée sur l'émission de particules secondaires, à partir des quelques premières couches d'atomes (1-2 nm) de la surface d'un échantillon solide, sous l'effet du bombardement par un faisceau d'ions primaires

⁷⁵ Castaing, R.; Slodzian, G. *J. Microsc.* **1962**, 1, 395-410.

très énergétiques (produit par une source de césium de 8 KeV). Sous l'impact, les liaisons chimiques sont rompues et les atomes (ou des combinaisons d'atomes) sont libérés, soit sous forme neutre, soit sous forme chargée (ions). Ces ions peuvent être collectés et focalisés sous forme d'un faisceau secondaire jusqu'à l'entrée d'un spectromètre de masse où les ions vont alors être triés en fonction de leur rapport m/z (masse/charge). L'ensemble du système est maintenu sous ultra-vide (10^8 - 10^{10} Torr).

Le Nanosims-50 constitue la dernière génération de micro-sonde ionique⁷⁶ (Figure 45). Il est constitué d'une source d'ions primaires, d'un spectromètre de masse et d'un système de détection parallèle. Il permet l'identification directe d'éléments, avec une sensibilité et une sélectivité élevées, et la détection simultanée de plusieurs espèces (jusqu'à 5 espèces) du même micro-volume. Il peut aussi être utilisée pour fournir une distribution d'éléments avec une résolution spatiale ≤ 50 nanomètre.

Par conséquent, cette micro-sonde de SIMS présente un potentiel élevé en biologie pour ce qui concerne l'étude de la distribution cellulaire de molécules d'intérêt (éléments rares, isotopes, drogues).

La préparation des échantillons est un aspect important et difficile du fait de la complexité et de l'aspect dynamique de la matière biologique qui nécessite souvent la mise en œuvre de méthodes cryogéniques.

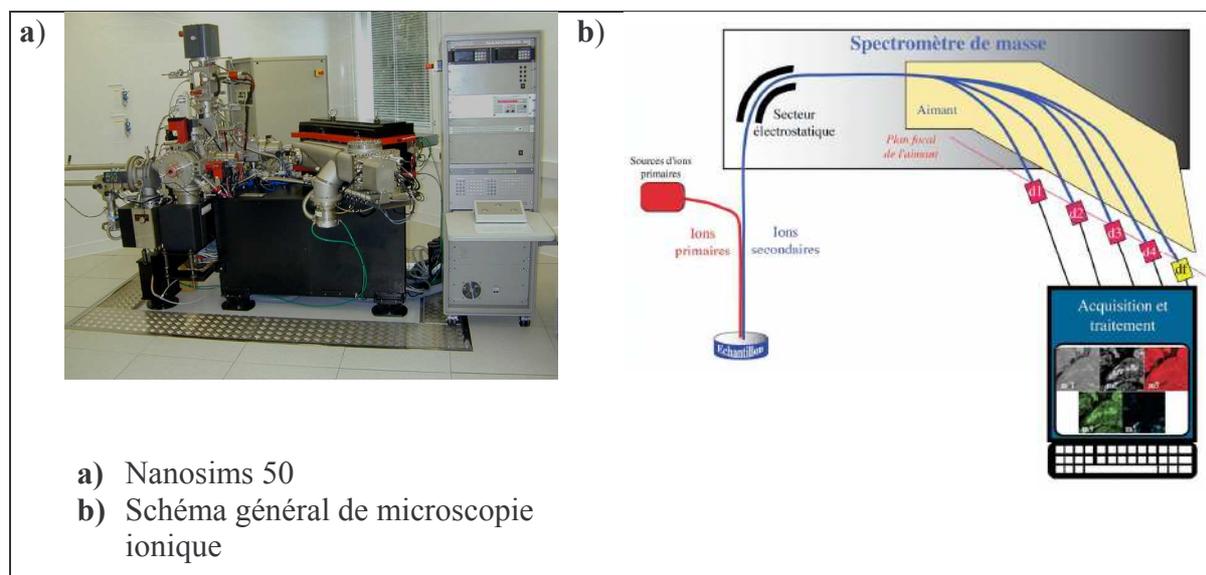


Figure 45

⁷⁶ Guerquin-Kern, J. L.; Hillion, F.; Madelmont, J. C.; Labarre, P.; Papon, J.; Croisy, A. Ultra-structural cell distribution of the melanoma marker iodobenzamide: improved potentiality of SIMS imaging in life sciences. *Biomedical Engineering Online* **2004**, 3:10.

Chaque étape du procédé doit être optimisée en fonction du type d'échantillon et de la finalité de l'expérience, ceci afin de préserver la distribution initiale des ions diffusibles et des petites molécules solubles.

➤ Résultat

Les cellules A549 ont été incubées en présence de la drogue (0,5 μ M) durant 24 heures.

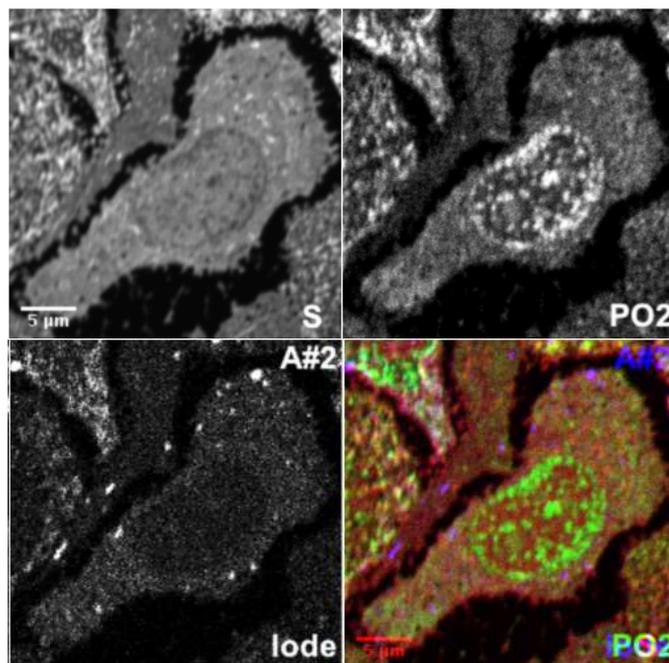


Figure 46

Dans cette étude, des images de $^{32}\text{S}^-$, $^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^-$ et $^{127}\text{I}^-$ ont été acquises simultanément (Figure 46). L'image en haut à gauche représente la distribution du soufre, en haut à droite, la distribution du phosphore et en bas à gauche, la distribution de l'iode.

La distribution du soufre peut être associée à celle des protéines et fournit, entre autres, des informations sur la morphologie de la cellule mais aussi la localisation des compartiments où l'on retrouve des concentrations élevées de protéines. La distribution du phosphore peut être associée à celles des macromolécules riches en phosphore comme l'ADN, et permet donc de localiser le noyau de la cellule. La distribution de l'iode peut être associée à celle de notre composé, qui est a priori la seule molécule comportant un iode dans la cellule.

La superposition des trois images (en bas à droite sur la figure 46) montre que nous n'avons pas de co-localisation entre la distribution du phosphore et de l'iode ce qui suggère

que le composé **41** n'est pas dans le noyau. Ce résultat corrobore tout à fait celui obtenu en microscopie de fluorescence. Par contre, nous pouvons voir qu'à certains endroits la distribution du soufre est co-localisée avec celle de l'iode. Le composé **41** semble être localisé dans la cellule dans des compartiments riches en protéines comme les endosomes ou les lysosomes.

3. Conclusion.

Ce composé iodé est en cours d'études. Les résultats présentés ici sont encore préliminaires. Néanmoins, on peut dire que :

- La présence de l'iode ne modifie pas les propriétés biologiques de la molécule de référence **1** (activité cytostatique et distribution cellulaire).
- L'hypothèse d'une localisation dans les lysosomes est envisagée. Une étude plus complète est maintenant nécessaire pour comprendre le mécanisme d'action de cette famille de molécules.

Chapitre II

Synthèse de guanidinoacridines et étude de l'influence du motif guanidine sur le pKa de l'acridine.

PARTIE A/ INTRODUCTION

Dans cette partie du travail, nous avons étudié l'influence du motif guanidine sur le pKa de l'acridine. Cette étude a été réalisée sur trois dérivés guanidinoacridines **46**, **47** et **48** (Figure 47) préparés à partir des amines correspondantes : respectivement la 3-aminoacridine, la 3,6-diaminoacridine et la proflavine mono-acétylée **6**. Pour des raisons de solubilité, nous avons choisi de fonctionnaliser le motif guanidine par une chaîne 3-(diméthylamino)propyle.

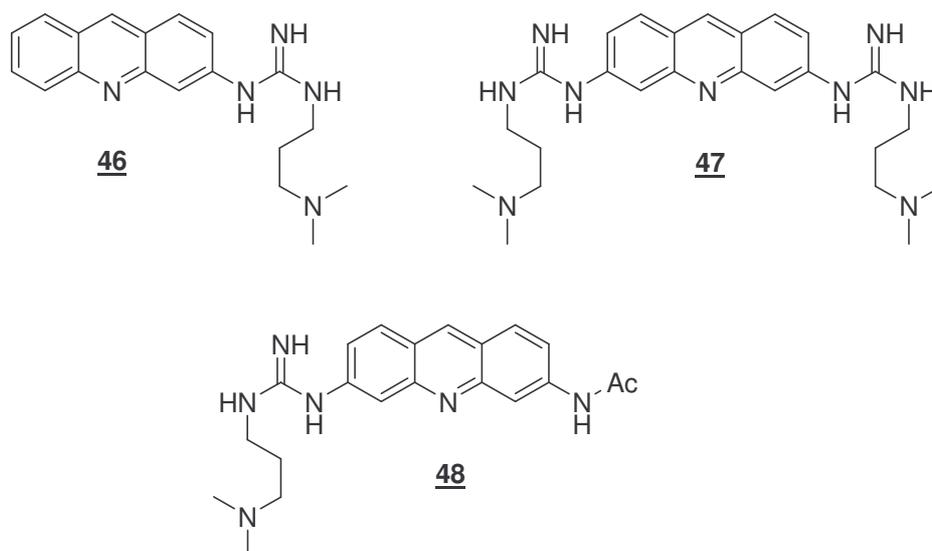


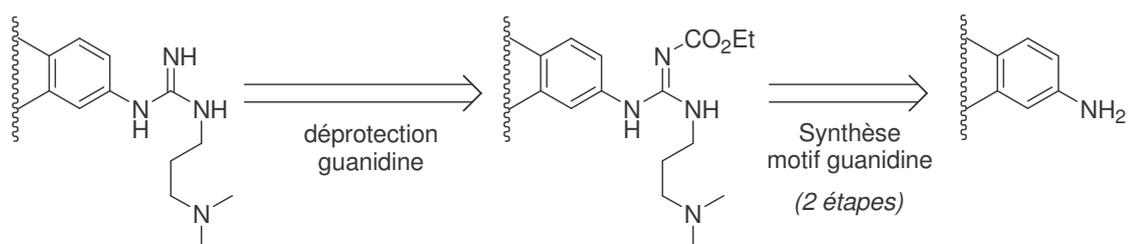
Figure 47

La synthèse de ces guanidinoacridines **46**, **47** et **48** est présentée dans la Partie B et l'étude du pKa de ces composés est présentée dans la Partie C.

PARTIE B/ SYNTHÈSES

1. Synthèse des guanidinoacridines **46**, **47** et **48**.

Le motif guanidine a été synthétisé selon la méthode d'Atwal⁴⁷, décrite précédemment (2 étapes). Les guanidinoacridines protégées **44**, **45** et **10** obtenues ont été ensuite déprotégées dans une troisième étape (Schéma 69).



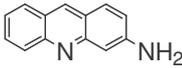
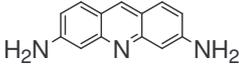
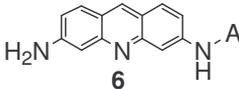
| Guanidine déprotégée | Guanidine protégée | amine de départ |
|----------------------|--------------------|---|
| <u>46</u> | <u>44</u> |  |
| <u>47</u> | <u>45</u> |  |
| <u>48</u> | <u>10</u> |  |

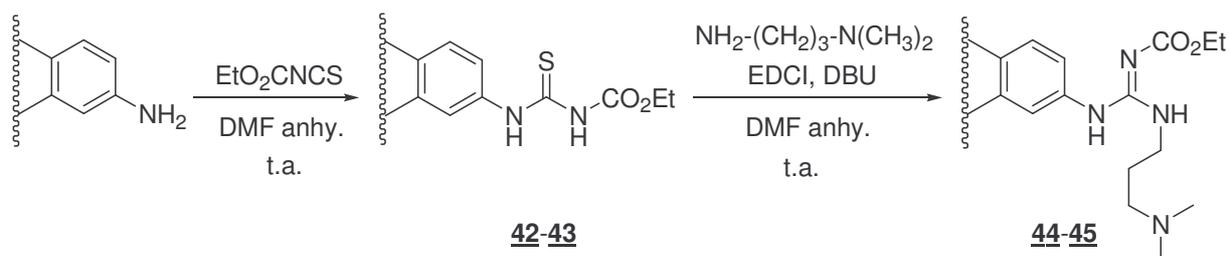
Schéma 69

1.1. Synthèse des guanidines protégées 44, 45 et 10.

La synthèse de la guanidine protégée 10 est décrite dans le chapitre I. La 3-aminoacridine est obtenue à partir de la proflavine monoacétylée 6 par désamination nitreuse en présence d'acide hypophosphoreux (H_3PO_4), suivie d'une hydrolyse en milieu acide du groupement acétyle (Ac). Le traitement de la 3-aminoacridine par 1,1 équivalent d'isothiocyanate EtO_2C-NCS conduit très majoritairement à la thiourée voulue 42. Avec la proflavine (3,6-diaminoacridine), il faut employer un large excès d'isothiocyanate EtO_2C-NCS pour que la réaction soit totale et conduise à la thiourée correspondante 43 avec un rendement convenable (Schéma 70).

Les dérivés des thiourées 42 et 43 sont obtenus, après précipitation dans l'eau, avec des rendements respectifs de 78 et 48%. La thiourée 43 est accompagnée de sous-produits qui sont éliminés par des lavages à l'éthanol. Ceci explique en partie le faible rendement obtenu pour ce dérivé.

En RMN du proton dans le $DMSO-d_6$, la présence des signaux caractéristiques du groupement CO_2Et , un quadruplet et un triplet couplé, ainsi que les deux singulets des protons portés par les deux azotes de la fonction thiourée confirme que nous avons bien les dérivés recherchés.



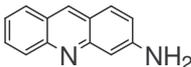
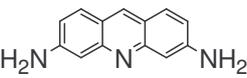
| produit de départ | thiourée | Rdt | guanidine protégée | Rdt |
|---|-----------|-----|--------------------|-----|
|  | 42 | 78% | 44 | 36% |
|  | 43 | 48% | 45 | 20% |

Schéma 70

Les intermédiaires thiourées ont ensuite été couplés à la 3-(diméthylamino)propylamine (1,2 équivalent / thiourée) en présence d'EDCI et de DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-ène) dans le DMF.

Après évaporation du solvant, les guanidinoacridines **44** et **45** sont obtenues sous forme d'huile. Un échange de contre-ion en milieu acide (HCl) avec l'hexafluorophosphate d'ammonium, permet d'extraire les produits en milieu organique et de les purifier par chromatographie sur alumine (éluant : AcOEt/MeOH/NH₄OH 99 :0,99 :0,01).

Les guanidines, sous forme de sels de PF₆⁻, sont ensuite passées sur une résine échangeuse d'ions Cl⁻ afin de les obtenir sous forme de chlorhydrates. Les faibles rendements obtenus pour ces deux réactions de couplage sont essentiellement dus à des pertes durant les traitements (colonne d'alumine, résine Cl⁻).

Pour la suite de la synthèse, nous avons considéré que le nombre de contre-ions Cl⁻ pour la guanidine protégée **44** était de 3, et de 5 pour la guanidine protégée **45** (protonation des fonctions amine(s) tertiaire(s), guanidine(s), azote hétérocyclique).

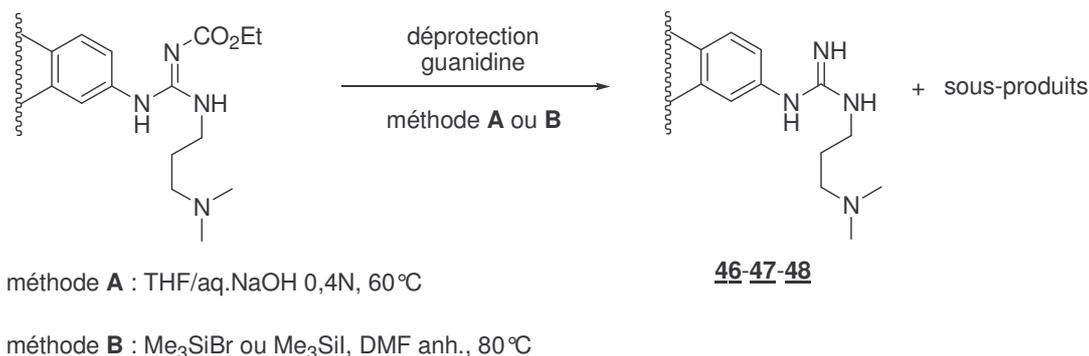
En RMN du proton, dans le DMSO-*d*₆, la présence des signaux caractéristiques de la chaîne propyle, 2 triplets et un quintuplet, ainsi que le singulet des protons N(CH₃)₂ confirme que nous avons bien les structures attendues.

1.2. Déprotection des guanidinoacridines 44, 45 et 10.

En raison de leur polarité, les guanidines déprotégées sont très difficile à purifier. Les techniques traditionnelles de purification comme la chromatographie sur gel de silice ne peuvent pas être envisagées sur de tels composés. C'est pourquoi nous avons testé différentes méthodes de déprotection afin d'obtenir les guanidine finales avec les meilleures puretés.

Dans le chapitre I, nous avons employé une solution basique pour hydrolyser le carbamate de la guanidine. Dans la littérature, une autre méthode décrite par Manimala et Anslyn⁷⁷, utilise le bromure de triméthylsilyle (Me_3SiBr) pour déprotéger les guanidines $\text{N-CO}_2\text{Et}$. Nous avons donc employé parallèlement les deux méthodes : l'hydrolyse basique (méthode **A**) et la méthode de Manimala et Anslyn en utilisant soit le Me_3SiBr , soit le Me_3SiI (méthode **B**) à 80°C dans le DMF anhydre.

Les résultats obtenus à partir des intermédiaires protégés 10, 44 et 45 sont résumés dans le schéma suivant (Schéma 71).



| guanidine protégée | méthode employée | temps de réaction | % produit déprotégé* | % sous-produits* |
|--------------------|---------------------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| <u>10</u> | B (Me_3SiBr) | 3h | 90% (<u>48</u>) | 10% |
| <u>44</u> | B (Me_3SiI) | 5h | 20% (<u>46</u>) | 80% (<u>49</u>) |
| | A | 24h | 90% (<u>46</u>) | 10% |
| <u>45</u> | A | 24h | 95% (<u>47</u>) | 5% |

*estimé par CLHP

Schéma 71

⁷⁷ Manimala, J. C.; Anslyn, E. V. A highly efficient method for the synthesis of guanidinium derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 565-567.

Le traitement de la guanidine protégée **10** avec 5 équivalents de Me₃SiBr conduit très majoritairement à la guanidine déprotégée **48**.

Après précipitation dans un mélange éther/éthanol absolu, la guanidine **48•3HBr** est isolée sous forme de sels (**48•3HBr**) avec un rendement de 91% et une pureté de 90%, estimée par CLHP. Des lavages à l'éthanol absolu permettent d'augmenter la pureté de ce produit (98% après plusieurs lavages). Remarquons que le groupement acétyle (Ac) est stable dans ces conditions. Pour ce composé **10** nous nous sommes contentés de cette méthode (**B**) puisque les résultats obtenus étaient satisfaisants.

Pour la guanidine protégée **44**, nous avons utilisé le Me₃SiI, plus réactif, au lieu du Me₃SiBr. Le traitement de la guanidine **44** avec 10 équivalents de Me₃SiI conduit à un mélange de deux produits dont, minoritairement, la guanidine déprotégée **46** (20% selon CLHP). Après précipitation dans un mélange éther/éthanol absolu, nous avons isolé le produit majoritaire **49** de cette réaction (Figure 47). Sa structure a pu être déterminée par analyse RMN et spectrométrie de masse. Il serait issu d'une cyclisation intramoléculaire.

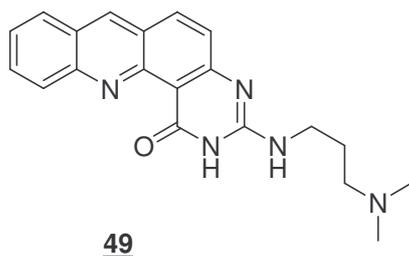


Figure 48

Bien que le produit majoritaire ne soit pas celui attendu, ce résultat nous a encouragé à étudier plus en détails cette nouvelle réactivité. Cette étude est présentée dans le chapitre III.

En revanche, l'hydrolyse basique (méthode **A**) des guanidines **44** et **45** a permis d'obtenir les guanidines déprotégées **46** et **47** majoritairement (90% et 95% respectivement selon CLHP). Après évaporation et précipitation dans l'acétate d'éthyle, les guanidinoacridines **46** et **47** sont isolés avec des rendements de 48 et 49% respectivement. Ces composés sont partiellement solubles dans l'acétate d'éthyle ce qui explique les faibles rendements obtenus après traitement.

Les guanidines déprotégées sont caractérisées en RMN du proton, dans le DMSO-*d*₆, par la disparition des signaux caractéristiques du groupement CO₂Et.

Les guanidinoacridines **46-48** ont été caractérisées par spectrométrie de masse ESI.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 8) :

| Produits | Masse moléculaire (MW) | ESI (M+H)⁺ trouvé |
|------------------|---------------------------------------|---|
| <u>46</u> | 321,42 | 322,21 |
| <u>47</u> | 463,62 | 464,30 |
| <u>48</u> | 378,47 | 379,10 |

Tableau 8

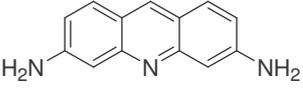
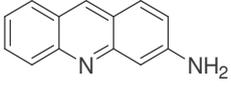
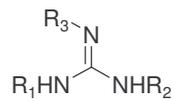
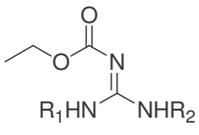
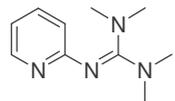
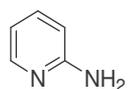
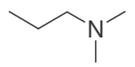
PARTIE C/ CALCUL DES pKa

1. Données bibliographiques et calculs théoriques.

En observant la structure des composés **46**- **48** nous pouvons prévoir :

- Trois sites de protonation pour les dérivés **46** et **48**
- Cinq sites de protonation pour le dérivé **47**

La détermination des pKa de ces composés peut être effectuée par titrage spectrophotométrique (UV/Vis) en fonction du pH. Dans un premier temps, afin d'avoir une idée sur l'attribution de l'ordre des pKa, nous avons comparé les pKa des différents azotes protonables (amine hétérocyclique, amine tertiaire et guanidine) de la molécule avec les données de la littérature (Tableau 9).

| Composés azotés | pKa (dans l'eau) | Réf. |
|---|------------------|----------------------------------|
|  | 9,7* | Albert ⁷⁸ |
|  | 8,4* | Albert ⁷⁸ |
|  | 13,5 | Suhs et König ⁷⁹ |
|  | > 8 | Suhs et König ⁷⁹ |
|  | 10,5 | Foroughifar et al. ⁸⁰ |
|  | 6,82* | Albert et Serjeant ⁸¹ |
|  | 9,99 | Albert et Serjeant ⁸¹ |

*pKa de l'azote central de l'hétérocycle

Tableau 9

Le pKa des guanidines (mono, di- ou tri-substituées) se situe généralement aux alentours de 12-13. Toutefois, celui-ci varie fortement en fonction de la nature des substituants. Lorsque l'un des substituants est un groupement électro-attracteur, comme un carbamate, le pKa peut chuter de cinq unités (pKa>8).

Nous avons également trouvé un exemple de guanidine substituée par un hétérocycle (une pyridine) exerçant un effet électro-attracteur comme c'est le cas avec notre composé acridine.

⁷⁸ Albert, A. *The acridines*. second ed.; Arnold: London, 1966.

⁷⁹ Suhs, T.; König, B. Synthesis of functionalized guanidino amino acids. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 8150-8157.

⁸⁰ Foroughifar, N.; Lee, Y. G.; Leffek, K. Basicity of substituted 2-pyridyl-1,1,3,3-tetramethylguanidines and aminopyridines in acetonitrile and water solvents. *Can. J. Chem.* **1992**, 70, 2856-2858.

⁸¹ Albert, A.; Serjeant, E. P. *The determination of Ionization Constants*. second ed.; Chapman and Hall Ltd: Great Britain, 1971.

Cet effet électro-attracteur se traduit par une diminution du pKa du motif guanidine de 3 unités (pKa=10,5).

A partir de ces données, nous avons pu émettre l'hypothèse que pour les composés **46**, **47**, **48**, le pKa de l'azote hétérocyclique est inférieur à ceux de la guanidine et de l'amine tertiaire.

Une série de calculs théoriques DFT a été effectuée parallèlement par C. Michel de l'équipe de chimie théorique de notre laboratoire. Ces calculs ont été réalisés à partir de guanidinoacridines simples afin de déterminer quel est le premier site de protonation de ces dérivés (entre l'azote hétérocyclique et le motif guanidine). Les ΔG phase gaz calculés correspondent à l'énergie libre de la réaction de déprotonation de l'espèce acide ($AH + B \rightarrow A + BH$). Le mode de calcul utilisé pour déterminer ces ΔG est PBE1PBE/6-31G**. Le site de protonation est donné par la forme acide la plus stable.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 10) :

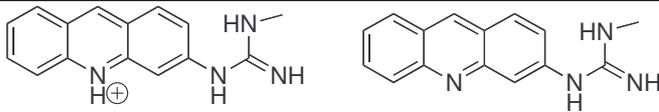
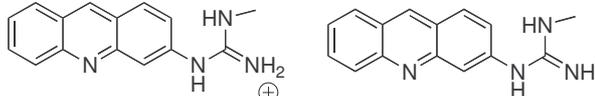
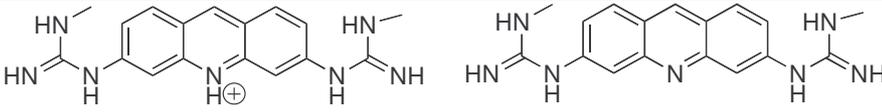
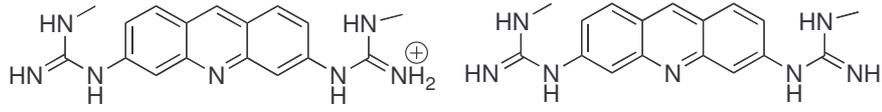
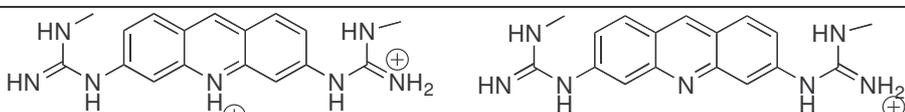
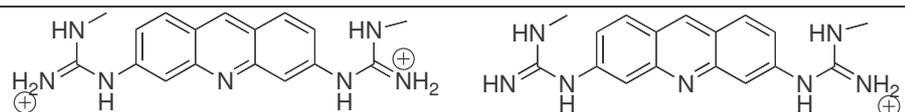
| | Couple acide/base | ΔG phase gaz (kJ/mol) |
|---|--|-------------------------------------|
| 1 |  | -53,85 |
| 2 |  | -55,18 |
| 3 |  | -52,97 |
| 4 |  | -57,74 |
| 5 |  | 202,1 |
| 6 |  | 115,5 |

Tableau 10

D'après ces calculs, les espèces protonées (acide) sur le motif guanidine sont plus stables (énergie plus basse) que leurs homologues protonés sur l'azote central du noyau acridine. Ce qui suggère donc que le premier site de protonation de ces guanidinoacridines est

le motif guanidine ($pK_a(\text{guanidine}) > pK_a(\text{acridine})$). Ces résultats ont ainsi confortés l'hypothèse que nous avons faite à partir des données bibliographiques.

Les valeurs obtenues pour les couples acide/base du dérivé bisguanidine (Tableau 10, ligne 5 et 6) suggèrent aussi que la deuxième protonation se produit sur le deuxième motif guanidine.

2. Calculs expérimentaux.

La détermination des pK_a des composés **46**, **47**, **48** a été effectuée par titrage spectrophotométrique (UV/Vis) en fonction du pH. Nous avons utilisé le logiciel SPECFIT® pour analyser les données spectrophotométriques et déterminer les pK_a des différents composés.

Afin de faciliter les calculs nous avons considéré que la protonation de l'amine tertiaire n'avait aucune influence sur les propriétés spectroscopiques de la molécule alors que le motif guanidine est conjugué au noyau acridine. En conséquence, seuls les pK_a de l'amine hétérocyclique (pK_a^a) et de la guanidine (pK_a^g) ont été déterminés.

Les valeurs calculées pour les différents composés sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 11) :

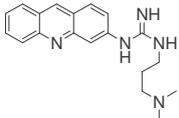
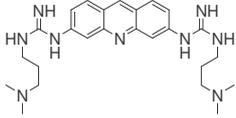
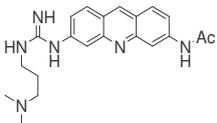
| N° | composé | pK_a^a (azote hétérocyclique) | pK_a^g (guanidine) |
|-----------|---|---------------------------------|----------------------|
| 46 |  | 4,85 | 9,61 |
| 47 |  | 4,49 | 7,68 et 10,25 |
| 48 |  | 5,32 | 9,48 |

Tableau 11

D'après les résultats obtenus avec le logiciel SPECFIT®, nous avons pu tirer les conclusions suivantes:

- Pour les composés **46** et **48**, le motif guanidine possède un pKa qui se situe entre 9 et 10. L'effet électro-attracteur du noyau acridine diminue le pKa de la guanidine, ce qui est confirmé par les données publiées dans la littérature (voir données bibliographiques).
- La protonation du motif guanidine a un effet très électro-attracteur sur l'azote hétérocyclique, ce qui se traduit par une diminution importante du pKa de ce dernier (diminution de 4 unités pour le composé **46** par rapport à la 3-aminoacridine). Comme pour les amines correspondantes (la 3-aminoacridine et la proflavine), le pKa de l'azote hétérocyclique du composé **48** est supérieur à celui du composé **46**.
- Les résultats obtenus avec la bisguanidine **47** suggèrent que l'ajout d'un deuxième motif guanidinium conjugué au noyau acridine a peu d'influence sur le pKa de l'azote hétérocyclique, comparé à la monoguanidine **46**. En revanche, la protonation d'un premier motif guanidine ($\text{pKa}^{\text{g}^1} = 10,25$) diminue fortement, de 3 unités, le pKa du second motif guanidine ($\text{pKa}^{\text{g}^2} = 7,68$) par rapport au premier.

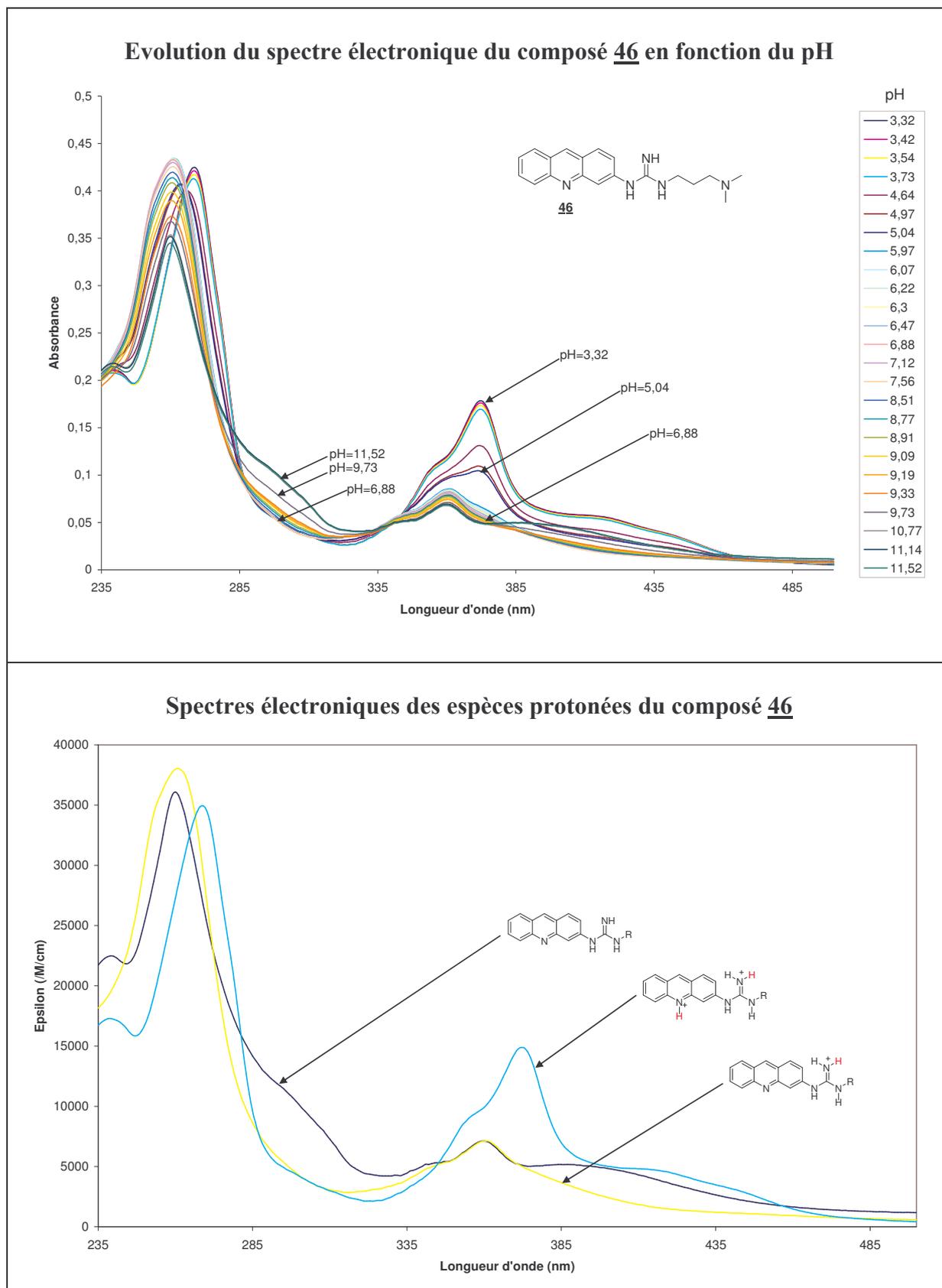
L'évolution du spectre électronique en fonction du pH des composés **46**, **47** et **48**, ainsi que les spectres des différentes espèces protonées (calculés à partir du logiciel SPECFIT®) sont représentés dans les figures 49, 50 et 51.

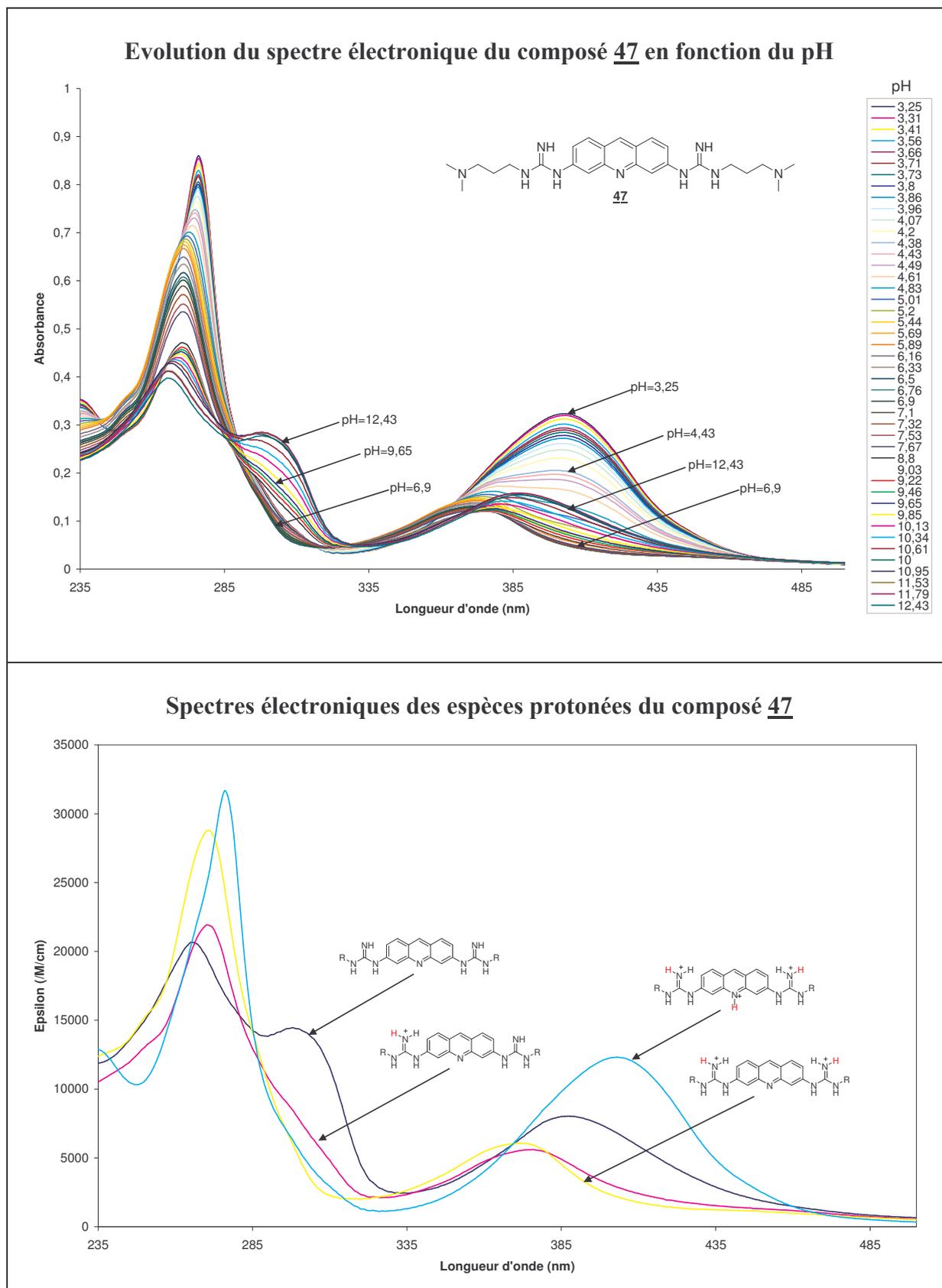
3. Conclusion.

D'après ces premières estimations de pKa, nous pouvons dire que le motif guanidine a une influence importante sur le pKa de l'azote hétérocyclique de l'acridine.

Les valeurs de pKa obtenues pour le motif guanidine avec le logiciel SPECFIT® sont comparables à celles que nous avons trouvées dans la littérature, à savoir que le pKa d'une guanidine substituée par un hétérocycle électro-attracteur se situe aux alentours de 10.

Nous avons voulu utiliser une autre méthode de détermination de pKa, par potentiométrie, afin de pouvoir comparer ces valeurs de pKa à celles obtenues par titration spectrophotométrique. Malheureusement, nous avons eu des problèmes de solubilité dans la gamme de concentrations requise pour cette méthode (10^{-3} M par potentiométrie, alors que par spectrophotométrie nous avons pu réaliser l'étude dans une gamme de concentrations plus diluées, de l'ordre de 10^{-6}).





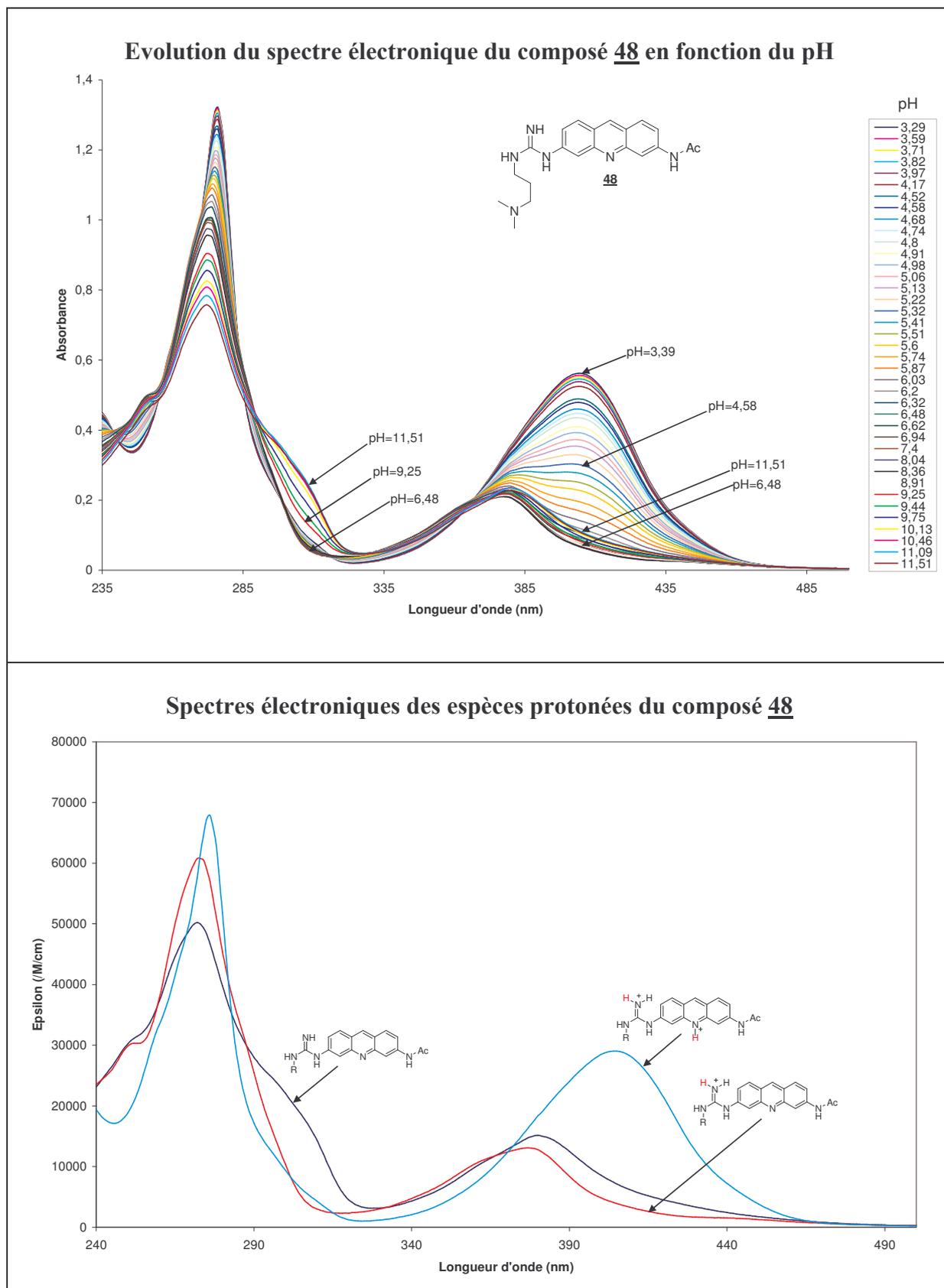


Figure 51

Chapitre III

**Synthèse et étude biologique de nouveaux hétérocycles
comportant un motif quinazolinone.**

PARTIE A/ INTRODUCTION

1. Données bibliographiques.

Les 4(3*H*)-quinazolinones sont des hétérocycles appartenant à la famille des quinazolines. Le squelette quinazoline (Figure 52), composé de deux cycles accolés, une pyrimidine et un benzène, est retrouvé dans de nombreuses molécules biologiquement actives. Depuis de nombreuses années, cette famille de molécules suscite l'intérêt des chimistes organiciens tant pour leurs propriétés physico-chimiques que pour leurs propriétés biologiques. Ainsi, les 2-amino-4(3*H*)-quinazolinones*, auxquelles nous nous intéresserons plus particulièrement, sont connues pour présenter des propriétés antitumorales (inhibiteurs de thymidylate synthase⁸²), antifongiques⁸³, anti-HIV⁸⁴, des effets antihypertenseurs⁸⁵ ou des activités dopaminergiques⁸⁶.

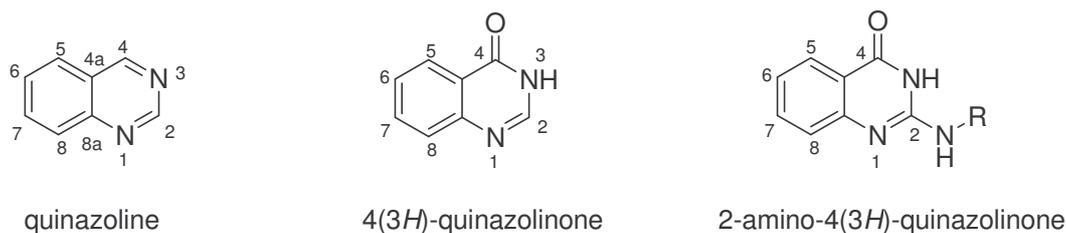


Figure 52

Dans la littérature, il existe un grand nombre d'articles et de brevets portant sur la synthèse et l'application de ces composés. Parmi les différentes voies de synthèse décrites, on

* nous emploierons aussi le terme aminoquinazolinone dans la suite de ce manuscrit.

⁸² Pendergast, W.; Johnson, J. V.; Dickerson, S. H.; Dev, I. K.; Duch, D. S.; Ferone, R.; Hall, W. R.; Humphrey, J.; Kelly, J. M.; Wilson, D. C. Benzoquinazoline inhibitors of thymidylate synthase: enzyme inhibitory activity and cytotoxicity of some 3-amino- and 3-methylbenzo[*f*]quinazolin-1(2*H*)-ones. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 2279-2291.

⁸³ Pendergast, W.; Dickerson, S. H.; Dev, I. K.; Ferone, R.; Duch, D. S.; Smith, G. K. Benzo[*f*]quinazoline inhibitors of thymidylate synthase: methyleneamino-linked aroylglutamate derivatives. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 838-844.

⁸⁴ De Clercq, E. New developments in anti-HIV chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 1543-1572.

⁸⁵ Chern, J.-W.; Tao, P.-L.; Wang, K.-C.; Gutcait, A.; Liu, S.-W.; Yen, M.-H.; Chien, S.-L.; Rong, J.-K. Studies on quinazolines and 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. 8. Synthesis and pharmacological evaluation of tricyclic fused quinazolines and 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides as potential α 1-adrenoceptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 3128-3141.

⁸⁶ Grosso, J. A.; E., N. D.; Kohli, J. D.; Glock, D. Synthesis of 2-(alkylamino)-5,6- and -6,7-dihydroxy-3,4-dihydroquinazolines and evaluation as potential dopamine agonists. *J. Med. Chem.* **1982**, 25, 703-708.

trouve un nombre considérable de synthèses développées sur support solide, notamment dans l'industrie pharmaceutique en vue d'une utilisation en chimie parallèle⁸⁷.

Nous avons regroupé ces différentes de voies de synthèse dans le schéma suivant, selon la nature de la déconnection (**a**, **b**, **c**, **d**) utilisée (Schéma 72).

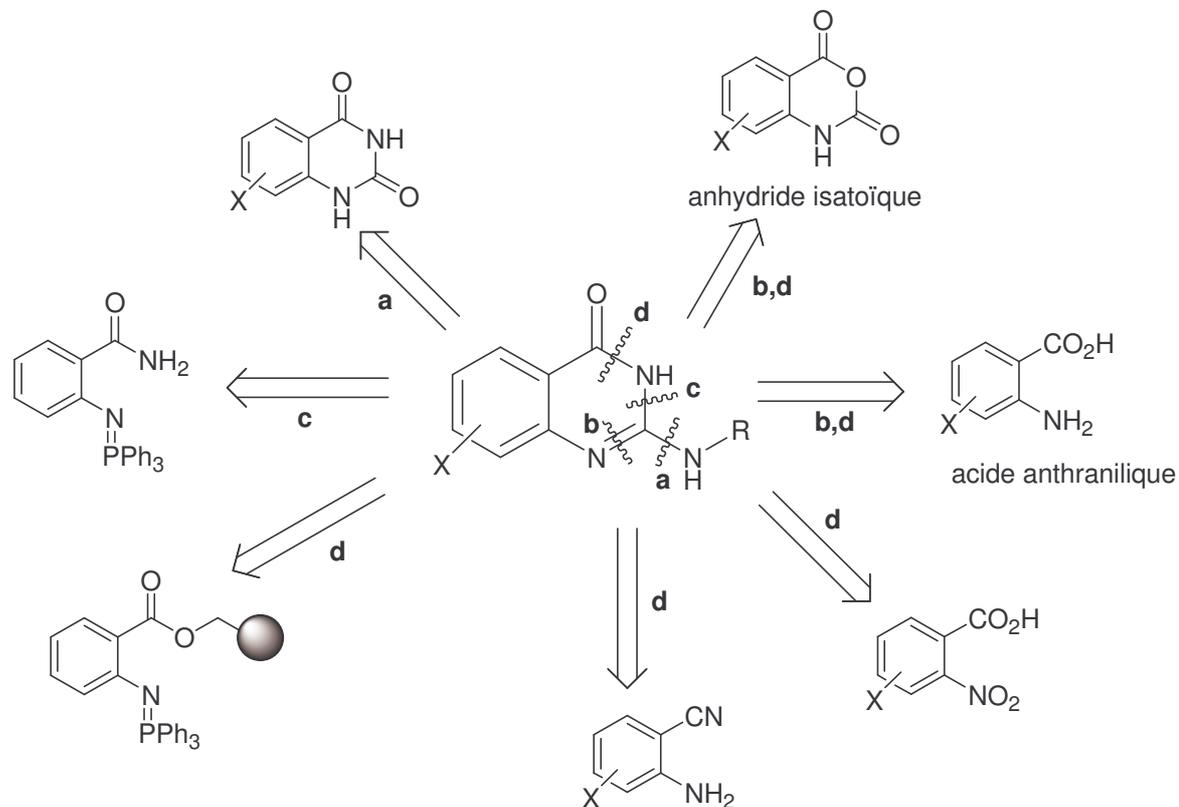


Schéma 72

➤ *Déconnection a* :

Wéber et al.⁸⁸ ont utilisé cette voie pour synthétiser des 2-alkylamino-4(3H)-quinazolines à partir de quinazolidiones possédant déjà le squelette quinazolinone (Schéma 73).

⁸⁷ Vögtle, M. M.; Marzinzik, A. L. Synthetic approaches towards quinazolines, quinazolinones and quinazolinonedioids on solid phase. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, 23, 440-459.

⁸⁸ a) Wéber, C.; Bielik, A.; Szendrei, G.; Greiner, I. Novel solid-phase synthesis of 2,6-disubstituted 4(3H)-quinazolinones for combinatorial library generation. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 2971-2974, Wéber, C.; Demeter, A.; Szendrei, G. I.; Greiner, I. Solid-phase synthesis of 2,6- and 2,7-diamino-4(3H)-quinazolinones via palladium-catalysed amination. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 7533-7536.

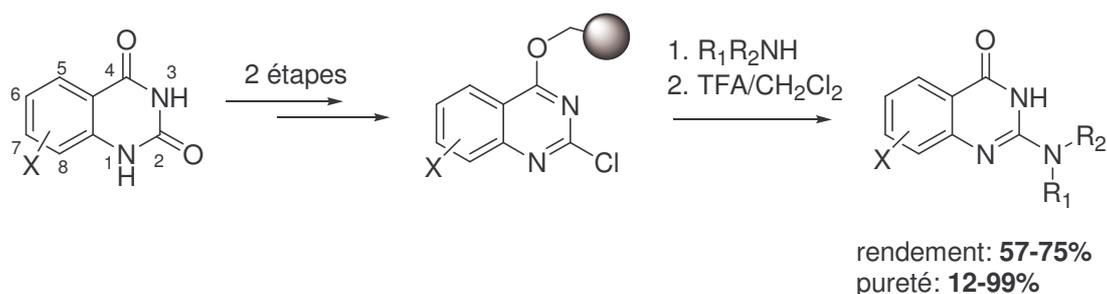


Schéma 73

Il s'agit plutôt d'une voie de fonctionnalisation de quinazolidinones. Elle est limitée par la faible réactivité de la position 2 vis-à-vis de la substitution nucléophile aromatique.

➤ *Déconnexions b et d :*

Ces voies de synthèse utilisent soit des dérivés de l'acide anthranilique, soit des dérivés de l'anhydride isoatoïque comme produits de départ.

A titre d'exemple, Gopalsamy et al.⁸⁹ comme Yang et al.⁹⁰, (Schéma 74) ont préparé selon ce procédé des dérivés de 2-alkylamino-4(3H)-quinazolinone par condensation d'isothiourée *N*-alkylée (R_1) sur des dérivés d'anhydride isoatoïque.

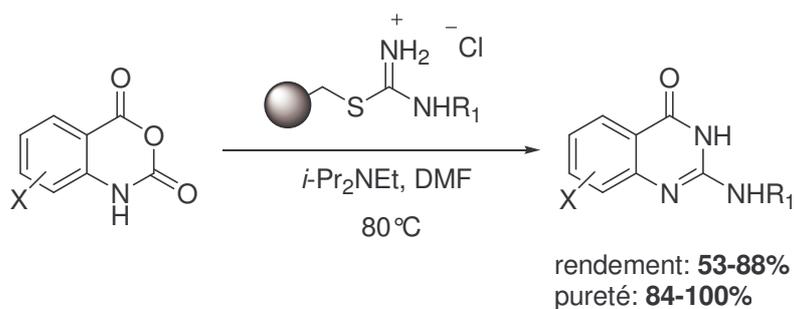


Schéma 74

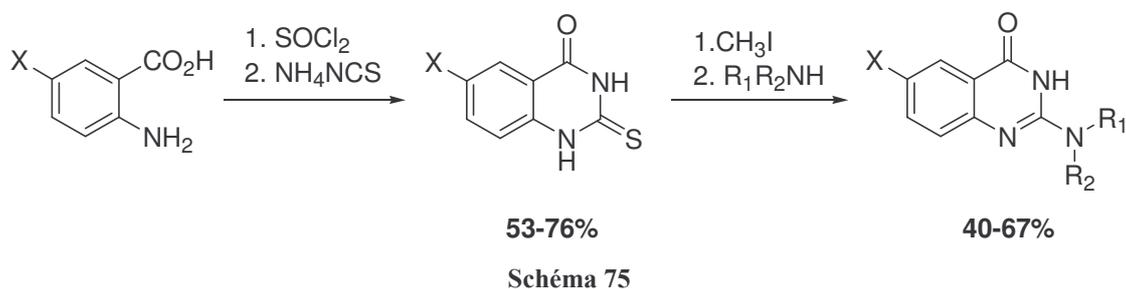
A partir de dérivés de l'acide anthranilique, Somers et al.⁹¹ ont synthétisé *in-situ* des intermédiaires de type isothiourée qui se cyclisent, via l'amine aromatique, en thiourée.

⁸⁹ Gopalsamy, A.; Yang, H. Combinatorial synthesis of heterocycles: solid-phase synthesis of 2-amino-4(1H)-quinazolinone derivatives. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 378-381.

⁹⁰ Yang, R.-Y.; Kaplan, A. A concise and efficient solid-phase synthesis of 2-amino-4(3H)-quinazolinones. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7005-7008.

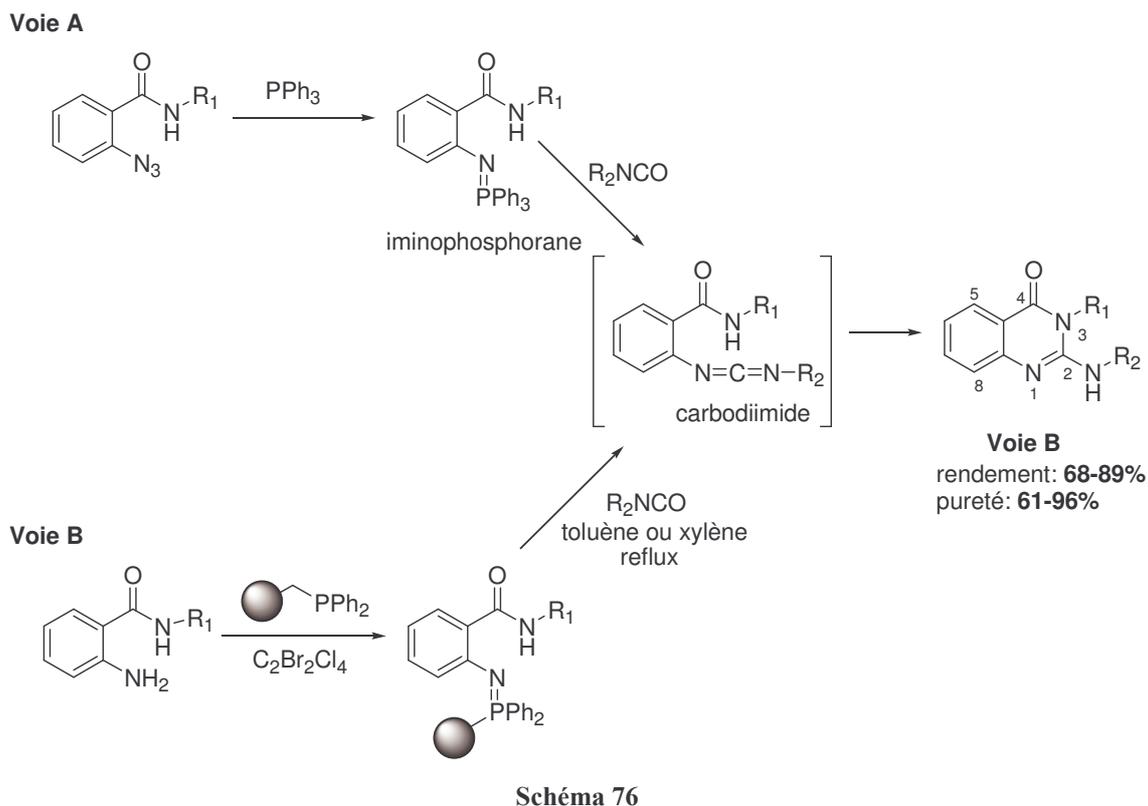
⁹¹ Somers, F.; Ouedraogo, R.; Antoine, M.-H.; de Tullio, P.; Becker, B.; Fontaine, J.; Damas, J.; Dupont, L.; Rigo, B.; Delarge, J.; Lebrun, P.; Pirotte, B. Original 2-alkylamino-6-halogenoquinazolin-4(3H)-ones and K_{ATP} channel activity. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2575-2585.

Ces thiourées permettent ensuite d'introduire diverses amines pour former les aminoquinazolinones voulues (Schéma 75).



➤ *Déconnection c :*

Cette approche a été utilisée par Molina et al.⁹² (**Voie A**, Schéma 76) et par Zhang et al.⁹³ (**Voie B**, Schéma 76) pour synthétiser des aminoquinazolinones à partir d'intermédiaires iminophosphoranes.



⁹² Molina, P.; Alajarin, M.; Vidal, A. New methodology for the preparation of quinazoline derivatives via tandem Aza-Wittig/heterocumulene-mediated annulation. Synthesis of 4(3*H*)-quinazolinones, benzimidazo[1,2-*c*]quinazolines, quinazolino[3,2-*a*]quinazolines and benzothiazolo[3,2-*c*]quinazolines. *Tetrahedron* **1989**, 45, 4263-4286.

⁹³ Zhang, W.; Mayer, J. P.; Hall, S. E.; Weigel, J. A. A polymer-bound iminophosphorane approach for the synthesis of quinazolines. *J. Comb. Chem.* **2001**, 3, 255-256.

L'étape-clé de cyclisation est une condensation intramoléculaire d'une fonction amide sur un carbodiimide. Ce dernier est obtenu via une réaction aza-Wittig entre un intermédiaire iminophosphorane et un isothiocyanate (R_2NCO). Notons que cette approche permet de préparer des aminoquinazolinones substituées sur l'azote N-3 du cycle quinazolinone.

➤ *Déconnection d :*

De nombreuses voies de synthèse sur support solide utilisent cette approche. L'étape-clé de cyclisation repose sur la condensation intramoléculaire d'un motif guanidine sur une fonction carboxamide. Lorsque la synthèse est effectuée sur support solide, l'étape de cyclisation et la libération de la résine sont réalisées simultanément.

Yu et al.⁹⁴ utilisent, par exemple, des dérivés d'acide *ortho*-nitrobenzoïque comme produits de départ (Schéma 77).

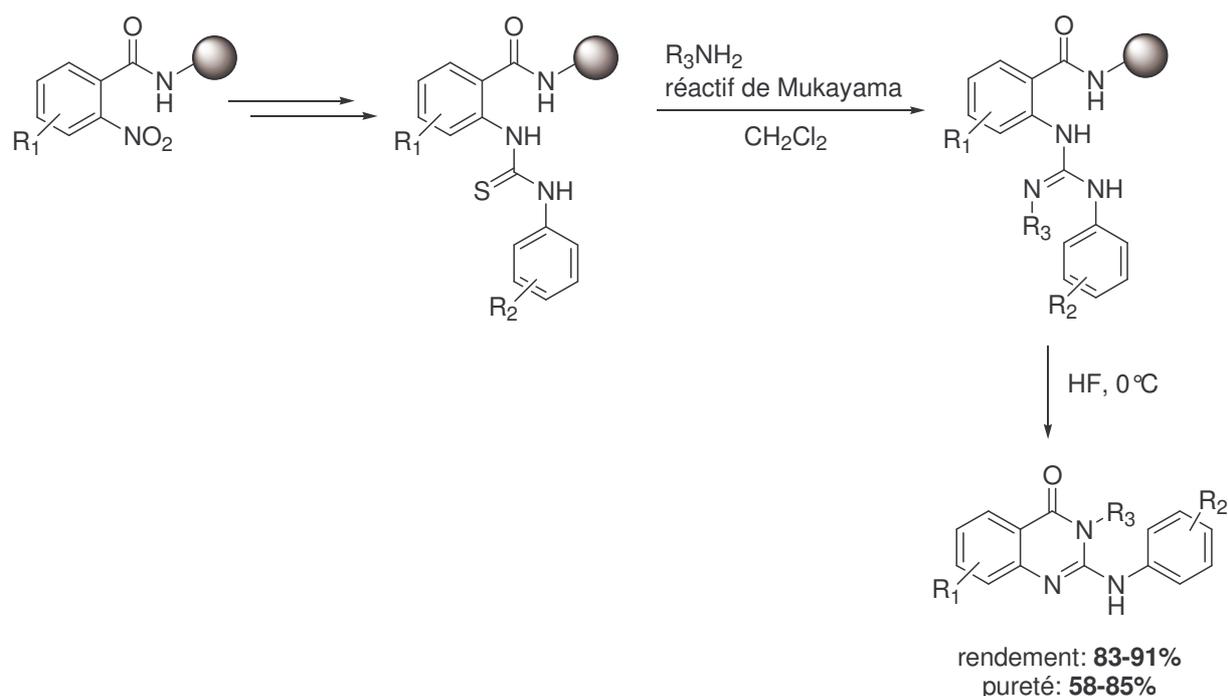


Schéma 77

La réduction du groupement nitro permet d'obtenir l'amine libre, à partir de laquelle est synthétisé le motif guanidine. La condensation intramoléculaire du motif guanidine sur l'amide en milieu acide (HF), génère le squelette quinazolinone et libère, par la même

⁹⁴ Yu, Y.; Ostresh, J. M.; Houghten, R. A. A traceless approach for the parallel solid-phase synthesis of 2-(arylamino)quinazolinones. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 5831-5834.

occasion, les aminoquinazolinones recherchées. Cette méthode permet aussi d'obtenir des aminoquinazolinones substituées sur l'azote N-3 de l'hétérocycle.

Cette étude bibliographique permet d'énoncer les constatations suivantes :

- Toutes les voies de synthèse décrites de 2-alkylamino-4(3*H*)-quinazolinones utilisent des produits de départ comportant déjà les liaisons Ar-N et Ar-C du squelette quinazolinone (Schéma 72). Ces produits de départ sont généralement des dérivés d'acide anthranilique ou d'anhydride isoatoïque et sont donc peu fonctionnalisés (ce qui restreint la diversité des structures de type quinazolinone formées).
- Il n'y a aucune méthodologie développée à partir d'amines aromatiques et hétérocycliques simples (sans liaison Ar-C en position *ortho* de l'amine).

Pour ces raisons, la réaction inattendue, observée dans le chapitre II, de cyclisation du dérivé guanidinoacridine **44** en dérivé d'aminquinazolinone **49** nous est apparue intéressante à exploiter (Schéma 78).

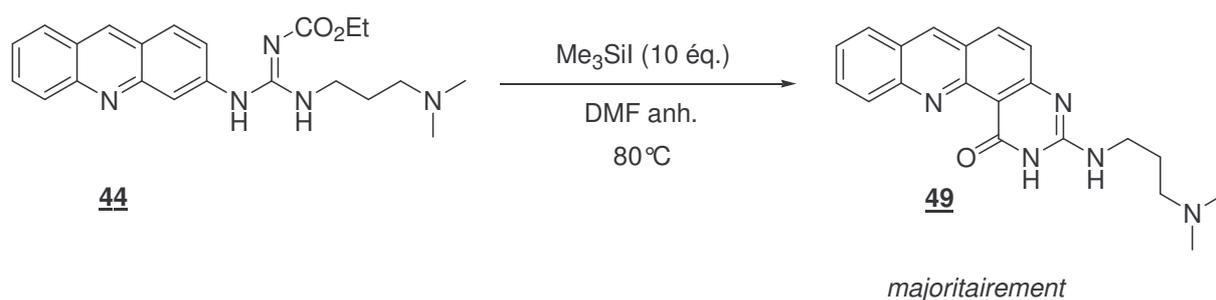


Schéma 78

En conséquence, nous nous sommes intéressés à la synthèse de dérivés de 2-alkylamino-4(3*H*)-quinazolinone à partir d'amines aromatiques et hétérocycliques de structures variées, en utilisant la déconnection suivante (e, Schéma 79) :

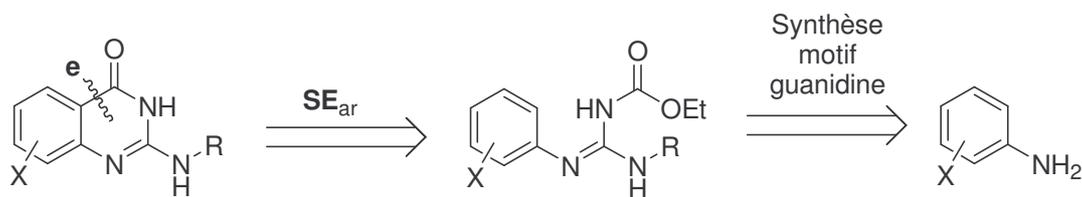


Schéma 79

L'étape-clé de cyclisation est ici une substitution électrophile aromatique (SE_{ar}) intramoléculaire de l'intermédiaire guanidine N-carbamoylé en présence d'iodure de triméthylsilyle comme acide de Lewis.

Il convient de noter que, dans la littérature, une approche similaire a été reportée pour la synthèse de 2,4-diaminoquinazolines à partir d'arylcyanoguanidines (Schéma 80) en présence de $BF_3 \cdot Et_2O$ comme acide de Lewis⁹⁵.

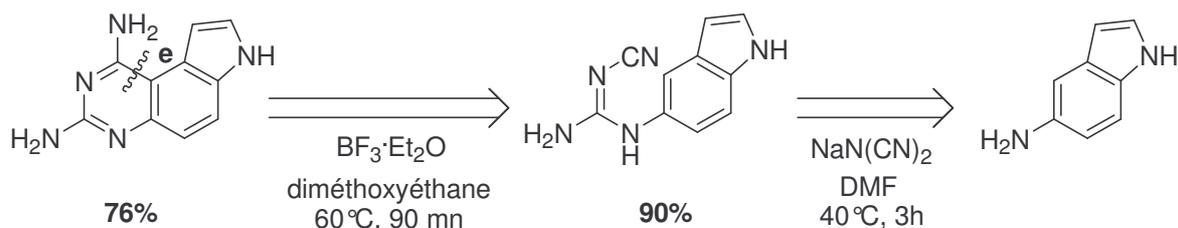


Schéma 80

Dans un premier temps, nous avons testé et optimisé la réaction de cyclisation observée avec le dérivé guanidinoacridine **44** (Schéma 78) sur un autre hétérocycle (utilisé au laboratoire dans la synthèse de base de Tröger) connu pour réagir par substitution électrophile : la 5-aminophénantroline⁹⁶ (Partie B). Nous avons ensuite appliqué cette réaction à d'autres dérivés guanidinoacridines (**10** et **45**, dont la synthèse est décrite dans le Chapitre II), puis à diverses amines aromatiques et hétérocycliques (Partie B). Certaines de ces aminoquinazolinones ont fait l'objet d'études biologiques en tant qu'agents potentiellement antitumoraux (Partie C).

PARTIE B/ SYNTHÈSES

1. Synthèse d'un dérivé de 2-amino-4(3H)-quinazolinone à partir de la 5-aminophénantroline.

Afin d'évaluer les possibilités de cyclisation à partir de cette amine hétérocyclique, nous avons d'abord préparé le dérivé guanidino correspondant **51**.

⁹⁵ Jones, M. L.; Kuyper, L. F.; Styles, V. L.; Caddell, J. M. Lewis acid assisted cyclisation of arylcyanoguanidines to 2,4-diaminoquinazolines. *J. Het. Chem.* **1994**, 31, 1681.

⁹⁶ Van Gijte, O.; Tatibouët, A.; Demeunynck, M.; Lhomme, J.; Kirsch-De Mesmaeker, A. A phenanthroline analogue of Tröger's base as bridging ligand in the synthesis of a bimetallic Ruthenium(II) complex. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 1567-1570.

1.1. Préparation de la guanidinophénantroline **51**.

Le dérivé guanidino **51** est obtenu en 2 étapes à partir de la 5-aminophénantroline selon la méthode décrite par Atwal et al.⁴⁷ (Schéma 81). Pour nos premiers essais nous avons choisi de coupler la propylamine ($C_3H_7NH_2$) à l'intermédiaire thiourée **50**.

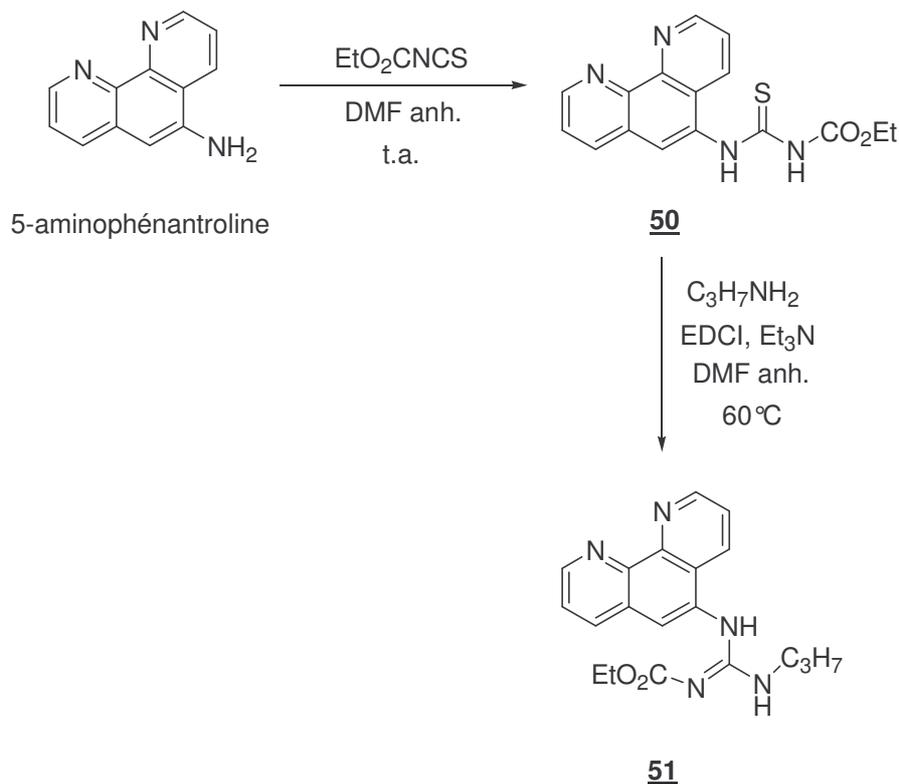


Schéma 81

Les réactions sont suivies par CLHP. L'intermédiaire thiourée **50** est obtenu pur (selon analyse CLHP) avec un rendement de 90% par précipitation dans l'eau, sans aucune étape de purification supplémentaire.

Après précipitation dans l'eau et quelques lavages à l'acétone pour éliminer les impuretés formées, la guanidine **51** est obtenu avec un rendement de 52% (non optimisé) et une pureté supérieure à 90% (estimée par CLHP). Ce composé **51** s'est révélé soluble dans l'acétone, ce qui explique le faible rendement obtenu.

En RMN du proton, pour le composé **50**, dans le $DMSO-d_6$, les signaux des deux NH du motif thiourée apparaissent sous forme de 2 singulets déblindés à 11,64 ppm et 11,51 ppm. Les signaux caractéristiques du groupement CO_2Et sont un quadruplet à 4,29 ppm et un triplet à 1,32 ppm.

Pour le composé **51**, en RMN du proton dans l'acide acétique- d_4 , on trouve les trois signaux caractéristiques de la chaîne propyle.

1.2. Cyclisation de la guanidinophénantroline **51**.

Le traitement de la guanidinophénantroline **51** par l'iodure de triméthylsilyle (Me_3SiI) dans le DMF anhydre (Schéma 82) conduit à un résultat similaire à celui observé avec le dérivé guanidinoacridine **44**. En CLHP, on peut constater que, dans ces conditions, il se forme après deux heures de réaction, deux produits. Le composé majoritaire **52** (80%, estimé par CLHP) est moins polaire que le produit de départ **51**.

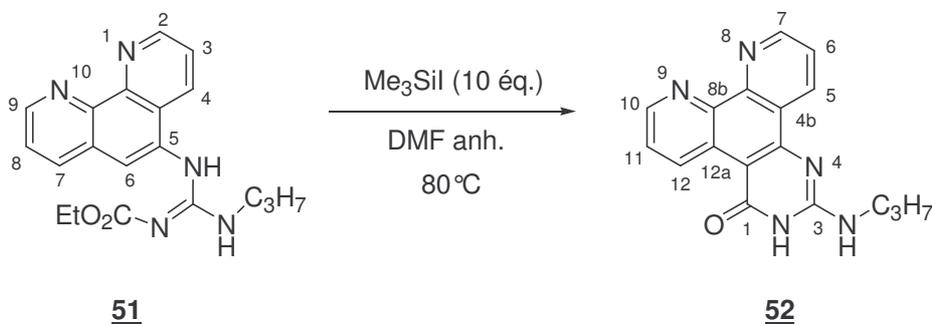


Schéma 82

Après un traitement basique, nous avons isolé le produit majoritaire **52** résultant d'une cyclisation intramoléculaire. Le produit minoritaire **53** (plus polaire) n'a pas été isolé mais son temps de rétention en CLHP permet de penser qu'il s'agit de la guanidine déprotégée **53** (Figure 53) que nous avons obtenu parallèlement par hydrolyse basique (THF/NaOH 0,4 N) de la guanidine **51**.

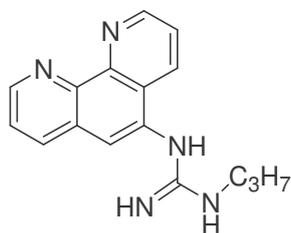
**53**

Figure 53

L'analyse, par RMN du proton dans le DMSO- d_6 , du produit majoritaire **52** montre que le singulet caractéristique du proton H-6 a disparu, ce qui confirme bien la substitution sur le carbone C-6. Les signaux caractéristiques du groupement CO_2Et (un quadruplet et un

triplet) ont aussi disparu, tandis qu'en RMN du carbone, le signal du carbonyle C=O est toujours présent à 161,9 ppm.

La structure proposée pour ce composé **52** a été confirmée par spectrométrie de masse haute résolution (EI) qui permet de mettre en évidence l'ion moléculaire (M)+Na⁺ à 328.11.

Ce résultat corrobore bien celui obtenu avec le dérivé guanidinoacridine **44**, à savoir qu'avec l'iodure de triméthylsilyle il se produit deux réactions compétitives: la déprotection du groupement CO₂Et du motif guanidine et la cyclisation intramolécule qui résulte d'une substitution électrophile aromatique catalysée par Me₃SiI.

1.3. Optimisation de la réaction de cyclisation.

Nous avons cherché à optimiser la réaction de cyclisation intramolécule en utilisant d'autres acides de Lewis que l'iodure de triméthylsilyle. Afin également de faciliter les étapes de purification, nous avons aussi testé une argile acide: la montmorillonite K-10. Ces réactions ont été effectués sur 20 mg de produit (**51**) et suivies par CLHP.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant (Tableau 12).

| | Conditions | Durée | Résultats | Rendements (estimés par CLHP) |
|----------|---|---------------------------------------|---|--|
| A | Bi(OTf) ₃ (10 éq.) EtOH abs, reflux | 30 h | Pas de cyclisation (produit de départ récupéré) | - |
| B | CeCl ₃ •7H ₂ O (10 éq.) EtOH abs, reflux | 30 h | Pas de cyclisation (produit de départ récupéré) | - |
| C | AlCl ₃ (1éq.) Toluène, 80°C | Plus de 24 h | Cyclisation intramoléculaire | 100% |
| D | POCl ₃ , 80°C | Plus de 24 h | Cyclisation intramoléculaire <i>majoritairement</i> | 70% |
| E | Montmorillonite K-10 C ₂ H ₄ Cl ₂ , 80°C | Plus de 24 h | Cyclisation intramoléculaire | 100% |
| F | Montmorillonite K-10 Micro-ondes | - | Cyclisation intramoléculaire | 10%* après 2 cycles de 5 minutes |
| G | Me ₃ SiI (10 éq.) DMFanhydre, 80°C | 7h | Cyclisation intramoléculaire <i>majoritairement</i> | 80% |
| H | Me ₃ SiCl DMFanhydre, 80°C | 1h30 (5éq.) 2h40 (1 éq.) | Cyclisation intramoléculaire | 100% |
| I | MeSiCl ₃ (1 éq.) DMFanhydre, 80°C | 1h10 | Cyclisation intramoléculaire | 100% |

*Une fraction du milieu réactionnel est mise en solution dans le DMF puis soniquée et centrifugée. Le surnageant est ensuite analysé en CLHP.

Tableau 12

En présence de Bi(OTf)₃ ou de CeCl₃, aucune réaction n'est observée. Avec POCl₃ (**D**), le produit cyclisé **52** est majoritaire à 70% (d'après CLHP). Que ce soit avec AlCl₃ (**C**) ou les dérivés chlorosilanes (Me₃SiCl (**H**), MeSiCl₃ (**I**)), avec une quantité stoechiométrique d'acide de Lewis on obtient 100% de produit cyclisé **52**. La réaction est toutefois beaucoup plus rapide avec les chlorosilanes.

On obtient aussi 100% de produit cyclisé **52** en employant la Montmorillonite K-10 (**E**), mais la réaction est plus lente et les rendements moins bons, après traitement, qu'avec les chlorosilanes. En effet, après élimination du solvant et précipitation dans un mélange éther/éthanol absolu, on obtient 98% de produit cyclisé **52** avec MeSiCl₃ contre 74% après filtration avec la Montmorillonite K-10. Une partie du produit cyclisé reste en effet adsorbé sur l'argile.

Nous avons aussi effectué un essai sous micro-ondes avec la Montmorillonite (**F**) et nous avons observé que le produit cyclisé **52** pouvait se former dans ces conditions. Mais ne disposant pas de matériel adéquat, nous n'avons pas cherché à optimiser cette méthode.

Les conditions optimales, en terme de rendement et de temps de réaction, pour réaliser cette réaction de cyclisation intramoléculaire ont été obtenues avec les chlorosilanes (Me₃SiCl, MeSiCl₃). C'est donc ces conditions que nous avons retenues pour la suite du travail.

2. Synthèse de dérivés de 2-amino-4(3H)-quinazolinone à partir des guanidinoacridines 44, 45 et 10.

Nous avons appliqué la méthodologie optimisée à partir de la guanidinophénantroline **51** aux dérivés guanidinoacridine **44**, **45** et **10** précédemment synthétisés (Chapitre II).

Le traitement des guanidinoacridines **44** et **45** par le Me₃SiCl dans le DMF anhydre à 80°C conduit aux produits cyclisés correspondants **49** et **54** avec de très bons rendements (Schéma 83).

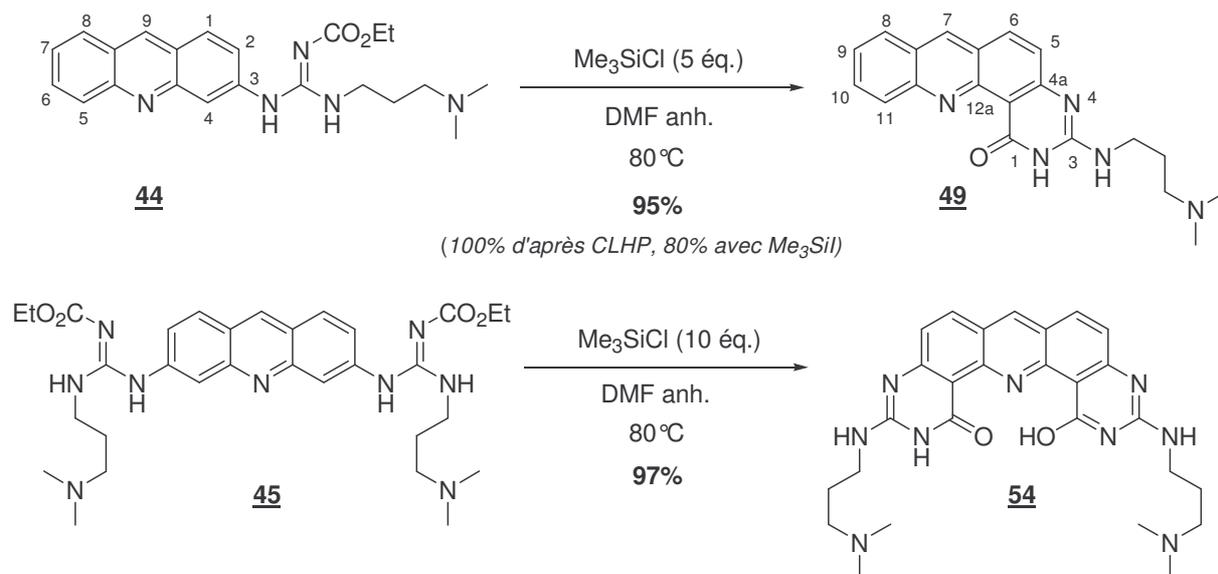
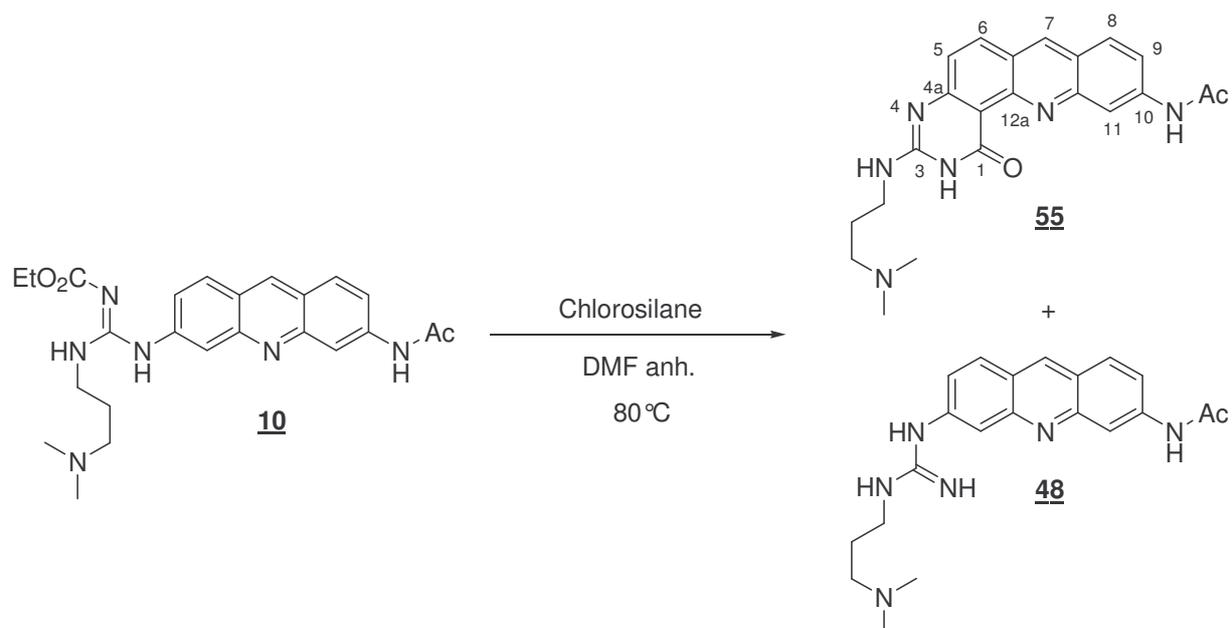


Schéma 83

Le cas de la guanidinoacridine **10** est particulier (Schéma 84). Le traitement de cette dernière par cinq équivalents de Me_3SiCl conduit très majoritairement au produit déprotégé **48** (même résultat qu'avec le Me_3SiBr (Chapitre II)). Lorsqu'on augmente la proportion de Me_3SiCl jusqu'à quinze équivalents, on voit alors apparaître, par CLHP, du produit cyclisé **55** mais celui-ci reste minoritaire (20%) par rapport au produit déprotégé **48** (80%). En remplaçant le Me_3SiCl par le MeSiCl_3 (plus réactif), avec dix équivalents, on ne forme que du produit cyclisé **55** (Schéma 84).



| chlorosilane | stoechiométrie | % produit cyclisé* (55) | % produit déprotégé* (48) |
|----------------------|----------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Me ₃ SiCl | 5 équ. | traces | 99 |
| Me ₃ SiCl | 15 équ. | 20 | 80 |
| MeSiCl ₃ | 10 équ. | 99 | traces |

* estimé par CLHP

Schéma 84

De manière générale, les aminoquinazolinones que nous avons synthétisées à partir des aminoacridines **44**, **45** et **10** se sont révélées très solubles en milieu aqueux (acide ou basique) et insolubles en milieu organique. Nous les avons alors isolé, sous forme de chlorhydrate, par précipitation dans un mélange éther/éthanol absolu.

Les produits cyclisés sont ainsi obtenus avec des rendements respectifs de 95% pour le composé **49**·2HCl, 97% pour le composé **54**·4HCl et 84% pour le composé **55**·2HCl.

Notons que ces guanidinoacridines **44**, **45** et **10**, présentent la même régiosélectivité lors de substitution électrophile aromatique que les aminoacridines correspondantes (3-aminoacridine et 3,6-diaminoacridine).

De manière générale, les aminoquinazolinones obtenues à partir des guanidinoacridines sont caractérisés en RMN du proton par : La disparition des signaux d'un ou deux protons aromatiques (H-4 pour le composé **49**, H-4 et H-5 pour le composé **54**, H-4 pour le composé **55**), ainsi que par celle des signaux du groupement CO₂Et.

Jusqu'à présent, un seul dérivé cyclisé, le composé **49**, a été caractérisé en RMN du carbone 13. Dans le spectre, on peut en effet constater que le signal du carbonyle C=O est toujours présent à 161,4 ppm.

Il est connu dans la littérature que les quinazolinones sont caractérisées en RMN du proton⁹⁷ :

- Par un fort déblindage du signal du proton porté par le carbone situé en péri de la fonction carbonyle.
- Et par un élargissement du signal du proton situé en péri de l'azote N-1 du squelette quinazolinone, dû à un équilibre entre deux formes tautomères N3-H et N1-H.

Ceci est confirmé dans les spectres des produit **49** et **55**, où l'on peut voir, en RMN du proton, que le signal caractéristique du proton H-5 en position péri de l'azote N-4 est un doublet large.

Ces dérivés cyclisés ont été caractérisés soit par spectrométrie de masse ESI, soit par spectrométrie de masse haute résolution EI (Tableau 13).

| Produits | Masse moléculaire (MW) | EI | | ESI |
|-----------|------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| | | (M+H) ⁺ calculé | (M+H) ⁺ trouvé | (M+H) ⁺ |
| 49 | 347,41 | 348,18 | 348,18 | - |
| 54 | 515,61 | 516,28 | 516,28 | - |
| 55 | 404,46 | - | - | 405,20 |

Tableau 13

3. Extension de la nouvelle méthodologie à d'autres amines aromatiques et hétérocycliques.

Nous avons ensuite étendu cette méthodologie à d'autres amines aromatiques, comme le 5-aminoindane ou hétérocycliques, comportant soit un cycle à 6 chaînons comme la 6-aminoquinoléine, soit un cycle pentagonal comme le 6-aminoindole (Figure 54).

⁹⁷ Weber, C.; Demeter, A.; Szendrei, G. I.; Greiner, I. Solid-phase synthesis of 2,6- and 2,7-diamino-4(3H)-quinazolinones via palladium-catalysed amination. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 7533-7536.

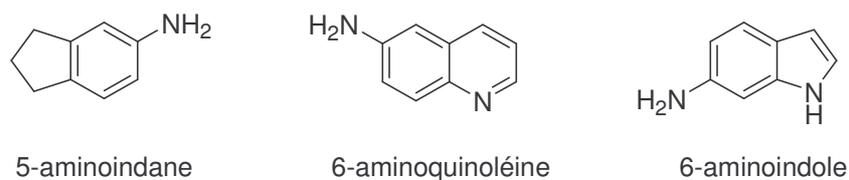
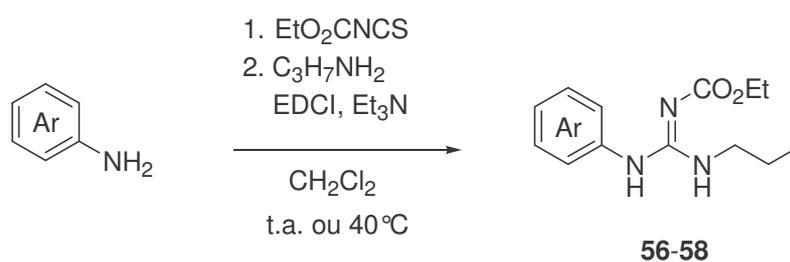


Figure 54

En terme de réactivité, la 6-aminoquinoléine est connue pour se prêter aux substitutions électrophiles aromatiques⁹⁸. Pour ce qui concerne le 6-aminoindole et le 5-aminoindane, nous n'avons trouvé aucun exemple dans la littérature de réaction de substitution électrophile aromatique conduite à partir de ces composés.

3.1. Préparation des dérivés guanidines 56, 57 et 58.

Les guanidines correspondantes ont été préparés en un seul pot selon la méthode de Manimala et Anslyn⁷⁷ (Schéma 85). Les réactions sont suivies par CCM.



| Ar | produit | Rdt. brut |
|----|------------------|---------------|
| | <u>56</u> | >90% (huile)* |
| | <u>57</u> | 85% (solide) |
| | <u>58</u> | >90% (huile) |

* 55% après colonne SiO₂

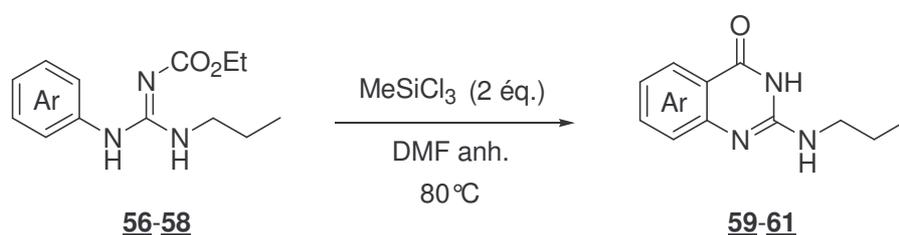
Schéma 85

⁹⁸ Cudero, J.; Pardo, C.; Ramos, M.; Gutierrez-Puebla, E.; Monge, A.; Elguero, J. Synthesis and molecular structure of heterocyclic Tröger's bases derived from C-amino heterocycles. *tetrahedron*. **1997**, 53, 2233-2240.

Les réactions ont été effectuées dans le dichlorométhane et les guanidines finales ont été obtenus soit par précipitation dans l'eau (sous forme de solide), soit par extraction (sous forme d'huile) avec de très bons rendements et une pureté acceptable (>90%, estimée par CLHP).

3.2. Cyclisation des dérivés guanidines 56, 57 et 58.

Les dérivés guanidines 56-58 ont été placés en réaction avec deux équivalents de MeSiCl₃, dans le DMF anhydre à 80°C pendant 2 heures (Schéma 86). Les réactions ont été suivies par CLHP.



| Ar | guanidine | produit cyclisé | Rdt. |
|----|------------------|--|------------|
| | <u>56</u> | <u>59</u> | 88% |
| | <u>57</u> | <u>60</u> | 97% |
| | <u>58</u> | mélange de 2 produits: <u>61a</u> et <u>61b</u> | 91% |

Schéma 86

Après précipitation en milieu aqueux basique, les produits cyclisés correspondants ont été obtenus avec de très bons rendements allant de 88 à 97% (Schéma 86), sans aucune étape de purification.

La structure du dérivé guanidine 58 laissait prévoir un mélange de deux produits après réaction, puisque la cyclisation peut se produire soit sur le carbone C-6, soit sur le

carbone C-4. En CLHP, les deux produits cyclisés présentent des polarités trop voisines pour être séparés. En RMN du proton on peut constater que nous avons bien un mélange de deux produits cyclisés **61a** et **61b** (Figure 55).

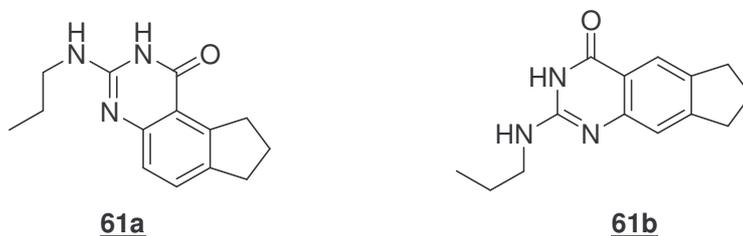


Figure 55

Les signaux des protons aromatiques du produit **61a** apparaissent sous forme de deux doublets, alors que pour le produit **61b** on observe deux singulets. L'intégration de ces signaux caractéristiques montre que le rapport entre ces deux produits est de 85 (**61a**):100 (**61b**).

En ce qui concerne les composés cyclisés **59** et **60** (Figure 56), en RMN du proton dans le DMSO- d_6 , on peut observer, pour les deux produits, que les signaux caractéristiques du groupement CO₂Et ont disparu, ainsi que le proton aromatique H-5 pour le produit **59** et H-7 pour le produit **60**.

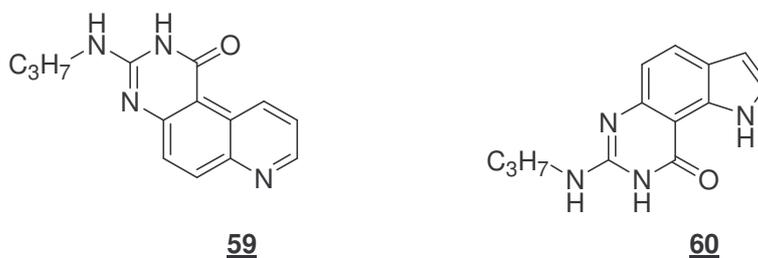


Figure 56

Notons que la réaction est totalement régiosélective pour ces deux composés **59** et **60**. La 6-aminoquinoléine⁹⁸ est connue pour subir régiosélectivement des substitutions électrophiles en position 5. On retrouve ici cette régiosélectivité (cyclisation sur le carbone C-5). En ce qui concerne le 6-aminoindole, la cyclisation a lieu sur le carbone C-7 (carbone le plus proche de la jonction de cycle, comme pour les guanidinoacridines).

Ces produits cyclisés **59** et **60**, ainsi que le mélange **61a/61b** ont également été caractérisés par spectrométrie de masse haute résolution (EI). Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 14).

| Produits | (M+H) ⁺ calculé | (M+H) ⁺ trouvé |
|----------------|-------------------------------|------------------------------|
| 59 | 255,12 | 255,12 |
| 60 | 243,12 | 243,12 |
| 61a/61b | 244,14 | 244,14 |

Tableau 14

4. Conclusion.

Nous avons mis au point une stratégie efficace et originale de synthèse d'aminoquinazolinones à partir d'amines aromatiques et hétérocycliques. L'étape-clé de cette stratégie est la cyclisation intramoléculaire des guanidines *N*-CO₂Et préparées, en deux étapes ou en un seul pot, à partir des amines correspondantes. Cette réaction de cyclisation peut être réalisée avec de très bons rendements en présence de divers acide de Lewis (chlorosilane) ou de Montmorillonite K-10 (argile acide).

PARTIE C/ ETUDES BIOLOGIQUES

Certaines des nouvelles 2-amino-4(3*H*)-quinazolinones (composés **49**, **52**, **54** et **55** (Figure 57)) ont été testées *in vitro* sur des cellules tumorales humaines. Ces dérivés, qui présentent une large surface aromatique plane (caractéristique d'un grand nombre de ligands d'ADN G-quadruplexes), ont également été testés sur des G-quadruplexes.

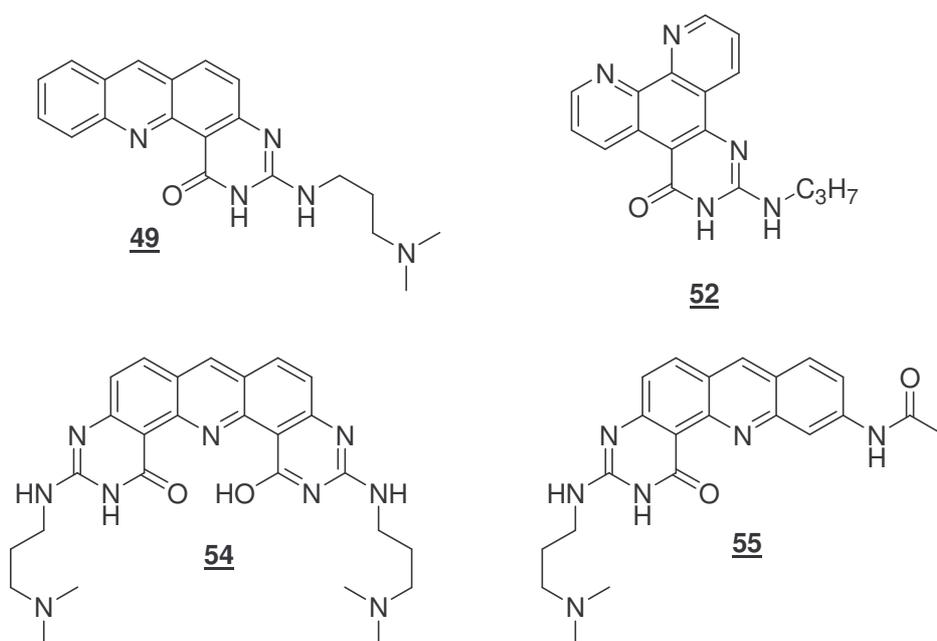


Figure 57

1. Activité cytostatique.

L'activité cytostatique des composés **49**, **52**, **54** et **55** a été évaluée sur trois lignées cellulaires humaines (HeLa, HT29, A549) (Tableau 15).

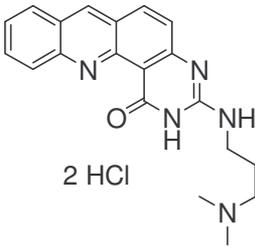
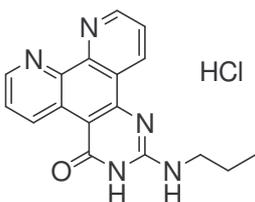
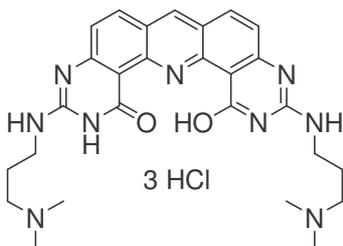
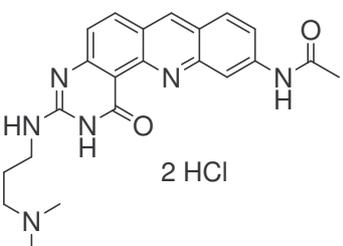
| N° | Composé | Activité cytostatique (IC ₅₀ en μM) | | |
|-----------|--|--|--------------|--------------|
| | | HeLa | A549 | HT29 |
| <u>49</u> |  2 HCl | >20 | >20 | 21 ± 3 |
| <u>52</u> |  HCl | 4 ± 0,5 | 2,9 ± 0,8 | 0,5 ± 0,2 |
| <u>54</u> |  3 HCl | Inactif à 20 | Inactif à 20 | Inactif à 20 |
| <u>55</u> |  2 HCl | >20 | Inactif à 20 | Inactif à 20 |

Tableau 15

Sur les trois lignées testées, le composé 52 est le seul dérivé à présenter des activités intéressantes, avec des IC₅₀ comprises entre 0,5 (HT29) et 4 μM (HeLa). Les autres dérivés 49, 54 et 55 présentent des activités faibles voire nulles dans la gamme de concentrations testées (0,1 à 50 μM).

2. Test sur les G-quaduplexes.

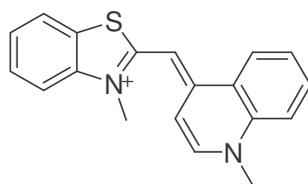
2.1. Le test « G4-FID ».

Le FID (Fluorescent Intercalator Displacement) est un test permettant d'évaluer l'affinité et la sélectivité d'un composé pour une structure d'ADN donnée. Le principe consiste à marquer la structure d'ADN par une sonde fluorescente : un intercalant (bromure d'éthidium, thiazole orange) ou un ligand de petit sillon (Hoechst 33258) dont la fluorescence est exaltée en présence d'ADN. L'ajout de quantité croissante du composé testé entraîne un déplacement de la sonde fluorescente par compétition et donc une diminution de son émission. La diminution de la fluorescence en fonction de la concentration en ligand donne une estimation de l'affinité de celui-ci, souvent exprimée sous forme de DC_{50} , qui est la concentration en ligand nécessaire pour diminuer l'intensité de fluorescence de moitié par rapport à son niveau initial.

L'équipe de Teulade-Fichou a mis au point un test simple, rapide et efficace, basé sur cette méthode, pour évaluer l'affinité et la sélectivité de ligands pour les G4.

Ce test⁹⁹, appelé « G4-FID », permet de classer des composés d'une même série en fonction de leur affinité pour l'ADN quadruplexe et de leur sélectivité ADN quadruplexe/duplexe (double brin).

La sonde fluorescente de l'ADN quadruplexe et de l'ADN duplexe utilisée pour ce test est le thiazole orange (TO) (Figure 58), connu pour présenter une bonne affinité pour les deux formes d'ADN contrairement au bromure d'éthidium qui est généralement utilisé pour mesurer l'affinité vis-à-vis de l'ADN duplexe.



thiazole orange

Figure 58

Il faut noter que la capacité d'un ligand à déplacer le TO dépend de son mode d'interaction avec le quadruplexe. Il faut donc prendre des précautions quant à l'interprétation

⁹⁹ Monchaud, D.; Allain, C.; Teulade-Fichou, M. P. Development of a Fluorescent Intercalator Displacement assay (G4-FID) for establishing quadruplex-DNA affinity and selectivity of putative ligands. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4842-4845.

des résultats. Cependant, ce test est très utile pour comparer des molécules appartenant à une même famille.

Le principe de ce test est résumé dans la figure suivante (Figure 59).

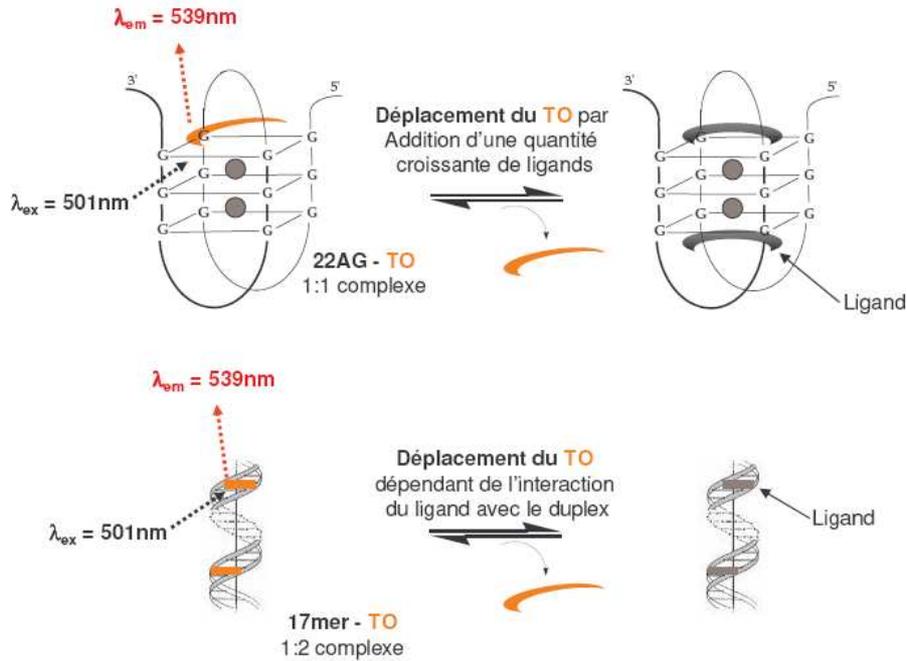


Figure 59

Deux types d'ADN quadruplexe intramoléculaire et deux types d'ADN duplexe sont utilisés de façon à éviter les faux positifs ou négatifs.

Pour les quadruplexes, il s'agit du 22AG (5'-AGGG(TTAGGG)₃-3') qui mime la séquence télomérique humaine, et le TBA (5'-GGTTGGGTGGGTTGG-3'), un quadruplexe plus simple structuralement (il ne présente que deux tétrades de guanine), dont l'intérêt est de ne pas être polymorphique.

Les deux duplexes utilisés ont des séquences aléatoires (pas de site spécifique), de longueurs différentes : un 17mer (5'-CCAGTTCGTAGTAACCC-3'/3'-GGTCAAGCATCATTGGG-5') et un 26mer (auto-complémentaire, 5'-CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG-3'/3'-GTTAGCCTAGCTTAAGCTAGGCTAAC-5').

2.2. Résultats du test « G4-FID ».

Les mesures suivantes (Tableau 16) ont été réalisées par D. Monchaud à l'Institut Curie à Orsay dans le cadre d'une étude préliminaire.

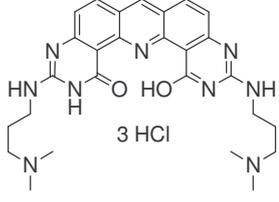
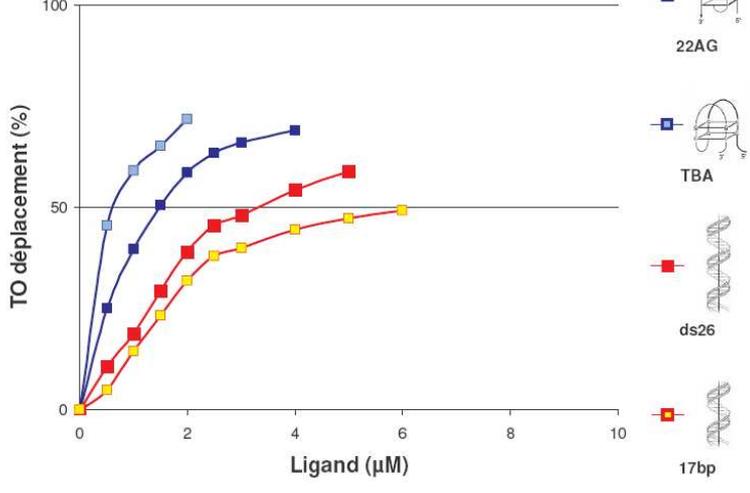
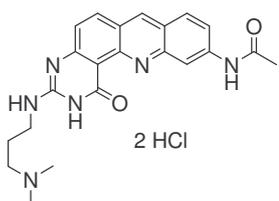
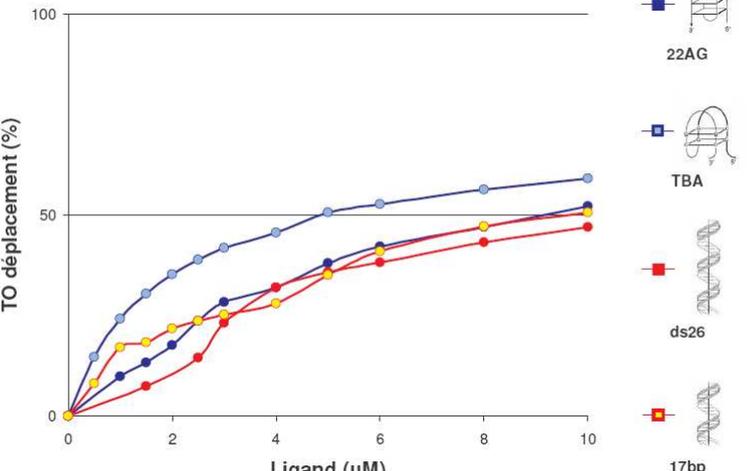
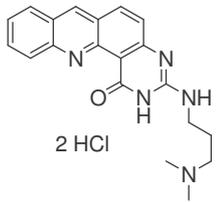
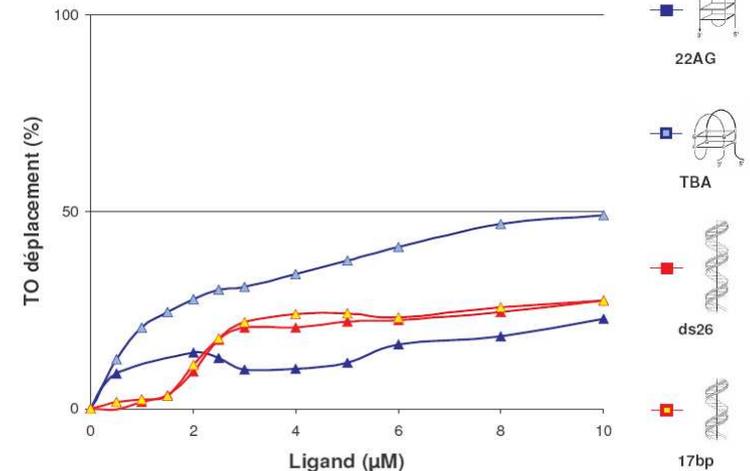
| N° | composés | Résultats du test G4-FID |
|----|---|--|
| 54 |  |  |
| 55 |  |  |
| 49 |  |  |

Tableau 16

Les résultats des mesures sont traités comme suit. L'aire de fluorescence FA_0 ($510 < \lambda_{\text{ém}} < 750\text{nm}$) du **TO** avant ajout de ligand est prise comme référence. A chaque ajout de ligand (de 0 à 10 équivalents) on mesure l'aire de fluorescence FA du **TO** et on calcule un pourcentage de déplacement ($\text{TO déplacement} = 100 - [(FA/FA_0) * 100]$). Le pourcentage de déplacement peut ensuite être tracé en fonction de la concentration en ligand ajouté. Pour comparer les ligands entre eux, on définit ensuite un ${}^{\text{G4}}\text{DC}_{50}$ (pour l'ADN télomérique) et un ${}^{\text{ds}}\text{DC}_{50}$ (pour l'ADN double brin) comme étant la concentration de ligand nécessaire pour déplacer 50% du **TO**. La sélectivité du ligand est alors définie comme étant le rapport des deux DC_{50} (ds/G4).

De cette étude préliminaire, nous avons pu tirer les conclusions suivantes :

- Le composé **54** est le plus intéressant car il présente une bonne aptitude à déplacer le **TO** de sa matrice ADN, avec une petite préférence pour le quadruplexe par rapport au duplexe (une sélectivité (${}^{\text{ds}}\text{DC}_{50}/{}^{\text{G4}}\text{DC}_{50}$) de 5 est obtenue si l'on compare les résultats ds26/TBA, et de 10 en comparant 17mer/TBA). Cependant, ce ligand est problématique car il absorbe légèrement dans les conditions du test. C'est pourquoi les mesures n'ont pu être effectuées avec un excès de ligand supérieur à 4-5 équivalents.
- Pour les composés **49** et **55**, les résultats sont plus modestes que ceux obtenus avec le produit **54**, que ce soit en terme de déplacement du **TO** ou de sélectivité.
- Le composé **52** ne présente aucune aptitude à déplacer le **TO** de sa matrice ADN sur les quadruplexes (résultats non présentés dans le Tableau 13).

Des études supplémentaires sont actuellement menées sur les composés **49**, **54** et **55** afin de confirmer ces premiers résultats.

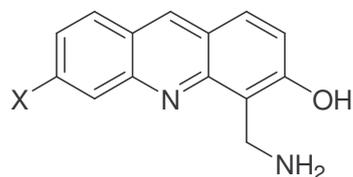
Dans cette famille de dérivés (**49**, **54**, **55**), le composé **54** semble être le candidat le plus intéressant en terme de ligand d'ADN-quadruplexes. D'autres techniques permettant plus

précisément de déterminer l'affinité de ligands pour les G4, comme le FRET-melting¹⁰⁰, peuvent être alors envisagées pour ce composé.

¹⁰⁰ Mergny, J. L.; Lacroix, L.; Teulade-Fichou, M. P.; Hounsou, C.; Guittat, L.; Hoarau, M.; Arimondo, P. B.; Vigneron, J. P.; Lehn, J. M.; Riou, J. F.; Garestier, T.; Helene, C. Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, 98, 3062-3067.

Conclusion générale

Lors de ce travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse et à l'étude biologique de dérivés d'aminoacridines *ortho*-hydroxyméthylées (ou aminoalcools).

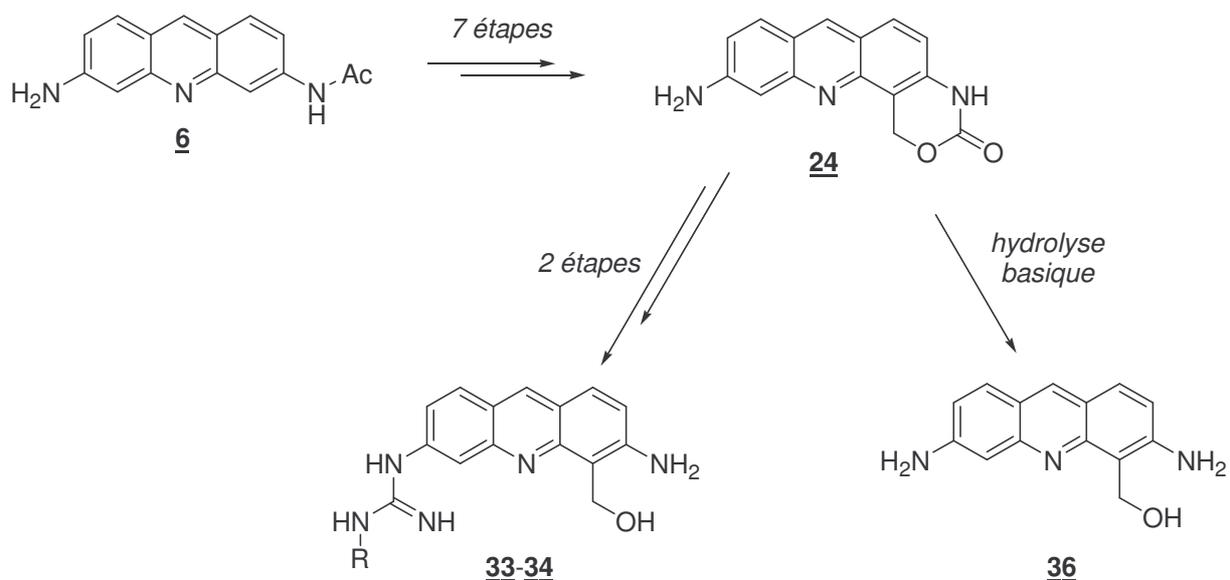


| X | N° |
|-----------------|--|
| H | <u>1</u> (référence) |
| | <u>33</u> (R= cyclopentyl) <u>34</u> (R= decyl) |
| NH ₂ | <u>36</u> |
| I | <u>41</u> |

Dans cette famille de composés, quatre nouvelles molécules (33, 34, 36 et 41) ont été synthétisées :

- Des dérivés aminoalcools comportant soit un motif guanidine (X= guanidine) soit un groupement amine (X = NH₂) :

Pour synthétiser les dérivés aminoalcools comportant un motif guanidine (33 et 34) nous avons mis au point une stratégie générale et efficace en neuf étapes :



Le point majeur de cette stratégie est la synthèse d'un intermédiaire-clé 24 qui est ensuite fonctionnalisé à partir de son amine libre. Dans notre étude, nous avons choisi de le

fonctionnaliser via un motif guanidine, mais on peut aussi imaginer une fonctionnalisation impliquant un autre motif ou une autre fonction (urée, carbamate, amide).

L'avantage d'une fonctionnalisation via un motif guanidine est que celui-ci permet : d'une part d'augmenter la solubilité des composés en milieu aqueux et, d'autre part, d'accrocher différents groupements R.

Cette stratégie nous a aussi permis de synthétiser le dérivé aminoalcool **36** (X= NH₂), à partir de l'intermédiaire-clé **24**.

Les études biologiques menées sur ces dérivés ont confirmé l'intérêt de ces aminoacridines *ortho*-hydroxyméthylées, à savoir :

- des activités cytostatiques très intéressantes.
- Les cibles de ces composés ne sont pas les topoisomérases I et II, cibles classiques de certaines acridines possédant des activités antitumorales.
- Les composés les plus cytostatiques, **36** et **33**, sont capables de s'intercaler dans l'ADN et sont distribués partout dans la cellule. L'ADN reste une cible potentielle pour ces composés.
- En revanche, le composé **34** moins cytostatique, ne semble pas capable de s'intercaler dans l'ADN et n'est pas observé dans le noyau. Il faut cependant noter que le composé de référence **1** n'est, lui non plus, pas localisé dans le noyau.

Un autre point intéressant à souligner est que, pour les dérivés comportant un motif guanidine, en modifiant la nature du groupement R, nous pouvons moduler la distribution cellulaire du composé tout en conservant une bonne activité cytostatique. On peut alors envisager d'accrocher par ce biais aux dérivés cytotoxiques un vecteur, voire un anticorps, en vue de cibler les cellules cancéreuses.

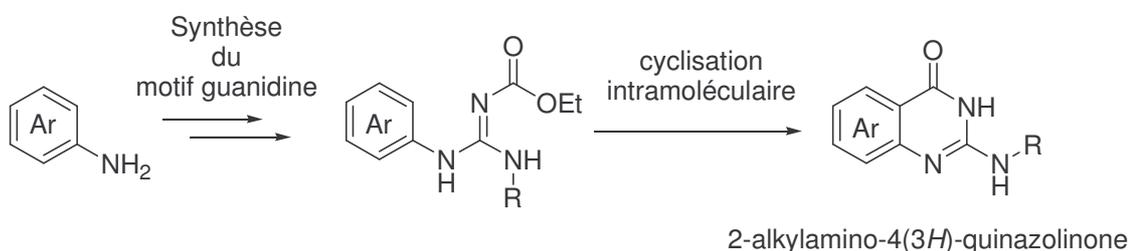
2- Un dérivé aminoalcool iodé **41** :

Afin de comprendre le mécanisme d'action du composé de référence **1** qui, rappelons le, est le dérivé le plus cytostatique et qui est distribué exclusivement le cytoplasme, nous avons synthétisé un analogue iodé (composé **41**) de ce composé et étudié sa distribution cellulaire par microscopie ionique (SIMS). Des études biologiques nous ont montré que l'introduction d'un atome d'iode sur la molécule ne modifiait ni l'activité cytostatique, ni la distribution cellulaire du composé (localisation dans le cytoplasme uniquement, comme le composé de référence **1**).

D'après les premiers résultats obtenus par SIMS, l'hypothèse d'une localisation dans les lysosomes peut être envisagée. Cependant des études complémentaires et plus approfondies sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

Au cours de travail, nous avons mis en évidence une nouvelle réactivité des guanidines "*N*-aryl,*N'*-alkyl,*N''*-CO₂Et" qui permet de synthétiser des dérivés de 2-alkylamino-4(3*H*)-quinazolinone. Ces hétérocycles sont très étudiés pour leurs diverses propriétés biologiques et physico-chimiques.

Nous avons, dans un premier temps, optimisé cette réaction, puis nous l'avons appliquée avec succès à diverses amines aromatiques et hétérocycliques.



La méthodologie que nous avons mise au point permet de synthétiser en deux étapes (la synthèse des guanidines peut se faire en "one-pot") et avec de bons rendements des 2-aminoquinazolinones hautement fonctionnalisées à partir d'amines (hétéro)aromatiques simples. Dans notre laboratoire des travaux sont actuellement en cours pour appliquer cette méthodologie à d'autres amines aromatiques et hétérocycliques, puis développer une méthode sur support solide en vue d'une utilisation en chimie parallèle.

Des études préliminaires ont montré que certaines des nouvelles aminoquinazolinones synthétisées présentent des propriétés biologiques intéressantes (cytostatiques, ligand d'ADN G-quadruplexes, ligand potentiel du petit sillon). D'autres études sont envisagées (inhibition des CDK).

Partie expérimentale

Les analyses par chromatographie sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice 60F₂₅₄ Merck de 0,25 mm d'épaisseur, avec détection UV à 254 et 365 nm.

Les analyses par chromatographie liquide haute performance (CLHP) ont été effectuées sur un appareil Waters équipé de deux pompes M510, d'un injecteur universel U6K, d'un programmeur de gradient M680, d'un détecteur UV Waters à barette de diode. Les analyses en phase inverse ont été réalisées avec une colonne μ -bondapack C₁₈ (3,9 x 300 mm, 10 μ m de porosité, Waters).

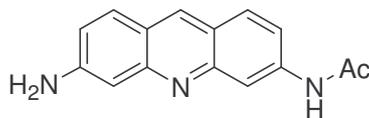
Les éluants utilisés sont :

- **A** : H₂O, pH 2,5 (acide phosphorique).
- **B** : MeOH / H₂O : 95/5, v/v.

Les températures de fusion (Mp) ont été mesurées à l'aide d'un appareil de détermination microscopique du point de fusion Reichert Thermovar muni d'un transformateur de réglage Reichert-Jung.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (NMR) ont été enregistrés sur les spectromètres Bruker AC 200 et Avance 300. Les déplacements chimiques (δ) sont données en ppm par rapport au pic de solvant pris comme référence interne (**CDCl₃** : 7,24 ppm ; **CD₃OD** : 4,78 ppm ; **DMSO-*d*₆** : 2,50 ppm). Les spectres sont décrits avec les abréviations suivantes : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quintet = quintuplet, sextet = sextuplet, m = multiplet. Les constantes de couplage (J) sont données en Hertz.

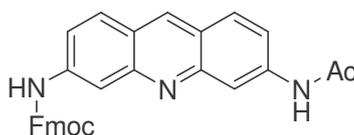
Les spectres d'absorption électronique (UV-Visible) ont été réalisés sur un spectrophomètre Perkin-Elmer 15 UV-Vis.

3-acetylamino-6-aminoacridine (6)

In a 6 L jacketed flask thermostated with the aid of a cryostat, proflavin (20 g, 96 mmol) was dissolved in propanoic acid (200 mL) and cooled to -12°C . Acetic anhydride (56 mL) was added dropwise over a period of 50 min and the mixture was stirred at -12°C for 20 h. Maintaining the temperature at -12°C , EtOH (200 mL) was introduced and triethylamine (128 mL) was added dropwise over 45 min period. After a further 30 min of agitation, the mixture was allowed to warm to 0°C and 5.5N HCl (285 mL) was added dropwise over 2 h period and the solution was stirred for another hour at 0°C . The reaction mixture was then filtered and the red precipitate was washed with ethanol, giving the chlorhydrate of 3-acetylamino-6-aminoacridine in 84% yield.

The free base was then prepared by dissolving the chlorhydrate (15 g, 52 mmol) in 400 mL of water, cooling the solution to 0°C in an ice bath and adding 60 mL of 28% aq. NH_4OH . The solution was left to stir at 0°C for 2 h before being filtered, washed with water and dried in a dessicator. The free base 3-acetylamino-6-aminoacridine 6 (10.55 g, 82%) was thus obtained as a yellow solid

The ^1H NMR spectra of this molecule corresponded with that already detailed by Wardani and al.⁵⁵ in previous research.

6-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)amino-3-acetylaminoacridine (15)

Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (108 mg, 1.22 mmol) was added to a solution of monoacetylproflavine 6 (103 mg, 0.14 mmol) in dioxane (5.5 mL). An 10% aqueous solution of Na_2HCO_2 (1.3 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature during 5h. When the reaction was completed, the mixture solution was extracted five times with AcOEt.

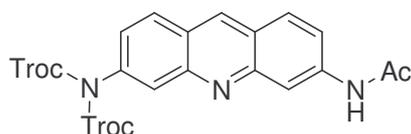
The combined organic layers were washed with water and brine. After drying over magnesium sulfate, the organic phase was removed under reduced pressure. The resulting residue was chromatographed on silica gel with a mixture of AcOEt/ EtOH (100:0 to 98:2) as eluant. Compound **15** (54 mg, 28%) was thus obtained as a yellow solid.

Mp: 134-135°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10.33 (s, 1H, NH-Ac), 10.16 (s, 1H, NH-Fmoc), 8.82 (s, 1H, H-9), 8.48 (s, 1H, H-4), 8.25 (s, 1H, H-5), 8.04-8.00 (m, 2H, H-1, H-8), 7.92 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz, CH_{arom}), 7.80 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz, CH_{arom}), 7.60 (d, 2H, *J* = 9.1 Hz, H-2, H-7), 7.47-7.35 (m, 4H, 4xCH_{arom}), 4.60 (d, 2H, *J* = 6.5 Hz, CH₂), 4.37 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH), 2.16 (s, 3H, CH₃).

SM (ESI) : *m/z* = 474.0 ((M+H)⁺)

6-[bis(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl) amino]-3-acetylaminoacridine (17**)**

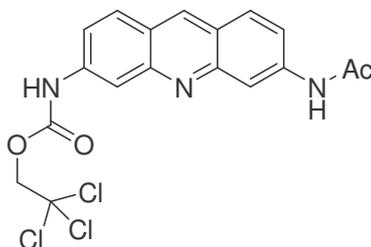


2,2,2-trichloroethyl chloroformate (2 mL, 14.53 mmol) was added dropwise to a solution of monoacetylproflavine **6** (100 mg, 0.40 mmol) in pyridine (6 mL), stirred at room temperature during 10 mn. When all starting compound has disappeared, the heterogeneous solution was filtered to remove salts and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in water and the solution was extracted three times with AcOEt. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate and evaporated. The resulting residue was then poured into water and filtered. Compound **17** (74 mg, 31%) was thus obtained as a brown solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10.34 (s, 1H, NH-Ac), 9.03 (s, 1H, H-9), 8.59 (s, 1H, H-4), 8.20-8.10 (m, 3H, H-8, H-1, H-5), 7.67 (dd, 1H, *J* = 2.0, 9.2 Hz, H-7), 7.56 (dd, 1H, *J* = 2.1, 8.8 Hz, H-2), 4.99 (s, 4H, 2xCH₂), 2.17 (s, 3H, CH₃).

SM (ESI) : $m/z = 601.9$ (^{35}Cl) ((M) $^+$)

6-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)amino-3-acetylaminoacridine (**18**)



2,2,2-trichloroethyl chloroformate (1550 μl , 11.25 mmol) was added dropwise to a solution of monoacetylproflavine **6** (353 mg, 1.40 mmol) in pyridine (20 mL) cooled at 0°C . When all starting compound has disappeared the solvent was evaporated to dryness. The resulting oil was stirred in aq. NH_4OH and the resulting precipitate was filtered, washed with water. The desired product was purified by recrystallization from isopropanol. Compound **18** (462 mg, 77%) was thus obtained as a brown solid.

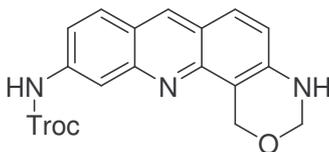
Mp: 234-238 $^\circ\text{C}$

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : δ 10.60 (s, 1H, NH-Troc), 10.34 (s, 1H, NH-Ac), 8.86 (s, 1H, H-9), 8.49 (s, 1H, H-4), 8.29 (s, 1H, H-5), 8.08-8.02 (m, 2H, H-8, H-1), 7.68 (dd, 1H, $J = 1.8, 9.0$ Hz, H-7), 7.61 (dd, 1H, $J = 1.7, 9.0$ Hz, H-2), 5.04 (s, 2H, CH_2), 2.16 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : δ 169.0 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 151.8 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_2\text{CCl}_3$), 149.8 (C-4a), 149.5 (C-10a), 140.8 (C-3), 140.1 (C-6), 135.2 (C-9), 129.3 (C-8), 129.1 (C-1), 122.4 (C-9a), 122.3 (C-8a), 120.1 (C-2), 119.4 (C-7), 113.8 (C-4), 113.4 (C-5), 95.8 (CCl_3), 73.6 (CH_2), 24.2 (CH_3).

HRMS (EI) : (M) $^+$ _{found} 426.0174 (^{35}Cl); (M) $^+$ _{calcd} for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_3$ 426.0174 (^{35}Cl).

10-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)amino-3,4-dihydro-1H-[1,3]oxazino[4,5-c]acridine
(21)



Compound **18** (574 mg, 1.35 mmol) was dissolved in 11N HCl (300 ml) in the presence of formaldehyde (37% aqueous solution, 6ml, 73.92 mmol). The solution was sonicated to break aggregates. The yellow solution was stirred at 45°C and monitored by TLC (elution with diethylether). After 16h of reaction, the solution becoming red was cooled to 0°C and basified carefully with diluted aqueous NH₄OH. The precipitate thus formed was filtered and then dissolved in diethylether (500 mL). The solution was washed with water until neutral pH and brine, dried over magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure. The residue obtained was then chromatographed on silica gel (diethylether/pentane 7:3 to diethylether 100%). The dihydrooxazine **21** (435 mg, 76%) was thus obtained as yellow solid.

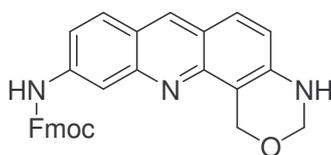
Mp: 203-205°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10.51 (s, 1H, NH-Troc), 8.68 (s, 1H, H-7), 8.21 (s, 1H, H-11), 7.97 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz, H-8), 7.79 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-6), 7.55 (dd, 1H, *J* = 1.9, 9.0 Hz, H-9), 7.03 (br s, 1H, NH), 7.01 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H-5), 5.25 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 5.03 (s, 2H, CH₂-CCl₃), 4.80 (d, 2H, *J* = 4.1 Hz, O-CH₂-N).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 152.2 (CO), 149.1 (C-11a), 147.5 (C-12a); 144.1 (C-4a), 140.1 (C-10), 135.9 (C-7), 129.7 (C-8); 128.1 (C-6), 121.4 (C-6a), 120.9 (C-7a), 119.9 (C-5), 118.4 (C-9), 113.9 (C-11), 109.9 (C-12b), 96.2 (CCl₃), 74.0 (C-3), 73.9 (CH₂), 65.3 (C-1).

Anal. Calcd for C₁₈H₁₄Cl₃N₃O₃: C, 50.67; H, 3.31; N, 9.85. **Found:** C, 50.99; H, 3.43; N, 9.61.

10-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)amino-3,4-dihydro-1H-[1,3]oxazino[4,5-c]acridine
(**19**)



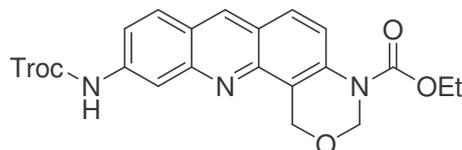
Compound **15** (200 mg, 0.42 mmol) was dissolved in 11N HCl (40 ml) in the presence of formaldehyde (37% aqueous solution, 1.6 ml, 19.73 mmol). The heterogeneous solution was stirred at 35°C and monitored by TLC (elution with diethylether). After 24h of reaction, the mixture solution was cooled to 0°C and basified with saturated aqueous NaHCO₃. The precipitate thus formed was filtered and then washed with water until neutral pH. The crude product was chromatographed (eluant: AcOEt/EtOH 98:2) to give the desired dihydrooxazine **19** (29 mg, 15%).

Mp: 150-151°C

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) : δ 10.16 (s, 1H, NH-Fmoc), 8.65 (s, 1H, H-7), 8.18 (s, 1H, H-11), 7.94-7.90 (m, 3H, H-6 or H-8, 2xCH_{arom}), 7.81-7.76 (m, 3H, H-8 or H-6, 2xCH_{arom}), 7.50-7.36 (m, 5H, H-9, 4xCH_{arom}), 7.01-6.98 (m, 2H, H-6, NH), 5.24 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 4.79 (d, 2H, *J* = 4.2 Hz, O-CH₂-N), 4.58 (d, 2H, *J* = 6.7 Hz, CH₂), 4.37 (t, 1H, *J* = 6.3 Hz, CH).

SM (ESI) : *m/z* = 474.0 ((M+H)⁺)

4-ethoxycarbonyl-10-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)amino-3,4-dihydro-1H-[1,3]oxazino[4,5-c]acridine (**22**)



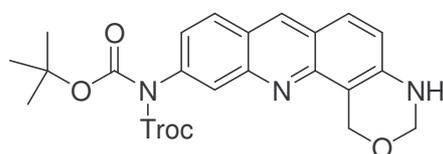
Ethyl chloroformate (500 μL, 5.23 mmol) was added dropwise to a solution of **21** (74 mg, 0.17 mmol) in pyridine (5 mL) at room temperature. When the reaction was completed,

pyridine was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in aqueous NH_4OH and then extracted three times with AcOEt. The combined organic layers were washed with water until neutral pH and brine. After drying over magnesium sulfate, the organic phase was evaporated under reduced pressure. The desired product was purified by chromatography on silica gel (eluant: AcOEt). The dihydrooxazinone **22** (45 mg, 52%) was thus obtained as a yellow solid.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) : δ 10.65 (s, 1H, NH-Troc), 8.95 (s, 1H, H-7), 8.35 (s, 1H, H-11), 8.11 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, H-8), 7.99 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, H-6), 7.84 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, H-5), 7.69 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, H-9), 5.48 (s, 2H, Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$), 5.28 (s, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-N}$), 5.04 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CCl}_3$), 4.28 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, COCH_2), 1.31 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_3).

SM (ESI) : $m/z = 497,90$ ((M+H) $^+$)

10-[N-*tert*-butoxycarbonyl-N-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)]amino-3,4-dihydro-1H-[1,3]oxazino[4,5-c]acridine (**26)**



Boc_2O (910 mg, 4.16 mmol) was added to a solution of **21** (351mg, 0.82 mmol) in pyridine (90 mL) and stirred at room temperature for 3h. The reaction was monitored by TLC (elution diethylether/pentane 7:3). When the starting material had completely disappeared, the reaction was quenched by adding water (2 mL). The pyridine was removed under reduced pressure and as azeotropic mixture with water. The *tert*-butanol formed during the reaction was also removed with an azeotropic mixture with water. The residue thus obtained was dissolved in diethylether. The solution was dried over magnesium sulfate and removed under reduced pressure. The dihydrooxazine **26** (433 mg, quantitative) was thus obtained as a yellow solid and was used without purification.

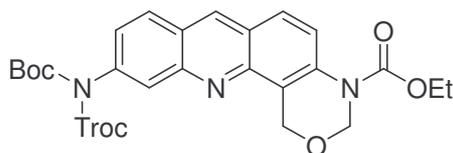
Mp : 76-79°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8.93 (s, 1H, H-7), 8.06 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, H-8), 7.83-7.86 (m, 2H, H-6, H-11), 7.35 (dd, 1H, $J = 2.2, 8.8$ Hz, H-9), 7.16 (br t, 1H, NH), 7.10 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-5), 5.26 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 4.95 (s, 2H, CH₂-CCl₃), 4.82 (d, 2H, $J = 4.0$ Hz, O-CH₂-N), 1.41 (s, 9H, *tert*-but).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 150.9 (C=O₂CH₂CCl₃), 150.7 (C=O₂C(CH₃)₃), 148.3 (C-11a), 147.4 (C-12a), 144.4 (C-4a), 139.5 (C-10), 136.2 (C-7), 129.5 (C-8), 128.2 (C-6), 126.9 (C-11), 124.6 (C-9), 123.6 (C-7a), 121.9 (C-6a), 121.1 (C-5), 109.6 (C-12b), 95.1 (CCl₃), 83.9 (C *tert*-but), 75.1 (CH₂), 74.0 (C-3), 65.2 (C-1), 27.8 (CH₃ *tert*-but).

HRMS (EI) : (M)⁺_{found} 526.0695 (³⁵Cl); (M)⁺_{calcd} for C₁₈H₁₄Cl₃N₃O₃ 526.0695 (³⁵Cl).

4-ethoxycarbonyl-10-[*N*-*tert*-butoxycarbonyl-*N*-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)]amino-3,4-dihydro-1*H*-[1,3]oxazino[4,5-*c*]acridine (27)



Ethyl chloroformate (1 mL, 10.45 mmol) was added dropwise to a solution of 26 (190 mg, 0.36 mmol) in pyridine (50 mL) cooled at 0°C. When the reaction was completed, pyridine was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in aqueous NH₄OH and then extracted twice with diethylether. The combined organic layers were washed with water until neutral pH and brine. After drying over magnesium sulfate, the organic phase was evaporated under reduced pressure. The dihydrooxazine 27 (213 mg, 99%) was thus obtained as a yellow solid and was used without purification.

Mp: 66-72°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 9.11 (s, 1H, H-7), 8.21 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H-8), 8.06 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, H-6), 8.04 (s, 1H, H-11), 7.93 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz, H-5), 7.55 (dd, 1H, $J = 1.9, 8.8$ Hz, H-9), 5.49 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 5.29 (s, 2H, O-CH₂-N), 4.95 (s, 2H, CH₂-CCl₃), 4.28 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz, COCH₂), 1.41 (s, 9H, *tert*-but), 1.31 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH₃).

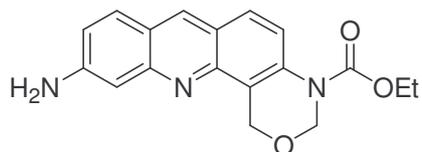
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 153.7 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 150.7 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_2\text{CCl}_3$), 150.6 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 148.0 (C-11a), 146.0 (C-12a), 140.1 (C-10), 138.6 (C-4a), 136.7 (C-7), 129.5 (C-8), 127.5 (C-11), 126.9 (C-9), 126.8 (C-6), 125.3 (C-7a), 124.1 (C-5), 123.6 (C-6a), 121.1 (C-12b), 95.1 (CCl_3), 84.1 (C *tert-but*), 75.2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CCl}_3$), 74.9 (C-3), 65.9 (C-1), 62.8 (CH_2), 27.8 (CH_3 *tert-but*), 14.6 (CH_3).

HRMS (EI): (M)+ Na^+ _{found} 620.0736 (^{35}Cl); (M)+ Na^+ _{calcd} for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_7\text{N}_3\text{Cl}_3$ 620.0728.

Preparation of 10% Cd/Pb couple

Yellow lead oxide, (litharge, PbO , 430 mg, 2 mmol), was dissolved in 20 ml of warm 50% aq. AcOH , and the solution was slowly added to a vigorously stirred suspension of Cd dust (Aldrich, 325 mesh, 2180 mg, 20 mmol) in deionized water (40 mL). The Cd darkened as Pb deposited on its surface, and formed clumps that were gently broken up with a glass rod. The dark, non-pyrophoric Cd/Pb couple was filtered, washed with water, then acetone, vacuum dried, crushed (glass rod), and stored in a closed vessel.

4-ethoxycarbonyl-10-amino-3,4-dihydro-1*H*-[1,3]oxazino[4,5-*c*]acridine (**23**)

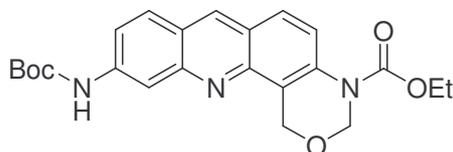


10% Cd-Pb (273 mg, 2.43 mmol in Cd) was added to a rapidly stirring mixture of **22** (116 mg, 0.23 mmol), THF (10 mL) and 1N aq. NH_4OAc (pH =7, 10 mL) at room temperature. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed after 90 min, the solids were filtered and rinsed successively with water and AcOEt . The aqueous phase was extracted twice with AcOEt . The combined organic layers were washed with water and brine. After drying over magnesium sulfate, the organic phase was removed under reduced pressure. The desired product was purified by chromatography on silica gel (eluant: AcOEt). The dihydrooxazine **23** (37 mg, 49%) was thus obtained as a brown solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ 8.45 (s, 1H, H-7), 7.82-7.71 (m, 3H, H-6, H-8, H-5), 7.20 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, H-11), 6.99 (dd, 1H, $J = 2.0, 8.8$ Hz, H-9), 5.57 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 5.31 (s, 2H, O-CH₂-N), 4.34 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz, COCH₂), 4.20 (br s, 2H, NH₂), 1.38 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH₃).

SM (ESI) : $m/z = 324.0$ ((M+H)⁺)

4-ethoxycarbonyl-10-*tert*-butoxycarbonylamino-3,4-dihydro-1*H*-[1,3]oxazino[4,5-*c*]acridine (28)



10% Cd-Pb (1554 mg, 13.83 mmol in Cd) was added to a rapidly stirring mixture of 27 (550 mg, 0.92 mmol), THF (90 mL) and aq. 1N NH₄OAc (pH =7, 90 mL) at room temperature. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed after 2 h, the solids were filtered and rinsed successively with water and AcOEt. The aqueous phase was extracted twice with AcOEt. The combined organic layers were washed with water and brine. After drying over magnesium sulfate, the organic phase was removed under reduced pressure. The desired product was purified by crystallization from isopropanol. The dihydrooxazine 28 (311 mg, 80%) was thus obtained as yellow solid.

Mp: 184-186°C

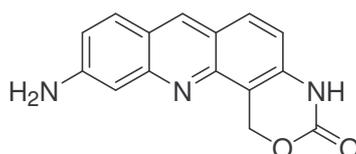
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 9.87 (s, 1H, NH-Boc), 8.87 (s, 1H, H-7), 8.33 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz, H-11), 8.03 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, H-8), 7.97 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz, H-6), 7.81 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz, H-5), 7.61 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, H-9), 5.47 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 5.28 (s, 2H, O-CH₂-N), 4.28 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, COCH₂), 1.54 (s, 9H, *tert*-but), 1.31 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 153.8 (C=O₂CH₂CH₃), 153.1 (C=O₂C(CH₃)₃), 149.4 (C-11a), 146.0 (C-12a), 141.8 (C-10), 138.1 (C-4a), 136.0 (C-7), 129.4 (C-8), 126.8 (C-6), 122.8

(C-7a), 122.6 (C-5), 122.3 (C-6a), 120.8 (C-12b), 120.6 (C-9), 112.8 (C-11), 80.2 (C *tert*-but), 74.9 (C-3), 66.0 (C-1), 62.7 (CH₂), 28.4 (CH₃ *tert*-but), 14.6 (CH₃).

Anal. Calcd for C₂₃H₂₅N₃O₅: C, 65.24; H, 5.96; N, 9.93. Found: C, 65.41; H, 5.90; N, 10.07.

10-amino-1,4-dihydro-3H-[1,3]oxazino[4,5-c]acridin-3-one (24)



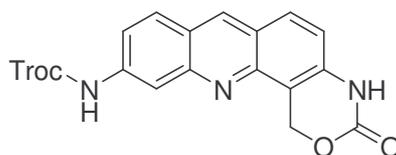
The dihydrooxazine 28 (325 mg, 0.77 mmol) was dissolved in 99% methanesulfonic acid (25 mL) and stirred overnight at 80°C. When the reaction was completed, the mixture was allowed to cool to room temperature before being poured over 200 g of ice. The solution was carefully basified with aq. NH₄OH and the resulting precipitate was filtered, washed with water until neutral pH and then with EtOH in order to improve the purity of the product. The dihydrooxazinone 24 (182 mg, 89%) was thus obtained as a brown solid.

Mp: >350°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10.34 (s, 1H, NH), 8.60 (s, 1H, H-7), 7.89 (d, 1H, *J*= 8.9 Hz, H-8 or H-6), 7.77 (d, 1H, *J*= 9.0 Hz, H-8 or H-6), 7.04-6.87 (m, 2H, H-5, H-9), 6.87 (d, 1H, *J*= 1.9 Hz, H-11), 6.12 (s, 2H, NH₂), 5.86 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 151.5 (C-3), 151.3 (C-10), 151.2 (C-11a), 144.8 (C-12a), 136.9 (C-4a), 135.8 (C-7), 129.8 (C-8 or C-6), 129.6 (C-6 or C-8), 120.3 (C-6a), 120.0 (C-9), 119.9 (C-7a), 113.2 (C-5), 108.2 (C-12b), 102.9 (C-11), 66.2 (C-1).

HRMS (EI) : (M)⁺_{found} 266.0926; (M)⁺_{calcd} for C₁₅H₁₂O₂N₃ 266.0924.

10-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)amino-1,4-dihydro-3H-[1,3]oxazino[4,5-c]acridin-3-one (25)

The dihydrooxazine 22 (60 mg, 0.11 mmol) was dissolved in 99% methanesulfonic acid (10 mL) and stirred overnight at 80°C. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed, the mixture was allowed to cool to room temperature before being poured into cold water. The solution was basified carefully with aq. NH₄OH and the basic solution was extracted three times with AcOEt. The combined organic layers were washed with water until neutral pH and brine. After drying over magnesium sulfate, the organic phase was removed under reduced pressure. The crude product was then chromatographed (eluant: AcOEt) to give the desired dihydrooxazinone 25 (23 mg, 46%) as a yellow solid.

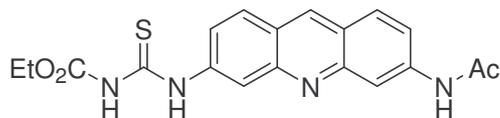
Mp: 231-232°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10.65 (s, 1H, NH-Troc), 10.50 (s, 1H, Ar-NH-C=O), 8.93 (s, 1H, H-7), 8.32 (s, 1H, H-11), 8.10-8.06 (m, 2H, H-8, H-6), 7.67 (dd, 1H, *J*= 2.0, 9.1 Hz, H-9), 7.22 (d, 1H, *J*= 8.9 Hz, H-5), 5.96 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 5.04 (s, 2H, CH₂).

MS (ESI) : *m/z* = 440.0 (³⁵Cl) ((M)⁺)

General procedure for the synthesis of thiourea derivatives

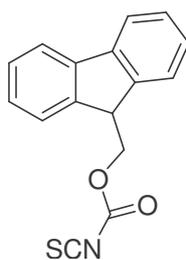
The amino derivative (1 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (volume depending of the solubility of the amine). Carbamoyl isothiocyanate (1.1 mmol) was added and the solution was stirred at room temperature. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed, the solvent was removed under reduced high pressure. The residue thus obtained was poured into water and the resulting solid was filtered. The crude product was washed with EtOH or acetone.

***N*-[3-(acetylamino)acridin-6-yl]-*N'*-(ethoxycarbonyl)thiourea (**8**)**

Prepared according to the general procedure described above, from monoacetylproflavine **6** (500 mg, 1.98 mmol), ethyl isothiocyanatoformate (247 μ l, 2.09 mmol) and Anhydrous DMF (15 mL) and stirred overnight. When the reaction was completed, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting residue was poured into water. The desired thiourea **8** (513 mg, 67%) was thus obtained as an orange solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 11.9 (s, 1H, NH-C=S), 11.5 (m, 1H, NHCO₂Et), 10.4 (s, 1H, NHAc), 9.2 (s, 1H, H-9), 8.6 (s, 1H, H-4), 8.5 (s, 1H, H-5), 8.1 (dd, 2H, *J*= 3.1, 8.9 Hz, H-2, H-7), 7.6 (d, 2H, *J*= 8.9 Hz, H-8, H-1), 4.3 (q, 2H, *J*= 7.2 Hz, CH₂), 2.2 (s, 3H, CH₃), 1.3 (t, 3H, *J*= 7.2 Hz, CH₃).

SM (DCI) : 383.0 ((M+H)⁺)

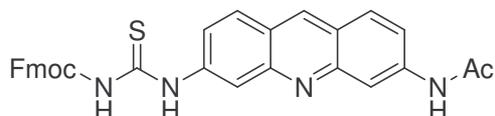
Preparation of fluorenylmethoxycarbonyl isothiocyanate (Fmoc-NCS) (7**)**

Fluorenylmethoxycarbonyl chloride (2606 mg, 10.07 mmol) was dissolved in 10 ml of anhydrous AcOEt. This solution was added dropwise to a suspension of dry potassium thiocyanate (1120 mg, 11.53 mmol) in 20 mL of anhydrous AcOEt at 0°C under inert atmosphere. The solution was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. The reaction was monitored by TLC (eluant: CH₂Cl₂/hexane 1:3). The reaction mixture was passed through a Celite pad to remove residuals salts, and the solvent was removed by rotary

evaporation. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (eluant mixture: CH₂Cl₂/hexane 2:3) to give the Fmoc-NCS **7** as a white solid (887 mg, 31%).

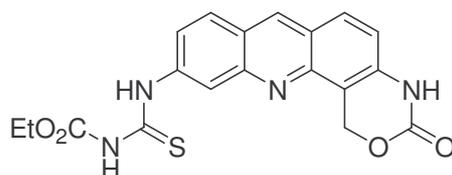
The ¹³C NMR spectra of this molecule corresponded with that already detailed by P.C. Kearney and al⁶¹.

***N*-[3-(acetylamino)acridin-6-yl]-*N'*-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)thiourea (**9**)**



Prepared according to the general procedure, described above, from monoacetylproflavine **6** (302 mg, 1.20 mmol) in anhydrous DMF (115 mL), a solution of fluorenylmethyloxycarbonyl isothiocyanate (354 mg, 1.26 mmol) in anhydrous DMF (5 mL) during 1h. The residue obtained after evaporation of solvent, was solubilized in a minimum volume of MeOH and a large volume of diethylether was added to precipitate the desired product. After filtration, the thiourea **9** (479 mg, 75%) was thus obtained as a brown solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 11.84 (s, 1H, NH-C=S), 11.78 (s, 1H, NH-Fmoc), 10.39 (s, 1H, NH-Ac), 8.94 (s, 1H, H-9), 8.61 (s, 1H, H-4 or H-5), 8.56 (s, 1H, H-5 or H-4), 8.12-8.07 (m, 2H, H-1, H-8), 7.93-7.87 (m, 4H, 4xCH_{arom}), 7.67-7.64 (m, 2H, H-2, H-7), 7.48-7.35 (m, 4H, 4xCH_{arom}), 4.48 (d, 2H, *J*= 7.3 Hz, CH₂), 4.35 (br t, 1H, CH), 2.17 (s, 3H, CH₃).

N*-[1,4-dihydro-3*H*-[1,3]oxazino[4,5-*c*]acridin-3-one-10-yl]-*N'*-(ethoxycarbonyl)thiourea*(29)**

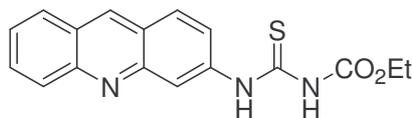
Prepared according to the general procedure described above, from compound **24** (172 mg, 0.65 mmol), ethyl isothiocyanatoformate (80 μ l, 0.68 mmol) and anhydrous DMF (68 mL) and stirred for 90 min. The crude product obtained after filtration was washed with EtOH absolute. The thiourea **29** (223 mg, 87%) was thus obtained as an orange-red solid.

Mp: >350°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 12.91 (s, 1H, NH-C=S), 11.41 (s, 1H, NH-CO₂Et), 10.53 (s, 1H, Ar-NH-C=O), 8.99 (s, 1H, H-7), 8.68 (s, 1H, H-11), 8.12-8.09 (m, 2H, H-8, H-6), 7.64 (d, 1H, *J* = 10.1 Hz, H-9), 7.26 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H-5), 5.96 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 4.26 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 1.29 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 178.7 (C=S), 153.9 (C=O), 151.4 (C-3), 149.0 (C-11a), 145.3 (C-12a), 140.5 (C-10), 138.2 (C-4a), 137.0 (C-7), 130.4 (C-6 or C-8), 129.4 (C-6 or C-8), 123.7 (C-7a), 123.6 (C-9), 123.0 (C-6a), 120.1 (C-11), 116.8 (C-5), 109.2 (C-12b), 66.5 (C-1), 62.6 (CH₂), 14.5 (CH₃).

HRMS (EI): (M)⁺_{found} 397.09696; (M)⁺_{calcd} for C₁₉H₁₇N₄O₄S₁ 397.09650.

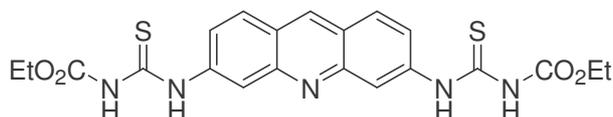
***N*-(acridin-3-yl)-*N'*-(ethoxycarbonyl)thiourea (42)**

Prepared according to the general procedure, described above, from 3-aminoacridine (500 mg, 2.57 mmol), ethyloxycarbonyl isothiocyanate (377 μ l, 3.20 mmol) in anhydrous DMF (15 mL) stirred overnight. When the reaction was completed, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting residue was poured into diethylether. The desired thiourea 42 (655 mg, 78%) was thus obtained as an orange solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 11.91 (s, 1H, NH-C=S), 11.43 (s, 1H, NHCO₂Et), 9.09 (s, 1H, H-9), 8.73 (s, 1H, H-4), 8.18-8.13 (m, 3H, H-1, H-8, H-5), 7.89-7.84 (m, 1H, H-6), 7.72 (dd, 1H, *J*= 2.1, 9.0 Hz, H-2), 7.65-7.59 (m, 1H, H-7), 4.27 (q, 2H, *J*= 7.1 Hz, CH₂), 1.30 (t, 3H, *J*= 7.1 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 178.5 (C=S), 153.5 (C=O), 148.7 (C-10a or C-9b), 148.5 (C-9b or C-10a), 139.8 (C-3), 136.0 (C-9), 130.8 (C-6), 128.7-128.6 (C-1, C-8, C-5), 126.0 (C-8a), 125.7 (C-7), 124.3 (C-9a), 124.2 (C-2), 120.2 (C-4), 62.2 (CH₂), 14.1 (CH₃).

HRMS (EI) : (M)⁺_{found} 326.09614; (M)⁺_{calcd} for C₁₇H₁₆N₃O₂S₁ 326.09577.

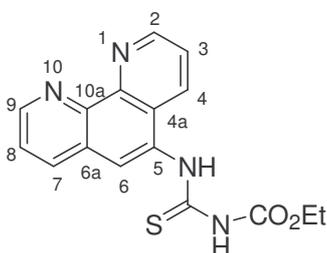
3,6-bis[3-(ethoxycarbonyl)thioureido]acridine (43)

Prepared according to the general procedure, described above, from 3,6-diaminoacridine (500 mg, 2.39 mmol), ethyl isothiocyanatoformate (1 mL, 8.48 mmol) added in two equal portions in anhydrous DMF (15 mL) and stirred at room temperature for 24h. When the reaction was completed, the mixture solution was poured into cold water (50 mL) to precipitate the product

and then the mixture was filtered. The desired product was purified by crystallization from MeOH. The bithiourea **43** (539 mg, 48%) was thus obtained as an orange solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 11.91 (s, 1H, NH-C=S), 11.42 (s, 1H, NHCO₂Et), 9.04 (s, 1H, H-9), 8.69 (s, 2H, H-4, H-5), 8.15 (d, 2H, *J*= 9.1 Hz, H-1, H-8), 7.71 (dd, 2H, *J*= 2.1, 9.0 Hz, H-7, H-2), 4.27 (q, 4H, *J*= 7.1 Hz, 2xCH₂), 1.30 (t, 6H, *J*= 7.1 Hz, 2xCH₃).

N-(ethoxycarbonyl)-N'-([1,10]phenanthrolin-5-yl)thiourea (50**)**



Prepared according to the general procedure described above, from 5-aminophenanthroline (1 g, 5.12 mmol), ethyl isothiocyanatoformate (670 μ l, 5.68 mmol) and anhydrous DMF (10 mL) stirred for 1h. When the reaction was completed, the heterogeneous solution was diluted with water (60 mL) and then filtered to give the desired thiourea **50** (1.50 g, 90%) as a white solid.

Mp: 199-201°C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 11.64 (s, 1H, NH-C=S), 11.51 (s, 1H, NH-CO₂Et), 9.13-9.10 (m, 2H, H-2, H-9), 8.51 (dd, 1H, *J*= 1.7, 8.2 Hz, H-7), 8.37 (dd, 1H, *J*= 1.7, 8.3 Hz, H-4), 8.09 (s, 1H, H-6), 7.82-7.77 (m, 2H, H-3, H-8), 4.29 (q, 2H, *J*= 7.1 Hz, CH₂), 1.32 (t, 3H, *J*= 7.1 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 181.3 (C=S), 153.6 (C=O), 150.2 (C-2 or C-9), 150.0 (C-2 or C-9), 145.9 (C-10b), 144.9 (C-10a), 136.2 (C-7), 133.2 (C-5), 131.9 (C-4), 127.7 (C-6a), 125.9 (C-4a), 125.0 (C-6), 123.5 (C-8 or C-3), 123.2 (C-8 or C-3), 62.1 (CH₂), 14.2 (CH₃).

Anal. Calcd for C₁₆H₁₄N₄O₂S: C, 58.89; H, 4.33; N, 17.17. **Found:** C, 59.03; H, 4.54; N, 17.30.

General procedure for the synthesis of guanidine derivatives

Method A: (*in DMF with triethylamine*)

A mixture of carbamoyl thiourea (1 mmol), alkylamine (1.2 mmol) and EDCI (N-(dimethylaminopropyl)-N-ethyl-carbodiimide hydrochloride) (1.2 mmol) was solubilized in anhydrous DMF. Triethylamine (3 mmol) was added to the solution and the mixture was stirred at 60°C. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue thus obtained was poured into water, sonicated and filtered. The protected guanidine was then washed with EtOH or acetone.

Method B: (*in DMF with DBU*)

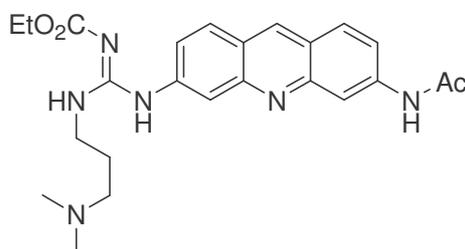
A mixture of carbamoyl thiourea (1 mmol), alkylamine (1.1 mmol) and EDCI (1.1 mmol) was solubilized in anhydrous DMF. DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-ene) (1.1 mmol) was added to the solution and the mixture was stirred at room temperature. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed, the mixture solution was diluted with cold water and acidified with 11N HCl to reach acidic pH (pH=1-2). A few spatulas of ammonium hexafluorophosphate were added to the solution and the resulting mixture was then extracted three times with AcOEt. The combined organic layers were washed with water and dried over magnesium sulphate before being evaporated under reduce pressure. The crude product obtained was purified by chromatography on silica alumina to give the desired product as $[\text{PF}_6]^-$ salt. This was then passed through a resin ion exchange, containing a Cl^- ion exchange, to give the desired product as chlorhydrated.

Method C: (*One pot synthesis in CH_2Cl_2*)

Ethyl isothiocyanatoformate (135 μl , 1.2 mmol) was added to a solution of the (hetero)cyclic amine (1 mmol) in CH_2Cl_2 (10 ml). The solution was stirred at room temperature for 1h30. The disappearance of the starting amine was checked by TLC or HPLC analysis. To the solution, Et_3N (416 μl , 3 mmol), propylamine (166 μl , 2 mmol) and EDCI (229 mg, 1.2 mmol) were successively added. The resulting mixture was stirred for 6h at room temperature

or 60°C (depending on the solubility of the intermediate thiourea). The solvent was then evaporated to dryness. The resulting oily residue was then diluted with water. The guanidines were isolated either as solids by simple filtration or as oils after extraction with CH₂Cl₂ and evaporation of the organic solvent. The purity of the guanidines was checked by HPLC analysis and was found to be > 95%. The guanidines were used in the next step without further purification.

N-(3-acetylaminoacridin-6-yl)-N'-[3-(N,N-dimethylamino)propyl]-N''-(ethoxycarbonyl)guanidine (10)



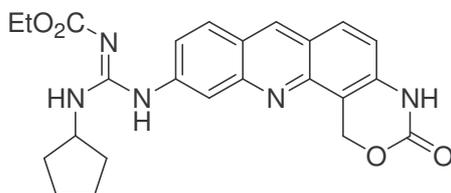
Prepared according to the method A from thiourea **8** (10 mg, 0.025 mmol), 3-(dimethylamino)propylamine (317 µL, 2.52 mmol), EDCI (6 mg, 0.03 mmol), triethylamine (10 µL, 0.07 mmol) and anhydrous DMF (1 mL) and stirred for 70 min. After filtration and washing with EtOH, the desired guanidine **30** (9 mg, 76 %) was thus obtained as a brown solid.

An analytical sample was purified by chromatography on silica gel (elution with a mixture of AcOEt/ CH₂Cl₂ 1:1).

¹H NMR (200 MHz, MeOH-*d*₄) : δ 9.7 (s, 1H, H-9), 9.0 (s, 1H, H-4 or H-5), 8.5 (d, 1H, *J*= 9.6 Hz, H-1 or H-8), 8.3 (d, 1H, *J*= 9.6 Hz, H-1 or H-8), 8.0 (s, 1H, H-4 or H-5), 7.8-7.7 (m, 2H, H-2, H-7), 4.2 (q, 2H, *J*= 7.2 Hz, CH₂), 3.8 (m, 2H, *J*= 7.2 Hz, CH₂), 3.0 (s, 6H, 2xCH₃), 2.2 (s, 3H, CH₃), 1.4 (m, 2H, CH₂).

SM (ESI) : *m/z* = 451.1 ((M+H)⁺)

***N*-(cyclopentyl)-*N'*-(ethoxycarbonyl)-*N''*-[1,4-dihydro-3*H*-[1,3]oxazino[4,5-*c*]acridin-3-one-10-yl] guanidine (**30**)**



Prepared according to the method A from thiourea **29** (10 mg, 0.025 mmol), cyclopentylamine (3 μ L, 0.03 mmol), EDCI (6 mg, 0.03 mmol), triethylamine (10 μ L, 0.07 mmol) and anhydrous DMF (1 mL) and stirred for 70 min. After filtration and washing with water, the desired guanidine **30** (11 mg, 97 %) was thus obtained as a brown solid.

An analytical sample was purified by chromatography on silica gel (elution with a mixture of AcOEt/ CH₂Cl₂ 1:1).

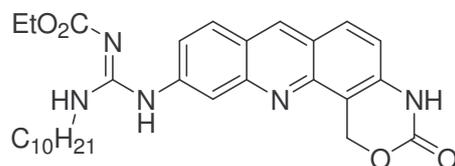
Mp: >350°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10.50 (s, 1H, NH), 8.92 (s, 1H, H-7), 8.08-8.02 (m, 3H, H-9, H-6, H-8), 7.72 (br s, 1H, H-11), 7.21 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H-5), 5.95 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 4.27 (br s, 1H, CH), 3.98 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz, CO₂CH₂), 2.02 (br s, 2H, CH₂), 1.72-1.51 (m, 6H, 3xCH₂), 1.16 (t, 3H, *J* = 6.4 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 163.4 (CO), 157.4 (CN), 151.1 (C-3), 149.1 (C-11a), 144.8 (C-12a), 141.1 (C-10), 137.5 (C-4a), 136.3 (C-7), 130.0 (C-6 or C-8), 128.5 (C-8 or C-6), 123.2 (C-11), 122.3 (C-6a), 122.1 (C-7a), 117.5 (C-9), 115.7 (C-5), 108.6 (C-12b), 66.1 (C-1), 59.9 (CH₂), 52.4 (CH), 32.8 (2xCH₂), 23.2 (2xCH₂), 14.5 (CH₃).

HRMS (EI) : (M)⁺_{found} 448.19831; (M)⁺_{calcd} for C₂₄H₂₆N₄O₅ 448.19793.

***N*-(decyl)-*N'*-(ethoxycarbonyl)-*N''*-[1,4-dihydro-3*H*-[1,3]oxazino[4,5-*c*]acridin-3-one-10-yl] guanidine (**31**)**



Prepared according to the method A from thiourea **29** (10 mg, 0.025 mmol), decylamine (6 μ L, 0.03 mmol), EDCI (6 mg, 0.03 mmol), triethylamine (10 μ L, 0.07 mmol) and anhydrous DMF (1 mL) stirred for 80 min. After filtration and washing with water, the desired guanidine **31** (13 mg, 99%) was obtained as a brown solid.

An analytical sample was purified by chromatography on silica gel (elution with a mixture of AcOEt/ CH₂Cl₂ 1:1).

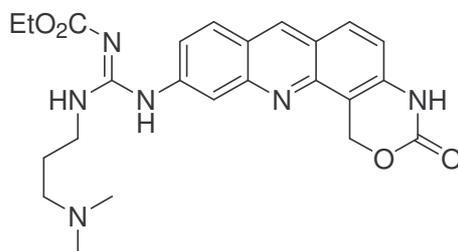
Mp: >350°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10.50 (s, 1H, NH), 8.93 (s, 1H, H-7), 8.09-8.03 (m, 3H, H-9, H-6, H-8), 7.68 (br s, 1H, H-11), 7.22 (d, 1H, *J* = 9,3 Hz, H-5), 5.95 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 3.97 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, CO₂CH₂), 3.37 (br s, 2H, CH₂), 1.57 (br s, 2H, CH₂), 1.32-1.15 (m, 17H, 6xCH₂ and 1xCO₂CH₂CH₃), 0.84 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 163.4 (CO), 157.9 (CN), 151.1 (C-3), 149.2 (C-11a), 144.8 (C-12a), 140.9 (C-10), 137.5 (C-4a), 136.3 (C-7), 130.0 (C-6 or C-8), 128.7 (C-8 or C-6), 123.0 (C-11), 122.3 (C-6a), 122.2 (C-7a), 117.4 (C-9), 115.7 (C-5), 108.6 (C-12b), 66.1 (C-1), 59.9 (CH₂), 41.1 (CH₂), 31.2 (CH₂), 28.9-28.6 (5xCH₂), 26.2 (CH₂), 22.0 (CH₂), 14.5 (CH₃), 13.9 (CH₃).

HRMS (EI) : (M)⁺_{found} 520.2920; (M)⁺_{calcd} for C₂₉H₃₈N₅O₄ 520.2918.

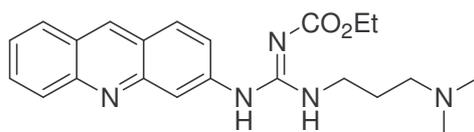
***N*-[3-(dimethylamino)-propyl]-*N'*-(ethoxycarbonyl)-*N''*-[1,4-dihydro-3*H*-[1,3]oxazino[4,5-*c*]acridin-3-one-10-yl] guanidine (**32**)**



Prepared according to the method A from thiourea **29** (114 mg, 0.29 mmol), 3-(dimethylamino)propylamine (54 μ L, 0.43 mmol), EDCI (83 mg, 0.43 mmol), triethylamine (120 μ L, 0.86 mmol) and anhydrous DMF (55 mL) stirred overnight. After filtration and washing with water the guanidine **32** (101 mg, 76%) was obtained as a brown solid.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.50 (s, 1H, NH), 8.92 (s, 1H, H-7), 8.08-8.03 (m, 3H, H-6, H-8, H-9), 7.57 (br s, 1H, H-11), 7.21 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-6), 5.95 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 4.02 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH₂), 3.43 (br s, 2H, CH₂), 2.35 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, CH₂), 2.17 (s, 6H, 2x CH₃), 1.73 (quintet, 2H, $J = 6.4$ Hz, CH₂), 1.19 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₃).

***N*-[3-(dimethylamino)-propyl]-*N'*-(ethoxycarbonyl)-*N''*-(acridin-3-yl)guanidine (**44**)**



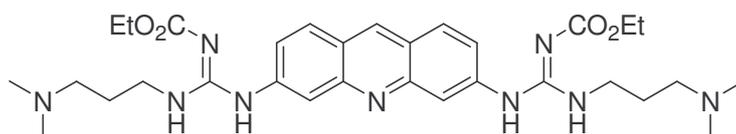
Prepared according to the method B, described above, from thiourea **42** (298 mg, 0.84 mmol), 3-(dimethylamino)propylamine (140 μ L, 1.1 mmol), EDCI (211 mg, 1.1 mmol), DBU (150 μ L, 1 mmol) and anhydrous DMF (5 mL) and stirred for 2h.

The crude product obtained was purified by chromatography on neutral alumina with mixture of AcOEt/MeOH/aq.NH₄OH (99:0.99:0.01) as eluant. The purified product was thus obtained as [PF₆]⁻ salt and was then passed through a Cl⁻ ion exchange resin to give the desired chlorhydrated product **44** (139 mg, 36%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) of **44** as PF₆ salt : δ 9.04 (s, 1H, H-9), 8.15-8.08 (m, 3H, H-1, H-8, H-5), 7.98 (br s, 1H, H-4), 7.85-7.81 (m, 1H, H-6), 7.60-7.51 (m, 2H, H-2, H-7), 4.27 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH₂), 3.42-3.39 (m, 2H, CH₂), 3.03 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH₂), 2.73 (s, 6H, 2xCH₃), 1.95-1.86 (quintet, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH₂), 1.17 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) of **44** as PF₆ salt : δ 161.9 (CO), 156.6 (CN), 149.2 (C-9b), 148.8 (C-10a), 141.0 (C-3), 136.1 (C-9), 130.9 (C-6), 129.5 (C-1), 128.7 (C-8), 128.5 (C-5), 125.9 (C-8a), 125.5 (C-7), 124.2 (C-2), 123.9 (C-9a), 119.0 (C-4), 60.4 (CH₂), 54.5 (CH₂), 42.7 (2xCH₃), 38.1 (CH₂), 24.9 (CH₂), 14.6 (CH₃).

3,6-bis[3-(dimethylaminopropyl)guanidino]acridine (**45**)

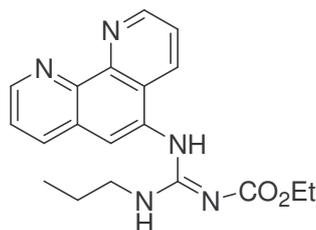


Prepared according to the method B described above, from thiourea **43** (539 mg, 1.14 mmol), 3-(dimethylamino)propylamine (317 μ L, 2.52 mmol), EDCI (482 mg, 2.52 mmol), DBU (376 μ L, 2.52 mmol) and anhydrous DMF (15 mL) and stirred for 2h.

The crude product was purified by chromatography on neutral alumina with mixture of AcOEt/MeOH/aq.NH₄OH (99:0.99:0.01) as eluant. The purified product was thus obtained as [PF₆]⁻ salt and was then passed through a Cl⁻ ion exchange resin to give the desired chlorhydrated product **45** (139 mg, 20%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) of **45** as PF₆ salt : δ 9.9 (s, 1H, H-9), 8.5 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz, H-1 and H-8), 8.3 (s, 2H, H-4 and H-5), 7.9 (d, 2H, $J = 9.3$ Hz, H-2 and H-7), 4.2 (q, 4H, $J = 7.4$ Hz, 2xCH₂), 3.2 (t, 4H, $J = 7.2$ Hz, 2xCH₂), 2.8 (s, 12 H, 4xCH₃), 2.1 (t, 4H, $J = 7.2$ Hz, 2xCH₂), 1.2 (t, 6H, $J = 7.4$ Hz, 2xCH₃).

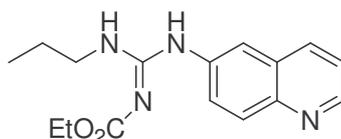
***N*-(propyl)-*N'*-(1,10-phenanthrolin-5-yl)-*N''*-(ethoxycarbonyl)guanidine (51)**



Prepared according to the method A from thiourea 50 (48 mg, 0.15 mmol), propylamine (15 μ L, 0.18 mmol), EDCI (34 mg, 0.18 mmol), triethylamine (61 μ L, 0.44 mmol) and anhydrous DMF (2 mL) during 70 mn. After treatment, the precipitate was washed with acetone to give the desired guanidine 51 (27 mg, 52%) as a white solid.

^1H NMR (300 MHz, CD_3COOD , D_2O) : δ 9.29-9.27 (m, 2H, H-9, H-2), 8.91-8.83 (m, 2H, H-7, H-4), 8.20 (br s, 1H, H-6), 8.13-8.06 (m, 2H, H-2, H-8), 4.20 (br s, 2H, CH_2), 3.48 (br s, 2H, CH_2), 1.76 (br s, 2H, CH_2), 1.07 (br s, 3H, CH_3), 0.97 (br s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3COOD , D_2O) : δ 154.3 (Cquat), 152.5 (Cquat), 149.5 (CH), 147.7 (CH), 141.3 (CH), 140.90 (Cquat), 139.0 (Cquat), 135.6 (CH), 132.7 (Cquat), 129.3 (Cquat), 127.4 (Cquat), 125.5 (CH), 125.4 (CH), 124.3 (CH), 63.7 (CH_2), 44.6 (CH_2), 21.6 (CH_2), 13.1 (CH_3), 10.2 (CH_3).

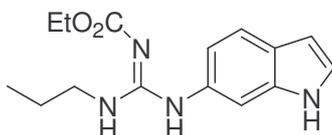
***N*-(propyl)-*N'*-(quinolin-6-yl)-*N''*-(ethoxycarbonyl)guanidine (56)**

Prepared according to the method C from 6-aminoindole (145 mg, 1 mmol), Ethyl isothiocyanatoformate (135 μ l, 1.2 mmol), propylamine (166 μ l, 2 mmol), EDCI (229 mg, 1.2 mmol), triethylamine (416 μ l, 3 mmol) and CH_2Cl_2 (10 mL), stirred at room temperature for 1h30 and at 60°C for 6h (after formation of the intermediate thiourea). When the reaction was completed the solution was extracted with CH_2Cl_2 and the combined organic layers were evaporated to give the desired guanidine 56 (>90%) as an oil.

The guanidines 56 were used in the next step without further purification. An analytical sample was purified by chromatography on silica gel (elution with ether).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : δ 8.62 (d, 1H, $J= 3.5$ Hz, Har.), 7.88 (d, 1H, $J= 8.2$ Hz, Har.), 7.82 (d, 1H, $J= 8.9$ Hz, Har.), 7.44-7.38 (m, 2H, 2xHar.), 7.20 (dd, 1H, $J= 4.2, 8.3$ Hz, Har.), 4.05 (q, 2H, $J= 7.1$ Hz, CH_2), 3.29-3.24 (m, 2H, CH_2), 1.55-1.48 (m, 2H, CH_2), 1.11 (t, 3H, $J= 7.2$ Hz, CH_3), 0.81 (t, 3H, $J= 7.6$ Hz, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : δ 164.7, 158.7, 150.4, 146.3, 135.5, 131.5, 129.0, 127.7, 121.9, 61.3, 43.1, 22.7, 14.7, 11.4.

***N*-(propyl)-*N'*-(indolin-6-yl)-*N''*-(ethoxycarbonyl)guanidine (57)**

Prepared according to the method C from 6-aminoindole (130 mg, 1 mmol), Ethyl isothiocyanatoformate (135 μ l, 1.2 mmol), propylamine (166 μ l, 2 mmol), EDCI (229 mg, 1.2 mmol), triethylamine (416 μ l, 3 mmol) and CH_2Cl_2 (10 mL) and stirred at room temperature

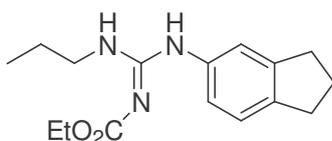
for 7h30. When the reaction was completed, the solution was diluted with water and then filtered to give the desired guanidine **57** (241 mg, 85%).

The guanidines **57** were used in the next step without further purification.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ 10.56 (br s, 1H, NH), 9.45 (s, 1H, NH), 7.56 (d, 1H, $J= 8.3$ Hz, Har.), 7.23-7.20 (m, 2H, 2xHar.), 7.86 (dd, 1H, $J= 1.7, 8.3$ Hz, Har.), 6.47 (br s, 1H, Har.), 4.73 (br s, 1H, NH), 4.12 (q, 2H, $J= 7.1$ Hz, CH₂), 3.24-3.17 (m, 2H, CH₂), 1.30 (sextet, 2H, $J= 7.3$ Hz, CH₂), 1.25 (t, 3H, $J= 7.1$ Hz, CH₃), 0.71 (t, 3H, $J= 7.3$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ 164.5, 159.8, 136.4, 129.6, 127.3, 126.1, 122.0, 118.5, 109.7, 102.3, 61.0, 43.0, 22.8, 14.8, 11.3.

***N*-(propyl)-*N'*-(indan-5-yl)-*N''*-(ethoxycarbonyl)guanidine (**58**)**



Prepared according to the method C from 5-aminoindane (130 mg, 1 mmol), Ethyl isothiocyanatoformate (135 μ l, 1.2 mmol), propylamine (166 μ l, 2 mmol), EDCI (229 mg, 1.2 mmol), triethylamine (416 μ l, 3 mmol) and CH₂Cl₂ (10 mL), stirred at room temperature for 7h30. When the reaction was completed the solution was extracted with CH₂Cl₂ and the combined organic layers were evaporated to give the desired guanidine **58** (>90%) as an oil. The guanidines **58** were used in the next step without further purification

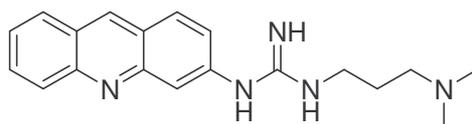
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ 10.53 (br s, 1H, NH), 7.23 (d, 1H, $J= 7.8$ Hz, Har.), 7.05 (s, 1H, Har.), 6.96 (d, 1H, $J= 7.8$ Hz, Har.), 4.81 (br s, 1H, NH), 4.15 (q, 2H, $J= 7.2$ Hz, CH₂), 3.33 (q, 2H, $J= 7.2$ Hz, CH₂), 2.91 (t, 4H, $J= 7.5$ Hz, 2xCH₂), 2.11 (quintet, 2H, $J= 7.5$ Hz, CH₂), 1.50 (sextet, 2H, $J= 7.2$ Hz, CH₂), 1.32 (t, 3H, $J= 7.2$ Hz, CH₃), 0.88 (t, 3H, $J= 7.5$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ 164.5, 159.2, 146.4, 143.3, 134.0, 125.5, 123.8, 122.1, 60.7, 42.8, 22.8, 14.7, 11.2.

General procedure for deprotection of guanidine derivatives

The protected guanidine was solubilized in a mixture of THF/ 0.4N aq. NaOH and the mixture was stirred at 60°C. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed, the solution was diluted with a large volume of AcOEt and the aqueous phase was extracted three times with AcOEt. The combined organic layers were washed with water until neutral pH and brine. After drying over magnesium sulfate, the organic phase was evaporated under reduced pressure. The desired compound was purified by washing with diethylether and pentane.

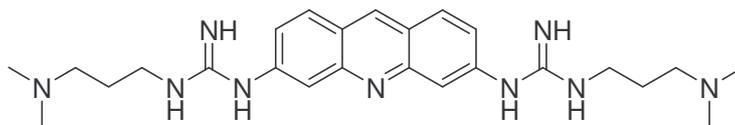
N-[3-(dimethylamino)-propyl]-*N'*-(acridin-3-yl)guanidine (**46**)



Prepared according to the general procedure described above, from the protected guanidine **44**•3HCl (100 mg, 0.20 mmol) in a mixture of THF (3 mL) and aq. NaOH 0.4N (3 mL) and the solution was stirred at 60°C for 36 h. The end of reaction was determined by HPLC and the solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting residue was then poured into AcOEt and the precipitate was filtered, washed with acetonitrile. The compound **46** was thus obtained (31 mg, 48%) as a hygroscopic solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 9.05 (s, 1H, H-9), 8.19-8.08 (m, 4H, 4xHar.), 7.86-7.81 (m, 1H, Har.), 7.61-7.58 (m, 2H, 2xHar.), 3.33 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, CH₂), 2.36 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz, CH₂), 2.18 (s, 6H, 2xCH₃), 1.75-1.70 (m, 2H, CH₂).

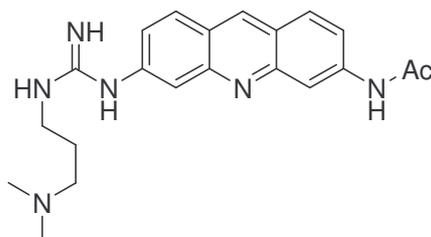
SM (ESI) : $m/z = 322.1$ ((M+H)⁺)

3,6-bis[3-(dimethylaminopropyl)guanidino]acridine (47)

Prepared according to the general procedure described above, from the protected guanidine **45**·5HCl (139 mg, 0.18 mmol) in a mixture of THF (3 mL) and aq. NaOH 0.4N (3 mL) and the solution was stirred at 60°C for 36 h. The end of reaction was determined by HPLC and the solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting residue was then poured into AcOEt and the precipitate was filtered, washed with acetonitrile. The compound **46** was thus obtained (40 mg, 49%) as a hygroscopic solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 9.63 (s, 1H, H-9), 8.42 (d, 2H, $J = 9.3$ Hz, H-1, H-8), 7.91 (s, 2H, H-4, H-5), 7.69 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, H-2, H-7), 3.43-3.38 (m, 4H, 2xCH₂), 3.15 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz, 2xCH₂), 2.81 (s, 12H, 4xCH₃), 2.01-1.99 (m, 4H, 2xCH₂).

SM (ESI) : $m/z = 464.3$ ((M+H)⁺)

***N*-(3-acetylacridin-6-yl)-*N'*-[3-(*N,N*-dimethylamino)propyl]guanidine (48)**

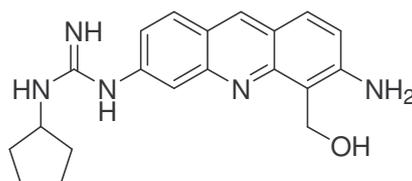
The protected guanidine **10** (20 mg, 0.04 mmol) was solubilized in anhydrous DMF (1 mL) and Me₃SiBr (0.2 mmol) was added to the solution stirred at 80°C. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed, the solvent was removed under reduced pressure. The resulting residue was then poured into diethylether and a minimum volume of EtOH was added. The mixture was sonicated and then filtered to give the desired compound **48** (24 mg, 87%) as HBr salt.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆ + D₂O) of **48** as HBr salt : δ 9.45 (s, 1H, H-9), 8.79 (s, 1H, H-4 or H-5), 8.34 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz, H-1 or H-8), 8.29 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz, H-1 or H-8), 7.84 (s,

1H, H-4 or H-5), 7.66-7.58 (m, 2H, H-2, H-7), 3.38 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz, CH₂), 3.13 (t, 2H, $J = 7.8$ Hz, CH₂), 2.78 (s, 6H, 2xCH₃), 2.19 (s, 3H, CH₃), 1.99 (quintet, 2H, $J = 7.8$ Hz, CH₂).

SM (ESI): $m/z = 379.1 ((M+H)^+)$

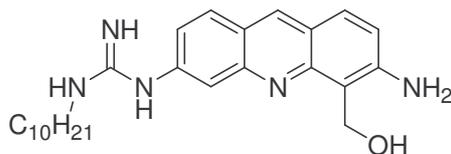
***N*-(cyclopentyl)-*N'*-[3-amino-4-hydroxymethylacridin-6-yl]guanidine (**33**)**



The compound **30** (34 mg, 0.08 mmol) was dissolved in a mixture of THF (8.5 mL) and aq. NaOH 0.4N (5 mL) and the solution was stirred at 60°C during three days. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed, a large volume of AcOEt was added at room temperature. The organic phase was then separated and washed with brine until neutral pH. After drying over magnesium sulfate, the organic solvent was removed under reduced pressure. The desired product **33** (22 mg, 83%) was thus obtained as a brown solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8.59 (s, 1H, H-9), 7.87 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-8), 7.76 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, H-1), 7.35 (br s, 1H, H-5), 7.11-7.08 (m, 2H, H-2, H-7), 5.97 (s, 2H, NH₂), 5.21 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 4.10 (m, 1H, CH), 2.04-1.93 (br s, 2H, CH₂), 1.58-1.52 (br s, 6H, 3xCH₂),

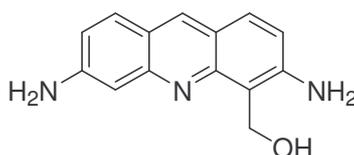
MS (ESI) : $m/z = 350.0 ((M+H)^+)$

***N*-(decyl)-*N'*-[3-amino-4-hydroxymethylacridin-6-yl]guanidine (**34**)**

The compound **31** (31 mg, 0.06 mmol) was dissolved in a mixture of THF (7.5 mL) and aq. NaOH 0.4N (4.5 mL) and the solution was stirred at 60°C during five days. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed, a large volume of AcOEt was added at room temperature. The organic phase was then separated and washed with brine until neutral pH. After drying over magnesium sulfate, the organic solvent was removed under reduced pressure and the resulting residue was washed with diethylether. The desired product **34** (13 mg, 52%) was thus obtained as a brown solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.63 (s, 1H, H-9), 7.94 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H-8), 7.76 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-1), 7.54 (s, 1H, H-5), 7.18-7.10 (m, 2H, H-2, H-7), 6.04 (s, 2H, NH₂), 5.18 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 3.37 (br s, 2H, CH₂), 1.56 (br s, 2H, CH₂), 1.26 (br s, 14H, 7xCH₂), 0.86 (br s, 3H, CH₃).

MS (ESI) : *m/z* = 422.1 ((M+H)⁺)

3-amino-4-hydroxymethyl-6-aminoacridine (36**)**

The compound **24** (80 mg, 0.30 mmol) was dissolved in a mixture of THF (26 mL) and aq. NaOH 0.4N (6 mL) and the solution was stirred at 60°C overnight. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed, a large volume of AcOEt was added at room temperature. The organic phase was then separated and washed with brine until neutral pH. After drying over magnesium sulfate, the organic solvent was removed under

reduced pressure. The resulting residue was washed with a mixture of pentane/diethylether 1:1. The desired product **36** (70 mg, 97%) was thus obtained as a brown solid.

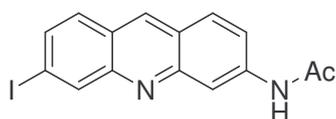
Mp : >350°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8.35 (s, 1H, H-9), 7.64 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H-8), 7.59 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H-1), 6.91 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H-2), 6.8 (dd, 1H, *J* = 2.1, 8.8 Hz, H-7), 6.80 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H-5), 5.84 (br s, 2H, NH₂), 5.79 (br s, 2H, NH₂), 5.09 (s, 2H, Ar-CH₂-O).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 150.7 (C-6), 149.9 (C-10a), 148.9 (C-9b), 148.0 (C-3), 135.4 (C-9); 129.2 (C-8); 128.4 (C-1); 118.3 (C-9a); 118.2 (C-2 or C-7), 118.0 (C-2 or C-7), 117.9 (C-8a), 111.1 (C-4), 103.0 (C-5), 55.8 (CH₂).

HRMS (EI) : (M)⁺_{found} 240.1132; (M)⁺_{calcd} for C₁₄H₁₄O₁N₃ 240.1131.

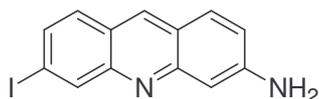
3-acetylamino-6-iodoacridine (**38**)



3-acetylamino-6-aminoacridine **6** (502 mg, 1.99 mmol) was dissolved in 1N H₂SO₄ (10 mL) and cooled to 0°C in an ice bath. NaNO₂ (276 mg, 4 mmol in 2 mL of cold water) was added and the mixture was stirred for 15 min at 0°C. Urea (240 mg, 4 mmol in 2 mL of cold water), diisopropyl ether (2 mL) and NaI (150 mg, 3 mmol in 3 mL of water) were added and the mixture was allowed to warm to room temperature under stirring. The excess iodide was eliminated by 5 mL of 2M Na₂S₂O₃ and the solution was basified with 1N aq. NaOH before being extracted three times with ethyl acetate. The organic phase was washed with water and brine, dried over magnesium sulphate and evaporated under reduced pressure. The crude product was then purified by chromatography on silica gel, with ethyl acetate as eluant. The desired product **38** (194 mg, 27%) was thus obtained as a brown solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10.42 (s, 1H, NH), 9.01 (s, 1H, H-9), 8.58 (s, 1H, H-4), 8.53 (s, 1H, H-5), 8.10 (d, 1H, *J* = 9 Hz, H-1), 7.92 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-8), 7.80 (dd, 1H, *J* = 1.5, 8.7 Hz, H-2), 7.67 (dd, 1H, *J* = 2.1, 9.0 Hz, H-7), 2.17 (s, 3H, CH₃).

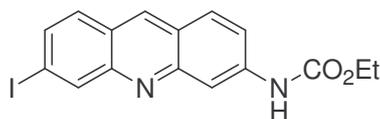
3-amino-6-iodoacridine (**37**)



3-acetylamino-6-iodoacridine **38** (99 mg, 0.27 mmol) was suspended in 6N HCl (10 mL) and stirred at 80°C for 24 h. The reaction was monitored by HPLC and the mixture was allowed to cool to room temperature before being poured over 100 g of ice. The solution was basified with aq. NH₄OH. The precipitate was filtered and washed with water until neutral pH. The filtrate was extracted three times with AcOEt. The organic phase was washed with water and brine, dried over magnesium sulphate and evaporated to dryness. The products thus obtained were combined to give the desired product **37** (86 mg, 98%) as a brown solid.

The ¹H NMR spectra of this molecule corresponded with that previously described by Martin and Kelly⁷⁴.

3-ethoxycarbonylamino-6-iodoacridine (**39**)



Ethyl chloroformate (400 μ L, 4.18 mmol) was added dropwise to a solution of 6-iodo-3-aminoacridine **37** (130 mg, 0.41 mmol) in pyridine (7 mL) cooled at 0°C. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed after 3h of stirring, pyridine was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in aqueous NH₄OH and the resulting precipitate was filtered, washed with water until the filtrate showed a neutral pH. The compound **39** (141 mg, 89%) was thus obtained as a brown solid.

An analytical sample was purified by chromatography on silica gel, with AcOEt as eluant.

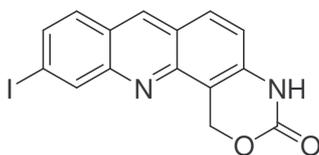
Mp : 145-148°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10.18 (s, 1H, NH), 8.97 (s, 1H, H-9), 8.52 (s, 1H, H-5), 8.32 (s, 1H, H-4), 8.07 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz, H-1), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H-8), 7.78 (dd, 1H, *J* = 1.6, 8.8 Hz, H-7), 7.68 (dd, 1H, *J* = 2.1, 9.1 Hz, H-2), 4.23 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 1.31 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 153.5 (C=O), 149.7 (C-4a), 149.1 (C-10a), 141.6 (C-3), 136.8 (C-5), 136.3 (C-9), 133.0 (C-7), 130.0 (C-8), 129.3 (C-1), 124.0 (C-8a), 123.0 (C-9a), 120.9 (C-2), 112.3 (C-4), 98.1 (C-6), 60.6 (CH₂), 14.4 (CH₃).

HRMS (EI) : (M)⁺_{found} 393.00996; (M)⁺_{calcd} for C₁₆H₁₄O₂N₂I₁ 393.00945.

10-iodo-1,4-dihydro-3*H*-[1,3]oxazino[4,5-*c*]acridin-3-one (40)



3-Ethoxycarbonylamino-6-iodoacridine 39 (50 mg, 0.13 mmol) was dissolved in 99% methanesulfonic acid (5 mL) in presence of formaldehyde (37% aqueous solution, 91 μ L, 1.09 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 5 h and then heated at 70°C for a further 12 h. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed, the mixture was allowed to cool to room temperature before being poured over 100 g of ice. The solution was carefully basified with aq. NH₄OH and extracted three times with AcOEt. The combined organic layers were washed with water until neutral pH, and then brine, dried over magnesium sulphate and evaporated under reduced pressure. This crude product was chromatographed on silica gel with a mixture of AcOEt/CH₂Cl₂ 1:1 as eluant. The desired product 40 (25 mg, 52%) was thus obtained as a brown solid.

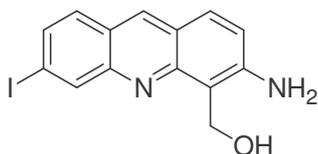
Mp : 244-247°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10.57 (s, 1H, NH), 9.02 (s, 1H, H-7), 8.48 (s, 1H, H-11), 8.09 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-6), 7.89 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H-8), 7.79 (dd, 1H, *J* = 1.6, 8.8 Hz, H-9), 7.28 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H-5), 5.91 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 150.9 (C-3), 148.7 (C-11a), 144.7 (C-12a), 138.2 (C-4a), 137.4 (C-7), 136.8 (C-11), 133.2 (C-9), 130.1 (C-6, C-8), 123.8 (C-7a), 123.0 (C-6a), 117.0 (C-5), 108.8 (C-12b), 98.9 (C-10), 66.0 (C-1).

HRMS (EI) : (M)⁺_{found} 376.97876; (M)⁺_{calcd} for C₁₅H₁₀O₂N₂I₁ 376.97815.

3-amino-4-hydroxymethyl-6-iodoacridine (**41**)



The compound **40** (33 mg, 0.09 mmol) was dissolved in a mixture of THF (10 mL) and aq. NaOH 0.4N (3 mL). The reaction mixture was stirred in the dark at 50 °C for 7 h before being heated at 60 °C for a further 3 h. It was then cooled to room temperature and left to stir over the weekend. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed, 50 mL of AcOEt was added to the solution. The aqueous phase was extracted twice with AcOEt. The combined organic layers were washed with water until neutral pH, and then brine. After drying over magnesium sulphate, the organic solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting residue was poured into a mixture of diethylether/pentane 1:1 and then filtered. The compound **41** (20 mg, 65%) was thus obtained as an orange solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8.71 (s, 1H, H-9), 8.38 (s, 1H, H-5), 7.79 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-1), 7.77 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H-8), 7.62 (dd, 1H, *J* = 1.6, 8.6 Hz, H-7), 7.19 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-2), 6.18 (s, 2H, NH₂), 5.18 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 149.4 (C-4a), 149.2 (C-3), 148.4 (C-10a), 136.4 (C-5), 135.9 (C-9), 131.2 (C-7), 129.9 (C-8), 128.6 (C-1), 122.3 (C-8a), 121.9 (C-2), 121.2 (C-9a), 111.5 (C-4), 97.1 (C-6), 55.0 (CH₂).

HRMS (EI) : (M)⁺_{found} 350.99926; (M)⁺_{calcd} for C₁₄H₁₂O₁N₂I₁ 350.99888.

General procedure for the synthesis of 2-alkylamino-4(3*H*)-quinazolinone derivatives

Method A (with Montmorillonite clay K-10)

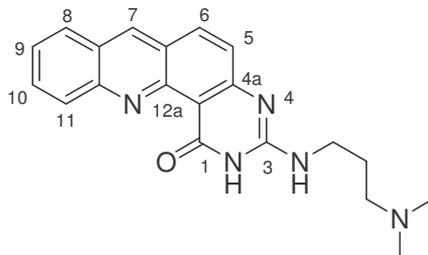
The protected guanidine (1 mmol) was solubilized in C₂H₄Cl₂ and Montmorillonite clay K-10 (167 mg) was added to the solution under stirring at 80°C. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed, the solution was filtered and the solid was washed successively with C₂H₄Cl₂ and DMF. The filtrate was removed under reduced pressure to give the desired product.

Method B (with a Lewis acid)

The protected guanidine (1 mmol) was solubilized in anhydrous DMF and the Lewis acid (1 to 5 mmol) was added to the solution stirred at 80°C. The reaction was monitored by HPLC. When the reaction was completed, the solvent was removed under reduced pressure. The resulting residue was then poured into diethylether and a minimum volume of EtOH was added. The mixture was sonicated and then filtered to give the desired compound as the hydrochloride.

3-(N,N-dimethylaminopropyl)amino-10-amino-2H-quinolino[2,3-f]quinazolin-4-one

(49)

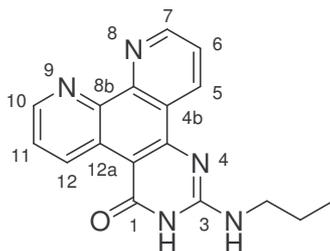


Prepared according to the *method B*, described above, from the protected guanidine **44**·3PF₆ (50 mg, 0.07 mmol), Me₃SiCl (47 μ l, 0.37 mmol) and anhydrous DMF (2 mL) stirred for 4h. After treatment, the compound **49**·2HCl (24 mg, 95%) was obtained as a brown gummy residue.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆ + D₂O) of **49** as PF₆ salt : δ 9.70 (s, 1H, H-7), 8.53 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-11), 8.44 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz, H-6, H-8), 8.26-8.21 (m, 1H, H-10), 7.94-7.89 (m, 1H, H-9), 7.60 (br d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-5), 3.58-3.63 (m, 2H, CH₂), 3.17-3.12 (m, 2H, CH₂), 2.80 (s, 6H, 2x CH₃), 1.99 (quintet, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆ + D₂O) of **49** as PF₆ salt : δ 163.4 (C-1), 161.0 (C-4a), 154.7 (C-3), 146.7 (C-7), 141.5 (C-12a), 136.9 (C-11a), 136.6 (C-10), 135.5 (C-6), 129.9 (C-8), 128.1 (C-5), 127.7 (C-9), 124.5 (C-7a), 122.8 (C-6a), 120.2 (C-11), 99.5 (C-12b), 54.4 (CH₂), 42.3 (2xCH₃), 37.8 (CH₂), 23.9 (CH₂).

HRMS (EI) : (M)⁺_{found} 348.18212; (M)⁺_{calcd} for C₂₀H₂₂O₁N₅ 348.18189.

3-propylamino-2H-dipyrido[3,2-f;2,3-h]quinazolin-1-one (52)

Prepared according to the *method B*, from the protected guanidine 51 (20 mg, 0.06 mmol), MeSiCl₃ (7 μl, 0.06 mmol) and anhydrous DMF (2 mL) and stirred for 1h.

After treatment, the compound 52·HCl (19 mg, 98%) was obtained as a yellow solid. The free base was obtained by an alkaline treatment.

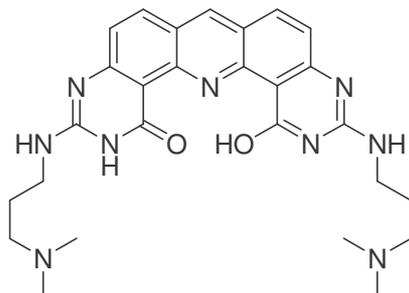
Mp of the free base 52 : >350°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆ + D₂O) of the free base 52 : δ 10.34 (dd, 1H, *J*= 1.3, 8.6 Hz, H-12), 9.33 (dd, 1H, *J*= 1.5, 8.3 Hz, H-5), 9.26 (dd, 1H, *J*= 1.6, 4.6 Hz, H-7), 8.94 (dd, 1H, *J*= 1.4, 5.1 Hz, H-10), 8.13 (dd, 1H, *J*= 5.1, 8.7 Hz, H-11), 8.07 (dd, 1H, *J*= 4.7, 8.3 Hz, H-6), 3.50 (t, 2H, *J*= 7.1 Hz, N-CH₂), 1.66 (sextet, 2H, *J*= 7.4 Hz, CH₂), 0.97 (t, 3H, *J*= 7.4 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆ + D₂O) of the free base 52 : δ 161.9 (C-1), 152.9 (C-3), 152.2 (C-4a), 151.6 (C-7), 141.7 (C-10), 141.5 (C-8a), 139.4 (C-12), 136.3 (C-5), 134.7 (C-8b), 128.6 (C-12a), 127.1 (C-4b), 126.1 (C-6), 125.7 (C-11), 103.3 (C-12b), 42.0 (N-CH₂), 22.1 (CH₂), 11.2 (CH₃).

HRMS (EI) : (M)+Na⁺_{found} 328.1171; (M)+Na⁺_{calcd} for C₁₇H₁₅O₁N₅ 328.1168.

1-hydroxy-3,11-bis(N,N-dimethylaminopropyl)-12H-bis-pyrimidino[6,5-c;5,6-h]acridin-3-one (54)

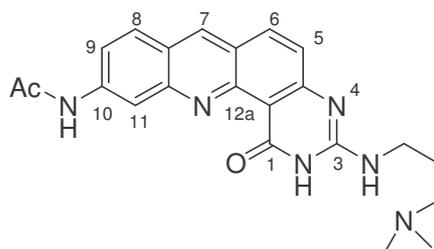


Prepared according to the *method B* from the protected guanidine **45·5PF6** (50 mg, 0.04 mmol), Me₃SiCl (54 μl, 0.43 mmol) and anhydrous DMF (2 mL) and stirred for 4h. After treatment, compound **54·4HCl** (24 mg, 97%) was obtained as a red solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆ + D₂O) : δ 9.33 (s, 1H, Har.), 8.29 (br s, 2H, Har.), 8.44 (br s, 2H, Har.), 3.20-3.16 (m, 4H, CH₂), 2.80 (s, 12H, 4xCH₃), 1.99 (m, 4H, CH₂).

HRMS (EI) : (M)⁺_{found} 516.28361; (M)⁺_{calcd} for C₂₇H₃₄O₂N₉ 516.28300.

10-acetamido-(N,N-dimethylaminopropyl)amino-10-amino-2H-quinolino[2,3-*f*]quinazolin-4-one (55)



Prepared according to the *method B* from the protected guanidine **10·3PF6** (20 mg, 0.02 mmol), MeSiCl₃ (32 μl, 0.27 mmol) and anhydrous DMF (1 mL) during 6h.

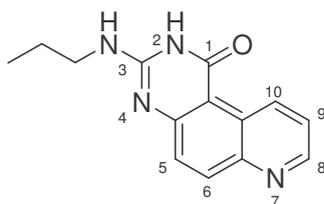
After treatment, the compound **55·2HCl** (9 mg, 84%) was obtained as a yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆/D₂O 1:1 (v/v)): δ 9.42 (s, 1H, H-7), 8.78 (s, 1H, H-11), 8.39-8.33 (m, 2H, H-6, H-8), 7.75 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H-9), 7.57 (br d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-5), 3.60

(br s, 2H, CH₂), 3.22-3.17 (m, 2H, CH₂), 2.85 (s, 6H, 2xCH₃), 2.26 (s, 3H, CH₃), 2.04 (quintet, 2H, CH₂).

MS (ESI) : m/z = ((M+H)⁺)

3-propylamino-2H-pyrido[3,2-f]quinazolin-1-one (59)

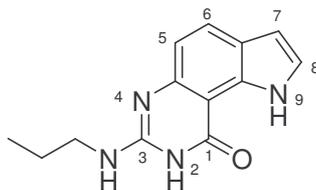


Prepared according to the *method B*, from the protected guanidine 56 (300 mg, 1 mmol), MeSiCl₃ (235 μL, 2 mmol) and anhydrous DMF (3 mL) and stirred for 2h. After cooling to room temperature, water was added and the mixture was evaporated under reduced pressure. The residue thus formed was diluted with water (5 ml), and the resulting acidic mixture was neutralized by adding aq. NH₄OH. The precipitate thus formed was filtered, washed with water and dried. The desired product 59 (223 mg, 88%) was thus obtained as a white solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 11.10 (br s, 1H, NH), 9.89 (d, 1H, *J*= 8.1 Hz, Har.), 8.76 (d, 1H, *J*= 2.8 Hz, Har.), 8.08 (d, 1H, *J*= 9.1 Hz, Har.), 7.60-7.56 (m, 2H, Har.), 6.55 (br s, 1H, NH), 1.59 (sextet, 2H, *J*= 7.4 Hz, CH₂), 0.93 (t, 3H, *J*= 7.4 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 162.5 (Cquat), 153.5 (Cquat), 152.0 (Cquat), 147.6 (CH), 144.6 (Cquat), 135.8 (CH), 132.6 (CH), 129.4 (CH), 126.8 (Cquat), 122.7 (CH), 107.6 (Cquat), 41.9 (CH₂), 22.2 (CH₂), 11.2 (CH₃).

HRMS (EI) : (M)⁺_{found} 255.12422; (M)⁺_{calcd} for C₁₄H₁₅O₁N₄ 255.12404.

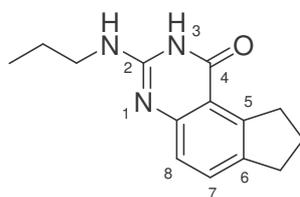
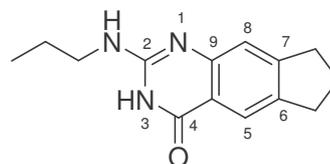
3-propylamino-2H-pyrrolo[2,3-f]quinazolin-1-one (60)

Prepared according to the *method B*, from the protected guanidine 57 (290 mg, 1 mmol), MeSiCl₃ (235 μ L, 2 mmol) and anhydrous DMF (3 mL) and stirred for 2h. After cooling to room temperature, water was added and the mixture was evaporated under reduced pressure. The residue thus formed was diluted with water (5 ml), and the resulting acidic mixture was neutralized by adding aq. NH₄OH. The precipitate thus formed was filtered, washed with water and dried. The desired product 60 (236 mg, 97%) was thus obtained as a white solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 11.11 (s, 1H, NH), 10.88 (br s, 1H, NH), 7.76 (d, 1H, *J*= 8.5 Hz, H-6 or H-5), 7.24-7.23 (m, 1H, H-7 or H-8), 6.96 (d, 1H, *J*= 8.5 Hz, H-6 or H-5), 6.48-6.46 (m, 1H, H-7 or H-8), 6.10 (br s, 1H, NH), 3.32-3.30 (m, 2H, CH₂), 1.58 (sextet, 2H, *J*= 7.2 Hz, CH₂), 0.93 (t, 3H, *J*= 7.4 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 162.1 (Cquat), 149.7 (Cquat), 148.2 (Cquat), 131.9 (Cquat), 127.2 (CH), 124.3 (CH), 122.3 (Cquat), 116.5 (CH), 102.4 (Cquat), 101.7 (CH), 42.0 (CH₂), 22.2 (CH₂), 11.3 (CH₃).

HRMS (EI) : (M)⁺_{found} 243.12420; (M)⁺_{calcd} for C₁₃H₁₅O₁N₄ 243.12404.

2-propylamino-3H-cyclopenta[f]quinazolin-4-one (61a, angular) and 2-propylamino-3H-cyclopenta[g]quinazolin-4-one (61b, linear)**61a****61b**

Prepared according to the *method B*, from the protected guanidine **58** (290 mg, 1 mmol), MeSiCl₃ (235 μL, 2 mmol) and anhydrous DMF (3 mL) and stirred for 2h. After cooling to room temperature, water was added and the mixture was evaporated under reduced pressure. The residue thus formed was diluted with water (5 ml), and the resulting acidic mixture was neutralized by adding aq. NH₄OH. The precipitate thus formed was filtered, washed with water and dried. The mixture product **61a/61b** (221 mg, 91%) was thus obtained.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) of the mixture product **61a/61b** : δ 7.72 (s, 1H, Har.), 7.46 (d, 1H, *J*= 8.1 Hz, Har.), 7.20 (s, 1H, Har.), 7.16 (d, 1H, *J*= 8.2 Hz, Har.), 2.93-2.80 (m, 8H, CH₂), 2.10-1.97 (m, 4H, CH₂), 1.57 (sextet, 4H, *J*= 7.3 Hz, CH₂), 0.93 (t, 6H, *J*= 7.4 Hz, CH₃).

HRMS (EI) (mixture 61a/61b) : (M)⁺_{found} 244.14462; (M)⁺_{calcd} for C₁₄H₁₈O₁N₃ 244.14444.

Références bibliographiques

- 1- Ferlay, J.; Autier, P.; Boniol, M.; Heanue, M.; Colembet, M.; Boyle, P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology*. **2006**, 18, 581-592.
- 2- Boyle, P.; Ferlay, J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Annals of Oncology*. **2005**, 16, 481-488.
- 3- Berthet, N.; Boturyn, D.; Constant, J.-F. DNA repair inhibitors. *Exp. Opin. Ther. Patents* **1999**, 9, 401-415.
- 4- O' Dwyer, P. J.; Johnson, S. W. Current status of oxaliplatin in colorectal cancer. *Semin. Oncol.* **2003**, 30, 78-87.
- 5- a) *Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers*. Lavoisier: Paris, 2003; Vol. 6, b) Calvo, F.; Bruzzonni-Giovanelli, H. nouvelles cibles moléculaires dans les traitements des cancers. *l'actualité chimique* **2003**, novembre, 150-153.
- 6- L'étude bibliographique portant sur les nouvelles cibles a été réalisée en grande partie à partir d'un article de Calvo F. et Bruzzoni-Giovanelli H., paru dans *l'Actualité Chimique* de novembre-décembre **2003**; et d'un livre « *Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers* » des éditions Tec&co (Vol 6, **2003**).
- 7- a) Knockaert, M.; Greengard, P.; Meijer, L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependant kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, 23, 417, b) Ruetz, S.; Fabbro, D.; Zimmerman, J.; Meyer, T.; Gray, N. Chemical and biological profile of dual Cdk1 and Cdk2 inhibitors. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2003**, 3, 1-14.
- 8- a) L'Allemain, G. Actualités sur...l'inhibiteur du protéasome PS341. *Bull. Cancer* **2002**, 89, 29-30, b) Vorhees, P. M.; Dees, E. C.; O' Neil, B.; Orłowski, R. Z. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **2003**, 9, 6316-6325.
- 9- Bettaieb, A.; Dubrez-Daloz, L.; Launay, S.; Plenchette, S.; Rebe, C.; Cathelin, S.; Solary, E. Bcl-2 proteins: targets and tools for chemosensibilisation of tumour cells. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2003**, 3, 307-318.
- 10- Witton, C. J.; Reeves, J. R.; Going, J. J.; Cooke, T. G.; Bartlett, J. M. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J. Pathol.* **2003**, 200, 290-297.
- 11- Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.; Pegram, M.; Baselga, J.; Norton, L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* **2001**, 344, 783-792.
- 12- Garanger, E. Conception, synthèse et caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation pour la cancérologie. Université Joseph Fourier, Grenoble, 2005.
- 13- Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **1971**, 285, 1182-1186.

- 14- Burger, A. M.; Dai, F.; Schultes, C. M.; Reszka, A. P.; Moore, M. J.; Neidle, S. A G-quadruplex binding telomerase inhibitor with in vivo anticancer activity. *Cancer Research* **2005**, *65*, 1489-1496.
- 15- Neidle, S.; Parkinson, G. Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. *Nature Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 383-393.
- 16- a) Belmont, P.; Bosson, J.; Godet, T.; Tiano, M. Acridine and acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: Where are we now? *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* **2007**, *7*, 139-169, b) Demeunynck, M. Antitumour acridines. *Exp. Opin. Ther. Patents* **2004**, *14*, 55-70, c) Denny, W. A. Acridine-based antitumour agents. In *Chemistry of antitumour agents*, Wilman, D. E. V., Ed. Blackie and son Ltd: Glasgow and London, 1990; pp 1-29.
- 17- Liu, L. F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 351-375.
- 18- Denny, W. A.; Cain, B. F.; Atwell, G. J.; Hansch, C.; Panthanickal, A.; Leo, A. Potential antitumor agents. 36. Quantitative relationships between experimental antitumor activity, toxicity, and structure for the general class of 9-anilinoacridine antitumor agents. *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 276-315.
- 19- Robinson, M. J.; Osheroff, N. Stabilization of the topoisomerase II-DNA cleavage complex by antineoplastic drugs: inhibition of enzyme-mediated DNA religation by 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-*m*-anisidine. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2511-2515.
- 20- Finlay, G. J.; Atwell, G. J.; Baguley, B. C. Inhibition of the action of the topoisomerase II poison amsacrine by simple aniline derivatives: evidence for drug-protein interactions. *Oncol. Res.* **1999**, *11*, 249-254.
- 21- a) Harvey, V. J.; Hardy, J. R.; Smith, S.; Grove, W.; Baguley, B. C. Phase II study of the amsacrine analogue CI-921 (NSC 343499) in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* **1991**, *27*, 1617-1620, b) Sklarin, N. T.; Wiernik, P. H.; Grove, W. R.; Benson, L.; Mittelman, A.; Maroun, J. A.; Stewart, J. A.; Robert, F.; Doroshow, J. H.; Rosen, P. J.; et al. A phase II trial of CI-921 in advanced malignancies. *Invest New Drugs* **1992**, *10*, 309-312.
- 22- a) Su, T. L. Development of DNA topoisomerase II-mediated anticancer agents, 3-(9-acridinylamino)-5-hydroxymethylanilines (AHMAs) and related compounds. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 1677-1688, b) Su, T. L.; Chen, C. H.; Huang, L. F.; Basu, M. K.; Zhang, X. G.; Chou, T. C. Synthesis and structure-activity relationships of potential anticancer agents: alkylcarbamates of 3-(9-acridinylamino)-5-hydroxymethylaniline. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4741-4748.
- 23- a) Atwell, G. J.; Rewcastle, G. W.; Baguley, B. C.; Denny, W. A. Potential antitumor agents. 50. In vivo solid-tumor activity of derivatives of *N*-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 664-669, b) Denny, W. A.; Atwell, G. J.; Rewcastle, G. W.; Baguley, B. C. Potential antitumor agents. 49. 5-Substituted derivatives of *N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-9-aminoacridine-4-carboxamide with in vivo solid-tumor activity. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 658-663.

- 24- a) Schofield, P. C.; Robertson, I. G.; Paxton, J. W.; McCrystal, M. R.; Evans, B. D.; Kestell, P.; Baguley, B. C. Metabolism of *N*-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide in cancer patients undergoing a phase I clinical trial. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1999**, *44*, 51-58, b) Twelves, C. J.; Gardner, C.; Flavin, A.; Sludden, J.; Dennis, I.; de Bono, J.; Beale, P.; Vasey, P.; Hutchison, C.; Macham, M. A.; Rodriguez, A.; Judson, I.; Bleehen, N. M. Phase I and pharmacokinetic study of DACA (XR5000): a novel inhibitor of topoisomerase I and II. *Br. J. Cancer* **1999**, *80*, 1786-1791.
- 25- a) Harrison, R. J.; Gowan, S. M.; Kelland, L. R.; Neidle, S. Human telomerase inhibition by substituted acridine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2463-2468, b) Read, M.; Harrison, R. J.; Romagnoli, B.; Tanious, F. A.; Gowan, S. H.; Reszka, A. P.; Wilson, W. D.; Kelland, L. R.; Neidle, S. Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 4844-4849.
- 26- Hannun, Y. A.; Bell, R. M. Aminoacridines, potent inhibitors of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 5124-5231.
- 27- a) Kohn, K. W.; Orr, A.; O'Connor, P. M. Synthesis and DNA-sequence selectivity of a series of mono- and difunctional 9-aminoacridine nitrogen mustards. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 67-72, b) Konakahara, T.; Wurdeman, R. L.; Gold, B. Synthesis of an *N*-methyl-*N*-nitrosourea linked to a methidium chloride analogue and its reactions with 32P-end-labeled DNA. *Biochemistry* **1988**, *27*, 8606-8613, c) Mehta, P.; Church, K.; Williams, J.; Chen, F.-X.; Encell, L.; Shuker, D. E. G.; Gold, B. The design of agents to control DNA methylation adducts. Enhanced major groove methylation of DNA by an *N*-methyl-*N*-nitrosourea functionalized phenyl Neutral Red intercalator. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 939-948, d) Sundquist, W. J.; Bancroft, D. P.; Lippard, S. J. Synthesis, characterization, and biological activity of cis-diammineplatinum(II) complexes of the DNA intercalators 9-aminoacridine and chloroquine. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1590-1596, c) Takahashi, K.; Ciszewska, G.; Watanabe, K. A. Potential anticancer agents derived from acridine. Intercalating agents with covalent bond forming capabilities. *3. Drugs of the Future* **1990**, *15*, 605-610, d) Wickham, G.; Prakash, A. S.; Wakelin, L. P. G.; McFadyen, W. D. DNA-binding properties and antitumor activity of monofunctional alkylating groups attached to the DNA-intercalating chromophore phenanthridine: *n*-bromoalkylphenanthridinium bromides. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1073*, 528-537.
- 28- Gourdie, T. A.; Prakash, A. S.; Wakelin, L. P. G.; Woodgate, P. D.; Denny, W. A. Synthesis and evaluation of DNA-targeted spatially separated bis(aniline mustards) as potential alkylating agents with enhanced DNA cross-linking capability. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 240-248.
- 29- Ackley, M. C.; Barry, C. G.; Mounce, A. M.; Farmer, M. C.; Springer, B.-E.; Day, C. S.; Wright, M. W.; Berners-Price, S. J.; Hess, S. M.; Bierbach, U. Structure-activity relationships in platinum-acridinylthiourea conjugates: effect of the thiourea nonleaving group on drug stability, nucleobase affinity, and in vitro cytotoxicity. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 453-461.

- 30- Tillequin, F.; Michel, S.; Skaltsounis, A.-L. Acronycine-type alkaloids: chemistry and biology. In *Alkaloids: chemical and biological properties*, Pelletier, S. W., Ed. Pergamon: Oxford, 1998; Vol. 12, pp 1-102.
- 31- a) Costes, N.; Le Deit, H.; Michel, S.; Tillequin, F.; Koch, M.; Pfeiffer, B.; Renard, P.; Léonce, S.; Guilbaud, N.; Kraus-Berthier, L.; Pierré, A.; Atassi, G. Synthesis and cytotoxic and antitumor activity of benzo[*b*]pyrano[3,2-*h*]acridin-7-one analogue of acronycine. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2395-2402, b) Elomri, A.; Mitaku, S.; Michel, S.; Skaltsounis, A.-L.; Tillequin, F.; Koch, M.; Pierré, A.; Guilbaud, N.; Léonce, S.; Kraus-Berthier, L.; Rolland, Y.; Atassi, G. Synthesis and cytotoxic and antitumor activity of esters in the 1,2-dihydroxy-1,2-dihydroacronycine series. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 4762-4766.
- 32- Costes, N.; Le Deit, H.; Michel, S.; Tillequin, F.; Koch, M.; Pfeiffer, B.; Renard, P.; Léonce, S.; Guilbaud, N.; Kraus-Berthier, L.; Pierré, A.; Atassi, G. Synthesis and cytotoxic and antitumor activity of benzo[*b*]pyrano[3,2-*h*]acridin-7-one analogue of acronycine. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2395-2402.
- 33- a) Charmantray, F.; Demeunynck, M.; Carrez, D.; Croisy, A.; Lansiaux, A.; Bailly, C.; Colson, P. 4-Hydroxymethyl-3-aminoacridine derivatives as a new family of anticancer agents. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 967-977, b) Charmantray, F.; Duflos, A.; Lhomme, J.; Demeunynck, M. Synthesis and study of 4-hydroxymethyl-3-alkylaminoacridines as models of a new class of DNA intercalating-alkylating agents. *J. Chem. Soc, Perkin Trans. I* **2001**, 2962-2968.
- 34- Asche, C.; Dumy, P.; Carrez, D.; Croisy, A.; Demeunynck, M. Nitrobenzylcarbamate prodrugs of cytotoxic acridines for potential use with nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1990-1994.
- 35- Ouberaï, M.; Asche, C.; Carrez, D.; Croisy, A.; Dumy, P.; Demeunynck, M. 3,4-Dihydro-1*H*-[1,3]oxazino[4,5-*c*]acridines as a new family of cytotoxic drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4641-4643.
- 36- Katritzky, A. R.; Rogovoy, B. V. Recent developments in guanylation agents. *Arkivoc* **2005**, iv, 49-87.
- 37- Alarcon, K. Synthèse et étude d'hétérodimères spécifiques des sites abasiques de l'ADN - Potentialisation d'agents alkylants anticancéreux. Université Joseph Fourier, Grenoble, 2000.
- 38- a) Atkins, P. R.; Glue, S. E. J.; Kay, I. T. Heterocyclic syntheses with isothiocyanatoformic esters and their derivatives. *J. C. S. Perkin I* **1973**, 22, 2644-2646, b) Buschauer, A. Synthesis and in vitro pharmacology of arpromidine and related phenyl(pyridylalkyl)guanidines, a potential new class of positive inotropic drugs. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1963-1970, c) Nagarajan, S.; Ho, T.-L.; DuBois, G. E. A simple method for the synthesis of unsymmetrical trisubstituted guanidines. *Synthetic Commun.* **1992**, 22, 1191-1198, d) Pannecouque, C.; Wigerinck, P.; Van Aerschot, A.; Herdewijn, P. Dimeric building blocks with N-cyanoguanidine linkage for oligonucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 7609-7612.

- 39- Reddy, N. L.; Fan, W.; Magar, S. S.; Perlman, M. E.; Yost, E.; Zhang, L.; Berlove, D.; Fischer, J. B.; Burke-Howie, K.; Wolcott, T.; Durant, G. J. Synthesis and pharmacological evaluation of N,N'-Diarylguanidines as potent sodium channel blockers and anticonvulsant agents. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 3298-3302..
- 40- Ramadas, K.; Janarthanan, N.; Pritha, R. A short and concise synthesis of guanidines. *Synlett* **1997**, 1053-1054.
- 41- King, H.; Tonkin, I. M. Antiplasmodial action and chemical constitution. Part VIII. Guanidines and diguanides. *J. Chem. Soc.* **1946**, 1063-1069.
- 42- Lammin, S. G.; Pedgrift, B. L.; Ratcliffe, A. J. Conversion of anilines to bis-Boc protected N-methylguanidines. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6815-6818.
- 43- Ramadas, K.; Srinivasan, N. An expedient synthesis of substituted guanidines. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2841-2844.
- 44- a) Kim, K. S.; Qian, L. Improved method for the preparation of guanidines. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7677-7680, b) Levallet, C.; Lerpiniere, J.; Ko, S. Y. The HgCl₂-promoted guanylation reaction: the scope and limitations. *Tetrahedron* **1997**, 53, 5291-5304.
- 45- Yong, Y. F.; Kowalski, J. A.; Lipton, M. A. Facile and efficient guanylation of amines using thioureas and Mukaiyama's reagent. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 1540-1542.
- 46- Manimala, J. C.; Anslyn, E. V. A highly efficient method for the synthesis of guanidinium derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 565-567.
- 47- Atwal, K. S.; Ahmed, S. Z.; O'Reilly, B. C. A facile synthesis of cyanoguanidines from thioureas. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 7313-7316.
- 48- Linton, B. R.; Carr, A. J.; Orner, B. P.; Hamilton, A. D. A versatile one-pot synthesis of 1,3-disubstituted guanidines from carbamoyl isothiocyanates. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 1566-1568.
- 49- Shinada, T.; T., U.; Ando, T.; Kozuma, H.; Ohfuné, Y. A new entry for the synthesis of N-acyl-N'substituted guanidines. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 1945-1947.
- 50- Jain, M. L.; Bruice, T. C. Solid-phase synthesis of positively charged deoxynucleic guanidine (DNG) oligonucleotide incorporating 7-deazaguanine bases. *Biorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 7333-7346.
- 51- Poss, M. A.; Iwanowicz, E. J.; Reid, J. A.; Lin, J.; Gu, Z. A mild and efficient method for the preparation of guanidines. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5933-5936.
- 52- Schroif-Gregoire, C.; Barale, K.; Zaparucha, A.; Al-Mourabit, A. Preparation of N-alkyl-N'-carboalkoxy guanidines: unexpected effective trans-alkoxylation transforming the 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl into various carbamates. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 2357-2359.

- 53- Elmore, D. T.; Ogle, J. R.; Fletcher, W.; Toseland, P. A. 858. Acyl isothiocyanates. Part I. The synthesis of esters *N*-Acyldithiocarbamic acids. *J. Chem. Soc.* **1956**, 4458-4463.
- 54- Charmantray, F. Une Nouvelle Famille d'Intercalants-Alkylants de l'ADN. Synthèse et Etude de Dérivés d'Acridines. Université Joseph Fourier, Grenoble, 2001.
- 55- Wardani, A. Recherche de Nouveaux Intercalants à Propriétés Antitumorales : Synthèse, Etudes Physicochimiques et Biologiques en Série Benzo [*b*] Phenanthroline-1,7. Thèse de doctorat, Bruxelles, 1989.
- 56- a) Lorente, A.; Fernandez-Saiz, M.; Espinosa, J. F.; Jaime, C.; Lehn, J. M.; Vigneron, J. P. Cyclo-bis-intercalands with acridine subunits linked by rigid spacers. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 5261-5264, b) Lorente, A.; Espinosa, J. F.; Fernandez-Saiz, M.; Lehn, J.-M.; Wilson, D. W.; Zhong, Y. Y. Synthesis of imidazole-acridine conjugates as ribonuclease A mimics. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 4417-4420.
- 57- a) Diouf, O.; Carato, P.; Depreux, P.; Bonte, J. P.; Craignard, D. H.; Guardiola-Lemaitre, B.; Rettori, M. C.; Belzung, C.; Lesieur, D. 5-HT1A and 5-HT2A ligands with anxiolytic and antipanic-like properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2579-2584, b) Thompson, L. A.; Ellman, J. A. Straightforward and general method for coupling alcohols to solid supports. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 50, 9333-9336, c) Williams, P. D.; Clineschmidt, B. V.; Erb, J. M.; Freidinger, R. M.; Guidotti, M. T.; Lis, E. V.; Pawluczyk, J. M.; Pettibone, D. J.; Reiss, D. R.; Veber, D. F.; Woyden, C. J. 1[1-[(*N*-acetyl-4-piperidinyl)oxy]-2-methoxybenzoyl]piperidin-4-yl]-4*H*-3,1-benzoxazin-2(1*H*)-one. A new orally bioavailable, non-peptide oxytocin antagonist. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 4634-4636.
- 58- a) Consonni, R.; Dalla Croce, P.; Ferraccioli, R.; La Rosa, C. Diels-Alder reactions of *N*-sulfonyl substituted aza-ortho-xylylenes generated from the corresponding 1,4-dihydro-2*H*-3,1-benzoxazin-2-one derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1996**, 1809-1814, b) Nikam, S. S.; Yuen, P.-W.; Kornberg, B. E.; Tobias, B.; Rafferty, M. F. Novel use of substituted 1,4-dihydrobenz[d][1,3]oxazin-2-ones in the synthesis of important aminomethyl *o*-nitroanilines. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 9331-9334.
- 59- a) Carretero, J. C.; Ruano, J. L. G.; Vicioso, M. A practical route to C-8 substituted fluoroquinolone. *Tetrahedron* **1992**, 48, 7373-7382, b) Tye, H.; Eldred, C.; Wills, M. The synthesis of a synthetic receptor via directed lithiations of dibenzofuran and bibenzothiophene. *Synlett* **1995**, 770-772.
- 60- a) Barton, J. W.; Pearson, N. D. Cinnolines. Part 1. Widman-Stoermer reactions of functionalised 2-phenylbut-2-enes to give cinnolinecarbaldehydes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1987**, 1541-1545, b) Molina, P.; Arques, A.; Molina, A. A novel and efficient synthesis of 4*H*-[3,1]benzoxazines by a tandem Aza-Wittig/heterocumulene mediated annulation strategy. *Synthesis* **1991**, 21-23.
- 61- Kearney, P. C.; Fernandez, M.; Flygare, J. A. Solid-phase Synthesis of 2-Aminothiazoles. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 196-200.

- 62- Jain, M. L.; Bruice, T. C. Solid-phase synthesis of positively charged deoxynucleic guanidine (DNG) oligonucleotide incorporating 7-deazaguanine bases. *Biorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 7333-7346.
- 63- Peterson, K. E.; Smith, R. C.; Mohan, R. S. Bismuth compounds in organic synthesis. Synthesis of resorcinarenes using bismuth triflate. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 7723-7725.
- 64- Kocienski, P. J. *Protecting groups*. Thieme: New York, 2005.
- 65- Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective groups in organic synthesis*. Third ed.; John Wiley and sons, Inc.: 1999.
- 66- Carpino, L. A.; Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3401-3404,
- 67- Fixler, N. Recherche de Nouveaux Agents Anticancéreux Dérivés d'Acridine et de Benzo[b][1,7]Phénanthroline. Synthèse et Etude de Réactivité. 1994.
- 68- Woodward, R. B.; Heusler, K.; Gosteli, J.; Naegeli, P.; Oppolzer, W.; Ramage, R.; Ranganathan, S.; Vorbrüggen, H. The total synthesis of Cephalosporin C. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 852-853.
- 69- Hancock, G.; Galpin, I. J.; Morgan, B. A. Side reactions and cadmium catalysed removal of the trichloroethoxycarbonyl (Troc) protecting group. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 249-252.
- 70- Dong, Q.; Anderson, C. E.; Ciufolini, M. A. Reductive cleavage of TROC groups under neutral conditions with Cadmium-Lead couple. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 5681-5682.
- 71- Mineno, T.; Choi, S-R.; Avery, M. A. A mild deprotection of trichloethyl carbamates using Indium metal. *Synlett* **2002**, 883-886
- 72- Semmelhack, M.F.; Heinsohn, G. E. Selective removal of protecting groups using controlled potential electrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 5139-5140.
- 73- Zeghida, W.; Demeunynck, M. Application of 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl protection of aminoacridines. *Synthesis* **2007**, 231-234.
- 74- Martin, R. F.; Kelly, D. P. Synthesis and NMR spectra of substituted aminoiodoacridine. *Aust. J. Chem.* **1979**, 32, 2637-2646.
- 75- Castaing, R.; Slodzian, G. *J. Microsc.* **1962**, 1, 395-410.
- 76- Guerquin-Kern, J. L.; Hillion, F.; Madelmont, J. C.; Labarre, P.; Papon, J.; Croisy, A. Ultra-structural cell distribution of the melanoma marker iodobenzamide: improved potentiality of SIMS imaging in life sciences. *Biomedical Engineering Online* **2004**, 3:10.

- 77- Manimala, J. C.; Anslyn, E. V. A highly efficient method for the synthesis of guanidinium derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 565-567.
- 78- Albert, A. *The acridines*. second ed.; Arnold: London, 1966.
- 79- Suhs, T.; König, B. Synthesis of functionalized guanidino amino acids. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 8150-8157.
- 80- Foroughifar, N.; Lee, Y. G.; Leffek, K. Basicity of substituted 2-pyridyl-1,1,3,3-tetramethylguanidines and aminopyridines in acetonitrile and water solvents. *Can. J. Chem.* **1992**, 70, 2856-2858.
- 81- Albert, A.; Serjeant, E. P. *The determination of Ionization Constants*. second ed.; Chapman and Hall Ltd: Great Britain, 1971.
- 82- Pendergast, W.; Johnson, J. V.; Dickerson, S. H.; Dev, I. K.; Duch, D. S.; Ferone, R.; Hall, W. R.; Humphrey, J.; Kelly, J. M.; Wilson, D. C. Benzoquinazoline inhibitors of thymidylate synthase: enzyme inhibitory activity and cytotoxicity of some 3-amino- and 3-methylbenzo[f]quinazolin-1(2H)-ones. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 2279-2291.
- 83- Pendergast, W.; Dickerson, S. H.; Dev, I. K.; Ferone, R.; Duch, D. S.; Smith, G. K. Benzo[f]quinazoline inhibitors of thymidylate synthase: methyleneamino-linked aroylglutamate derivatives. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 838-844.
- 84- De Clercq, E. New developments in anti-HIV chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 1543-1572.
- 85- Chern, J.-W.; Tao, P.-L.; Wang, K.-C.; Gutcait, A.; Liu, S.-W.; Yen, M.-H.; Chien, S.-L.; Rong, J.-K. Studies on quinazolines and 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. 8. Synthesis and pharmacological evaluation of tricyclic fused quinazolines and 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides as potential α 1-adrenoceptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 3128-3141.
- 86- Grosso, J. A.; E., N. D.; Kohli, J. D.; Glock, D. Synthesis of 2-(alkylamino)-5,6- and -6,7-dihydroxy-3,4-dihydroquinazolines and evaluation as potential dopamine agonists. *J. Med. Chem.* **1982**, 25, 703-708.
- 87- Vögtle, M. M.; Marzinzik, A. L. Synthetic approaches towards quinazolines, quinazolinones and quinazolinone derivatives on solid phase. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, 23, 440-459.
- 88- a) Wéber, C.; Bielik, A.; Szendrei, G.; Greiner, I. Novel solid-phase synthesis of 2,6-disubstituted 4(3H)-quinazolinones for combinatorial library generation. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 2971-2974, Wéber, C.; Demeter, A.; Szendrei, G. I.; Greiner, I. Solid-phase synthesis of 2,6- and 2,7-diamino-4(3H)-quinazolinones via palladium-catalysed amination. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 7533-7536.
- 89- Gopalsamy, A.; Yang, H. Combinatorial synthesis of heterocycles: solid-phase synthesis of 2-amino-4(1H)-quinazolinone derivatives. *J. Comb. Chem.* **2000**, 2, 378-381.

- 90- Yang, R.-Y.; Kaplan, A. A concise and efficient solid-phase synthesis of 2-amino-4(3H)-quinazolinones. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 7005-7008.
- 91- Somers, F.; Ouedraogo, R.; Antoine, M.-H.; de Tullio, P.; Becker, B.; Fontaine, J.; Damas, J.; Dupont, L.; Rigo, B.; Delarge, J.; Lebrun, P.; Pirotte, B. Original 2-alkylamino-6-halogenoquinazolin-4(3H)-ones and K_{ATP} channel activity. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2575-2585.
- 92- Molina, P.; Alajarin, M.; Vidal, A. New methodology for the preparation of quinazoline derivatives via tandem Aza-Wittig/heterocumulene-mediated annulation. Synthesis of 4(3H)-quinazolinones, benzimidazo[1,2-c]quinazolines, quinazolino[3,2-a]quinazolines and benzothiazolo[3,2-c]quinazolines. *Tetrahedron* **1989**, 45, 4263-4286.
- 93- Zhang, W.; Mayer, J. P.; Hall, S. E.; Weigel, J. A. A polymer-bound iminophosphorane approach for the synthesis of quinazolines. *J. Comb. Chem.* **2001**, 3, 255-256.
- 94- Yu, Y.; Ostresh, J. M.; Houghten, R. A. A traceless approach for the parallel solid-phase synthesis of 2-(arylamino)quinazolinones. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 5831-5834.
- 95- Jones, M. L.; Kuyper, L. F.; Styles, V. L.; Caddell, J. M. Lewis acid assisted cyclisation of arylcyanoguanidines to 2,4-diaminoquinazolines. *J. Het. Chem.* **1994**, 31, 1681.
- 96- Van Gijte, O.; Tatibouët, A.; Demeunynck, M.; Lhomme, J.; Kirsch-De Mesmaeker, A. A phenanthroline analogue of Tröger's base as bridging ligand in the synthesis of a bimetallic Ruthenium(II) complex. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 1567-1570.
- 97- Wéber, C.; Demeter, A.; Szendrei, G. I.; Greiner, I. Solid-phase synthesis of 2,6- and 2,7-diamino-4(3H)-quinazolinones via palladium-catalysed amination. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 7533-7536.
- 98- Cudero, J.; Pardo, C.; Ramos, M.; Gutierrez-Puebla, E.; Monge, A.; Elguero, J. Synthesis and molecular structure of heterocyclic Tröger's bases derived from C-amino heterocycles. *Tetrahedron* **1997**, 53, 2233-2240.
- 99- Monchaud, D.; Allain, C.; Teulade-Fichou, M. P. Development of a Fluorescent Intercalator Displacement assay (G4-FID) for establishing quadruplex-DNA affinity and selectivity of putative ligands. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4842-4845.
- 100- Mergny, J. L.; Lacroix, L.; Teulade-Fichou, M. P.; Hounsou, C.; Guittat, L.; Hoarau, M.; Arimondo, P. B.; Vigneron, J. P.; Lehn, J. M.; Riou, J. F.; Garestier, T.; Helene, C. Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, 98, 3062-3067.