



HAL
open science

Trioxanes antiparasitaires : mécanisme d'action et nouvelles molécules biologiquement actives.

Sophie Thétiot-Laurent

► **To cite this version:**

Sophie Thétiot-Laurent. Trioxanes antiparasitaires: mécanisme d'action et nouvelles molécules biologiquement actives.. Autre. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2006. Français. NNT: . tel-00567140

HAL Id: tel-00567140

<https://theses.hal.science/tel-00567140>

Submitted on 18 Feb 2011

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.

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE (SCIENCES)

en vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PAUL SABATIER

spécialité

CHIMIE BIOLOGIE SANTE

par

Sophie LAURENT

TRIOXANES ANTIPARASITAIRES : MECANISME D'ACTION ET NOUVELLES MOLECULES BIOLOGIQUEMENT ACTIVES

Soutenue le vendredi 13 octobre 2006

Jury :

Claude COMBES	Professeur à l'Université de Perpignan Membre de l'Académie des Sciences	Rapporteur
Yves GENISSON	Chargé de Recherche au CNRS, Toulouse	
Bernard MEUNIER	PDG de la société Palumed, Labège Membre de l'Académie des Sciences	
Alain MILON	Professeur à l'Université Paul Sabatier, Toulouse	
Anne ROBERT	Chargée de Recherche au CNRS, LCC, Toulouse	
Marc TAILLEFER	Directeur de Recherche au CNRS, Montpellier	Rapporteur

*Recherches effectuées au Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS
205 route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex 4*

A mes parents

" Les arbres aux racines profondes sont ceux qui montent haut. " Frédéric Mistral, Les Iles d'Or.

Aux êtres chers qui m'ont quittée.

" Telle est la vie des hommes. Quelques joies très vite effacées par d'inoubliables chagrins. "
Marcel Pagnol, Le Château de ma Mère.

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS à Toulouse, dirigé par Monsieur Jean-Jacques Bonnet. Qu'il soit remercié de m'avoir accueillie au sein de cet établissement.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur Claude Combes, Professeur à l'Université de Perpignan, et Monsieur Marc Taillefer, Directeur de Recherche au CNRS à Montpellier, pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Leur présence à ce jury est pour moi un grand honneur.

J'adresse ma plus profonde gratitude à Monsieur Alain Milon, Professeur à l'Université Paul Sabatier, pour avoir présidé ce jury de thèse et à Monsieur Yves Génisson, Chargé de Recherche au CNRS, pour sa présence en tant qu'examineur.

Monsieur Bernard Meunier, PDG de la société Palumed, m'a accueillie au sein de son équipe. Je voudrais lui faire part de mes remerciements les plus sincères pour la confiance qu'il m'a accordée en me proposant ce sujet captivant. Ses compétences, sa grande motivation, son écoute et ses nombreux conseils m'ont beaucoup apporté tout au long de la thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à celle qui a assuré la direction scientifique de ce travail : Anne Robert, Chargée de Recherche au CNRS à Toulouse. Sa détermination, sa rigueur scientifique et son optimisme ont été indispensables au bon déroulement de mes recherches. Je souhaite également la remercier pour sa disponibilité, sa gentillesse et son écoute. Je lui suis extrêmement reconnaissante pour la liberté qu'elle m'a laissée dans ces recherches et d'avoir cru en mes compétences.

Je suis très obligée à Monsieur André Théron, Directeur du Laboratoire de Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive de Perpignan, pour avoir accepté la collaboration qui nous a permis de tester l'activité de nos molécules. Je souhaite également remercier Monsieur Jérôme Boissier, Chargé de Recherche dans ce même laboratoire, pour avoir réalisé les traitements sur les souris ainsi que leurs perfusions. Malgré les soucis concernant le retard de certaines livraisons des produits, il a mené ses expériences avec une parfaite rigueur scientifique et une constante disponibilité. Les discussions concernant la vaste "odyssée des schistosomes" ont été très enrichissantes. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma plus profonde gratitude. Je remercie également les différentes personnes du laboratoire pour leur accueil lors de nos visites à Perpignan.

J'adresse aussi mes remerciements les plus chaleureux aux divers services grâce auxquels ce travail a pu être réalisé dans d'excellentes conditions : le service RMN et tout spécialement Yannick Coppel pour les analyses RMN en 2D et Marc Vedrenne pour les analyses RMN ¹⁹F à haute température, le service

de microanalyse, les services de spectrométrie de masse et de diffraction des rayons X et notamment Heinz Gornitzka pour la détermination des configurations des structures cristallines.

Ces trois années de travail ont été facilitées par les encouragements et " coups de pouce " de toutes les personnes côtoyées quotidiennement et que je n'oublierais pas de remercier : Jean Bernadou (pour toutes ses réponses aux questions de pharmacologie), Vania (pour les discussions concernant les mécanismes réactionnels), Geneviève (pour la chromatographie liquide), Catherine, Marguerite et Jean-Luc (pour leur gentillesse), Tamara (pour nos longues discussions et pour la saga des équilibres facétieux forme ouverte - forme fermée. L'année prochaine ce sera ton tour, alors courage tu es dans la dernière ligne droite !!), François (le futur roi des carbènes : " Garde le moral !! "), Marc (pour nos discussions footballistiques et nos pseudo karaokés sur Grease. Zue de bons souvenirs !), Sophie (pour les " tuyaux " sur les démarches pour la thèse et pour la comm. orale à Paris), Céline (die Chemikerin der Alzheimerskrankheit, viel Glück für dein deutsches Abenteuer), Ludivine, Guillaume (dit Guiqui et qui sait si bien faire sursauter Marie-Thérèse ...), Alexandre (grâce à qui j'ai retrouvé une ancienne collègue de promo), Sylvain, Michel (pour toutes ses farces et blagues), Joël et Françoise (pour leur gaieté et bonne humeur communicatives à chacune de leurs visites), les deux Christophe (B. et L. footballeurs du mercredi), les dernières arrivées dans l'équipe Alexandrine et Fatima, Sébastien (dit Séby pour notre soutien mutuel lors des journées "Vers mon métier "), Mayerling (et son super accent vénézuélien), l'équipe F avec Peter, Luc (pour la sortie à Carcassonne, les plans de Violet le Duc et bonne chance pour le 11 décembre), Vanessa, Christine. Je pense également aussi beaucoup à certains qui sont partis plus ou moins loin : Antonella (pour les cours d'Italien, nos petites escapades et la soirée " pasta "), Ulla, Anna, Magda, Robert, Adam, Katia (pour les randos même en plein brouillard comme au Pic du Fourcat !!). Quand je pense aux moments passés ensemble, je n'ai que de bons souvenirs qui me viennent en mémoire. Je voudrais également remercier Martine pour sa gaieté et sa bonne humeur communicatives, Madame Lecouls pour son immense disponibilité et les membres du magasin et de l'atelier (jamais avares de blagues et jeux de mots).

Last but not least, j'adresse mes remerciements les plus intenses à tous ceux qui m'entourent, qui ont toujours soutenu mes choix et m'ont prodigué des encouragements intarissables : mon père, ma mère et le reste de la famille. Je suis touchée par l'intérêt que vous avez toujours porté à mes recherches. Vous tous m'avez apporté la confiance nécessaire pour mener ces projets surtout dans les moments où je doutais le plus.

Merci à TOUS pour m'avoir soutenue dans les moments où, comme on dit du côté de ma belle Provence, j'étais toute escagassée et estransinée !!!

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS	1
-------------------------------	----------

INTRODUCTION GÉNÉRALE	3
------------------------------	----------

1^{ère} PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	7
---	----------

CHAPITRE I : Propriétés alkylantes des dérivés de l'artémisinine	9
Introduction	11
I – Le paludisme	12
II - Le rôle de l'hème dans le paludisme	13
II.1 – Digestion de l'hémoglobine	13
II.2 – Polymérisation de l'hème	13
III – Les capacités alkylantes de l'artémisinine	14
III.1 – L'artémisinine : un trioxane à activité antipaludique	14
III.2 – Mécanisme d'action de l'artémisinine	15
III.3 – Relation structure-activité des peroxydes antipaludiques	18
III.4 – Autres activateurs et cibles possibles de l'artémisinine	19
IV – Propriétés alkylantes d'antipaludiques dérivés de l'artémisinine	20
V – Bibliographie	20

CHAPITRE II : Les schistosomiasis	23
I - Qu'est-ce-que la bilharziose ?	25
I.1 – Cycle de vie des schistosomes	27
I.2 – Manifestations de la maladie	29
II – Dégradation de l'hémoglobine et formatin de l'hémozoïne	30
II.1 – Dégradation de l'hémoglobine et polymérisation de l'hème	30
II.2 – Effet de la chloroquine sur la polymérisation de l'hème	32
III – Les différents antihelminthiques	33
III.1 – Molécules diverses	34
III.2 – Le praziquantel	41
III.3 – Les traitements du futur	50
IV – Bibliographie	53

2^{ème} PARTIE : PROPRIÉTÉS ALKYLANTES DES DÉRIVÉS HÉMISYNTHÉTIQUES DE L'ARTÉMISININE ET DE LA TRIOXAQUINE DU1301	59
--	-----------

CHAPITRE I : Propriétés alkylantes de l'acide artésunique et des trioxaquinés	Résumé de la publication Laurent S. A.-L., Loup C., Mourgues S., Robert A., Meunier B. Heme alkylation by artesunic acid and trioxaquine DU1301, two antimalarial trioxanes. <i>ChemBioChem</i> 2005, 6, 653-658.	61
Introduction		63

I – Alkylation de l'hème par l'acide artésunique	63
I.1 – Introduction	63
I.2 – Alkylation de l'hème par l'acide artésunique <i>in vitro</i> et caractérisation des produits de couplage	64
II – Alkylation de l'hème par la trioxaquine® DU1301	66
II.1 – Généralités	66
II.2 – Alkylation de l'hème <i>in vitro</i> et caractérisation des produits de couplage	67
III - Conclusion	68
IV - Bibliographie	69
Article	70

CHAPITRE II : Dérivés de la déoxoartémisinine modifiés en C10 Résumé de la publication Laurent S. A.-L., Robert A., Meunier B. C10-modified artemisinin derivatives : efficient heme-alkylating agents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2060-2063. _____ **77**

Introduction	79
I – Alkylation de l'hème par la 10-déoxoartémisinine 2	80
II – Alkylation de l'hème par la 10 α -(4-benzyl)-pipérazinylartémisinine 3	81
II.1 – Préparation du composé 3	81
II.2 – Alkylation de l'hème par le dérivé 3	84
III - Conclusion	85
IV – Bibliographie	85
Article	86

3^{ème} PARTIE : SYNTHÈSE DES TRIOXAQUANTELS. SYNTHÈSE STÉRÉOSÉLECTIVE DES TRIOXAQUANTELS _____ **99**

CHAPITRE I : Synthèse des trioxaquantels _____ **101**

Introduction	103
I – Synthèse du synthon praziquanamine 2	104
I.1 – Méthode de Rupe	104
I.2 – Méthode de Maffrand et analogues	104
I.3 – Méthode de Berkowitz	107
I.4 – Méthode à partir d'ions <i>N</i> -acyliminiums	107
I.5 – Méthode par cyclisation radicalaire	110
I.6 – Méthode choisie	111
II – Couplage de la praziquanamine 2 et des trioxanes : formation des trioxaquantels	111
II.1 – 1 ^{ère} génération de trioxaquantels " sans le CO "	112
II.2 – Diméthyltrioxaquantels acylés en position 2	119
III – Partie expérimentale	127
IV – Bibliographie	149

CHAPITRE II : Obtention des stéréoisomères séparés du 9'-méthyltrioxaquantel **53** _____ **151**

I – Obtention de la praziquanamine 2 énantiopure	154
I.1 – Tentative de synthèse énantiosélective de la praziquanamine	154
I.2 – Tentative de résolution de la (\pm)-praziquanamine par l'intermédiaire de sels chiraux diastéréoisomères	155
I.3 – Tentative de résolution de la (\pm)-praziquanamine sur colonne chirale HPLC	156

I.4 – Tentative de résolution cinétique de la (±)-praziquanamine par acylation enzymatique	156
I.5 – Transformation de la (±)-praziquanamine en dérivés covalents diastéréoisomères	158
II – Séparation des deux isomères <i>cis</i> et <i>trans</i> de la partie trioxane	166
II.1 – Séparation des composés du 9'-méthyl-diméthyltrioxane 44	166
II.2 – Séparation des isomères <i>cis</i> et <i>trans</i> du 9'H-diméthyltrioxane 41	168
III – Couplage des stéréoisomères du trioxaquantel 53	169
IV – Partie expérimentale	170
V – BIBLIOGRAPHIE	189

4^{ème} PARTIE : ACTIVITÉ BIOLOGIQUE	191
I – Méthodologie du test <i>in vivo</i>	193
I.1 – Techniques d'infestation	193
I.2 – Traitement des souris	194
I.3 – Comptage des schistosomes après le traitement	195
II – Résultats	196
II.1 – Expérience préliminaire : DE ₅₀ du praziquantel sur la souche de <i>Schistosoma mansoni</i> étudiée	196
II.2 – Activités des trioxaquantels par voie orale sur les stades âgés	196
II.3 – Activités de deux stéréoisomères purifiés du trioxaquantel 9'Me- 53 par voie intrapéritonéale sur les stades âgés	197
II.4 – Activité du trioxaquantel 9'Me- 53 par voie orale sur les stades jeunes	198
II.5 – Analyse des résultats	199
III – Partie expérimentale	200
IV – Bibliographie	201

CONCLUSION GÉNÉRALE	203
----------------------------	------------

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Acac	Acétylacétonate
APTS	Acide <i>para</i> -toluènesulfonique
Artm	Artéméther
Art	Artémisinine
Arts	Artésunate
δ	Déplacement chimique (en ppm)
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCE	Dichloroéthane
DCM	Dichlorométhane
DDVP	<i>O,O</i> -diméthyl-2,2-dichlorovinylphosphate
DE ₅₀	Dose efficace réduisant de 50% la parasitémie
DéoxoArt	Déoxoartémisinine
DHA	Dihydroartémisinine
DIPE	Diisopropyléther
DIPEA	Diisopropyléthylamine
DME	Diméthylester
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNPH	Dinitrophénylhydrazine
e.d.	Excès diastéréoisomérique
e.e.	Excès énantiomérique
ϵ	Coefficient d'extinction molaire
eq	Equivalent molaire
ES-MS	Spectrométrie de masse, mode d'ionisation électrospray
GSH	Glutathion
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HMPA	Héxaméthylphosphotriamide
ip	Intrapéritonéal

JPI	Jour post-infestation
λ	Longueur d'onde (en nm)
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse
LDA	Lithium diisopropylamide
MEK	Méthylethylketone
MHz	Mégahertz
MTPA	Acide α -methoxy- α -trifluorophénylacétique
NMM	<i>N</i> -méthylmorpholine
PPIX	Protoporphyrine IX
Py	Pyridine
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-trispyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
PZQ	Praziquantel
Rdt	Rendement
R_f	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SN1	Substitution nucléophile du premier ordre
TA	Température ambiante
TEA	Triéthylamine
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Triméthylsilyle
TMSBr	Bromure de triméthylsilyle
TMSCl	Chlorure de triméthylsilyle
TPP	Tétraphénylporphyrine
TsCl	Chlorure de <i>para</i> -toluènesulfonyle
USD	U.S. dollar
v/v	volume/volume
wt/v	masse/vol

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Toutes les schistosomiasés sont consécutives au contact direct des mammifères avec de l'eau infestée par les formes larvaires du parasite, larves libérées par un mollusque (hôte intermédiaire). Dans de nombreux pays, y compris certains pays d'Europe, elles infestent le cheptel bovin et ovin ; elles peuvent avoir, de ce fait, un fort impact économique. Enrayer la maladie au stade des larves aquatiques n'est pas envisageable. Ces espèces étant dispersées dans l'eau, le traitement nécessiterait l'utilisation de parasiticide répétée dans le temps et l'espace avec des conséquences possibles sur l'environnement mais aussi sur l'économie. Seules les chimiothérapies permettent d'apporter une solution aux problèmes des schistosomiasés déclarées. Ainsi, différentes molécules ont été développées pour les infections humaines. Jusqu'après la seconde guerre mondiale, les dérivés de l'antimoine sont intensivement utilisés puis abandonnés pour des problèmes de toxicité. Une période d'activité intense commence dans les années 1960, avec l'introduction du niridazole, de l'hycanthone, de l'oxamniquine et du métrifonate. Cette période atteint son apogée dans les années 70 avec la découverte de l'amoscanate, de l'oltipraz et surtout du **praziquantel**.

Actuellement, seul le praziquantel est utilisé pour le traitement de toutes les formes des schistosomiasés humaines et animales. L'apparition de résistance ainsi que la faible efficacité et la gravité des effets secondaires des autres molécules ont conduit à leur abandon. Les recherches concernant un vaccin, ciblant soit la prévention de la maladie, soit la réduction de la fécondité du parasite, avancent mais de nombreux efforts doivent encore être faits. Ne disposant plus que d'une seule molécule pour traiter cette maladie, il devient donc urgent de mettre au point de nouveaux médicaments schistosomicides peu coûteux et efficaces contre toutes les espèces résistantes.

La découverte de l'activité antipaludique et antischistosomiasé de l'artémisinine, une molécule d'origine naturelle, extraite des feuilles d'une variété d'armoise chinoise, met en lumière une nouvelle famille de composés très actifs : les **trioxanes**. Le faible rendement d'extraction et le coût prohibitif de la synthèse totale de l'artémisinine font que la molécule reste chère. Il est donc intéressant de mettre au point de nouveaux analogues actifs sur la base de la compréhension, au niveau moléculaire, du mécanisme d'action de l'artémisinine et de ses dérivés.

Les travaux décrits dans ce manuscrit présentent les propriétés d'alkylation de différents dérivés hémisynthétiques de l'artémisinine vis-à-vis de l'hème qui est libéré lors de la digestion de l'hémoglobine par les parasites hématophages *Plasmodium* et *Schistosoma*. Sur la base de ce mécanisme d'action, de nouvelles molécules synthétiques comportant un motif 1,2,4-trioxane, analogues fonctionnels de l'artémisinine, ont été élaborées, synthétisées

et leurs activités biologiques évaluées. Ces molécules, appelées **trioxaquantels**, sont des molécules duales et associent de façon covalente le motif 1,2,4-**trioxane** au motif pyrazino-isoquinoléine du praziquantel.

La première partie de ce mémoire présente, dans un premier volet, un état de la compréhension du mécanisme d'action de l'artémisinine dans le paludisme. Dans un second volet, une revue bibliographique de la chimiothérapie des schistosomiasés, des problèmes de résistances et des stratégies actuelles et envisagées de la maladie est décrite.

La deuxième partie présente l'étude du mécanisme d'action de l'acide artésunique et de la trioxaquine DU1301 d'une part, et de la 10-déoxoartémisinine et de la 10 α -benzylpipérazinylartémisinine d'autre part, quatre antipaludiques efficaces.

La troisième partie se divise en deux chapitres. Le premier concerne la conception de différents trioxaquantels. Le second porte sur la synthèse de chacun des quatre stéréoisomères, de manière énantiomériquement pure, d'un trioxaquantel choisi.

La dernière partie présente les évaluations biologiques de trois trioxaquantels, activités évaluées *in vivo* sur des souris infectées par *Schistosoma mansoni*.

1^{ère} PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : PROPRIÉTÉS ALKYLANTES DES DÉRIVÉS DE
L'ARTÉMISININE

INTRODUCTION

Les ions métalliques sont importants pour les organismes vivants. Outre les ions sodium, potassium, magnésium et calcium, plusieurs métaux de transition ont une importance vitale. Le fer est le plus abondant de ces métaux : un corps humain adulte en contient environ 4 g. Contrairement aux ions sodium, calcium et magnésium qui circulent librement dans le plasma, les ions ferriques sont liés avec une grande affinité et une grande sélectivité à la transferrine et la ferritine, deux protéines responsables respectivement de son transport et de son stockage. La concentration en fer libre dans le plasma humain n'est que de 10^{-16} M, à cause de la faible solubilité de l'hydroxyde de fer à pH physiologique.

Le fer est un composant essentiel de réactions redox cellulaires et est nécessaire pour le fonctionnement de diverses enzymes. L'hème (une protoporphyrine de fer(II)) est un complexe de fer particulièrement stable et abondant dans les organismes vivants. Il est nécessaire comme groupe prosthétique de protéines et d'enzymes (l'hémoglobine [contenant environ 55% du fer chez l'homme], la myoglobine, les cytochromes, les peroxydases, les catalases, la NO-synthétase, etc.), impliquées dans divers processus comme le transport d'oxygène, le transport d'électrons et le métabolisme de petites molécules. Les clusters fer-soufre sont également impliqués dans le transport électronique des protéines.

La capacité du fer de l'hème (ou des clusters fer-soufre) à accepter ou donner des électrons est un point clé de sa réactivité *in vivo*. Ces transferts électroniques peuvent conduire à des réactions toxiques. La réduction de l'oxygène moléculaire, peut entraîner la formation d'espèces réduites de l'oxygène, radicalaires ou non, telles que le superoxyde et l'eau oxygénée. La réaction de Fenton peut également produire des radicaux hydroxyles toxiques (figure 1).

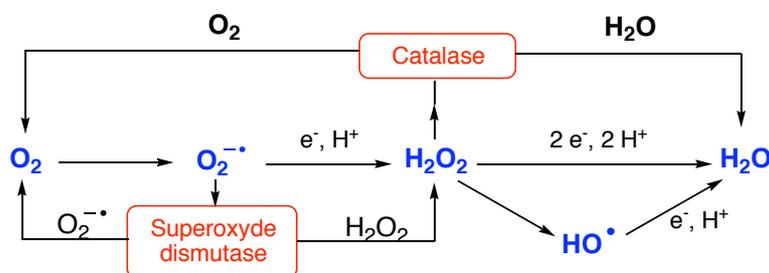


Figure 1 : Réduction de l'oxygène moléculaire et formation des espèces réduites de l'oxygène [1].

Pour maintenir la concentration en ces espèces oxygénées réduites aussi faible que possible, les organismes aérobies ont développé des systèmes de régulation sophistiqués (superoxyde dismutases, peroxydases, catalases) [2]. Ces espèces réactives sont responsables de divers dégâts cellulaires comme la peroxydation des lipides, les dommages occasionnés à l'ADN et aux protéines.

I – LE PALUDISME

Le paludisme est une maladie parasitaire due à l'infection des érythrocytes par un protozoaire hématophage du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme lors de la piqûre d'un moustique anophèle femelle infecté. Quatre espèces d'hématozoaires, pathogènes pour l'homme sont identifiés : *P. falciparum* (espèce la plus répandue et la plus dangereuse, responsable du neuropaludisme, forme mortelle de la maladie), *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* (qui peuvent entraîner des rechutes plusieurs années après la primo-infection). D'autres hématozoaires du genre *Plasmodium* affectent les animaux, mais ne sont pas transmissibles à l'homme.

Le paludisme reste aujourd'hui un fléau mondial. Il est la troisième cause de mortalité infectieuse après le sida et la tuberculose. Plus de 40% de la population mondiale vit en zone d'endémie et l'on dénombre chaque année 300 à 400 millions de nouveaux cas et environ 3 millions de décès, la majeure partie étant des enfants de moins de 5 ans en Afrique subsaharienne. En 2004, 107 pays et territoires présentaient des risques de transmission de la maladie avec 3,2 milliards de personnes à risque [3].

Depuis environ 25 ans, le parasite est devenu résistant aux principales classes de médicaments, rendant la chloroquine quasiment inutilisable dans la plupart des régions touchées par *Plasmodium falciparum* ce qui entraîne une réactivation de la maladie [4,5]. Des cas de résistances à la quinine, médicament habituellement utilisé dans les cas graves, sont maintenant enregistrés [6].

II - LE RÔLE DE L'HÈME DANS LE PALUDISME

II.1 – Digestion de l'hémoglobine

Plasmodium dépend de l'hôte pour se procurer les acides aminés, nécessaires à la construction de ses propres protéines, par le biais de la digestion de l'hémoglobine [7]. Ce processus conduit à la libération d'hème-fer(II) toxique pour le parasite. Sur les quatre équivalents d'hème, contenus dans chaque molécule d'hémoglobine, seule une quantité mineure d'hème est dégradée et utilisée comme source de fer pour le parasite. La majeure partie de l'hème libéré est polymérisée sous forme d'un pigment malarique d'hème-fer(III) non toxique.

II.2 – Polymérisation de l'hème

Dans la vacuole digestive acide du parasite, 20 à 80% de l'hémoglobine de l'hôte est digérée [8]. Contrairement aux vertébrés, *Plasmodium* ne possède pas d'hème oxygénase pour dégrader l'hème-fer(II) libéré par cette digestion. Cet hème-fer(II) est capable de réduire l'oxygène moléculaire entraînant ainsi la formation d'espèces réduites $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 . Ce processus initie un " stress oxydant " pour le parasite.

Pour éviter les dommages dus à la présence d'hème-fer(II) libre et toxique, le parasite agrège l'hème-fer(II) sous la forme d'un polymère insoluble, microcristallin dans lequel le fer est oxydé en fer(III) non toxique : pigment malarique ou hémozoïne. À la suite de la première structure proposée en 1991 par Slater *et al.* [9], Pagola *et al.* proposent que l'hémozoïne soit en fait composée d'unités dimériques d'hème (dans lesquelles un groupement carboxylate d'une molécule d'hème coordonne l'atome de fer d'une seconde molécule d'hème et réciproquement) reliées entre elles par des liaisons hydrogènes (figure 2) [10].

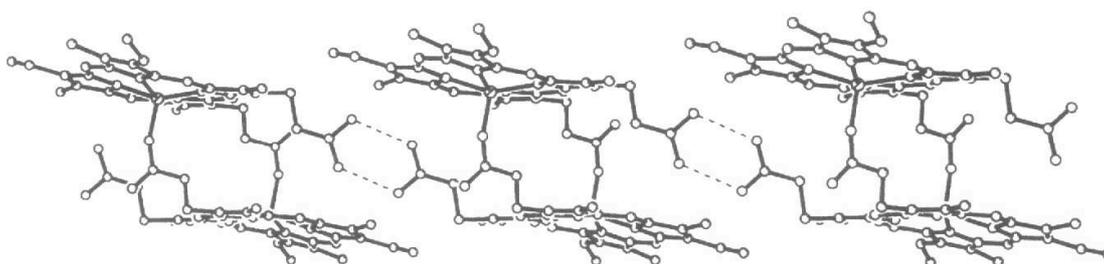


Figure 2 : Structure de l'hémozoïne proposée par Pagola *et al.* [10].

L'hémozoïne s'accumule dans la vacuole digestive du parasite. Toute perturbation de ce processus de détoxification peut avoir des conséquences néfastes pour la survie de

Ces composés sont très utilisés depuis plus de 20 ans en Asie du sud-est sans effet secondaire ou résistance jusqu'à maintenant [17]. En laboratoire, l'induction de résistances aux dérivés de l'artémisinine chez la souris est lente et réversible [18]. Cependant, l'utilisation de ces dérivés en monothérapie est associée à de forts taux de recrudescence à cause de leur temps court de demi-vie dans le plasma [19]. Pour cette raison, ces dérivés sont associés à d'autres molécules, comme la méfloquine ou la luméfantrine, qui sont éliminées plus lentement.

L'inconvénient majeur de l'artémisinine concerne ses problèmes d'approvisionnement : les rendements maximums, obtenus à partir d'*Artemisia* cultivée, ne représentent que 2% de la plante sèche contre 0,5% pour des plantes sauvages [20]. De plus, la production d'artémisinine à partir d'armoise cultivée dépend des régions géographiques (5 fois plus d'artémisinine à l'hectare en Inde qu'au Vietnam ou en Afrique) [21]. Les cultures indiennes plus productives ainsi que le développement de nouvelles voies d'accès aux dérivés de l'artémisinine (production d'acide artésunique par des levures) [22] peuvent aider à la baisse du coût de l'artémisinine. Toutefois, il est essentiel de synthétiser un nouvel antipaludique très bon marché et présentant le même mécanisme d'action. Pour se faire, une connaissance minimale du mécanisme d'action de l'artémisinine est nécessaire.

III.2 – Mécanisme d'action de l'artémisinine

Le " stress oxydant " dû à des espèces réduites de l'oxygène a été considéré comme responsable de l'activité de l'artémisinine [23, 24]. Cependant ces travaux ont été effectués à des concentrations en artémisinine mille fois supérieures aux doses pharmacologiquement actives. À ces concentrations, les lésions provoquées ne sont pas spécifiques et ne peuvent rendre compte de l'activité antipaludique des endoperoxydes utilisés à des concentrations nanomolaires.

L'hypothèse la plus probable repose sur l'application de la chimie classique des peroxydes au cas de l'artémisinine : activation réductrice du peroxyde par un complexe métallique de bas degré d'oxydation. L'hème qui est internalisé par les parasites est abondant dans les globules rouges. De plus, l'artémisinine s'accumule dans les globules rouges infectés. Dans ces conditions, la réaction entre l'hème-fer(II) et l'artémisinine est-elle possible ?

La coupure des 1,2,4-trioxanes, initiée par le fer(II), commence par un transfert monoélectronique du fer(II) vers le pont peroxyde, générant deux radicaux anions **3** et **5** (figure 4), chacun pouvant évoluer selon sa propre voie réactionnelle [25].

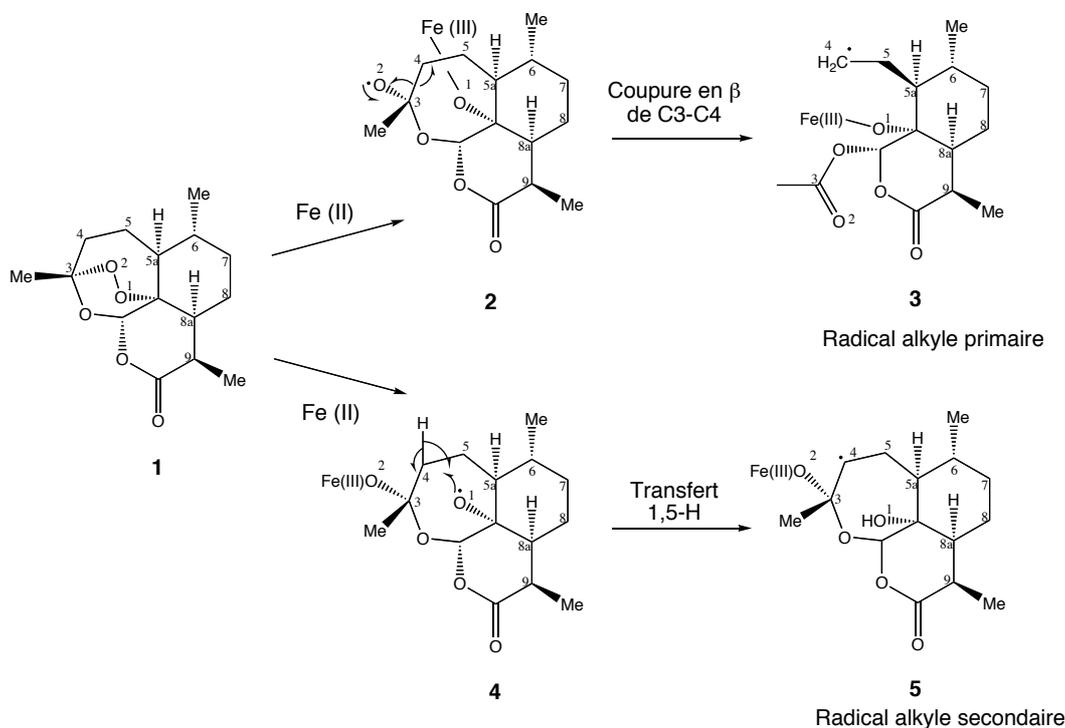


Figure 4 : Structures des deux radicaux anions formés par activation réductrice de l'artémisinine par le fer(II).

La coupure du peroxyde de l'artémisinine **1** avec fixation du fer sur l'oxygène 1 peut générer le radical oxygéné **2** qui évolue rapidement via la coupure de la liaison C3-C4 adjacente pour former le radical alkyle primaire en position C4 **3**. L'autre ouverture du peroxyde peut donner naissance au radical oxygéné **4** qui évolue via un transfert 1,5 d'hydrogène pour générer le radical alkyle secondaire **5**.

Après des expériences préliminaires sur une métalloporphyrine synthétique modèle d'hème (la *méso*-tétraphénylporphyrine de manganèse) [26], la PPIX-Fe(III) (stable à l'air), incubée avec de l'artémisinine en présence d'un réducteur capable de générer du fer(II) réactif, a été convertie avec de très bons rendements en adduits covalents hème-artémisinine. Ces adduits résultent de l'alkylation des quatre positions *meso* de la porphyrine par un radical alkyle primaire centré en C4 **3** issu de l'activation réductrice de l'artémisinine (figure 5) [27, 28].

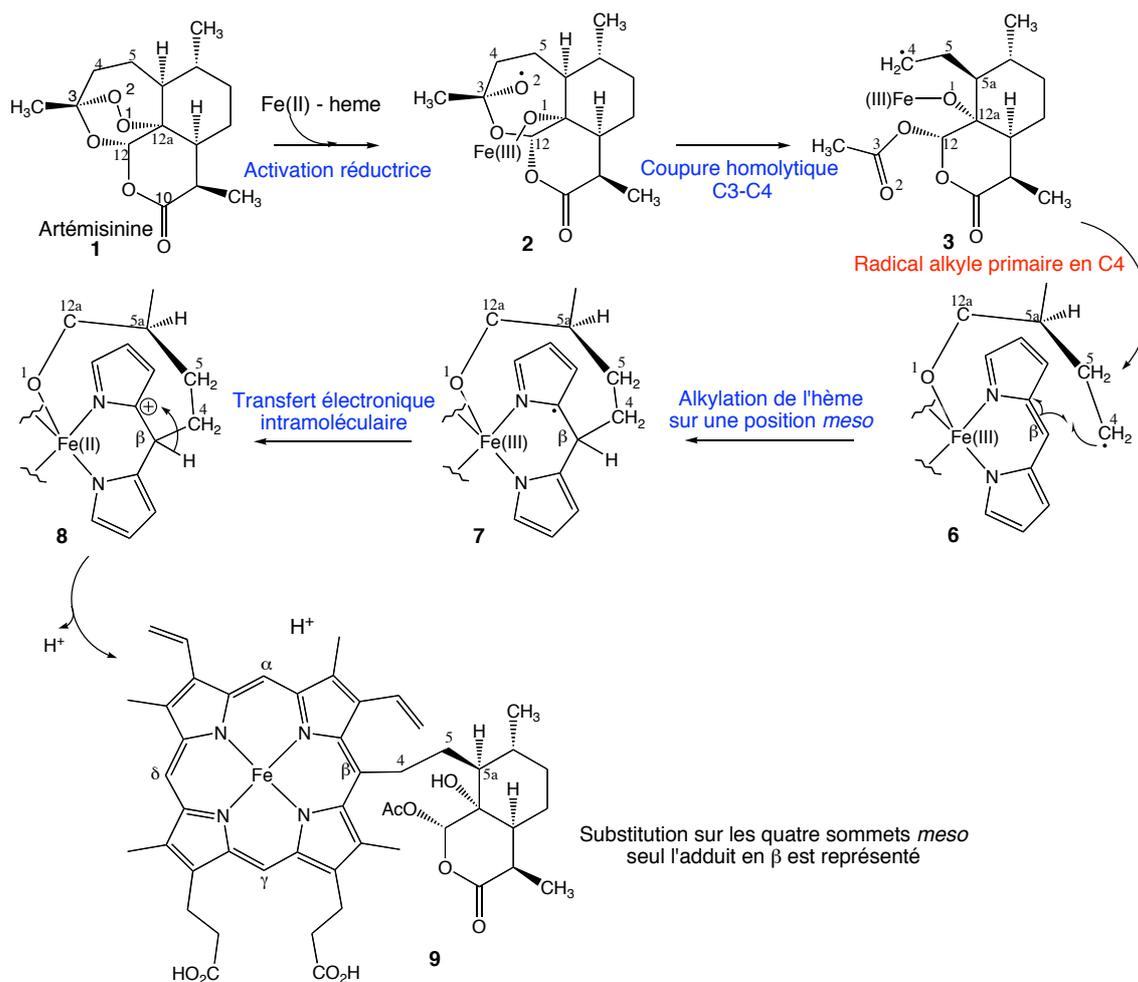


Figure 5 : Mécanisme réactionnel de formation des adduits hème-artémisinine.

L'activation réductrice du pont peroxyde de l'artémisinine **1**, initiée par un transfert monoélectronique de l'hème-fer(II), génère le radical oxygéné **2**, qui se réarrange rapidement par la coupure homolytique de la liaison C3-C4 en β, pour donner le radical alkyle primaire **3**. L'addition intramoléculaire de ce radical sur le sommet *meso* de la porphyrine n'est pas régiosélective : l'addition se fait sur les quatre sommets, générant ainsi, le radical **7** sur la position adjacente à celle de l'alkylation. Un transfert monoélectronique intramoléculaire transforme ce radical **7** en un cation **8** et réduit le fer(III) en fer(II). Ce composé est ré-aromatisé par la perte d'un proton pour donner les adduits covalents **9**. Après démétallation de ces adduits, une caractérisation complète par RMN a été obtenue [29].

Ces adduits hème-artémisinine ne dépendent pas de la nature du réducteur utilisé : seule son aptitude à réduire l'hème-fer(III) en hème-fer(II) compte. Ainsi, divers réducteurs (glutathion, acide ascorbique, dithionite de sodium) ont été utilisés et ont donné les mêmes résultats. L'artémisinine est également capable d'alkyler l'hème de l'hémoglobine humaine non-dénaturée, en l'absence de toute protéase et même en présence de quantités importantes

de protéines non hémiques [30]. Ceci indique clairement la forte affinité de l'artémisinine à réagir avec l'hémoglobine, même dans des conditions défavorables.

Très récemment, l'alkylation de l'hème par l'artémisinine a été mise en évidence *in vivo*, chez des souris infectées par *P. vinckei* et traitées par des doses pharmaceutiques d'artémisinine par voie orale ou voie intrapéritonéale [31].

III.3 – Relation structure-activité des peroxydes antipaludiques

Les propriétés alkylantes vis-à-vis de l'hème sont le fait de tous les dérivés actifs de l'artémisinine (artéméther [27], acide artésunique [32], autres dérivés hémisynthétiques [33], trioxaquine® [32]).

Les études d'alkylation d'un modèle d'hème par des trioxanes synthétiques ont montré que les composés actifs sont alkylants et les composés inactifs ne sont pas alkylants (figure 6).

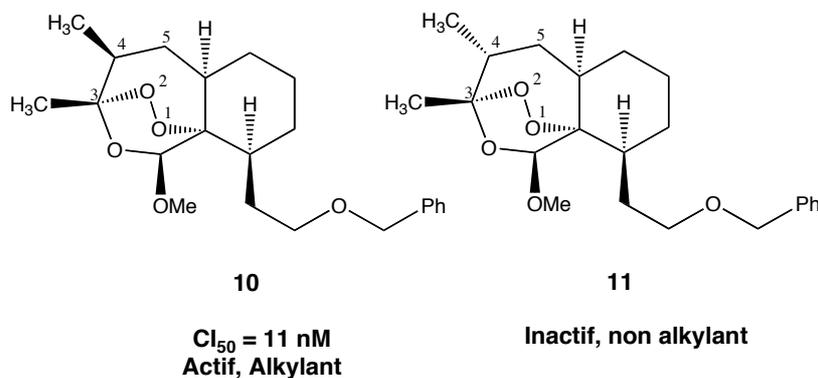


Figure 6 : Corrélation activité - capacité d'alkylation.

L'activation réductrice du peroxyde se fait par un transfert monoélectronique par sphère interne. Quand le groupement méthyle en position 4 et le peroxyde sont en positions relatives *cis* (cas du composé **11**), l'approche du peroxyde sur le centre métallique est empêchée à cause de l'encombrement stérique du méthyle en C4 (figure 7) : le trioxane est dépourvu d'activité pharmacologique.

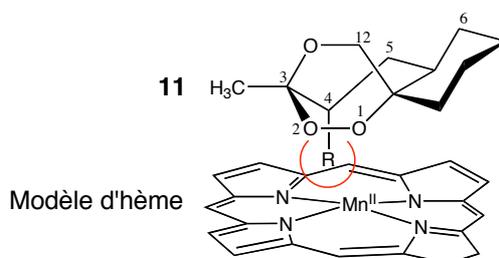


Figure 7 : Approches du trioxane inactif **11**.

Ce résultat suggère qu'une interaction proche entre le centre métallique et le pont peroxyde est nécessaire pour l'activité. Le transfert d'électron semble se faire par un **mécanisme de type sphère-interne**. Par ailleurs, les propriétés alkylantes de l'artémisinine semblent bien être corrélées à l'activité antipaludique des endoperoxydes. Il est remarquable que dans ces réactions d'alkylation, l'hème est à la fois activateur et cible de l'artémisinine (ou des autres peroxydes).

III.4 – Autres activateurs et cibles possibles de l'artémisinine

L'alkylation de protéines parasites par les dérivés hémisynthétiques de l'artémisinine a été mise en évidence [34]. L'incubation de la dihydroartémisinine radioactive, à des concentrations pharmacologiquement actives, dans des érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum*, révèle l'alkylation de protéines parasites spécifiques. Parmi ces protéines parasites, la TCTP (Translationally Controlled Tumor Proteine) est alkylée *in vitro* en présence d'hème [35].

Très récemment, l'inhibition sélective par l'artémisinine de *Pf*ATP6, une ATPase calcium-dépendante a été décrite [36]. Cette inhibition dépend également du fer. Par ailleurs, l'inhibition par l'artémisinine (à la concentration très élevée de 200 μ M) de l'activité de protéases à cystéine dans la vacuole digestive de *Plasmodium*, a également été rapportée.

Plusieurs hémoprotéines (hémoglobine, catalase, cytochrome *c*) réagissent avec l'artémisinine. Après incubation avec de l'artémisinine marquée, la radioactivité est associée non seulement à l'hème mais également à la partie protéique [37]. Ainsi, dans les hémoprotéines, l'hème peut également catalyser l'alkylation de la partie protéique.

Après activation de l'artémisinine par l'hème, l'alkylation de protéines est donc également possible. En effet, avec une durée de vie de 1 à 3 ns, une molécule organique peut se déplacer sur une distance de 8 à 14 Å en solution aqueuse à température ambiante [38]. Ainsi, un radical carboné, généré par l'hème, peut se déplacer et alkyler une protéine du voisinage de l'hème. Toutefois, d'autres espèces biologiques de fer peuvent également jouer le rôle d'activateur, de même que d'autres espèces métalliques réductrices.

IV – PROPRIÉTÉS ALKYLANTES D'ANTIPALUDIQUES DÉRIVÉS DE L'ARTÉMISININE

Dans la deuxième partie, nous allons nous intéresser à des dérivés de l'artémisinine afin de voir si ces propriétés alkylantes peuvent être généralisées aux composés comportant un motif 1,2,4-trioxane. Parmi ces molécules, nous étudierons l'action de l'hème sur l'acide artésunique (forme acide de l'artésunate : dérivé hémisynthétique de l'artémisinine le plus utilisé en clinique humaine), mais aussi sur une trioxaquine®, molécule duale comportant le pharmacophore de l'artémisinine et celui de la chloroquine (cf. partie 2, chapitre 1). Enfin, la littérature faisant controverse de cette alkylation, nous regarderons en détail ce qu'il en est avec des dérivés de la déoxoartémisinine modifiés en C10 (cf. partie 2, chapitre 2).

V – BIBLIOGRAPHIE

- [1] Robert A., Benoit-Vical F., Meunier B. The key role of heme to trigger the antimalarial activity of trioxanes. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, 249, 1927-1936.
- [2] Kumar S., Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol. Lett.* **2005**, 157, 175-188.
- [3] Olumese P. Epidemiology and surveillance: changing the global picture of malaria. Myth or reality ? *Acta Trop.* **2005**, 95, 265-269.
- [4] Ridley R.G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* **2002**, 415, 686-693.
- [5] White N.J., Nosten F., Looareesuwan S., Watkins W.M., Marsh K., Snow R.W., Kokwaro G., Ouma J., Hien T.T., Molyneux M.E., Taylor T.E., Newbold C.I., Ruebush T.K., Danis H.M., Greenwood B.M., Anderson R.M., Olliaro P. Averting a malaria disaster. *Lancet* **1999**, 353, 1965-1967.
- [6] Demar M., Carme B. *Plasmodium falciparum* in vivo resistance to quinine: description of two RIII responses in French Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, 70, 125-127.
- [7] Francis S.E., Sullivan D.J. Jr., Goldberg D.E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, 51, 97-123.
- [8] Yahon A., Cabantchik Z.I., Ginsburg H. Identification of the acidic compartment of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. *EMBO J.* **1984**, 3, 2695-2700.
- [9] Slater A.F.G., Swiggard W.J., Orton B.R., Flitter W.D., Goldberg D.E., Cerami A., Henderson G.B. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 325-329.
- [10] Pagola S., Stephens P.W., Bohle D.S., Kesar A.D., Madsen S.K. The structure of malaria pigment β -haematin. *Nature* **2000**, 404, 307-310.
- [11] Chou A.C., Chevli R., Fitch C.D. Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites. *Biochemistry* **1980**, 19, 1543-1549.
- [12] Moreau S., Perly B., Biguet J. Interactions de la chloroquine avec la ferriprotoporphyrine IX. *Biochimie* **1982**, 64, 1015-1025.
- [13] Fitch C.D., Chevli R., Banyal H.S., Phillips G., Pfaler M.A., Krogstad D.J. Lysis of *Plasmodium falciparum* by ferriprotoporphyrin IX and a chloroquine-ferriprotoporphyrin IX complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, 21, 819-822.
- [14] Klayman D.L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* **1985**, 228, 1049-1055.
- [15] Vroman J.A., Alirm-Gaston M., Avery M.A. Current progress in the chemistry, medicinal chemistry and drug design of artemisinin based antimalarials. *Curr. Pharm. Design* **1999**, 5, 101-138.
- [16] Jacquet C., Stohler H.R., Chollet J., Peters W. Antimalarial activity of the bicyclic peroxide Ro 42-1611 (arteflene) in experimental models. *Trop. Med. Parasitol.* **1994**, 45, 266-271.

- [17] Wongsrichanalai C., Pickard A.L., Wernsdorfer W.H., Meshnick S.R. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect. Dis.* **2002**, *2*, 209-218.
- [18] Xiao S.-H., Yao J.-M., Utzinger J., Cai Y., Chollet J., Tanner M. Selection and reversal of *Plasmodium berghei* resistance in the mouse model following repeated high doses of artemether. *Parasitol. Res.* **2004**, *92*, 215-219.
- [19] Ittarat W., Pickard A.L., Rattanasinganchan P., Wilairatana P., Looareesuwan S., Emery K., Low J., Udomsangpetch R., Meshnick S.R. Recrudescence in artesunate-treated patients with *falciparum* malaria is dependent on parasite burden not on parasite factors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2003**, *68*, 147-162.
- [20] Hien T.T., White N.J. Qinghaosu. *Lancet* **1993**, *341*, 603-608.
- [21] Kumar S., Srivastava S. Establishment of artemisinin combination therapy as first line treatment for combating malaria: *Artemisia annua* sustainable supply chain of artemisinin. *Curr. Sci.* **2005**, *89*, 1097-1102.
- [22] Ro D.-K., Ouellet M., Fisher K.J., Newman K.L., Ndungu J.M., Ho K.A., Eachus R.A., Ham T.S., Kirby J., Chang M.C.Y., Withers S.T., Shiba Y., Sarpong R., Keasling J.D. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* **2006**, *440*, 940-943.
- [23] Meshnick S.R., Tsang T.W., Lin F.B., Pan H.Z., Chang C.N., Kuypers F., Chiu D., Lubin B. Activated oxygen mediates the antimalarial activity of qinghaosu. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1989**, *313*, 95-104.
- [24] Pfaller M.A., Krogstad D.J. Oxygen enhances the antimalarial activity of the imidazoles. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1983**, *32*, 660-665.
- [25] Posner G.H., Oh C.H., Wang D., Gerena L., Milhous W.K., Meshnick S.R., Asawamahasadka W. Mechanism-based design, synthesis and *in vitro* antimalarial testing of new 4-methylated trioxanes structurally related to artemisinin: the importance of a carbon-centered radical for antimalarial activity. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1256-1258.
- [26] Robert A., Meunier B. Characterization of the first covalent adduct between artemisinin and a heme model. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5968-5969.
- [27] Robert A., Cazelles J., Meunier B. Characterization of the alkylation product of heme by the antimalarial drug artemisinin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1954-1057.
- [28] Robert A., Coppel Y., Meunier B. Alkylation of heme by the antimalarial drug artemisinin. *Chem. Commun.* **2002**, 414-416.
- [29] Robert A., Coppel Y., Meunier B. NMR characterization of covalent adducts obtained by alkylation of heme with the antimalarial drug artemisinin. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *339*, 488-496.
- [30] Selmeczi K., Robert A., Claparols C., Meunier B. Alkylation of human hemoglobin A₀ by the antimalarial drug artemisinin. *FEBS Lett.* **2004**, *556*, 245-248.
- [31] Robert A., Benoit-Vical F., Claparols C., Meunier B. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13676-13680.
- [32] Laurent S.A.-L., Loup C., Mourgues S., Robert A., Meunier B. Heme alkylation by artesunic acid and trioxaquine DU1301, two antimalarial trioxanes. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 653-658.
- [33] Laurent S.A.-L., Robert A., Meunier B. C10-modified artemisinin derivatives: efficient heme-alkylating agents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2060-2063.
- [34] Asawamahasadka W., Ittarat I., Pu Y.-M., Ziffer H., Meshnick S.R. Reaction of antimalarial endoperoxides with specific parasite proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 1854-1858.
- [35] Bhisutthibhan J., Pan X.-Q., Hossler P.A., Walker D.J., Yowell C.A., Carlton J., Dame J.B., Meshnick S.R. The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 16192-16198.
- [36] Eckstein-Ludwig U., Webb R.J., van Goethem I.D.A., East J.M., Lee A.G., Kimura M., O'Neill P.M., Bray P.G., Ward S.A., Krishna S. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2003**, *424*, 957-961.
- [37] Yang Y.-Z., Little B., Meshnick S.R. Alkylation of proteins by artemisinin. Effects of heme, pH, and drug structure. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 569-573.
- [38] Atkins P.W., *Physical Chemistry 5th ed.*, Oxford University Press, Oxford, **1994**, 846-856.

CHAPITRE II : LES SCHISTOSOMIASES

I - QU'EST-CE QUE LA BILHARZIOSE ?

En 1851 lors d'une expédition organisée en Égypte, Theodor Bilharz observe au cours d'une autopsie pratiquée sur un patient égyptien, la présence dans le sang de la veine porte de vers blancs semblant être des trématodes. Il identifie ainsi la cause de la bilharziose encore connue sous les noms de schistosomiase ou schistosomose. Cette maladie est causée par un parasite sanguin (trématode) du genre *Schistosoma*. Les hôtes intermédiaires de ces trématodes sont des escargots (mollusques) d'eau douce, dont l'importance n'a été mise en évidence qu'au début du 20^{ème} siècle. Toutefois, la schistosomiase a une longue histoire : en 1950 avant J.-C., les Égyptiens relataient dans les papyri des perturbations de la vessie. Des œufs calcifiés de *S. haematobium* ont été retrouvés dans une momie égyptienne datant de 1200 ans avant J.-C.

Les schistosomoses ont jalonné l'histoire du monde : en 1950 l'assaut à Formose, prévu par la Chine communiste, a été annulé en raison de 30 000 à 50 000 cas de schistosomiasés sévères parmi les soldats. Pendant la seconde guerre mondiale, la bilharziose au sein des troupes américaines du Pacifique a posé de sérieux problèmes. L'infection de plusieurs troupes pendant la bataille de Leyte en 1944 a entraîné la perte de plus de 300 000 hommes.

Les schistosomoses se classent actuellement au deuxième rang des maladies parasitaires d'Afrique derrière le paludisme. Malgré les campagnes de traitement mises en œuvre par l'OMS en Afrique, on estime à 200 millions le nombre de personnes atteintes par la maladie (85% des personnes infectées se situent en Afrique subsaharienne) et à 600 millions le nombre de personnes à risque d'infection. Le nombre de morts chaque année est estimé à 200 000. En Chine, le nombre de personnes infectées a atteint 850 000 en 2003 [1]. Cinq espèces de schistosomes sont pathogènes pour l'homme : *Schistosoma haematobium*, *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* et *S. mekongi*. *S. japonicum* est endémique en Asie. *S. haematobium* et *S. mansoni* sont présents en Afrique et *S. mansoni* est la seule espèce présente en Amérique du Sud. La plupart des zones d'endémie de schistosomoses sont également des zones affectées par le paludisme.

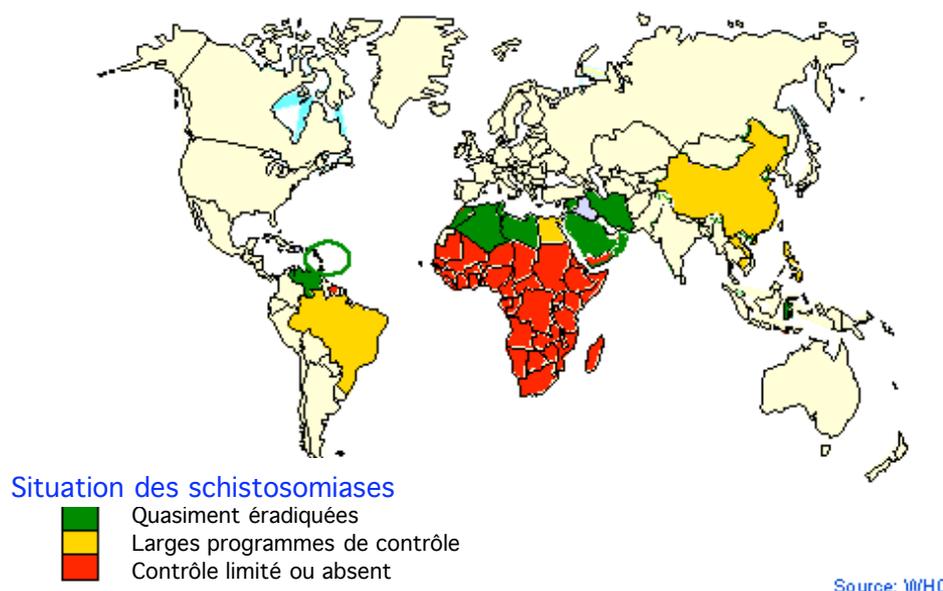


Figure 1 : Situation des schistosomiases dans le monde en 2003 selon l’OMS [2].

La maladie a un très fort impact socio-économique. En effet, de nombreux animaux sont infectés (chiens, chats, rongeurs, cochons, chevaux, volailles, poissons, bovins et ovins). Dans de nombreux pays, y compris européens, les cheptels bovins et ovins sont contaminés.

Les changements environnementaux qui résultent du développement de points d’eau ainsi que la croissance et la migration des populations peuvent faciliter l’émergence de schistosomiases [3]. Par exemple, la construction du barrage Diama sur la rivière Sénégal a eu pour conséquence l’introduction de *S. mansoni* en Mauritanie et au Sénégal. La migration de réfugiés et de populations a introduit *S. mansoni* en Somalie et à Djibouti. Le barrage d’Assouan en Égypte a éliminé *S. haematobium* de la région du Delta du Nil, mais a permis l’établissement de *S. mansoni*.

La mise au point de nouveaux médicaments, tant pour un usage prophylactique que pour un traitement curatif, reste une nécessité de santé publique. Cette recherche est actuellement délaissée.

I.1 – Cycle de vie des schistosomes

Les infections par *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi* ou *S. intercalatum* sont souvent associées à des hépatites chroniques et des fibroses intestinales. Les infections par *S. haematobium* provoquent des fibroses et une calcification de l'appareil urinaire. Toutes les schistosomoses sont consécutives à un contact direct avec de l'eau (mare, étang, flaque) contenant des formes larvaires du parasite produites par le mollusque [4]. Les cycles de vie des différentes espèces sont très semblables et ne diffèrent que par quelques points qui sont précisés ci-après.

Libération des œufs par l'hôte

Les couples de vers adultes vivent dans les vaisseaux sanguins (système porte pour *S. mansoni* et *S. japonicum*, système cave pour *S. haematobium*) de l'organisme de l'hôte mammifère. Les œufs pondus par les femelles migrent, à travers les vaisseaux sanguins, vers la vessie ou l'intestin de l'hôte [5]. Dans le cas de *S. mansoni*, les œufs libérés dans les voies mésentériques sont transportés dans le sang à proximité du gros intestin, où ils pénètrent graduellement la paroi de l'intestin, le lumen et sont libérés dans les fèces. Les œufs de *S. japonicum* se trouvent dans les voies mésentériques supérieures à proximité de l'intestin grêle et sont également éliminés dans les fèces. Ceux de *S. haematobium* passent la paroi de la vessie et sont éliminés par l'urine [6]. Au voisinage de l'œuf, des enzymes protéolytiques sont libérées et aident à la digestion des tissus de l'hôte. Les œufs possèdent un éperon qui leur permet de percer la paroi de l'intestin. De plus, les mouvements péristaltiques aident à la progression. Il est communément observé que des œufs soient piégés dans les tissus et causent des inflammations entraînant la formation d'un granulome sur chaque site d'œuf piégé. De plus, des occlusions des petits vaisseaux sanguins entraînent des nécroses et des ulcérations.

Cycle du schistosome chez l'hôte intermédiaire

Les œufs libérés dans les excréments d'une personne infectée, se retrouvent au contact de l'eau et libèrent des larves microscopiques appelées miracidia (figure 2). Ces dernières doivent trouver et pénétrer un mollusque aquatique spécifique (*Biomphalaria glabrata* pour *S. mansoni* par exemple) de manière à survivre. Des agents chimiques du mollusque (mucus, acides gras, acides aminés) attirent le miracidium. Une fois à l'intérieur du mollusque, le miracidium se transforme en un sporocyste-mère qui génère 35 à 600 sporocystes-filles en trois semaines. Ces dernières migrent dans les glandes digestives du mollusque dès le 12^{ème} jour après la pénétration par le miracidium, se transforment par un cycle de reproduction

asexué et produisent de nouvelles larves parasites (les cercaires) qui sont libérées par le mollusque dans l'eau (environ 1500 cercaires par jour). La durée entre la pénétration des miracidia dans l'escargot et la libération des cercaires est de 4 semaines.

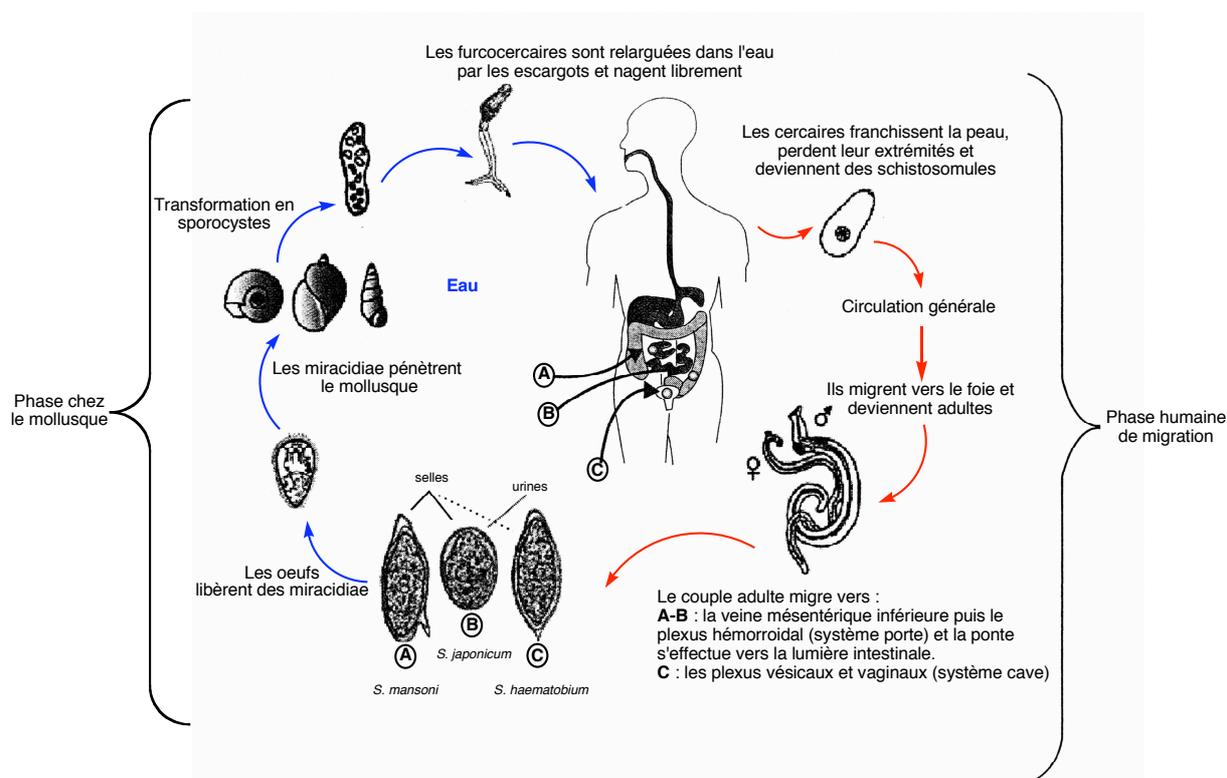


Figure 2 : Cycle de vie des schistosomes d'après [7].

Cycle du schistosome chez l'hôte mammifère

Les personnes sont contaminées par les cercaires lors d'un contact avec de l'eau infectée pendant leurs activités quotidiennes (hygiène, récréation, agriculture). Cinq minutes de contact suffisent pour que les personnes soient infectées. Cette phase de pénétration peut se manifester par un prurit au cours du bain, puis immédiatement après le bain, par une dermatite dite cercarienne (éruption maculopapuleuse prurigineuse correspondant aux points de pénétration des larves) disparaissant dans les 48 heures suivant le bain infectant [8]. La pénétration de la cercaire à travers le derme d'un individu a été longuement étudiée. Elle se fait en plusieurs temps suite à des stimuli chimiques et thermiques [9, 10]. Au cours du processus de pénétration de la peau, la cercaire perd son extrémité terminale et devient une schistosomule. Cette étape dure approximativement 18 heures. La schistosomule entre ensuite dans la circulation sanguine et continue son cycle biologique par migration à travers les poumons pour atteindre le foie (phase d'invasion, environ 15 jours). Dès sa pénétration dans l'hôte, la schistosomule puis les schistosomes adultes dégradent l'hémoglobine de l'hôte. Ce processus leur est indispensable.

Trois à quatre semaines (selon les espèces) sont nécessaires après la pénétration, avant que les vers adultes ne s'apparient dans le foie, la femelle se logeant dans le canal gynécophore du mâle. Les adultes migrent alors à contre courant vers les plexus veineux mésentériques pour *S. mansoni*, *S. japonicum* et *S. intercalatum* ou vésicaux pour *S. haematobium*. La femelle gorgée d'œufs se place sous la muqueuse digestive ou vésicale et la ponte peut débuter. Deux cents à 2000 œufs par jour sur une période de 5 ans sont libérés à partir du 40^{ème} jour après l'infestation (phase d'état). Les œufs passent le lumen des vaisseaux sanguins. Certains migrent à travers la muqueuse de l'intestin ou de la vessie et sont éliminés par les fèces ou l'urine.

Dans les zones endémiques, où les réinfections se produisent continuellement, la pénétration répétée des parois de l'intestin et/ou de la vessie entraîne la formation de nombreuses cicatrices qui empêchent la migration des œufs à travers les parois. Ainsi, de nombreux œufs connaissent une " migration aberrante " et sont transportés vers le foie et parfois d'autres sites comme le cerveau, la moelle épinière, l'utérus, les gonades, les poumons. Les cirrhoses et hypertrophies du foie et de la rate ne sont pas rares.

1.2 – Manifestations de la maladie

Les infections légères dues aux schistosomes peuvent être asymptomatiques et les personnes touchées par la maladie vivre toute leur vie sans savoir qu'elles ont été infectées. Le premier symptôme évident de l'infection par *S. haematobium* est la présence de sang dans les urines. Comme les œufs de *S. mansoni* se retrouvent dans les fèces, des symptômes intestinaux comme la diarrhée, avec ou sans trace de sang, sont présents dans les infections sévères. La difficulté de diagnostic réside dans le fait que ces signes ne sont pas spécifiques.

Les altérations majeures des trois principaux types de schistosomoses sont produites par les œufs, qui sont le foyer de réactions inflammatoires. De plus, la migration des œufs à travers la paroi de la vessie pour la schistosomiase haematobia et à travers la paroi du colon pour les schistosomiasis mansoni et japonica produit des hémorragies.

II – DÉGRADATION DE L'HÉMOGLOBINE ET FORMATION DE L'HÉMOZOÏNE

Les schistosomes en croissance ou adultes vivent dans les vaisseaux sanguins de l'hôte, où ils se nourrissent de globules rouges [11]. L'hémoglobine de l'hôte est essentielle pour leur croissance, leur développement et leur reproduction.

II.1 – Dégradation de l'hémoglobine et polymérisation de l'hème

Les schistosomes digèrent l'hémoglobine de l'hôte. Les globules rouges du sang de l'hôte sont lysés par action d'hémolysines dans l'œsophage des schistosomes [12]. L'hémoglobine libérée est transportée vers le cæcum des vers, où elle est dégradée en acides aminés, nécessaires à la construction des protéines du parasite. Les vers femelles ont une capacité protéolytique supérieure aux mâles et digèrent d'avantage d'hémoglobine [13]. La digestion de l'hémoglobine se fait dans une enveloppe acide et l'existence d'au moins une protéase spécifique de l'hémoglobine a été montrée chez *S. mansoni* [14].

Comme nous l'avons vu pour le paludisme, les organismes hématophages doivent posséder un bon mécanisme de protection contre la toxicité de l'hème-fer(II) libéré lors de la digestion de la partie protéique de l'hémoglobine, qui peut réduire l'oxygène moléculaire et former des espèces réactives : $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} , ROO^{\cdot} . Chez *Plasmodium* et *Rhodnius prolixus*, la plupart de l'hème est détoxifiée par la formation d'un agrégat, l'hémozoïne, dans lequel le fer de l'hème est au degré d'oxydation III.

Mise en évidence d'un polymère d'hème chez les schistosomes

Dès 1940, Rogers note la présence d'un pigment noir, insoluble dans l'eau mais soluble dans une solution d'hydroxyde de potassium à 10%, dans les intestins de *S. mattheei* et *S. mansoni* [15]. Ce pigment résulterait de la digestion des hématies de l'hôte. En 1966, Kloetzel *et al.* confirment la présence de ce pigment, détectable de manière évidente 25 jours après l'infestation et en quantité importante [16]. Ils l'identifient à un dérivé non caractérisé de l'hème. L'agrégation de l'hème dans les intestins de *Schistosoma* en un polymère insoluble et son élimination par régurgitation constituent le moyen de détoxification de l'hème pour les schistosomes.

Caractérisation de la structure du polymère d'hème

Il existe une grande similitude entre le pigment produit par les schistosomes et le pigment malarique. Dès 1972, Homewood *et al.* montrent que les deux pigments sont très proches structurellement [17]. Les spectres UV-visible des deux pigments dans une solution de soude aqueuse (0,1 M) sont très similaires. Les deux pigments ne peuvent être différenciés ni par des examens spectroscopiques ni par des examens microscopiques. De même, le pigment schistosomiasique est très similaire de celui produit par *Rhodnius prolixus*.

Processus de polymérisation de l'hème

La synthèse du pigment schistosomiasique se fait très tôt dans le développement des schistosomes (quelques heures après l'infection humaine) : de petites particules de pigments sont observables dans les intestins des schistosomules de l'espèce *S. mansoni* [18].

Le processus d'agrégation de l'hème est dépendant du pH : *Plasmodium*, *Rhodnius* et *Schistosoma* digèrent l'hémoglobine dans un environnement légèrement acide. L'agrégation nécessite que la moitié des chaînes propionates de l'hème soit dissociée. La dissociation de ces chaînes se produit à un pH voisin du pKa de l'hème (pH = 4,8) dans la vacuole digestive de *Plasmodium falciparum*, dans la membrane périmicrovillaire de *Rhodnius* et dans des particules lipidiques de *Schistosoma* [19]. L'hème peut ainsi se dimériser puis s'agréger comme cela a été présenté dans le cas du paludisme (cf. partie 1, chapitre 1). Deux molécules d'hème sont liées par une coordination réciproque fer-carboxylate (figure 3). Les dimères sont ensuite liés, entre eux, par des liaisons hydrogène pour former le pigment.

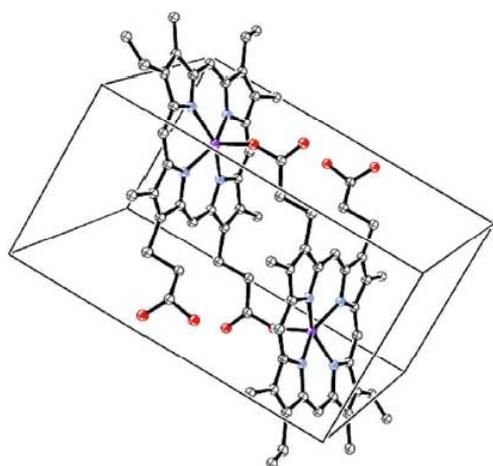


Figure 3 : Proposition de structure des dimères (diffraction des rayons X sur poudre, irradiation synchrotron, 8% de résolution) [19]. Les deux atomes de fer coordonnés et les atomes d'azote coordonnants sont représentés en violet et bleu respectivement ; les atomes d'oxygène des chaînes propionates sont représentés en rouge. Les deux molécules d'hème sont liées par des liaisons fer-carboxylate réciproques.

La polymérisation de l'hème dans le cas de *Plasmodium* et de *Schistosoma* se fait dans des compartiments différents. Dans le cas de *Plasmodium*, la polymérisation a lieu dans la vacuole digestive du parasite où une protéine (HRP " histidine-rich protein ") pourrait initier

la nucléation. Chez les schistosomes, la polymérisation de l'hème-fer(II) se fait dans l'intestin du parasite. Oliveira *et al.* suggèrent que des composés hydrophobes jouent un rôle dans la cristallisation de l'hème mais aucune indication n'est donnée sur le mécanisme de polymérisation [20].

Une fois le pigment schistosomiasique formé, les parasites régurgitent le polymère qui s'accumule dans le foie de l'hôte mammifère [16, 18].

La formation d'hémozoïne n'est pas la seule méthode de détoxification de l'hème des animaux hématophages : les moustiques *Aedes* et *Anopheles* et la tique *Boophilus microplus*, pourtant hématophages, ne produisent pas d'hémozoïne [18]. Néanmoins, la formation d'hémozoïne chez *Schistosoma* (et *Rhodnius*) ouvre de nouvelles voies de thérapies. Les composés qui agissent avec les mécanismes de détoxification de l'hème des organismes hématophages produisant de l'hémozoïne pourraient être utilisés comme de nouveaux médicaments contre ces maladies.

II.2 – Effet de la chloroquine sur la polymérisation de l'hème

La chloroquine inhibe la formation de l'hémozoïne chez *S. mansoni* [20]. Cette inhibition est également observée avec d'autres quinoléines, comme l'amodiaquine, la quinacrine, la quinidine et la quinine. Il est probable que cette inhibition de l'agrégation de l'hème soit due, comme chez *Plasmodium*, à l'interaction π - π entre les noyaux aromatiques plans de l'hème d'une part et des résidus quinoléines des drogues d'autre part. Le praziquantel, molécule de choix pour le traitement des schistosomiasis et sur laquelle nous reviendrons en détail, n'a aucun effet sur l'agrégation de l'hème. Cette observation n'est pas étonnante, compte tenu de l'absence de cycle aromatique étendu dans le praziquantel.

L'administration de chloroquine (1 dose en ip à 50 mg/kg de J = 42 à 49 post-infestation) à des souris infectées par *S. mansoni* entraîne des altérations drastiques des vers mais une faible réduction de la quantité d'hémozoïne formée [20]. Bogitsh *et al.* montrent que la chloroquine induit un gonflement de l'intestin des parasites, suggérant ainsi que non seulement ce compartiment est acide mais aussi que la chloroquine s'y accumule [21]. Toutefois, le mécanisme d'action de cette inhibition est encore inconnu.

III – LES DIFFÉRENTS ANTIHELMINTHIQUES

Les stades larvaires du parasite sont libérés dans l'eau par un mollusque intermédiaire et pénètrent à travers la peau des hommes qui sont en contact avec de l'eau infectée. Il n'est pas possible d'envisager l'éradication de l'infection : il serait nécessaire de traiter des espèces aquatiques très dispersées et très nombreuses. Le traitement serait onéreux, devrait être répété dans le temps et pourrait avoir des conséquences néfastes pour l'environnement. Un vaccin serait souhaitable, mais sa réalisation semble actuellement lointaine. La prévention, l'utilisation de molluscicides et la lutte biologique par des mollusques prédateurs permettent également de lutter contre cette parasitose. Toutefois, seules les chimiothérapies permettent d'apporter une solution aux problèmes des schistosomiasis déclarées.

Différentes molécules ont été développées pour essayer de venir à bout de cette maladie. Un historique de leur découverte est présenté au tableau 1.

Date de première utilisation	Composé	Remarque
~ 1900 ans avant J.-C.	Antimoine	D'après les anciens papyri
1918	Dérivés de l'antimoine	Très toxique
1920	Emétine	Moyennement active, toxique
1955	Métrifonate	Toujours utilisé pour en Afrique
1962	Lucanthone	Remplacée par l'hycanthone
1964	Niridazole	Oral, moyennement actif
1965	Hycanthone	Mutagène
1969	Oxamniquine	Toujours utilisée en Afrique
1976	Amoscanate	Testé en Chine, toxique
1977	Praziquantel	Contre tous les schistosomes
1978	Ro-11 3128	Benzodiazépine, actif sur vers immatures
1978	Oltipraz	Abandonné pour toxicité
1981	Cyclosporine A	Testée seulement en laboratoire

Tableau 1 : Historique des composés présentant des propriétés antischistosomiasis démontrées chez l'animal et/ou l'homme [22].

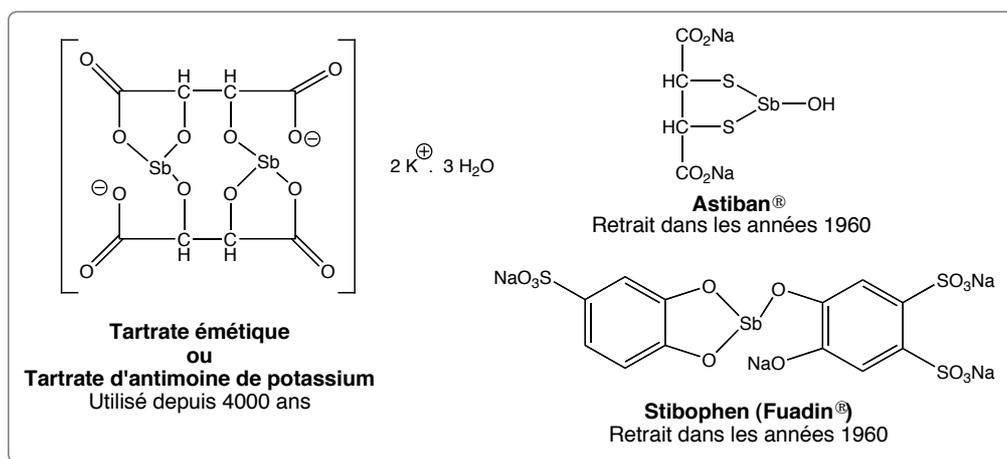
Le traitement de nombreuses infections parasitaires est compliqué par l'existence de résistance innée ou l'apparition de résistance acquise à certains médicaments. La résistance

acquise d'un parasite à un médicament se définit comme la perte de la sensibilité de cette population de parasites, qui était précédemment sensible au médicament, et qui se transmet de manière génétique [23]. L'absence de sensibilité d'une population de parasites à une molécule, à laquelle elle n'a jamais été exposée, est nommée résistance innée. La résistance acquise est due à une ou plusieurs mutation(s) sélectionnée(s) par la molécule et se transmet aux générations suivantes. La résistance innée se traduit par une différence de sensibilité de souches géographiquement éloignées soumises à la seule sélection naturelle.

Ce chapitre consiste à décrire les différentes molécules développées pour le traitement des schistosomoses ainsi que leur mode d'action et les résistances qui sont apparues.

III.1 – Molécules diverses

Les dérivés de l'antimoine



Les propriétés de l'antimoine sur les schistosomes sont connues depuis près de 4000 ans [22].

Utilisées pendant près de 50 ans, ces molécules sont aujourd'hui obsolètes.

En 1918, Christopherson *et al.* notent que les berbères traités avec du tartrate d'antimoine contre la leishmaniose ont un arrêt de leur hématurie probablement due à une infection par *S. haematobium*.

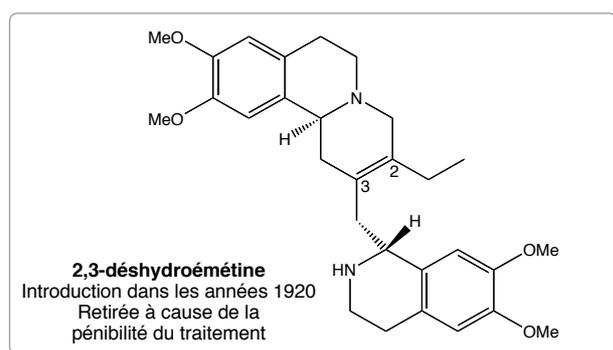
Les composés trivalents d'antimoine sont actifs *in vitro* et *in vivo*, quelle que soit l'espèce de schistosome ou d'hôte [24]. Cependant, ce traitement s'accompagne d'effets secondaires : nausées, diarrhées, effets secondaires cardiovasculaires fatals. Administré par voie intraveineuse, l'antimoine s'accumule dans les tissus et l'excrétion du métal après traitement peut prendre plusieurs semaines. Ces espèces sont très toxiques et les doses thérapeutiques ne sont pas toujours tolérées. Les molécules contenant de l'antimoine trivalent lié à la partie organique par des atomes d'oxygène sont plus efficaces que leur équivalent

soufré, qui eux sont mieux tolérés (l'Astiban® et le Stibocaptate® peuvent être injectés par voie intramusculaire) [25]. La dose moyenne de ces composés est de 5 mg/kg par voie intramusculaire. Les taux de guérison du Stibophen® sont de 70 à 80% contre *S. haematobium* et de 60 à 70% contre *S. mansoni*. Pour le tartrate d'antimoine les taux de guérison contre *S. haematobium*, *S. mansoni* et *S. japonicum* sont respectivement de 80-90%, 75-90% et 40-75% [26].

Les dérivés de l'antimoine inhibent la phosphofructokinase (qui transforme le fructose-6-phosphate en fructose-1,6-diphosphate), enzyme glycolytique essentielle pour la production d'énergie nécessaire à la reproduction des schistosomes [27]. Ce phénomène se traduit par l'inhibition de l'ovulation des femelles et de la production des œufs. Une modification létale du protoplasme du schistosome est également observée. Un taux élevé de glycolyse étant également nécessaire pour maintenir les vers fixés aux parois des vaisseaux, l'administration de dérivés d'antimoine à des souris infectées par *S. mansoni* induit un détachement des vers et leur migration passive depuis les voies mésentériques vers le foie [28]. La phosphofructokinase des schistosomes est 80 fois plus sensible aux dérivés de l'antimoine que celle de l'homme.

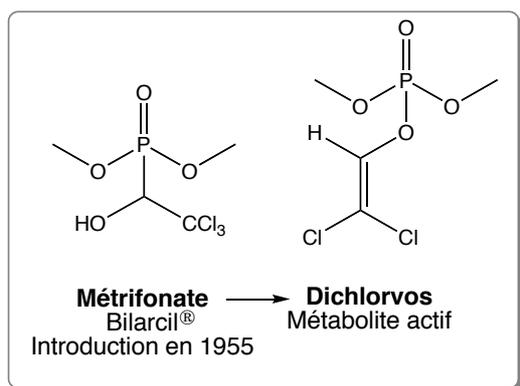
L'émétine

L'émétine a été utilisée pour la première fois dans la seconde décennie du XX^{ème} siècle pour le traitement de *S. japonicum*. L'efficacité était bonne, mais les doses nécessaires étaient à la limite de la toxicité [29].



Son dérivé 2,3-déshydroémétine présente une toxicité moindre. Cependant les patients traités avec ce composé étaient hospitalisés pendant un mois et recevaient des injections quotidiennes. Ce lourd traitement a conduit les médecins à l'abandonner, mais reste, toutefois, utilisé

pour l'amibiase. Le mécanisme d'action de l'émétine reste flou, toutefois, cette molécule semble inhiber la synthèse protéique au niveau de l'élongation de la chaîne [30].

Le métrifonate

En 1955 est introduit le métrifonate : un organophosphate essentiellement actif sur *S. haematobium*. Connue initialement comme insecticide sous le nom de trichlorfon et commercialisé sous Dipterex® ou Dylox®, il a été remplacé en 1969 par une préparation pharmaceutique de la société Bayer A.G. sous le

nom de Bilarcil®.

Le métrifonate en lui-même est inactif. En solution aqueuse à pH acide ou bien chez l'homme, il se transforme en dichlorvos DDVP [31]. Ce dernier, grâce à son groupement partant dichlorovinyle est capable d'estérifier la sérine du site actif de l'acétylcholinestérase de schistosome, ce qui est responsable de son activité. Cela se traduit par la paralysie de la musculature des vers (accumulation d'acétylcholine) qui entraîne leur détachement de la paroi des vaisseaux sanguins et leur migration vers le foie ou les poumons. Le DDVP est spécifiquement actif sur *S. haematobium*, ce qui est cohérent avec le fait que l'acétylcholinestérase de *S. haematobium* est inhibée à une concentration cent fois plus faible que la concentration nécessaire pour inhiber l'acétylcholinestérase de *S. mansoni* [32].

La dose moyenne de métrifonate est de 7,5 à 10 mg/kg par voie orale deux fois, à deux semaines d'intervalle. L'action de ce composé diminue la production d'œufs de 90 à 95% et supprime les symptômes de 44 à 93% des individus traités.

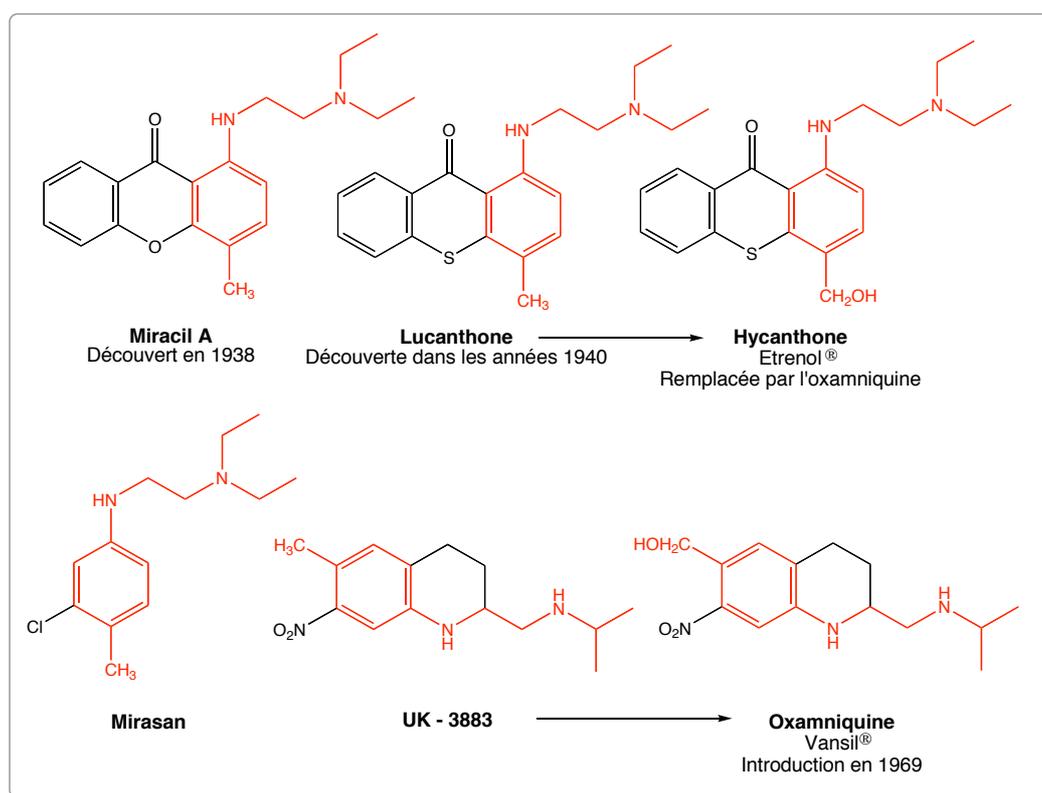
Dès 1987, les premiers signes de résistances au métrifonate apparaissent. L'exposition de mollusques, infectés par *S. haematobium*, au métrifonate produit des schistosomules beaucoup moins sensibles à la molécule *in vitro* [33]. Chez l'homme, une baisse constante de la réponse au métrifonate, de 79% en 1984 à 47% en 1993, a été enregistrée au Kenya [34]. Toutefois, le mécanisme de la résistance est inconnu.

Les composés aromatiques inspirés du miracil A

Un programme systématique de recherches de schistosomicides a commencé en 1932 chez Bayer (Eberfeld, Allemagne). Le Miracil A, a été trouvé en août 1938 ; par la suite, la lucanthone a été développée sur la base du même squelette carboné.

La lucanthone est une molécule active contre *S. mansoni* et *S. haematobium*. Le mode d'administration du médicament est important : par voie orale le composé est actif alors que par injection, aucune activité n'est notée. L'oxydation de la lucanthone par *Aspergillus*

sclerotiorum en hycanthonne restaure l'activité [35]. L'hycanthonne est active par voie orale et intramusculaire : une injection intramusculaire d'hycanthonne à 3,0 mg/kg induit une réduction du nombre de vers (*S. mansoni* ou *S. haematobium*) comprise entre 50 et 90%, mais génère immédiatement des effets secondaires indésirables (nécrose hépatique, vomissement, diarrhée, douleur abdominale, migraine, etc.) [26]. Pour des raisons de mutagénicité, l'hycanthonne a été abandonnée.



Toutes ces molécules sont caractérisées par un même squelette avec un groupement dialkylamino en *para* d'un méthyle (ou hydrométhyle) sur un cycle aromatique.

Le mirasan est un schistosomicide actif chez la souris mais pas chez le singe. Pour cette raison, il a été abandonné. Le développement de l'UK-3883 dans les années 1960 par la société Pfizer et son oxydation par *Aspergillus sclerotiorum* a permis l'introduction de l'oxamniquine en 1969 [29]. De la même manière qu'avec le couple hycanthonne/lucanthonne, les activités *in vitro* et *in vivo* sont notées pour l'oxamniquine et sont absentes avec l'UK-3883 qui est donc une prodrogue [36]. L'action de l'oxamniquine est sélective contre *S. mansoni*. La dose recommandée est de 12 à 15 mg/kg par voie orale [37]. Un point remarquable est qu'il existe une résistance croisée entre l'hycanthonne et l'oxamniquine [36]. Toutes ces observations laissent penser à un mode d'action commun à l'hycanthonne et à l'oxamniquine.

In vitro, l'oxamniquine et l'hycanthonne génèrent une inhibition irréversible de la synthèse des acides nucléiques chez les vers adultes sensibles de l'espèce *S. mansoni*. Cette inhibition est transitoire chez les schistosomes résistants : dès que la pression médicamenteuse est supprimée (*in vitro* ou *in vivo*) la synthèse des acides nucléiques se fait de nouveau. Cette inhibition transitoire peut s'expliquer par une intercalation de la molécule dans l'ADN, alors que l'inhibition irréversible serait due à une alkylation de l'ADN [38]. Cioli *et al.* proposent le mécanisme suivant (figure 4) :

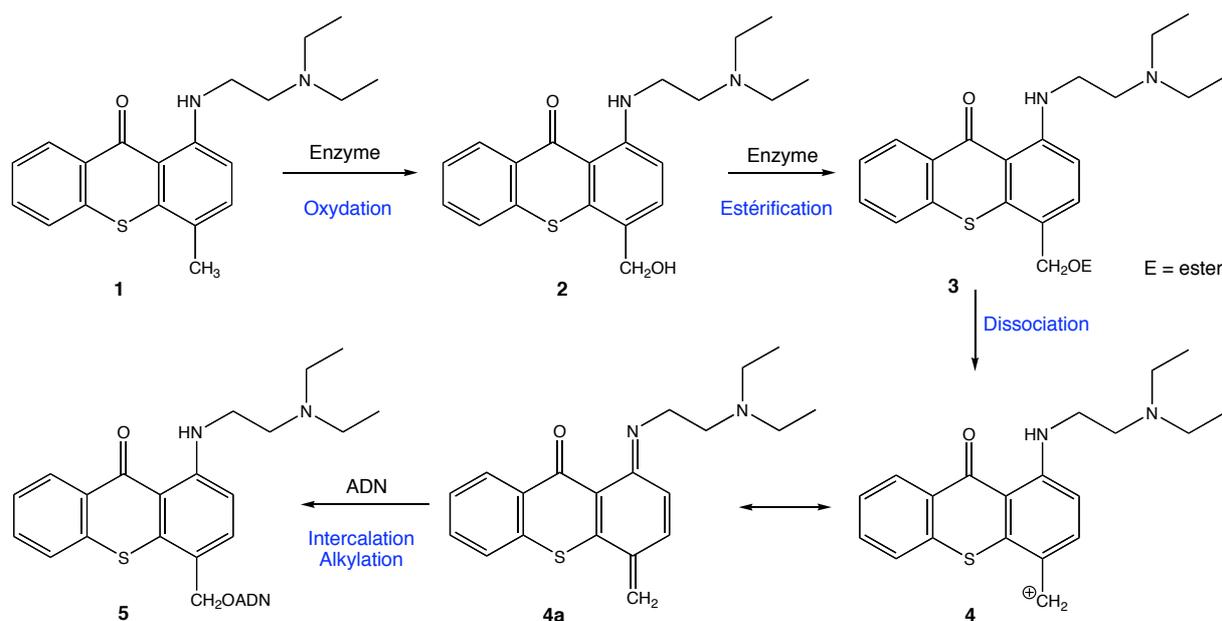


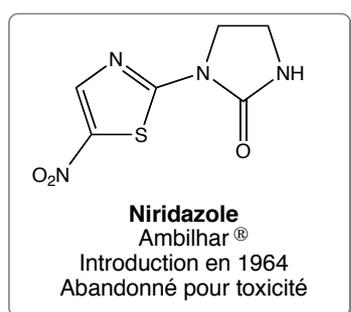
Figure 4 : Proposition d'un mécanisme d'action pour l'hycanthonne et la lucanthonne [38].

La biooxydation de l'hycanthonne **1** donne la lucanthonne **2** qui est convertie par une enzyme (une kinase ou une sulfotransférase) en un ester **3** (E étant un groupement phosphate ou sulfate respectivement). Dans tous les cas, l'ester **3** possède un bon groupement partant : une dissociation non enzymatique génère l'ion **4** ou le composé **4a** qui s'intercale et alkyle l'ADN pour donner le composé covalent **5**. Par la suite, un mécanisme similaire a été proposé pour l'oxamniquine [39]. Les schistosomes résistants à l'hycanthonne et l'oxamniquine manqueraient de certaines activités enzymatiques nécessaires pour transformer l'oxamniquine et l'hycanthonne en espèces alkylantes.

En 1971, Rogers *et al.* relatent le premier cas de résistance à l'hycanthonne obtenu au laboratoire [40]. L'induction de ces résistances est stable. Le premier cas de résistance de *S. mansoni* à l'hycanthonne sur le terrain a été découvert en 1973, chez des patients brésiliens [23]. Au laboratoire, les schistosomes issus des œufs de schistosomes de ces patients montraient également une résistance notable à l'oxamniquine. Il existe donc une résistance

croisée entre l'hycanzone et l'oxamniquine [23, 41]. La relative facilité à induire une résistance à l'hycanzone peut provenir de la nature hautement mutagène de cette molécule. Cette résistance croisée serait due à un seul gène récessif autosomique [42]. Ce phénomène permet de postuler un mécanisme d'action commun aux composés inspirés du miracil et une mutation génétique commune à l'origine de la résistance à l'hycanzone et à l'oxamniquine chez *Schistosoma*.

Le niridazole

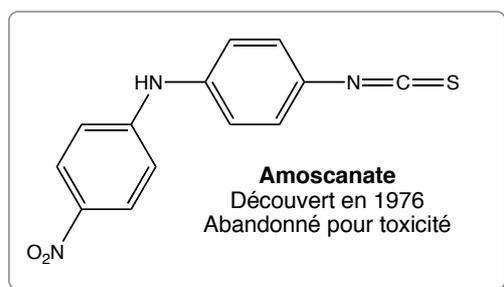


Le niridazole doté de propriétés antibactériennes [43] et produit en 1964 par la société Ciba-Geigy est actif contre *S. mansoni*, *S. japonicum*, mais l'efficacité est nettement plus forte contre *S. haematobium* [44]. La dose couramment administrée est de 25 à 30 mg/kg pendant 5 à 10 jours par voie orale. Le niridazole est un inhibiteur de la glycogène-phosphorylase.

Ceci se traduit par une baisse du taux de glycogène entraînant un mauvais fonctionnement du système reproductif des femelles [45]. L'usage du niridazole a été abandonné à cause de propriétés cancérogènes et mutagènes de la molécule observées après administration par voie orale. De plus de nombreux effets secondaires apparaissent avec la prise de ce médicament : hyperexcitabilité, agitations, hallucinations, pertes de connaissance, convulsions, dépressions, etc.

L'activité du niridazole a été attribuée à une réduction du groupement nitro *in vivo* [46]. Cependant, il semble que cette réduction n'ait lieu qu'en milieu anaérobie. L'activité de la molécule est variable selon l'origine des souches de *S. mansoni* [23]. De plus, un cas de résistance semble avoir été mis en évidence chez des patients égyptiens en 1966 [47].

L'amoscanate

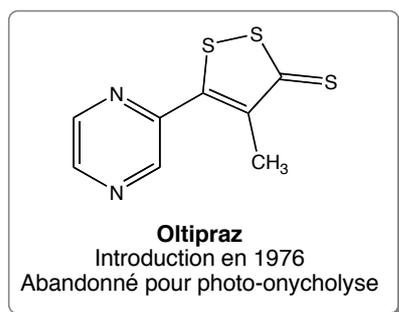


L'activité de l'amoscanate a été rapportée pour la première fois par Striebel en 1976. Chez la souris, l'amoscanate est plus efficace contre les infections dues à *S. japonicum* qu'à *S. mansoni* [48]. Chez l'homme, l'amoscanate a été testé intensivement en Chine. Des taux de guérison supérieurs à 92% étaient obtenus après une dose totale de 7 mg/kg (reçue en 3 fois, pendant 3 jours). Le composé est une molécule insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants

organiques dont l'activité est très dépendante de la granulométrie des particules. L'amoscanate a été abandonné pour des raisons de toxicité au niveau du foie mais aussi de perturbations au niveau du système nerveux central.

L'amoscanate se lierait de manière covalente aux protéines plasmatiques des schistosomes, via la fonction isothiocyanate pour former des thio-urées [49].

L'oltipraz

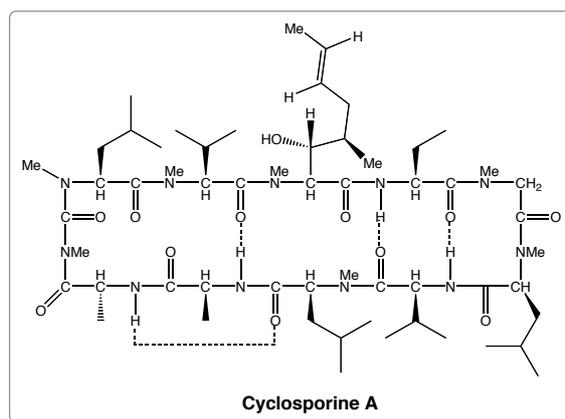


Synthétisé en 1976 par les laboratoires Rhône-Poulenc, l'oltipraz est aussi actif contre *S. haematobium* (90% de guérison chez les patients traités à la dose de 25 mg/kg répartie sur 1 ou 2 jours), *S. intercalatum* (dose totale de 1,2 à 4,5 mg sur 3 jours) et *S. mansoni*, mais est inactif contre *S. japonicum*. Insoluble dans l'eau et soluble dans les lipides, sa biodisponibilité est accrue par l'absorption concomitante de nourriture. La DL₅₀ chez les souris est très élevée (5000 mg/kg) ; aucun effet secondaire toxique à long terme n'a été rapporté. Toutefois, l'observation de plusieurs cas de photo-onycholyse (perte des ongles) ont conduit Rhône-Poulenc à abandonner ce médicament [29].

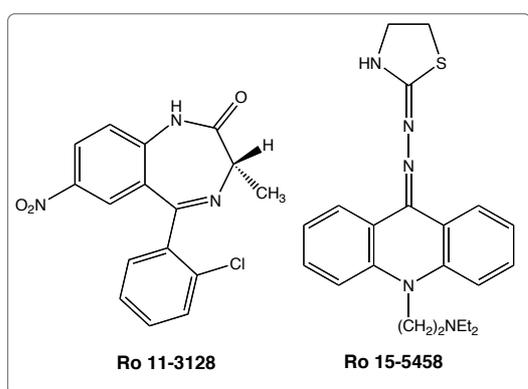
Après administration de cette molécule à effet lent, une baisse transitoire du taux de glutathion (GSH) des schistosomes précède la migration des parasites vers le foie [39, 50]. Une baisse des activités de GSH-S-transférase et de GSH-réductase est également notée [51]. En revanche, l'activité des enzymes métaboliques du GSH chez les mammifères est augmentée de 4 à 6 fois [52]. En outre, l'inhibition de la cancérogenèse induite par différents agents, dans différents organes cibles par l'oltipraz a été observée [53]. Toutefois, les propriétés anticancéreuses de l'oltipraz sont insuffisantes pour en faire un médicament anticancéreux utilisable.

La cyclosporine A

À titre anecdotique, l'activité antiparasitaire de la cyclosporine A (agent immunosuppresseur) a été découverte par Bueding *et al.* en traitant des souris, infectées par *S. mansoni*, dans le but d'inhiber la formation des granulomes [54]. Toutefois, l'effet antiparasitaire de la cyclosporine A n'est pas spécifique : observation d'une activité antiparasitaire contre le paludisme, la leishmaniose, la toxoplasmose, etc.



Ro 11-3128 et Ro 15-5458



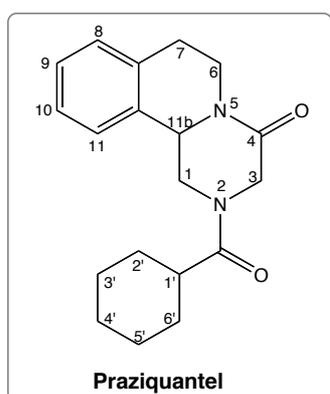
Plus de 400 molécules inspirées de benzodiazépines ont été évaluées par Hoffmann-La Roche pour leur activité antischistosomose. Parmi ces molécules, Ro 11-3128 et Ro 15-5458 sont les plus actives. Cependant des doses de l'ordre de 80 mg/kg sont nécessaires pour guérir les souris et les hamsters infectés par *S. mansoni* et *S. haematobium* [29]. Chez l'homme, Ro 11-

3128 guérit les patients à la dose de 0,2 à 0,3 mg/kg. Cependant une dose supérieure à 0,1 mg/kg a un fort effet sédatif tel que cette molécule est inutilisable.

Le mirazide

Le mirazide est une préparation à base de myrrhe (collectée en Somalie et Péninsule Arabique) commercialisée en Egypte depuis 2001. Ce produit est proposé comme schistosomicide [55], cependant son efficacité fait l'objet de controverse [56].

III.2 – Le praziquantel



Aujourd'hui, le praziquantel est pratiquement le seul médicament pour le traitement des schistosomiasis. Il est très actif contre toutes les espèces de *Schistosoma*, n'entraîne aucun effet secondaire. Il peut être administré par voie orale et son coût est très bas (0,2 USD pour traiter un enfant) [57].

Historique

Le système pyrazino-isoquinoléine a d'abord été exploré par Merck pour le développement de produits tranquillisants. L'activité antihelminthique a été découverte conjointement en 1972 par E. Merck et Bayer A.G. Initialement référencé sous le nom "EMBAY 8440", le praziquantel, actif contre les cestodes, est utilisé par les vétérinaires sous le nom de Droncit®. L'activité antischistosomiasis a été testée chez les animaux en 1977, suivie par les tests toxicologiques et pharmacologiques chez l'animal et l'homme dès 1978. Le praziquantel est aujourd'hui disponible pour le traitement des schistosomiasis sous le nom de Biltricide®. En 1983, la compagnie coréenne, Shin Poong, développe une nouvelle méthode de synthèse du praziquantel, obtient un brevet de procédé pour son produit, avec pour conséquence l'ouverture du marché à la compétition et la réduction du prix du médicament [58]. En 1987, EIPICO commence la production du praziquantel en Égypte sous une licence de Shin Poong, suivi par d'autres producteurs dans différents pays. Aujourd'hui, plusieurs génériques du praziquantel existent : Distocide®, Bilharzid®, Prazitel®, Piquiton®.

Les comprimés de praziquantel contiennent généralement 600 mg de substance active et sont sécables en 3 ou 4 parties. Une préparation sous forme de sirop (600 mg/ 5 mL) est également disponible pour les jeunes enfants.

Activité du praziquantel (PZQ)

Le praziquantel ou 2-(cyclohexylcarbonyl)-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1a]isoquinoléin-4-one, est une poudre cristalline inodore, avec un goût acide, stable et quasiment insoluble dans l'eau. Les deux groupements essentiels à l'activité de la molécule sont le groupement oxo en position 4 et le groupement acyle en position 2 [29, 59]. L'activité maximale est obtenue avec un groupement cyclohexylcarbonyle en position 2, mais des substituants *para*-aminobenzoyle ou benzoyle ont aussi une certaine activité.

Le praziquantel possède un centre chiral en position 11b ; la préparation commerciale est un mélange racémique des isomères 11b(R) et 11b(S). Seul l'énantiomère *levo* est doté d'une activité antischistosomiasis. Cette particularité se retrouve chez d'autres antihelminthiques (tétramisole, lévamisole, etc.) où un seul des isomères présente une activité antihelminthique [60]. Les deux énantiomères du praziquantel ont la même toxicité et la dose recommandée est de 40 mg/kg de praziquantel racémique, mais une dose de 20 mg/kg de l'énantiomère 11b(R) induit les mêmes résultats [61, 62]. Les différences pharmacodynamiques et pharmacocinétiques, entre les deux énantiomères, ont été montrées [60]. *In vitro*, le R(-)-PZQ est 350 fois plus efficace que le composé racémique. Le S(+)-PZQ

est dépourvu d'activité. Après administration orale du praziquantel racémique, les seuls composés dosables dans le plasma sont le métabolite 11b(R)-*trans*-4'-hydroxypraziquantel qui possède lui aussi une activité schistosomicide et l'énantiomère inactif 11b(S)-PZQ [63, 64].

La dose de praziquantel utilisée pour traiter des souris infectées par *Schistosoma* est environ 35 fois supérieure à la dose utilisée chez l'homme [65]. Par ailleurs, l'efficacité est supérieure lorsqu'on fractionne la dose de la molécule. Chez la souris, le même effet est obtenu avec une dose orale totale 6 fois plus faible lorsque cette dose est fractionnée en 10 prises horaires [66]. De plus, la biodisponibilité du PZQ est accrue par l'absorption concomitante de nourriture [67].

Toxicité du praziquantel

Le pouvoir mutagène de la drogue a été étudié en profondeur *in vitro* : aucune mutation ponctuelle, aucune réparation d'ADN, aucune mutation récessive létale associée au sexe n'ont été enregistrées [68]. Chez l'animal, le praziquantel est dénué d'effets toxiques : la toxicité aiguë pour le rat et le chien est très faible comparée à celle d'autres schistosomicides. Les rats tolèrent des doses quotidiennes de 1000 mg/kg/j pendant quatre semaines et les chiens 180 mg/kg pendant 13 semaines sans conséquence sur les organes. Il ne perturbe nullement la reproduction chez le rat (jusqu'à la deuxième génération) et aucun effet tératogène n'a été noté chez le rat, la souris et le lapin [69]. Les examens biologiques et les paramètres hématologiques montrent que les souris fortement infestées par *S. mansoni* supportent bien un traitement au praziquantel [70]. Chez l'homme, la molécule est très bien tolérée : les études cliniques montrent que l'administration par voie orale de 1 x 20 ou 3 x 25 mg/kg/j de PZQ n'induit aucun effet toxique.

Métabolisme du praziquantel

L'absorption du praziquantel, après traitement par voie orale, est très rapide (la concentration maximale dans le sérum est atteinte en une à deux heures). Les métabolites identifiés dans le plasma après administration par voie orale sont des dérivés hydroxylés (figure 5). Le composé 6 monohydroxylé en position 4' est le métabolite majoritaire (2/3 des métabolites). *In vitro*, le 11b(R)-PZQ et le 11b(R)-*trans*-4'-hydroxypraziquantel ont la même activité sur *S. mansoni* [64]. Chez le volontaire sain, après administration de PZQ racémique par voie orale, le rapport 11b(R)-/11b(S)-*trans*-4'-hydroxypraziquantel est de 70/30.

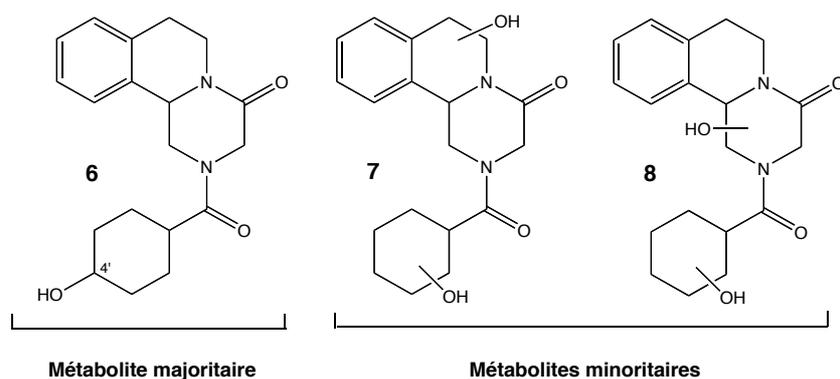


Figure 5 : Structure des métabolites du praziquantel [59].

L'élimination du médicament se fait principalement par l'urine (80%) et moins de 1% de praziquantel inchangé est excrété.

Action du praziquantel sur les parasites

Deux phénomènes sont observés chez les trématodes et les cestodes exposés au praziquantel : une contraction quasiment instantanée de la musculature des parasites accompagnée de leur migration passive vers le foie et une rapide vacuolisation du tégument. *In vitro*, ces effets sont observables 30 secondes après l'exposition à la drogue à des concentrations de 10^{-6} M (concentrations équivalentes aux concentrations de praziquantel dans le sérum après des doses thérapeutiques). *In vivo*, *S. mansoni* et *S. japonicum* migrent des voies mésentériques vers le foie, quelques minutes après l'administration orale de PZQ et la vacuolisation du tégument est observée dès 15 minutes post-traitement.

Moment d'action du praziquantel

L'efficacité du praziquantel se manifeste surtout sur les parasites matures [71]. Chez l'animal, les schistosomes montrent une sensibilité biphasique au praziquantel : les premiers stades larvaires (1^{ère} semaine post-infestation) sont sensibles à la molécule. Cette susceptibilité diminue dès la fin de la deuxième semaine chez *S. mansoni* jusque vers la cinquième semaine (moment où apparaissent les premiers œufs de cette espèce) puis augmente graduellement, pour donner la seconde phase de sensibilité à partir de la sixième semaine [72, 73]. Chez *S. japonicum*, la première phase d'efficacité du praziquantel est beaucoup plus courte (inférieure à 3 jours). Par contre elle est plus longue chez *S. haematobium* de même que la production des œufs (10-12 semaines post-infestation). Chez *S. haematobium*, l'activité maximale du praziquantel est observée vers la 7^{ème} semaine. Elle est donc plus précoce que la ponte des œufs [74].

L'inactivité du médicament sur les stades jeunes est un réel problème : dans les zones où la réinfection est importante, le traitement au praziquantel est insuffisant.

Domages infligés aux parasites

Les mâles et les femelles non matures (= non appariés) sont moins (ou pas) sensibles au praziquantel. Cette insensibilité peut venir du fait que ces parasites sont localisés dans le foie et non dans les vaisseaux [71].

In vitro et à des concentrations micromolaires, le praziquantel entraîne une contraction du tégument [75], une paralysie de la musculature des parasites matures, accompagnées de spasmes [76]. Ces effets sont quasiment immédiats et réversibles dès que la drogue est retirée. Les inhibiteurs de neurotransmetteurs (comme la 5-hydroxytryptamine, le carbachol, le spiroperidol, l'acide bromosilergique diéthylamide et l'atropine) n'ont aucune influence sur la contraction des vers induite par le PZQ, ce qui indique que la molécule exerce son effet directement sur la musculature du ver et non pas sur des sites neuromusculaires ou neuronaux. En outre, la contraction due au PZQ est inhibée quand les vers sont incubés dans un milieu exempt d'ions Ca^{2+} , ou dans un milieu contenant un fort excès d'ions Mg^{2+} [75]. De plus, l'utilisation de $^{45}Ca^{2+}$ a permis de montrer que le PZQ induit un afflux rapide de calcium à l'intérieur du parasite. Le méthoxyvérapamil, inhibiteur d'une classe de canaux à calcium des mammifères, ne bloque pas l'afflux de calcium chez les schistosomes [77]. Cette observation semble indiquer une sélectivité de l'action du PZQ sur les canaux calciques des schistosomes.

Parallèlement à la contraction musculaire, des altérations morphologiques du parasite sont observées 30 secondes après l'exposition des vers au médicament. En présence de 1 μM de PZQ, les parasites mâles ont une vacuolisation à la base du tégument et des boursouffures sur la surface du corps [64]. Ces altérations sont inhibées par l'incubation des parasites dans un milieu exempt d'ions Ca^{2+} et sont spécifiquement induites par le 11b(R)-PZQ. De plus, un certain nombre d'altérations du métabolisme des vers exposés au praziquantel a été décrit [65]. À forte concentration de PZQ (10^{-3} M), l'assimilation de glucose, l'excrétion de lactate et la quantité de glycogène sont toutes les trois diminuées. Néanmoins, à faible concentration (10^{-7} M) le PZQ augmente l'assimilation du glucose. À 10^{-5} M de PZQ, les effets stimulateurs de la sérotonine sur le métabolisme des carbohydrates des schistosomes sont inhibés.

Aucun effet sur le métabolisme des acides nucléiques n'est rapporté, mais une baisse de la concentration de diverses enzymes (phosphatase alcaline, ATPase) voire l'inhibition de leur activité (acétylcholinestérase) est notée [29]. Ces résultats suggèrent une action du PZQ sur le métabolisme des carbohydrates.

Mécanisme d'action du praziquantel

Le mécanisme d'action moléculaire du praziquantel n'a pas encore été élucidé à l'échelle moléculaire. L'événement central de l'activité du praziquantel est **l'afflux d'ions calcium dans le tégument**. Toute augmentation de la concentration en Ca^{2+} intratégumentaire entraîne une augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique, susceptible d'induire la contraction des parasites [78]. Les effets du praziquantel sur l'homéostasie du calcium sont peut-être dus à une action directe de la molécule sur la perméabilité de la membrane vis-à-vis du calcium. Le praziquantel n'agit pas comme un ionophore de Ca^{2+} . Il agit soit sur la structure biphasique phospholipidique de la membrane soit sur sa fluidité [79]. Les sites d'action du PZQ pourraient donc être des canaux calciques sensibles au voltage.

In vitro, l'exposition des schistosomes mâles adultes au PZQ s'accompagne d'une augmentation de l'exposition des antigènes des schistosomes à la surface du tégument [80]. *In vivo*, chez des souris déficientes en anticorps, l'activité antischistosomiasis du praziquantel est fortement réduite, voire inexistante [81]. En revanche, l'activité du composé est restaurée quand du sérum contenant des anticorps est injecté en même temps que la molécule. Une glycoprotéine de 200 kDa localisée dans les tubercules des parasites serait directement impliquée dans l'action synergique du praziquantel sur la réponse immunitaire de l'hôte (figure 6) [82, 83].

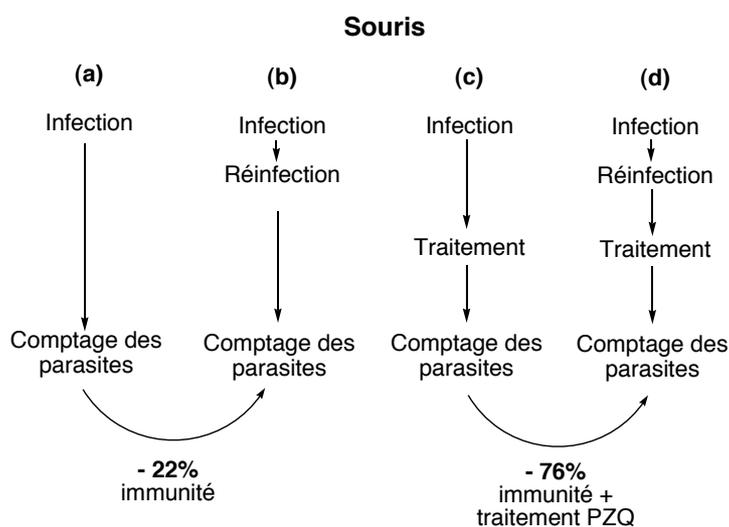


Figure 6 : Expérience montrant la synergie praziquantel/anticorps de l'hôte d'après [83].

Des souris ayant subi une primo-infection par *S. mansoni* sont réinfectées puis traitées au PZQ (d, figure 6). Ces souris présentent, par rapport aux souris non immunisées (c, figure

6) une réduction du nombre de vers supérieure à la réduction observée entre souris immunisées (b, figure 6) et non immunisées (a, figure 6) n'ayant pas reçu de traitement au praziquantel. De plus, le taux d'anticorps total chez les animaux réinfectés et traités au PZQ (d, figure 6) est plus important que chez les animaux réinfectés et non traités (b, figure 6). Au vu de ces résultats, il semble donc que l'efficacité du PZQ soit médiée par le système immunitaire de l'hôte. Cependant le mécanisme de cette synergie est actuellement inconnu.

Échecs thérapeutiques

Le bas coût du prix des traitements au praziquantel a entraîné une généralisation de son utilisation. Les isolats sont considérés comme résistants lorsque la dose nécessaire pour tuer 50% des vers adultes (DE_{50}) chez la souris infectée est 3 à 5 fois plus élevée que celle utilisée sur les isolats sensibles. Ainsi pour des isolats sensibles, la DE_{50} de PZQ maximale est de 100 mg/kg/j pendant 5 jours consécutifs [84].

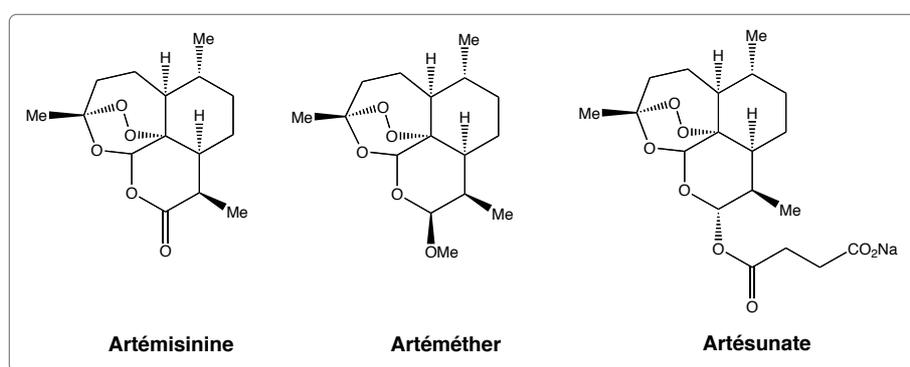
En 1994, la première souche résistante au PZQ est développée au laboratoire en mélangeant quatre différents isolats géographiques (Porto Rico, Brésil, Kenya et Égypte) de *S. mansoni* de manière à maximiser le nombre de gènes accessibles pour une mutation et/ou une sélection [85]. Les souris infectées avec ce pool de souches sont traitées avec des doses orales subcuratives de PZQ, juste avant que les œufs n'apparaissent dans les fèces, et les parasites survivants sont utilisés pour d'autres inoculations. Après sept passages de sélection avec des doses croissantes de praziquantel, 93% des vers survivent à trois doses de 300 mg/kg, un traitement qui ne laisse que 10% de survivants chez la souche mère. Cette résistance est stable, non croisée avec la résistance à l'oxamniquine.

Une étude égyptienne de 1995 semble mettre en évidence 3 isolats de patients ayant une sensibilité faible au PZQ, conduisant à un échec thérapeutique pour ces 3 patients [86]. Cependant dans les 10 années suivant cette étude, malgré l'utilisation intensive du PZQ dans cette région, la prévalence des infections dues à *S. mansoni* a baissé indiquant clairement qu'il ne s'agit pas d'une résistance sélectionnée par le PZQ [87]. Une étude similaire au Sénégal montre également une baisse de l'activité du PZQ (40% des patients sont complètement guéris après une dose orale de PZQ alors qu'un taux de guérison de 80% est obtenu quand les patients sont traités à l'oxamniquine) [22, 88]. Chez 2 voyageurs espagnols de retour du Mali et du Sénégal, porteurs d'infections dues à *S. haematobium*, cinq fois la dose habituelle de PZQ (40 mg/kg) a été nécessaire pour éradiquer l'infection [89].

Il semble donc que les souches de *S. mansoni* et *S. haematobium* présentent une sensibilité (innée ou acquise ?) relativement variable au praziquantel. Par ailleurs, le statut

immunitaire de l'hôte jouant aussi un rôle, le traitement de l'hôte doit être adapté en fonction de chaque individu et en fonction des souches infectantes. La généralisation de l'utilisation du PZQ, l'obtention en laboratoire de souches résistantes à cette molécule, ainsi que quelques cas d'échecs thérapeutiques font craindre le développement de résistances importantes, susceptibles d'inhiber l'activité de ce médicament majeur. Toutefois, le praziquantel est toujours la molécule de choix pour le traitement des différentes schistosomoses et il ne serait pas actuellement justifié d'interrompre ou de réduire son utilisation.

Activité des dérivés de l'artémisinine



Comme nous l'avons déjà indiqué, les schistosomiasis sont dues à des parasites sanguins qui se nourrissent de l'hémoglobine de l'hôte. Ce sont des maladies importantes dans lesquelles l'hème, libéré par la dégradation de l'hémoglobine, joue un rôle important. En effet, l'hème-fer(II) libre et toxique est agrégé en un pigment similaire à l'hémozoïne formée par *Plasmodium* dans le cas du paludisme. Ces similitudes ont fait naître l'idée d'utiliser un trioxane actif contre *Plasmodium* et connu pour interagir avec l'hème comme schistosomicide. Parmi les molécules présentant un effet schistosomicide, les dérivés de l'artémisinine (partie 1, chapitre 1), ont montré une efficacité sur les stades immatures des parasites. Toutefois, les doses nécessaires sont telles que ces **dérivés ne peuvent être administrés seuls**.

Rôle de l'hème

In vitro, les schistosomes sont exposés à l'artéméthér à des concentrations inférieures ou égales à 67 μM avec 80 à 160 μM d'hème. Une baisse graduelle de l'activité motrice des vers, une dilatation de l'intestin et finalement la mort des parasites sont observées. Des observations similaires ont été faites sur les trois espèces de schistosomes (*S. japonicum*, *S. haematobium* et *S. mansoni*) mais les effets sont plus rapides sur les adultes de *S.*

haematobium que sur les adultes des deux autres espèces. En revanche, rien n'est observé quand les vers sont soumis à l'un des deux partenaires seulement.

Activité in vivo des dérivés de l'artémisinine

Chez le lapin infecté par *S. japonicum*, 90 à 94% des schistosomules âgées de 5 à 14 jours sont éliminées après 3 doses orales de 15 mg/kg d'artéméther [90]. Chez la souris traitée avec des doses de 225 à 435 mg/kg pendant 3 jours, les meilleurs taux de guérison des parasites sont obtenus sur des schistosomules de *S. mansoni* âgées de 14 à 28 jours, ce qui est cohérent avec le fait que le développement de *S. mansoni* est plus long que celui de *S. japonicum* [91]. L'efficacité de ces dérivés est donc retardée par rapport à *S. japonicum*. L'effet de ces molécules a également été montré contre les schistosomules de moins de 28 jours de *S. haematobium* chez des hamsters (300 mg/kg) [92]. Néanmoins, l'administration répétée d'artéméther à forte dose présente un certain effet sur les parasites adultes. L'artésunate a également été testé [93] mais les résultats sont moins bons qu'avec l'artéméther.

Des études sur le terrain ont également montré l'activité de ces dérivés. Après un traitement initial au praziquantel destiné à éliminer les parasites adultes, des patients infectés par *S. japonicum* en Chine [94] ou en Côte d'Ivoire [95] reçoivent 6 (Côte d'Ivoire) à 11 doses (Chine) d'artéméther (6 mg/kg) à intervalles de temps réguliers. Dans les 2 cas, la prévalence de la maladie a été réduite de 50% (Côte d'Ivoire) à 93% (Chine). De plus, l'étude chinoise indique que l'effet protecteur de l'artéméther se traduit par le fait que plus de 99% des personnes traitées n'excrètent pas d'œufs à la fin de la saison de transmission de la maladie, ce qui indique l'absence d'infection. L'étude ivoirienne révèle également une diminution de 25% de l'incidence de la maladie chez les patients ayant reçu de l'artéméther par rapport aux patients ayant reçu un placebo.

Complémentarité praziquantel-artéméther

Le praziquantel est principalement actif sur les vers adultes alors que l'artéméther est plus actif sur les schistosomules. Les deux pharmacophores sont complémentaires (figure 7) [96]. Un traitement praziquantel/artéméther couvre la totalité de la durée de vie du parasite chez l'hôte vertébré et tue en principe tous les stades du parasite.

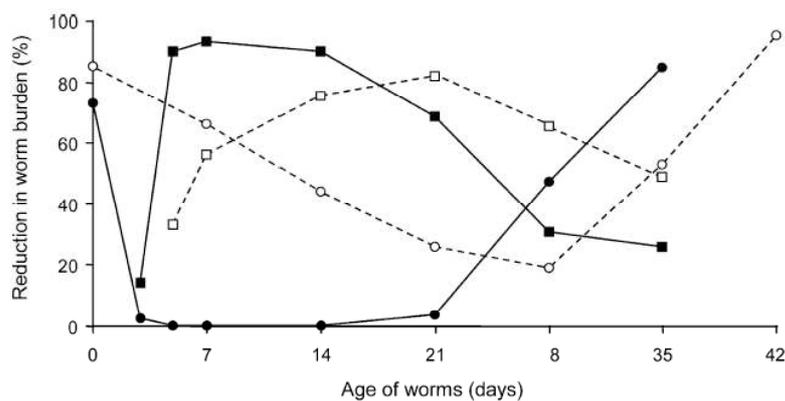


Figure 7 : Susceptibilité des différents stades larvaires de *S. japonicum* au praziquantel (-●-) et à l'artéméthér (-■-) de même que la susceptibilité des différents stades larvaires de *S. mansoni* au praziquantel (---o---) et à l'artéméthér (---□---) [96].

La combinaison des deux molécules entraîne une réduction du nombre de vers supérieure à chacune des deux drogues séparément. Chez les personnes constamment réinfectées, tous les âges des parasites sont présents à un instant t, d'où l'intérêt d'associer des médicaments actifs sur des stades différents tels que le PZQ et l'artéméthér.

Chez le lapin, infecté par des stades d'âges divers, les monothérapies avec le praziquantel (50 mg/kg) et l'artéméthér (15 mg/kg) par voie orale induisent une réduction du nombre de vers de 66 et 44% respectivement, alors que la combinaison des deux médicaments induit une réduction du nombre de parasites de 82% [97]. Des études analogues ont été effectuées chez le hamster [98] et la souris [99]. Au vu de ces résultats, il a été suggéré que la bithérapie (praziquantel/artéméthér) soit utilisée pour le traitement des schistosomiasis dues à *S. japonicum*.

Les zones d'endémie des schistosomiasis et du paludisme sont en majeure partie les mêmes. L'utilisation intensive de dérivés de l'artémisinine pour traiter les schistosomiasis présente le risque de faire naître des résistances de *Plasmodium* à ces dérivés. En ce sens, nous avons imaginé la synthèse de molécules duales praziquantel-trioxane.

III.3 – Les traitements du futur

Les personnes exposées en zone d'endémie sont sujettes aux réinfections : 6 à 8 mois après le traitement en masse de la population avec divers schistosomicides, la prévalence de la maladie est revenue à son niveau initial. Un vaccin et de nouvelles stratégies de contrôle de la maladie (nouveaux médicaments, nouvelles installations sanitaires, etc.) sont nécessaires.

Quel que soit le traitement envisagé, une réduction du nombre de vers supérieure à 80-85% est nécessaire.

Le vaccin

La vaccination peut cibler soit la prévention de l'infection, soit la réduction de la fécondité du parasite. Comme les œufs sont responsables à la fois de la pathologie et de la transmission, un vaccin qui aurait pour cible la fécondité du parasite et la viabilité des œufs serait une solution de choix [100]. Deux voies sont envisagées :

À partir d'antigènes isolés de schistosomes

Divers essais sur animaux utilisant des protéines de *Schistosoma* ont conduit à une réduction du nombre d'œufs par rapport aux animaux non traités [101]. Cette réduction atteint 50 à 60% chez le cochon dans le cas d'un traitement à la glutathion-S-transférase Sj26SGT de *S. japonicum*. Un vaccin à base de glutathion-S-transférase Sh28GST de *S. haematobium*, connu sous le nom de Bilhvax, est actuellement au plan II d'essais cliniques [102]. Ce vaccin aurait des effets anti-fécondité contre les femelles de *S. haematobium*. Par ailleurs, l'injection d'une paramyosine Sj97 de *S. japonicum* à des souris ou des moutons confère une protection contre de nouvelles infections par cette espèce comprise entre 69 et 80% [101, 103].

À partir de cercaires irradiées

Les premières études sur les cercaires irradiées datent de plus de 40 ans [104]. Des cercaires irradiées pénètrent la peau de l'hôte, migrent beaucoup plus lentement que des larves intactes, génèrent des schistosomes immatures qui meurent [105]. Cependant, la période de protection est limitée de 7 à 30 jours post-vaccination.

Ces deux types de vaccins sont à l'heure actuelle spécifiques d'une espèce de schistosome. Malgré les progrès sur différents points, de nombreux efforts doivent être faits en ce qui concerne la longévité du vaccin. Par ailleurs, sa production en grande quantité et sa conservation présentent des difficultés évidentes.

Les éventuels médicaments

L'activité (modeste) de l'artémisinine sur les schistosomes a conduit les auteurs travaillant dans le domaine des peroxydes antipaludiques à tester également leurs composés sur schistosomes. Ainsi, Zhang *et al.* décrivent l'activité de dérivés hémisynthétiques de l'artémisinine, dans lesquels le 1,2,4-trioxane est remplacé par un trioxolane (figure 8) [106].

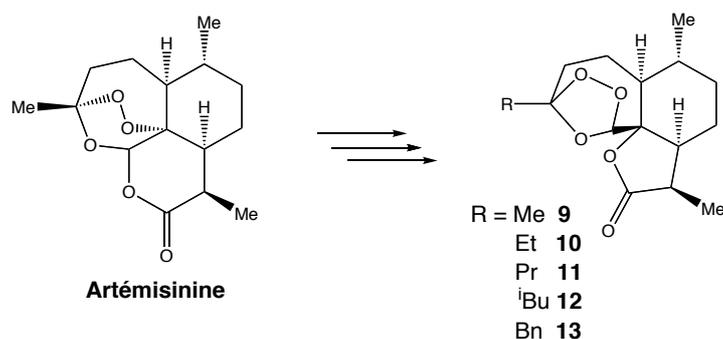
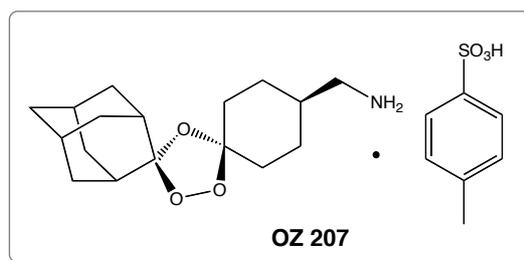


Figure 8 : Structures des ozonides dérivés de l'artémisinine [106].

Chez les souris infectées par *S. mansoni*, traitées à 30 jours post-infestation, les activités des composés **9** à **13** sont faibles, mais du même ordre de grandeur que celle de l'artémisinine. La dose de 300 mg/kg induit une réduction du nombre de vers de 30 à 60% (considérée comme largement insuffisante pour une utilisation en monothérapie). Il est intéressant de noter que plus le groupement R est encombrant, plus l'activité est faible. Ce résultat suggère que le peroxyde doit rester accessible, par exemple pour une activation réductrice par l'hème. Cependant, de tels composés nécessitent plusieurs étapes de synthèse à partir de l'artémisinine, produit naturel dont nous savons que l'approvisionnement est limité.

Vennerstrom a décrit, principalement pour leur activité antipaludique, des trioxolanes totalement synthétiques. L'activité antischistosomiasis de ces composés a aussi été testée sur des souris infectées par *S. japonicum* [107]. Le " chef de file " de cette série (OZ207) à la dose unique de 400 mg/kg présente une activité un peu supérieure à celle de l'artémisinine (84% de réduction du nombre de vers contre 62% pour un traitement à 30 jours post-infestation). Il est notable qu'OZ207 induit également 80% de réduction du nombre de vers à la dose unique de 200 mg/kg lorsque le traitement est effectué 7 jours post-infestation (l'effet de l'artémisinine dans ces conditions n'est pas donné). Dans tous les cas, les doses nécessaires pour un effet satisfaisant (80 à 85% de réduction du nombre de vers) sont très élevées.



Force est de constater la faible activité des peroxydes utilisés seuls sur schistosomes. En revanche une véritable action synergique entre le praziquantel et les dérivés de l'artémisinine a été mise en évidence. De plus, une polythérapie est actuellement recommandée dans tous les cas d'infection sévère à la fois pour augmenter l'efficacité du

traitement mais également pour diminuer les risques d'apparition de résistances. Sur la base des trioxaquines®, molécules duales trioxane-quinoléine, efficaces dans le traitement du paludisme [108-111], nous avons imaginé une nouvelle classe de composés hybrides entre le praziquantel et les trioxanes. Le motif 1,2,4-**trioxane**, responsable de l'activité de l'artémisinine et le noyau pyrazino-isoquinoléine, responsable de l'activité du praziquantel, sont liés de manière covalente, pour donner la famille des **trioxaquantels** (figure 9).

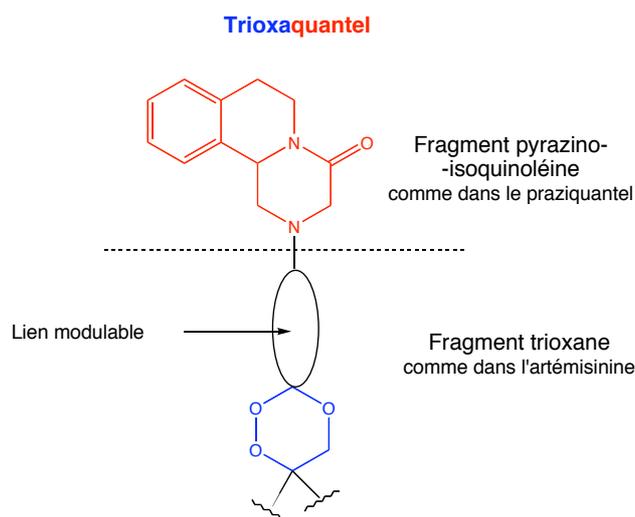


Figure 9 : Structure des trioxaquantels.

L'association des deux pharmacophores doit permettre à un instant t d'éliminer tous les stades de schistosomes présents chez un individu. De plus, il est possible d'obtenir un effet synergique entre les propriétés d'alkylation du peroxyde après activation par l'hème et l'effet propre au praziquantel. L'intérêt de lier de manière covalente les deux pharmacophores est de faciliter la prise du composé comparé à une situation où les deux pharmacophores devraient être pris séparément.

La 3^e partie de ce mémoire décrit la synthèse de différents trioxaquantels, la résolution de chacun des stéréoisomères et l'évaluation de leur activité *in vivo* sur des souris infectées par *Schistosoma mansoni*.

IV – BIBLIOGRAPHIE

- [1] Chitsulo L. Schistosomiasis mission to the People's Republic of China. *TDR news* **2005**, 75, 4-5.
- [2] http://www.schisto.org/Schistosomiasis/global_distribution.htm
- [3] Patz J.A., Graczyk T.K., Geller N., Vittor A.Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int. J. Parasitol.* **2000**, 30, 1395-1405.
- [4] Ross A.G.P., Bartley P.B., Sleigh A.C., Olds G.R., Li Y., Williams G.M., McManus D.P. Schistosomiasis. *N. Engl. J. Med.* **2002**, 346, 1212-1220.
- [5] Chitsulo L., Loverde P., Engels D. Focus: Schistosomiasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, 2, 12-13.
- [6] Thomas C. Cheng " General Parasitology ", 2nd edition, Academic Press 1986.

- [7] Jauréguiberry S., Perez L., Paris L., Bricaire F., Danis M., Caumes E. Bilharzioses invasives. *Presse Med.* **2005**, *34*, 1641-1645.
- [8] Corachan M. Schistosomiasis and international travel. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *35*, 446-450.
- [9] Stirewalt M.A., Hackey J.R. Penetration of host skin by cercariae of *Schistosoma mansoni*. Observed entry into skin of mouse, hamster, rat, monkey and man. *J. Parasitol.* **1956**, *42*, 565-580.
- [10] Stirewalt M.A., Kruidenier F.J. Activity of the acetabular secretory apparatus of cercariae of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions. *Exp. Parasitol.* **1961**, *11*, 191-211.
- [11] Zussman R.A., Bruman P.M., Petruska J.C. The role of ingested hemoglobin in the nutrition of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **1970**, *56*, 75-79.
- [12] Brindley P.J., Kalinna B.H., Dalton J.P., Day S.R., Wong J.Y.M., Smythe M.L., McManus D.P. Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, *89*, 1-9.
- [13] Lawrence J.D. The ingestion of red blood cells by *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **1973**, *59*, 60-63.
- [14] Timms A.R., Bueding E. Studies of a proteolytic enzyme from *Schistosoma mansoni*. *Brit. J. Pharmacol.* **1959**, *14*, 68-73.
- [15] Rogers W.P. Haematological studies on the gut contents of certain nematode and trematode parasites. *J. Helminthol.* **1940**, *18*, 53-62.
- [16] Kloetzel K., Lewert R.M. Pigment formation in *Schistosoma mansoni* infections in the white mouse. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1966**, *15*, 28-31.
- [17] Homewood C.A., Jewsbury J.M., Chance M.L. The pigment formed during haemoglobin digestion by malarial and schistosomal parasites. *Comp. Biochem. Physiol.* **1972**, *43*, 517-523.
- [18] Oliveira M.F., d'Avila J.C.P., Torres C.R., Oliveira P.L., Tempone A.J., Rumjanek F.D., Braga C.M.S., Silva J.R., Danso-Petretski M., Oliveira M.A., de Souza W., Ferreira S.T. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *111*, 217-221.
- [19] Oliveira M.F., Kycia S.W., Gomez A., Kosar A.J., Bohle D.S., Hempelmann E., Menezes D., Vannier-Santos M.A., Oliveira P.L., Ferreira S.T. Structural and morphological characterization of hemozoin produced by *Schistosoma mansoni* and *Rhodnius prolixus*. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6010-6016.
- [20] Oliveira M.F., d'Avila J.C.P., Tempone A.J., Corrêa Soares J.B.R., Rumjanek F.D., Ferreira-Pereira A., Ferreira S.T., Oliveira P.L. Inhibition of heme aggregation by chloroquine reduces *Schistosoma mansoni* infection. *J. Infect. Dis.* **2004**, *190*, 843-852.
- [21] Bogitsh B.J., Davenport G.R. The *in vitro* effects of various lysomotropic agents on the gut of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *J. Parasitol.* **1991**, *77*, 187-193.
- [22] Cioli D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitol. Today* **1998**, *14*, 418-422.
- [23] Cioli D., Pica-Mattocchia L., Archer S. Drug resistance in schistosomes. *Parasitol. Today* **1993**, *9*, 162-166.
- [24] Christopherson J.B., Cantab M.D. The successful use of antimony in bilharziosis. *Lancet* **1918**, *195*, 325-327.
- [25] Schmidt P., Wilhelm M. A new group of antischistosomal compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1966**, *5*, 857-908.
- [26] Shekhar C.K. Schistosomiasis drug therapy and treatment considerations. *Drugs* **1991**, *42*, 379-405.
- [27] Mansour T.E., Bueding E. The actions of antimonials on glycolytic enzymes of *Schistosoma mansoni*. *Brit. J. Pharmacol.* **1954**, *9*, 459-462.
- [28] Woolhouse N.M. Biochemical and pharmacological effects in relation to the mode of action of antischistosomal drugs. *Biochem. Pharmacol.* **1979**, *28*, 2413-2418.
- [29] Cioli D., Pica-Mattocchia L., Archer S. Antischistosomal drugs : past, present ... and future ? *Pharmac. Ther.* **1995**, *68*, 35-85.
- [30] Harder S. Chemotherapeutic approaches to schistosomes : current knowledge and outlook. *Parasitol. Res.* **2002**, *88*, 395-397.
- [31] Bloom A. Studies of the mode of action of metrifonate and DDVP in schistosomes cholinesterase activity and the hepatic shift. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **1981**, *49*, 109-113.
- [32] Gear N.R. The effect of inhibitors on the hydrolysis of acetylcholine by four species of *Schistosoma*. *Comp. Biochem. Physiol.* **1976**, *55*, 5-10.
- [33] Coles G.C., Bruce J.I. *In vitro* selection of drug resistant *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* **1987**, *17*, 767-771.
- [34] King C.H., Muchiri E.M., Ouma J.H. Evidence against rapid emergence of praziquantel resistance in *Schistosoma haematobium*, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* **2000**, *6*, 585-594.
- [35] Rosi D., Peruzzotti G., Dennis E.W., Berberian D.A., Freele H., Tullar B.F., Archer S. Hycanthon, a new active metabolite of lucanthon. *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 867-876.
- [36] Pica-Mattocchia L., Cioli D. Studies of the mode of action of oxamniquine and related schistosomicidal drugs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1985**, *34*, 112-118.
- [37] Okun R. New medications 1981. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1981**, *21*, 597-604.

- [38] Cioli D., Pica-Mattoccia L., Rosenberg S., Archer S. Evidence for the mode of antischistosomal action of hycanthone. *Life Sci.* **1985**, *37*, 161-167.
- [39] Archer S. The chemotherapy of schistosomiasis. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1985**, *25*, 485-508.
- [40] Rogers S.H., Bueding E. Hycanthone resistance: development in *Schistosoma mansoni*. *Science* **1971**, *172*, 1057-1058.
- [41] Brindley P.J. Drug resistance to schistosomicides and other anthelmintic of medical significance. *Acta Trop.* **1994**, *56*, 213-231.
- [42] Cioli D., Pica-Mattoccia L., Moroni R. *Schistosoma mansoni*: hycanthone/oxamniquine resistance is controlled by a single autosomal recessive gene. *Exp. Parasitol.* **1992**, *75*, 425-432.
- [43] Hof H., Zak O., Schweizert E., Denzler A. Antibacterial activities of nitrothiazole derivatives. *J. Antimicrob. Chemother.* **1984**, *14*, 31-39.
- [44] Taylor M.G. A comparison of the susceptibility to niridazole of *Schistosoma mansoni* and *S. intercalatum* in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1973**, *67*, 245-249.
- [45] Robinson C.H., Bueding E., Fisher J. Relationship between structure, conformation and antischistosomal activity of nitroheterocyclic compounds. *Mol. Pharmacol.* **1970**, *6*, 604-616.
- [46] Tracy J.W., Catto B.A., Webster L.T. Jr Reductive metabolism of niridazole by adult *Schistosoma mansoni*. Correlation with covalent binding to parasite macromolecules. *Mol. Pharmacol.* **1983**, *24*, 291-299.
- [47] Davis A. Field trials of ambilhar in the treatment of urinary bilharziosis in schoolchildren. *Bull. WHO* **1966**, *35*, 827-835.
- [48] Bueding E., Batzinger R., Petterson G. Antischistosomal and some toxicological properties of a nitrodiphenylaminoisothiocyanate (C9333-Go/CGP4540). *Experientia* **1976**, *15*, 604-606.
- [49] Striebel H.P. 4-isothiocyanato-4'-nitrodiphenylamine (C9333-Go/CGP4540), an anthelmintic with an unusual spectrum of activity against intestinal nematodes, filariae and schistosomes. *Experientia* **1976**, *32*, 457-458.
- [50] Mkoji G.M., Smith J.M., Prichard R.K. Glutathione redox state, lipid peroxide levels, and activities of glutathione enzymes on oltipraz-treated adult *Schistosoma mansoni*. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 4307-4313.
- [51] Nare B., Smith J.M., Prichard R.K. Differential effects of oltipraz and its oxy-analogue on the viability of *Schistosoma mansoni* and the activity of glutathione S-transferase. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *42*, 1287-1292.
- [52] Ansher S.S., Dolan P., Bueding E. Chemoprotective effects of two dithiolethiones and of butylhydroxyanisole against carbon tetrachloride and acetaminophen toxicity. *Hepatology* **1983**, *3*, 932-935.
- [53] Clapper M.L., Everley L.C., Strobel L.A., Townsend A.J., Engstrom P.F. Coordinate induction of glutathion-S-transferase α , μ and π expression in murine liver after a single administration of oltipraz. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 469-474.
- [54] Bueding E., Hawkins J., Cha Y.N. Antischistosomal effects of cyclosporin A. *Agents Actions* **1981**, *11*, 380-383.
- [55] Botros S., Sayed H., El-Dusoki H., Sabry H., Rabie I., El-Ghannam M., Hassanein M., El-Wahab Y.A., Engels D. Efficacy of mirazid in comparison with praziquantel in egyptian *Schistosoma mansoni*-infected school children and households. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, *72*, 119-123.
- [56] Botros S., William S., Ebeid F., Cioli D., Katz N., Day T.A., Bennett J.L. Lack of evidence for an antischistosomal activity of myrrh in experimental animals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, *71*, 206-210.
- [57] Doenhoff M.J., Pica-Mattoccia L. Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **2006**, *4*, 199-210.
- [58] Cioli D., Pica-Mattoccia L. Praziquantel. *Parasitol. Res.* **2003**, *90*, S3-S9.
- [59] Andrews P., Thomas H., Pohlke R., Seubert J. Praziquantel. *Med. Res. Rev.* **1983**, *3*, 147-200.
- [60] Xiao S.-H., Catto B.A. Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of racemic praziquantel and its levorotated isomer on *Schistosoma mansoni*. *J. Infect. Dis.* **1989**, *159*, 589-592.
- [61] Wu M.-H., Wei C.-C., Xu Z.-Y., Yuan H.-C., Lian W.-N., Yang Q.-J., Chen M., Jiang Q.-W., Wang C.-Z., Zhang S.-J., Liu Z.D., Wei R.-M., Yuan S.-J., Hu L.-S., Wu Z.-S. Comparison of the therapeutic efficacy and side effects of a single dose of levo-praziquantel with mixed isomer praziquantel in 278 cases of schistosomiasis japonica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1991**, *45*, 345-349.
- [62] Liu Y.H., Qian M.X., Wang X.G., Jia J., Wang Q.N., Jiang Y.F., Wang R.Q., Yan S.H., Chen B.Y., Li J.S. *Chin. Med. J.* **1986**, *99*, 935-940.
- [63] Westhoff F., Blaschke G. High-performance liquid chromatographic determination of the stereoselective biotransformation of the chiral drug praziquantel. *J. Chromatogr.* **1992**, *578*, 265-271.

- [64] Staudt U., Schmahl G., Blaschke G., Mehlhorn H. Light and scanning electron microscopy studies on the effects of the enantiomers of praziquantel and its main metabolite on *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Parasitol. Res.* **1992**, 78, 392-397.
- [65] Andrews P. Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity. *Pharmac. Ther.* **1985**, 29, 129-156.
- [66] Harder H., Andrews P., Thomas H. Praziquantel: mode of action. *Biochem. Soc. Trans.* **1987**, 15, 68-70.
- [67] Castro N., Medina R., Sotelo J., Jung H. Bioavailability of praziquantel increases with concomitant administration of food. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 2903-2904.
- [68] Frohberg H. Results of toxicological studies of praziquantel. *Arzneim.-Forsch.* **1984**, 34, 1137-1144.
- [69] Frohberg H., Schencking M.S. Toxicological profile of praziquantel, a new drug against cestode and schistosome infections, as compared to some other schistosomicides. *Arzneim.-Forsch.* **1981**, 31, 555-565.
- [70] Andrews P. A summary of the efficacy of praziquantel against schistosomes in animal experiments and notes on its mode of action. *Arzneim.-Forsch.* **1981**, 31, 538-541.
- [71] Pica-Mattoccia L., Cioli D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. *Int. J. Parasitol.* **2004**, 34, 527-533.
- [72] Sabah A.A., Fletcher C., Webbe G., Doenhoff M.J. *Schistosoma mansoni* : chemotherapy of infections of different ages. *Exp. Parasitol.* **1986**, 61, 294-303.
- [73] Doenhoff M.J., Pica-Mattoccia L. Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* **2006**, 4, 199-210.
- [74] Botros S., Pica-Mattoccia L., William S., El-Lakkani N., Cioli D. Effect of praziquantel on the immature stages of *Schistosoma haematobium*. *Int. J. Parasitol.* **2005**, 35, 1453-1457.
- [75] Blair K.L., Bennett J.L., Pax R.A. *Schistosoma mansoni*: myogenic characteristics of phorbol ester induced muscle contraction. *Exp. Parasitol.* **1994**, 78, 302-316.
- [76] Pax R., Bennett J.L., Fetterer R. A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Naunyn Schiedbergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1978**, 304, 309-315.
- [77] Greenberg R.M. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? *Int. J. Parasitol.* **2005**, 35, 1-9.
- [78] Redman C.A., Robertson A., Fallon P.G., Modha J., Kusel J.R., Doenhoff M.J., Martin R.J. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitol. Today* **1996**, 12, 14-20.
- [79] Harder A., Goossens J., Andrews P. Influence of praziquantel and Ca²⁺ on the bilayer-isotropic-hexagonal transition of model membranes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1988**, 25, 55-60.
- [80] Harnett W., Kusel J.R. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel *in vitro*. *Parasitol.* **1986**, 93, 401-405.
- [81] Brindley P.J., Sher A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J. Immunol.* **1987**, 139, 215-220.
- [82] Brindley P.J., Strand M., Norden A.P., Sher A. Role of host in the chemotherapeutic action of praziquantel against *Schistosoma mansoni*: identification of target antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1989**, 34, 99-108.
- [83] Ribeiro F., de Mello R.T., Tavares C.A.P., Kusel J.R., Coelho P.M.Z. Synergistic action of praziquantel and host specific immune response against *Schistosoma mansoni* at different phases of infection. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **2004**, 46, 231-233.
- [84] Cioli D., Botros S.S., Wheatcroft-Francklow K., Mbaye A., Southgate V., Tchuem-Tchuente L.-A., Pica-Mattoccia L., Troiani A.R., Seif-el-Din S.H., Sabra A.N., Albin J., Engels D., Doenhoff M.J. Determination of ED₅₀ values for praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. *Int. J. Parasitol.* **2004**, 34, 979-987.
- [85] Fallon P.G., Doenhoff M.J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced with *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1994**, 51, 83-88.
- [86] Ismail M., Metwally A., Farghaly A., Bruca J., Tao L.-F., Benett J.L. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from egyptians villagers that tolerate high doses of praziquantel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1996**, 55, 214-218.
- [87] Botros S., Sayed H., Amer N., El-Ghannam M., Bennett J.L., Day T.A. Current status of sensitivity to praziquantel in a focus of potential drug resistance in Egypt. *Int. J. Parasitol.* **2005**, 35, 787-791.
- [88] Stelma F.F., Talla I., Polman K.B., Sow S., Kongs A., Niang M., Gryseels B. Low efficacy and tolerance of praziquantel in a new, intense focus of *Schistosoma mansoni* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1995**, 53, 167-170.
- [89] Alonso D., Munoz J., Gascon J., Valls M.E., Corachan M. Short report: failure of standard treatment with praziquantel in two returned travelers with *Schistosoma haematobium* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, 74, 342-344.

- [90] Utzinger J., Xiao S.-H., Keiser J., Minggan C., Jiang Z., Tanner M. Current progress in the development and use of artemether for chemoprophylaxis of major human schistosome parasites. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1841-1859.
- [91] Xiao S.-H., Chollet J., Weiss N.A., Bergquist R.N., Tanner M. Preventive effect of artemether in experimental animals infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Int.* **2000**, *49*, 19-24.
- [92] Xiao S.-H., Utzinger J., Chollet J., Endriss Y., N'Goran E.K., Tanner M. Effect of artemether against *Schistosoma haematobium* in experimentally infected hamster. *Int. J. Parasitol.* **2000**, *30*, 1001-1006.
- [93] Utzinger J., Chollet J., Tu Z., Xiao S.-H., Tanner M. Comparative study of the effects of artemether and artesunate on juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in experimentally infected mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *96*, 318-323.
- [94] Li Y.-S., Chen H.-G., He H.-B., Hou X.-Y., Ellis M., McManus D.P. A double-blind field trial on the effects of artemether on *Schistosoma japonicum* infection in a highly endemic focus in southern China. *Acta Trop.* **2005**, *96*, 184-190.
- [95] Utzinger J., N'Goran E.K., N'Dri A., Lengeler C., Xiao S.-H., Tanner M. Oral artemether for prevention of *Schistosoma mansoni* infection: randomised controlled trial. *The Lancet* **2000**, *355*, 1320-1325.
- [96] Xiao S.-H., Tanner M., N'Goran E.K., Utzinger J., Chollet J., Bergquist R., Minggan C., Jiang Z. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. *Acta Trop.* **2002**, *82*, 175-181.
- [97] Xiao S.-H., Jiqing Y., Jinying M., Huifang G., Peiyong J., Tanner M. Effect of praziquantel together with artemether on *Schistosoma japonicum* parasites of different ages in rabbits. *Parasitol. Int.* **2000**, *49*, 25-30.
- [98] Utzinger J., Chollet J., Jiqing Y., Jinyan M., Tanner M., Xiao S.-H. Effect of combined treatment with praziquantel and artemether on *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in experimentally infected animals. *Acta Trop.* **2001**, *80*, 9-18.
- [99] Mahmoud M.R., Botros S.S. Artemether as adjuvant therapy to praziquantel in murine egyptian *Schistosomiasis mansoni*. *J. Parasitol.* **2005**, *91*, 175-178.
- [100] Bergquist N.R., Colley D.G. Schistosomiasis vaccines: research and development. *Parasitol. Today* **1998**, *14*, 99-104.
- [101] Wu Z.-D., Lü Z.-Y., Yu X.-B. Development of a vaccine against *Schistosoma japonicum* in China: a review. *Acta Trop.* **2005**, *96*, 106-116.
- [102] Capron A., Riveau G., Bartley P., McManus D.P. Prospects for a schistosome vaccine. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metab. Disord.* **2002**, *2*, 281-290.
- [103] Zhang D.M., Pan W.Q., Qian L., Duke M., Shen L.H., McManus D.P. Investigation of recombinant *Schistosoma japonicum* paramyosin fragments for immunogenicity and vaccine efficacy in mice. *Parasite Immunol.* **2006**, *28*, 77-84.
- [104] Radke M.G., Sadun E.H. Resistance induced in mice by exposure to irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *Exp. Parasitol.* **1963**, *13*, 134-142.
- [105] Richter D., Harn D.A., Matuska F.-R. The irradiated cercariae vaccine model: looking on the bright side of radiation. *Parasitol. Today* **1995**, *11*, 288-293.
- [106] Zhang Z.-S., Wu W.-M., Wu Y.-L. Design and synthesis of novel artemisinin-like ozonides with antischistosomal activity. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 2865-2872.
- [107] Vennertstrom J.L., Dong Y., Chollet J., Matile H., Padmaniyalam M., Tang Y., Charman W.N., US 2004/ 01 861 68 A1.
- [108] Meunier B., Robert A., Dechy-Cabaret O. Brevet français 0004422 avril **2000**, extensions avril **2001**.
- [109] Dechy-Cabaret O., Benoit-Vical F., Loup C., Robert A., Gornitzka H., Bonhoure A., Vial H., Magnaval J.F., Séguéla J.P., Meunier B. Synthesis and antimalarial activity of trioxaquine derivatives. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1625-1636.
- [110] Robert A., Benoit-Vical F., Claparols C., Meunier B. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13676-13680.
- [111] Dechy-Cabaret O., Benoit-Vical F., Robert A., Meunier B. Preparation and antimalarial activities of trioxaquinones, new modular molecules with a trioxane skeleton linked to a 4-aminoquinoline. *ChemBiochem* **2000**, *4*, 281-283.

**2^{ème} PARTIE : PROPRIÉTÉS ALKYLANTES DES
DÉRIVÉS HÉMISYNTHÉTIQUES DE
L'ARTÉMISININE ET DE LA TRIOXAQUINE
DU1301**

CHAPITRE I : PROPRIÉTÉS ALKYLANTES DE L'ACIDE ARTÉSUNIQUE ET DES TRIOXAQUINES

Résumé de la publication suivante : Laurent S. A.-L., Loup C., Mourgues S., Robert A., Meunier B. Heme alkylation by artesunic acid and trioxaquine DU1301, two antimalarial trioxanes. *ChemBioChem* **2005**, 6, 653-658.

INTRODUCTION

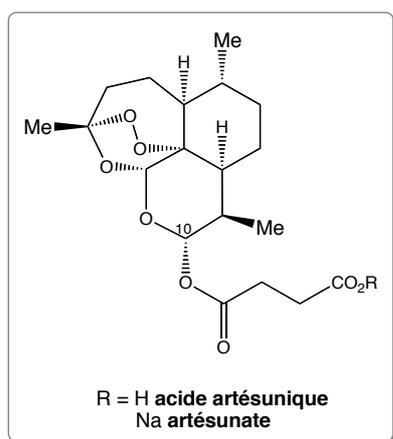
L'artémisinine, un peroxyde sesquiterpénique, est le composé actif d'*Artemisia annua* L, plante de la famille de l'armoise. Cette molécule est fortement active sur les souches chloroquino-sensibles et résistantes de *Plasmodium falciparum* ainsi que sur les autres espèces de *Plasmodium*.

La fonction endoperoxyde est nécessaire pour l'activité antipaludique de l'artémisinine [1, 2]. Il a été montré au laboratoire qu'après activation réductrice de l'endoperoxyde par l'hème-fer(II) libéré au cours de la digestion de l'hémoglobine par *Plasmodium*, l'artémisinine se comporte comme un alkylant puissant vis-à-vis de l'hème lui-même [3, 4]. La réduction du peroxyde par l'hème-fer(II) est un transfert monoélectronique, probablement par sphère interne [5].

L'artésunate, monoester de l'acide succinique en position C10 de l'artémisinine, est actuellement le dérivé de l'artémisinine le plus utilisé en clinique. Les trioxaquines®, nouvelles molécules duales antipaludiques comportant un motif peroxyde, ont été mises au point au laboratoire [6, 7]. Nous avons voulu voir si l'acide artésuniquique et les trioxaquines présentent les mêmes capacités alkylantes que l'artémisinine.

I – ALKYLATION DE L'HÈME PAR L'ACIDE ARTÉSUNIQUE

I.1 – Introduction



La fonction carbonyle en position C10 de l'artémisinine est réduite et estérifiée par une fonction carboxylate de l'acide succinique en α . La fonction ester est du même côté que le pont peroxyde. Ce trioxane est, à l'heure actuelle, très utilisé au niveau clinique et est parfois associé à une autre molécule antipaludique : la méfloquine. L'acide artésuniquique, dérivé utilisé pour l'étude de l'alkylation de l'hème, correspond à la forme acide de l'artésunate.

1.2 – Alkylation de l'hème par l'acide artésunique *in vitro* et caractérisation des produits de couplage

De façon similaire à ce qui avait été observé pour l'artémisinine [8, 9] (partie 1, chapitre 1), l'hème-fer(III) dans son état stable est réduit par le dithionite de sodium *in situ*. L'hème-fer(II) formé réagit rapidement en présence d'acide artésunique pour alkyler l'hème sur les quatre positions *meso* de la porphyrine. Les produits de couplage covalent hème-acide artésunique sont obtenus avec un bon rendement (figure 1).

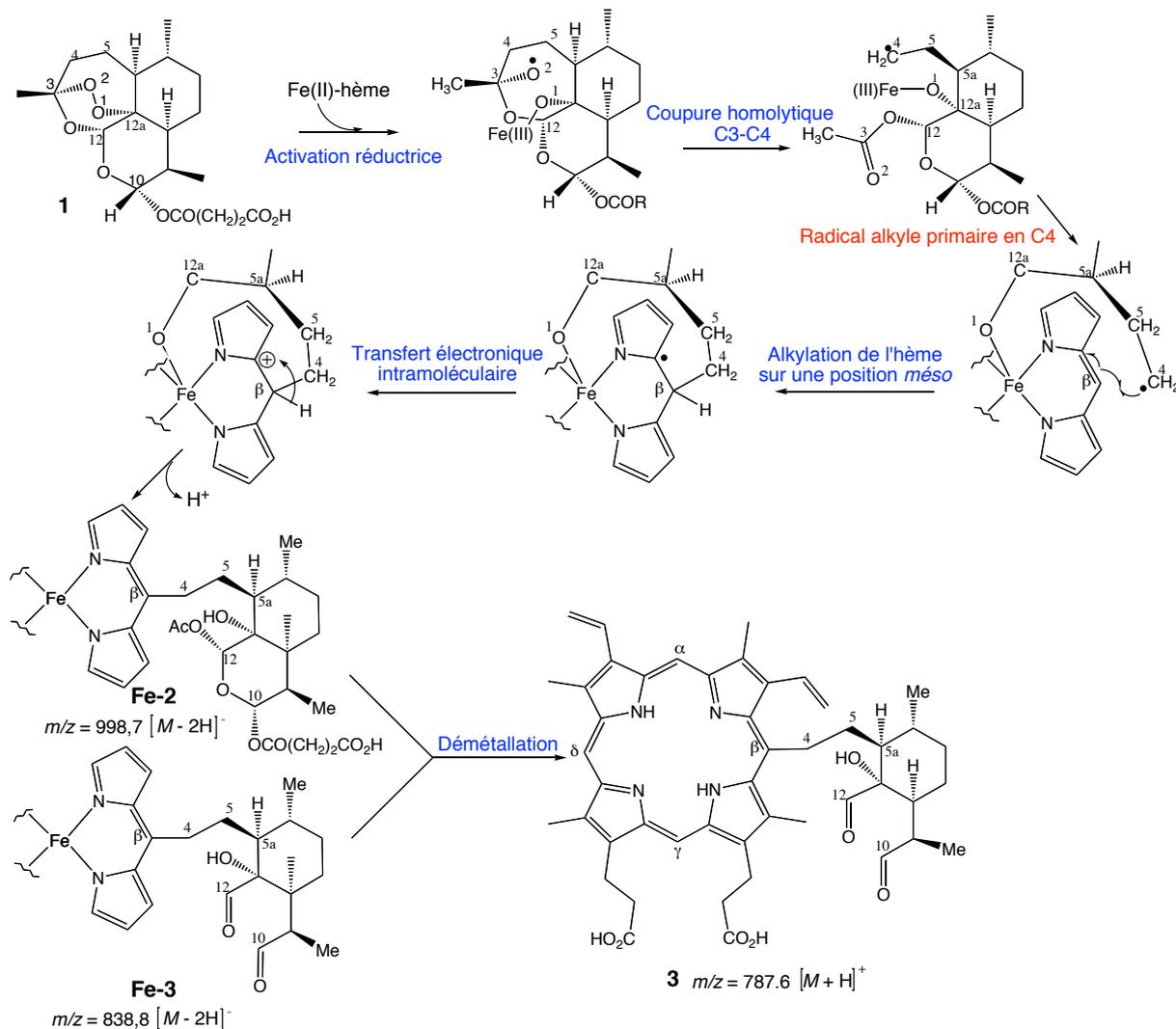


Figure 1 : Mécanisme d'alkylation de l'hème par l'acide artésunique. Les positions *meso* sont alkylées, seule l'alkylation en β est décrite.

Le suivi de la réaction d'alkylation par HPLC nous permet de déterminer un taux de conversion de l'hème de 96% pour un rapport hème/acide artésunique/réducteur de 1/1/1. Les produits de couplage métallés sont caractérisés par spectrométrie de masse à $m/z = 998,7 [M - 2H]^-$

$2\text{H}]^-$ pour l'adduit **Fe-2** et $m/z = 838,8$ $[\text{M}-2\text{H}]^-$ pour l'adduit **Fe-3***. Le produit d'alkylation **Fe-2** est sensible aux conditions acides : l'hydrolyse de l'acétal en position C12 conduit à une ouverture du cycle et donc à la formation de deux fonctions aldéhydes en position C10 et C12 (**Fe-3**, figure 1).

De manière à avoir une caractérisation par RMN, ces adduits sont démétallés. Pour des raisons de solubilité, la purification des adduits démétallés par colonne de chromatographie est très difficile, les adduits sont donc dérivatisés. La dérivatisation des adduits **Fe-3** la plus simple est la protection de ces fonctions en groupement hydrazone ou acétal ; les structures des produits dérivatisés sont présentées sur la figure 1 de la publication originale (page 71). En présence d'éthanol, de dinitrophénylhydrazine et d'acide sulfurique le composé **3** est transformé en *bis*-dinitrophénylhydrazone **4** selon les conditions décrites par McMurry [10]. Par ailleurs, la réaction du composé **3** démétallé avec le triéthylorthoformiate, en présence d'acide chlorhydrique [11] donne le composé **5** avec deux fonctions diéthylacétal en position 10 et 12. Cette réaction s'accompagne également de l'estérification des chaînes propioniques de la porphyrine.

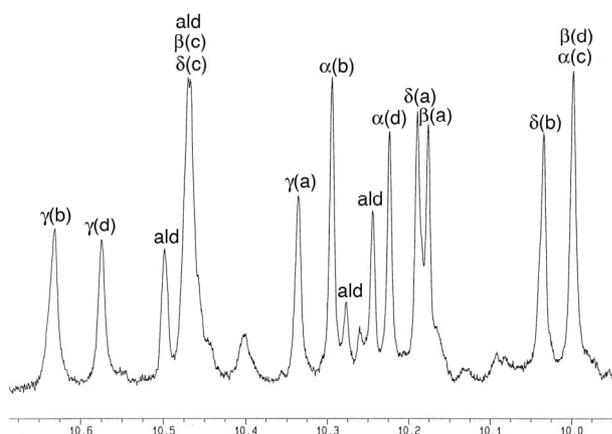


Figure 2 : Région ^1H -RMN des protons *méso* du composé **5 avec une fonction aldéhyde déprotégée.**

L'obtention de douze singulets en plus des protons aldéhydiques montre que l'alkylation se fait sur les quatre sommets *méso* de la porphyrine. Pour l'adduit substitué en β , les protons α , γ et δ sont observables et notés respectivement $\beta(a)$, $\beta(c)$ et $\beta(d)$ (figure 2). De même, les protons *meso* de l'adduit substitué en α sont notés $\alpha(b)$, $\alpha(c)$, $\alpha(d)$.

Comme attendu, le diacétal linéaire **5** n'est pas très stable : l'acidité de la solution de chloroforme deutéré suffit à induire la réaction inverse de désacétalisation d'une des fonctions

* les numérotations des composés correspondent à celles de l'article publié dans ChemBioChem (cf. page 70)

ainsi que la protonation des NH intra-cycliques de la porphyrine. Pour éviter l'hydrolyse des diéthylacétals, une dérivatisation avec des acétals cycliques a été effectuée. En présence d'éthylène glycol et d'APTS, nous observons la formation de l'éthylène diacétal **6** ainsi que l'estérification des chaînes propioniques de la porphyrine [12]. Cette molécule a été caractérisée par spectrométrie de masse ainsi que par RMN. Les analyses détaillées RMN et MS sont données dans la partie expérimentale de l'article ci-joint.

II – ALKYLATION DE L'HÈME PAR LA TRIOXAQUINE® DU1301

II.1 – Généralités

Ces dernières années de nombreux efforts ont été faits pour synthétiser de nouveaux composés antipaludiques. Entre autres travaux, citons la modification de la chloroquine par un lien ferrocène pour donner la ferroquine [13], la synthèse d'ammoniums quaternaires ayant pour cible le transporteur de choline du parasite [14], la synthèse de trioxanes simplifiés [15]. Au sein de notre équipe, de nouvelles molécules ont été synthétisées sur le concept de "bithérapie covalente" [6]. Ces molécules peuvent formellement être décomposées en trois parties : un trioxane, partie responsable de l'activité de l'artémisinine, une aminoquinoléine, responsable de l'activité de la chloroquine grâce à l'empilement avec le noyau aromatique de l'hème, et un bras de jonction reliant ces deux pharmacophores. Ces molécules, appelées trioxaquines®, sont aisément modulées.

L'artémisinine et la chloroquine interagissent, toutes les deux, avec l'hème mais par des mécanismes différents. Cette combinaison est un bon moyen d'augmenter l'efficacité du traitement et de prévenir l'émergence de résistances. Les premières molécules trioxaquines® sont très actives *in vitro* sur des souches chloroquino-sensibles et chloroquino-résistantes de *Plasmodium falciparum*. Les valeurs des CI_{50} vont de 8 à 40 nM, selon les substituants présents sur le trioxane. La trioxaquine DU1301 est également efficace *in vivo*, par voie orale, chez la souris impaludée. La synthèse et l'activité de la trioxaquine DU1301 sont décrites dans la référence [6].

Les trioxaquines ont été conçues pour être, comme l'artémisinine, des alkylants de l'hème. Nous avons donc recherché cette propriété alkylante *in vitro* de la DU1301 vis-à-vis de l'hème-fer(II).

II.2 – Alkylation de l'hème *in vitro* et caractérisation des produits de couplage

Tout comme dans le cas de l'artémisinine et de l'acide artésunique, la réaction de la trioxaquine DU1301 avec l'hème ou l'hème diméthylester (pour des raisons de solubilité), à 37°C, pendant une heure, conduit à une alkylation de la porphyrine sur les positions *méso* du macrocycle après activation réductrice du pont endoperoxyde. Deux radicaux alcoyles peuvent ainsi être générés et évoluer en différents radicaux carbonés (figure 3).

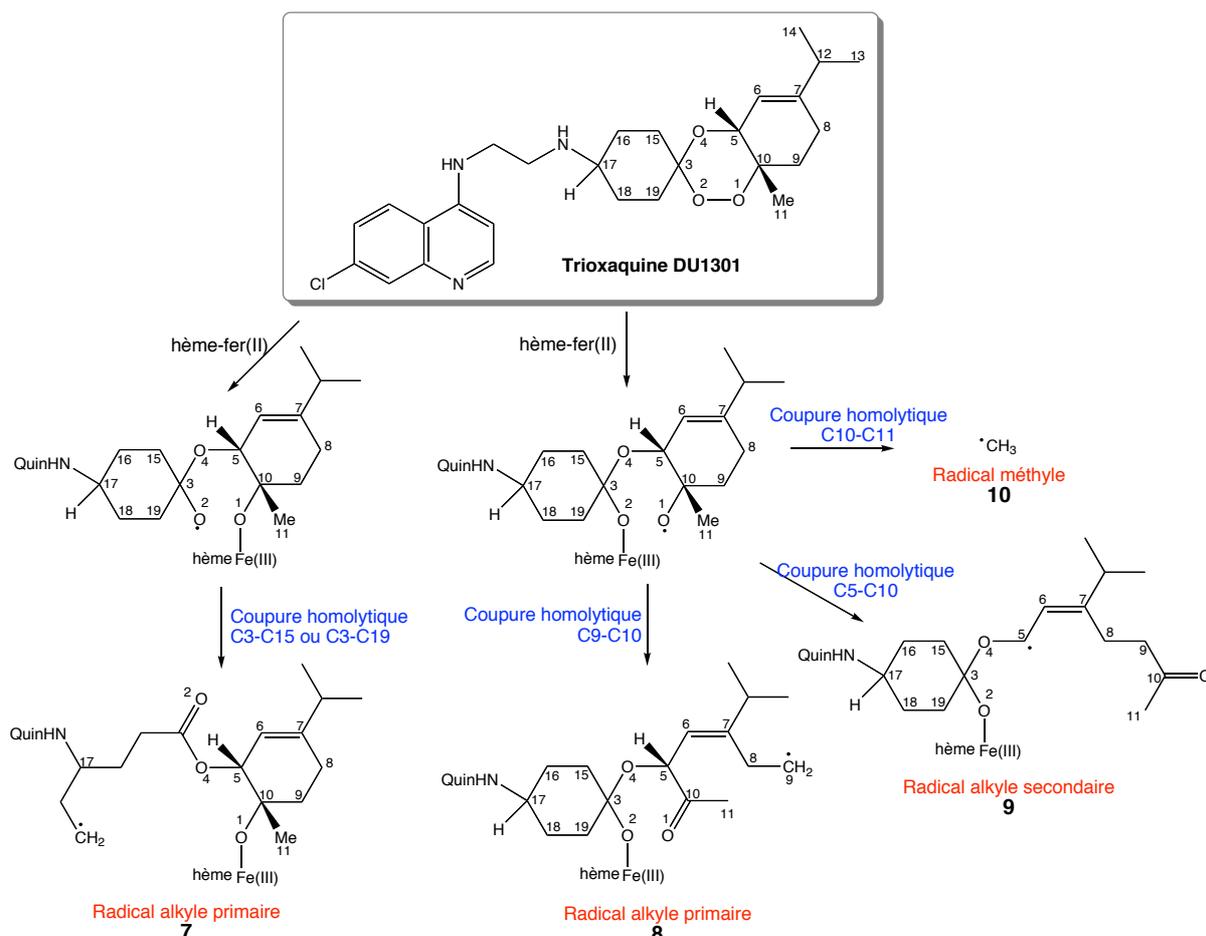


Figure 3 : Différentes voies de coupure du pont peroxyde de la DU1301.

Quatre radicaux carbonés peuvent être formés par coupure homolytique du peroxyde. Le radical oxygéné sur l'atome 2 peut se réarranger par coupure homolytique de la liaison C3-C15 ou C3-C19 pour donner le radical alkyle primaire **7**. Si le radical est porté par l'atome d'oxygène 1, trois homolyses des liaisons adjacentes sont possibles. La coupure de la liaison C9-C10 génère le radical alkyle primaire **8**, la coupure de la liaison C5-C10 génère le radical alkyle secondaire **9** et enfin, la coupure de la liaison C10-C11 génère le radical méthyle **10**.

L'analyse par spectrométrie de masse du brut d'alkylation révèle la présence d'adduits **Fe-11** et **Fe-12** issus de l'addition du radical alkyle **7** et la méthylporphyrine **Fe-13** issue de l'alkylation par le radical méthyle **10**. Aucun produit de couplage provenant des radicaux **8** et **9** n'a été observé.

La démétallation du mélange réactionnel brut nous a permis de caractériser les adduits **12** (dans le cas de l'hème) et **16** (dans le cas de l'hème diméthylester) par spectrométrie de masse et par RMN pour les adduits **16** (figure 4).

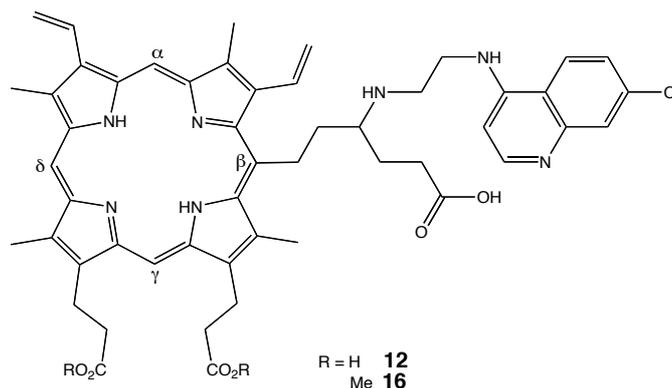


Figure 4 : Structure des adduits hème-trioxaquine (seul l'adduit en β est représenté).

Les protons *méso* sont caractérisés en RMN sous forme de trois familles de trois singulets (dans un rapport 50/30/20) : un singulet par proton *méso* sur chaque produit de couplage, ce qui révèle l'alkylation préférentielle de 3 positions *méso*. Il est possible que l'alkylation sur le sommet γ soit défavorisée à cause de l'encombrement stérique des chaînes propionates. Dans le cas des adduits hème-artémisinine, le produit d'alkylation en γ est très minoritaire.

III - CONCLUSION

Cet article montre la capacité alkylante de l'acide artésunique, qui est un dérivé hémisynthétique de l'artémisinine largement utilisé en clinique humaine, et de la trioxaquine® DU1301, conçue sur la base d'un 1,2,4-trioxane et présentant une grande activité contre *Plasmodium in vivo* et *in vitro*.

Les deux molécules alkylent la protoporphyrine IX de fer(II) avec de bons rendements, après l'activation du motif peroxyde par le fer(II) de l'hème. L'acide artésunique possède un groupement succinate sur la face α , c'est-à-dire du même côté que le pont peroxyde. La caractérisation des adduits covalents hème-acide artésunique montre que

l'encombrement stérique de la position C10 n'a pas d'influence sur les propriétés alkylantes du trioxane : l'interaction entre le pont peroxyde et centre métallique, nécessaire pour l'étape d'activation réductrice, n'est pas gênée par cette substitution.

L'hème joue ainsi à la fois les rôles d'activateur (activation réductrice du pont peroxyde) et de cible (alkylation par les radicaux générés).

IV - BIBLIOGRAPHIE

- [1] Klayman D.L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* **1985**, 228, 1049-1055.
- [2] Meshnick S.R., Taylor T.E., Kamchonwongpaisan S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol. Rev.* **1996**, 60, 301-315.
- [3] Robert A., Dechy-Cabaret O., Cazelles J., Meunier B. From mechanistic studies on artemisinin derivatives to new modular antimalarial drugs. *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 167-174.
- [4] Robert A., Benoit-Vical F., Claparols C., Meunier B. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 13676-13680.
- [5] Cazelles J., Robert A., Meunier B. Alkylating capacity and reaction products of antimalarial trioxanes after activation by a heme model. *J. Org. Chem.* **2002**, 67(3), 609 – 619.
- [6] Dechy-Cabaret O., Benoit-Vical F., Loup C., Robert A., Gornitzka H., Bonhoure A., Vial H., Magnaval J.F., Séguéla J.P., Meunier B. Synthesis and antimalarial activity of trioxaquine derivatives. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 1625 – 1636.
- [7] Meunier B., Robert A., Dechy-Cabaret O. Brevet français 0004422, avril **2000**, ; extensions avril **2001**.
- [8] Robert A., Meunier B. Characterization of the first covalent adduct between artemisinin and a heme model. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5968-5969.
- [9] Robert A., Coppel Y., Meunier B. Alkylation of heme by the antimalarial drug artemisinin. *Chem. Commun.* **2002**, 414-416.
- [10] McMurry J.E. Total synthesis of Sativene. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 6821-6825.
- [11] Fife T.H., Jao L.K. Substituent effects in acetal hydrolysis. *J. Org. Chem.* **1964**, 22, 1492-1495.
- [12] Caserio F.F. Jr, Roberts J.D. Small-ring compounds. 3-méthylencyclobutanone and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 5837-5840.
- [13] Delhaes L., Biot C., Berry L., Delcourt P., Maciejewski L.A., Camus D., Brocard J.S., Vive D. Synthesis of ferroquine enantiomers : first investigation of effects of metallocenic chirality upon antimalarial activity and cytotoxicity. *Chem. Biochem.* **2002**, 3, 418-423.
- [14] Wengelnik K., Vidal V., Ancelin M.L., Cathiard A.-M., Morgat J.L., Kocken C.H., Calas M., Herrera S., Thomas A.W., Vial H.J. A class of potent antimalarials and their specific accumulation in infected erythrocytes. *Science* **2002**, 295, 1311-1314.
- [15] Posner G.H., Paik I.-H., Sur S., McRiner A.J., Borstnik K., Xie S., Shapiro T.A. Orally active, antimalarial, anticancer, artemisinin-derived trioxane dimers with high stability and efficacy. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 1060-1065.

Heme Alkylation by Artesunic Acid and Trioxaquine DU1301, Two Antimalarial Trioxanes

Sophie A.-L. Laurent, Christophe Loup, Sophie Mourgues, Anne Robert,* and Bernard Meunier^{*,[a]}

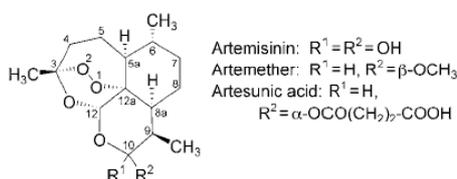
The sesquiterpene Artemisinin, an antimalarial drug that is effective against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* strains, contains a 1,2,4-trioxane, and the endoperoxide function plays a key role in its biological activity. However, its poor solubility means that hemisynthetic derivatives, such as artesunic acid, are preferred for drugs.

The reductive activation of the peroxide function of artemisinin by iron(II)-heme produces heme derivatives that are alkylated at meso positions by a C-centered radical derived from artemisinin. We checked if the alkylating ability of trioxane-based drugs

toward heme, which might be related to its parasitocidal activity, is a general feature by comparing the chemical reactivity toward heme of the clinically relevant derivative artesunic acid and DU1301, a drug of the trioxaquine family, that is active against *P. falciparum*. Both artesunic acid and trioxaquine DU1301 efficiently alkylated the heme macrocycle after activation of their peroxide function by the iron(II) of heme itself and thus gave rise to covalently coupled heme–drug products. This heme–drug adduct formation might be related to the high antimalarial activity of DU1301.

Introduction

Artemisinin is an antimalarial drug, extracted from *Artemisia annua*, that is effective against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* strains.^[1] This sesquiterpene exhibits a 1,2,4-triox-



ane, and the endoperoxide function plays a key role in its biological activity. However, artemisinin is poorly soluble in both water and oil, which are commonly used as vehicles for drug administration. For this reason, hemisynthetic derivatives obtained by reduction and functionalization of the lactone function of artemisinin are usually preferred. These compounds have been used for more than 20 years without any serious side effects or reported cases of resistance.^[1a] Among them, artesunic acid, which is the hemiester of succinic acid and dihydroartemisinin (or its sodium salt, artesunate), is actually the most widely used.^[1b]

The reductive activation of the peroxide function of artemisinin by iron(II)-heme produces heme derivatives that are alkylated at meso positions by a C-centered radical derived from artemisinin. The resulting heme–artemisinin covalent adducts have recently been characterized,^[2] and the alkylating ability of artemisinin toward heme or parasite proteins might be related to its parasitocidal activity.^[3]

Recently, we designed new antimalarial drugs named trioxaquinones. These modular hybrid molecules contain two pharmacologically active moieties, a trioxane (as in artemisinin) and a 4-aminoquinoline (as in chloroquine), a motif known to efficiently accumulate within the parasites.^[4]

We therefore checked if the alkylating ability of antimalarial trioxane-based drugs toward heme is a general feature, especially i) with the clinically relevant derivative artesunic acid and ii) with one drug of the trioxaquine family, DU1301, that is active against *Plasmodium falciparum* in vitro and in vivo.

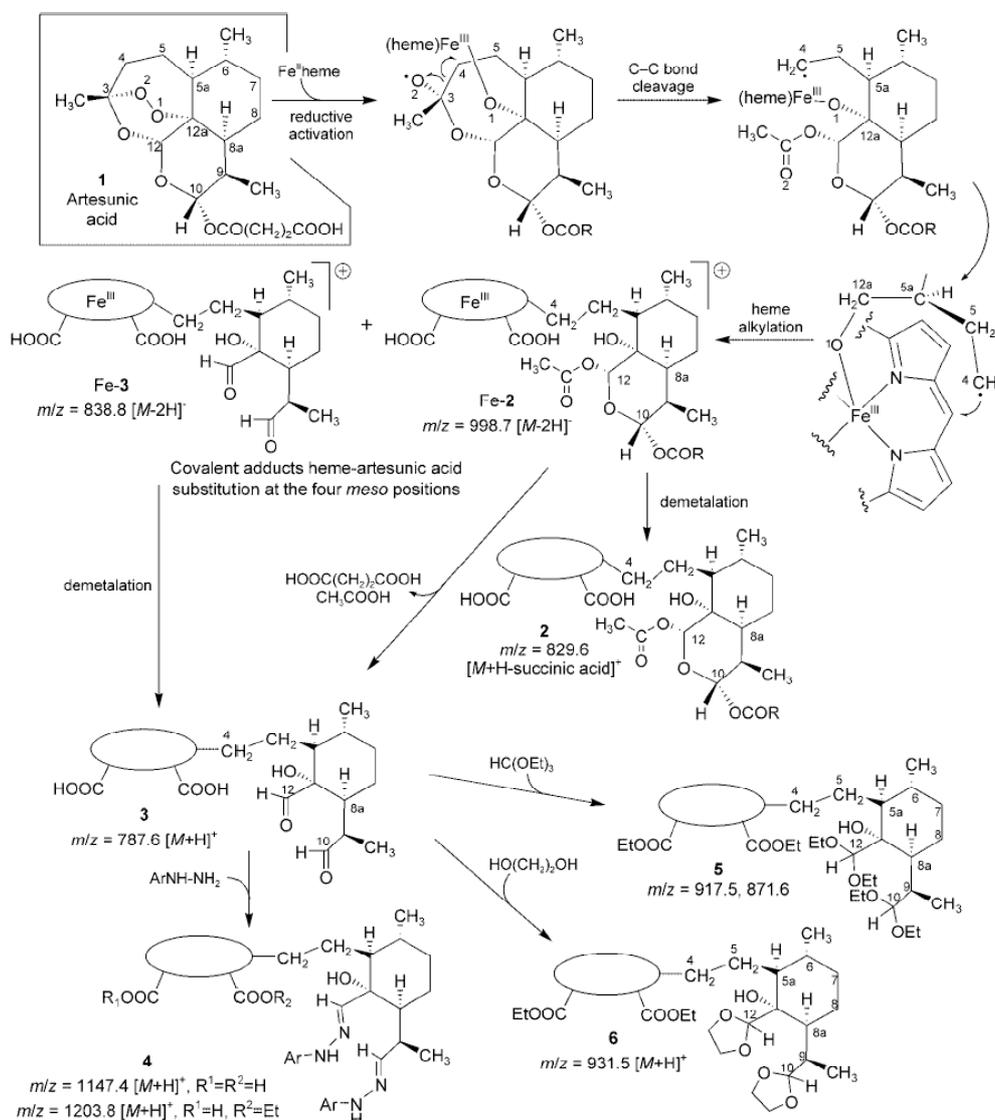
Here, we report that both drugs, artesunic acid and the trioxaquine DU1301, were able to efficiently alkylate the heme macrocycle after activation of their peroxide function by the iron(II) of heme itself and thus give rise in high yield to covalently coupled heme–drug products, which have been characterized.

Results and Discussion

Alkylation of heme by artesunic acid

In the presence of artesunic acid, iron(II)-heme, generated in situ by a reducing agent, was quickly converted in high yield into heme–artesunic acid covalent adducts Fe-2, resulting from the alkylation of porphyrin meso-positions by a drug-derived alkyl radical centered at C4 (Scheme 1). The reaction was moni-

[a] S. A.-L. Laurent, C. Loup, S. Mourgues, Dr. A. Robert, Dr. B. Meunier
 Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS
 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex 4 (France)
 Fax: (+33) 561-553-003
 E-mail: bmeunier@lcc-toulouse.fr



Scheme 1. Alkylation of heme by artesunic acid. Alkylation occurred at four meso positions, only alkylation at the β position is depicted. The oval stands for the protoporphyrin-IX macrocycle, R = $-(CH_2)_2-COOH$, and Ar = 2,4-NO₂-C₆H₃.

tored by HPLC. In 40 minutes of reaction at room temperature, 96% of heme ($\lambda_{max} = 398$ nm) was converted to heme-alkylated derivatives (three different peaks, $\lambda_{max} = 416$ nm). These compounds were identified by their molecular peaks in ES⁻MS at $m/z = 998.7$ corresponding to $[M-2H]^-$. However, these heme-artesunic acid covalent adducts are more fragile than those resulting from the reaction of heme with artemisinin.^[2] Consequently, the cleavage of the 6-membered C12-C10-C8a ring gave rise to the adduct Fe-3, bearing two aldehyde functions as a minor product (15%).

Strongly acidic conditions are needed for the demetalation of the porphyrin moiety. Consequently, this step provided the demetalated H₂PPIX-artesunic acid adduct 3 as the main product (Scheme 1). Compound 3 was detected in positive electro-spray mass spectrometry ($m/z = 787.6$, $[M+H]^+$). However, a significant amount of ligand 2, with an intact C12-C10-C8a cycle, was still present (32%), as evidenced by the signal at $m/z = 829.6$, which corresponded to $[M-succinic acid+H]^+$. The purification of these heme-artesunic acid adducts was difficult due to their poor solubility in organic solvents. In order to get a complete characterization, we therefore functionalized

the aldehyde and acid functions of compound **3** in several ways, namely i) treatment of the aldehydes with a phenylhydrazine derivative to get the *bis*-phenylhydrazone **4**, ii) esterification of the propionic side chains of the porphyrin and protection of the aldehydes by linear or cyclic acetals giving rise to **5** and **6**, respectively (Scheme 1).

The bis-dinitrophenylhydrazone derivative **4** was obtained in the presence of ethanol and sulfuric acid. Esterification of the propionate residues of the protoporphyrin-IX (PPIX) moiety then occurred, along with formation of the hydrazones. Compound **4** was characterized by ES⁺-MS analysis: peaks were detected at $m/z=1147.4$, 1175.4 , and 1203.8 , which corresponded to **4** with no, one, or two ethyl ester functions, respectively. The poor solubility of these compounds did not allow NMR analysis.

The reaction of **3** with triethyl orthoformate provided derivative **5**, which has two diethyl acetal functions at C10 and C12, and two ethyl esters on the propionate groups of the PPIX residue. Compound **5** has been characterized by ¹H NMR and is actually a mixture of four regioisomers due to the alkylation of the four *meso* carbons of the porphyrin macrocycle. The resonance of *meso* protons appeared as twelve peaks between 10.2 and 9.8 ppm, three for each of the four regioisomers. The complex patterns of vinyl protons confirmed the presence of regioisomers. The resonance of H₂C₄, evidence of the covalent coupling between the heme and drug moieties, was detected at 5.45–5.00 ppm, along with the resonance of protons H10 and H12. As expected, compound **5** was not very stable under acidic conditions (for instance, in four days in solution in CDCl₃) and returned to the dialdehyde at C10 and C12 along with protonation of the intracyclic NH of the porphyrin.

The PPIX-artesunic acid covalent adduct **6**, with two ethylene acetals, at C10 and C12, and concomitant esterification of propionates was also obtained and characterized by ES-MS.

Alkylation of heme by trioxaquine DU1301

By treatment of trioxaquine DU1301 (**6**, Scheme 2) with heme or heme dimethyl ester in the presence of a reducing agent (ascorbic acid or 2,3-dimethylhydroquinone), a reductive activation of the peroxide occurred, as observed with artemisinin derivatives. After 30 min, HPLC analysis indicated that 60% of starting heme was converted to heme–drug adducts. This reaction produced two different alkoxy radicals, either on O2 (route a, Scheme 2) or on O1 (route b). The subsequent homolytic cleavage of an adjacent C–C bond can give rise to different alkyl radicals, namely **7** from route a, and **8**, **9**, and **10** from route b. Alkylation of *meso* carbons of heme by a trioxaquine-derived radical provided a covalent adduct heme–trioxoquine with retention of the complete structure of trioxoquine, identified by ES⁺-MS at $m/z=1101.8$ [$M+H$]⁺. In principle, three structures can be proposed for this adduct: Fe-**11**, Fe-**14**, and Fe-**15**, formed by alkylation of heme by the radicals **7**, **8** and **9**, respectively. These three compounds have the same mass, corresponding to $M(\text{heme})+M(\text{trioxoquine})-H$. Adduct Fe-**12** was also detected [$m/z=949.6$ [M]⁺]. This compound may be formed from Fe-**11** by protonation of O4 and loss of

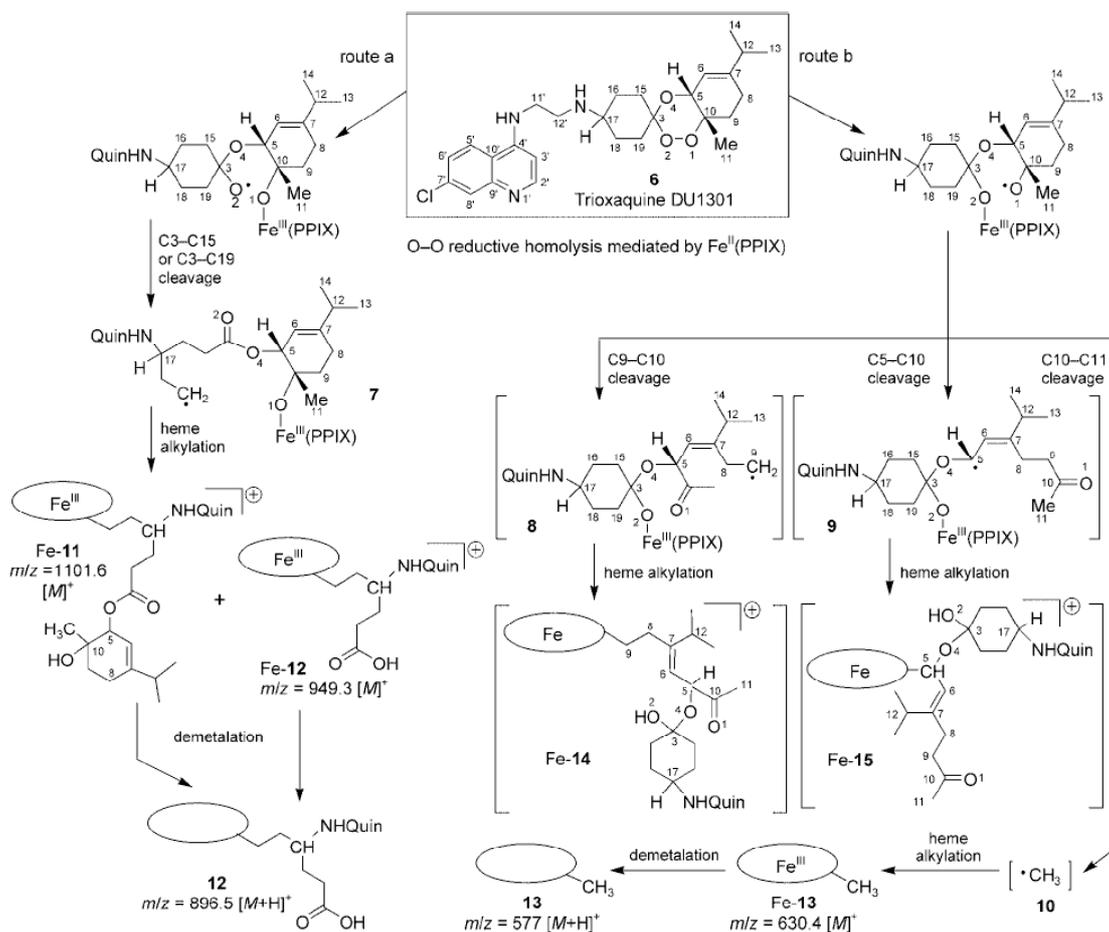
the cyclohexene ring in the mass spectrometer. Consequently, the more probable structure for the main heme–trioxoquine adduct is Fe-**11** (yield ca. 50% with respect to heme). Furthermore, both Fe-**14** and Fe-**15** have a hemiacetal structure at C3, which is supposed to be less stable than Fe-**11**, and no fragment coming from the putative Fe-**14** or Fe-**15** could be characterized. The yield of the alkylation reaction by HPLC was 50–60%.

In addition, Fe-**13** ($m/z=630.4$ [M]⁺; Scheme 2) was identified as a minor product (< 10% with respect to starting heme). The cleavage of the C10–C11 bond of the alkoxy radical on O1 produced a methyl radical **10**, which alkylated heme to yield Fe-**13**. This adduct was confirmed by detection, after demetalation of the heme–trioxoquine pool of adducts, of the *meso*-methylated protoporphyrin-IX derivative **13** ($m/z=577$ [$M+H$]⁺).

It should be noted that when heme reacted with an artemisinin derivative, its alkylation by a drug radical arising from the alkoxy radical on O1 has never been characterized. The absence of formation of an O1-radical in the heme activation of artemisinin derivatives should be attributed to a preferred interaction between heme and artemisinin derivatives, rather than to a particular intrinsic reactivity of trioxane entities.

The demetalation of the heme–trioxoquine covalent adducts yielded **12** as the main compound (Scheme 2). In fact, the covalent adduct Fe-**11**, containing the complete heme and trioxoquine moieties, was fragile under the strongly acidic demetalation conditions. The ester function was therefore hydrolyzed, and the α -terpinene-derived cyclohexene C5–C8–C10 cycle was lost, giving rise to compound **12** [$m/z=896.5$ [$M+H$]⁺].

This covalent adduct **12** was poorly soluble due to strong stacking interactions between the heme and aminoquinoline entities, and was difficult to purify for a complete characterization by NMR. We therefore repeated the alkylation reaction using the dimethyl ester of heme instead of heme itself (Scheme 3).^[2c] In this case, the major covalent adduct **16**, resulting from the alkylation of the *meso* positions of the protoporphyrin-IX dimethyl ester by a trioxoquine derived alkyl radical, was characterized by ¹H NMR. The use of deuterated pyridine as solvent and heating to 353 K were necessary to avoid the stacking of the porphyrin and the quinoline cycles that considerably broaden the signals in other solvents. The *meso*-H resonances appeared at 10.2–10.6 ppm as a pattern of three sets of three singlets each when the spectrum was recorded at 293–323 K (total integral consistent with three protons). This clearly indicates the presence of three regioisomers of **16** (ratio: 50:30:20). As in the case of the alkylation of heme by artemisinin, there was no clear selectivity in the alkylation of the *meso* positions. The intracyclic NHs were detected at –2.96 ppm. One vinyl system was clearly identified at 6.48 (H_a), 6.23 (H_b), and 8.45 ppm (H_c). The other one was broad and partly overlapped with quinoline. The protons of the quinoline were detected at 7.70 ppm (H8'), 7.0–7.4 (H2', H3', H5', and H6'), and 5.70 (HN-C4'). The covalent coupling between the trioxoquine and heme moieties was supported by the resonance of H₂C15 at 5.25 and 5.36 ppm.



Scheme 2. Alkylation of heme by trioxaquine DU1301. Alkylation occurred at four meso positions, only alkylation at the β position is depicted. The structures in square brackets have not been characterized.

Conclusion

Trioxaquinones with a 1,2,4-trioxane cycle have been designed in order to mimic the alkylating ability of artemisinin, which might be related to its biological activity. We therefore compared the chemical reactivity toward heme of artesunic acid, a widely used derivative of artemisinin, and the reactivity of a trioxaquinone, DU1301, that is highly active against *Plasmodium* in vitro and in vivo.

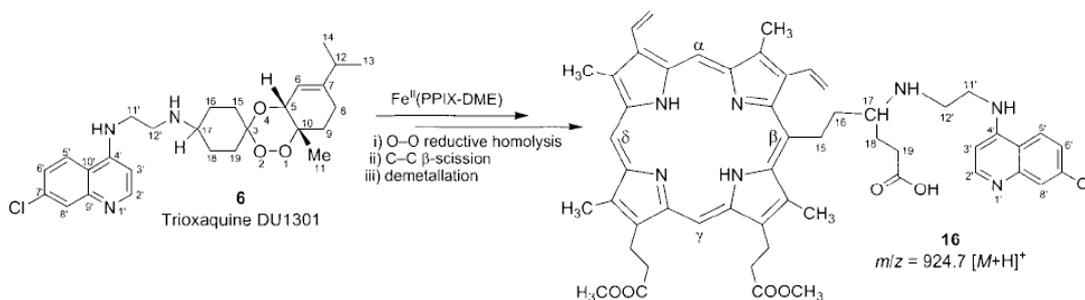
Both artesunic acid and trioxaquinone DU1301 were able to efficiently alkylate the heme macrocycle, after activation of their peroxide function by the iron(II) of heme, and give rise to covalent heme–drug adducts. In the case of artesunic acid, activation of the peroxide produced an alkoxy radical at O2 that, after isomerization into the primary alkyl radical **7**, reacted with heme. As previously reported for artemisinin in the presence of heme, no product arising from a putative radical on O1 was evidenced. However, in the case of DU1301, the two different routes produced alkoxy radicals either at O1 or at O2,

giving rise to the different heme–trioxoquinone covalent adducts Fe-11 and Fe-13. This heme–drug adduct formation might be related to the high antimalarial activity of DU1301.

Experimental Section

Material and methods: NMR spectra were recorded on Bruker spectrometers at 250 and 500 MHz (¹H). Chemical shifts are given with respect to external TMS. LC-MS analyses and ES mass spectra were acquired on a API 365 Sciex Perkin–Elmer instrument. Chromatography columns were performed on silica gel 60 ACC Chromagel, 70–230 μ m granulometry. Artesunic acid was a gift from Sanofi–Aventis, Gentilly, France.

HPLC conditions for the heme–artesunic acid adducts: The alkylation of heme was monitored on a 10 μ m C18 Nucleosil column. The eluent solution was methanol/water/acetic acid (6.6:3.3:1), elution rate: 0.6 mL min⁻¹. Detection was at 406 nm. Retention times: 13.3 min (heme), 16.3, 19.9, 22.2 min (adducts).



Scheme 3. Alkylation of heme dimethyl ester by trioxaquine DU1301. NMR characterization of the covalent adduct **16**. Alkylation occurred mainly at three meso positions, only alkylation at the β position is depicted.

HPLC conditions for the heme–trioxaquine adducts: The alkylation of heme and heme dimethyl ester by trioxaquine was monitored on a 10 μ m C18 nucleosil column. The eluants solutions were A: methanol/water/trifluoroacetic acid (70:30:0.1) and B: methanol/trifluoroacetic acid 100:0.1. The elution was a linear gradient from A/B = 100:0 to A/B = 0:100 over 25 min, followed by 10 min at A/B = 0:100. The flow rate was 1 mL min⁻¹. A diode-array detector was used for detection of the products and monitoring of UV/Vis spectra. Only the products that retain the quinoline nucleus ($\lambda_{\text{max}} = 350$ nm) and porphyrin moiety ($\lambda_{\text{max}} = 400$ nm), with $\epsilon_{400}/\epsilon_{350} = 2.6 \pm 0.2$, were considered. Retention times: 10.6 min (heme), 11.5–19.0 min (heme–trioxaquine adducts).

HPLC conditions for the (protoporphyrin-IX)–trioxaquine adducts: The analytical conditions were the same as described above for the metalated heme–trioxaquine adducts. The (protoporphyrin-IX)–trioxaquine adducts were characterized by $\epsilon_{410}/\epsilon_{350} = 3.3 \pm 0.2$ and retention times of 6.1, 8.5, 16.5, 17.7 min (H₂PPIX–trioxaquine adducts), 19.4 min (H₂PPIX).

HPLC conditions for the heme dimethyl ester–trioxaquine adducts: The analytical conditions were as described above for the heme–trioxaquine adducts. Retention times: 13.0 min (heme–DME), 14.5–18.0 min (heme–DME–trioxaquine adducts).

HPLC conditions for the protoporphyrin-IX dimethyl ester–trioxaquine adducts: The analytic conditions were the same as described above for the heme–trioxaquine adducts. Retention time: 21.0, 22.3 min [(H₂PPIX–DME)–trioxaquine adducts], 27.2 min (H₂PPIX–DME).

LC-MS conditions for the heme–trioxaquine adducts, the heme-dimethyl ester–trioxaquine adducts, and the protoporphyrin-IX–trioxaquine adducts: The LC conditions were as described above for the heme–trioxaquine adducts, except that the trifluoroacetic acid concentration in the eluent was 0.01%, and the flow rate was 0.5 mL min⁻¹. MS detection was in ES⁺ mode.

Heme–artesianic acid adducts: Fe^{III}(PPIX)Cl (hemin, 65 mg, 100 μ mol) and artesianic acid (38 mg, 100 μ mol) were dissolved in DMSO (3.5 mL). A solution of sodium dithionite (85 wt%, 17.4 mg, 100 μ mol) in water (0.4 mL) was added. The reaction was monitored by HPLC. After 40 min at room temperature, the reaction mixture was precipitated by addition of water. The precipitate was filtered, washed with water, dissolved in acetone, and dried under vacuum. Yield: 92% of a mixture of Fe-2 and Fe-3, containing 4% of heme. UV/Vis (DMSO): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 416$ nm (60×10^3 L mol⁻¹ cm⁻¹); ES⁻-MS: m/z (%): 998.7 (100) [M–2H]⁻ for Fe-2, 838.8 (15) [M–2H]⁻ for Fe-3

Demetalation of heme–artesianic acid adducts: A mixture of adducts Fe-2 + Fe-3 (100 μ mol) was dissolved in glacial acetic acid (83 mL). A mixture of ferrous sulfate (380 mg, 2.5 mmol) and 12 M hydrochloric acid (2.5 mL) was then added. After 5 min, water (200 mL) was added, and the demetalated adducts **2** + **3** were extracted with ethyl acetate (4 \times 75 mL). The organic phase was washed with water, dried over sodium sulfate, and concentrated. The product was precipitated by addition of hexane. Yield 85%; UV/Vis (ethyl acetate): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 426$ (100), 570 nm (7); ES⁺-MS: m/z (%): 787.6 (100) [M+H]⁺ for **3**, 809.7 (48) [M–H+Na]⁺ for **3**, 829.6 (71) [M+H–succinic acid]⁺ for **2**.

Derivatization of heme–artesianic acid adducts) Dinitrophenylhydrazones **4:** Compound **3** (42 μ mol) was dissolved in 95% ethanol (0.8 mL). A solution of 2,4-dinitrophenylhydrazine (84 μ mol) in concentrated H₂SO₄/water/95% ethanol (1:1:3, v/v/v, 0.5 mL) was then added. After 20 min at room temperature, the mixture was cooled to 0 °C and diluted with 1 M H₂SO₄ (3 mL). The precipitate of bis-dinitrophenylhydrazone **4** was centrifuged, washed with water, and dried under vacuum. UV/Vis (acetone): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 362$ (49), 426 (100), 570 nm (7); ES⁺-MS: m/z (%): 1147.4 (R¹ = R² = H, [M+H]⁺), 1175.4 (R¹ = H, R² = Et, [M+H]⁺), 1203.8 (R¹ = R² = Et, [M+H]⁺).

ii) **Diethyl acetal **5**:** Compound **3** (42 μ mol) was dissolved in absolute ethanol (1.2 mL). Under argon, triethylorthoformate (84 μ mol) and HCl (0.15 mL, 5 M in propan-2-ol) were added. After 24 h at room temperature, adducts **5** were precipitated by addition of water. The precipitate was centrifuged, washed with water, dried under vacuum, and purified by column chromatography: SiO₂, eluants: i) dichloromethane/methanol (98:2, v/v); ii) hexane/diethyl ether (50:50, v/v). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): $\delta = 10.21$ –9.79 (3H; meso-H), 8.33–7.98 (2H; vinyl-H₂), 6.36–5.89 (4H; vinyl H_a and H_b), 5.45–5.00 (4H; H₂C₄, H10 and H12), 4.35 (4H; β -pyrrolic –CH₂–), 4.17 (4H; –COO–CH₂–CH₃, 4H; –CH₂–O–C10 or –CH₂–O–C12), 3.74–3.56 (12H; β -pyrrolic –CH₃, 2H; –CH₂–O–C10 or –CH₂–O–C12), 3.29–3.14 (4H; –CH₂–COOEt, 2H; –CH₂–O–C10 or –CH₂–O–C12), 2.00–0.65 (CH₂–CH₃, H₂C₅, H_{5a}, H₆, H₃C–C₆, H₂C₇, H₂C₈, H_{8a}, H₉, and H₃C–C₉), –2.60 to –3.10 ppm (2H; NH); ES⁺-MS: m/z : 917.5 ([M+H]⁺ for –CHO at C10 or C12, and diethylacetal at C12 or C10), 871.5 ([M]⁺ for –CHO at C10 or C12, and –CH(=O)Et at C12 or C10).

iii) **Ethylene acetal **6**:** Compound **3** (32 μ mol) was dissolved in triethylorthoformate (0.5 mL). *p*-Toluene sulfonic acid (20 μ mol) and ethylene glycol (680 μ mol) were then added. After 8 h at 80 °C, water (10 mL) was added, and the solution was neutralized by aqueous NaOH saturated with NaCl and extracted with dichloromethane (5 \times 20 mL). The organic phase was washed with water, dried over sodium sulfate, dried under vacuum, and purified by

CHEMBIOCHEM

A. Robert, B. Meunier et al.

column chromatography: SiO₂, eluants: i) dichloromethane/methanol (96:4, v/v); ii) hexane/diethyl ether (60:40, v/v). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 10.23–9.78 (3H; meso-H), 8.35–7.80 (2H; vinyl-H₂), 6.38–5.80 (4H; vinyl H₃ and H₄), 5.34–4.70 (4H; H₂C₄, H10 and H12), 4.67, 4.50 and 4.37 (12H; β-pyrrolic -CH₂-, -CH₂-O-C10, and -CH₂-O-C12), 3.85–3.50 (16H; β-pyrrolic -CH₃ and -COO-CH₂-CH₃), 3.30–3.05 (4H; -CH₂-COOEt), 2.00–0.7 (CH₂-CH₃, H₂C₅, H5a, H6, H₃C-C6, H₂C7, H₂C8, H8a, H9, and H₃C-C9), –2.7 to –2.8 ppm (2H; NH); ES⁺-MS: m/z: 931.5 [M+H]⁺.

Heme–trioxaquine adducts: Fe^{III}(PPIX)Cl (hemin, 3.2 mg, 4.9 μmol), L-ascorbic acid sodium salt (3 mg, 15 μmol, 3 equiv), and the di-citrate salt of trioxaquine DU1301 **6** (*trans,cis*-diastereoisomer,^[14C] 5.1 mg, 5.9 μmol, 1.2 equiv) were dissolved in DMSO (500 μL). The solution was stirred 30 min at 37 °C. HPLC monitoring indicated 60% conversion of heme and 100% conversion of trioxaquine. H₂O (4 mL) was added, and the mixture was separated in a centrifuge. The precipitate was washed twice with water and dried under vacuum. ES⁺-MS: m/z: 630.4 ([M]⁺ for Fe-13), 949.6 ([M]⁺ for Fe-12), 1101.8 ([M]⁺ for Fe-11); LC-MS: retention time (m/z): 22.9 min (616.4, heme, [M]⁺), 24–26 min (1101.4, Fe-11, [M]⁺; 475.2, Fe-12, [M+H]²⁺).

Demetalation for the heme–trioxaquine adducts: The crude product was dissolved in pyridine (100 μL) under nitrogen, and the solution was diluted with glacial acetic acid (5 mL). A suspension of FeSO₄ (20 mg, 131 μmol, 27 equiv) in hydrochloric acid (37 wt%, 400 μL) was added. The solution was stirred for 10 min at 40 °C, then poured into water (20 mL). This acidic solution was neutralized by addition of 1 M aqueous NaOH. The organic products were extracted with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over sodium sulfate, and evaporated to dryness. LC-MS: retention times (m/z): 24.3–25.3 min (577.4, **13**, [M+H]⁺), 26–27 (896.5, **12**, [M+H]⁺), 29.3 (563.3, H₂PPIX, [M+H]⁺).

Heme dimethyl ester–trioxaquine adducts: Hemin dimethyl ester (heme-DME, 40 mg, 59 μmol), trioxaquine DU1301 **6** (*trans,cis*-diastereoisomer,^[14C] 34.3 mg, 70.5 μmol, 1.2 equiv), and 2,3-dimethylhydroquinone (81.5 mg, 590 μmol, 10 equiv) were dissolved in degassed dichloromethane under nitrogen. This solution was stirred for 30 min at room temperature and evaporated to dryness. HPLC monitoring indicated 60% conversion of heme-dimethyl ester and 100% conversion of trioxaquine. The crude product was dissolved in glacial acetic acid (30 mL) under nitrogen. A suspension of FeSO₄ (180 mg, 1.2 mmol, 17 equiv) in hydrochloric acid (37 wt%, 1.2 mL) was added. The solution was stirred for 10 min at room temperature. Dichloromethane (100 mL) was then added under air. The organic layer was washed with aqueous saturated NaCl (3 × 100 mL), aqueous sodium hydroxide (0.1 M, 2 × 100 mL), and water (2 × 100 mL), dried over sodium sulfate, and evaporated to dryness. The powder was separated by chromatography on silica gel. H₂PPIX-DME was first eluted with dichloromethane/ethanol (99:1, v/v), compound **16** was then eluted with dichloromethane/metha-

no/triethylamine (84:15:1, v/v/v). Further purification on a C18 column (CH₃OH/H₂O/HCOOH 73:18:9, v/v/v) afforded **16** with purity higher than 85% (HPLC). The yield of **16** from heme was 15% (alkylation, demetalation, and purification steps). ¹H NMR (500 MHz, C₅D₅, 353 K): δ = 10.53, 10.52, 10.47, 10.45, 10.38, 10.35, 10.26 (3H; meso-H), 10.8 (1H; -COOH), 8.45 (1H; vinyl-H₂), 7.75 (1H; vinyl-H₂), 7.70 (H8'), 7.4–7.0 (H2', H3', H5', and H6'), 6.48 (1H; vinyl-H₂), 6.23 (1H; vinyl-H₄), 5.97 (1H; vinyl), 5.70 (1H; HNC4), 5.36–5.25 (2H; H₂C15), 4.58 (4H; β-pyrrolic -CH₂-), 3.8–3.5 (β-pyrrolic -CH₃ -CH₂-COOCH₃), 3.20 (H₂C11'), 3.10 (H₂C12'), 2.55 (HC17), 2.52 (H₂C19), 2.40 (HNC12'), 2.30–1.60 (H₂C16), 1.80 (H₂C18), –2.96 ppm (2H; NH); LC-MS: retention times (m/z): 30–35 min (924.7, **16**, [M+H]⁺).

Acknowledgements

S.L. is indebted to the CNRS and Palumed for a doctoral joint-fellowship. Dr. Yannick Coppel is gratefully acknowledged for NMR experiments at 500 MHz. Sanofi–Aventis is acknowledged for a gift of artesunic acid. Trioxaquinones are currently under preclinical studies by Palumed and Sanofi–Aventis.

Keywords: alkylation · artemisinin · heme · malaria · synthesis · trioxaquine

- [1] a) P. Newton, N. White, *Annu. Rev. Med.* **1999**, *50*, 179–192; b) F. Smithuis, I. van der Broek, N. Katterman, M. K. Kyaw, A. Brockman, S. Lwin, N. J. White, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2004**, *98*, 182–192.
- [2] a) A. Robert, J. Cazelles, B. Meunier, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2008–2011; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1954–1957; b) A. Robert, B. Meunier, *Chem. Commun.* **2002**, 414–415; c) A. Robert, Y. Coppel, B. Meunier, *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *339*, 488–496.
- [3] a) G. H. Posner, C. H. Oh, D. Wang, L. Gerena, W. K. Milhous, S. R. Meshnick, W. Asawamasakda, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1256–1258; b) Y.-L. Hong, Y.-Z. Yang, S. R. Meshnick, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1994**, *63*, 121–128; c) J. Bhisuttibhan, X.-Q. Pan, P. A. Hossler, D. J. Walker, C. A. Yowell, J. Carlton, J. B. Dame, S. R. Meshnick, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 16192–16198; d) A. Robert, O. Dechy-Cabaret, J. Cazelles, B. Meunier, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 167–174; e) U. Eckstein-Ludwig, R. J. Webb, I. D. A. van-Goethem, J. M. East, A. G. Lee, M. Kimura, P. M. O'Neill, S. A. Ward, S. Krishna, *Nature* **2003**, *424*, 957–961; f) P. M. O'Neill, G. H. Posner, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2945–2964.
- [4] a) O. Dechy-Cabaret, F. Benoit-Vical, A. Robert, B. Meunier, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 281–283; b) L. K. Basco, O. Dechy-Cabaret, M. Ndounga, F. S. Meche, A. Robert, B. Meunier, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1886–1888; c) O. Dechy-Cabaret, F. Benoit-Vical, C. Loup, A. Robert, H. Gornitzka, A. Bonhoure, H. Vial, J.-F. Magnaval, J.-P. Séguéla, B. Meunier, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1625–1636.

Received: July 19, 2004

Published online on March 2, 2005

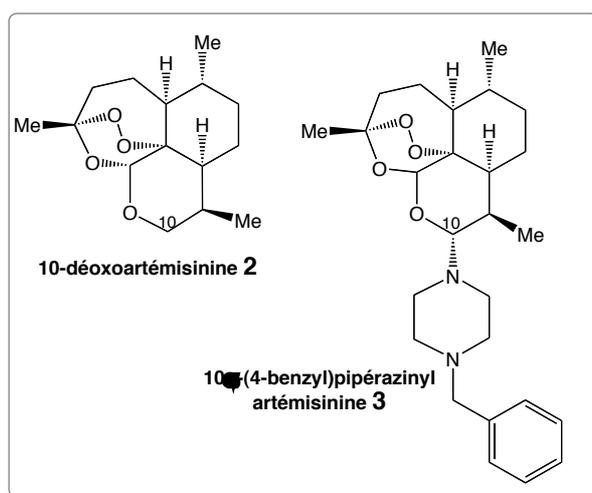
CHAPITRE II : DÉRIVÉS DE LA DÉOXOARTÉMISININE MODIFIÉS EN C10

Résumé de la publication suivante : Laurent S. A.-L., Robert A., Meunier B. C10-modified artemisinin derivatives : efficient heme-alkylating agents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2060-2063.

INTRODUCTION

Comme nous l'avons montré au chapitre précédent, dans le cas de l'acide artésunique, un substituant α en position C10 n'inhibe pas la capacité alkylante d'un dérivé de l'artémisinine. Cette position est suffisamment éloignée du pont peroxyde pour que l'interaction entre le métal et le peroxyde se produise et que le transfert monoélectronique, initiant l'activation réductrice du peroxyde, ne soit pas empêché.

Dans un article paru en **2004**, Haynes *et al.* décrivent des dérivés substitués en C10 ainsi que leurs propriétés antipaludiques [1]. Certains composés, en particulier la 10 α -(4-benzyl)pipérazinylartémisinine **3**^{*}, sont très actifs *in vitro* et *in vivo*. Dans cet article, les auteurs rapportent que certains composés, comme la 10-déoxoartémisinine **2**, ne réagissent pas avec l'hème ou bien sont décomposés par l'hème sans produire d'adduits covalents. Les auteurs en concluent que l'activation réductrice de l'artémisinine par l'hème et sa capacité d'alkylation ne peuvent en aucun cas avoir une relation avec son activité antipaludique.



Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de l'alkylation de l'hème par deux molécules décrites dans cet article : la 10-déoxoartémisinine **2** et la 10 α -(4-benzyl)pipérazinylartémisinine **3**. Ces molécules diffèrent par la présence (dans **3**) ou l'absence (dans **2**) de substituants en position C10. Nous souhaitons donc tester réellement les capacités alkylantes de ces deux antipaludiques : dans les deux cas les adduits covalents hème-drogue sont obtenus avec de bons rendements et caractérisés par spectrométrie de masse et RMN.

^{*} les numérotations des composés correspondent à celles de l'article publié dans *Angew. Chem.* (cf. page 86)

I – ALKYLATION DE L'HÈME PAR LA 10-DÉOXOARTÉMISININE 2

La 10-déoxoartémisinine **2** est préparée par réduction de l'artémisinine par le borohydrure de sodium en présence d'éthérate de BF₃ dans le THF avec un rendement de 63% selon un protocole modifié de Mankil Jung *et al.* [2]. En effet, si aucune précaution n'est prise lors du traitement, l'hydrolyse du trifluorure de bore libère de l'acide fluorhydrique qui hydrolyse les acétals et dégrade ainsi le cycle de la déoxoartémisinine. Pour éviter cette dégradation, le mélange réactionnel est donc versé sur une solution aqueuse de soude de manière à neutraliser l'acide formé.

L'alkylation de l'hème ou de l'hème diméthylester, pour des raisons de solubilité et de facilité de purification, se fait dans les mêmes conditions que celles qui ont été utilisées par notre équipe pour la mise en évidence et la caractérisation des produits d'alkylation entre l'hème et l'artémisinine et décrites au chapitre précédent (dithionite de sodium, DMSO). Dans ces conditions, des produits de couplage **6-Fe** et **8-Fe** sont isolés et analysés par spectrométrie de masse, puis par RMN après démétallation.

L'activation réductrice du peroxyde par l'hème-fer(II) génère un radical oxygéné qui se réarrange rapidement via la rupture homolytique de la liaison C3-C4 adjacente (figure 1).

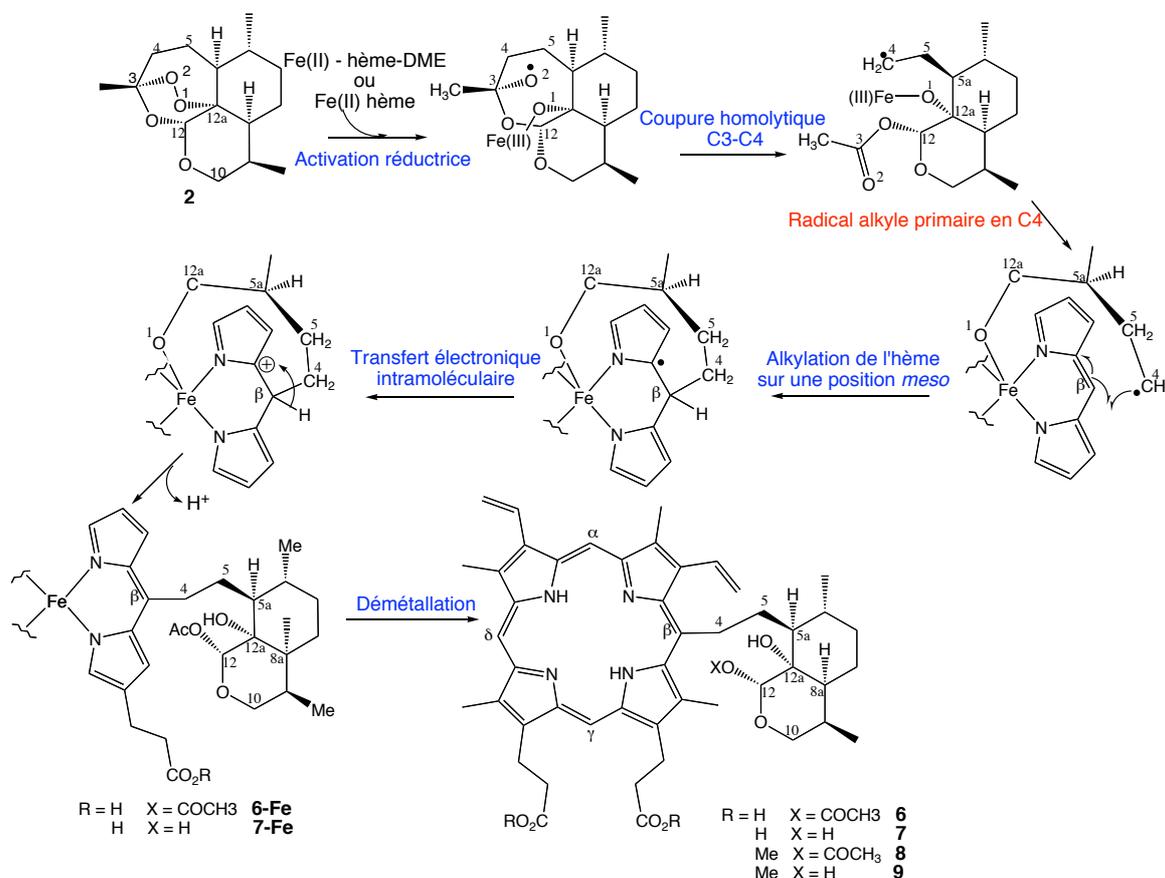


Figure 1 : Mécanisme d'alkylation de la déoxoartémisinine.

Le radical alkyle primaire en C4, formé par l'homolyse de la liaison C3-C4, s'additionne de manière intramoléculaire sur un sommet *méso* de la porphyrine. Cette addition crée un radical sur un sommet β -pyrrolique. Il s'en suit un transfert monoélectronique intramoléculaire pour former un site cationique. La perte d'un proton permet la réaromatisation du macrocycle pour donner les adduits **6-Fe** et **8-Fe**. La démétallation de la porphyrine permet la formation des adduits " entiers " **6** et **8** caractérisés par SM ($m/z = 831,3 [M+H]^+$ pour **6** et $m/z = 859,5 [M+H]^+$ pour **8**).

La purification du produit d'alkylation de l'hème-diméthylester par le composé **2**, par chromatographie sur colonne de silice, ne permet d'isoler qu'un produit, dont l'analyse indique une masse de 816,5 correspondant au produit dé-acétylé **9**. Ces adduits ont été caractérisés par RMN 1D et 2D. Trois jeux de signaux sont obtenus dans la zone des protons *méso* : l'alkylation se fait préférentiellement sur les sommets α , β et δ . Le signal du groupe méthylène C4, preuve du couplage covalent entre le radical alkyle primaire et le cycle porphyrinique, est détecté dans la zone 5,42-5,05 ppm. Les protons H10 sont couplés au carbone C10 (détecté à 61 ppm), le proton H12 est couplé au carbone C12, détecté à 93-95 ppm. Les corrélations $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ nous permettent donc d'écarter toute hypothèse d'hydrolyse du cycle C8a-C10-C12. Une telle hydrolyse conduirait à la formation d'une fonction alcool en C10 et d'une fonction aldéhyde en C12, non détectées.

II – ALKYLATION DE L'HÈME PAR LA 10 α -(4-BENZYL)-PIPÉRAZINYLA RTÉMISININE **3**

II.1 – Préparation du composé **3**

Le composé 10 α -(4-benzyl)pipérazinylartémisinine **3** est préparé à partir de la dihydroartémisinine **15** (figure 2). L'artémisinine est réduite par le borohydrure de sodium dans le méthanol en dihydroartémisinine **15** avec un rendement de 91% sous la forme d'un mélange constitué des deux épimères en proportions 50 / 50 [**3**]. L'alcool en position C10 de la DHA **15** est silylée par du chlorure de triméthylsilyle. Il est possible à partir du mélange des deux épimères de la DHA de n'obtenir qu'un seul des épimères du dérivé silylé selon les conditions utilisées. Le dérivé α -silyloxy **α -4** est préparé avec du chlorure de triméthylsilyle dans le DCM en présence de TEA [**4**] avec un rendement de 72%, alors que le dérivé β -silyloxy en **β -4** est synthétisé avec le chlorure de triméthylsilyle dans la pyridine et un rendement de 81%.

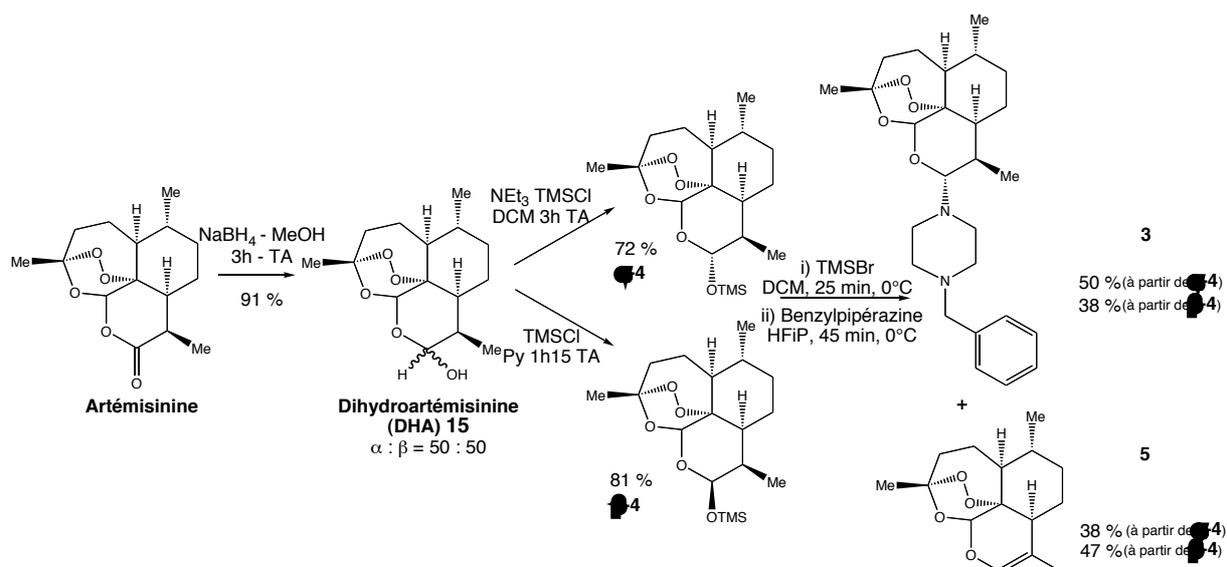


Figure 2 : Préparation de la 10 α -(4-benzyl)pipérazinylartémisinine 3.

Il est aisé de distinguer les deux épimères α -4 et β -4 en RMN ^1H par la constante de couplage entre les protons H9 et H10. Dans le cas du dérivé α -silyloxy α -4, les protons H9 et H10 ont une position relative *trans* (axial-axial), caractérisée par une grande constante de couplage de 9,0 Hz. Pour le dérivé β -silyloxy β -4, les protons H9 et H10 ont une position relative *cis* (équatorial-axial), caractérisée par une constante de couplage de 2,4 Hz.

Le dérivé de la déoxoartémisinine substituée en C10 par la 1-benzylpipérazine peut être préparé selon Haynes [1] en traitant l' α -silyloxy α -4 par du bromure de triméthylsilyle dans le DCM. Le bromure en β formé intermédiairement est substitué par la 1-benzylpipérazine dans le DCM. Entre nos mains et dans ces conditions, seul le produit d'élimination 5 a été isolé avec un rendement de 81% après purification. En effet, si selon la référence 1, le bromure formé intermédiairement est en β , position antipériplanaire trans-diaxiale par rapport au proton H9 favorisée par un effet anomérique (figure 3), alors l'élimination de HBr (abstraction du proton H9 et élimination du Br), lors de l'ajout de l'amine, est favorisée.

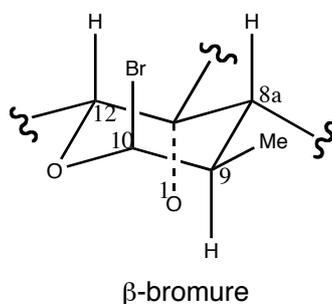


Figure 3: Conformation du bromure β formé intermédiairement à partir de l' α -silyloxy α -4.

À partir du β -silyloxy **β -4**, le produit d'élimination **5** a été obtenu avec un rendement de 83% lors de l'ajout de l'amine. Par contre, dans les conditions décrites par Magueur *et al.* [5], l'ajout de 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol (HFIP) nous a permis de limiter la réaction d'élimination quelle que soit la stéréochimie du groupement *O*-triméthylsilyyle et d'obtenir le produit de substitution **3**.

La substitution avec la 1-benzylpipérazine a donc été réalisée à partir des composés silyloxy α et β en présence d'HFIP. Avec le silyloxy α -4 (donc le bromure en β) nous avons obtenu le produit de couplage **3** avec un rendement de 50%. Dans le cas du silyloxy β -4, le produit de couplage **3** a été préparé avec un rendement de 38%. Les spectres RMN ¹H des produits de substitution présentent pour le proton H10 un doublet avec une constante de couplage $^3J_{H_{10}-H_9} = 10,2$ Hz, caractéristique d'un couplage entre deux protons en position antipériplanaire *trans*-diaxiale. Ainsi, la configuration α de la 1-benzylpipérazine est attribuée au produit **3** (figure 4).

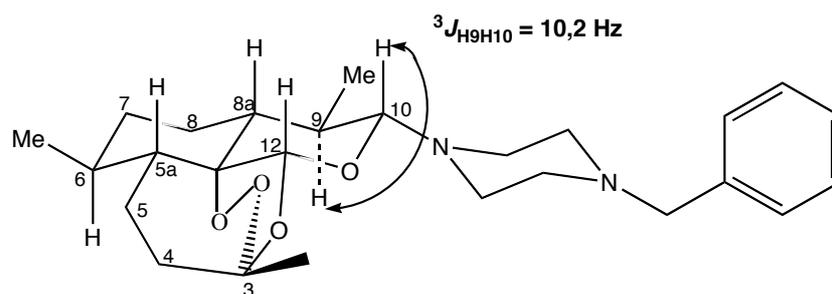


Figure 4 : Conformation de la déoxoartémisinine substituée en C10 par la 1-benzylpipérazine.

Plusieurs points au sujet de cette réaction peuvent être notés :

- le rendement semble légèrement plus élevé au départ de l' α -silyloxy α -4.
- les deux épimères du silyloxy **4**, ne génèrent finalement qu'un seul et même produit de substitution. Cette remarque indique que la réaction se fait par une réaction de SN1 avec passage par un carbocation. L'attaque de l'amine sur ce dernier se fait du côté du plan le moins encombré, c'est-à-dire en *anti* du méthyle en C9, pouvant induire un effet parapluie et donc une gêne stérique.
- le 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol est nécessaire puisqu'il permet de stabiliser le carbocation intermédiaire [6]. Des études, réalisées dans le cadre de la mesure de la persistance de cation pour des analyses de RPE, ont montré que la persistance des cations en présence d'HFIP est 100 fois

plus importante que dans des solvants considérés comme favorables tels que l'acide trifluoroacétique.

II.2 – Alkylation de l'hème par le dérivé 3

Dans les mêmes conditions que celles qui sont utilisées pour l'alkylation de l'hème avec l'artémisinine, des produits de couplage **10** (et **12**) et **11** (et **13**) dans le cas de l'hème (et de l'hème diméthylester) sont obtenus et caractérisés en spectrométrie de masse (figure 5).

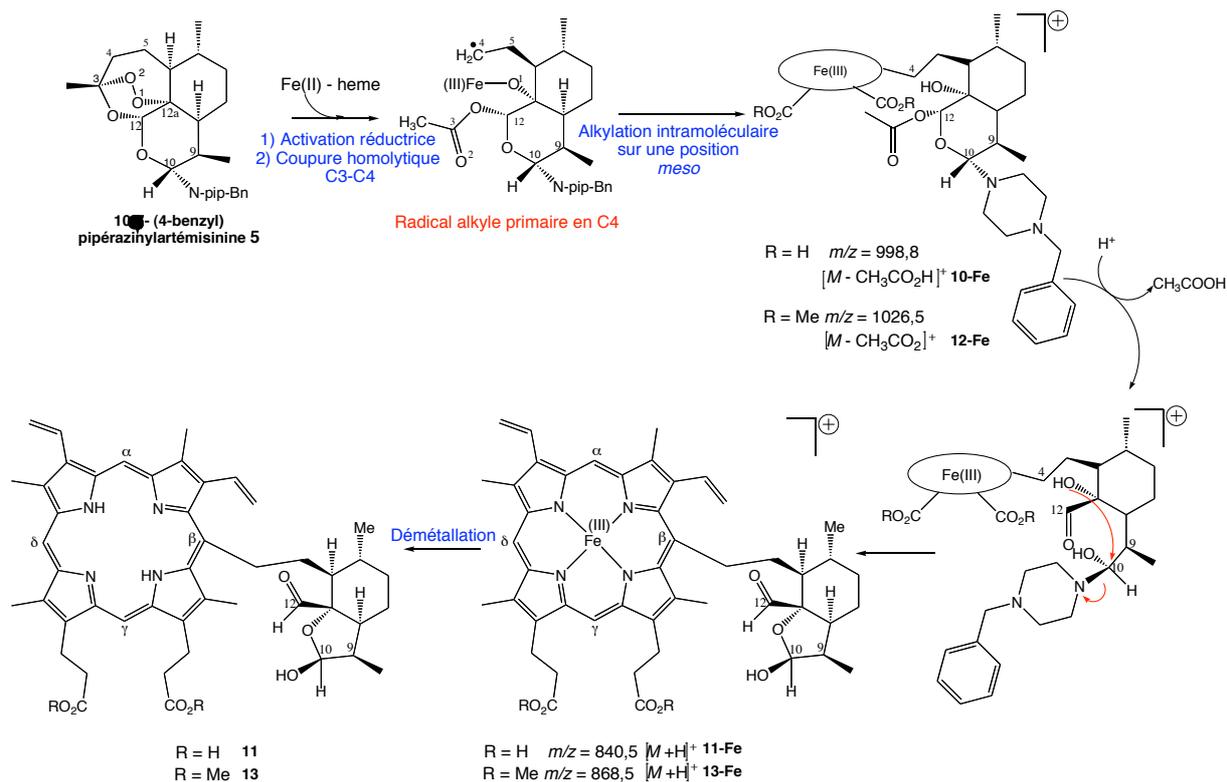


Figure 5 : Mécanisme réactionnel de l'alkylation de l'hème par le composé 3.

Un mécanisme réactionnel semblable à celui décrit précédemment permet d'expliquer la formation des produits obtenus. Après démétallation, l'analyse par SM ne permet pas de mettre en évidence les produits **10** et **12**, adduits " complets " de la PPIX avec le composé **5**. En effet, les conditions acides de la démétallation entraînent l'ouverture de l'acétal **12-Fe**, suivie par la substitution nucléophile intramoléculaire de l'hydroxyle en position 12a sur la carbone 10. Cette SN_2 s'accompagne de la perte du fragment benzylpipérazine pour donner les adduits **11** et **13**. Les adduits **11** et **13** ont été caractérisés par SM. Le spectre RMN du composé **13** présente quatre jeux de signaux dans la zone de 9,82 à 10,24 ppm, caractéristiques de l'alkylation de la porphyrine sur les quatre sommets *méso*. Le carbone 12 de la fonction aldéhydique est détecté à 209 ppm. Un massif résonant de 5,10 à 5,54 ppm,

dont l'intégrale vaut pour trois protons, a été attribué au méthylène H₂C₄ (preuve du couplage covalent) et au proton H₁₀. Ce massif est couplé avec les carbones C₄ et C₁₀ détectés respectivement à 31-33 ppm et 107 ppm. Le déplacement chimique du C₁₀ confirme la présence d'un cycle hémiacétal à 5 chaînons.

III - CONCLUSION

Il apparaît clairement de ces deux exemples, que les composés **2** et **3** sont, après activation réductrice, de puissantes espèces alkylantes de l'hème. L'encombrement stérique de la position 10 par la benzylpipérazine en α dans le composé **3**, pourtant du même côté que le pont peroxyde, ne gêne pas l'interaction entre le peroxyde et le centre métallique de la porphyrine, interaction nécessaire pour l'activation réductrice. L'encombrement de la position C₁₀ n'a pas d'influence sur la réactivité du peroxyde et donc sur ses propriétés alkylantes. **Il apparaît donc une fois de plus que les dérivés antipaludiques efficaces de l'artémisinine sont également de puissants alkylants de l'hème.**

IV – BIBLIOGRAPHIE

- [1] Haynes R.K., Ho W.-Y., Chan H.-W., Fugmann B., Stetter J., Croft S.L., Vivas W., Peters W., Robinson B.L. Highly antimalaria-active artemisinin derivatives: biological activity does not correlate with chemical reactivity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1381-1385.
- [2] Jung M., Li X., Bustos D.A., Elsohly H.N., McChesney J.D., Milhous W.K. Synthesis and antimalarial activity of (+)-deoxoartemisinin. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1516 – 1518.
- [3] Lin A.J., Klayman D.L., Milhous W.K. Antimalarial activity of new water-soluble dihydroartemisinin derivatives. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 2147 – 2150.
- [4] Haynes R.K., Chan H.-W., Cheung M.-K., Lam W.-L., Soo M.-K., Tsang H.-W., Voerste, Williams I.D. C-10 ester and ether derivatives of dihydroartemisinin – 10- α artesunate, preparation of authentic 10- β artesunate, and of other ester and ether derivatives bearing potential aromatic intercalating groups at C-10. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 113 – 132.
- [5] Magueur G., Crousse B., Charneau S., Grellier P., Bégué J.-P., Bonnet-Delpon D. Fluoroartemisinin : trifluoromethyl analogues of artemether and artesunate. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2694 – 2699.
- [6] Ebersson L., Hartshorn M.P., Persson O. 1,1,1,3,3,3-Hexafluoropropan-2-ol as a solvent for the generation of highly persistent radical cations. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 1735 – 1744.

Correspondence

Artemisinin Derivatives

C10-Modified Artemisinin Derivatives: Efficient Heme-Alkylating Agents**

Sophie A.-L. Laurent, Anne Robert,* and Bernard Meunier*

Keywords:

alkylation · antiviral agents · heme proteins · iron · porphyrinoids

Artemisinin (**1**, Figure 1) is a sesquiterpene extracted from the leaves of *Artemisia annua* which contains a 1,2,4-

des.^[1-4] Among the different possible mechanisms, one suggestion is that reductive activation of its endoperoxide

some of these efficient antimalarial C10-modified derivatives were unable to alkylate free heme. For example, the highly active 10-deoxoartemisinin derivative **2** (labeled **23** in Ref. [8]; see Figure 1) with a methylene group at C10 was totally inert to Fe^{II}-heme. On the other hand, the 10-(4-benzyl)-piperazinyl derivative **3** (labeled **18** in Ref. [8]) reacted with heme, however, the major reaction products, presumably heme–drug adducts, were not characterized.

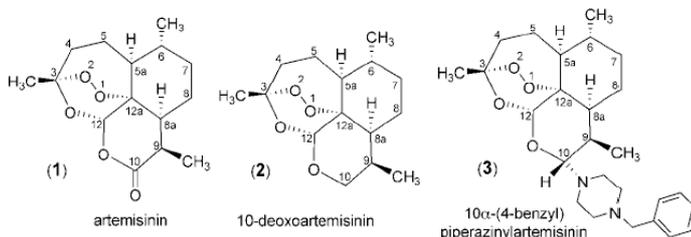


Figure 1. Structures of artemisinin (**1**), 10-deoxoartemisinin (**2**), and 10α-(4-benzyl)piperazinyl-10-deoxoartemisinin (**3**).

trioxane structure that is essential for its activity against malaria-infected erythrocytes. The mechanism of action of artemisinin has been the center of intense debate over the last two deca-

function by the iron(II) center of heme generates a C4-centered radical that alkylates the *meso* positions of protoporphyrin-IX (PPIX).^[5] We found that many antimalarial trioxanes related to artemisinin are also able to interact with heme or heme-like models and consequently alkylate the porphyrin ring.^[4c,6] We were working on the identification of heme–artesunate and heme–trioxoquinone adducts^[7] when Haynes et al. reported the preparation and antimalarial activities of several C10-substituted artemisinin derivatives.^[8] As all of these compounds are based on different substituents at the C10 position, no structural modification in terms of steric effects or reactivity is expected for the untouched trioxane entity of these derivatives. Consequently, one can expect that the heme-alkylating capacities of these molecules should be very similar to that of artemisinin, artemether, or artesunate. In Table 2 of the article by Haynes et al.,^[8] the authors claimed that

Herein we report that both compounds **2** and **3** are indeed potent heme-alkylating agents; both heme–drug adducts have been obtained in high yields. In fact, heme is poorly soluble in the mixture of acetonitrile and phosphate buffer (pH 7.4) used by Haynes et al. The saturation concentration of heme under these conditions at room temperature is not higher than 100 μM, and such a low solubility probably does not allow heme to react with artemisinin. For this reason of solubility, we used a homogeneous solution in dimethylsulfoxide (DMSO) containing 2–4 vol% of water in which heme was significantly more soluble (6 mM). Artemisinin itself and its derivatives **2** and **3** are not very soluble in aqueous solution. However, many drugs are insoluble in water, yet they are highly active, as hydrophobicity is required for them to cross cell membranes (e.g. the anticancer drug taxol is insoluble in water). Furthermore, solutions that contain some volume of DMSO are usually used in biologically relevant studies to evaluate the activity of artemisinin or related compounds *in vitro* and *in vivo*.^[9,10]

Compound **3** was obtained from the corresponding 10-trimethylsilyl ether

[*] S. A.-L. Laurent, Dr. A. Robert, Dr. B. Meunier
Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS
205 route de Narbonne
31077 Toulouse cedex 4 (France)
Fax: (+33) 5-6155-3003
E-mail: arobert@lcc-toulouse.fr
bmeunier@lcc-toulouse.fr

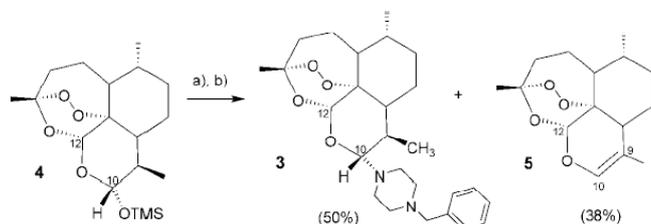
[**] Comments on “Highly Antimalaria-Active Artemisinin Derivatives: Biological Activity Does Not Correlate with Chemical Reactivity”. This work was supported by the CNRS and Palumed, and S.A.-L.L. is indebted to both for a joint fellowship. Dr. Y. Coppel (CNRS, Toulouse) is acknowledged for the measurement of 2D NMR spectra.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.angewandte.org> or from the author.

4^[11,12] after modification of the procedure published by Haynes et al.^[9] In our hands, the original procedure provided essentially the elimination product **5** with a double bond between C9 and C10 (Scheme 1). However, when

agents other than dithionite can be used. The use of glutathione (which is a “biological” reductant present at approximately 5-mM concentration in red blood cells) to form heme- or hemoglobin-artemisinin adducts has already

the loss of a molecule of acetic acid at C12. A small amount of unconverted heme ($m/z = 616.3$) was also present. A ratio of 89:11 of **6-Fe** to heme in the crude reaction mixture was indicated by mass spectrometry.



Scheme 1. Synthesis of 10 α -(4-benzyl)piperazinyl-10-deoxoartemisinin (**3**): a) TMSBr, 25 min, 0°C; b) 1-benzylpiperazine, HFIP, 45 min, 0°C. TMS = trimethylsilyl.

1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol (HFIP) was used as an additive^[10] in the amination step of the 10-brominated intermediate, the expected compound **3** was obtained in 50% yield (see Supporting Information). Compound **2** was prepared by using a modification of the described procedure,^[13] and then the two compounds **2** and **3** were tested for their alkylation of heme.

Alkylation of Heme by **2**

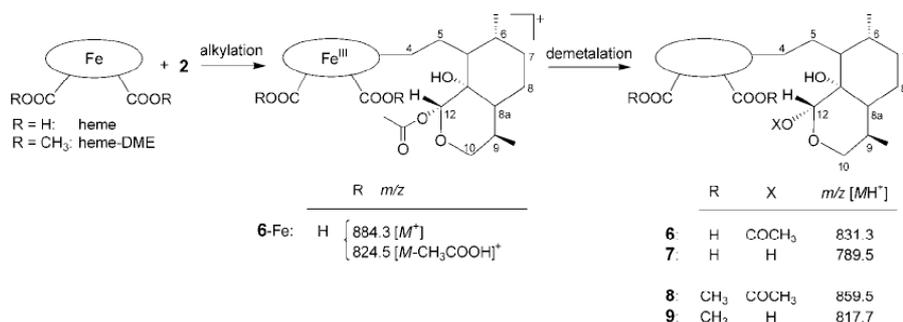
Iron(II) protoporphyrin-IX, generated in situ from its iron(III) analogue and sodium dithionite, readily reacted with **2** at room temperature to provide the covalent heme–drug adduct **6-Fe** (1:1 molar ratio of [Fe^{III}(PPIX)Cl]/**2**/dithionite; Scheme 2). In fact, several reducing

been reported.^[5b,c] This confirms that this alkylation process is not dependent on the reductant used, provided that its redox potential is consistent with the reduction of iron(III)-heme to iron(II)-heme. As previously described for artemisinin,^[2b,5] the reductive activation of the peroxide bond of 10-deoxoartemisinin leads to an alkoxy radical on O2 which, after β scission, gives a C4-centered radical. This species efficiently alkylates the *meso* carbon atoms of heme and leads to the four regioisomeric covalent adducts **6-Fe**. All of the porphyrinic material was precipitated from the reaction mixture and analyzed by mass spectrometry. The major compound was the adduct **6-Fe**, characterized by its molecular mass peak ($m/z = 884.4$ [M^+]) with the parent peak ($m/z = 824.4$ [$M-\text{CH}_3\text{COOH}^+$]) resulting from

The mixture of heme and **6-Fe** was demetalated to provide the free-base covalent adduct **6**, which was characterized by MS ($m/z = 831.3$ [$M\text{H}^+$]). However, owing to the strongly acidic conditions required for demetalation, the parent peak detected at $m/z = 789.5$ corresponded to compound **7**, which has a hemiacetal structure. The ratio of **6/7** was 3:10. As expected, a small amount of H₂PPIX was detected at $m/z = 563.3$ (ratio **6** + **7**/H₂PPIX = 81:19).

Owing to the low solubility of heme derivatives, the purification and characterization by NMR spectroscopy of these heme–drug adducts was not possible. We therefore repeated these reactions using heme-dimethylester (heme-DME) instead of heme. In this case, the alkylation reaction was immediately followed by demetalation to afford, as expected, a mixture of adducts **8** and **9**, which are the dimethylester analogues of compounds **6** and **7**. Adducts **8** and **9** were detected at $m/z = 859.5$ and 817.7, respectively ($M\text{H}^+$), with a ratio of **8/9** of 34:100, along with H₂PPIX-DME ($m/z = 591.3$). The yield of alkylation calculated from this analysis was 69% (for a 1:1 molar ratio of heme-DME/drug).

Column chromatography of this mixture yielded pure adduct **9**, which was characterized by 1D and 2D NMR spectroscopy. The ¹H NMR spectrum exhibited three signals in the range $\delta =$



Scheme 2. Alkylation of heme and heme-dimethylester by 10-deoxoartemisinin (**2**), and demetalation of the obtained adducts. The configuration at C12 of adducts **7** and **9** has not been verified.

Correspondence

10.63–9.76 ppm for the protons in the *meso* positions. The resonance of the methylene group at C4 was detected as a broad pattern at $\delta = 5.42$ –5.05 ppm, a proof of the covalent coupling between the porphyrin and drug moieties. The hemiacetal proton H12 gave a signal at $\delta = 4.63$ ppm. The signals for the two methylene protons at C10 at $\delta = 3.68$ and 3.27 ppm overlapped with those of the protons of the β -pyrrolic CH₃ and CH₂COOCH₃ groups, respectively. These assignments were attested by ¹H–¹³C correlation spectroscopy. Both protons H10 correlated with C10, which was detected at $\delta = 61$ ppm, and proton H12 correlated with the resonance found at $\delta = 93$ –95 ppm for C12. These NMR data allow to rule out the possible hydrolysis of the cycle C8a–C10–C12 with formation of an alcohol at C10 and an aldehyde at C12; in fact, such a product is expected to exhibit the same mass spectrum as **9**, but with different NMR characteristics.

Alkylation of Heme by **3**

Iron(II) protoporphyrin-IX was also efficiently alkylated by the C10-benzyl-

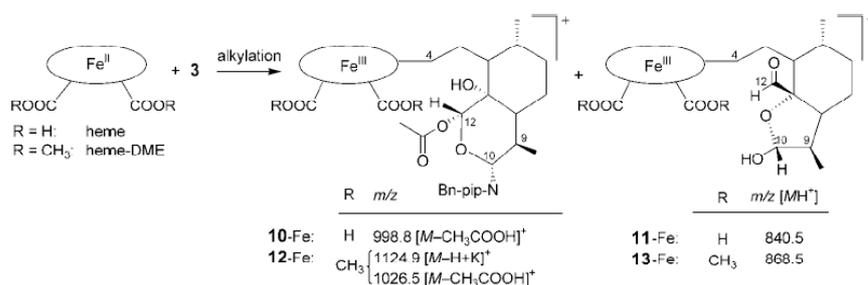
piperazinyl-substituted deoxoartemisinin derivative. Mass spectrometry of the crude porphyrinic residue revealed the presence of the adduct **10-Fe**, which corresponds to alkylation of heme at the *meso* positions by the drug **3** ($m/z = 998.8$, [M^{III}–CH₃COOH]⁺), along with a minor amount of unconverted heme (7% measured by HPLC; Scheme 3). The structure of **10-Fe** was confirmed by the presence of peaks at $m/z = 999.7$ and 499.9 which could be assigned to [M^{II}–CH₃COO]⁺ and [M^{III}–CH₃COO]²⁺, respectively (see Supporting Information). The reduction of iron(III) porphyrins and the loss of acetate at C12 in artemisinin-derived adducts under the analytical conditions of mass spectrometry are well-known phenomena.^[15]

Covalent adduct **11-Fe** ($m/z = 840.3$, MH⁺) was also produced during the alkylation of heme by **3** by hydrolysis of the C8a–C10–C12 cycle of adduct **10-Fe**, followed by nucleophilic attack of HO–C12a at C10, and loss of 1-benzylpiperazine (Scheme 4). This structure, which contains an exocyclic aldehyde, was confirmed by ¹H–¹³C NMR correlation spectroscopy after demetalation of the heme-dimethylester derivative (see be-

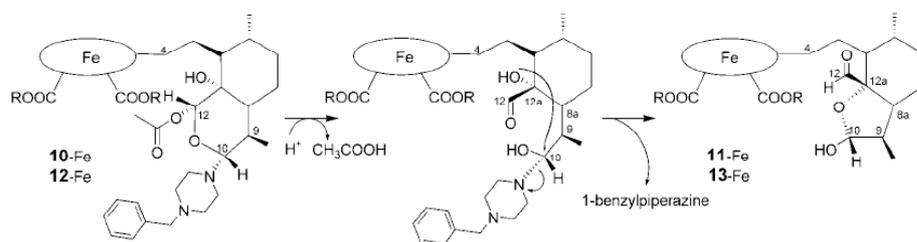
low). Minor peaks were also detected at $m/z = 858.7$ (hydration of the aldehyde function: +18 amu) and 872.5 (hydration of the aldehyde and methylation of the hydroxyl function: +32 amu). The ratio **10-Fe**/**11-Fe** was 43:57, as determined from mass spectrometry, while the ratio of **10-Fe** + **11-Fe**/[Fe(PPIX)] was 80:20.

Demetalation of the mixture of **10-Fe** and **11-Fe** was performed and gave rise to the respective free-base adducts **10** and **11**. Adduct **11** was characterized by the presence of its molecular peak at $m/z = 787.7$ (MH⁺) and a small signal at $m/z = 805.8$ owing to hydration of the aldehyde function. Adduct **10** was characterized by the presence of a peak at $m/z = 829.7$ owing to the loss of the benzylpiperazinyl substituent (see Supporting Information).

The identification of the covalent adducts **10-Fe** and **11-Fe** was confirmed by using heme-dimethylester instead of heme as the starting material. Under these circumstances, the analogous adducts **12-Fe** ($m/z = 1124.9$ [M–H+K]⁺, 1026.5 [M–CH₃COOH]⁺) and **13-Fe** ($m/z = 868.5$ [M⁺]) were observed (Scheme 4; yield = 77% from HPLC analysis). Demetalation of the mixture

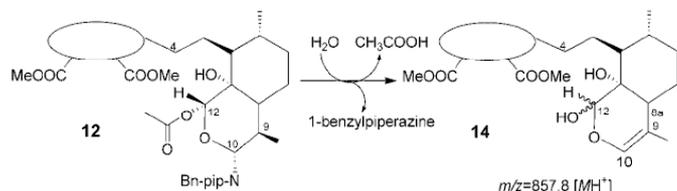


Scheme 3. Alkylation of heme and heme-dimethylester by 10 α -(4-benzyl)piperazinylartemisinin (**3**). Bn – benzyl, pip – piperazinyl.



Scheme 4. Modification of the covalent adducts **10-Fe** and **12-Fe** to give **11-Fe** and **13-Fe**, respectively. The configuration at C10 is more probable, but has not been verified.

of **12**-Fe and **13**-Fe yielded **13** as the main adduct ($m/z = 815.6$ [MH^+]), while a significant peak at $m/z = 857.8$ was also detected that probably corresponds to the molecular ion [M^+] of compound



Scheme 5. Structure of adduct **14**.

14 (see Scheme 5). The presence of this adduct, formed by the elimination of 9,10-piperazine from **12**, indicates that the C8a-C10-C12 cycle may withstand to some extent the harsh conditions required for the demetalation step. It also confirms the high propensity of the artemisinin derivatives that are substituted at C10 by an amine to produce the C9-C10 unsaturated derivative, as observed during the synthesis of **3**.

The structure of **13** was unambiguously determined by 1H - ^{13}C NMR correlation spectroscopy. The protons of the *meso* positions and the aldehyde (H12) appeared at $\delta = 9.82$ – 10.24 ppm (4H) and correlated with the *meso* carbon atoms and the carbonyl center C12 at $\delta = 95$ – 99 and 209 ppm, respectively. A broad pattern at $\delta = 5.10$ – 5.54 ppm accounted for three protons, namely from H₂C4 and H10, which correlated with C4 and C10 that were detected at $\delta = 31$ – 33 ppm and 107 ppm, respectively. These data confirm the presence of both the exocyclic aldehyde and the 5-membered cyclic hemiacetal. The NMR spectra were complex owing to the presence of four regioisomeric adducts. The confirmation of the stereochemistry at C10 could therefore not be obtained. However, the intramolecular reaction makes the *S* configuration probable.

Mass spectrometry is not, in principle, a quantitative method. However,

heme derivatives are supposed to have similar volatilities under given conditions. Furthermore, the consistency between the results of HPLC and MS analyses confirms that the yields of the

alkylation reactions of heme by **2** or **3** ranged from 70 to 90% under the reported conditions.

In conclusion, it is clear that compounds **2** and **3** are very efficient alkylating agents toward iron(II)-heme to provide covalent heme–drug adducts in high yields. The bulky amine substituent in the α position at C10 of compound **3** (on the same side as the peroxide bond) did not prevent the interaction with the iron center of heme that mediates the reductive activation. This is consistent with previous results obtained with model trioxanes which suggest that hindrance at C10 has no influence on the reactivity of the peroxide toward heme (active artesunate has an α configuration at C10). In fact, reduction of the carbonyl function at C10 to give an sp^3 -hybridized carbon center renders the C8a-C10-C12 cycle relatively labile, as previously reported for artemether.^[16] This feature somewhat complicates the characterization of the heme–drug adducts, but does not change the reactivity of the peroxide bond and, thus, does not alter the alkylating ability of these powerful antimalarial drugs.

[1] S. R. Meshnick, T. E. Taylor, S. Kamchonwongpaisan, *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 301–315.

[2] a) P. L. Olliaro, R. K. Haynes, B. Meunier, Y. Yuthavong, *Trends Parasitol.*

2001, *17*, 122–126; b) A. Robert, J. Cazelles, O. Dechy-Cabaret, B. Meunier, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 167–174.

[3] a) U. Eckstein-Ludwig, R. J. Webb, I. D. A. van Goethem, J. M. East, A. G. Lee, M. Kimura, P. M. O'Neill, P. G. Bray, S. A. Ward, S. Krishna, *Nature* **2003**, *424*, 957–961.

[4] P. M. O'Neill, G. H. Posner, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2945–2964.

[5] a) A. Robert, J. Cazelles, B. Meunier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1954–1957; b) A. Robert, Y. Coppel, B. Meunier, *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *339*, 488–496; c) K. Selmeczi, A. Robert, C. Claparols, B. Meunier, *FEBS Lett.* **2004**, *556*, 245–248.

[6] J. Cazelles, A. Robert, B. Meunier, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 609–612.

[7] S. A.-L. Laurent, C. Loup, S. Mourgues, A. Robert, B. Meunier, *ChemBioChem*, in press.

[8] R. K. Haynes, W.-Y. Ho, H.-W. Chan, B. Fugmann, J. Stetter, S. L. Croft, L. Vivas, W. Peters, B. L. Robinson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1381–1385.

[9] a) P. M. O'Neill, A. Miller, L. P. D. Bishop, S. Hindley, J. L. Maggs, S. A. Ward, S. M. Roberts, F. Scheinmann, A. V. Stachulski, G. H. Posner, B. K. Park, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 58–68; b) S. Hindley, S. A. Ward, R. C. Storr, N. L. Searle, P. G. Bray, B. K. Park, J. Davies, P. M. O'Neill, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1052–1063; c) M. Jung, K. Lee, H. Kendrick, B. L. Robinson, S. L. Croft, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4940–4944.

[10] G. Magueur, B. Crousse, S. Charneau, P. Grellier, J.-P. Bégué, D. Bonnet-Delpon, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2694–2699.

[11] A. J. Lin, D. L. Klayman, W. K. Milhous, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 2147–2150.

[12] R. K. Haynes, H.-W. Chan, M.-K. Cheung, W.-L. Lam, M.-K. Soo, H.-W. Tsang, A. Voerste, I. D. Williams, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 113–132.

[13] M. Jung, X. Li, D. A. Bustos, H. N. ElSohly, J. D. McChesney, W. K. Milhous, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1516–1518.

[14] A. J. Lin, M. Lee, D. L. Klayman, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1249–1252.

[15] A. Robert, Y. Coppel, B. Meunier, *Chem. Commun.* **2002**, 414–416.

[16] A. Robert, B. Meunier, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1287–1296.



Supporting Information

© Wiley-VCH 2005

69451 Weinheim, Germany

C10-modified Artemisinin Derivatives: Efficient Heme-Alkylating Agents.

Sophie A.-L. Laurent, Anne Robert,* and Bernard Meunier*

Experimental section.

Material and methods. NMR spectra were recorded on Bruker spectrometers working at 250 and 400 MHz in proton. Chemical shifts are given with respect to external TMS. ESI mass spectra were recorded on a API 365 Sciex Perkin Elmer instrument. Chromatography columns were done on silica gel 60 Merck, 70-230 μm granulometry. All chemicals and solvents were purchased from Fluka, Sigma-Aldrich or SDS.

UV-Visible spectroscopy was used to monitor alkylation and demetalation reactions. The substitution at *meso* position of heme is characterized by a bathochromic shift of the Soret band : from $\lambda_{\text{max}} = 404$ and 400 nm (Fe^{III} PPIX and Fe^{III} PPIX-DME, respectively) to 410 and 406 nm for the metalated heme-drug adducts in DMSO, and from $\lambda_{\text{max}} = 406$ and 402 nm (H_2 PPIX and H_2 PPIX-DME) to 424 and 414 nm for the demetalated adducts in acetic acid.

HPLC for adducts 10-Fe and 12-Fe. HPLC analyses were performed with a 10 μm C18 Nucleosil column. The eluents solutions were (A) methanol/water/acetic acid, 6/4/1, v/v/v, and (B) methanol/water/acetic acid, 8/2/1, v/v/v. The elution was a linear gradient from A/B = 100/0 to A/B = 0/100 over 25 min, followed by 20 min at A/B = 0/100. Flow rate was 1 mL/min. A diode array detector (Kontron instrument) allowed detection of the products at 400 nm and 250 nm and monitoring of UV-vis spectra. Retention time were 19.1 min [Fe (PPIX)], 25.6, 26.9 and 28.6 min [**10-Fe**], 25.2 min [Fe (PPIX-DME)], 29.8 and 31.6 min [**12-Fe**].

10-Deoxoartemisinin was synthesized by modification of ref. [13]. A stirred under argon solution of sodium borohydride (20 mg, 530 μmol) in freshly distilled THF (1 mL) was, cooled at 0 °C under argon. A solution of artemisinin (50 mg, 177 μmol) and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (650 μL , 5.1 mmol) in distilled THF (1 mL) was then added. The mixture was stirred at 0 °C for 50 minutes, and then refluxed for 10 minutes. The mixture was poured into an aqueous solution of NaOH 0.4 M. The aqueous phase was extracted with diethylether (4 x 10 mL). The organic phases were gathered, washed with water until pH 7, dried on MgSO_4 , filtered and dried under vacuum. A white, cristalline product was obtained (30 mg, yield = 63%).

TLC : $R_f = 0.38$ (hexane/ethyl acetate, 80/20, v/v).

MS (DCI): m/z (%): 269 (19) $[M+H]^+$, 286 (100) $[M+NH_4]^+$.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.18$ (s, 1H ; H12), 3.72 (dd, $^2J = 11.7$ Hz, $^3J = 3.4$ Hz, 1H ; H10_{eq}), 3.43 (t, $^2J = ^3J = 11.7$ Hz, 1H ; H10_{ax}), 2.63 (m, 1H ; H9), 2.37 (m, 1H ; H4), 2.02 (m, 1H ; H4), 1.87 (m, 1H ; H5a), 1.60–1.74 (m, 2H ; H7 and H8), 1.42–1.58 (m, 2H ; H8a and H5), 1.41 (s, 3H ; H₃C-C3), 1.35 (m, 1H ; H6), 1.29–1.17 (m, 2H ; H8 and H5), 1.07 (m, 1H ; H7), 0.95 (d, $^3J = 6.2$ Hz, 3H ; H₃C-C6), 0.76 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 3H ; H₃C-C9).

Dihydroartemisinin was synthesized according to ref. [11]. Isolated yield = 91%. Characterization was consistent with reported data.

10 α -(Trimethylsilyloxy)dihydroartemisinin was prepared from dihydroartemisinin ($\alpha/\beta \approx 50/50$) according to ref. [12]. Isolated yield = 72%. Characterization was consistent with reported data.

10 β -(Trimethylsilyloxy)dihydroartemisinin was prepared according to ref. [12] modified as follows. Dihydroartemisinin ($\alpha/\beta \approx 50/50$, 30 mg, 106 μ mol) was dissolved in pyridine (5 mL). At 0 °C was added chlorotrimethylsilane (105 μ L, 824 μ mol), and the mixture was stirred for 75 min at 0 °C. The reaction mixture was then poured into water and ice (5 mL), and extracted with diethylether (3 x 15 mL). The organic phases were gathered, washed with an aqueous solution of $CuSO_4$ 10 wt% (3 x 15 mL), dried on $MgSO_4$, filtered, concentrated and dried under vacuum. A colorless oil was obtained, which was purified by column chromatography [SiO_2 , eluents hexane/ethyl acetate, 90/10, v/v]. 30.8 mg of a colorless, crystalline product were obtained (Yield = 81 %).

TLC : $R_f = 0.77$ (hexane/ethyl acetate, 80/20, v/v).

MS (ESI⁺) : m/z (%) : 267.2 (46) $[M-OTMS]^+$, 357.2 (3) $[M+H]^+$, 379.1 (100) $[M+Na]^+$, 395.2 (57) $[M+K]^+$.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$, selected data): $\delta = 5.46$ (s, 1H, H12), 5.16 (d, $^3J_{eq-ax} = 2.4$ Hz, 1H ; H10), 2.54 (m, 1H ; H9), 2.35 (m, 1H ; H4), 2.01 (m, 1H ; H8a), 1.87 (m, 1H ; H4), 1.80–1.60 (m ; H6), 1.42 (s, 3H, H₃C-C3), 0.94 (d, $^3J = 6.2$ Hz, 3H ; H₃C-C6), 0.84 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 3H ; H₃C-C9), 0.15 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$).

10 α -(4-benzyl)piperazinyl-10-deoxoartemisinin (3).

10 α -(Trimethylsilyloxy)dihydroartemisinin (108 mg, 303 μ mol) was dissolved under argon in dichloromethane (8 mL). Bromotrimethylsilane (48 μ L, 364 μ mol) was added at 0 °C and the mixture stirred for 25 min. Then, were successively added at 0 °C 1-benzylpiperazine (525 μ L, 3.03 mmol) and

1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol (160 μ L, 1.5 mmol). The mixture was allowed to stand at 0 °C for 45 min, then poured into water and ice (30 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 15 mL). The organic phases were gathered, dried on MgSO₄, filtered and evaporated. The residue was purified on a column chromatography [SiO₂, eluent hexane/ethyl acetate, 80/20, v/v]. The 10-benzylpiperazinyl derivative **3** was obtained with a 50% yield, along with the elimination product **3** (38% ; this latter one was consistent with the characterization reported in ref. [14]).

MS (ESI⁺) : m/z (%) : 443.4 (100) [M+H]⁺.

UV/Vis (DMSO) : λ_{\max} (ϵ , L mol⁻¹ cm⁻¹) : 270 nm (12.4).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃, selected data) δ = 7.33–7.26 (m, 5H ; phenyl), 5.26 (s, 1H ; H12), 4.02 (d, ³J_{ax-ax} = 10.2 Hz, 1H ; H10), 3.53 (AB, 2H ; –CH₂–Ph), 3.01 (m, 2H ; –CH₂N–C10), 2.71 (m, 2H ; –CH₂N–C10), 2.59 (m, 1H ; H9), 2.47 (m, 4H ; –CH₂NCH₂Ph), 2.34 (m, 1H ; H4), 1.38 (s, 3H ; H₃C–C3), 0.94 (d, ³J = 6.1 Hz, 3H ; H₃C–C6), 0.79 (d, ³J = 7.2 Hz, 3H ; H₃C–C9).

Starting from 10 β -(trimethylsilyloxy)dihydroartemisinin, the same compound **3**, having α -configuration of the benzylpiperazinyl substituent, was obtained (isolated yield = 38%, along with 47% of compound **5**).

Alkylation of heme by 10-deoxoartemisinin (2). Iron(III) protoporphyrin-IX (31.6 mg, 48.5 μ mol) and 10-deoxoartemisinin (13 mg, 48.5 μ mol) were dissolved in DMSO (8 mL) at room temperature. A solution of sodium hydrosulfite 85 wt% (8.4 mg, 48.5 μ mol) in water (200 μ L) was added. The mixture was stirred at room temperature for 80 minutes. Adducts were precipitated by addition of water, filtered, then redissolved in acetone and dried under vacuum. Recovered porphyrinic material = 27.5 mg, ratio 6-Fe/Fe(PPIX) = 89/11, calculated from mass spectra.

UV/Vis (DMSO) : λ_{\max} : 410 nm.

MS (ESI⁺) : m/z (%) : 616.3 (21) [M]⁺ for Fe^{III}(PPIX), 824.5 (100) [M-CH₃COOH]⁺, 884.3 (50) [M]⁺ for 6-Fe, 906.5 (18) [M-H+Na]⁺, 922.3 (6) [M-H+K]⁺ for 6-Fe.

Demetalation of the covalent adducts 6-Fe. To a solution of 6-Fe adducts (containing 11% Fe(PPIX), 27.5 mg) in glacial acetic acid (25 mL) was added a suspension of FeSO₄ (118 mg, 778 μ mol) in hydrochloric acid 12 M (0.8 mL) under argon. The mixture was stirred at room temperature for 30 minutes, diluted with water (60 mL), extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The organic phases were gathered, washed with water, dried on Na₂SO₄ and concentrated. Covalent adducts were precipitated by addition of hexane and dried under vacuum. Ratio 6/H₂PPIX = 81/19, calculated from mass spectra.

UV/Vis (acetic acid) : λ_{\max} (rel. intens.): 424 nm (100), 568 (9).

MS (ESI⁺) : m/z (%): 563.3 (32) [M+H]⁺ for H₂PPIX, 789.5 (100) [M+H]⁺ for adduct 7, 831.3 (30) [M+H]⁺ for adduct 6.

Alkylation of heme dimethylester by 10-deoxoartemisinin (2). Iron(III) protoporphyrin-IX dimethylester (76 mg, 112 μ mol) and deoxoartemisinin (30 mg, 112 μ mol) were dissolved in DMSO (18.5 mL) at room temperature. A solution of sodium hydrosulfite 85 wt% (19.4 mg, 112 μ mol) in water (460 μ L) was added. The mixture was stirred at room temperature for 70 minutes. Adducts were precipitated by addition of water, filtered, then redissolved in acetone and dried under vacuum (111 mg).

UV/Vis (DMSO) : λ_{\max} (ϵ , rel. intens.) : 406 nm (100), 510 (12).

This crude alkylation product (111 mg) was dissolved in glacial acetic acid (90 mL). A suspension of FeSO₄ (426 mg, 2.8 mmol) in hydrochloric acid 12 M (2.9 mL) was added under argon. The mixture was stirred at room temperature for 30 minutes, diluted with water (100 mL), extracted with ethyl acetate (4 x 70 mL). The organic phases were gathered, washed with water, dried on Na₂SO₄ and concentrated. The porphyrinic material was precipitated by addition of hexane.

MS (ESI⁺) : m/z (%): 591.3 (60) [M+H]⁺ for H₂PPIX-DME, 817.7 (100) [M+H]⁺ for adduct 7, 859.5 (34) [M+H]⁺ for adduct 8.

Pure covalent adduct 9 was recovered by column chromatography (SiO₂, eluent CH₂Cl₂/MeOH, 98/2, v/v).

TLC : R_f = 0.44 (CH₂Cl₂/MeOH, 98/2, v/v).

UV/Vis (acetic acid) : λ_{\max} (rel. intens.): 414 nm (100), 556 (6), 634 (4).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) for 7: δ = 10.63, 10.45, 10.19, 10.10, 10.05, 10.03, 9.98, 9.84, 9.76 (9 x s, 3H; *meso*-H), 8.10–8.29 (m, 2H; vinyl-H_c), 5.89–6.39 (m, 4H; vinyl-H_a and H_b), 5.05–5.42 (m, 2H; H₂C₄), 4.63 (m, 1H; H12), 4.34 (m, 4H; β pyrrolic-CH₂), 3.46–3.82 (m; β -pyrrolic-CH₃ and –COOCH₃) overlapped with 3.68 ppm (1H; H10), 3.27 (m, 4H; –CH₂COOCH₃ and 1H; H10), –3.0 to –3.5 (2H; NH).

¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) : δ = 130–131 (=CH_c), 119–125 (=CH_aH_b), 95–100 (*meso*-C), 93–95 (C12), 61 (C10), 53 (–COOCH₃), 36 (–CH₂COOCH₃), 21 (β -pyrrolic-CH₂), 12 (β -pyrrolic-CH₃).

Alkylation of heme by 3. Iron(III) protoporphyrin-IX (19.7 mg, 30.3 μ mol) and compound 3 (13.4 mg, 30.3 μ mol) were dissolved in DMSO (5 mL) at room temperature. A solution of sodium hydrosulfite 85

wt% (5.3 mg, 30.3 μ mol) in water (200 μ L) was added. The mixture was stirred at room temperature for 1 hour. Porphyrinic material was precipitated by addition of water, filtered, then redissolved in acetone and dried under vacuum. Recovered : 26.2 mg. Yield of alkylation = 93 % (HPLC).

UV/Vis (DMSO) : λ_{max} = 410 nm.

MS (ESI⁺) : m/z (%) : 616.5 (92) [M+H⁺] for Fe^{III}PPIX, 999.7 (44) [M+H-CH₃COOH]⁺ for **10**-Fe, 998.8 (61) [M-CH₃COOH]⁺ for **10**-Fe, 872.5 (27), 858.7 (78), and 840.5 (100) for **11**-Fe, 499.9 (50) for **10**-Fe. The structures are depicted in Figure 1S.

Demetalation of the covalent adducts 10-Fe + 11-Fe. To a solution of adducts (26.2 mg) in glacial acetic acid (20 mL) was added a suspension of FeSO₄ (94 mg, 619 μ mol) in hydrochloric acid 12 M (0.6 mL) under argon. The mixture was stirred at room temperature for 30 minutes, diluted with water (40 mL), extracted with ethyl acetate (4 x 35 mL). The organic phases were gathered, washed with water, dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated. Covalent adducts were precipitated by addition of hexane, filtered, and dried under vacuum (recovered = 17 mg).

UV/Vis (acetic acid) : λ_{max} (rel. intens.): 424 nm (100), 538 (4), 568 (8).

MS (ESI⁺) : m/z (%) : 563.6 (7) [M+H]⁺ for H₂PPIX, 787.7 (100) [M+H]⁺ for **11**, 805.8 (17) [M+H]⁺ for aldehyde hydrate of **11**, 829.7 (57) [M+H]⁺ for **10**-benzylpiperazine. The structure of m/z = 829.7 is depicted in Figure 1S.

Alkylation of heme dimethylester by 3. Iron(III) protoporphyrin-IX dimethylester (24.6 mg, 36 μ mol) and compound **3** (16 mg, 36 μ mol) were dissolved in DMSO (5 mL) at room temperature. A solution of sodium hydrosulfite 85 wt% (6.3 mg, 36 μ mol) in water (150 μ L) was added. The mixture was stirred at 37 °C for 2 hours. Adducts were precipitated by addition of water, filtered, redissolved in acetone and dried under vacuum. Yield of alkylation adducts **12**-Fe + **13**-Fe = 77 % (HPLC).

UV/Vis (DMSO) : λ_{max} (rel. intens.): 406 (100), 552 (12), 590 (10).

MS (ESI⁺) : m/z (%) : 644.2 (38) [M+H]⁺ for H₂PPIX-DME, 868.5 (100) [M⁺] for **13**-Fe, 1124.9 (5) [M-H+K]⁺, and 1026.5 (45) [M-CH₃COOH]⁺ for **12**-Fe.

Demetalation of the covalent adduct 12-Fe and 13-Fe. To a solution containing 77% of adducts **12**-Fe + **13**-Fe and 23% of Fe-PPIX (29 mg) in glacial acetic acid (20 mL) was added a suspension of FeSO₄ (102 mg, 672 μ mol) in hydrochloric acid 12 M (0.6 mL) under argon. The mixture was stirred at room temperature for 90 minutes, diluted with water (40 mL), extracted with ethyl acetate (5x40 mL). The organic phases were gathered, washed with water, dried on Na₂SO₄, filtered and evaporated.

MS(ESI⁺) : *m/z* (%) : 591.6 (30) [M+H]⁺ for H₂PPIX-DME, 857.8 (34) [M+H]⁺ for **14**, 815.6 (100) [M+H]⁺ for **13**, 932.0 (32).

Pure adduct **13** was obtained by column chromatography (SiO₂, eluent dichloromethane/methanol, 99.2/0.8, v/v).

UV/Vis (acetic acid) : λ_{\max} (rel. intens.): 424 (100), 504 (5), 568 (8), 604 (4).

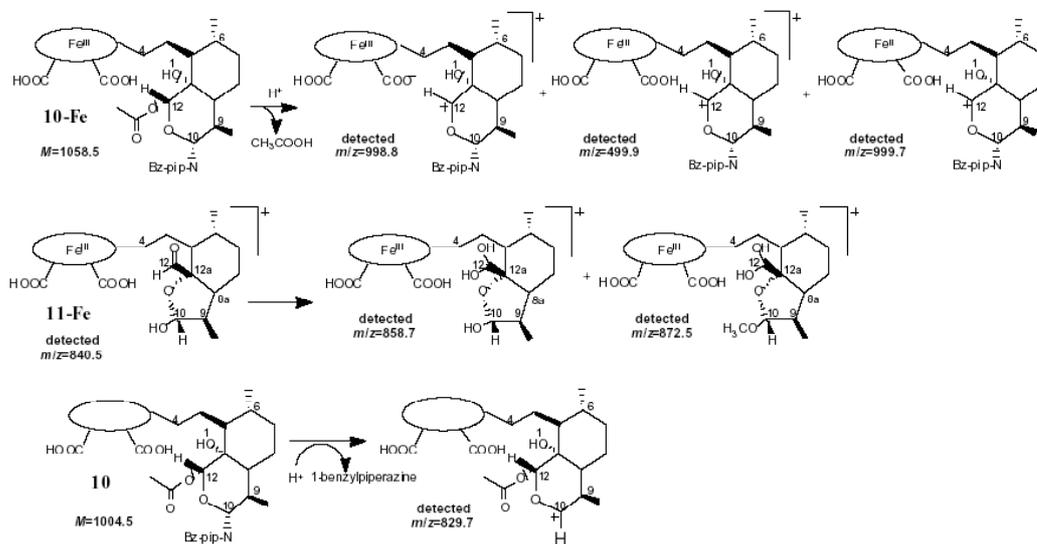
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, selected data for **13**: δ = 10.24, 10.19, 10.14, 10.10, 10.08, 10.05, 10.02, 9.96, 9.91, 9.82 (10 x s, 4H ; *meso*-H and H12), 8.33-8.04 (m, 2H ; vinyl-H_c), 6.41-5.90 (m, 4H ; vinyl-H_a and H_b), 5.54-5.10 (m, 3H ; H₂C4 and H10), 4.37 (m, 4H ; β -pyrrolic-CH₂), 3.44-3.84 (m, 18H ; β -pyrrolic-CH₃, -COOCH₃), 3.27 (m, 4H ; -CH₂COOCH₃), -2.70 to -2.95 (2H ; NH).

¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃, selected data) : δ° 209 (C12), 130-131 (=CH_c), 120-127 (=CH_aH_b), 107 (C10), 95-99 (*meso*-C), 52 (-COOCH₃), 37 (-CH₂COOCH₃), 31-33 (C4), 22 (β -pyrrolic-CH₂), 12 (β -pyrrolic-CH₃).

Legend

Figure 1S. Detected peaks from mass spectrometry of adducts, **10**-Fe, **11**-Fe, and **10**.

Figure 1S



3^{ème} PARTIE

SYNTHÈSE DES TRIOXAQUANTELS
SYNTHÈSE STÉRÉOSÉLECTIVE DES
TRIOXAQUANTELS

CHAPITRE I : SYNTHÈSE DES TRIOXAQUANTELS

INTRODUCTION

Notre travail a consisté à préparer des molécules duales, hybrides du praziquantel et de trioxanes, à visée antischistosomiase. Ces molécules comportent un endoperoxyde, plus simple que l'artémisinine : il ne s'agit de synthétiser que le motif actif, c'est-à-dire le 1,2,4-trioxane, responsable des propriétés alkylantes. Ce motif est lié au noyau pyrazino-isoquinoléine, connu pour ses propriétés contre les schistosomes.

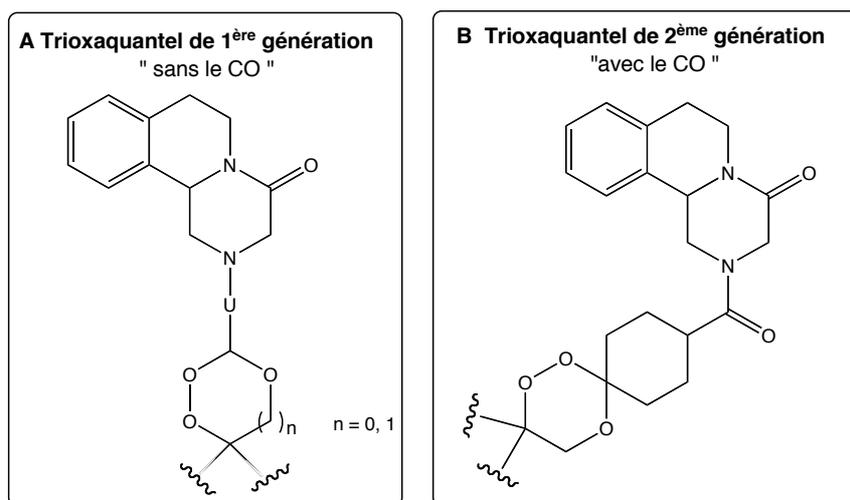
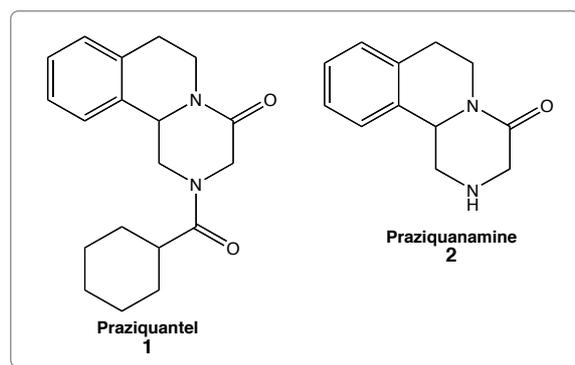


Figure 1 : Formules générales des trioxaquantels de 1^{ère} et 2^{ème} génération.

Les trioxaquantels de 1^{ère} génération ont la structure représentée à la figure 1A. Le résidu U est un espaceur permettant de lier la partie pyrazino-isoquinoléine au trioxane. Or, comme nous l'avons vu au chapitre 2 de la partie 1, la fonction acyle en position 2 est nécessaire pour l'activité du praziquantel. De plus, les dérivés du praziquantel les plus actifs sont ceux dans lesquels l'azote 2 du noyau pyrazine est substitué par un résidu cyclohexylcarbonyle éventuellement modifié en position 4. Les trioxaquantels de 2^{ème} génération ont donc la formule 1B, dans laquelle le substituant en position 4 du cyclohexyle est le trioxane lui-même.

Après avoir décrit les différentes voies d'accès au motif pyrazino-isoquinoléine, ce chapitre présente la mise au point des deux séries de trioxaquantels.

I – SYNTHÈSE DU SYNTHON PRAZIQUANAMINE 2



Afin de synthétiser la 1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4*H*-pyrazino[2,1-*a*]isoquinoléin-4-one ou praziquanamine **2**, une étude des différentes voies de synthèse du praziquantel **1** a été réalisée. Une présentation de ces dernières est faite dans les lignes qui suivent.

I.1 – Méthode de Rupe

La synthèse la plus ancienne date de 1939 et est basée sur la cyclisation du composé **4** en présence de bases fortes (figure 2) [1].

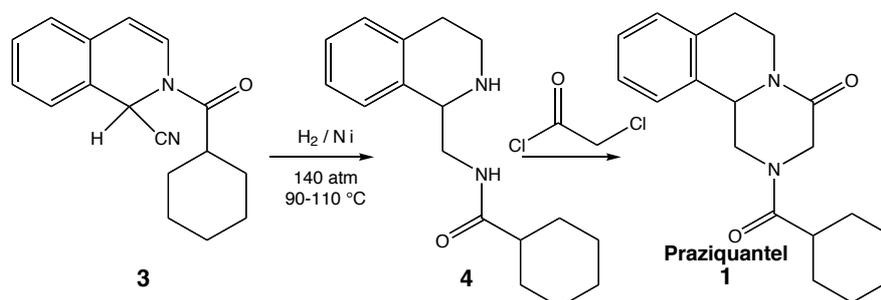


Figure 2 : Synthèse du praziquantel **1** selon la méthode de Rupe [1].

L'hydrogénation catalytique du composé **3** permet l'obtention du composé **4**, qui est acylé avec le chlorure de chloroacétyle, puis cyclisé par une base forte pour conduire au praziquantel **1**, composé cristallin incolore. Le 1^{er} brevet du praziquantel [2] utilise la synthèse des isoquinoléines développées par Rupe.

I.2 – Méthode de Maffrand et analogues

En 1983, Maffrand *et al.* décrivent deux nouvelles voies d'accès au praziquantel : soit au départ d'imino-diacétonitrile, en six étapes, avec un rendement global de 35%, soit au départ de 4-acétylpipérazine-2,6-dione, en cinq étapes, avec un rendement global de 27% (figure 3) [3].

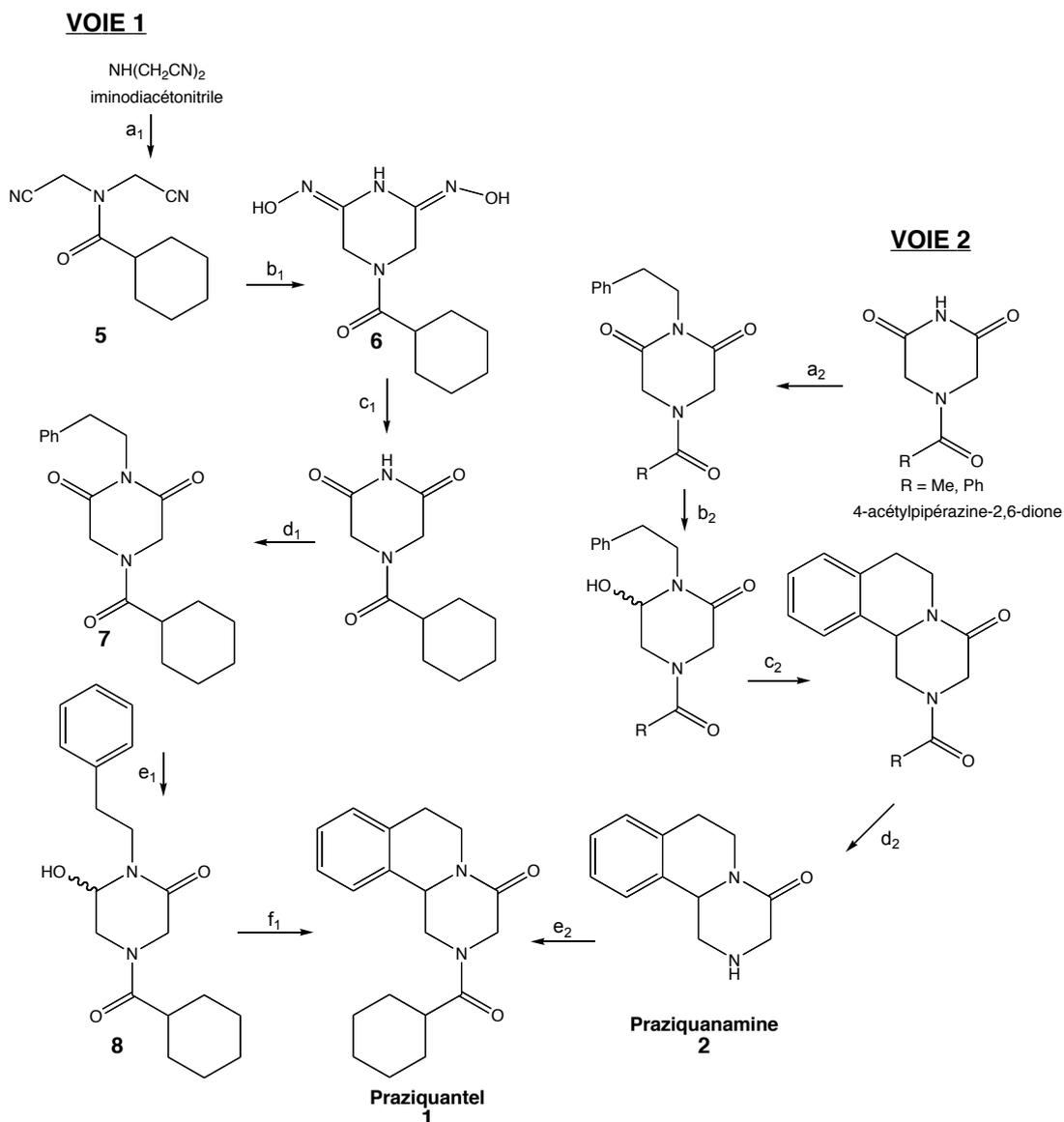


Figure 3 : Synthèse du praziquantel 1 selon la méthode de Maffrand *et al.* [3] : a₁) C₆H₁₁COCl, K₂CO₃, TA, 2h, 85% ; b₁) NH₂OH, H₂O, MeOH, reflux, 2,5h, 84% ; c₁) NaNO₂, H₂O, AcOH, 0°C, 24h, 83% ; d₁) CH₃ONa, DMF, TA, 1h puis C₆H₅(CH₂)₂I, 80°C, 5h, 86% ; e₁) CuCl₂, NaBH₄, EtOH, 0°C, 1h45, 73% ; f₁) HCl 12N, 0°C, nuit, 95% ; a₂) CH₃ONa, DMF, TA, 1h puis C₆H₅(CH₂)₂I, 120°C, 5h, 65% ; b₂) CuCl₂, NaBH₄, EtOH, 0°C, 1h45, 69% ; c₂) HCl 12N, 0°C, nuit, 94% ; d₂) HCl 1N, reflux, 3h, 70% ; e₂) C₆H₁₁COCl, TEA, diméthoxyéthane, TA, 15h, 90%.

Dans la première synthèse, l'iminodiacétonitrile est acylé avec le chlorure de cyclohexanecarbonyle pour donner le composé **5** avec un rendement de 85%. La condensation du composé **5** avec l'hydroxylamine conduit au dérivé 4-(cyclohexylcarbonyl)-2,6-dihydroxyiminopipérazine **6** avec un rendement de 84%. La diazotation de **6** suivie de l'alkylation avec l'iodure de phényléthylamine donne le composé **7** qui est réduit de manière sélective selon la méthode de Atta-ur-Rahman pour donner la 4-(cyclohexylcarbonyl)-6-

hydroxy-1-phenéthylpipérazin-2-one **8**. Cette dernière est cyclisée dans l'acide chlorhydrique 12M à 0°C pour conduire au praziquantel **1** avec un rendement global de 35%.

Dans la seconde voie, la préparation du composé tricyclique se fait à partir de la 4-acétylpipérazine-2,6-dione ou de la 4-benzoylpipérazine-2,6-dione. Cette voie de synthèse permet d'obtenir la praziquanamine **2** et le praziquantel **1** avec des rendements globaux de 30% et de 27% respectivement.

Yuste *et al.*, dans une méthode similaire à celle de Mafrand *et al.*, utilisent l'acide *N*-benzyliminodiacétique comme réactif de départ (figure 4) [4].

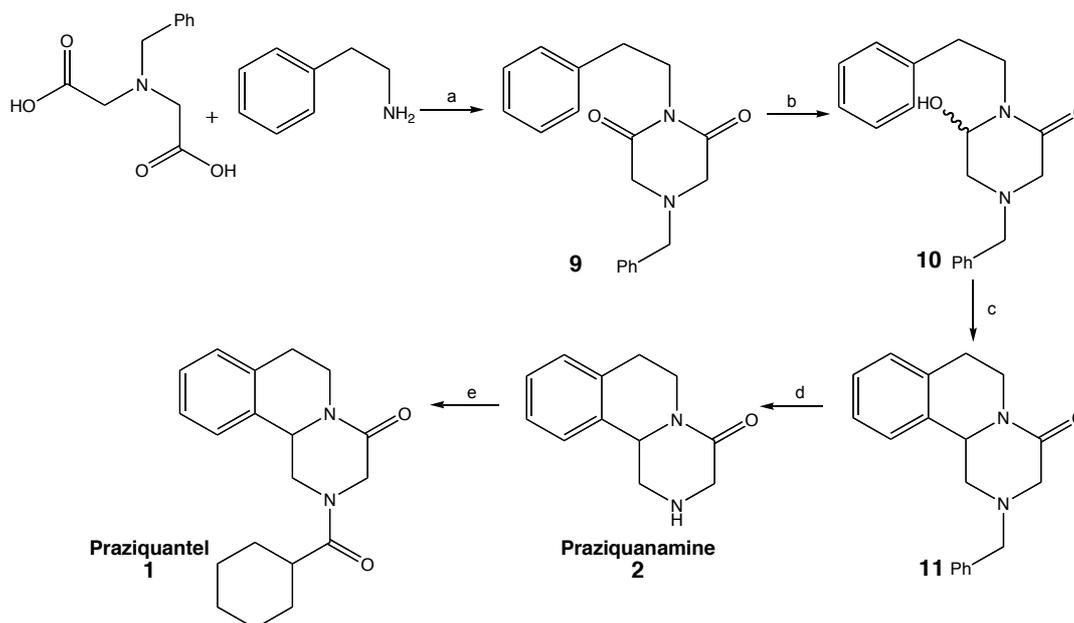


Figure 4 : Synthèse du praziquantel selon la méthode de Yuste *et al.* [4] : a) 200°C, 1h, 65% ; b) CuCl₂, EtOH, NaBH₄, 0°C, 1h45, 86% ; c) HCl 37%, 60°C, 5h, 44% ; d) HCl aq 2N, MeOH, Pd/C, H₂, 4,5 atm, 60 °C, 4h, 94% ; e) C₆H₁₁CO₂H, TEA, MeO(CH₂)₂OMe, TA, 20h, 70%.

La 4-benzyl-1-phenéthyl-2,6-pipérazinedione **9** est obtenue par chauffage de l'acide *N*-benzyliminodiacétique et de la phényléthylamine à 200°C. La réduction partielle de la fonction amide est réalisée dans les conditions de Atta-ur-Rahman. La cyclisation du composé **10** dans l'acide chlorhydrique concentré donne le composé **11** avec un rendement de 44%. L'hydrogénolyse suivie de l'acylation permettent d'obtenir le praziquantel **1** avec un rendement global de 16%.

I.3 – Méthode de Berkowitz

En 1984, Berkowitz *et al.* allient une réaction de rétrocyclisation d'un benzocyclobutane, réalisée par pyrolyse à 400°C, à une réaction d'imino Diels-Alder pour la formation du praziquantel **1** (figure 5) [5].

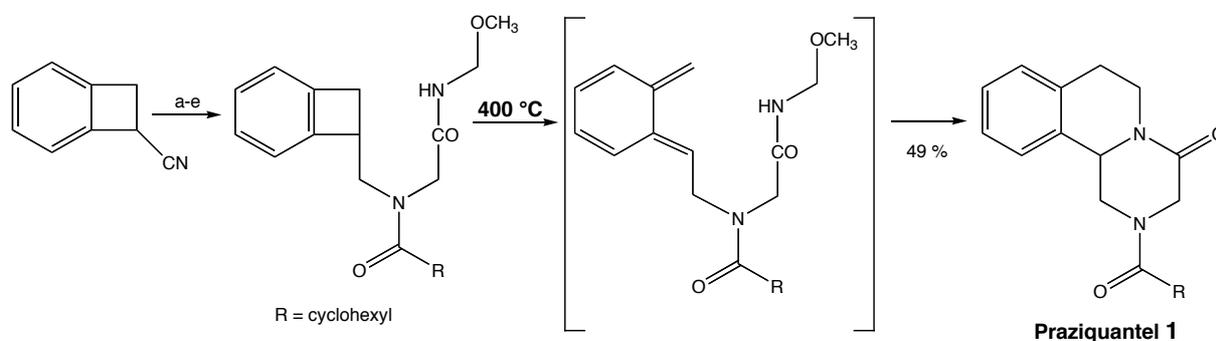


Figure 5 : Synthèse du praziquantel selon la méthode de Berkowitz [5] : a) H_2/Ni de Raney, EtOH, NH_4OH , TA, 7h, 96% ; b) $\text{ClCH}_2\text{CONH}_2$, EtOH absolu, reflux, 6h, 38% ; c) $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{CO}_2\text{H}$, DCC, DMAPDCM, TA, 24 h, 67% ; d) HCHO, AcOH, Ac_2O , 80°C, 16h, 80°C, 93% ; e) K_2CO_3 , MeOH, TA, 16h, 99%.

L'inconvénient majeur de cette voie de synthèse réside dans les conditions dures de réaction : hydrogénation catalytique, pyrolyse etc.

I.4 – Méthode à partir d'ions *N*-acyliminiums

Pour éviter les conditions dures de réaction (étape d'hydrogénation catalytique à haute pression, pyrolyse), Kim *et al.* proposent une stratégie basée sur la cyclisation d'ions *N*-acyliminiums (figure 6) [6].

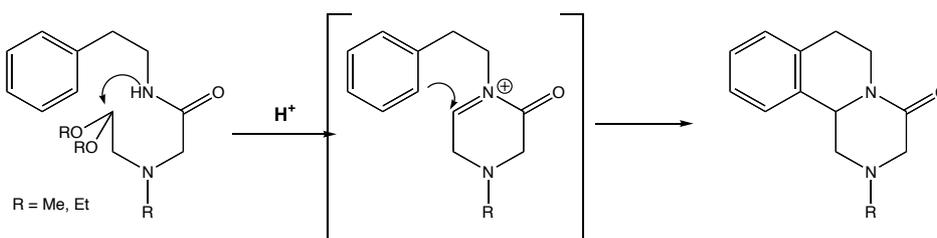


Figure 6 : Stratégie de cyclisation du noyau pyrazino-isoquinoléine via les ions *N*-acyliminiums.

La synthèse au départ de la glycine (figure 7) conduit au praziquantel **1** avec un rendement de 50%.

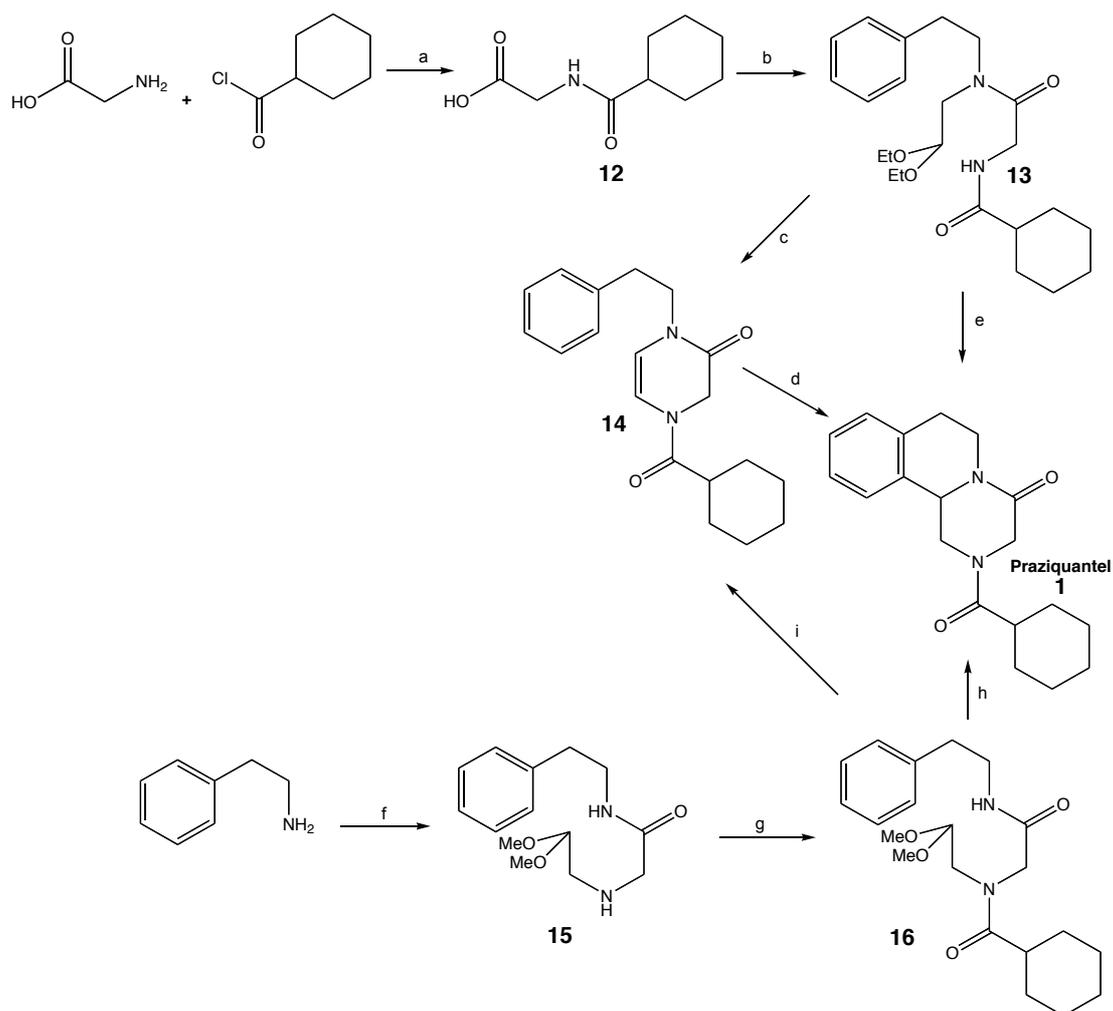


Figure 7 : Synthèse du praziquantel selon la méthode de Kim et al. [6] : a) TEA, THF, TA, 2h, quant. ; b) 1 - éthylchloroformate, DCM, 0°C, 1h, quant. ; 2 - *N*-2-phényléthylaminoacétaldéhyde diéthylacétal, reflux, 7h, 66% ; c) MeSO₃H, DCM, TA, 3h, 91% ; d) H₂SO₄ concentré, TA, 3h, quant. ; e) MeSO₃H, DCM, reflux, 2 jours, 73% ; f) 1 - Chlorure de chloroacétyle, NaHCO₃, CH₂Cl₂, TA, 2h, 92% ; 2 - aminoacétaldéhyde diméthylacétal, toluène, reflux, 2h, quant. ; g) C₆H₁₁COCl, TEA, DCM, TA, 30 min, 93% ; h) MeSO₃H, DCE, reflux, 6h, 85% ; i) MeSO₃H, DCM, TA, 3h, 95%.

La réaction du glycinamide avec le chlorure de cyclohexanecarboxyle donne le composé **12** avec un rendement quantitatif. Le traitement de ce composé avec l'éthylchloroformate dans le dichlorométhane suivi par le *N*-2-phényléthylaminoacétaldéhyde diéthylacétal fournit l'aminoacétal **13** avec un rendement de 66%. Le second aminoacétal **15** est préparé par acylation de la phénylamine avec le chlorure de chloroacétyle suivie d'une réaction avec l'aminoacétaldéhyde diméthylacétal. L'acylation de l'amine avec le chlorure de cyclohexanecarboxyle conduit au composé **16** avec un rendement de 93%. Le traitement des amidoacétals **13** et **16** par l'acide méthanesulfonique dans le dichlorométhane ou le dichloroéthane à reflux permet de cycliser le produit en praziquantel **1**, via les ions *N*-acyliminiums. Par traitement de ces mêmes amidoacétals **13** et **16** par l'acide

méthanesulfonique à température ambiante, seul l'énamide **14** est isolé avec un rendement quasi quantitatif. La réaction de ce dernier dans l'acide sulfurique concentré permet la cyclisation en praziquantel **1**.

La seconde synthèse, proposée par la même équipe, consiste en une amidoalkylation et la cyclisation de l'ion *N*-acyliminium d'un amidoacétal (figure 8) [7].

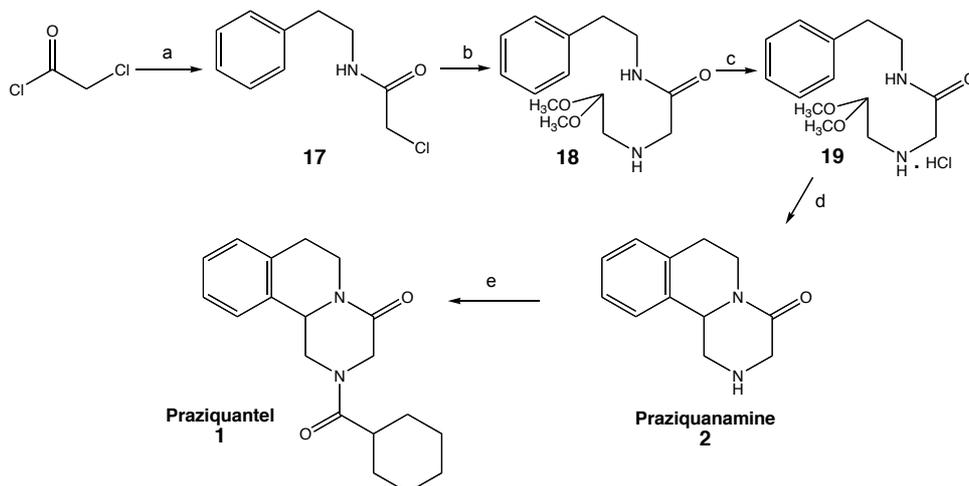


Figure 8 : Synthèse du praziquantel 1 selon la méthode de Kim *et al.* [7] : a) phényléthylamine, NaHCO₃, CH₂Cl₂, TA, 2h, 92% ; b) aminoacétaldéhyde diméthylacétal, toluène, reflux, 2h ; c) HCl gaz, rendement des étapes b et c 67% ; d) H₂SO₄ concentré, TA, 3,5h, 98% ; e) C₆H₁₁CHCl, Na₂CO₃, DCM, TA, 2h, 85%.

La construction des cycles pipérazine et isoquinoléine se fait " one-pot " en présence d'acide, par une amidoalkylation intramoléculaire de l'acétal et de l'amide, suivie par la cyclisation du dérivé *N*-acyliminium, intermédiairement formé, par l'addition nucléophile du noyau aromatique.

La réaction du chlorure de chloroacétyle et de la phényléthylamine en présence d'hydrogencarbonate de sodium dans le dichlorométhane à 0°C pendant 2 heures conduit au *N*-(2-phényl)-éthylchloroacétamide **17** avec un rendement de 92%. La réaction de ce dernier, avec l'aminoacétaldéhyde diméthylacétal dans le toluène à reflux, fournit le *N*-(2-phényl)éthyl-2-[(2,2-diméthoxyéthyl)amino]-acétamide **18**, qui est transformé en chlorhydrate correspondant **19** par action d'acide chlorhydrique gazeux avec un rendement de 67%. La praziquanamine **2** est obtenue par une condensation de Pictet-Spengler du chlorhydrate **19** dernièrement formé dans l'acide sulfurique concentré à température ambiante pendant 3,5 heures avec un rendement de 98%. Le précurseur est donc obtenu en trois étapes avec un rendement global de 60%. L'acylation de la praziquanamine **2** avec le chlorure de cyclohexanecarbonyl donne le praziquantel **1** avec un rendement de 85%. Le rendement global de la synthèse est de 51%.

I.5 – Méthode par cyclisation radicalaire

Très récemment, Todd *et al.* décrivent deux synthèses du praziquantel via une cyclisation radicalaire (figure 9) [8].

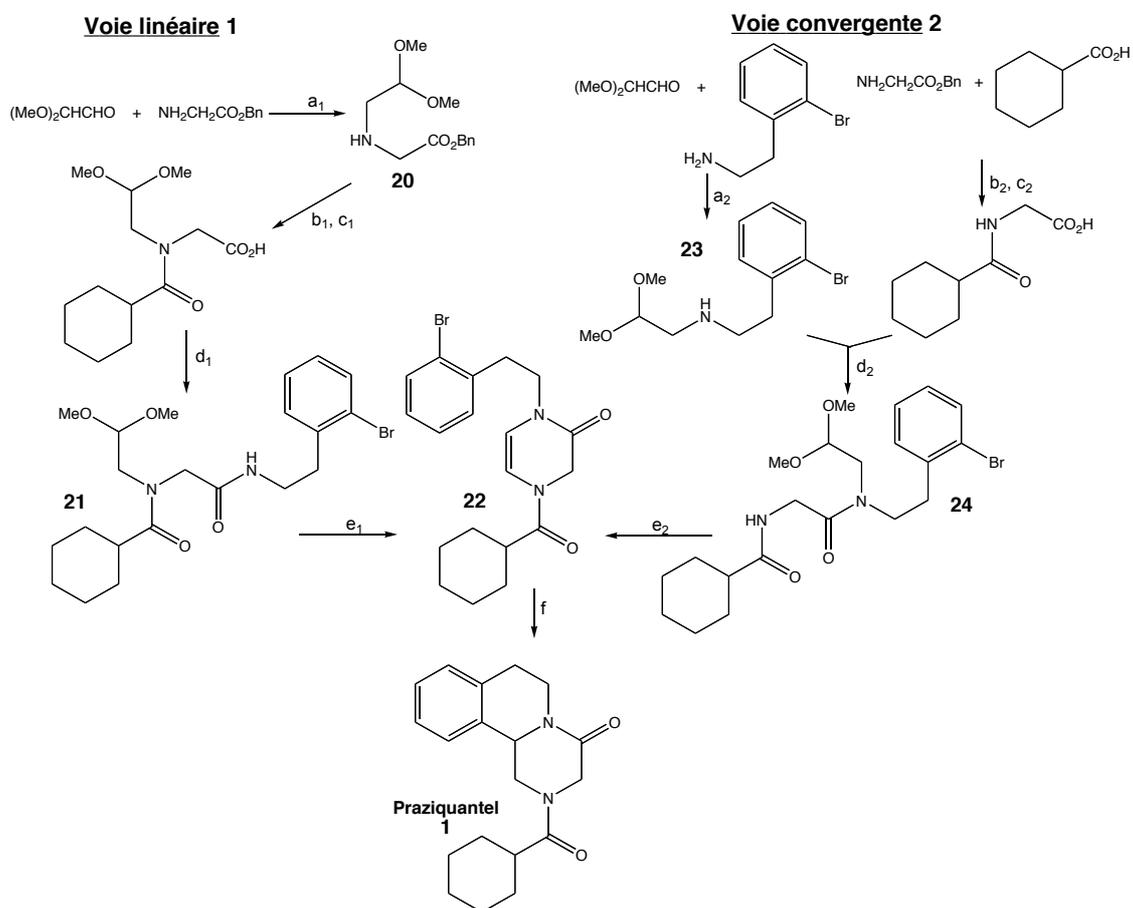


Figure 9 : Synthèse du praziquantel selon la méthode de Todd *et al.* [8] : a₁) NaBH(OAc)₃, DCM, TA, 3h, 38% ; b₁) C₆H₁₁CO₂H, PyBroP, HOAt, DIPEA, DCM TA, 16h, 82% ; c₁) Pd/C, H₂, EtOH, TA, 90 min, 98% ; d₁) 2-(2-bromo-phényl)éthylamine, HOBt, EDC, DMAP, DCM, TA, 16h, 68% ; e₁) 10 mol% Sn(OTf)₂, acétone, 40°C, 48h, 69% ; f) AIBN, Bu₃SnH, toluène, reflux, 16h, 90% ; a₂) NaBH(OAc)₃, DCM, TA, 3h, 40% ; b₂) HOBt, EDC, DMAP, DCM, TA, 16h, 61% ; c₂) Pd/C, H₂, EtOH, TA, 90 min, 98% ; d₂) PyBroP, HOAt, DIPEA, DCM TA, 48h, 88% ; e₂) 10 mol% Sn(OTf)₂, acétone, 40°C, 48h, 77%.

Les deux voies ne diffèrent que par leur degré de convergence et par l'orientation donnée à la " cyclisation de l'acétal ". Cette fonction acétal est introduite par amination réductrice entre le diméthoxyacétaldéhyde et soit le benzylglycinate (voie linéaire) soit l'*ortho*-bromophénylamine (voie convergente). Les amines secondaires **20** et **23** respectivement sont soumises à un couplage amide pour donner les deux précurseurs **21** et **24** de la cyclisation de l'acétal, qui sont des composés isomères. Les deux acétals sont cyclisés par une réaction catalysée par le triflate de zinc pour donner la pyrazinone **22** avec un bon rendement. La dernière étape consiste en la cyclisation radicalaire de cette pyrazinone **22** qui

se fait avec un excellent rendement de 90%. La synthèse du praziquantel dans la voie linéaire se fait avec un rendement global de 13%, alors que dans la voie convergente ce même rendement est de 60%.

1.6 – Méthode choisie

Comptes tenus des différentes synthèses et des conditions de réaction, nous avons choisi la voie d'accès décrite par Kim *et al.* au départ du chlorure de chloroacétyle et de la phénéthylamine (figure 8) pour synthétiser le synthon praziquanamine **2**. Le composé a ainsi été obtenu avec un rendement global de 50% et une structure RX a été obtenue (figure 10).

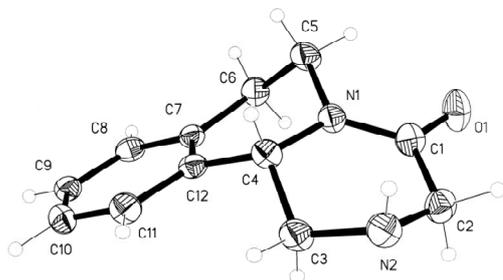


Figure 10 : Structure RX de la praziquanamine 2 déterminée par le Dr. H. Gornitzka.

Il est bon de noter que la purification du *N*-(2-phényl)éthyl-2[(2,2-diméthoxyéthyl)amino]acétamide obtenu sous la forme d'une huile marron a été réalisée par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M dans l'éther de manière à former le chlorhydrate **19** correspondant et non avec HCl gazeux, comme cela était décrit dans la publication.

II – COUPLAGE DE LA PRAZIQUANAMINE 2 ET DES TRIOXANES : FORMATION DES TRIOXAQUANTELS

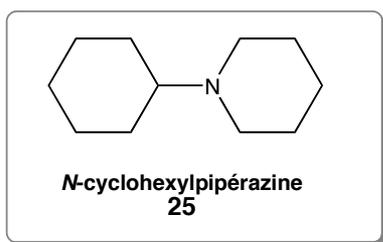
Les 1,2,4-trioxanes comportant un endoperoxyde sont très peu répandus dans la nature ; la caractérisation structurale de l'artémisinine en 1972 (cf. partie 1, chapitre 1) a suscité la recherche de nouvelles voies simples de synthèse de ce motif. Les 1,3,5-trioxanes et 1,2,4-trioxanes sont les plus stables. De nombreux composés naturels comportent un endoperoxyde. Nous pouvons citer par exemple l'ascaridole : endoperoxyde naturel extrait de la plante *Chenopodium ambrosioides* (sur lequel nous reviendrons dans plus tard), l'artémisinine et l'artémisitène extraits d'*Artemisia annua*, la caniojane isolée des racines de *Jatropha grossidentata*.

Pour la synthèse des trioxaquantels, nous avons utilisé des 1,2,4-trioxanes simples, facilement préparés et dont les synthèses sont éprouvées.

II.1 – 1^{ère} génération de trioxaquantels " sans le CO "

La première série de trioxaquantel a été réalisée par couplage de la praziquanamine **2** (amine secondaire) et d'un trioxane comportant une fonction carbonyle, par une réaction d'amination réductrice selon le modèle utilisé pour les trioxaquines [9].

II.1.1 - Mise au point des conditions d'amination réductrice



Afin de mettre au point les conditions de l'amination réductrice, deux réactifs modèles ont été choisis : la pipéridine et la cyclohexanone. L'amination réductrice en présence de cyanoborohydrure (de sodium ou de tétrabutylammonium) et d'acide dans le méthanol conduit à la *N*-cyclohexylpipéridine **25**. En revanche, quand le réducteur est le cyanoborohydrure de sodium en absence d'acide l'amination réductrice n'a pas lieu. De plus, le solvant joue un rôle important : quand la réaction est effectuée dans le DCM le produit de couplage **25** ne se forme pas, même en présence d'aliquat 336 (agent de transfert de phase composé de chlorures de méthyltrialkylammoniums avec des chaînes C8-C10), afin de favoriser la solubilisation du cyanoborohydrure dans le DCM [10].

Quand le triacétoxyborohydrure de sodium est utilisé comme réducteur [11], il est possible de réaliser l'amination réductrice conduisant à la *N*-cyclohexylpipéridine **25** avec ou sans acide acétique. Pour cette raison, nous avons choisi les conditions suivantes : **triacétoxyborohydrure de sodium, sans acide, dans le dichloroéthane, à température ambiante.**

L'attribution du spectre RMN ¹H de la *N*-cyclohexylpipéridine **25** a permis de déterminer la position équatoriale du résidu pipéridine sur le cyclohexane. En effet, les protons axiaux à 2,99 et 1,46 ppm présentent une grande constante de couplage égale à 13,1 Hz (figure 11). Le proton axial résonnant à 2,99 ppm est également couplé aux protons équatoriaux à 2,28 ppm (4,4 Hz). Enfin, la constante géminée entre les protons à 2,28 et 1,46 ppm est de 12,2 Hz.

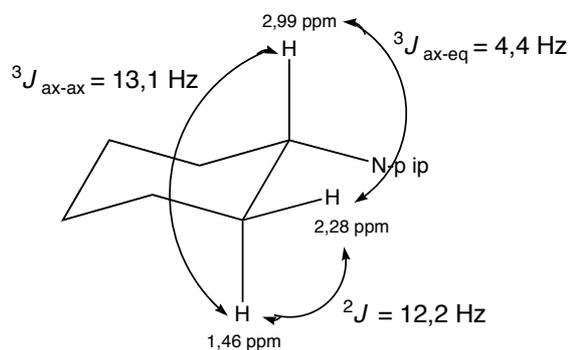


Figure 11 : Position équatoriale de la pipéridine et constantes de couplage. N-pip = résidu pipéridine.

Les conditions d'amination réductrice étant mises au point, nous allons passer au couplage de la praziquanamine **2** avec les différents trioxanes.

II.1.2 - *Cis*-trioxane terpène **26**

Le premier trioxane, auquel nous nous sommes intéressés, est dérivé de l' α -terpinène, produit naturel, présent dans de nombreux végétaux. Ce trioxane avait précédemment été synthétisé au laboratoire pour la synthèse de la trioxaquine DU1302 [9].

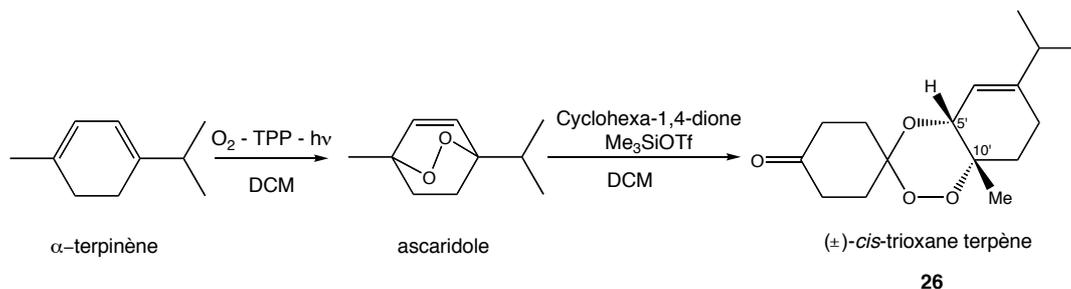
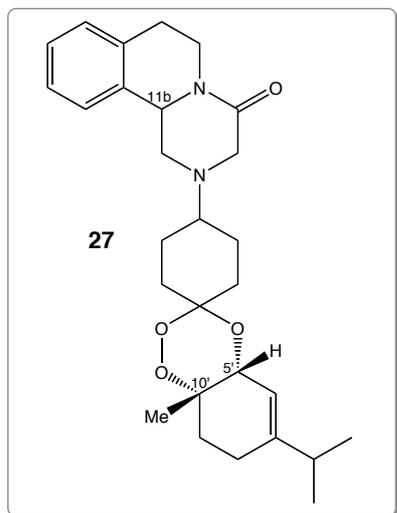


Figure 12 : Synthèse du *cis*-trioxane terpène **26** racémique.

La photooxygénation de l' α -terpinène en présence de tétraphénylporphyrine (TPP) comme photo-sensibilisateur, d'oxygène moléculaire, sous irradiation de lumière blanche (600 W) produit l'ascaridole (figure 12). Ce dernier est transformé en *cis*-trioxane terpène **26** avec un rendement de 34% par réaction avec la cyclohexa-1,4-dione en présence de Me₃SiOTf dans le dichlorométhane. La dénomination de *cis*-trioxane **26** provient du fait que le proton en 5' et le méthyle en 10' sont du même côté de la jonction des cycles trioxane d'une part et cyclohexène d'autre part. Ainsi, les deux énantiomères de ce trioxane ont les configurations (5'*R*, 10'*S*) et (5'*S*, 10'*R*).

La synthèse de ce trioxane fonctionnalisé par une cétone ayant été mise au point au laboratoire, nous avons tout naturellement synthétisé le premier trioxaquantel à partir de ce trioxane.



L'amination réductrice dans les conditions établies précédemment (triacétoxyborohydrure de sodium, DCE, 72 heures) nous a permis d'isoler le trioxaquantel **27** avec un rendement de 47% après purification.

Les éléments de chiralité de cette molécule sont :

- i) la configuration du carbone 11b du fragment praziquanamine,
- ii) la configuration (5'*R*, 10'*S*) ou (5'*S*, 10'*S*) du fragment trioxane.

La réaction d'amination réductrice permet la formation de composés dont le peroxyde et l'amine sont soit du même côté du plan moyen du cyclohexyle, nous obtenons alors le " *cis*-trioxaquantel ", soit de part et d'autre du plan moyen du cyclohexyle, nous obtenons le " *trans*-trioxaquantel ". Ainsi, le trioxaquantel **27** est obtenu sous la forme d'un mélange de quatre diastéréoisomères racémiques représentés à la figure 13.

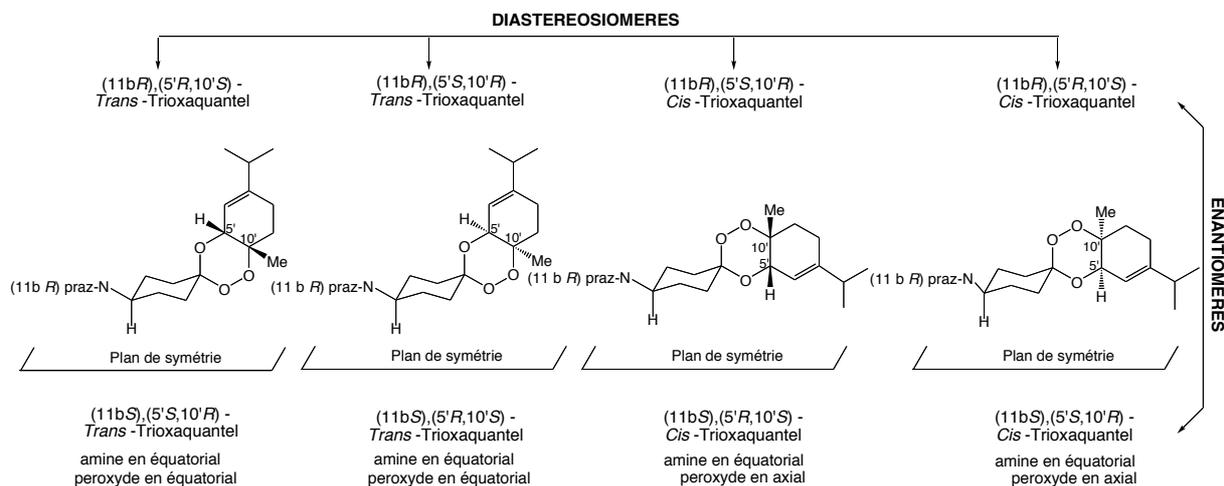


Figure 13 : Structure des 4 diastéréoisomères et de leur énantiomère. (N-praz = résidu praziquanamine)

De plus, chaque *cis*-trioxaquantel peut exister sous deux formes conformères, l'amine et le peroxyde étant respectivement en positions axiale-équatoriale ou équatoriale-axiale sur le cyclohexyle. De même, pour le *trans*-trioxaquantel, les conformères comportant l'amine et le peroxyde en positions axiale-axiale ou équatoriale-équatoriale peuvent exister.

L'analyse par RMN ¹H du composé **27** montre que tous ces stéréoisomères sont présents en proportions variables (4 diastéréoisomères x 2 conformères). Les tentatives de séparation des différents diastéréoisomères ont échoué ; nous avons cherché par la suite à diminuer le nombre d'éléments de chiralité des molécules.

11.1.3 - 3,3-diméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecan-9-one ou diméthyltrioxane **29**

Le second trioxane auquel nous nous sommes intéressés est obtenu par une réaction de silylperoxydation de la cyclohexa-1,4-dione. Le trioxane possède un plan de symétrie et n'est donc pas chiral. Ce diméthyltrioxane a été synthétisé par Frédéric Cosledan de la société Palumed, dans le cadre du développement de nouvelles trioxaquinés®.

Synthèse du silylperoxyde 28

Les méthodes classiques de la littérature pour la synthèse de trioxanes de type 3,3,6,6-tétraalkyl-1,2,4-trioxane nécessitent des conditions de réaction drastiques et parfois dangereuses [12] :

- réaction de perhydrolyse (98% H₂O₂) d'époxydes en catalyse acide, suivie de la cyclisation de l'intermédiaire peroxyalcool formé avec un dérivé carbonylé,
- expansion de cycle par ozonolyse,
- cyclisation d'hydroxy-hydroperoxydes vicinaux catalysée par le cuivre(II),
- cyclisation d'hydroperoxyacétals avec des oléfines ou des époxydes via une catalyse acide,
- réaction de 1,2-dioxétanes avec des aldéhydes ou des cétones.

La méthode que nous avons utilisée (figure 14) utilise la réaction hautement régiosélective de Markovnikov (d'un allylalcool) dans les conditions de Mukaiyama et Isayama pour la formation du silylperoxyde [13, 14], suivie de la cyclisation de ce même peroxyde avec la cyclohexa-1,4-dione.

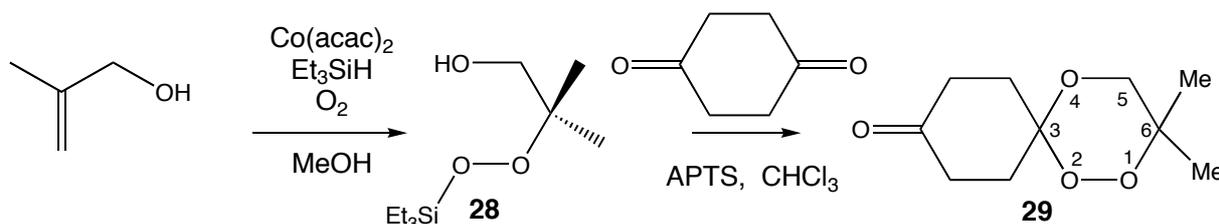


Figure 14 : Synthèse du diméthyltrioxane 29 via le silylperoxyde 28.

La réaction du 2-méthylpropèn-1-ol en présence d'oxygène moléculaire, de triéthylsilane et du catalyseur acétylacétonate de cobalt(II) donne le silylperoxyde 28 avec un rendement de 36%. Cette réaction est sensible au catalyseur utilisé [15], mais aussi au solvant. Oh *et al.* montrent que dans le DCE la réaction est 6 à 8 fois plus lente que dans un alcool [12]. La vitesse d'agitation joue également un rôle important : plus l'agitation est vigoureuse, plus la quantité d'oxygène dissoute dans le solvant est importante, et meilleur est le rendement.

La triéthylsilylperoxydation du 2-méthylpropèn-1-ol correspond à une addition formelle de " Et₃SiOOH ". Le mécanisme radicalaire, proposé par Tokuyasu *et al.*, est décrit à la figure 15 ci-après [16].

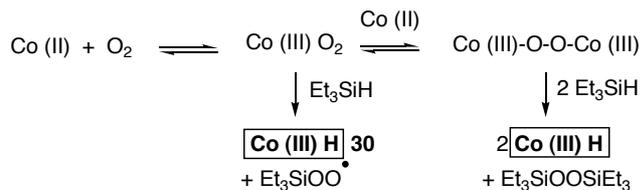
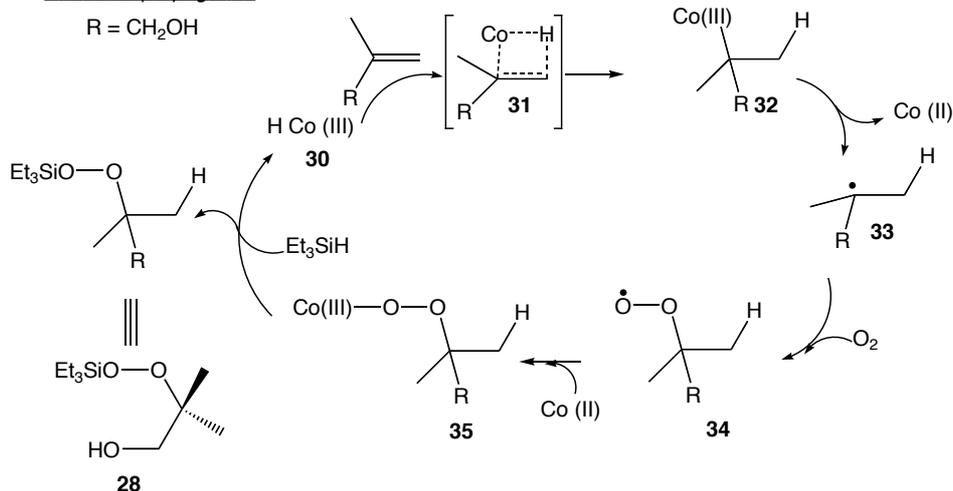
Phase d'initiationPhase de propagation

Figure 15 : Mécanisme réactionnel de la silylperoxydation proposé par Tokuyasu *et al.* [16].

Dans la phase d'initiation, le catalyseur de cobalt(II) réagit avec l'oxygène moléculaire pour former un complexe de cobalt(III). Le changement de couleur du milieu réactionnel, du rose au vert soutenu, est révélateur de l'oxydation du cobalt. Le triéthylsilane transforme ce complexe en un hydrure de cobalt(III) **30** qui est l'espèce réactive.

Dans la première étape du cycle catalytique, l'insertion de la double liaison dans la liaison H-Co du complexe hydrure **30** (addition de type Markovnikov : état de transition **31**) donne le complexe alkyl-Co(III) **32**. La coupure homolytique de la liaison métal-carbone du complexe **32** génère le radical alkyle **33** qui réagit avec l'oxygène moléculaire pour donner le radical superoxyde **34**. Ce dernier se complexe au cobalt pour former un complexe alkylperoxo-Co(III) **35**. Dans une dernière étape, la transmétallation du complexe **35** avec le triéthylsilane entraîne la formation du triéthylsilylperoxyde **28** et la régénération du complexe H-Co(III) **30**.

Synthèse du trioxane 29

Une fois le silylperoxyde **28** formé, la réaction de cyclisation avec la cyclohexa-1,4-dione est faite dans le chloroforme en présence d'acide *para*-toluènesulfonique comme

catalyseur [13]. Le diméthyltrioxane **29** est obtenu avec un rendement de 57% après purification par chromatographie.

L'amination réductrice dans les conditions précédentes (triacétoxyborohydrure de sodium, dans le dichloroéthane, à température ambiante) a permis de synthétiser le trioxaquantel **36** avec un rendement de 59% après purification.

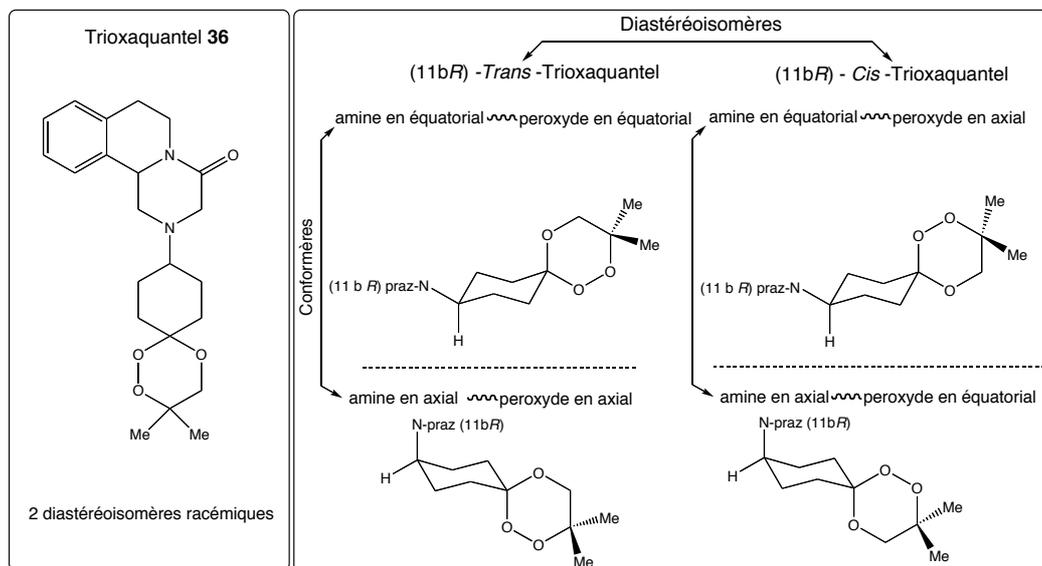


Figure 16 : Structure et stéréochimie du trioxaquantel **36**. (N-praz = résidu praziquanamine)

Le trioxaquantel **36** se présente comme un mélange de deux diastéréoisomères racémiques (figure 16). En effet, la partie pyrazino-isoquinoléine possède un centre stéréogène en position 11b et la position relative des substituants, amine d'une part et peroxyde d'autre part, sur le cyclohexane. Dans notre intention de diminuer le nombre de diastéréoisomères du trioxaquantel, nous avons donc divisé ce nombre par 2 en passant du *cis*-terpène-trioxantel **27** au trioxaquantel **36**.

II.1.4 - Trioxolane de Vennerstrom

Dans un brevet de 2004, Vennerstrom *et al.* synthétisent toute une série de trioxolanes à activité antipaludique [17]. Pour certaines de leurs molécules, les auteurs revendiquent des propriétés antischistosomiales à la dose de 200 à 400 mg/kg (dose unique). Nous avons donc synthétisé un trioxaquantel comportant le motif trioxolane (figure 17).

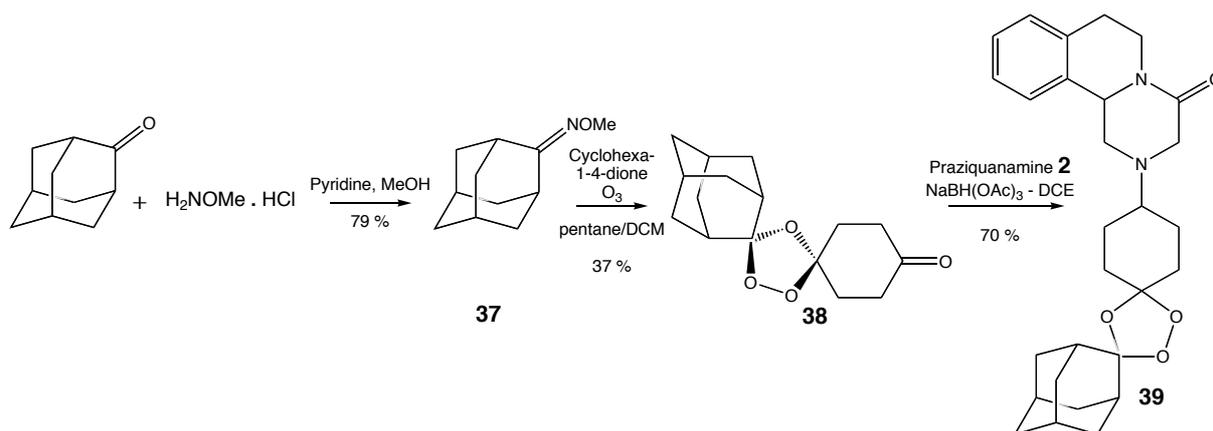


Figure 17 : Synthèse du trioxaquantel 39.

La *O*-méthyl-2-adamantane oxime **37** est préparée par oximation de la 2-adamantanone commerciale en présence de chlorhydrate de *O*-méthylhydroxylamine et de pyridine dans le méthanol. L'ozonolyse de la *O*-méthyloxime **37**, dans un mélange pentane/DCM 1,5/1 v/v à 0°C, donne le trioxolane **38** avec un rendement de 39% après purification par chromatographie et recristallisation. La quantité de DCM, utilisé comme co-solvant de la réaction d'ozonolyse, doit être minimale : les solvants les moins polaires favorisent la formation de l'ozonide [18]. Le couplage entre le trioxolane **38** et la praziquanamine **2**, dans les conditions d'amination réductrice énoncées plus haut donne le trioxaquantel **39** avec un rendement de 70%. Le produit est un mélange de deux diastéréoisomères racémiques.

II.1.5 - Conclusion

Cette première série de trioxaquantels (dite sans C=O) se fait par une synthèse convergente. Après la synthèse des deux synthons (trioxane et praziquanamine), la dernière étape est une réaction d'amination réductrice, réalisée avec de bons rendements (47, 59 et 70% pour les trioxaquantels **27**, **36** et **39** respectivement).

À partir de cette série, deux modifications importantes sont envisagées :

- i) l'introduction d'une fonction acyle en position 2 : l'activité du praziquantel **1** nécessite la présence de cette fonction,
- ii) la réduction du nombre de diastéréoisomères : l'activité pharmacologique de chaque stéréoisomère d'une molécule chirale doit être testée.

Nous avons donc laissé de côté le trioxaquantel **27** qui compte quatre diastéréoisomères. De plus, le trioxolane étant breveté par Vennerstrom, nous nous sommes

concentrés sur le trioxaquantel **36** dérivant du diméthyltrioxane **29** développé par Palumed (demande de brevet français, juin 2006).

II.2 – Diméthyltrioxaquantels acylés en position 2

II.2.1 – Tentatives d'amination réductrice sur une fonction urée

Le schéma de synthèse, qui a été essayé, est décrit à la figure 18.

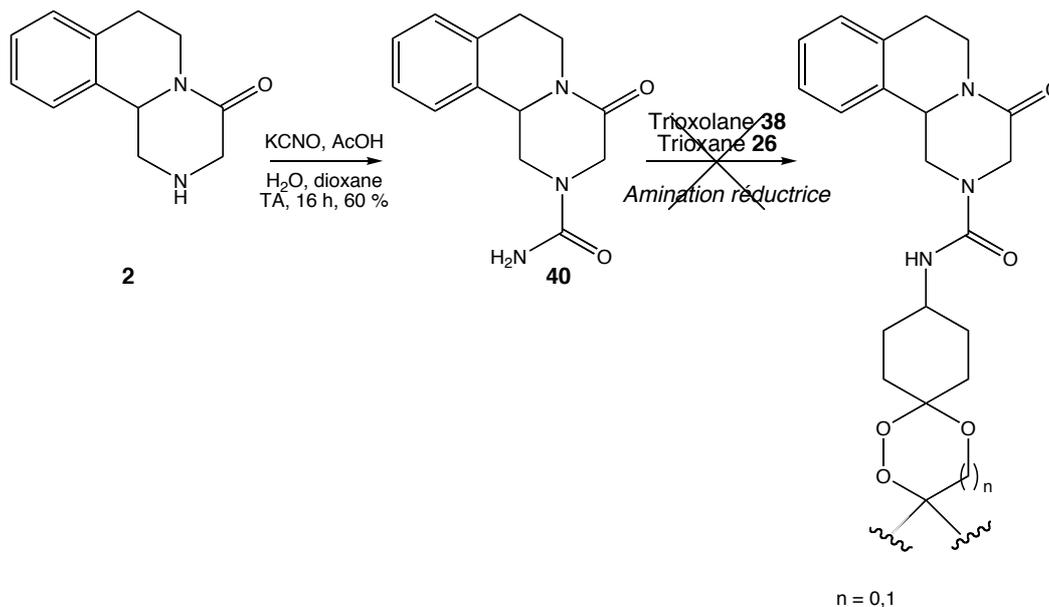


Figure 18 : Dérivatisation de la praziquanamine **2 en urée **40** et tentative d'amination réductrice avec un fragment trioxane ou trioxolane.**

La transformation de la praziquanamine **2** en urée **40** a été réalisée en présence de cyanate de potassium dans un mélange eau/dioxane/acide acétique à température ambiante pendant 16 heures. L'urée **40** a ainsi été obtenue avec un rendement de 60%. Des tentatives de mise au point des conditions d'amination réductrice ont été effectuées en partant de la cyclohexa-1,4-dione ou de la cyclohexanone et de l'urée. Nous avons fait varier le solvant (DCE, Ac₂O, DMF, MeOH), le réducteur (NaBH₃CN, NBu₄BH₃CN, NaBH(OAc)₃), le temps et la température de réaction, la présence ou non d'acide ainsi que sa nature (AcOH, HCl). Dans aucune condition, l'amination réductrice de l'urée n'a été obtenue. De même, les tentatives de couplage de l'urée **40** avec le trioxane **26** ou le trioxolane **38** n'ont pas abouti. Il semble cependant que cette réaction ne soit pas impossible [19].

Dans l'impossibilité de coupler l'urée à une cétone modèle de trioxane, nous avons décidé d'introduire la fonction acyle en position 2 sous la forme d'un amide (comme cela est le cas dans le praziquantel) par couplage entre la praziquanamine **2** et un ester activé.

II.2.2 – Diméthyltrioxane carboxylate et 9'H-trioxaquantel

Synthèse du H9'-trioxaquantel 43

L'introduction de la fonction C=O en position 2 a ensuite été envisagée par un couplage peptidique, entre la praziquanamine **2** et un ester activé porté par le fragment trioxane. Le schéma rétrosynthétique est décrit à la figure 19 ci-après.

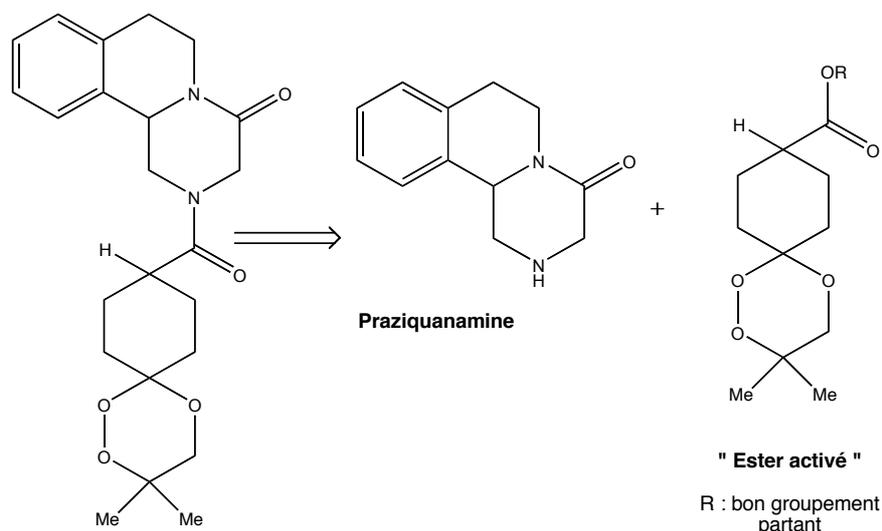


Figure 19 : Rétrosynthèse du diméthyltrioxaquantel acylé en position 2.

Différents agents de couplage permettent la formation de l'ester activé. Pour le couplage peptidique envisagé, nous avons opté pour le PyBOP en présence de NMM [20].

Sur le schéma de synthèse du diméthyltrioxane **29**, l'analogue comportant un substituant carboxylate **41** a été préparé à partir de l'éthyl-4-oxocyclohexancarboxylate commercial et du silylperoxyde **28** (figure 20). Cette méthode avait été mise au point par Frédéric Cosledan au sein de la société Palumed.

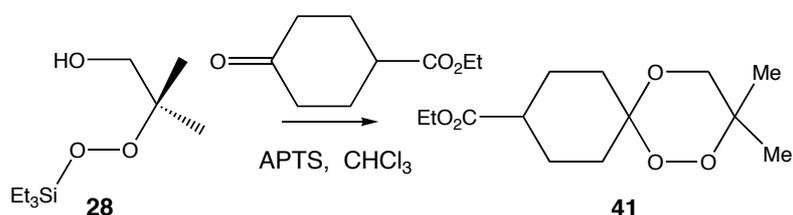


Figure 20 : synthèse du diméthyltrioxaquantel **41**.

La cyclisation du silylperoxyde **28** et de l'éthyl-4-oxocyclohexancarboxylate, en présence d'acide *para*-toluènesulfonique, donne le diméthyltrioxaquantel **41** avec un rendement de 62%. Ce composé est synthétisé comme un mélange de deux formes isomères *cis* et *trans* en proportion 1/2 ou 2/1 : dans l'isomère *trans* les substituants éthylcarboxylate et peroxyde sont

situés de part et d'autre du plan moyen du cyclohexane (axial, axial \rightleftharpoons équatorial, équatorial), dans l'isomère *cis* les substituants sont situés du même côté du plan moyen du cyclohexane (axial, équatorial \rightleftharpoons équatorial, axial). Ces deux composés sont facilement séparables en CCM. De même, en ¹H-RMN, deux quadruplets et deux triplets sont observés pour le CH₂ et le CH₃ de l'ester éthylique respectivement.

Dans un premier temps, c'est le mélange des deux isomères *cis/trans* qui a été couplé à la praziquanamine **2**. Le schéma de synthèse réalisé est décrit à la figure 21 suivante :

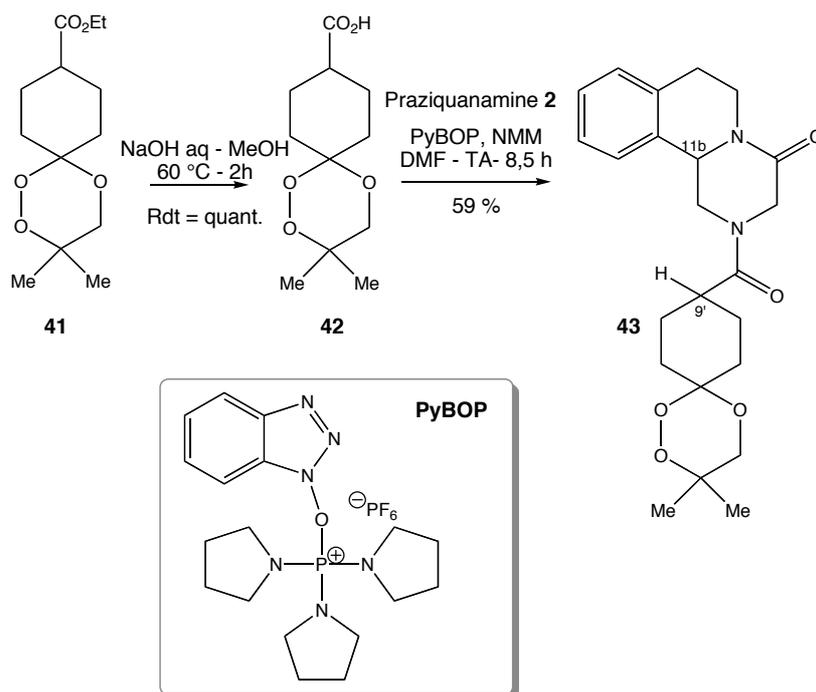


Figure 21 : Synthèse du trioxaquantel **43** à partir du diméthyltrioxane **41**.

La saponification du diméthyltrioxane **41** par une solution de soude aqueuse, dans le méthanol, à 60°C donne de façon quantitative l'acide carboxylique **42**. Le couplage du trioxane **42** avec la praziquanamine **2**, en présence de PyBOP et de NMM (*N*-méthylmorpholine), permet l'obtention du 9'-H-trioxaquantel **43** avec un rendement de 59% après purification par chromatographie et précipitation.

Le trioxaquantel **43** est un mélange de deux racémates diastéréoisomériques du fait

- i) du centre chiral 11b,
- ii) de la stéréochimie *cis/trans* du peroxyde et de l'amide de part et d'autre du résidu cyclohexyle.

Ces deux diastéréoisomères sont obtenus dans les proportions 1/1 et séparables en HPLC (cf. partie expérimentale).

Fragilité de la position H9'

Les trioxanes **41** et **42**, utilisés pour l'amination réductrice, sont des mélanges d'isomères *cis* et *trans* 1/2 (ou 2/1). Il est donc logique d'attendre deux diastéréoisomères du 9'H-trioxaquantel **43** dans les mêmes proportions. Or nous avons obtenu des diastéréoisomères en proportion 1/1. La position C9' en α de la fonction acyle créée peut être fragile : l'arrachement de ce proton conduit alors soit à une épimérisation (ce qui expliquerait l'obtention du 9'H-trioxaquantel **43** en proportion 1/1) soit à la formation d'une double liaison (non observée). Avant d'envisager la séparation des diastéréoisomères, nous avons donc substitué cette position avec un groupement méthyle (groupement iso-électronique du proton) ou avec un atome de fluor (groupement iso-stérique du proton).

II.2.3 – Blocage de la position angulaire du trioxane

Le schéma rétrosynthétique du diméthyltrioxane méthylé ou fluoré sur la position en α du groupement ester (C9) est présenté à la figure 22 ci-après.

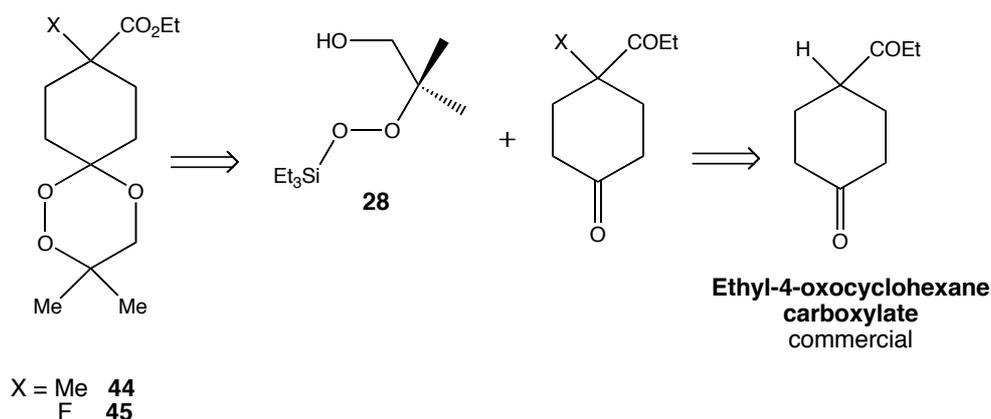


Figure 22 : Rétrosynthèse du diméthyltrioxane méthylé **44 et fluoré **45**.**

En partant de l'éthyl-4-oxocyclohexane carboxylate commercial et par une réaction de méthylation ou de fluoration, il est possible d'introduire le groupement souhaité en α du groupement ester. Le composé ainsi obtenu peut ensuite être cyclisé, grâce au silylperoxyde **28**, pour conduire aux trioxanes souhaités.

9-Méthyl-diméthyltrioxane 44Méthylation de l'éthyl-4-oxocyclohexane carboxylate

Le réactif éthyl-4-oxocyclohexane carboxylate possède une fonction cétone. Si aucune précaution n'est prise, la méthylation se fait de manière prédominante en α de ce groupement carbonyle. La cétone est donc protégée par un groupement diéthoxycétal, ce qui nous permet d'introduire de manière spécifique le groupement méthyle en α du groupement éthylcarboxylate (figure 23).

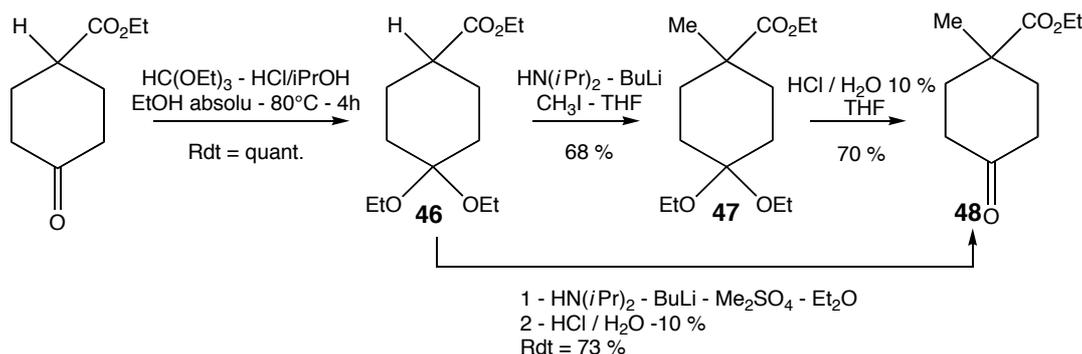


Figure 23 : Méthylation de l'éthyl-4-oxocyclohexane carboxylate.

La réaction de la cétone commerciale en présence de triéthylorthoformiate et d'une solution d'acide chlorhydrique (5M) dans l'*iso*-propanol, dans l'éthanol absolu donne le diéthoxycétal **46** quantitativement, après purification par colonne de chromatographie. Différentes conditions de méthylation du composé **46** ont été essayées. L'utilisation de LDA formé *in situ*, par addition de butyllithium sur une solution de diisopropylamine, suivie de l'ajout d'iodométhane dans les conditions de Shiner *et al.* [21] a permis d'isoler le produit méthylé protégé **47** avec un rendement de 68%. L'utilisation de diméthylsulfate à la place de l'iodométhane, suivie d'un traitement acide (HCl aqueux 10%) [22] conduit directement au produit déprotégé **48** avec un rendement de 73% après purification. C'est cette méthode que nous avons utilisée par la suite.

Cyclisation en 9-méthyl-diméthyltrioxane 44

Comme cela a été précisé au schéma rétrosynthétique de la figure 22, le composé méthylé **48** est cyclisé par la réaction avec le silylperoxyde **28** en présence d'APTS dans le chloroforme. Cette réaction est quantitative. Le 9-méthyl-diméthyltrioxane **44** est obtenu sous la forme d'un mélange de deux isomères en proportion 3/2 (isomère *cis* et isomère *trans*). Ces deux composés sont séparables en CCM. En RMN ¹H, deux quadruplets et deux triplets sont observés à 4,13 et 4,14 ppm pour le CH₂ et à 1,23 et 1,24 ppm pour le CH₃ de l'ester éthylique

respectivement. Deux singulets sont également visibles à 1,16 et 1,18 ppm (isomère majoritaire et minoritaire respectivement) (à 293 K, dans CDCl_3) pour le méthyle angulaire de chacun de ces composés. Ces isomères *cis* et *trans* ont été séparés et analysés (cf. partie 2, chapitre 2).

9-fluoro-diméthyltrioxane 45

Fluoration de l'éthyl-4-oxocyclohexane carboxylate

Pour les mêmes raisons que précédemment, le réactif éthyl-4-oxocyclohexane carboxylate est protégé par le groupement diéthoxycétal en composé **46**, protection qui nous permet d'introduire de manière spécifique le fluor en α du groupement éthylcarboxylate (figure 24).

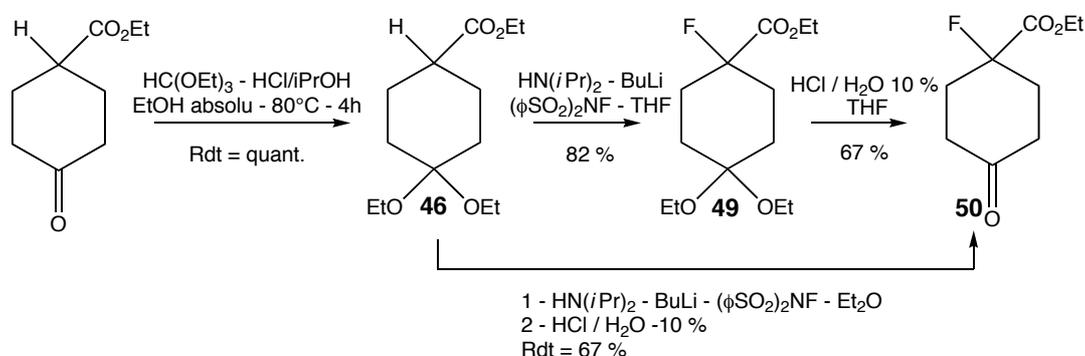


Figure 24 : Fluoration de l'éthyl-4-oxocyclohexane carboxylate.

Différentes options existent pour introduire un atome de fluor en α d'un groupement ester ou d'un carbonyle. Dans des conditions relativement similaires à celle de la méthylation (utilisation de LDA formé *in situ*) et en présence de *N*-fluorobenzènesulfonimide [23], nous avons obtenu le produit fluoré **49** avec un rendement de 82%. De manière à optimiser la synthèse, nous avons choisi la stratégie "déprotection de l'acétal *in situ*" par un traitement acide (HCl aqueux 10%) pour obtenir le produit fluoré **50**.

D'autres tentatives de fluoration décrites dans la littérature étaient plus difficile à mettre en œuvre (utilisation de F_2 gaz [24], d'acétylhypofluorite [25]) ou n'ont pas donné le produit attendu dans notre cas (utilisation de Selectfluor [26, 27] dans diverses conditions de solvant, base, température et durée de réaction).

Cyclisation en 9-fluoro-diméthyltrioxane 45

Comme cela a été précisé au schéma rétrosynthétique de la figure 22, le composé fluoré **50** est cyclisé par réaction avec le silylperoxyde **28** en présence d'APTS dans le chloroforme de façon quantitative. Le 9-fluoro-diméthyltrioxane **45** est, une nouvelle fois, obtenu sous la forme d'un mélange de deux composés isomères en proportion 3/2 ou 2/3 (isomère *trans* et isomère *cis*). Tout comme pour les deux diméthyltrioxanes **41** et **44**, ces deux composés isomères sont séparables en CCM. En RMN du fluor, deux singulets sont observables à - 91,3 (isomère majoritaire) et - 92,0 ppm (isomère minoritaire), (à 293 K, CDCl₃, acide trifluoroacétique comme référence).

II.2.4 – Synthèse du méthyl-trioxaquantel et du fluoro-trioxaquantel en position C9'

Les trioxanes 9'Me-**44** et 9'F-**45** préparés nous permettent d'exemplifier notre série de trioxaquantels avec la fonction C=O en position 2. Selon le protocole de la synthèse du H9'-trioxaquantel **43**, les diméthyltrioxanes 9'Me-**44** et 9'F-**45** sont saponifiés dans le méthanol, par une solution de soude aqueuse à 60°C en trioxanes **51** et **52** avec des rendements quantitatifs (cf. figure 25). Le couplage avec la praziquanamine **2**, en présence de PyBOP et de NMM réalisé dans le DMF (trioxane **51**) et dans le DMSO (trioxane **52**) est obtenu avec des rendements de l'ordre de 60% (figure 25).

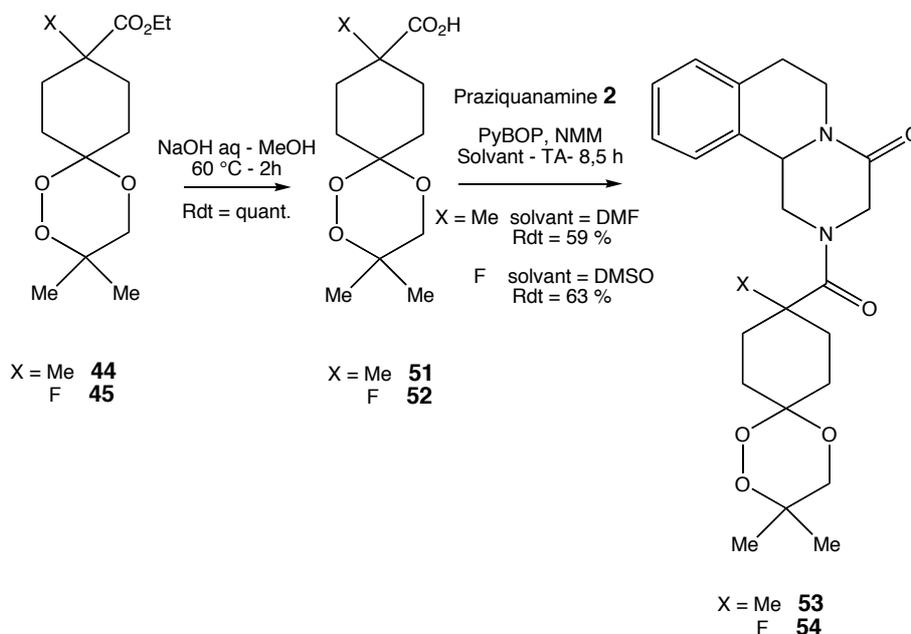


Figure 25 : Synthèse du 9'Me-trioxaquantel **53** et du 9'F-trioxaquantel **54**.

Comme pour le trioxaquantel 9'H-**43**, lors des couplages décrits ci-dessus, les trioxaquantels 9'Me-**53** et 9'F-**54** sont obtenus sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères racémiques, en proportion 2/3. Les diastéréoisomères du trioxaquantel 9'F-**54** sont séparables en HPLC. Par contre, ceux du trioxaquantel 9'Me-**53** n'ont pas pu l'être. Ces deux diastéréoisomères ont donc été dosés en RMN du proton en utilisant les singulets attribués au méthyle angulaire. Ces proportions 2/3, des diastéréoisomères des trioxaquantels 9'Me-**53** et 9'F-**54**, sont conformes aux proportions 2/3 des composés isomères des trioxanes 9'Me-**44** et 9'F-**45**. **Le mélange 1/1 obtenu pour le trioxaquantel 9'H-43, non substitué en C9', pourrait donc s'expliquer par une épimérisation.**

Il est à noter que les spectres RMN ¹H à température ambiante des trioxanes **41**, **42**, **44**, **45**, **51**, **52** et des trioxaquantels 9'H-**43**, 9'Me-**53**, 9'F-**54** présentent des signaux très larges du fait de la fluxionalité du cycle 6,6-diméthyl-1,2,4-trioxane. Dans chaque cas, une analyse à basse température a dû être réalisée pour caractériser ces molécules.

II.2.5 – Conclusion

Cette seconde génération de trioxaquantels (" avec la CO ") est obtenue une nouvelle fois par une synthèse convergente. Après la synthèse des deux synthons, le couplage peptidique est réalisé avec des rendements de l'ordre de 60% après purification par chromatographie et précipitation.

Les trioxanes éthylcarboxylate 9'H-**41**, 9'Me-**44** et 9'F-**45** sont obtenus sous la forme de mélanges de composés isomères *cis* et *trans* en proportion 1/2. Le couplage de ces derniers avec la praziquanamine racémique **2** devrait donner des trioxaquantels diastéréoisomères dans des proportions 1/2. Ceci est obtenu avec le trioxaquantel méthylé **53** et le trioxaquantel fluoré **54**. En revanche, le trioxaquantel **43** (qui possède la position C9' non bloquée) est obtenu dans des proportions 1/1.

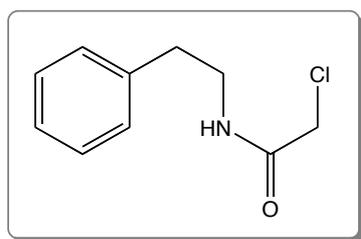
Le chapitre suivant est consacré à l'obtention des quatre stéréoisomères séparés du 9'Me-trioxaquantel **53**.

III – PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel et méthodes

Résonance magnétique nucléaire : RMN ¹H et ¹³C : Bruker AM250, DRX500 ; RMN ¹⁹F : Bruker AC200, DRX400. *Spectrométrie de masse* : Nemag R10-10H (DCI/NH₃) ; API 365 Sciex Perkin Elmer (ES). *Diffraction rayons X* : Diffractomètre bruker-AXS CDD 1000. *Point de fusion* : Electrothermal Digital melting point apparatus. *Ozonateur* : Trailigaz LI1981, débit d'oxygène moléculaire 180 L/h, pression 0,55 bars, puissance O₃ = 0,4. *Chromatographie* : silice 60 Merck (70–230 mesh) ; alumine basique 90 Merck (63-200 μm). *Chromatographie sur couche mince* : feuilles d'aluminium recouverte d'un gel de silice 60 F₂₅₄ Merck. *Révélation* : fluorescence UV (λ = 254 nm) ou par une solution d'acide phosphomolybdique (5 g d'acide phosphomolybdique + 2 mL d'acide sulfurique dans 20 mL d'éthanol à 95%) chauffée à 150°C

N-(2-phényl)éthylchloroacétamide 17



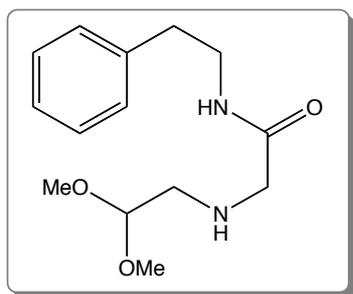
La phényléthylamine (6,0 mL, 48 mmol, 1 eq) et NaHCO₃ (4,0 g, 48 mmol, 1 eq) sont dissous dans le DCM (82 mL) sous argon à température ambiante. On refroidit à 0°C et on ajoute le chlorure de chloroacétyle (4,6 mL, 57 mmol, 1,2 eq). Le mélange réactionnel est agité à TA, pendant trois heures puis de l'eau est ajoutée précautionneusement (60 mL). La phase aqueuse est extraite au DCM (4 x 50 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution aqueuse de HCl à 10% (50 mL), séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier, concentrées et séchées sous vide. On obtient 8,9 g d'une poudre blanche (Rdt = 94%).

CCM : R_f = 0,83 (DCM/MeOH/NEt₃, 90/10/0,5, v/v/v).

P_f = 65°C.

ES-MS⁺ (MeOH) : 198,2 (55) [M+H]⁺ avec ³⁵Cl, 200,1 (18) [M+H]⁺ avec ³⁷Cl, 220,3 (100) [M+Na]⁺ avec ³⁵Cl, 222,2 (33) [M+Na]⁺ avec ³⁷Cl, 236,4 (6) [M+K]⁺ avec ³⁵Cl, 238,4 (2) [M+K]⁺ avec ³⁷Cl.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 7,33-7,19 (m, 5H, H_{aromatique}), 6,62 (br s, 1H, NH), 4,03 (s, 2H, CH₂Cl), 3,57 (q, ³J = 7,0 Hz, 2H, CH₂N), 2,85 (t, ³J = 7,0 Hz, 2H, Ph-CH₂).

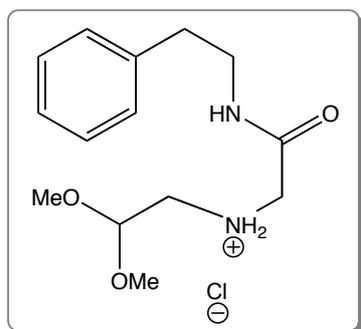
N-(2-phényl)éthyl-2[(2,2-diméthoxyéthyl)amine]acétamide **18**

Le *N*-(2-phényl)éthylchloroacétamide **17** (29,4 g, 149 mmol, 1 eq) est dissous dans le toluène (350 mL) sous argon. On ajoute la diméthoxyéthylamine (32,5 mL, 298 mmol, 2 eq) et on chauffe à reflux pendant 2 heures. On refroidit alors à 0°C : un précipité se forme. On filtre et l'on récupère 20,9 g d'une poudre blanche qui est la forme chlorhydrate du diméthoxyéthylamine (Rdt = quant). Le filtrat de couleur jaune pâle est évaporé et séché sous vide. On obtient 37 g d'un produit extrêmement huileux marron (Rdt = 93%).

CCM : $R_f = 0,63$ (DCM/MeOH/NEt₃, 90/10/0,5, v/v/v).

ES-MS⁺ (MeOH) : 235,2 (73) [M-OMe]⁺, 267,2 (100) [M+H]⁺, 289,2 (46) [M+Na]⁺.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 7,33-7,16 (m, 5H, H_{aromatique}), 4,29 (t, ³J = 5,3 Hz, 1H, CH(OMe)₂), 3,55 (q, ³J = 7,0 Hz, 2H, CH₂NHCO), 3,34 (s, 6H, 2 x OCH₃), 3,25 (s, 2H, COCH₂NH), 2,83 (t, ³J = 7,0 Hz, 2H, Ph-CH₂), 2,64 (d, ³J = 5,3 Hz, 2H, CH₂CH(OMe)₂).

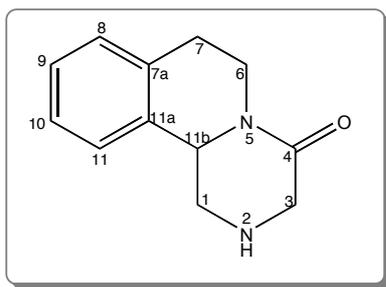
Chlorhydrate de N-(2-phényl)éthyl-2[(2,2-diméthoxyéthyl)amine]acétamide **19**

Le *N*-(phényl)éthyl-2-[(2,2-diméthoxyéthyl)amino]acétamide **18** (14,7 g, 55 mmol, 1 eq) est dissous dans le dichlorométhane (90 mL). On refroidit à 0°C et l'on ajoute une solution d'acide chlorhydrique dans du diéthyléther 1 M (61 mL, 61 mmol, 1,2 eq). Un produit précipite à 0°C. On filtre sur fritté, on lave la poudre blanche à l'éther (15 mL) puis à l'hexane (15 mL) et l'on récupère 12,0 g d'une poudre blanche (Rdt = 73%).

$P_f = 153^\circ\text{C}$.

DCI/NH₃ : 267 (100) [M+H]⁺, 563 (3) [2M+H]⁺.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 9,00 (br s, 2H, NH₂⁺), 8,58 (br s, 1H, NHCO), 7,29-7,19 (m, 5H, H_{aromatique}), 4,88 (t, ³J = 5,1 Hz, 1H, CH(OMe)₂), 4,03 (s, 2H, COCH₂), 3,52 (m, 2H, CH₂NHCO), 3,41 (s, 6H, 2 x OCH₃), 3,18 (d, ³J = 5,1 Hz, 2H, CH₂CH(OMe)₂), 2,88 (t, ³J = 7,9 Hz, 2H, Ph-CH₂).

4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine 2

Le chlorhydrate de *N*-(2-phényl)éthyl-2-[(2,2-diméthoxyéthyl)amine]-acétamide **19** (1,0 g, 3,30 mmol, 1 eq) est dissous à 0°C dans H₂SO₄ concentré (3,0 mL). Le mélange est agité à TA, pendant 3,5 heures puis versé sur une solution H₂O/glacé (≈ 20 mL). Le pH est ajusté à 12 avec une solution aqueuse de soude à 20% en masse. La solution est

extraite au DCM (3 x 20 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier, concentrées et séchées sous vide. On obtient 508 mg d'un produit cristallin blanc (Rdt = 76%).

CCM : R_f = 0,48 (DCM/MeOH/NEt₃, 90/10/0,5, v/v/v).

P_f = 116-118°C.

UV-vis (DCM) : λ_{max}, nm (ε, M⁻¹.cm⁻¹) : 264 (400).

DCI/NH₃ : 203 (100) [M+H]⁺, 220 (20) [M+NH₄]⁺.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 7,24 (m, 1H, HC9), 7,23 (m, 1H, HC10), 7,19 (m, 1H, HC8), 7,15 (m, 1H, HC11), 4,88 (m, ²J = 12,5 Hz, 1H, HC6), 4,82 (m, 1H, HC11b), 3,75 (m, 1H, HC1), 3,68 (AB, ²J = 17,0 Hz, 1H, HC3), 3,54 (AB, ²J = 17,0 Hz, 1H, HC3), 3,00 (m, 1H, HC7), 2,90 (m, 1H, HC1), 2,85 (m, 1H, HC6), 2,77 (m, 1H, HC7).

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 167,3 (C4), 134,9 (C7a), 134,2 (C11a), 129,4 (C8), 127,1 (C9), 126,7 (C10), 124,7 (C11), 56,8 (C11b), 50,0 (C3), 49,8 (C1), 38,8 (C6), 28,8 (C7).

Analyse HPLC :

Colonne N10 C18 – Modulo Cart Nucléosil – 250 x 4,6 mm

Détection : 262 nm

Débit : 1 mL/min

Éluants :

(A) = CH₃CN

(B) = H₂O/HCO₂H, 100/1, v/v

Élution isocratique A/B, 45/55, v/v

1 pic à 28,6 min

Diffraction aux rayons X :

Système cristallin
Groupe spatial
Paramètres de la maille

Monoclinique
P2(1)/n
a = 8,1306(12) Å
b = 8,0472(12) Å
c = 15,692(2) Å
α = 90 °
β = 104,889(3) °
γ = 90 °

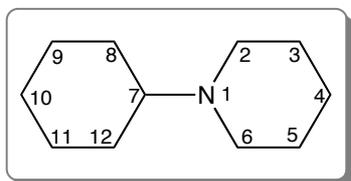
Volume	992,2(3) Å ³
Z	4
Réflexions collectées	4593
Données / paramètres	1571 / 140
Indices R finaux (I > 2σ(I))	R ₁ = 0,0437
Indices R (toutes les données)	wR ₂ = 0,1036

Longueur des liaisons (Å)

N(1)-C(1)	1,350(3)	C(5)-C(6)	1,515(3)
N(1)-C(5)	1,463(2)	C(6)-C(7)	1,507(3)
N(1)-C(4)	1,467(3)	C(7)-C(8)	1,398(3)
N(2)-C(2)	1,455(3)	C(7)-C(12)	1,404(3)
N(2)-C(3)	1,456(3)	C(8)-C(9)	1,383(3)
O(1)-C(1)	1,234(2)	C(9)-C(10)	1,388(3)
C(1)-C(2)	1,517(3)	C(10)-C(11)	1,383(3)
C(3)-C(4)	1,383(3)	C(11)-C(12)	1,390(3)
C(4)-C(12)	1,524(3)		

Angles entre les liaisons (°)

C(1)-N(1)-C(5)	119,96(18)	N(2)-C(3)-C(4)	112,96(18)	C(12)-C(7)-C(6)	120,93(17)
C(1)-N(1)-C(4)	125,52 (16)	N(1)-C(4)-C(12)	110,85(14)	C(9)-C(8)-C(7)	121,47(17)
C(5)-N(1)-C(4)	114,52(16)	N(1)-C(4)-C(3)	110,65(16)	C(8)-C(9)-C(10)	119,15(19)
C(2)-N(2)-C(3)	109,40(16)	C(12)-C(4)-C(3)	112,17(17)	C(11)-C(10)-C(9)	120,2(2)
O(1)-C(1)-N(1)	122,69(18)	N(1)-C(5)-C(6)	108,77(17)	C(10)-C(11)-C(12)	121,10(18)
O(1)-C(1)-C(2)	119,90(19)	C(7)-C(6)-C(5)	110,76 (16)	C(11)-C(12)-C(7)	119,13(18)
N(1)-C(2)-C(1)	117,41(19)	C(8)-C(7)-C(12)	118,93(19)	C(11)-C(12)-C(4)	118,95(16)
N(2)-C(2)-C(1)	116,55(18)	C(8)-C(7)-C(6)	120,12(16)	C(7)-C(12)-C(4)	121,90(18)

N-cyclohexylpipéridine 25

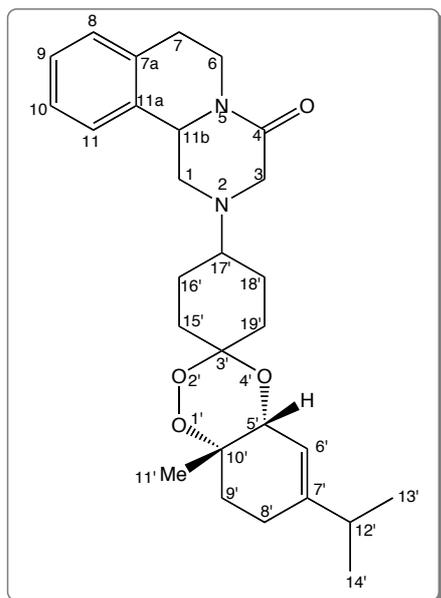
La cyclohexanone (150 µL, 1,45 mmol, 1eq) et la pipéridine (143 µL, 1,45 mmol, 1eq) sont dissoutes sous argon dans du DCE (3,5 mL). On ajoute alors le triacétoxyborohydrure de sodium (430 mg, 2,03 mmol, 1,4 eq) et l'acide acétique (87 µL,

1,45 mmol, 1eq). Le mélange est agité à TA, pendant 72 heures. Le milieu est versé sur une solution de soude aqueuse (1N) (20 mL) pour avoir pH = 13. La phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 15 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier et concentrées. On obtient une poudre blanche, qui est précipitée (DCM/hexane). On obtient 169 mg (Rdt = 70%).

DCI/NH₃ : 168 (100) [M+H]⁺.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 3,41 (d, ²J = 12,3 Hz, 2H, HC2 et HC6), 2,99 (tt, ³J = 13,1 Hz, ³J = 4,4 Hz 1H, H_{ax}C7), 2,70 (m, ²J = 12,3 Hz, ³J = 3,2 Hz, 2H, HC2 et HC6), 2,45 (m, 2H, HC3 et HC5), 2,28 (m, ³J_{ax-ax} = 13,1 Hz, ²J = 12,2 Hz, 2H, H_{ax}C8 et H_{ax}C12), 1,90 (m, 2H, HC3 et HC5), 1,72 (m, 2H, HC9 et HC11), 1,49 (m, 2H, H₂C4), 1,46 (m, ²J = 12,2 Hz, ³J_{eq-ax} = 5,2 Hz, 2H, H_{eq}C8 et H_{eq}C12), 1,32 (m, 2H, HC9 et HC11), 1,15 (m, 2H, H₂C10).

2[(4aR,8aS)-6-isopropyl-8a-méthyl-4a,7,8,8a-tétrahydrospiro[1,2,4-benzotrioxane-3,1'-cyclohexan]4'-yl][1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine-4-one **27**



La 4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine **2** (26 mg, 128 μ mol, 1 eq) et le trioxane *cis*-terpène **26** (36 mg, 128 μ mol, 1 eq) sont dissous sous argon dans le DCE (2 mL). On ajoute ensuite le triacétoxyborohydrure de sodium (40 mg, 188 μ mol, 1,4 eq) et on agite à TA, pendant 72 heures. Le milieu réactionnel est basifié jusqu'à pH = 12 avec une solution aqueuse de soude (1 N). La phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 5 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier et concentrées. On obtient une huile qui est purifiée par chromatographie sur

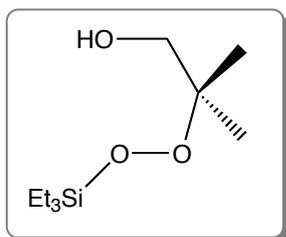
une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant DCM/MeOH, gradient de 100/0, v/v à 92/8, v/v). On obtient 28 mg d'une huile jaunâtre très visqueuse (Rdt = 47%) contenant 4 diastéréoisomères.

CCM : R_f = 0,75 (DCM/MeOH/NEt₃, 90/10/0,5, v/v/v).

ES-MS⁺ (MeOH) : 467,3 (100) [M+H]⁺, 483,3 (19) [M+Na]⁺.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 253 K) δ (ppm) 7,26-7,23 (m, 1H, HC9), 7,25-7,23 (m, 1H, HC10), 7,19-7,16 (m, 2H, HC8 et HC11), 5,47-5,38 (m, 1H, HC6'), 4,88-4,80 (m, 1H, HC11b), 4,81-4,78 (m, 1H, HC6), 4,44-4,00 (m, 1H, HC5'), 3,91-3,75 (m, 1H, HC17'), 3,66-3,52 (m, 1H, HC3), 3,62-3,52 (m, 1H, HC1), 3,24-3,09 (m, 1H, HC3), 2,97-2,94 (m, 1H, HC7), 2,90-2,86 (m, 1H, HC6), 2,77-2,76 (m, 1H, HC7), 2,73-2,63 (m, 1H, HC9'), 2,47-2,37 (m, 1H, HC1), 2,24 (m, 1H, HC12'), 2,29-2,14 (m, 1H, HC8'), 2,17-2,05 (m, 1H, HC8'), 1,87 (m, 2H, HC15' et HC19'), 1,85-1,80 (m, 2H, HC16' et HC18'), 1,70-1,51 (m, 2H, HC16' et HC18'), 1,64-1,51 (m, 2H, HC15' et HC19'), 1,72-1,49 (m, 1H, HC9'), 1,07-1,00 (m, 6H, H₃C13' et H₃C14'), 1,00-0,91 (m, 3H, H₃C11').

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 253 K) δ (ppm) 167,1-167,0 (C4), 135,0-134,9 (C7a), 134,2 (C11a), 129,5 (C8), 127,2 (C9), 126,7 (C10), 124,9 (C11), 102,2-101,6 (C3'), 150,4-144,5 (C7'), 118,8-115,7 (C6'), 80,8-78,7 (C10'), 67,5-67,0 (C17'), 67,3-64,3 (C5'), 56,0-55,1 (C11b), 54,1-52,9 (C3), 53,8-52,2 (C1), 38,7 (C6), 34,9-34,6 (C12'), 32,7-32,4 (C15' et C19'), 30,9-29,9 (C16' et C18'), 28,8 (C7), 21,5-21,2 (C13' et C14'), 21,4-17,7 (C11').

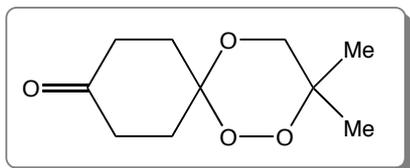
3-méthyl-3-[(triéthylsilyl)dioxy]butanol 28

Sous argon, on mélange dans l'ordre l'éthanol anhydre stabilisé avec 2% de MEK (200 mL), le 2-méthyl-2-propèn-1-ol (10 mL, 119 mmol, 1 eq), le Co(acac)₂ (1,53 g, 5,94 mmol, 0,05 eq) et le triéthylsilane (29 mL, 178 mmol, 1,5 eq). On plonge le ballon dans un bain à 20°C et l'on remplace l'atmosphère d'argon par de l'oxygène à la pression de 1,2 bars. Le milieu réactionnel est agité fortement pendant 4 heures. Les solvants sont évaporés à la rampe à vide. On obtient une pâte verte qui est chromatographiée sur une colonne sèche de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant hexane/AcOEt, 80/20, v/v). On obtient 9,4 g d'une huile incolore (Rdt = 36%).

CCM : R_f = 0,61 (hexane/AcOEt, 80/20, v/v).

DCI/NH₃ : 221 (29) [M+H]⁺, 238 (100) [M+NH₄]⁺.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 3,60 (d, ³J = 6,0 Hz, 2H, CH₂), 2,37 (m, 1H, OH), 1,19 (s, 6H, 2 x CH₃), 1,00 (t, ³J = 8,3 Hz, 9H, 3 x SiCH₂CH₃), 0,70 (q, ³J = 8,3 Hz, 6H, 3 x SiCH₂CH₃).

3,3-diméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecan-9-one 29

Le 3-méthyl-3-[(triéthylsilyl)dioxy]-butanol **28** (1,7 g, 7,73 mmol, 1 eq) et la 1,4-cyclohexanedione (2,6 g, 23,2 mmol, 3 eq) sont dissous sous argon dans du chloroforme (40 mL). On ajoute l'APTS monohydrate (1,03 mg, 5,41 mmol, 0,7 eq) et l'on agite 45 minutes à TA. On évapore les solvants ; le brut réactionnel est directement chromatographié sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant DCM/Et₂O, gradient de 100/0, v/v à 95/5, v/v). On obtient 881 mg d'une poudre blanche (Rdt = 57%).

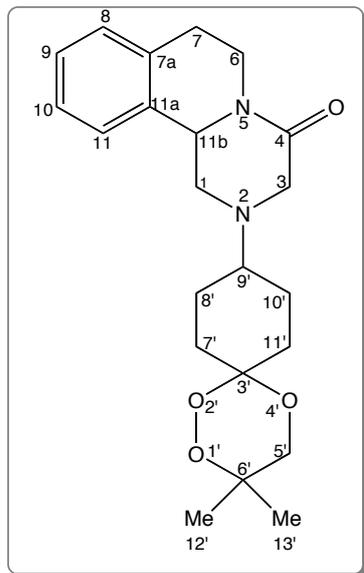
CCM : R_f = 0,42 (DCM/Et₂O, 95/5, v/v).

P_f = 68-69°C.

DCI/NH₃ : 218 (100) [M+ NH₄]⁺, 235 (18) [M+NH₃+NH₄]⁺, 418 (3) [2M+ NH₄]⁺.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 3,79 et 3,52 (2 x br s, 2H, O-CH₂), 2,70-1,95 (m, 8H, H_{cyclohexanone}), 1,53 et 1,13 (2 x br s, 6H, 2 x CH₃).

2-(3,3-diméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undec-9-yl)-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléin-4-one **36**



La 4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine **2** (38,4 mg, 190 μmol , 1 eq) et la 3,3-diméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecan-9-one **29** (38 mg, 190 μmol , 1 eq) sont dissoutes sous argon dans le DCE (3 mL). On ajoute ensuite le triacétoxyborohydrure de sodium (60 mg, 285 μmol , 1,5 eq) et on agite à TA pendant 96 heures. Le milieu réactionnel est basifié jusqu'à pH = 12 avec une solution aqueuse de soude (1 M). La phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 5 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO_4 , filtrées sur papier et concentrées. On obtient une huile qui est purifiée par chromatographie sur une colonne de silice

60 Merck (70-230 mesh) (éluant DCM/MeOH, gradient de 100/0, v/v à 90/10, v/v). On obtient 43 mg d'une huile jaunâtre très visqueuse (Rdt = 59%) contenant 2 diastéréoisomères.

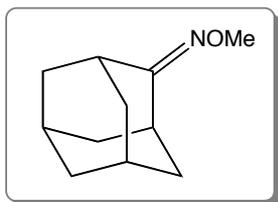
CCM : $R_f = 0,59$ (DCM/MeOH/ NEt_3 , 90/10/0,5, v/v/v).

$P_f = 131-132^\circ\text{C}$.

ES- MS^+ (MeOH) : 387,3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3 , 253 K) δ (ppm) 7,49-7,21 (m, 4H, phényl), 4,87 (m, 1H, HC11b), 4,75 (m, 1H, HC6), 3,87-3,82 (m, 1H, HC9'), 3,80 (m, 1H, HC5'), 3,60 (m, 1H, HC3), 3,59 (m, 1H, HC1), 3,40 (m, 1H, HC5'), 3,20 (m, 1H, HC3), 2,95 (m, 1H, HC7), 2,90 (m, 1H, HC6), 2,77 (m, 1H, HC7), 2,46 (m, 1H, HC1), 2,00 (m, 2H, HC8' et HC10'), 1,85 (m, 2H, HC7' et HC11'), 1,60 (m, 2H, HC8' et HC10'), 1,50 (m, 2H, HC7' et HC11'), 1,48 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}12'$), 1,08 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}13'$).

^{13}C -RMN (126 MHz, CDCl_3 , 253 K) δ (ppm) 168,6 (C4), 135,1 (C7a), 134,2 (C11a), 129,5 (C8), 127,1 (C9), 126,7 (C10), 124,9 (C11), 100,9 (C3'), 77,3 (C6'), 67,2 (C9'), 66,5 (C5'), 55,7 (C11b), 53,1 (C3), 52,4 (C1), 39,0 (C6), 33,5 (C8' et C10'), 32,2 (C7' et C11'), 29,0 (C7), 22,6 (C13'), 21,4 (C12').

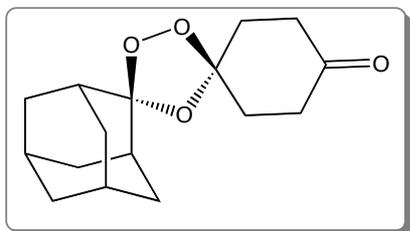
O-méthyl-2-adamantanone oxime **37**

À une solution de 2-adamantanone (2,5 g, 16,6 mmol, 1 eq) sous argon dans le méthanol (17 mL) est ajoutée la pyridine (3 mL, 36,6 mmol, 2,2 eq) et le chlorhydrate de *O*-méthylhydroxylamine (2,2 mg, 26,6 mmol, 1,6 eq). On agite 48 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est concentré sous vide. Le résidu blanc est repris dans l'eau (20 mL) et la phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 20 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution aqueuse de sulfate de cuivre 10% en poids, séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier, concentrées et séchées sous vide. On obtient 2,34 g d'une poudre blanche (Rdt = 79%).

CCM : $R_f = 0,80$ (hexane/AcOEt, 80/20, v/v).

ES-MS⁺ (MeOH) : 180 (100) [M+H]⁺.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 3,81 (s, 3H, NOCH₃), 3,46 (br s, 1H, adamantane), 2,53 (br s, 1H, adamantane), 1,99-1,63 (m, 12H, adamantane).

Adamantane-2-spiro-3',8'-oxo-1',2',4'-trioxaspiro[4,5]décane **38**

La *O*-méthyl-2-adamantanone oxime **37** (2,3 g, 12,8 mmol, 1 eq) et la 1,4-cyclohexanedione (2,8 g, 27 mmol, 2 eq) sont dissoutes dans un mélange pentane/DCM, 60/40, v/v. On fait passer un courant d'ozone généré par la lampe de l'ozonateur. Le milieu réactionnel est évaporé et l'on obtient une pâte blanche qui est purifiée par chromatographie sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant hexane/AcOEt, gradient de 100/0, v/v à 90/10, v/v). On obtient une poudre blanche (1,5 g) qui est recristallisée dans l'éthanol (8 mL) à chaud. Les cristaux sont filtrés sur fritté ; on obtient 1,02 g de produit (Rdt = 37%).

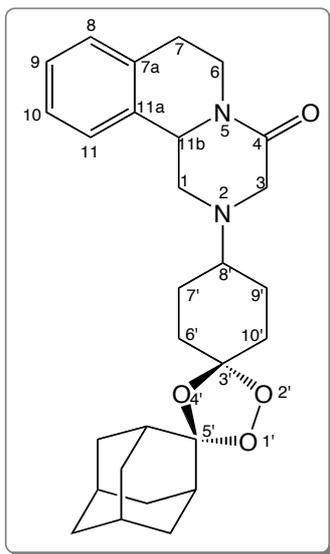
CCM : $R_f = 0,53$ (hexane/AcOEt, 80/20, v/v).

$P_f = 71-72^\circ\text{C}$.

DCI/NH₃ : 296 (100) [M+NH₄]⁺.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 2,53 (t, ³J = 7,2 Hz, 4H, 2 x CH₂_{cyclohexanone}), 2,14 (t, ³J = 7,2 Hz, 4H, 2 x CH₂_{cyclohexanone}), 2,03-1,70 (m, 14H, adamantane).

2-dispiro[cyclohexane-1,3'[1,2,4]trioxolane-5',2'-tricyclo[3.3.1.1]decan]4-yl-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine-4-one **39**



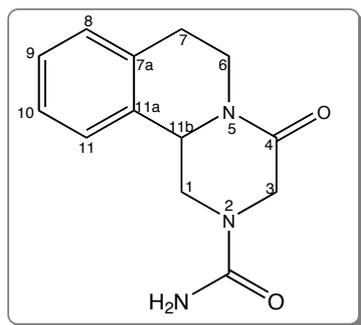
La 4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine **2** (25 mg, 124 μmol, 1 eq) et l'adamantane-2-spiro-3',8'-oxo-1',2',4'-trioxaspiro[4,5]-décane **38** (34,4 mg, 124 μmol, 1 eq) sont dissous sous argon dans le DCE (2 mL). On ajoute ensuite le triacétoxyborohydrure de sodium (39,3 mg, 186 μmol, 1,5 eq) et on agite à TA, pendant 72 heures. Le milieu réactionnel est basifié jusqu'à pH = 12 avec une solution aqueuse de soude (1 M). La phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 5 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier et concentrées. On obtient une huile qui est purifiée par chromatographie sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant DCM/MeOH, gradient de 100/0, v/v à 92/8, v/v). On obtient 34,5 mg d'une huile jaunâtre très visqueuse (Rdt = 70%) contenant 2 diastéréoisomères.

CCM : R_f = 0,71 (DCM/MeOH/NEt₃, 90/10/0,5 v/v/v).

DCI/NH₃ : 465 (100) [M+H]⁺.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 273 K) δ (ppm) 7,26 (m, 1H, HC10), 7,25 (m, 1H, HC9), 7,19 (m, 2H, HC8 et HC11), 4,87-4,83 (m, 1H, HC11b), 4,81 (m, 1H, HC6), 3,85-3,80 (m, 1H, HC8'), 3,65-3,57 (m, 1H, HC3), 3,61-3,55 (m, 1H, HC1), 3,18-3,13 (m, 1H, HC3), 2,97 (m, 1H, HC7), 2,89 (m, 1H, HC6), 2,81 (m, 1H, H_{adamantane}), 2,76 (m, 1H, HC7), 2,45-2,43 (m, 1H, HC1), 1,97-1,96 (m, 2H, HC6' et HC10'), 1,92-1,89 (m, 2H, HC7' et HC9'), 1,73-1,65 (m, 2H, HC7' et HC9'), 1,71-1,69 (m, 2H, HC6' et HC10'), 1,98-1,60 (m, 11H, H_{adamantane}).

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 273 K) δ (ppm) 166,9 (C4), 135,1 (C7a), 134,2 (C11a), 129,5 (C8), 127,1 (C9), 126,7 (C10), 124,9 (C11), 111,7-111,0 (C5'), 108,1 (C3'), 68,1-67,4 (C8'), 55,9 (C11b), 53,6-53,3 (C3), 53,7-52,8 (C1), 39,5 (3 x C_{adamantane}), 38,7 (C6), 36,4-36,2 (4 x C_{adamantane}), 35,2-34,7 (7 x C_{adamantane}), 32,1-31,5 (C7' et C9'), 31,3-30,7 (C6' et C10'), 28,8 (C7).

4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-2H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine-2-carboxamide 40

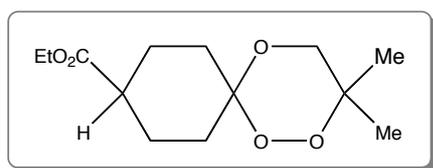
La 4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine **2** (400 mg, 1,98 mmol, 1eq) est dissoute dans un mélange eau/dioxane 1/1 (v/v) (20 mL). On ajoute ensuite le cyanate de potassium (240 mg, 2,97 mmol, 1,5 eq) et l'acide acétique (340 μ L, 5,94 mmol, 3 eq). Le mélange est agité à TA, pendant 16 heures. La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (3 x 15 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur $MgSO_4$, filtrées sur papier, concentrées et séchées sous vide. On obtient une huile qui est purifiée par chromatographie sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant DCM/MeOH, gradient de 100/0, v/v à 90/10, v/v). On obtient 340 mg d'une huile jaunâtre très visqueuse (Rdt = 60%).

CCM : $R_f = 0,40$ (DCM/MeOH/ NEt_3 , 90/10/0,5, v/v/v).

DCI/ NH_3 : 246 (100) $[M+H]^+$, 263 (51) $[M+NH_4]^+$.

1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$, 293 K) δ (ppm) 7,28-7,19 (m, 4H, $H_{aromatique}$), 5,68 (br s, 2H, NH_2), 4,82 (m, 3H, HC6, HC11b, HC1), 4,16 (AB, $^2J = 16,8$ Hz, 1H, HC3), 3,99 (AB, $^2J = 16,8$ Hz, 1H, HC3), 2,95-2,76 (m, 4H, H_2C7 , HC6, HC1).

^{13}C -RMN (126 MHz, $CDCl_3$, 293 K) δ (ppm) 165,3 (C4), 158,2 (C12), 135,3 et 132,9 (C7a et C11a), 129,7-127,9-127,3-126,0 (C8-C9-C10-C11), 55,5 (C11b), 48,5-47,0-39,4-29,1 (C1-C3-C6-C7).

Éthyl-3,3-diméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecan-9-carboxylate 41

Sous argon, on dissout dans du chloroforme (3 mL) le 3-méthyl-3[(triéthylsilyl)dioxy]butanol **28** (216 mg, 980 μ mol, 1 eq), l'éthyl-4-oxocyclohexanecarboxylate (500 mg, 2,94 mmol, 3 eq) et l'APTS monohydrate (130 mg, 686 μ mol, 0,7 eq) et l'on agite 3 heures à TA. Les solvants sont évaporés et le brut réactionnel est directement chromatographié sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant DCM/ Et_2O , gradient de 100/0, v/v à 95/5, v/v). On obtient 156 mg d'une huile incolore (Rdt = 62%).

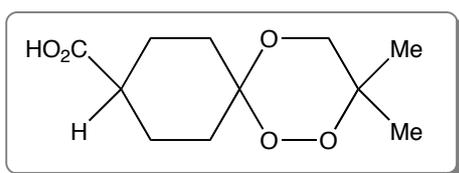
2 composés isomères *cis/trans* en proportion 1/2 ou 2/1.

CCM : $R_{f \text{ moyen}} = 0,42$ (DCM/Et₂O, 95/5, v/v).

DCI/NH₃ : 259 (5) [M+H]⁺, 276 (100) [M+NH₄]⁺.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 4,13 et 4,11 (2 x q, ³J = 7,2 Hz, 2H, CO₂CH₂), 3,81 et 3,43 (2 x br s, 2H, O-CH₂), 2,38 (m, 1H, CHCO₂), 1,91-1,52 (m, 8H, H_{cyclohexanone}), 1,53 et 1,13 (2 x br s, 6H, 2 x CH₃), 1,25 et 1,23 (2 x t, ³J = 7,2 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

Acide 3,3-diméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecan-9-carboxylique 42



L'éthyl-3,3-diméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecan-9-carboxylate **41** (600 mg, 2,33 mmol, 1 eq) est dissous dans l'éthanol absolu (10 mL). On ajoute une solution de soude aqueuse à 4,4 M (1,1 mL, 4,66 mmol, 2 eq).

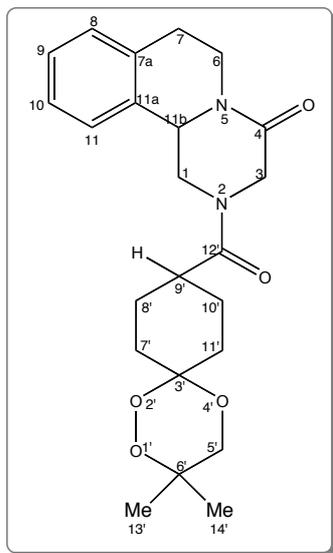
Le mélange est chauffé deux heures à 60°C. On refroidit à TA puis à 0°C et on acidifie avec de l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à pH = 3. Un précipité de NaCl se forme. Le précipité est filtré. Le filtrat est concentré de deux tiers et précipité à l'hexane (15 mL). Un second précipité se forme. On filtre sur fritté, on lave à l'hexane, on sèche sous vide. On obtient 535 mg d'une poudre blanche (Rdt = quant.).

$P_f = 120-122^\circ\text{C}$.

DCI/NH₃ : 160 (8) [M'+NH₄]⁺, 231 (5) [M+H]⁺, 248 (100) [M+NH₄]⁺. Avec M' cétone avec un bras carboxylique.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 3,80 et 3,47 (2 x br s, 2H, O-CH₂), 2,45 (m, 1H, CHCO₂), 1,91-1,52 (m, 8H, H_{cyclohexanone}), 1,49 et 1,13 (2 x br s, 6H, 2 x CH₃).

2[(3,3-diméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undec-9-yl)-carbonyl]1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléin-4-one **43**



Sous argon, on dissout dans du DMF sec (10 mL) la 4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine **2** (255 mg, 1,26 mmol, 1 eq), l'acide 3,3-diméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecan-9-carboxylique **42** (290 mg, 1,26 mmol, 1 eq), le PyBOP (787 mg, 1,51 mmol, 1,2 eq) et la NMM (692 μ L, 6,30 mmol, 5 eq). On agite le mélange réactionnel à température ambiante pendant 8,5 heures. Le mélange est versé dans une ampoule à décanter et l'on ajoute du DCM (50 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 (50 mL) puis avec de l'eau (5 x 30 mL). La phase

organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée sur papier, concentrée et séchée sous vide. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant DCM/MeOH, gradient de 100/0, v/v à 96/4, v/v). On obtient une huile incolore qui est précipitée dans DCM/hexane, 1/6, v/v. Le précipité est filtré et séché sous vide. On obtient 306 mg d'une poudre blanche (Rdt = 59%)

CCM : $R_f = 0,67$ (DCM/MeOH/ NEt_3 , 90/10/0,5, v/v/v).

$P_f = 178-180^\circ\text{C}$.

UV-vis (DCM) : λ_{max} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) : 262 (560).

DCI/ NH_3 : 327 (9) $[\text{M}'+\text{H}]^+$, 344 (18) $[\text{M}'+\text{NH}_4]^+$, 415 (50) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 432 (100) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$. Avec M' produit avec CO sur le cyclohexyle après ouverture du trioxane.

Analyse élémentaire : théorique pour $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$ C (66,65), H (7,30), N (6,76), expérimentale C (66,14), H (7,48), N (6,86).

Diastéréoisomère 1

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3 , 253 K) δ (ppm) 7,32 (m, 1H, HC10), 7,29 (m, 1H, HC11), 7,27 (m, 1H, HC9), 7,21 (m, 1H, HC8), 5,22 (dd, $^2J = 15,0$ Hz, $^3J = 5,0$ Hz, 1H, HC1), 4,85 (m, 1H, HC6), 4,83 (m, 1H, HC11b), 4,50 (AB, $^2J = 17,5$ Hz, 1H, HC3), 4,12 (AB, $^2J = 17,5$ Hz, 1H, HC3), 3,91 (d, $^2J = 10$ Hz, 1H, HC5'), 3,44 (d, $^2J = 10$ Hz, 1H, HC5'), 3,04 (m, 1H, HC7' ou HC11'), 3,00 (m, 1H, HC7), 2,91 (m, 1H, HC6), 2,82 (m, 1H, HC7), 2,80 (m, 1H, HC1), 2,50 (m, 1H, HC9'), 1,99 (m, 1H, HC7' ou HC11'), 1,79 (m, 2H, HC8' et HC10'), 1,70 (m, 2H, HC8' et HC10'), 1,62 (m, 1H, HC7' ou HC11'), 1,53 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}13'$), 1,35 (m, 1H, HC7' ou HC11'), 1,12 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}14'$).

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 253 K) δ (ppm) 173,5 (C12'), 164,3 (C4), 134,7 (C7a), 132,5 (C11a), 129,5 (C8), 125,5 (C11), 127,6 (C9), 127,1 (C10), 100,9 (C3'), 77,1 (C6'), 66,8 (C5'), 55,0 (C11b), 49,0 (C3), 45,0 (C1), 39,9 (C9'), 39,1 (C6), 34,1 (C11'), 28,7 (C7), 27,3 (C7'), 25,0 (C10' et C8'), 22,9 (C14'), 21,9 (C13').

Diastéréoisomère 2

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 253 K) δ (ppm) 7,32 (m, 2H, HC10 et HC9), 7,25 (m, 1H, HC8), 7,19 (m, 1H, HC11), 4,93 (m, 1H, HC11b), 4,89 (m, 1H, HC6), 4,80 (AB, ²J = 17,5 Hz, 1H, HC3), 4,34 (m, 1H, HC1), 3,89 (AB, ²J = 17,5 Hz, 1H, HC3), 3,77 (d, ²J = 10 Hz, 1H, HC5'), 3,45 (d, ²J = 10 Hz, 1H, HC5'), 3,30 (m, 1H, HC1), 2,99 (m, 1H, HC7), 2,96 (m, 1H, HC7' ou HC11'), 2,87 (m, 1H, HC6), 2,82 (m, 1H, HC7), 2,65 (m, 1H, HC9'), 1,87 (m, 1H, HC7' ou HC11'), 1,79 (m, 2H, HC8' et HC10'), 1,70 (m, 2H, HC8' et HC10'), 1,53 (s, 3H, H₃C13'), 1,49 (m, 2H, H7' et H11'), 1,12 (s, 3H, H₃C14').

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 253 K) δ (ppm) 173,0 (C12'), 165,6 (C4), 134,5 (C7a), 131,7 (C11a), 129,4 (C8), 127,9 (C9), 127,1 (C10), 125,6 (C11), 100,9 (C3'), 77,1 (C6'), 66,4 (C5'), 55,7 (C11b), 49,6 (C3), 39,7 (C9'), 38,6 (C6), 33,1 (C11'), 28,8 (C7), 26,7 (C7'), 25,0 (C10' et C8'), 22,9 (C14'), 21,9 (C13').

Analyse HPLC :

Colonne Modulo Cart QS Uptisphere – 5HDO – 250 x 4,6 mm

Détection : 262 nm

Débit : 1 mL/min

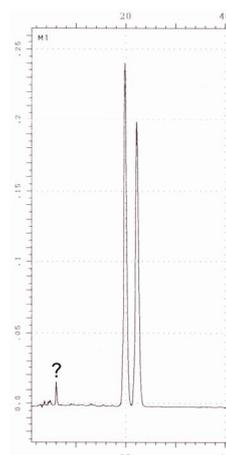
Éluants :

(A) = CH₃CN

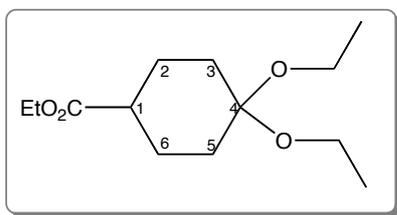
(B) = H₂O/HCO₂H, 100/1, v/v

Élution isocratique: A/B, 40/60, v/v

2 pics à 19,5 et 22,0 min



Éthyl-4,4-diéthoxycyclohexane carboxylate 46



Sous argon, on dissout l'éthyl-4-cyclohexane carboxylate (2 g, 11,8 mmol, 1 eq) dans l'éthanol absolu (20 mL). On ajoute le triéthylorthoformiate (3 mL, 16,5 mmol, 1,4 eq) et l'acide chlorhydrique (5M) en solution dans l'*iso*-propanol (471 μ L, 2,35 mmol, 0,2 eq). Le mélange est agité pendant quatre

heures à 80°C puis refroidit à TA. On ajoute du dichlorométhane (30 mL) et une solution aqueuse saturée de K₂CO₃ (10 mL). Les phases sont décantées, la phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (3 x 10 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur une colonne de

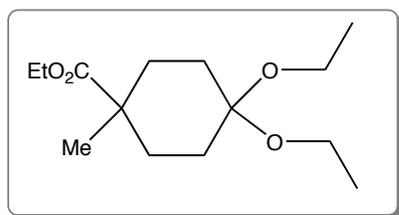
silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant hexane/AcOEt, 90/10, v/v). On obtient 2,9 g d'une huile incolore (Rdt quant.)

CCM : $R_f = 0,70$ (hexane/AcOEt, 80/20, v/v).

DCI/NH₃ : 199 (100) [M – OCH₂CH₃]⁺, 244 (31) [M]⁺, 262 (21) [M + NH₄]⁺.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 4,11 (q, ³J = 7,2 Hz, 2H, CO₂CH₂), 3,47 (q, ³J = 7,1 Hz, 2H, 4COCH₂ [Δ]), 3,37 (q, ³J = 7,1 Hz, 2H, 4COCH₂ [o]), 2,25 (tt, ³J = 10,4 Hz, ³J = 3,7 Hz, 1H, HC1), 1,99 (dt, ²J = 12,6 Hz, ³J_{eq-eq} = ³J_{ax-eq} = 4,4 Hz, 2H, H_{eq}C3 et H_{eq}C5), 1,88-1,60 (m, 4H, H₂C2 et H₂C6), 1,42 (ddd, 2H, ²J = 12,6 Hz, ³J_{ax-ax} = 12,0 Hz, ³J_{ax-eq} = 4,4 Hz, 2H, H_{ax}C3 et H_{ax}C5), 1,24 (t, ³J = 7,2 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1,17 (t, ³J = 7,1 Hz, 3H, 4COCH₂CH₃ [o]), 1,15 (t, ³J = 7,1 Hz, 3H, 4COCH₂CH₃ [Δ]).

Éthyl-4,4-diéthoxy-1-méthylcyclohexane carboxylate 47



Sous argon, on ajoute, à une solution de diisopropylamine (230 μ L, 1,64 mmol, 2 eq) dans du THF sec (1 mL) à –78°C, une solution de butyllithium dans l'hexane 1,6 M (1,13 mL, 1,80 mmol, 2,2 eq). On laisse remonter la température à l'ambiante. Le butane est évaporé sous vide et

l'on replace le milieu réactionnel sous atmosphère d'argon. On refroidit à –78°C, on ajoute l'éthyl-4,4-diéthoxycyclohexane carboxylate **46** (200 mg, 820 μ mol, 1 eq) dans du THF sec (0,5 mL) et l'on agite à 0°C pendant 1 heure. On refroidit à –78°C, on ajoute de l'iodométhane (77 μ L, 1,23 mmol, 1,5 eq) en solution dans du THF (1 mL) et on agite à TA pendant 14 heures. On ajoute de l'eau (5 mL) ; la phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (3 x 5 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier et concentrées. L'huile résiduelle est chromatographiée sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant hexane/AcOEt, 90/10, v/v). On obtient 140 mg d'une huile incolore (Rdt = 68%).

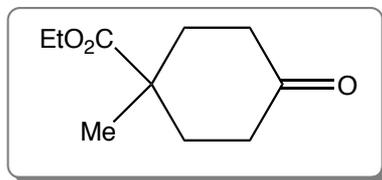
CCM : $R_f = 0,82$ (hexane/AcOEt, 80/20, v/v).

DCI/NH₃ : 213 (100) [M – OCH₂CH₃]⁺.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 4,13 (q, ³J = 7,0 Hz, 2H, CO₂CH₂), 3,46 (q, ³J = 7,1 Hz, 2H, OCH₂ [Δ]), 3,44 (q, ³J = 7,1 Hz, 2H, OCH₂ [o]), 2,03 (m, 2H, CH₂ cyclohexyl), 1,83 (m, 2H, CH₂ cyclohexyl), 1,57-1,38 (m, 4H, 2 x CH₂ cyclohexyl), 1,24 (t, ³J = 7,0 Hz,

3H, CO₂CH₂CH₃), 1,18 (t, ³J = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃ [O]), 1,17 (s, 3H, C-CH₃), 1,15 (t, ³J = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃ [Δ]).

Éthyl-1-méthyl-4-oxocyclohexane carboxylate 48



Première voie : déprotection de l'éthyl-4,4-diéthoxy-1-méthylcyclohexane carboxylate 47

L'éthyl-4,4-diéthoxy-1-méthylcyclohexane carboxylate **47** (100 mg, 388 μmol, 1 eq) est dissous dans l'éther diéthylique (1 mL). On ajoute une solution aqueuse de HCl à 10% (2 mL) et le mélange est agité vigoureusement pendant 15 minutes. La phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 5 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier et concentrées. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant hexane/AcOEt, 80/20, v/v). On obtient 50 mg d'une huile incolore, correspondant au produit (Rdt = 70%).

Deuxième voie : méthylation de 46 et déprotection *in situ*

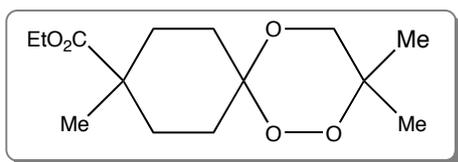
Sous argon, on ajoute à une solution de diisopropylamine (1,26 mL, 9,02 mmol, 2 eq) dans de l'éther sec (12 mL) à 0°C, une solution de butyllithium dans l'hexane 1,6 M (5,63 mL, 9,02 mmol, 2 eq). On agite le mélange pendant 1 heure à 0°C puis on ajoute l'éthyl-4,4-diéthoxycyclohexane carboxylate **46** (1,0 g, 4,09 mmol, 1 eq) dans de l'éther sec (2 mL) et l'on agite à TA, pendant 2 heures. On ajoute alors le diméthylsulfate (760 μL, 8,18 mmol, 2 eq) et l'on agite à TA, pendant 14 heures. La cétone est déprotégée *in situ* par ajout d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 10% (10 mL) et l'on agite vigoureusement pendant 15 minutes. La phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (3 x 15 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier et concentrées. L'huile résiduelle est chromatographiée sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant hexane/AcOEt, 80/20, v/v). On obtient 551 mg d'une huile incolore, correspondant au produit (Rdt = 73%).

CCM : R_f = 0,45 (hexane/AcOEt, 80/20, v/v).

DCI/NH₃ : 185 (85) [M+H]⁺, 202 (100) [M+NH₄]⁺.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 4,22 (q, ³J = 7,1 Hz, 2H, CO₂CH₂), 2,51-2,28 (m, 6H, 3 x CH₂ cyclohexyl), 1,74-1,60 (m, 2H, CH₂ cyclohexyl), 1,29 (s, 3H, C-CH₃), 1,28 (t, ³J = 7,1 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃).

Éthyl-3,3,9-triméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecane-9-carboxylate 44



Sous argon, on dissout dans du chloroforme (5 mL) le 3-méthyl-3[(triéthylsilyl)dioxy]butanol **28** (223 mg, 1,01 mmol, 1 eq), l'éthyl-1-méthyl-4-oxocyclohexanecarboxylate **48** (559 mg, 3,04 mmol, 3 eq) et l'APTS monohydrate (133 mg, 699 μmol, 0,7 eq) et l'on agite 3,5 heures à TA. Les solvants sont évaporés et le brut réactionnel est directement chromatographié sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant DCM/Et₂O, gradient de 100/0, v/v à 95/5, v/v). On obtient 275 mg d'une huile incolore (Rdt quant.) et l'on récupère 239 mg (1,3 eq) d'éthyl-1-méthyl-4-oxocyclohexanecarboxylate **48**.

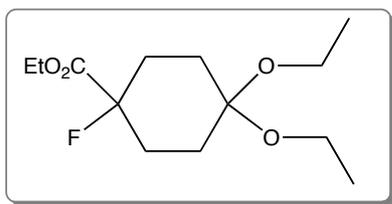
2 composés isomères *cis/trans* en proportion 3/2.

CCM : R_f moyen = 0,50 (DCM/Et₂O, 95/5, v/v).

DCI/NH₃ : 185 (36) [M'+H]⁺, 202 (19) [M'+NH₄]⁺, 290 (100) [M+NH₄]⁺ avec M' produit avec CO sur le cyclohexyle après ouverture du trioxane.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 4,13 et 4,12 (2 x q, ³J = 7,0 Hz, 2H, CO₂CH₂), 3,74 et 3,42 (2 x br s, 2H, O-CH₂), 2,72-1,03 (m, 14H, 4 x CH₂ cyclohexyl + 2 x CH₃), 1,25 et 1,24 (2 x t, ³J = 7,0 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1,16 et 1,18 (2 x s, 3H, CH₃).

Éthyl-4,4-diéthoxy-1-fluorocyclohexane carboxylate 49



Sous argon, on ajoute, à une solution de diisopropylamine (1,70 mL, 12,0 mmol, 2 eq) dans du THF sec (5 mL) à 0°C, une solution de butyllithium dans l'hexane 1,6 M (7,53 mL, 12,0 mmol, 2 eq) et on agite 1 heure à 0°C. À la même température, on ajoute l'éthyl-4,4-diéthoxycyclohexane carboxylate **46** (1,47 g, 6,02 mmol, 1 eq) dans du THF sec (5 mL) et l'on agite à 0°C pendant 1 heure. On ajoute le *N*-fluorobenzènesulfonimide (3,8 g, 12 mmol, 2 eq) dans du THF sec (10 mL) à 0°C. On laisse remonter à TA et l'on agite pendant 3 heures. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution

aqueuse saturée de NaHCO₃ (15 mL) ; la phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (3 x 10 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier et concentrées. L'huile résiduelle est chromatographiée sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant hexane/AcOEt, 80/20, v/v). On obtient 1,3 g d'une huile très légèrement jaune (Rdt = 82%).

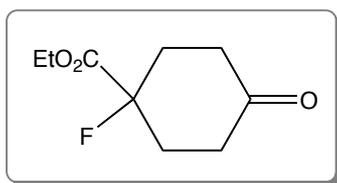
CCM : R_f = 0,50 (hexane/AcOEt, 90/10, v/v).

DCI/NH₃ : 188 (20) [M décétalisé]⁺, 217 (100) [M-OCH₂CH₃]⁺, 234 (27) [M-OCH₂CH₃+NH₃]⁺, 280 (5) [M+NH₄]⁺.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 4,26 (q, ³J = 7,1 Hz, 2H, CO₂CH₂), 3,54 (q, ³J = 7,1 Hz, 2H, OCH₂ [Δ]), 3,46 (q, ³J = 7,1 Hz, 2H, OCH₂ [o]), 2,20-1,65 (m, 8H, 4 xCH₂ cyclohexyl), 1,33 (t, ³J = 7,1 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1,23 (t, ³J = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃ [o]), 1,22 (t, ³J = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃ [Δ]).

¹⁹F-RMN (200 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ref : CF₃CO₂H 10 % dans C₆D₆) : - 91,7 (s).

Éthyl-1-fluoro-4-oxocyclohexane carboxylate 50



Première voie : déprotection de l'éthyl-4,4-diéthoxy-1-fluorocyclohexane carboxylate 49

On dissout l'éthyl-4,4-diéthoxy-1-fluorocyclohexane carboxylate **49** (120 mg, 458 μmol, 1 eq) dans de l'éther (5 mL). On ajoute une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 10% (5 mL) et l'on agite vivement pendant 1 heure. La phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (3 x 10 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier et concentrées. L'huile résiduelle est chromatographiée sur une colonne de silice 60 Merck (70 – 230 mesh) (éluant hexane/AcOEt, 80/20, v/v). On obtient 58 mg d'une huile très légèrement jaune (Rdt = 67%).

Deuxième voie : fluoration de 46 et déprotection *in situ*

Sous argon, on ajoute à une solution de diisopropylamine (1,26 mL, 9,02 mmol, 2,2 eq) dans du THF sec (5 mL) à 0°C, une solution de butyllithium dans l'hexane 1,6 M (5,6 mL, 9,02 mmol, 2,2 eq). On agite le mélange pendant 1 heure à 0°C puis on ajoute l'éthyl-4,4-

diéthoxycyclohexane carboxylate **46** (1,0 g, 4,10 mmol, 1 eq) dans du THF sec (5 mL) et l'on agite à 0°C pendant 45 minutes. On ajoute alors une solution de *N*-fluorobenzènesulfonimide (1,94 g, 6,15 mmol, 1,5 eq) dans du THF sec (10 mL). Le mélange est agité à TA, pendant 3 heures. On ajoute une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 10% (10 mL). La phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (3 x 10 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier et concentrées. L'huile résiduelle est chromatographiée sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant hexane/AcOEt, 80/20, v/v). On obtient 517 mg d'une huile très légèrement jaune (Rdt = 67%).

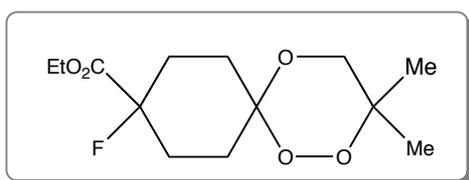
CCM : R_f = 0,35 (hexane/AcOEt, 80/20, v/v).

DCI/NH₃ : 206 (100) [M+NH₄]⁺.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 4,31 (q, ³J = 7,1 Hz, 2H, CO₂CH₂), 2,80-2,61 (m, 2H, CH₂ cyclohexyl), 2,51-2,33 (m, 6H, 3 x CH₂ cyclohexyl), 1,32 (t, ³J = 7,1 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃).

¹⁹F-RMN (200 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ref : CF₃CO₂H 10 % dans C₆D₆) : - 92,0 (s).

Éthyl-9-fluoro-3,3-diméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecane-9-carboxylate **45**



Sous argon, on dissout dans du chloroforme (5 mL) le 3-méthyl-3[(triéthylsilyl)dioxy]butanol **28** (218 mg, 993 μmol, 1 eq), l'éthyl-1-fluoro-4-oxocyclohexanecarboxylate **50** (560 mg, 2,98 mmol, 3 eq) et l'APTS monohydrate (130 mg, 685 μmol, 0,7 eq) et l'on agite 3,5 heures à TA. Les solvants sont évaporés et le brut réactionnel est directement chromatographié sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant DCM/Et₂O, gradient de 100/0, v/v à 95/5, v/v). On obtient 273 mg d'une huile incolore (Rdt quant.).

2 composés isomères *cis/trans* en proportions 3/2 ou 2/3.

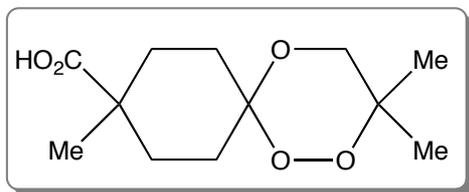
CCM : R_{f moyen} = 0,82 (DCM/Et₂O, 95/5, v/v).

DCI/NH₃ : 206 (35)[M'+NH₄]⁺, 294 (100) [M+NH₄]⁺ avec M' produit avec CO sur le cyclohexyle après ouverture du trioxane.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 4,23 (q, ³J = 7,0 Hz, 2H, CO₂CH₂), 3,70 et 3,45 (2 x s large, 2H, O-CH₂), 2,22-1,01 (m, 14H, 4 x CH₂ cyclohexyl + 2 x CH₃), 1,29 (t, ³J = 7,0 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

¹⁹F-RMN (200 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ref : CF₃CO₂H 10 % dans C₆D₆) : - 91,3 (s, 60%) et - 92,0 (s, 40%).

Acide 3,3,9-triméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecan-9-carboxylique 51



L'éthyl-3,3,9-triméthyl-1,2,5)trioxaspiro[5,5]undecane-9-carboxylate **44** (320 mg, 1,18 mmol, 1 eq) est dissous dans l'éthanol absolu (5 mL). On ajoute une solution aqueuse de soude à 4,4 M (535 μ L, 2,36 mmol, 2 eq).

Le mélange est chauffé deux heures à 60°C. On refroidit à TA puis à 0°C et on acidifie avec de l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à pH = 3. Un précipité de NaCl se forme. Le précipité est filtré. Le filtrat est concentré de deux tiers et précipité à l'hexane à 0 °C (5 mL). Un second précipité se forme. On filtre sur fritté, on lave à l'hexane, on sèche sous vide. On obtient 290 mg d'une poudre blanche (Rdt = quant.).

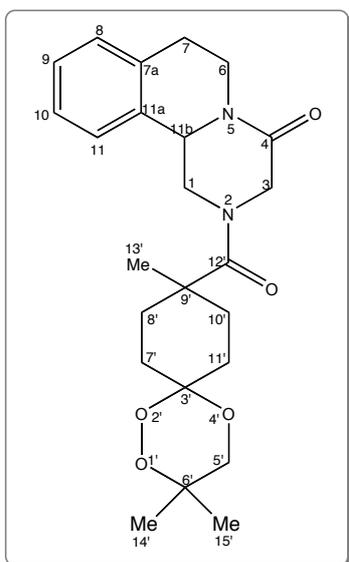
2 composés isomères *cis/trans* en proportions 3/2.

P_f = 148-150°C.

DCI/NH₃ : 174 (12) [M'+NH₄]⁺, 262 (100) [M+NH₄]⁺ avec M' produit avec CO sur le cyclohexyle après ouverture du trioxane.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 3,77 et 3,43 (2 x br s, 2H, O-CH₂), 2,66-0,82 (m, 14 H, 4 x CH₂ cyclohexyl + 2 x CH₃), 1, 26 et 1,25 (2 x s, 3H, CH₃).

2[(3,3,9-triméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undec 9-yl)-carbonyl]1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléin-4-one 53



Sous argon, on dissout dans le DMF (1 mL) la 4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine **2** (112 mg, 553 μ mol, 1 eq), l'acide 3,3,9-triméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecan-9-carboxylique **51** (135 mg, 553 μ mol, 1 eq), le PyBOP (345 mg, 664 μ mol, 1,2 eq) et la NMM (304 μ L, 2,77 mmol, 5 eq). On agite le mélange à température ambiante pendant 7,5 heures. Le mélange est versé dans une ampoule à décanter et l'on ajoute du DCM (30 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en K₂CO₃ (30 mL) puis avec de l'eau (3 x 30 mL). La phase organique est

séchée sur MgSO_4 , filtrée sur papier, concentrée et séchée sous vide. Le brut réactionnel est chromatographié sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant DCM/MeOH, gradient de 100/0, v/v à 96/4, v/v). On obtient une huile incolore qui est précipitée dans DCM/hexane, 1/6, v/v. Le précipité est filtré et séché sous vide. On obtient 140 mg d'une poudre blanche (Rdt = 59%).

CCM : $R_f = 0,78$ (DCM/MeOH/ NEt_3 , 90/10/0,5, v/v/v).

$P_f = 200-201^\circ\text{C}$.

UV-vis (DCM) : λ_{max} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) : 262 (610).

DCI/ NH_3 : 341 (42) $[\text{M}^+\text{H}]^+$, 429 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 446 (10) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ avec M^+ produit avec CO sur le cyclohexyle après ouverture du trioxane.

Analyse élémentaire : théorique pour $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5 + 1/8 \text{H}_2\text{O}$ C (66,92), H (7,55), N (6,50), expérimentale C (66,99), H (7,49), N (6,58).

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3 , 273 K) δ (ppm) 7,35-7,26 (m, 1H, HC11), 7,34-7,30 (m, 1H, HC10), 7,29-7,22 (m, 1H, HC9), 7,27-7,21 (m, 1H, HC8), 5,13 (m, 1H, HC1), 4,89 et 4,87 (m, 1H, HC11b), 4,88-4,86 (m, 1H, HC6), 4,82 (AB, $^2J = 17,5$ Hz, 1H, HC3), 4,00 (AB, $^2J = 17,5$ Hz, 1H, HC3), 3,81 (m, 1H, HC5'), 3,47-3,40 (m, 1H, HC5'), 3,00 (m, 1H, HC7), 2,98-2,95 (m, 1H, HC1), 2,94-2,89 (m, 1H, HC6), 2,84-2,80 (m, 1H, HC7), 2,60 (m, 2H, HC7' et HC11'), 2,21-2,18 (m, 4H, HC7', HC8', HC10' et HC11'), 1,82-1,48 (m, 2H, HC8' et HC10'), 1,54 (m, 3H, $\text{H}_3\text{C14}'$), 1,11 (m, 3H, $\text{H}_3\text{C15}'$), 1,35 et 1,33 (m, 3H, $\text{H}_3\text{C13}'$).

^{13}C -RMN (126 MHz, CDCl_3 , 273 K) δ (ppm) 175,0 et 174,7 (C12'), 164,7 (C4), 134,9 (C7a), 132,5 (C11a), 129,6-129,5 (C8), 127,5 (C9), 127,0 (C10), 125,7-125,4 (C11), 101,3 (C3'), 77,1 (C6'), 66,7 (C5'), 55,1 (C11b), 50,0 (C3), 48,6 (C1), 42,7-42,5 (C9'), 39,0 (C6), 33,0-31,2 (C8' et C10'), 28,8 (C7), 25,2-24,8 (C7' et C11'), 24,7-23,7 (C13'), 22,9 (C15'), 21,9 (C14').

Analyse HPLC :

Colonne Modulo Cart QS Uptisphère – 5HDO – 250 x 4,6 mm

Détection : 262 nm

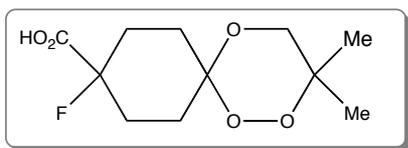
Débit : 1 mL/min

Éluants : (A) = CH_3CN

(B) = $\text{H}_2\text{O}/\text{HCO}_2\text{H}$, 100/1, v/v

Élution isocratique : A/B, 45/55, v/v

1 pic à 23,5 min

Acide 9-fluoro-3,3-diméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecan-9-carboxylique 52

L'éthyl-9-fluoro-3,3-diméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecane-9-carboxylate **45** (400 mg, 1,45 mmol, 1 eq) est dissous dans l'éthanol absolu (4 mL). On ajoute une solution aqueuse de soude à 4,4 M (659 μ L, 2,90

mmol, 2 eq). Le mélange est chauffé deux heures à 60°C. On refroidit à TA puis on acidifie à 0°C avec de l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à pH = 3. Un précipité de NaCl se forme. Le précipité est filtré. Le filtrat est concentré de deux tiers et précipité à l'hexane à 0°C (5 mL). Un second précipité se forme. On filtre sur fritté, on lave à l'hexane, on sèche sous vide. On obtient 359 mg d'une poudre blanche (Rdt = quant.).

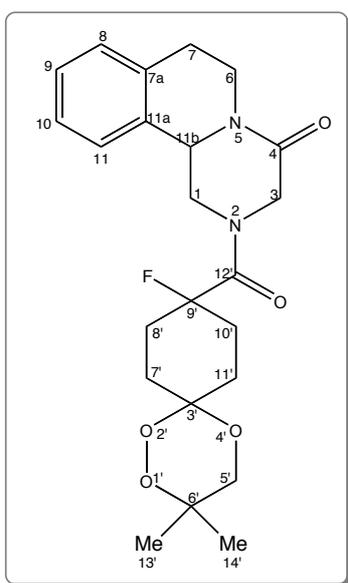
2 composés isomères *cis/trans* en proportions 3/2 ou 2/3.

$P_f = 128-129^\circ\text{C}$.

DCI/ NH_3 : 160 (7)[$\text{M}'+\text{H}$]⁺, 266 (100) [$\text{M}+\text{NH}_4$]⁺ avec M' produit avec CO sur le cyclohexyle après ouverture du trioxane.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl_3 , 293 K) δ (ppm) 3,86 et 3,45 (2 x s large, 2H, O- CH_2), 2,98-2,41 (m, 1H, cyclohexyl), 2,27-1,65 (m, 7 H, cyclohexyl), 1,49 (br s, 3H, CH_3), 1, 15 (s large, 3H, CH_3).

¹⁹F-RMN (200 MHz, CDCl_3 , 293 K) δ (ref : $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ 10 % dans C_6D_6) : -91,0 (s, 60 %) et -92,0 (s, 40 %).

2[(9-fluoro-3,3-diméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undec-9-yl)-carbonyl]1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléin-4-one 54

Sous argon, on dissout dans le DMSO (7 mL) la 4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine **2** (244 mg, 1,21 mmol, 1 eq), l'acide 9-fluoro-3,3-diméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecan-9-carboxylique **52** (300 mg, 1,21 mmol, 1 eq), le PyBOP (755 mg, 1,45 mmol, 1,2 eq) et la NMM (664 μ L, 6,05 mmol, 5 eq). On agite le mélange à température ambiante pendant 7 heures. Le mélange est versé dans une ampoule à décanter et l'on ajoute du DCM (30 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en Na_2CO_3 (30 mL) puis avec de l'eau (5 x 15 mL). La phase organique est

séchée sur MgSO₄, filtrée sur papier, concentrée et séchée sous vide. Le brut réactionnel est chromatographié sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant DCM/MeOH, gradient de 100/0, v/v à 96/4, v/v). On obtient une huile incolore qui est précipitée dans DCM/hexane, 1/6, v/v. Le précipité est filtré et séché sous vide. On obtient 330 mg d'une poudre blanche (Rdt = 63%)

À noter : les tentatives de couplage dans le DMF comme pour les trioxaquantels 9'H-**43** et 9'Me-**53** ont donné des rendements nettement moins bons (de l'ordre de 6%).

CCM : R_f = 0,73 (DCM/MeOH/NEt₃, 90/10/0,5 v/v/v).

P_f = 179-181°C.

UV-vis (DCM) : λ_{max}, nm (ε, M⁻¹.cm⁻¹) : 262 (340).

DCI/NH₃ : 345 (63) [M'+H]⁺, 362 (16) [M'+NH₄]⁺, 433 (100) [M+H]⁺, 450 (10) [M+NH₄]⁺ avec M' produit avec CO sur le cyclohexyle après ouverture du trioxane.

Analyse élémentaire : théorique pour C₂₃H₂₉FN₂O₅ + 4/5 DCM C (57,1), H (6,12), N (5,60), expérimentale C (56,7), H (6,09), N (5,60).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 264 K) δ (ppm) 7,33-7,29 (m, 1H, HC9), 7,31-7,30 (m, 1H, HC10), 7,29-7,20 (m, 1H, HC11), 7,27-7,21 (m, 1H, HC8), 5,12-5,00 (m, 1H, HC1), 4,97-4,87 (m, 1H, HC11b), 4,95-4,91 (AB, ²J = 17,5 Hz, 1H, HC3), 4,92-4,83 (m, 1H, HC6), 4,19-3,82 (AB, ²J = 17,5 Hz, 1H, HC3), 3,93-3,74 (m, 1H, HC5'), 3,45 (m, 1H, HC5'), 3,18-2,87 (m, 1H, HC1), 3,00-2,98 (m, 1H, HC7), 2,98-1,71 (m, 4H, H₂C8' et H₂C10'), 2,92-2,85 (m, 1H, HC6), 2,81 (m, 1H, HC7), 2,52-1,79 (m, 4H, H₂C7' et H₂C11'), 1,54 (m, 3H, H₃C13'), 1,13 (m, 3H, H₃C14').

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 264 K) δ (ppm) 170,0-169,1 (C12', ²J_{CF} = 22 Hz), 164,8-164,5 (C4), 135,2-134,8 (C7a), 132,4-131,9 (C11a), 129,5-129,7 (C8), 127,6 (C9), 127,1 (C10), 125,6 (C11), 97,5-96,7 (C9', ¹J_{CF} = 186 Hz), 100,3 (C3'), 77,2 (C6'), 66,8-66,7 (C5'), 56,1-54,6 (C11b), 50,2-46,9 (C1), 49,8-47,9 (C3, ⁴J_{CF} = 16 et 9 Hz), 39,0-38,7 (C6), 30,0-29,0 (C8' et C10'), 28,9-28,7 (C7), 22,9-22,5 (C7' et C11'), 22,9 (C14'), 21,9 (C13').

Analyse HPLC :

Colonne Modulo Cart QS Uptisphère – 5HDO – 250 x 4,6 mm

Détection : 262 nm

Débit : 1 mL/min

Éluants : (A) = CH₃CN

(B) = H₂O/HCO₂H, 100/1, v/v

Élution isocratique : A/B, 45/55, v/v

2 pics à 24,6 et 28,2 min (40 et 60 % respectivement)

IV – BIBLIOGRAPHIE

- [1] Rupe H., Frey W. Die katalytische Hydrierung des 1-Cyan-2-benzoyl-1,2-dihydroisochinolins (Reissert'scher Körper aus Isochinolin). *Helv. Chim. Acta* **1939**, 22, 673.
- [2] Pohlke R., brevet n° 1. 795. 728, **1972**.
- [3] Frehel D., Maffrand J.-P. New synthesis of praziquantel: 2-(cyclohexylcarbonyl-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinolin-4-one. *Heterocycles* **1983**, 20, 1731-1735.
- [4] Yuste F., Pallas Y., Barrios H., Ortiz B., Sanchez-Obregon R. A short synthesis of praziquantel. *J. Heterocyclic Chem.* **1986**, 23, 189-190.
- [5] Berkowitz W.F., John T.V. An internal imino-Diels-Alder route to a tetrahydroisoquinoline. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 5269-5271.
- [6] Kim J.H., Lee Y.S., Kim C.S. Synthesis of praziquantel via *N*-acyliminium ion cyclization of amido acetal through several synthetic routes. *Heterocycles* **1998**, 48, 2279-2285.
- [7] Kim J.H., Lee Y.S., Park H., Kim C.S. Synthesis of pyrazinoisoquinoline ring system by the tandem amidoalkylation and *N*-acyliminium ion cyclization: an efficient synthesis of praziquantel. *Tetrahedron* **1998**, 54, 7395-7400.
- [8] Todd M.H., Ndubaku C., Bartlett P.A. Amino acid derived heterocycles: Lewis Acid catalyzed and radical cyclizations from peptide acetals. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3985-3988.
- [9] Dechy-Cabaret O., Benoit-Vical F., Loup C., Robert A., Gornitzka H., Bonhoure A., Vial H., Magnaval J.-F., Séguéla J.-P., Meunier B. Synthesis and antimalarial activity of trioxaquin derivatives. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 1625-1636.
- [10] Hutchins R.O., Markowitz M. Tetraalkylammonium trihydridocyanoborates. Versatile, selective reagents for reductive aminations in nonpolar media. *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 3571-3574.
- [11] Abdel-Magid A.F., Harris B.D., Maryanoff C.A. A reductive amination/lactamisation procedure using borohydride reagents. *Synlett* **1994**, 81-83.
- [12] Oh C.H., Kang J.H. A convenient synthesis of substituted 1,2,4-trioxanes via Co(II) catalyzed oxygenation of cinnamyl alcohol. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 2771-2774.
- [13] O'Neill P.M., Pugh M., Davies J., Ward S.A., Park B.K. Regioselective Mukaiyama hydroperoxysilylation of 2-alkyl- or 2-aryl-prop-2-en-1-ols: application to a new synthesis of 1,2,4-trioxanes. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 4569-4571.
- [14] Isayama S., Mukaiyama T. Novel method for the preparation of triethylsilyl peroxides from olefins by the reaction with molecular oxygen and triethylsilane catalyzed by bis-(1,3-diketonato)cobalt (II). *Chem. Lett.* **1989**, 573-576.
- [15] Xu X.-X., Dong H.-Q. Enantioselective total synthesis of all four stereoisomers of Yingzahaosu C. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9429-9432.
- [16] Tokuyasu T., Masuyama A., Nojima M. Co(III)-alkyl complex- and Co(III)-alkylperoxy complex-catalyzed triethylsilylperoxidation of alkenes with molecular oxygen and triethylsilane. *Org. Lett.* **2002**, 4, 3595-3598.
- [17] Vennertstrom J.L., Dong Y., Chollet J., Matile H., Padmaniyalam M., Tang Y., Charman W.N., US 2004/ 01 861 68 A1.
- [18] Tang Y., Dong Y., Karle J.M., DiTusa C.A., Vennerstrom J.L. Synthesis of tetrasubstituted ozonides by the Griesbaum cozonolysis reaction: diastereoselectivity and functional group transformations by post-ozonolysis reactions. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 6470-6473.
- [19] Armstrong A., Atkin M.A., Swallow S. Electrophilic amination of carbanions by *N*-carboxamido oxaziridines. *Tet. Lett.* **2000**, 41, 2247-2251.
- [20] Lutz W., Lingle W.L., McCormick D., Greenwood T.M., Salisbury J.L. Phosphorylation of centrin during the cell cycle and its role in centriole separation preceding centrosome duplication. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 20774-20780.
- [21] Shiner V.J. Jr, Tai J.J. Deuterium isotope effects for migrating and nonmigrating groups in the solvolysis of neopentyl-type esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 436-442.
- [22] Davies J.E., Kirby A.J., Komarov I.V. Structural correlations for nucleophilic addition to the C=O group. The solvation angle. *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86, 1222-1233.
- [23] Resnati G., DesMarteau D.D. *N*-fluorobis-[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide: an efficient reagent for the α -fluorination of functionalized carbonyl compounds. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4925-4929.
- [24] Chambers R.D., Hutchinson J. Elemental fluorine. Part 9¹ catalysis of the direct fluorination of 2-substituted carbonyl compounds². *J. Fluorine Chem.* **1998**, 92, 45-52.
- [25] Rozen S., Hagooley A., Harduf R. Synthesis of α -fluorocarboxylates from the corresponding acids using acetyl hypofluorite. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 7464-7468.

- [26] Wnuk S.F., Rios J.M., Khan J., Hsu Y.-L. Stannyl radical-mediated cleavage of π -deficient heterocyclic sulfones. Synthesis of α -fluoroesters. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 4169-4174.
- [27] Lal S.G. Site-selective fluorination of organic compounds using 1-alkyl-4-fluoro-1,4-diazabicyclo-[2.2.2]-octane salts (selectfluor reagents). *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 2791-2796.

CHAPITRE II : OBTENTION DES STÉRÉOISOMÈRES
SÉPARÉS DU 9'-MÉTHYL-TRIOXAQUANTEL 53

I – OBTENTION DE LA PRAZIQUANAMINE 2 ÉNANTIOPURE

Plusieurs options sont envisageables pour réaliser la résolution du fragment pyrazino-isoquinoléine. Il est possible de réaliser la synthèse énantiospécifique, via l'addition d'une copule chirale, ou d'effectuer la résolution du fragment grâce à la fonction amine présente en position 2. Ont été successivement tentées :

- la synthèse asymétrique du synthon,
- la transformation en sels d'ammoniums diastéréoisomériques et la séparation des sels soit par cristallisation sélective soit par HPLC,
- la résolution de la (±)-praziquanamine **2** par HPLC chirale,
- la résolution cinétique grâce à l'utilisation d'enzymes,
- la transformation du noyau pyrazino-isoquinoléine **2** racémique en diastéréoisomères covalents, la séparation de ces derniers, puis la rétro-transformation pour obtenir chaque énantiomère de la praziquanamine.

Seule cette dernière méthode a été conduite avec succès dans le cas d'un amide de Mosher comme intermédiaire (cf. §I.5.3 page 161).

I.1 – Tentative de synthèse énantiosélective de la praziquanamine

En 2004, Ma *et al.* réalisent la synthèse totale du praziquantel de manière énantiosélective par une condensation de Pictet-Spengler, via la formation d'un sulfynamide chiral **[1]** (figure 3).

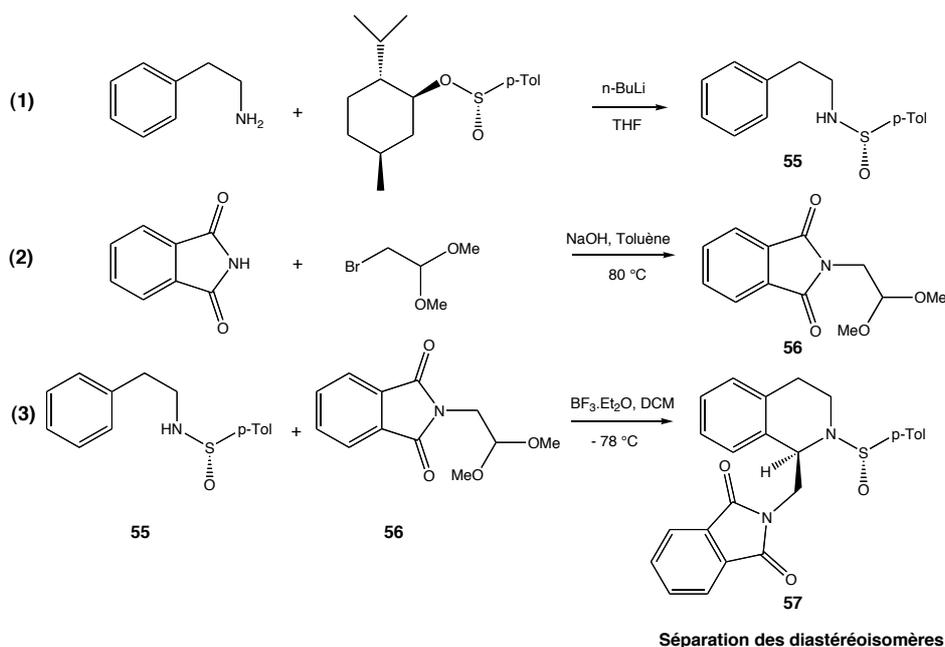
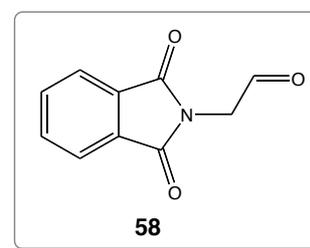


Figure 3 : Synthèse énantiosélective de la praziquanamine décrite par Ma *et al.* [1].

La copule chirale greffée sur la phényléthylamine provient du réactif d'Andersen [(1*S*, 2*R*, 5*S*)-menthyl-(*R*)-*p*-toluènesulfinate] commercial. Cette étape (1 figure 4), nous a donné le composé **55** avec un rendement de 79% conforme à ce qui était décrit. Parallèlement, le *N*-acétalpthalimide **56** est synthétisé (étape 2, figure 4). Nous n'avons pas pu reproduire cette étape dans les conditions décrites (toluène, 80°C, KOH). Ce produit **56** a donc été préparé de façon quantitative à partir de phtalimide de potassium dans l'acétamide en présence d'iodure de potassium et de bromoacétaldéhyde diméthoxyacétal à 110°C [2].

La condensation des synthons **55** et **56** (étape 3, figure 4) a été tentée sans de multiples conditions en faisant varier le rapport des réactifs, la température et la durée de réaction, le solvant (DCM, MeOH et le THF), le catalyseur acide (BF₃, TFA, acide camphorsulfonique). La réaction a également été tentée après hydrolyse de l'acétal **56** en aldéhyde **58**, ou en milieu aprotique (toluène) sans acide, à reflux [3]. Dans la plupart des cas, les réactifs ont été retrouvés inchangés, dans quelques cas (TFA), une dégradation s'est produite due à l'hydrolyse normale de la liaison –N-S(O)- par un acide protique.



Dans l'impossibilité de reproduire cette synthèse énantiosélective de la praziquanamine **2** décrite, cette voie a été abandonnée.

1.2 – Tentative de résolution de la (±)-praziquanamine par l'intermédiaire de sels chiraux diastéréoisomères

Les sels de praziquanamine ont été préparés avec les acides optiquement actifs suivants : acide tartrique, acide camphorsulfonique, acide mandélique et acide de Mosher. Avec un équivalent molaire d'acide par rapport à l'amine, quelque soit le solvant (MeOH, EtOH 95%, acétone, acétonitrile, acétate d'éthyle, acétone/eau, DCM/hexane, acétone/hexane), les deux diastéréoisomères formés ont précipité sans sélectivité (le surnageant ne contenant plus de réactif). Avec 0,5 équivalent molaire d'acide, la précipitation n'a pas non plus permis de séparer les diastéréoisomères (pouvoir rotatoire nul du surnageant).

La résolution de ces sels diastéréoisomères a également été tentée par HPLC sur colonne C18 en utilisant CH₃CN/H₂O comme éluant sans donner de résultats. La résolution de la praziquanamine racémique sur C18 en utilisant un éluant contenant de l'acide (+)-

camphorsulfonique (formation *in situ* des diastéréoisomères) a également été essayé sans succès.

I.3 – Tentative de résolution de la (±)-praziquanamine sur colonne chirale HPLC

La chromatographie sur phase stationnaire chirale peut constituer une méthode appréciable pour la séparation des énantiomères d'un composé racémique. Les deux énantiomères du praziquantel **1** sont séparés sur colonne Chiralcel OD (250 x 4,6 mm) [4, 5]. La phase stationnaire de cette colonne est de la cellulose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) sur un gel de silice de 10 µm de porosité et nous avons pu reproduire cette séparation (cf. partie expérimentale). Dans ces conditions, les énantiomères de la praziquanamine n'ont pu être séparés de façon convenable (figure 4). Seul un léger épaulement du pic a été mis en évidence.

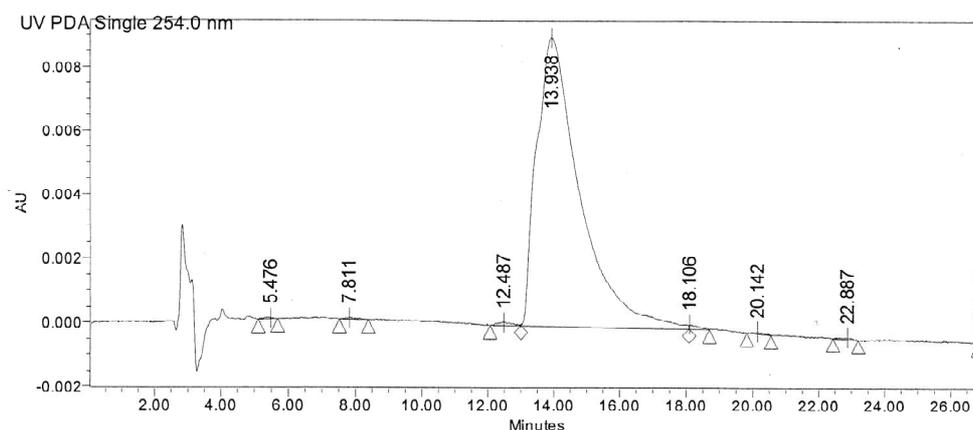


Figure 4 : Chromatogramme de la séparation de la praziquanamine 2 sur Chiralcel OD, hexane/isopropanol/DEA, 80/20/0,1, v/v/v.

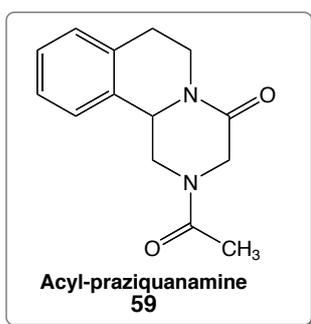
I.4 – Tentative de résolution cinétique de la (±)-praziquanamine par acylation enzymatique

Différentes enzymes, dans différentes conditions ont été utilisées pour tenter d'acyler spécifiquement l'un des énantiomères de la praziquanamine **2**. Les lipases suivantes ont été utilisées dans des conditions décrites dans la littérature : la PSL *Pseudomonas cepacia lipase* [6, 7, 8] (espèce du genre *Burkholderia* considéré comme pathogène et opportuniste chez l'homme), la CALB *Candida antarctica lipase B* [9, 10, 11] (hydrolase à sérine issue de levures de *Candida lipolytica*), la CCL *Candida cylindracea lipase* [12] (blastomycète de l'ordre des cryptococcales, encore connue sous le nom de *Candida rugosa*) et la PPL

Porcine pancreatic lipase [6, 13] (qui contient une grande variété d'enzymes estéro-lipolytiques). À titre d'exemple, les résultats obtenus avec la PPL sont regroupés dans le tableau 1 suivant.

Entrée	Agent acylant	Solvant	Résultat
1	Acétate d'éthyle	DIPE	100% praziquanamine 2
2		THF	100% praziquanamine 2
3		DMSO / H ₂ O	100% praziquanamine 2
4		CHCl ₃	100% praziquanamine 2
5		AcOEt (35 °C, 24 h)	ε acyl-praziquanamine 59
6	Anhydride acétique	DIPE	100% acyl-praziquanamine 59
7		THF	100% acyl-praziquanamine 59
8		DMSO / H ₂ O	100% acyl-praziquanamine 59
9		CHCl ₃	100% acyl-praziquanamine 59
10	Acétate d' <i>iso</i> -propényle	DIPE	100% acyl-praziquanamine 59
11		THF	100% acyl-praziquanamine 59
12		DMSO / H ₂ O	100% acyl-praziquanamine 59
13		CHCl ₃	100% acyl-praziquanamine 59
14	Acétate de vinyle	DIPE	100% acyl-praziquanamine 59
15		THF	100% acyl-praziquanamine 59
16		DMSO / H ₂ O	100% acyl-praziquanamine 59
17		CHCl ₃	100% acyl-praziquanamine 59

Tableau 1 : récapitulatif des essais de résolution enzymatique de la praziquanamine 2 avec la PPL (200 unités). Sauf mention, les réactions ont été réalisées à TA pendant 4 heures.

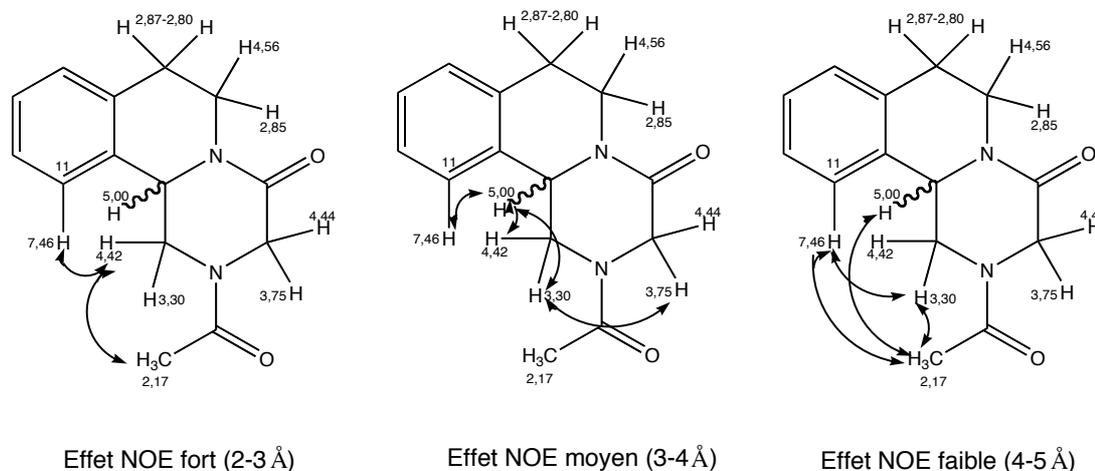


Quelle que soit l'enzyme utilisée, les résultats sont les mêmes : avec l'acétate d'éthyle : pas d'acylation (sauf pour la PPL, à 35°C, pendant 24 heures : une trace de produit acylé), avec les autres agents : l'acylation n'est pas sélective. Il est à noter que la *N*-acylation de dérivés de la pipéridine [13] est le seul exemple que nous ayons trouvé d'acylation stéréospécifique d'amine secondaire. La résolution enzymatique via l'hydrolyse de l'acyl-praziquanamine **59** est une méthode qui n'a pas été essayée.

Un point intéressant à noter est révélé par la RMN ¹H de l'acyl-praziquanamine **59**. Comme attendu, nous notons la présence de deux rotamères. L'exemple le plus simple d'amide présentant cette particularité est le diméthylformamide. La rotation autour de la liaison amide est lente ($\Delta\delta=28$ Hz) et les deux méthyles sont observables sous forme de deux singulets à 2,17 et 2,06 ppm. Ces deux singulets coalescent à 340 K lorsque le spectre est effectué dans le DMSO-*d*₆ (cf. partie expérimentale).

La mesure des effets NOE permet de confirmer ce phénomène :

Rotamère majoritaire



Rotamère minoritaire

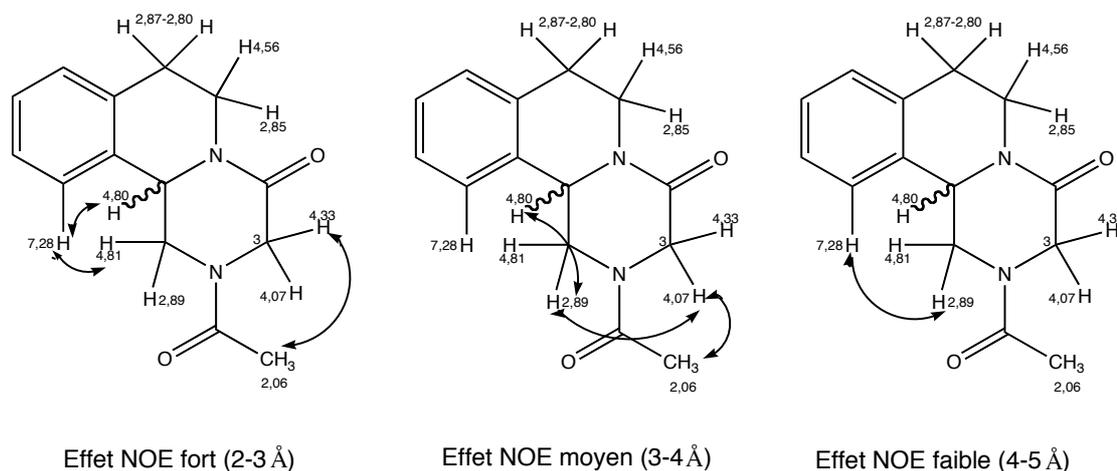


Figure 5 : Effet NOE sur l'acyl-praziquanamine 59.

Dans le rotamère majoritaire, un effet NOE positif est observé entre le groupement méthyle de l'acyle et le proton H11 du noyau aromatique. Dans le rotamère minoritaire, les effets NOE positifs sont mis en évidence essentiellement entre ce même groupement méthyle mais avec les protons H3 (à 4,33 et 4,07 ppm) en α de l'acyle et en α de l'amide.

1.5 – Transformation de la (\pm)-praziquanamine en dérivés covalents diastéréoisomères

Une autre stratégie consiste à dériver l'amine secondaire du fragment praziquantel **2** pour le transformer en diastéréoisomères, à les séparer et à revenir au fragment initial mais énantiomériquement pur par une réaction d'hydrolyse par exemple. La

première transformation, à laquelle nous avons pensé, est l'utilisation du réactif d'Andersen pour transformer le motif pyrazino-isoquinoléine racémique en deux sulfinates diastéréoisomères. La seconde méthode repose sur la transformation en carbamate et enfin une ultime réaction utilise le réactif de Mosher.

1.5.1 – Transformation en sulfinates diastéréoisomères

L'utilisation du réactif d'Andersen, comme copule chirale pour réaliser la condensation de Pictet-Spengler, nous a laissé entrevoir l'idée de transformer le précurseur racémique du praziquantel en deux sulfinates diastéréoisomériques **60** (figure 6). La séparation de ces derniers, suivie de l'hydrolyse de la liaison azote-soufre doit permettre d'obtenir le précurseur **2** de manière énantiomériquement pure.

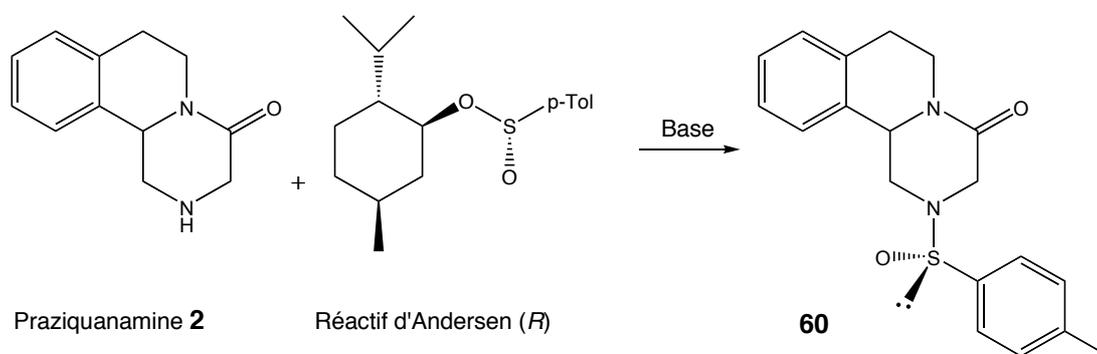


Figure 6 : Sulfinates de la praziquanamine racémique **2**.

Différentes conditions ont été tentées (présence de BuLi ou de ^tBuLi, solvant [THF, EtOH, DCM, Et₂O], température [de -78°C à 60°C] et durée de réaction). L'addition du lithien sur la praziquanamine **2** à -78°C se traduit par une coloration rouge sang caractéristique de la déprotonation de l'amine. Une fois l'anion formé, le réactif d'Andersen est ajouté. Malgré des conditions douces (THF distillé, basse température) le sulfinate **60** n'a pas pu être isolé en quantité suffisante (rendements de 3 à 10%). En général, la praziquanamine a été retrouvée inchangée (30 à 90%). Il n'est pas exclu que le sulfinate se forme et soit très rapidement dégradé [14, 15].

1.5.2 – Transformation en carbamates diastéréoisomères

Les carbamates sont parfois utilisés dans les synthèses peptidiques comme groupement protecteur des acides aminés, pour éviter une racémisation. Une dérivatisation de la fonction amine du précurseur en carbamate chiral a été envisagée comme moyen de résolution de la praziquanamine **2**. Les liaisons des carbamates sont, normalement,

relativement faciles à hydrolyser dans des conditions acides, puisqu'il faut prévoir la réversibilité de cette " protection ".

La réaction de la praziquanamine avec le (-)-menthylchloroformiate dans les conditions décrites par Wolf *et al.* (TEA, THF) [16] donne le carbamate souhaité **61** de façon quantitative (figure 7).

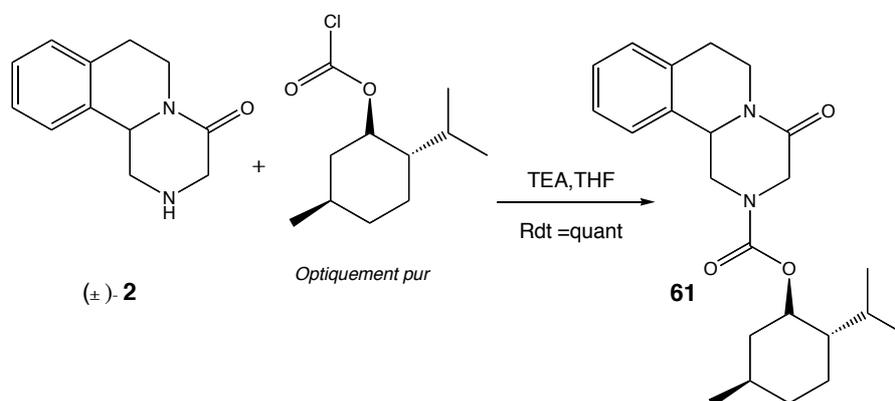


Figure 7 : Synthèse du carbamate **61**.

L'analyse RMN du produit montre que le carbamate **61** est obtenu sous la forme de deux diastéréoisomères en proportion 50/50 comme attendu. Chaque diastéréoisomère possède deux rotamères en proportion 70/30.

L'hydrolyse de la liaison carbamate, par réduction à l'hydruire de lithium aluminium [16], est inutilisable dans notre cas puisque la fonction amide en position 4 du noyau pyrazino-isoquinoléine serait également réduite. **L'hydrolyse de la fonction carbamate a été obtenue dans l'acide sulfurique concentré, avec un rendement de 80% après purification.**

Une fois que les conditions de synthèse mais également de l'hydrolyse du carbamate ont été mises au point, nous nous sommes intéressés à la séparation des diastéréoisomères. Malheureusement, toutes les tentatives de séparation sur CCM (plaque de silice, plaque d'alumine) avec des milieux éluants différents (DCM/MeOH, DCM, DCM/hexane, hexane/AcOEt, hexane/Et₂O, DCM/Et₂O, etc.) n'ont pas permis de séparer les composés. Les tentatives de séparation HPLC sur colonne C18 (élution MeOH/H₂O, CH₃CN/H₂O) ont toutes donné le même résultat : un seul pic, enveloppe des deux diastéréoisomères.

Ne disposant d'aucun moyen (qualitatif ou quantitatif) pour suivre la séparation, nous avons abandonné cette voie de résolution.

1.5.3 – Transformation en amides de Mosher diastéréoisomères

En 1969, Mosher *et al.* décrivent l'utilisation de l'acide α -méthoxy- α -trifluorométhylphénylacétique comme réactif pour la détermination de la composition énantiomérique d'alcools et d'amines chiraux [17]. Ce réactif, couramment employé sous le nom de réactif de Mosher, permet de transformer les alcools et les amines en esters et amides respectivement. Les avantages pour la détermination de la composition énantiomérique sont :

- l'utilisation de la RMN du proton et du fluor pour vérifier la cohérence des excès diastéréoisomériques trouvés par intégration,
- la forte stabilité du centre chiral face à la racémisation, même dans des conditions sévères d'acidité, de basicité et de température,
- la polyvalence du réactif : il peut être utilisé pour la détermination de la composition énantiomérique d'amines primaires, secondaires, mais aussi de carbinols.

Les amides de Mosher pouvant être formés avec des amines secondaires [18] nous sommes intéressés à la transformation de la praziquanamine racémique **2** en amides de Mosher diastéréoisomériques.

Formation et séparation des diastéréoisomères

En présence de (*R*)-(-)-MTPA (α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic acid, 99,9% de pureté) et de DCC, Kanger *et al.* réalisent la transformation de bismorpholines en composés diastéréoisomères avec un rendement de 50% [19]. Nous avons décidé de transformer la praziquanamine **2** en amide de Mosher **62** dans les conditions PyBOP / NMM dans le DMSO, conditions déjà utilisées pour le couplage des trioxaquantels (figure 8).

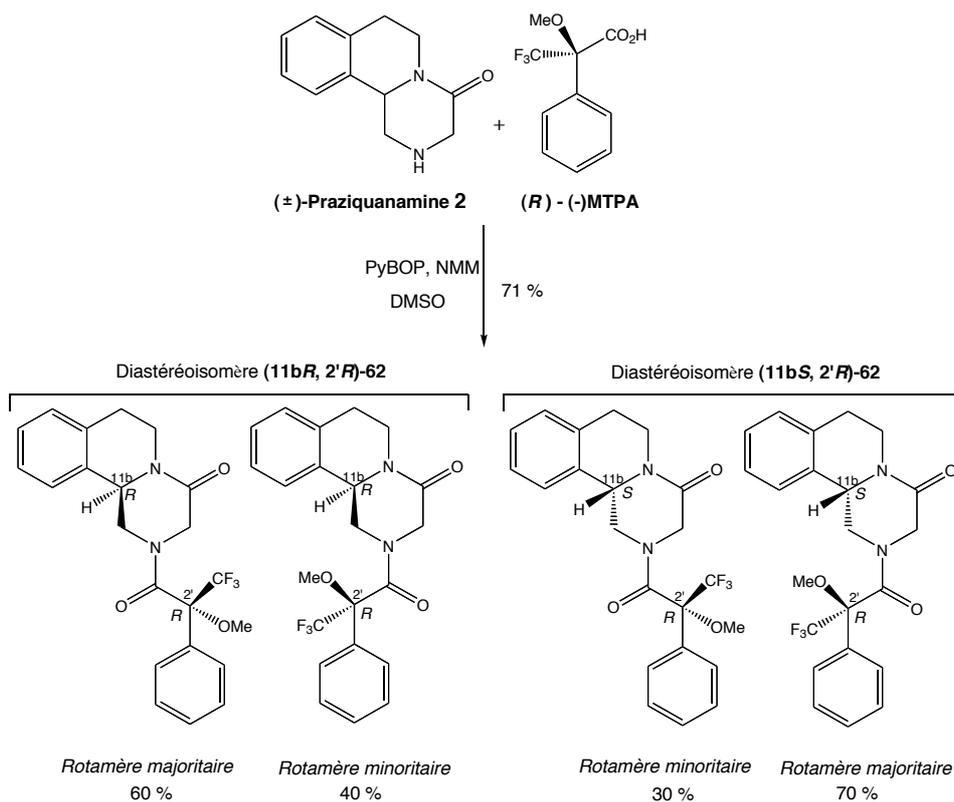


Figure 8 : Réaction de la praziquanamine 2 avec le MTPA : synthèse de l'amide de Mosher 62.

Dans ces conditions, la réaction donne un mélange de deux diastéréoisomères avec un rendement de 71%. La chromatographie sur une colonne de silice (100% éther diéthylique), permet la séparation des deux diastéréoisomères (**11bR, 2'R**)-**62** et (**11bS, 2'R**)-**62** avec des excès diastéréoisomériques supérieurs à 97%. Le diastéréoisomère (**11bR, 2'R**)-**62** a été obtenu sous forme de monocristaux analysables par diffraction des rayons X (DCN/hexane). La détermination de la structure a été réalisée par le Dr. H. Gornitzka. Connaissant la configuration (*R*) du centre 2' (provenant de l'acide de Mosher), il est possible par la diffraction aux rayons X de déterminer la configuration du centre 11b (figure 9) :

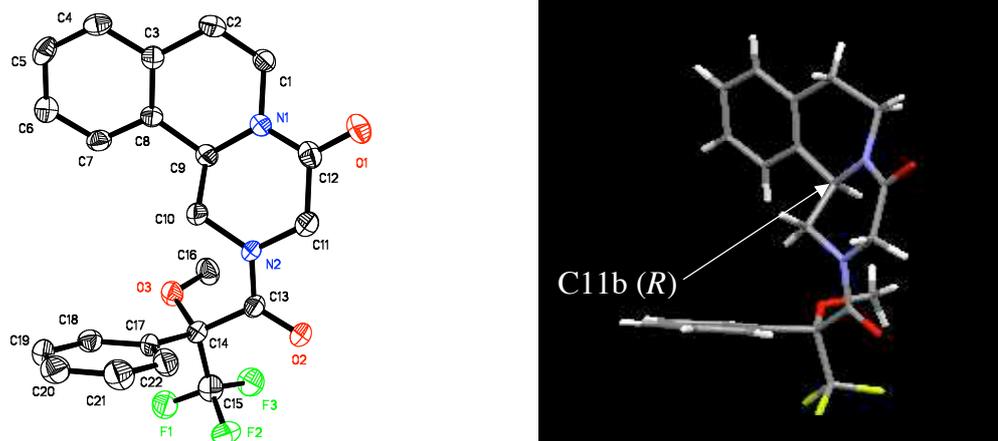
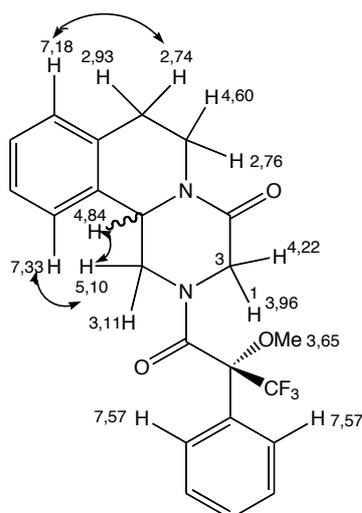
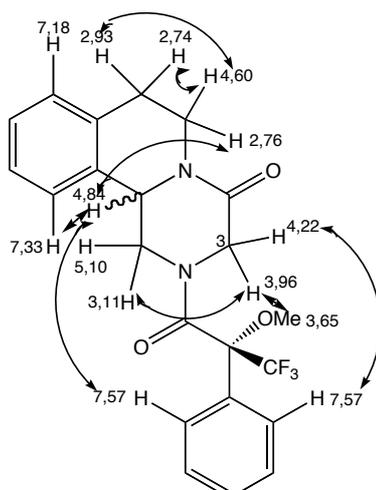
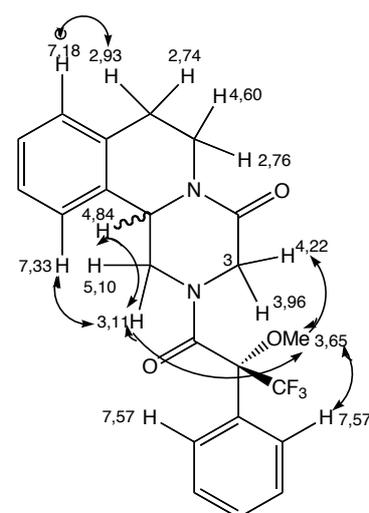
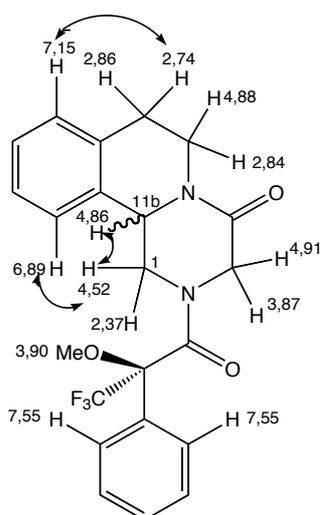
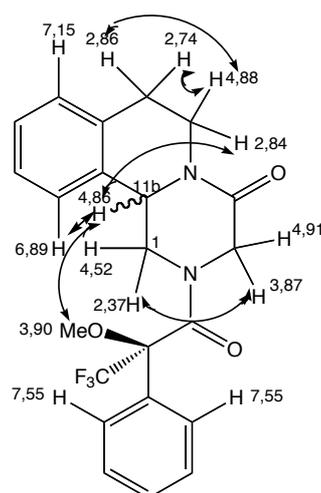
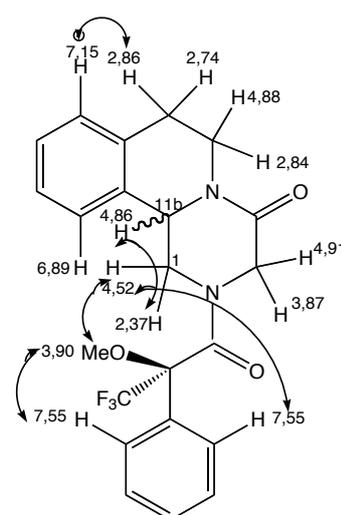


Figure 9 : Structure RX du diastéréoisomère (11bR,2'S)-62.

Il est intéressant de noter une conformation pseudo chaise du cycle pipérazine ainsi que la configuration (*R*) du carbone 11b. Ainsi, le diastéréoisomère est bien le (11bR,2'*R*)-62. Par élimination, le second diastéréoisomère est le (11bS,2'*R*)-62. Actuellement nous n'avons pas réussi à le cristalliser. Toutefois une caractérisation complète par RMN a été réalisée.

Analyse des rotamères du diastéréoisomère (11bR,2'R)-62

Comme pour le composé acylé 59 vu précédemment, nous avons une nouvelle fois des rotamères à cause de la lente rotation autour de la liaison amide. Hoye *et al.* [18] rapportent ce phénomène : la lente rotation autour de la liaison tertiaire de l'amide donne une paire de rotamères équiénergétiques, chacun observable en RMN. Les différences de déplacement chimique entre chacun des rotamères peuvent être supérieures à 0,9 ppm. Les effets NOE permettent de voir clairement ces interactions (figure 10).

Rotamère majoritaire**Effet NOE fort (2-3Å)****Effet NOE moyen (3-4Å)****Effet NOE faible (4-5Å)****Rotamère minoritaire****Effet NOE fort (2-3Å)****Effet NOE moyen (3-4 Å)****Effet NOE faible (4-5Å)****Figure 10 : effets NOE sur le diastéréoisomère (11bR,2'R)-62.**

Dans le rotamère majoritaire, des effets NOE positifs sont observables entre les protons du groupement méthoxy et les protons H3 du noyau pirazino-isoquinoléine. Dans le rotamère minoritaire, les effets NOE des protons du groupement méthoxy se font essentiellement avec les protons H1 et H11b du fragment praziquantel.

La RMN du fluor dans le DMSO- d_6 à 60°C d'un mélange des deux diastéréoisomères (11bR,2'R)-62 et (11bS,2'S)-62 permet de doser diastéréoisomères et rotamères. En effet, nous obtenons 4 pics (2 diastéréoisomères possédant chacun 2

rotamères). La RMN de deux mélanges de ces diastéréoisomères, en proportions 80/20 et 20/80, permet de lever toute ambiguïté sur l'attribution du couple de rotamères de chaque diastéréoisomère. Les deux rotamères du diastéréoisomère (11bR,2'R)-**62** ont deux singulets à - 69,3 ppm (pour le rotamère minoritaire, 40%) et - 69,8 ppm (pour le rotamère majoritaire, 60%). Les deux rotamères du diastéréoisomère (11bS,2'R)-**62** ont deux singulets à - 70,0 ppm (pour le rotamère minoritaire, 30%) et - 70,3 ppm (pour le rotamère majoritaire, 70%). Ainsi, par RMN du fluor, il est aisé de doser les proportions de chaque diastéréoisomère et de déterminer les excès diastéréoisomériques. Un point intéressant à souligner est que, quel que soit l'excès diastéréoisomérique, les rotamères de chaque diastéréoisomère ont des proportions constantes et différentes pour chaque diastéréoisomère [60/40 pour le (11bR,2'R)-**62** et 70/30 pour le (11bS,2'R)-**62**].

Tentatives d'hydrolyse de l'amide de Mosher 62

Les recherches bibliographiques ne font pas mention de l'hydrolyse des amides de Mosher, nous avons donc tenté différentes conditions pour hydrolyser la liaison N-C(O).

Dans des conditions basiques, seule la dégradation du produit a été observée. De plus, une épimérisation de la position benzylique (11b) aurait pu être possible. Nous sommes donc passés à des conditions acides, généralement utilisées pour l'hydrolyse des peptides par exemple. Dans une solution d'acide chlorhydrique dans le méthanol, protocole décrit par King *et al.* [20], ou dans H₂SO₄ 97% [21], seul le réactif **62** est récupéré. En revanche, le chauffage dans l'acide sulfurique 97% pendant 13 heures à 150°C entraîne la dégradation du produit. Dans les conditions utilisées par Pohlke *et al.* [22] pour l'hydrolyse d'un benzoylamide de la praziquanamine (H₃PO₄, 100°C, 3 jours), la rupture de la liaison amide a été obtenue avec un rendement de 73% après purification. Ces conditions de réaction ont été retenues pour l'hydrolyse de l'amide de Mosher **62**.

Cette méthode nous permet d'obtenir la praziquanamine 2 avec un excès énantiomérique supérieur à 95% pour la configuration (11bR) et un excès supérieur à 90% pour la configuration (11bS) (les excès énantiomériques étant déduits des excès diastéréoisomériques).

Conclusion

La transformation en amide de Mosher est une excellente méthode pour la détermination des excès diastéréoisomériques. Elle permet également de résoudre des

amines chirales qui supportent des conditions fortement acides pour l'hydrolyse. Il est intéressant de noter qu'une méthode de résolution de la praziquanamine **2** par cristallisation avec l'acide quinique ou acide (1*R*, 3*R*,4*R*,5*R*)-1,3,4,5-tétrahydrocyclohexane carboxylique est décrite par Pohlke *et al.* [23]. Toutefois, cette résolution n'a pour l'heure pas encore été tentée.

II – SÉPARATION DES DEUX ISOMÈRES *CIS* ET *TRANS* DE LA PARTIE TRIOXANE

Nous disposons de trois trioxanes (9'H : **41**, 9'Me : **44**, 9'F : **45**), sous la forme d'un mélange de deux composés isomères *cis* et *trans*. En ce qui concerne le 9'H-diméthyltrioxane **41**, comme cela a été explicité plus haut, une épimérisation du carbone C9' du trioxaquantel **43** peut se produire. De plus, les seuls signaux RMN ¹H fins, sur lesquels la détermination de l'excès diastéréoisomérique de la séparation du 9'H-diméthyltrioxane **41** est possible, sont le quadruplet et le triplet associés au groupement éthyle de l'ester. La synthèse du 9'F-diméthyltrioxane **45** pose problème : certaines étapes (soit la fluoration, soit la saponification) ont donné des résultats aléatoires.

Pour toutes ces raisons, nous avons choisi le 9'Me-diméthyltrioxane **44** pour l'étude de la séparation et la caractérisation stéréochimique des deux composés isomères. En effet, comme nous l'avons déjà précisé au chapitre précédent, ce composé possède un signal distinct pour le groupement méthyle de chacun de ses stéréoisomères. En ¹H-RMN, l'intégration des singulets à 1,16 et 1,18 ppm permet de déterminer l'excès diastéréoisomérique. Ces proportions peuvent être confirmées par l'intégration des triplets et des quadruplets du groupement éthyle de l'ester.

II.1 – Séparation des composés du 9'-méthyl-diméthyltrioxane **44**

La séparation des composés isomères est réalisée par chromatographie. En effet, la partie trioxane étant relativement " souple " (l'inversion des cyclohexanes est aisée et les molécules sont fluxionnelles), toute tentative de cristallisation a actuellement échoué. Seule la chromatographie sur colonne d'alumine basique 90 (0,63-0,200 mm) permet de séparer les deux trioxanes isomères. Le rapport entre la quantité d'alumine et quantité de produit à chromatographier d'une part, et le rapport entre le diamètre de la colonne et sa longueur d'autre part sont déterminants pour une bonne séparation (cf. partie expérimentale).

De manière à caractériser la stéréochimie *cis* ou *trans*, entre le peroxyde et le groupement carboxylate de chacun des isomères, nous avons dérivatisé ces derniers pour obtenir des composés " plus rigides " cristallisables. La formation d'un amide par couplage entre l'aniline et le 9'-Me-diméthyltrioxane sous sa forme acide **51**, en présence de PyBOP, de NMM dans le DMSO, nous a permis d'isoler, avec un rendement de 50%, les amides correspondants **63** qui sont cristallisés dans un mélange DCM/hexane.

L'analyse de ces cristaux par diffraction des rayons X, effectuée par H. Gornitzka, a permis de déterminer la stéréochimie *cis* ou *trans* de chacun des trioxanes (figure 11).

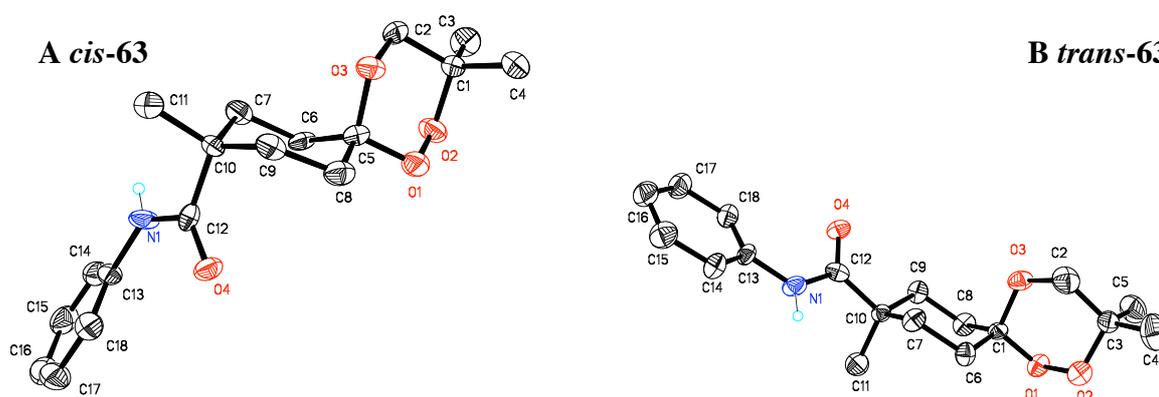


Figure 11 : Structures RX des amides **63** des deux composés isomères du 9'-méthyl-diméthyltrioxane.

Dans le trioxane *cis-63* (groupements amide et peroxyde en position du même côté du plan moyen du cyclohexyle, figure 11A), l'amide est en position axiale et le peroxyde en position équatoriale. Dans le trioxane *trans-63* (figure 11B), l'amide et le peroxyde sont tous les deux en position équatoriale, de part et d'autre du plan moyen du cyclohexane. En ¹H-RMN, le déplacement chimique du méthyle de chacun des amides est à 1,28 et 1,30 ppm pour le *trans-63* et le *cis-63* respectivement, à 293 K dans CDCl₃.

Une fois cette caractérisation effectuée, le seul déplacement chimique du méthyle en C9 permet d'identifier la stéréochimie *cis* ou *trans* du trioxane correspondant (figure 12).

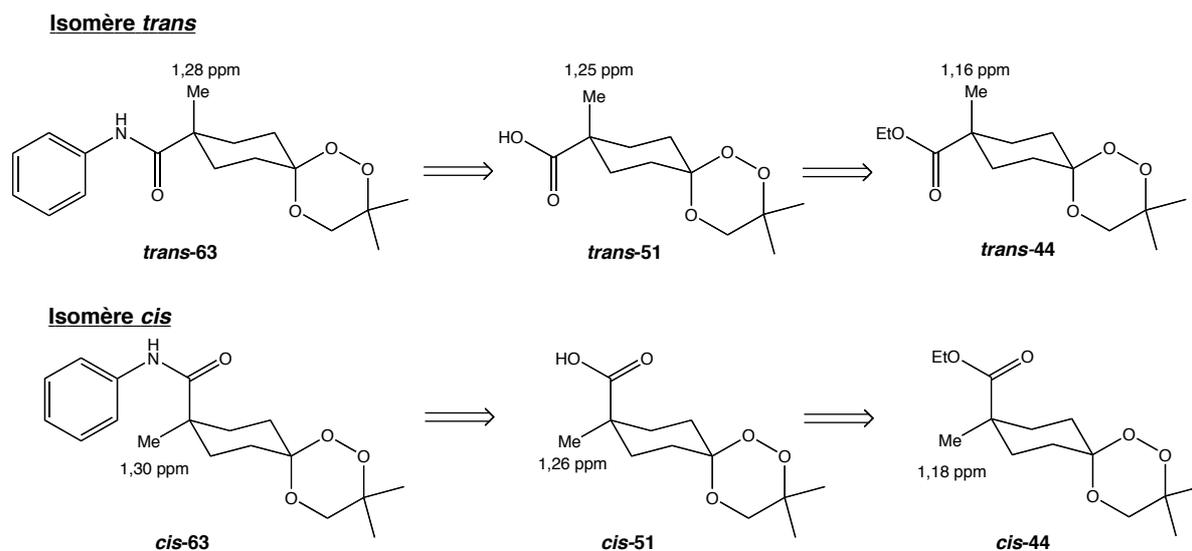


Figure 12 : Attribution des déplacements chimiques des groupements méthyles à 293 K, dans CDCl_3 en fonction de la position relative des substituants.

II.2 – Séparation des isomères *cis* et *trans* du 9'H-diméthyltrioxane **41**

Selon le même schéma de séparation que pour le 9'Me-diméthyltrioxane **44**, nous avons réussi à séparer les deux composés isomères du 9'H-diméthyltrioxane **41** dans les mêmes conditions, sur une colonne d'alumine basique 90, avec une élution identique. La proportion des deux isomères a été mesurée par la double intégration (quadruplet et triplet du groupement éthylcarboxylate) permettant ainsi de confirmer les rapports obtenus. Le premier isomère a un triplet à 1,25 ppm et un quadruplet à 4,13 ppm. Le second isomère a le triplet à 1,24 ppm et le triplet à 4,11 ppm.

Ainsi, chacun des composés isomères peut être caractérisé par le déplacement chimique du quadruplet et du triplet. Par une stratégie analogue à celle décrite précédemment, la saponification de la fonction ester, suivie de la dérivatisation de l'acide obtenu en amide avec l'aniline permettrait de réaliser la corrélation déplacement chimique/position relative des substituants, via l'obtention de cristaux.

III – COUPLAGE DES STÉRÉOISOMÈRES DU TRIOXAQUANTEL 53

Disposant de chacun des énantiomères (11b*R*) et (11b*S*) de la praziquanamine **2** et de chacun des isomères (*cis* et *trans*) du 9'-Me-diméthyltrioxane **44** et en utilisant les conditions de couplage, PyBOP, NMM, DMF, mises au point précédemment, il nous est alors possible de synthétiser chacun des stéréoisomères du 9'-Me-trioxaquantel **53**.

La réaction à température ambiante permet d'isoler les produits avec des rendements de 42 à 70% après une purification par colonne et une précipitation dans un mélange DCM/hexane. Comme attendu, les spectres RMN sont identiques deux à deux : (*R, cis*)-**53** identique au (*S, cis*)-**53** et le (*R, trans*)-**53** identique au (*S, trans*)-**53**. Les pouvoirs rotatoires sont en sens inverses 2 à 2 ce qui correspond bien à la synthèse de deux fois deux énantiomères énantiopurs : $[\alpha]_D = -95$ pour (*R, trans*)-**53**, $[\alpha]_D = +90$ pour (*S, trans*)-**53** et $[\alpha]_D = -100$ pour (*R, cis*)-**53**, $[\alpha]_D = +96$ pour (*S, cis*)-**53**.

Les diastéréoisomères sont facilement caractérisables en ¹H-RMN à 293K, dans CDCl₃ pour les analyses de routine. Les énantiomères (*R,trans*)-**53** et (*S,trans*)-**53** ont un singulet à 1,31 ppm pour le méthyle H₃C13' angulaire et un doublet à 3,99 pour un proton H3 du système AB avec une constante ²*J* de 17,8 Hz. De même, les énantiomères (*R,cis*)-**53** et (*S,cis*)-**53** ont un singulet à 1,34 ppm pour le méthyl H₃C13' angulaire et un doublet à 3,96 pour un proton H3 du système AB avec une constante ²*J* de 17,9 Hz. L'analyse ¹H-RMN effectuée à 273 K révèle des différences caractéristiques notamment pour les protons aromatiques. Les énantiomères (*R,trans*)-**53** et (*S,trans*)-**53** ont un doublet (³*J* = 7,5 Hz) à 7,22 ppm pour le proton H8 et un massif pour les protons H9, H10 et H11 (de 7,29 à 7,23 ppm). Les spectres des énantiomères (*R,cis*)-**53** et (*S,cis*)-**53** présentent un doublet à 7,32 ppm (³*J* = 7,2 Hz) pour le proton H11, un doublet à 7,22 ppm (³*J* = 7,6 Hz) pour le proton H8 et un massif pour les protons H9 et H10 (de 7,30 à 7,27 ppm).

Ces différences de déplacement chimique permettent de caractériser avec précision la stéréochimie *cis* ou *trans* du trioxaquantel **53**. Le signe du pouvoir rotatoire précise quant à lui la configuration du carbone C11b. Les trioxaquantels (*R,trans*)-**53** et (*R,cis*)-**53** ont des pouvoirs rotatoires négatifs alors que les trioxaquantels (*S,trans*)-**53** et (*S,cis*)-**53** ont des pouvoirs rotatoires positifs.

Le chapitre suivant présente les résultats des premières évaluations biologiques *in vivo* des trioxaquantels 9'-H-**43**, 9'-Me-**53**, et 9'-F-**54** (mélange des deux diastéréoisomères

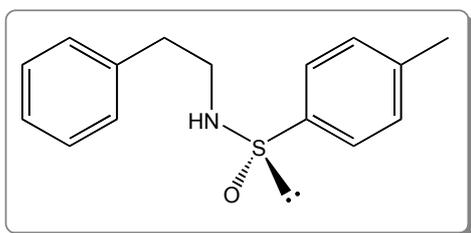
racémiques) et des stéréoisomères (*R,trans*)-**53**, (*R,cis*)-**53**, en comparaison avec le praziquantel et l'artéméter.

IV – PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel et méthodes

Résonance magnétique nucléaire : RMN ¹H et ¹³C : Bruker AM250, DRX500 ; RMN ¹⁹F : Bruker AC200, DRX400. *Spectrométrie de masse* : Nemag R10-10H (DCI/NH₃) ; API 365 Sciex Perkin Elmer (ES). *Diffraction rayons X* : Diffractomètre Bruker-AXS CDD 1000. *Point de fusion* : Electrothermal Digital melting point apparatus. *Chromatographie* : silice 60 Merck (70–230 mesh) ; alumine basique 90 Merck (63-200 μm). *Chromatographie sur couche mince* : feuilles d'aluminium recouverte d'un gel de silice 60 F₂₅₄ Merck. *Révélation* : fluorescence UV (λ = 254 nm) ou par une solution d'acide phosphomolybdique (5 g d'acide phosphomolybdique + 2 mL d'acide sulfurique dans 20 mL d'éthanol à 95%) chauffée à 150°C

4-méthyl-N-(2-phényléthyl)benzènesulfonamide (S) 55



Sous argon, on dissout la phényléthylamine (213 μL, 1,7 mmol, 1 eq) dans du THF fraîchement distillé (17 mL). À -78°C, on ajoute le butyllithium en solution 1,6 M dans l'hexane (1,16 mL, 1,87 mmol, 1,1 eq). On laisse remonter à TA. Parallèlement, on dissout le réactif d'Andersen (*R*) (500 mg, 1,7 mmol, 1 eq) dans du THF fraîchement distillé (1 mL) et l'on ajoute par canule la solution de lithien. On agite 3 heures, à TA. La réaction est quenchée par une solution aqueuse de Na₂HPO₄ 1M (50 mL). On dilue avec de l'eau (15 mL) et la phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 25 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier et concentrées. L'huile résiduelle est chromatographiée sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant DCM/MeOH, 98/2, v/v). Le produit est précipité dans DCM/hexane. On obtient 348 mg d'une poudre blanche (Rdt = 79%).

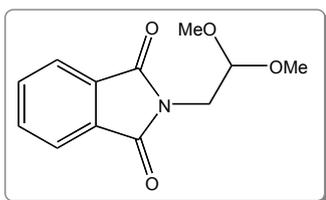
CCM : R_f = 0,75 (DCM/MeOH/NEt₃, 90/10/0,5, v/v/v).

ES-MS⁺ (MeOH) : 260,1 (100) [M+H]⁺, 282,2 (49) [M+Na]⁺.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 7,53 (d, ³J = 8,2 Hz, 2H, =CH-C(SO)), 7,27 (d, ³J = 8,2 Hz, 2H, =CH-C(CH₃)), 7,24-6,84 (m, 5H, phényl), 4,02 (t large, ³J = 5,6 Hz, 1H, NH), 3,36 (m, 1H, CHHNH), 3,07 (m, 1H, CHHNH), 2,78 (t, ³J = 6,9 Hz, 2H, φ-CH₂).

[α]_D = -70 (c = 0,04, DCM) Ref ([α]_D = -63,1 (c = 0,5, acétone) [1]

2-(2,2-diméthoxyéthyl)-1H-isoindole-1,3-(2H)-dione 56



L'acétamide (2,60 g, 44 mmol, 8 eq), le phtalimide de potassium (1,02 g, 5,5 mmol, 1 eq) et l'iodure de potassium (750 mg, 4,5 mmol, 0,8 eq) sont agités sous argon à 110°C.

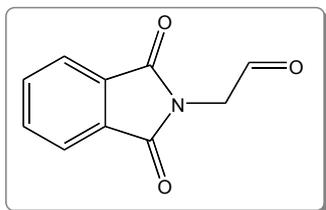
Quand on a une suspension, on ajoute le bromoacétaldéhyde diméthoxyacétal (843 µL, 7,14 mmol, 1,3 eq). On agite 40 minutes à 110°C puis 2h45 à 140°C. On laisse revenir à TA, on ajoute de l'eau (5 mL), on filtre sur fritté. On obtient 1,3 g d'une poudre blanche (Rdt = quantitatif).

CCM : R_f = 0,75 (hexane/AcOEt, 50/50, v/v).

ES-MS⁺ (MeOH) : 204,2 (43) [M-OMe]⁺, 236,2 (6) [M+H]⁺, 258,2 (100) [M+Na]⁺, 274,3 (4) [M+K]⁺, 493,5 (29) [2M+Na]⁺.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 7,89-7,83 (m, 2H, H_{aromatique}), 7,77-7,68 (m, 2H, H_{aromatique}), 4,77 (t, ³J = 5,8 Hz, 1H, CH(OMe)₂), 3,83 (d, ³J = 5,8 Hz, 2H, CH₂), 3,38 (s, 6H, 2 x OCH₃).

(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)acétaldéhyde 58



La 2-(2,2-diméthoxyéthyl)-1H-isoindole-1,3-(2H)-dione **56** (1,3 g, 5,5 mmol, 1 eq) est dissoute dans le DCM (5 mL) sous argon.

On ajoute du TFA (5 mL, 66 mmol, 12 eq) et l'on agite à TA pendant 2,5 heures. La solution est neutralisée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (20 mL). La phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 20 mL) ; les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier et concentrées. L'huile rouge résiduelle est purifiée par chromatographie sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant hexane/AcOEt, 60/40, v/v). On obtient 820 mg d'une poudre blanche (Rdt = 79%).

CCM : R_f = 0,44 (hexane/AcOEt, 50/50, v/v).

DCI/NH₃ : 189 (7) [M]⁺, 207 (100) [M + NH₄]⁺, 224 (8) [M + NH₃ + NH₄]⁺.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 9,66 (s, 1H, H_{aldéhyde}), 7,94-7,87 (m, 2H, H_{aromatique} en α du CO), 7,77-7,73 (m, 2H, H_{aromatique} en β du CO), 4,57 (s, 2H, CH₂).

HPLC des sels chiraux de la praziquanamine

Colonne N10C18 25QS – Modulo Cart Nucléosil

Détection 254 nm

Éluant : (A) = CH₃CN

(B) = H₂O

Élution : A/B de 15/85, v/v à 40/60, v/v en 15 minutes puis 40/60, v/v pendant 10 minutes. 1 pic large à 17,7 min quel que soit le contre ion chiral.

Chromatographie sur colonne chirale Chiralcel OD

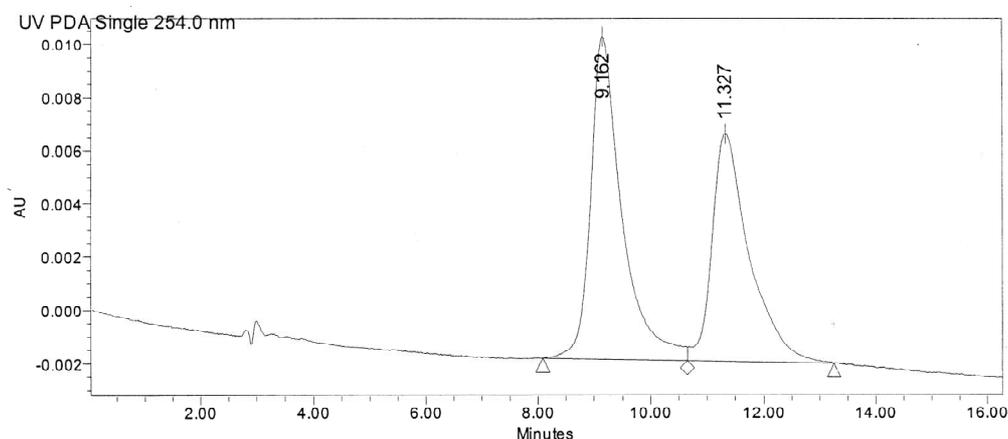
Colonne Chiralcel OD – 250 x 4,6 mm

Détection 254 nm

Débit 1 mL/min

Cas du praziquantel 1

Éluant : hexane/*iso*-propanol, 70/30, v/v.

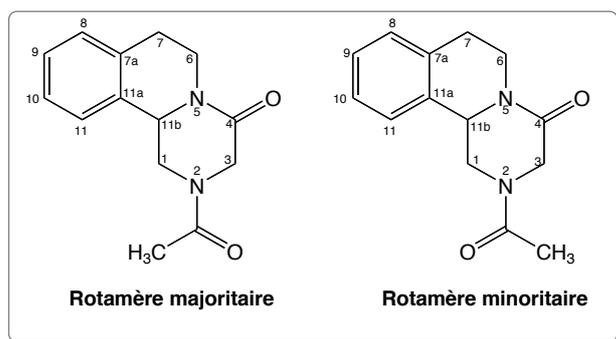


2 pics à 9,16 et 11,3 min.

Cas de la praziquanamine 2

Éluant : hexane/*iso*-propanol/DEA, 80/20/0,1, v/v/v.

1 pic large à 13,9 min.

2-acétyl-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléin-4-one 59

La 4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine **2** (500 mg, 2,48 mmol, 1 eq) est dissoute dans du chloroforme (5 mL) et l'on ajoute de l'anhydride acétique (2,3 mL, 24,8 mmol, 10 eq). Le mélange est agité à température ambiante pendant 8 heures. Les solvants

sont évaporés et le brut réactionnel est chromatographié sur une colonne de silice 60 Merck (70 - 230 mesh), (éluant DCM/MeOH, gradient de 100/0, v/v à 93/7, v/v). On obtient 675 mg d'une poudre beige (Rdt = quant).

CCM : $R_f = 0,63$ (DCM/MeOH, 90/10, v/v).

DCI/NH₃ : 245,3 (3) [M+H]⁺, 262,2 (100) [M+NH₄]⁺, 279,3 (6) [M+NH₄+NH₃]⁺.

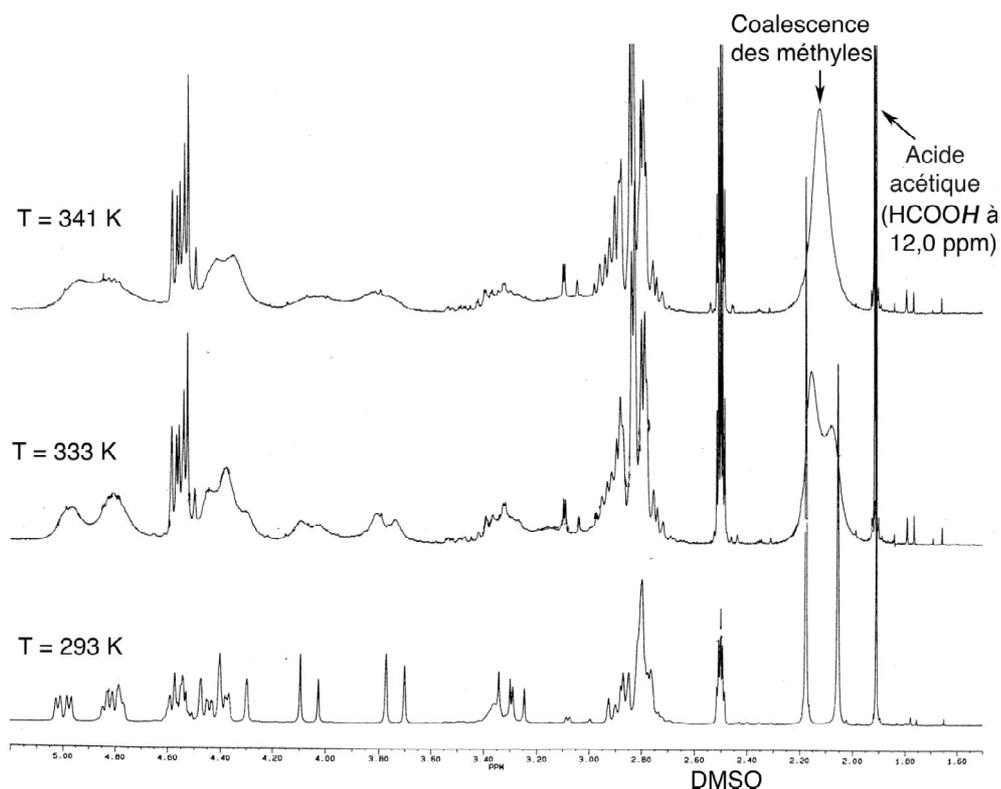
Rotamère majoritaire :

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆, 293 K) δ (ppm) 7,46 (d, ³*J* = 5 Hz, 1H, HC11), 7,31-7,20 (m, 3H, HC8, HC9 et HC10), 5,00 (dd, ³*J* = 10,0 Hz, ³*J* = 5,0 Hz, 1H, HC11b), 4,56 (m, 1H, HC6), 4,44 (d, ²*J* = 20,0 Hz, 1H, HC3), 4,42 (dd, ²*J* = 16,5 Hz, ³*J* = 5,0 Hz, 1H, HC1), 3,75 (d, ²*J* = 20,0 Hz, 1H, HC3), 3,30 (dd, ²*J* = 16,5 Hz, ³*J* = 10,0 Hz, 1H, HC1), 2,87-2,80 (m, 2H, H₂C7), 2,85 (m, 1H, HC6), 2,17 (s, 3H, CH₃).

Rotamère minoritaire :

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆, 293 K) δ (ppm) 7,28 (m, 1H, HC11), 7,31-7,20 (m, 3H, HC8, HC9 et HC10), 4,81 (m, 1H, HC1), 4,80 (m, 1H, HC11b), 4,56 (m, 1H, HC6), 4,33 (d, ²*J* = 18,5 Hz, 1H, HC3), 4,07 (d, ²*J* = 18,5 Hz, 1H, HC3), 2,89 (m, 1H, HC1), 2,87-2,80 (m, 2H, H₂C7), 2,85 (m, 1H, HC6), 2,06 (s, 3H, CH₃).

Coalescence des singulets attribués au groupement méthyle : DMSO-*d*₆, 250 MHz.

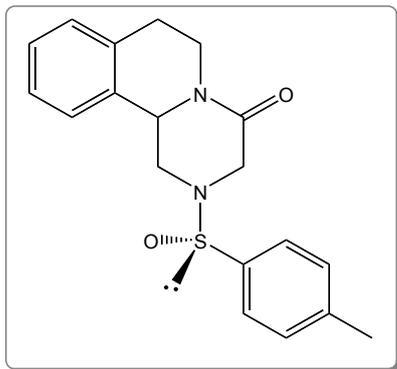


Partie expérimentale de la résolution enzymatique

- Lipase *Pseudomonas cepacia* : PSL Fluka 40 unités/mg.
- Lipase *Candida antarctica B* : CALB
Recombinant from *Aspergillus oryzae* Fluka 11 unités/mg.
- Porcine pancreatic lipase : PPL Sigma, Type II.
- Lipase *Candida cylindracea* : CCL Fluka 25 unités/mg.

La praziquanamine **2** et l'enzyme sont dissoutes dans le solvant choisi (DIPE, THF, DMSO/H₂O, CHCl₃, AcOEt). On ajoute alors l'agent d'acétylation (AcOEt, Ac₂O, acétate d'*iso*-propényle, acétate de vinyle). Le mélange est agité à température ambiante pendant 3 à 6 heures. Les milieux hétérogènes sont centrifugés ; le surnageant est évaporé, séché sous vide et analysé par ¹H-RMN. Les milieux homogènes sont extraits au DCM, séchés sur MgSO₄, centrifugés. Le surnageant est évaporé, séché sous vide et analysé par ¹H-RMN.

2[(4-méthylphényl)-(R)-sulfinyl]1,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléin-4-one 60



Sous argon, on dissout la 4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine **2** (100 mg, 0,5 mmol, 1 eq) dans du THF fraîchement distillé (5 mL). La solution est refroidie à -78°C et on ajoute une solution de butyllithium 1,6 M dans l'hexane (344 μL , 0,55 mmol, 1,1 eq). On laisse revenir à TA et la solution est ajoutée à l'aide d'une canule au réactif d'Andersen (*R*) (147 mg, 0,5 mmol, 1 eq) dans du THF fraîchement distillé (0,5 mL). Le mélange est agité à TA, pendant trois heures. On ajoute une solution aqueuse de Na_2HPO_4 1M (15 mL) ; on dilue à l'eau (15 mL) et au DCM (15 mL). La phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 15 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO_4 , filtrées sur papier et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant hexane/ AcOEt , gradient de 100/0, v/v à 50/50, v/v). On obtient 15 mg d'un verre jaune (e.d. = 97%, Rdt = 10%).

CCM : $R_{f\text{moyen}} = 0,53$ (hexane/ AcOEt , 50/50, v/v).

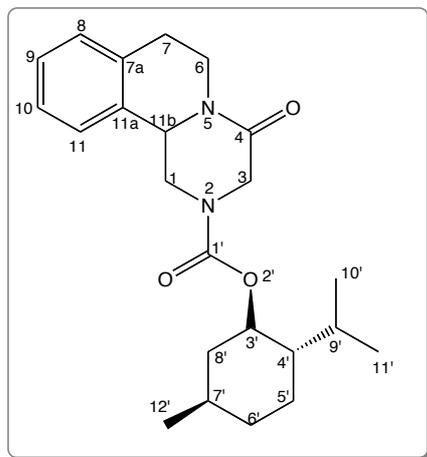
DCI/ NH_3 : 325 (100) $[\text{M} - \text{O} + \text{H}]^+$, 342 (38) $[\text{M} - \text{O} + \text{NH}_4]^+$, 358 (7) $[\text{M} + \text{H}]^+$.

^1H -RMN (250 MHz, CDCl_3 , 293 K) δ (ppm) 7,43 (d, $^2J = 8,1$ Hz, 2H, $=\text{CH}-\text{CSO}_2$), 7,25-7,04 (m, 6H, $\text{H}_{\text{phényl}} + 2 \times =\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)$), 4,96 (dd, $J = 10,2$ Hz, $J = 4,4$ Hz, 1H), 4,80 (m, 1H), 3,91-3,75 (m, 1H), 3,83 (AB, $^2J = 16,6$ Hz, 1H, HC3), 3,43 (AB, $^2J = 16,6$ Hz, 1H, HC3), 2,86-2,67 (m, 4H), 2,34 (s, 3H, $\text{CH}_3_{\text{tolyl}}$).

$[\alpha]_{\text{D}} = -16$ ($c = 2,5 \cdot 10^{-3}$, DCM)

À noter : un seuls des deux énantiomères a été obtenu suffisamment propres pour pouvoir être caractérisé.

(1R,2S,5R)-5-méthyl-2-(1-méthyléthyl)-cyclohexyl-4-oxo-1,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine-2-carboxylate 61



Sous argon, on dissout la 4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine **2** (50 mg, 248 μmol , 1 eq), la triéthylamine (38 μL , 495 μmol , 2 eq), dans du THF (1,3 mL). On refroidit à 0°C, on ajoute le (-)-menthylchloroformate (105 μL , 495 μmol , 2 eq) et l'on agite la pâte, à température ambiante pendant 1 heure. On dilue avec de l'eau (10 mL) et du dichlorométhane (10 mL). La phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 20 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO_4 ,

filtrées sur papier et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant éther diéthylique en isocratique). On obtient 91 mg (Rdt quantitatif) d'un mélange des diastéréoisomères sous la forme d'une mousse blanche.

CCM : R_f moyen = 0,57 (100 % Et_2O).

P_f = 70-73°C.

UV-vis (DCM) : λ_{max} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) : 262 (420).

DCI/ NH_3 : 385 (40) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 402 (100) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

Stéréoisomère majoritaire 1

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3 , 273 K) δ (ppm) 7,30 (m, 1H, HC10), 7,29 (m, 1H, HC11), 7,28 (m, 1H, HC9), 7,22 (m, 1H, HC8), 4,91 (m, 1H, HC11b), 4,89 (m, 1H, HC6), 4,78 (m, 1H, HC1), 4,62 (m, 1H, HC3'), 4,57 (d, $^2J = 17,6$ Hz, 1H, HC3), 3,92 (d, $^2J = 17,6$ Hz, 1H, HC3), 3,00 (m, 1H, HC7), 2,95 (m, 1H, HC1), 2,91 (m, 1H, HC6), 2,81 (m, 1H, HC7), 2,10 (m, 1H, HC8'), 1,93 (m, 1H, HC9'), 1,70 (m, 2H, HC5' et HC6'), 1,52 (m, 1H, HC7'), 1,40 (m, 1H, HC4'), 1,07 (m, 1H, HC5'), 1,00 (m, 1H, HC8'), 0,93 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}12'$), 0,92 (m, 3H, $\text{H}_3\text{C}11'$), 0,89 (m, 1H, HC6'), 0,79 (d, $^3J = 7,1$ Hz, 3H, $\text{H}_3\text{C}10'$).

^{13}C -RMN (126 MHz, CDCl_3 , 273 K) δ (ppm) 65,1 (C4), 157,4 (C1'), 139,9 (C7a), 132,6 (C11a), 129,4 (C8), 127,5 (C9), 127,0 (C10), 125,6 (C11), 76,2 (C3'), 55,3 (C11b), 47,5 (C3), 47,2 (C4'), 46,9 (C1), 41,3 (C8'), 38,8 (C6), 34,2 (C6'), 31,4 (C7'), 28,8 (C7), 26,2 (C9'), 23,3 (C5'), 22,2 (C12'), 21,0 (C11'), 16,4 (C10').

Stéréoisomère majoritaire 2

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 273 K) δ (ppm) 7,30 (m, 1H, HC10), 7,29 (m, 1H, HC11), 7,28 (m, 1H, HC9), 7,22 (m, 1H, HC8), 4,91 (m, 1H, HC11b), 4,89 (m, 1H, HC6), 4,78 (m, 1H, HC1), 4,62 (m, 1H, HC3'), 4,58 (d, ²J = 17,6 Hz, 1H, HC3), 3,93 (d, ²J = 17,6 Hz, 1H, HC3), 3,00 (m, 1H, HC7), 2,95 (m, 1H, HC1), 2,91 (m, 1H, HC6), 2,81 (m, 1H, HC7), 2,10 (m, 1H, HC8'), 1,93 (m, 1H, HC9'), 1,70 (m, 2H, HC5' et HC6'), 1,52 (m, 1H, HC7'), 1,40 (m, 1H, HC4'), 1,07 (m, 1H, HC5'), 1,00 (m, 1H, HC8'), 0,93 (s, 3H, H₃C12'), 0,91 (m, 3H, H₃C11'), 0,89 (m, 1H, HC6'), 0,78 (d, ³J = 7,1 Hz, 3H, H₃C10').

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 273 K) δ (ppm) 165,1 (C4), 154,6 (C1'), 134,9 (C7a), 132,6 (C11a), 129,4 (C8), 127,5 (C9), 127,0 (C10), 125,6 (C11), 76,1 (C3'), 55,3 (C11b), 47,4 (C3), 47,2 (C4'), 46,8 (C1), 41,3 (C8'), 38,8 (C6), 34,1 (C6'), 31,4 (C7'), 28,8 (C7), 26,2 (C9'), 23,1 (C5'), 22,2 (C12'), 20,9 (C11'), 16,3 (C10').

Stéréoisomère minoritaire 1

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 273 K) δ (ppm) 7,32 (m, 1H, HC10), 7,27 (m, 1H, HC9), 7,22 (m, 2H, HC8 et HC11), 4,83 (m, 1H, HC11b), 4,89 (m, 1H, HC6), 4,85 (m, 1H, HC1), 4,62 (m, 1H, HC3'), 4,58 (d, ²J = 17,6 Hz, 1H, HC3), 3,94 (d, ²J = 17,6 Hz, 1H, HC3), 3,07 (m, 1H, HC1), 3,00 (m, 1H, HC7), 2,91 (m, 1H, HC6), 2,81 (m, 1H, HC7), 2,11 (m, 1H, HC8'), 1,98 (m, 1H, HC9'), 1,72 (m, 1H, HC5'), 1,70 (m, 1H, HC6'), 1,52 (m, 1H, HC7'), 1,49 (m, 1H, HC4'), 1,12 (m, 1H, HC5'), 1,03 (m, 1H, HC8'), 0,97 (d, ³J = 7,0 Hz, 3H, H₃C11'), 0,93 (s, 3H, H₃C12'), 0,89 (m, 1H, HC6'), 0,86 (d, ³J = 7,0 Hz, 3H, H₃C10').

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 273 K) δ (ppm) 165,5 (C4), 154,4 (C1'), 135,3 (C7a), 132,5 (C11a), 129,6 (C8), 127,5 (C9), 126,9 (C10), 125,4 (C11), 76,2 (C3'), 55,6 (C11b), 47,7 (C3), 47,6 (C1), 47,3 (C4'), 41,6 (C8'), 38,8 (C6), 34,2 (C6'), 31,4 (C7'), 28,8 (C7), 27,0 (C9'), 23,8 (C5'), 22,2 (C12'), 20,8 (C11'), 17,0 (C10').

Stéréoisomère minoritaire 2

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 273 K) δ (ppm) 7,32 (m, 1H, HC10), 7,27 (m, 1H, HC9), 7,22 (m, 1H, HC8), 7,17 (m, 1H, HC11), 4,83 (m, 1H, HC11b), 4,89 (m, 1H, HC6), 4,85 (m, 1H, HC1), 4,62 (m, 1H, HC3'), 4,58 (d, ²J = 17,6 Hz, 1H, HC3), 3,94 (d, ²J = 17,6 Hz, 1H, HC3), 3,07 (m, 1H, HC1), 3,00 (m, 1H, HC7), 2,91 (m, 1H, HC6), 2,81 (m, 1H, HC7), 2,11 (m, 1H, HC8'), 1,93 (m, 1H, HC9'), 1,70 (m, 2H, HC5' et HC6'), 1,52 (m, 1H, HC7'), 1,49 (m, 1H, HC4'), 1,07 (m, 1H, HC5'), 1,03 (m, 1H, HC8'), 0,93 (s, 3H, H₃C12'), 0,92 (m, 3H, H₃C11'), 0,89 (m, 1H, HC6'), 0,79 (d, ³J = 7,0 Hz, 3H, H₃C10').

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 273 K) δ (ppm) 165,5 (C4), 154,3 (C1'), 135,3 (C7a), 132,5 (C11a), 129,6 (C8), 127,5 (C9), 126,9 (C10), 125,3 (C11), 76,2 (C3'), 55,6 (C11b), 47,6 (C3), 47,6 (C1), 47,3 (C4'), 41,6 (C8'), 38,8 (C6), 34,2 (C6'), 31,4 (C7'), 28,8 (C7), 26,3 (C9'), 23,4 (C5'), 22,2 (C12'), 21,0 (C11'), 16,5 (C10').

Analyse HPLC :

Colonne N10 C18 25QS – Modulo Cart Nucléosil – 250 x 4,6 mm

Détection : 262 nm

Débit : 1 mL/min

Éluant : CH₃CN/H₂O, 65/35, v/v

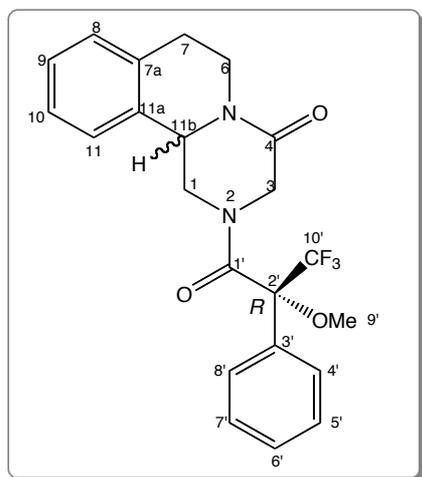
1 pic à 27,0 min.

4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine 2 par hydrolyse du carbamate **61**

Le (1*R*,2*S*,5*R*)-5-méthyl-2-(1-méthyléthyl)-cyclohexyl-4-oxo-1,3,6,7,11b-hexahydro-4*H*-pyrazino[2,1-*a*]isoquinoléine-2-carboxylate **61** (30 mg, 78 μmol) est dissous dans de l'acide sulfurique à 97% (1 mL). Le mélange est agité à température ambiante pendant trois heures. On refroidit à TA puis à 0°C et le mélange est versé sur une solution eau/glace (10 mL). Le pH est ajusté à 12 avec une solution aqueuse de soude (4,4 M). La phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 5 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄, filtrées sur papier et concentrées. On obtient 12 mg (Rdt = 95%) d'une poudre blanche, correspondant au composé **2**.

Toutes les caractérisations (RMN, SM, P_f, R_p, etc.) sont données page 129.

2[(2*R*)-3,3,3-trifluoro-2-(méthoxy)-2-phénylpropanoyl]1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4*H*-pyrazino[2,1-*a*]isoquinoléin-4one 62



Sous argon, on dissout la 4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4*H*-pyrazino[2,1-*a*]isoquinoléine **2** (300 mg, 1,49 mmol, 1 eq), l'acide (*R*) de Mosher (348 mg, 1,49 mmol, 1 eq), le PyBOP (927 mg, 1,78 mmol, 1,2 eq) et la NMM (815 μL, 7,43 mmol, 5 eq) dans du DMSO (5 mL) et l'on agite 22 heures à température ambiante. On ajoute une solution saturée aqueuse de NaHCO₃ (20 mL) et du DCM (20 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau (3 x 20 mL), séchée sur MgSO₄, filtrée sur papier et concentrée.

Le résidu est chromatographié sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant éther diéthylique en isocratique). On obtient 440 mg (Rdt = 71%) d'un mélange des diastéréoisomères sous la forme d'une poudre blanche.

CCM : R_f moyen = 0,35 (100 % Et₂O).

P_f = 158-159°C.

UV-vis (DCM) : λ_{\max} , nm (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) : 262 (630).

DCI/NH₃ : 419,2 (7) [M+H]⁺, 436,2 (100) [M+NH₄]⁺.

La séparation des diastéréoisomères est réalisée par chromatographie sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh), 1,2 x 35 cm : dépôt de 100 mg du mélange des deux diastéréoisomères, éluant Et₂O en isocratique.

Diastéréoisomère (11bR, 2'R)-62 :

$[\alpha]_D = -25$ (c = 5.10⁻³, DCM) pour un e.d. > 97% (déterminé par RMN).

CCM : R_f = 0,41 (100 % Et₂O).

Rotamère majoritaire :

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 7,57 (m, 2H, HC4' et HC8'), 7,43 (m, 3H, HC5', HC6' et HC7'), 7,33 (m, 1H, HC11), 7,32 (m, 1H, HC10), 7,28 (m, 1H, HC9), 7,18 (m, 1H, HC8), 5,10 (dd, ²J = 15,0 Hz, ³J = 5,0 Hz, 1H, HC1), 4,84 (dd, ³J = 10,0 Hz, ³J = 5,0 Hz, 1H, HC11b), 4,60 (dt, ²J = 18,0 Hz, ³J = 5,0 Hz, 1H, HC6), 4,22 (dd, ²J = 18,0 Hz, J = 3,7 Hz, 1H, HC3), 3,96 (dd, ²J = 18,0 Hz, J = 3,7 Hz, 1H, HC3), 3,65 (d, ⁵J_{HF} = 1,3 Hz, 3H, OCH₃), 3,11 (dd, ²J = 15,0 Hz, ³J = 10,0 Hz, 1H, HC1), 2,93 (m, 1H, HC7), 2,76 (m, 1H, HC6), 2,74 (m, 1H, HC7).

¹⁹F-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, 333 K) δ (ref : trifluoroéthanol, ppm), - 69,8 (s, 60%).

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 164,9 (C1'), 163,4 (C4), 134,9 (C7a), 132,9 (C3'), 132,3 (C11a), 130,2 (C6'), 129,4 (C8), 128,7 (C7' et C5'), 127,7 (C9), 127,0 (C10), 126,3 (C4' et C8'), 125,4 (C11), 123,3 (CF₃), 84,6 (C2'), 55,5 (OCH₃), 54,4 (C11b), 48,8 (C3), 46,3 (C1), 39,0 (C6), 28,6 (C7).

Rotamère minoritaire :

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 7,55 (m, 2H, HC4' et HC8'), 7,42 (m, 2H, HC5' et HC7'), 7,41 (m, 1H, HC6'), 7,23 (m, 2H, HC9 et HC10), 7,15 (m, 1H, HC8), 6,89 (m, 1H, HC11), 4,91 (d, ²J = 18,0 Hz, 1H, HC3), 4,88 (ddd, ²J = 15,0 Hz, ³J = 5,0 Hz, ³J = 3 Hz, 1H, HC6), 4,86 (m, 1H, HC11b), 4,52 (dd, ²J = 15,0 Hz, ³J = 5,0 Hz, 1H, HC1), 3,90 (d, ⁵J_{HF} = 1,3 Hz, 3H, OCH₃), 3,87 (d, ²J = 18,0 Hz, 1H, HC3), 2,86 (m, 1H, HC7), 2,84 (m, 1H, HC6), 2,74 (m, 1H, HC7), 2,37 (dd, ²J = 15,0 Hz, ³J = 10,0 Hz, 1H, HC1).

¹⁹F-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, 333 K) δ (ref : trifluoroéthanol, ppm), - 69,3 (s, 40%).

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 164,3 (C1'), 164,2 (C4), 135,1 (C7a), 133,4 (C3'), 131,7 (C11a), 129,8 (C6'), 129,5 (C8), 128,8 (C7' et C5'), 127,6 (C9), 127,0 (C10), 126,2 (C4' et C8'), 125,0 (C11), 123,2 (CF₃), 84,9 (C2'), 56,6 (OCH₃), 55,4 (C11b), 49,4 (C1), 47,1 (C3), 38,5 (C6), 28,7 (C7).

Diffraction aux rayons X :

Système cristallin	Orthorhombique	
Groupe spatial	P2(1)2(1)2(1)	
Paramètres de la maille	a = 8,2483(10) Å	$\alpha = 90^\circ$
	b = 10,5617(13) Å	$\beta = 90^\circ$
	c = 22,197(3) Å	$\gamma = 90^\circ$
Volume	1933,7(4) Å ³	
Z	4	
Réflexions collectées	8644	
Données / paramètres	2747 / 272	
Indices R finaux ($I > 2\sigma(I)$)	$R_1 = 0,0473$	
Indices R (toutes les données)	$wR_2 = 0,0672$	

Longueur des liaisons (Å)

N(1)-C(12)	1.351(4)	C(7)-C(8)	1,391(5)
N(1)-C(1)	1.463(4)	C(8)-C(9)	1,519(4)
N(1)-C(9)	1.469(4)	C(9)-C(10)	1,516(4)
N(2)-C(13)	1.347(4)	C(11)-C(12)	1,514(5)
N(2)-C(11)	1.458(4)	C(13)-C(14)	1,554(5)
N(2)-C(10)	1.462(4)	C(14)-C(17)	1,528(4)
O(1)-C(12)	1.233(4)	C(14)-C(15)	1,534(5)
O(2)-C(13)	1.225(4)	C(15)-F(2)	1,337(4)
O(3)-C(14)	1.421(4)	C(15)-F(1)	1,345(4)
O(3)-C(16)	1.439(3)	C(15)-F(3)	1,345(4)
C(1)-C(2)	1.515(4)	C(17)-C(22)	1,382(4)
C(2)-C(3)	1.509(4)	C(17)-C(18)	1,387(4)
C(3)-C(8)	1.379(4)	C(18)-C(19)	1,397(4)
C(3)-C(4)	1.403(4)	C(19)-C(20)	1,367(5)
C(4)-C(5)	1.386(4)	C(20)-C(21)	1,373(5)
C(5)-C(6)	1.392(4)	C(21)-C(22)	1,385(5)
C(6)-C(7)	1.379(5)		

Angles entre les liaisons (°)

C(12)-N(1)-C(1)	119.9(3)	C(4)-C(5)-C(6)	119.7(4)	C(17)-C(14)-C(13)	110.4(3)
C(12)-N(1)-C(9)	123.8(3)	C(7)-C(8)-C(9)	118.1(3)	C(15)-C(14)-C(13)	110.4(3)
C(1)-N(1)-C(9)	115.8(3)	N(1)-C(9)-C(10)	108.4(3)	F(2)-C(15)-F(1)	106.7(3)
C(13)-N(2)-C(11)	118.5(3)	N(1)-C(9)-C(8)	111.9(3)	F(2)-C(15)-F(3)	107.5(3)
C(13)-N(2)-C(10)	127.7(3)	C(10)-C(9)-C(8)	109.7(3)	F(1)-C(15)-F(3)	105.6(3)
C(11)-N(2)-C(10)	113.3(3)	N(2)-C(10)-C(9)	109.3(3)	F(2)-C(15)-C(14)	112.4(3)
C(14)-O(3)-C(16)	117.4(3)	N(2)-C(11)-C(12)	115.0(3)	F(1)-C(15)-C(14)	110.0(3)
N(1)-C(1)-C(2)	109.6(3)	O(1)-C(12)-N(1)	123.7(4)	F(3)-C(15)-C(14)	114.1(3)
C(3)-C(2)-C(1)	111.0(3)	O(1)-C(12)-C(11)	117.0(3)	C(22)-C(17)-C(18)	119.3(3)
C(8)-C(3)-C(4)	118.8(3)	N(1)-C(12)-C(11)	119.2(3)	C(22)-C(17)-C(14)	120.3(3)
C(8)-C(3)-C(2)	121.2(3)	O(2)-C(13)-N(2)	122.3(3)	C(18)-C(17)-C(14)	120.4(3)
C(4)-C(3)-C(2)	119.9(3)	O(2)-C(13)-C(14)	120.3(3)	C(17)-C(18)-C(19)	118.8(3)
C(5)-C(4)-C(3)	121.1(4)	N(2)-C(13)-C(14)	117.4(3)		
C(7)-C(6)-C(5)	118.9(4)	O(3)-C(14)-C(17)	106.5(3)	C(20)-C(19)-C(18)	121.3(4)
C(6)-C(7)-C(8)	121.9(4)	O(3)-C(14)-C(15)	108.9(3)	C(19)-C(20)-C(21)	120.0(4)
C(3)-C(8)-C(7)	119.6(3)	C(17)-C(14)-C(15)	108.4(3)	C(20)-C(21)-C(22)	119.4(4)
C(3)-C(8)-C(9)	122.4(3)	O(3)-C(14)-C(13)	112.1(3)	C(17)-C(22)-C(21)	121.2(4)

Diastéréoisomère (11bS, 2'R)-62 :

$[\alpha]_D = +95$ ($c = 6 \cdot 10^{-3}$, DCM) pour un e.d. > 90 % (déterminé par RMN).

CCM : $R_f = 0,32$ (100 % Et₂O).

Rotamère majoritaire :

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 7,71 (d, ³J = 7,4 Hz, 2H, HC4' et HC8'), 7,55 (t, ³J = 7,4 Hz, 2H, HC5' et HC7'), 7,48 (tt, ³J = 7,4 Hz, ⁴J = 1,1 Hz, 1H, HC6'), 7,17 (m, 1H, HC9), 7,10 (m, 2H, HC8 et HC10), 6,00 (d, ²J = 7,5 Hz, 1H, HC11), 5,06 (d, ²J = 18,9 Hz, 1H, HC3), 4,89 (m, 1H, HC6), 4,54 (m, 1H, HC1), 3,88 (d, ²J = 18,9 Hz, 1H, HC3), 3,77 (d, ³J = 3,8 Hz, 1H, HC11b), 3,69 (d, ⁵J_{HF} = 1,4 Hz, 3H, OCH₃), 2,97 (dd, ²J = 13,7 Hz, ³J = 3,8 Hz, 1H, HC1), 2,84 (m, 1H, HC7), 2,64 (m, 1H, HC7), 2,61 (m, 1H, HC6).

¹⁹F-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆, 333 K) δ (ref : trifluoroéthanol, ppm), - 70,3 (s, 70%).

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 164,2 (C4), 164,1 (C1'), 135,0 (C7a), 134,0 (C3'), 131,4 (C11a), 130,2 (C6'), 129,4 (C8), 128,8 (C5' et C7'), 127,3 (C9), 126,9 (C4' et C8'), 126,7 (C10), 125,5 (C11), 123,4 (CF₃), 84,5 (C2'), 54,6 (OCH₃), 54,3 (C11b), 48,9 (C1), 46,3 (C3), 38,3 (C6), 28,8 (C7).

Rotamère minoritaire :

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 7,43 (m, 2H, HC4' et HC8'), 7,40 (m, 1H, HC6'), 7,37 (m, 2H, HC5' et HC7'), 7,35 (m, 1H, HC11), 7,32 (m, 1H, HC10), 7,29 (m, 1H, HC9), 7,20 (m, 1H, HC8), 5,15 (dd, ²J = 13,6 Hz, ³J = 4,2 Hz, 1H, HC1), 4,87 (m, 1H, HC11b), 4,78 (m, 1H, HC6), 4,54 (d, ²J = 18,0 Hz, 1H, HC3), 3,75 (d, ⁵J_{HF} = 1,4 Hz, 3H, OCH₃), 3,22 (d, ²J = 18,0 Hz, 1H, HC3), 3,10 (dd, ²J = 13,6 Hz, ³J = 4,2 Hz, 1H, HC1), 2,90 (m, 1H, HC7), 2,89 (m, 1H, HC6), 2,75 (m, 1H, HC7).

¹⁹F-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆, 333 K) δ (ref : trifluoroéthanol, ppm), - 70,0 (s, 30%).

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 164,2 (C1'), 163,6 (C4), 134,9 (C7a), 132,7 (C3'), 132,4 (C11a), 129,7 (C6'), 129,5 (C8), 128,7 (C5' et C7'), 127,7 (C9), 127,1 (C10), 126,6 (C4' et C8'), 125,4 (C11), 123,5 (CF₃), 84,7 (C2'), 55,6 (OCH₃), 55,3 (C11b), 48,6 (C1), 45,5 (C1), 39,4 (C6), 28,6 (C7).

(11bR)-4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine (11bR)-2

La 2[(1*R*)-3,3,3-trifluoro-2-méthoxy-2-phénylpropanoyl](11*bR*)-1,2,3,6,7,11*b*-hétéro-4*H*-pyrazino[2,1-*a*]isoquinoléin-4-one **62** avec un e.d. > 95% (180 mg, 430 μmol, 1eq) est dissoute dans H₃PO₄ (3 mL) et agité à 100°C pendant 3,5 jours. La solution est refroidie à TA puis à 0°C, versée sur un mélange H₂O/glace (30 mL) et le pH est ajusté à 12 avec une solution aqueuse de soude 4,4 M. La phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 15 mL) ; les phases organiques sont réunies séchées sur MgSO₄ filtrées sur papier et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant DCM/MeOH, gradient de 100/0, v/v à 90/10, v/v). On obtient 61 mg d'une poudre blanche (Rdt = 70%) correspondant à la (11*bR*)-praziquanamine **2**.

Toutes les caractérisations (RMN, SM, P_f, R_p, etc.) sont données page 129.

$[\alpha]_D = -152$ ($c = 4,0 \cdot 10^{-3}$, DCM), (e.e. > 95%, déduit à partir de l'excès diastéréoisomérique du précurseur).

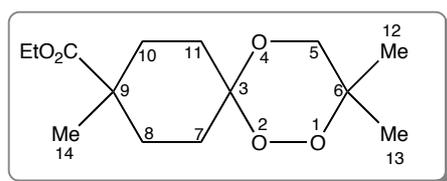
(11bS)-4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléine (11bS)-2

La 2[(1R)-3,3,3-trifluoro-2-méthoxy-2-phénylpropanoyl](11bS)-1,2,3,6,7,11b-héxahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléin-4-one **62** avec un e.d. > 91% (208 mg, 498 μ mol, 1eq) est dissoute dans H₃PO₄ (4 mL) et agité à 100°C pendant 3,5 jours. La solution est refroidie à TA puis à 0°C, versée sur un mélange H₂O/glace (30 mL) et le pH est ajusté à 12 avec une solution aqueuse de soude 4,4 M. La phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 15 mL) ; les phases organiques sont réunies séchées sur MgSO₄ filtrées sur papier et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant DCM/MeOH, gradient de 100/0, v/v à 90/10, v/v). On obtient 73 mg d'une poudre blanche (Rdt = 73%) correspondant à la (11bS)-praziquanamine **2**.

Toutes les caractérisations (RMN, SM, P_f, R_p, etc.) sont données page 129.

$[\alpha]_D = +146$ ($c = 3,1 \cdot 10^{-3}$, DCM), (e.e. > 91%, déduit à partir de l'excès diastéréoisomérique du précurseur).

Éthyl-3,3,9-triméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecane-9-carboxylate cis-44 et trans-44



La séparation des deux isomères *cis* et *trans* du trioxane **44** est réalisée par chromatographie sur une colonne d'alumine basique 90 Merck (0,063-0,200 mm), 2,5 x 35 cm : dépôt de 330 mg de produit, éluant hexane/DCM, gradient de 80/20, v/v à 60/40, v/v. Dans ces conditions on obtient 120 mg du l'isomère *trans* (e.d. > 98%), 190 mg de l'isomère *cis* (e.d. > 98%), et une fraction de mélange de 20 mg. Le suivi de la séparation se fait sur plaque de silice (éluant DCM/Et₂O, 95/5, v/v), révélation à l'acide phosphomolybdique.

Isomère *trans*-44 :

CCM : R_f = 0,48 (DCM/Et₂O, 95/5, v/v).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 263 K) δ (ppm) 4,15 (q, ³J=7,0 Hz, 2H, CO₂CH₂), 3,87 (d, ²J=12,1 Hz, 1H, HC5), 3,40 (d, ²J=12,1 Hz, 1H, HC5), 1,51 (s, 3H, H₃C13), 1,26 (t, ³J=7,0 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1,17 (s, 3H, H₃C14), 1,09 (s, 3H, H₃C12), 1,64 et 1,74 (2H, H₂C7 ou H₂C11), 1,40 et 2,08 (2H, H₂C8 ou H₂C10), 1,45 et 2,11 (2H, H₂C10 ou H₂C8), 1,45 et 2,70 (2H, H₂C11 ou H₂C7).

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 263 K) δ (ppm) 177,0 (CO), 101,5 (C3), 77,1 (C6), 66,6 (C5), 60,6 (CO₂CH₂), 42,8 (C9), 32,3 (C7 ou C11), 31,5 (C10 ou C8), 31,1 (C8 ou C10), 26,8 (C14), 25,3 (C11 ou C7), 22,9 (C12), 21,9 (C13), 14,3 (CO₂CH₂CH₃).

De plus, comme l'attestent les corrélations ¹H-¹H de la COSY, les atomes de carbone, dont les déplacements chimiques sont à 31,1 et 32,3 ppm, sont en α position. D'une manière similaire, les atomes de carbone, dont les déplacements chimiques sont à 25,3 et 31,5 ppm, sont en α position.

Isomère *cis*-44 :

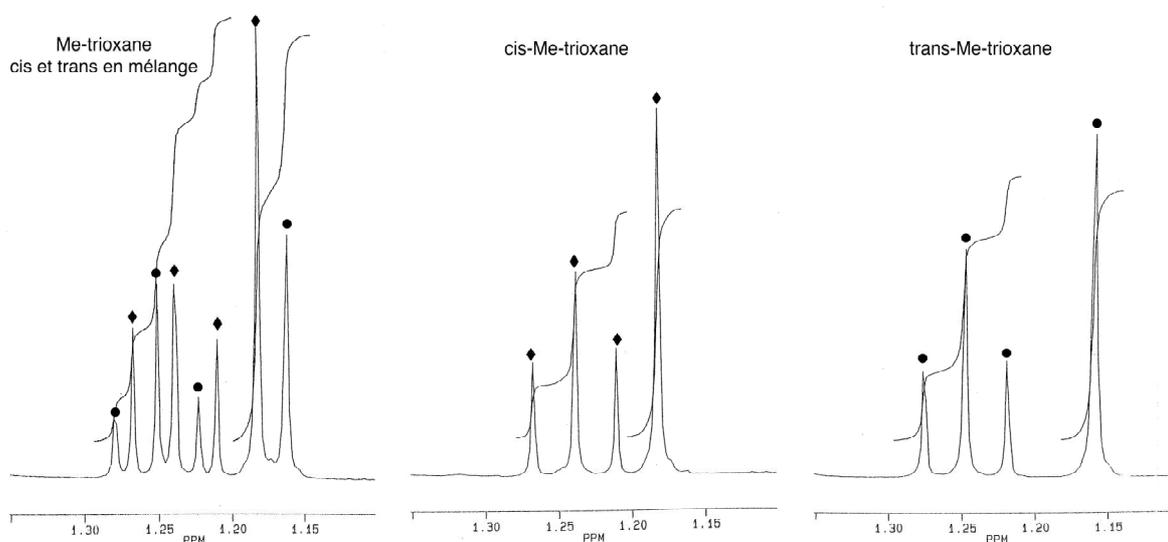
CCM : R_f = 0,51 (DCM/Et₂O, 95/5, v/v).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 263 K) δ (ppm) 4,16 (q, ³J=7,0 Hz, 2H, CO₂CH₂), 3,78 (d, ²J=11,8 Hz, 1H, HC5), 3,43 (d, ²J=11,8 Hz, 1H, HC5), 1,51 (s, 3H, H₃C13), 1,26 (t, ³J=7,0 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1,20 (s, 3H, H₃C14), 1,10 (s, 3H, H₃C12), 1,70 et 2,49 (2H, H₂C7 ou H₂C11), 1,37 et 2,09 (2H, H₂C8 ou H₂C10), 1,55 et 1,65 (2H, H₂C10 ou H₂C8), 1,52 et 2,11 (2H, H₂C11 ou H₂C7).

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 263 K) δ (ppm) : 177,1 (CO), 101,5 (C3), 77,2 (C6), 66,6 (C5), 60,6 (CO₂CH₂), 42,8 (C9), 31,4 (C10 ou C8), 31,2 (C8 ou C10), 30,7 (C11 ou C7), 25,9 (C14), 24,9 (C7 ou C11), 22,9 (C12), 21,9 (C13), 14,3 (CO₂CH₂CH₃).

De plus, comme l'attestent les corrélations ¹H-¹H de la COSY, les atomes de carbone, dont les déplacements chimiques sont à 24,9 et 31,2 ppm, sont en α position. D'une manière similaire, les atomes de carbone, dont les déplacements chimiques sont à 30,7 et 31,4 ppm, sont en α position.

Spectres RMN du mélange des deux isomères et de chacun des isomères séparé :



À noter : le dépôt de 100 mg du mélange des deux isomères sur une colonne d'alumine 90 (1,2 x 35 cm) conduit à une moins bonne séparation : 30 mg environ de chacun des isomères séparé et une fraction de mélange d'environ 30 mg.

Acide 3,3,9-triméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecan-9-carboxylique cis-51 et trans-51

Le protocole expérimental de la saponification de chacun des composés isomères du trioxane **51** est identique à celui de la page 145.

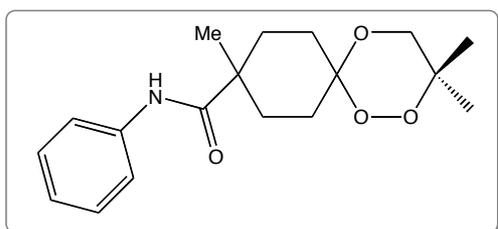
Isomère trans-51 :

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 3,81 et 3,41 (2 x br s, 2H, O-CH₂), 2,12-2,02 (m, 2H), 1,78-1,02 (m, 12 H, 3 x CH₂ cyclohexyl + 2 x CH₃), 1,25 (s, 3H, CH₃).

Isomère cis-51 :

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 3,71 et 3,45 (2 x br s, 2H, O-CH₂), 2,11-2,05 (m, 2H), 1,82-1,03 (m, 12 H, 3 x CH₂ cyclohexyl + 2 x CH₃), 1,26 (s, 3H, CH₃).

3,3,9-triméthyl-N-phényl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecane-9-carboxamide cis-63 et trans-63



L'acide 3,3,9-triméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecan-9-carboxylique **51** (*cis* ou *trans*) (31 mg, 129 μmol, 1 eq), le PyBOP (80 mg, 155 μmol, 1,2 eq) sont dissous sous argon dans le

DMSO (1 mL). On ajoute alors l'aniline (11 μ L, 129 μ mol, 1 eq) et la NMM (71 μ L, 645 μ mol, 5 eq). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 18 heures. On ajoute une solution saturée aqueuse de NaHCO₃ (15 mL) et du dichlorométhane (15 mL). La phase organique est lavée à l'eau (3 x 10 mL), séchée sur MgSO₄, filtrée sur papier et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur une colonne de silice 60 Merck (70-230 mesh) (éluant DCM/Et₂O, gradient de 100/0, v/v à 97/3, v/v). On obtient 21 mg d'une huile incolore (Rdt = 50%) qui est cristallisée dans DCM/hexane, 1/6, v/v).

Isomère *trans*-63 :

CCM : R_f = 0,35 (DCM/Et₂O, 95/5, v/v).

DCI/NH₃ : 232 (52) [M'+H]⁺, 249 (100) [M'+NH₄]⁺, 266 (16) [M'+NH₄⁺+NH₃]⁺, 320 (26) [M'+H]⁺, 337 (35) [M+NH₄]⁺ avec M' produit avec CO sur le cyclohexyle après ouverture du trioxane.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 7,52 (dd, ³J = 8,5 Hz, ⁴J = 1,3 Hz, 2H, H_{ortho}), 7,33 (br t, ³J = 7,4 Hz, 2H, H_{méta}), 7,29 (br s, 1H, NH), 7,12 (tt, ³J = 7,4 Hz, ⁴J = 1,3 Hz, 1H, H_{para}), 3,80 et 3,44 (2 x br s, 2H, H₂C5), 2,59 (br s, 1H), 2,10-1,99 (m, 2H), 1,85-1,76 (m, 3H), 1,67-1,41 (m, 5H, 2H + CH₃), 1,28 (s, 3H, CH₃), 1,11 (br s, 3H, CH₃).

Diffraction aux rayons X :

Système cristallin	Orthorhombique	
Groupe spatial	Pbca	
Paramètres de la maille	a = 12,552(3) Å	$\alpha = 90^\circ$
	b = 9,207(3) Å	$\beta = 90^\circ$
	c = 29,188(8) Å	$\gamma = 90^\circ$
Volume	3373,3(16) Å ³	
Z	8	
Réflexions collectées	10803	
Données / paramètres	1746 / 215	
Indices R finaux (I > 2 σ (I))	R ₁ = 0,0530	
Indices R (toutes les données)	wR ₂ = 0,1136	

Longueur des liaisons (Å)

C(1)-O(3)	1,416(5)	C(1)-O(1)	1,422(5)
C(1)-C(8)	1,503(5)	C(1)-C(6)	1,518(6)
C(2)-O(3)	1,411(5)	C(2)-C(3)	1,503(6)
C(3)-O(2)	1,450(5)	C(3)-C(4)	1,514(6)
C(3)-C(5)	1,516(6)	C(6)-C(7)	1,516(5)
C(7)-C(10)	1,541(5)	C(8)-C(9)	1,510(5)
C(9)-C(10)	1,533(5)	C(10)-C(12)	1,528(6)
C(10)-C(11)	1,528(6)	C(14)-O(4)	1,232(5)
C(12)-N(1)	1,360(6)	C(13)-C(18)	1,371(6)
C(13)-C(14)	1,387(6)	C(13)-N(1)	1,416(5)
C(14)-C(15)	1,368(6)	C(15)-C(16)	1,376(6)
C(16)-C(17)	1,378(6)	C(17)-C(18)	1,386(6)
O(1)-O(2)	1,471(4)		

Angles entre les liaisons (°)

O(3)-C(1)-O(1)	109,0(3)	O(3)-C(1)-C(8)	106,5(4)	O(1)-C(1)-C(8)	104,8(3)
----------------	----------	----------------	----------	----------------	----------

O(3)-C(1)-C(6)	113,3(3)	O(1)-C(1)-C(6)	112,0(4)	C(8)-C(1)-C(6)	110,8(4)
O(3)-C(2)-C(3)	112,3(4)	O(2)-C(3)-C(2)	106,2(4)	O(2)-C(3)-C(4)	102,8(4)
C(2)-C(3)-C(4)	110,6(4)	O(2)-C(3)-C(5)	110,8(4)	C(2)-C(3)-C(5)	114,0(4)
C(4)-C(3)-C(5)	111,7(4)	C(7)-C(6)-C(1)	112,0(4)	C(6)-C(7)-C(10)	112,8(3)
C(1)-C(8)-C(9)	111,3(3)	C(8)-C(9)-C(10)	113,1(4)	C(12)-C(10)-C(11)	110,0(4)
C(12)-C(10)-C(9)	108,2(4)	C(11)-C(10)-C(9)	110,7(3)	C(12)-C(10)C(7)	108,2(3)
C(11)-C(10)-C(7)	111,9(4)	C(9)-C(10)-C(7)	107,8(3)	O(4)-C(12)-N(1)	121,3(5)
O(4)-C(12)-C(10)	122,5(4)	N(1)-C(12)-C(10)	116,2(4)	C(18)-C(13)-C(14)	119,7(4)
C(18)-C(13)-N(1)	122,9(4)	C(14)-C(13)-N(1)	117,4(4)	C(15)-C(14)-C(13)	120,0(4)
C(14)-C(15)-C(16)	121,1 (5)	C(15)-C(16)-C(17)	118,7(5)	C(16)-C(17)-C(18)	120,8(5)
C(13)-C(18)-C(17)	119,7(4)	C(1)-O(1)-O(2)	108,6(3)	C(3)-O(2)-O(1)	106,6(3)
C(2)-O(3)-C(1)	114,0(3)	C(12)-N(1)-C(13)	128,3(5)		

Isomère *cis*-63 :

CCM : $R_f = 0,32$ (DCM/Et₂O, 95/5, v/v).

DCI/NH₃ : 232 (59) [M'+H]⁺, 249 (100) [M'+NH₄]⁺, 320 (18) [M'+H]⁺, 337 (52) [M+NH₄]⁺
avec M' produit avec CO sur le cyclohexyle après ouverture du trioxane.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃, 293 K) δ (ppm) 7,48 (dd, ³J = 8,3 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, 2H, H_{ortho}), 7,35 (br s, 1H, NH), 7,31 (br t, ³J = 8,3 Hz, 2H, H_{méto}), 7,10 (tt, ³J = 7,8 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, 1H, H_{para}), 3,75 et 3,47 (2 x br s, 2H, H₂C5), 2,85-2,02 (m, 4H), 1,94-1,40 (m, 7H, 4H+ CH₃), 1,30 (s, 3H, CH₃), 1,11 (br s, 3H, CH₃).

Diffraction aux rayons X :

Système cristallin	Orthorhombique	
Groupe spatial	Pbca	
Paramètres de la maille	a = 12,831(2) Å	$\alpha = 90^\circ$
	b = 9,2185(15) Å	$\beta = 90^\circ$
	c = 29,052 (5) Å	$\gamma = 90^\circ$
Volume	3436,2(10) Å ³	
Z	8	
Réflexions collectées	11122	
Données / paramètres	1774 / 214	
Indices R finaux ($I > 2\sigma(I)$)	R ₁ = 0,0614	
Indices R (toutes les données)	wR ₂ = 0,0622	

Longueur des liaisons (Å)

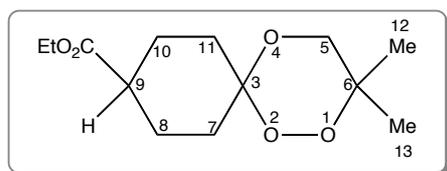
N(1)-C(12)	1,363(6)	N(1)-C(13)	1,435(6)
O(1)-C(5)	1,431(5)	O(1)-O(2)	1,467(4)
O(2)-C(1)	1,466(5)	O(3)-C(5)	1,417 (5)
O(3)-C(2)	1,444(5)	O(4)-C(12)	1,227(5)
C(1)-C(4)	1,515(6)	C(1)-C(2)	1,517(6)
C(1)-C(3)	1,521(6)	C(5)-C(8)	1,510(6)
C(5)-C(6)	1,516(6)	C(6)-C(7)	1,530(5)
C(7)-C(10)	1,539(6)	C(8)-C(9)	1,510(5)
C(9)-C(10)	1,528(6)	C(10)-C(12)	1,531(6)
C(10)-C(11)	1,548(6)	C(13)-C(14)	1,362(6)
C(13)-C(18)	1,387(6)	C(14)-C(15)	1,387(7)
C(15)-C(16)	1,389(6)	C(16)-C(17)	1,367(7)
C(17)-C(18)	1,393(6)		

Angles entre les liaisons (°)

C(12)-N(1)-C(13)	126,7(4)	C(5)-O(1)-O(2)	108,5(3)	C(1)-O(2)-O(1)	107,9(4)
C(5)-O(3)-O(2)	113,2(4)	O(2)-C(1)-C(4)	110,5(4)	O(2)-C(1)-C(2)	106,6(4)

C(4)-C(1)-C(2)	113,3(5)	O(2)-C(1)-C(3)	102,2(5)	C(4)-C(1)-C(3)	112,4(4)
C(2)-C(1)-C(3)	111,0(4)	O(3)-C(2)-C(1)	110,1(4)	O(3)-C(5)-O(1)	108,2(4)
O(3)-C(5)-C(8)	106,6(5)	O(3)-C(5)-C(6)	113,3(4)	O(1)-C(5)-C(6)	112,8(5)
C(8)-C(5)-C(6)	110,5(4)	C(5)-C(6)-C(7)	109,2(4)	C(6)-C(7)-C(10)	112,2(4)
C(5)-C(8)-C(9)	111,1(4)	C(8)-C(9)-C(10)	114,2(5)	C(9)-C(10)-C(12)	109,8(4)
C(9)-C(10)-C(7)	109,8(4)	C(12)-C(10)-C(7)	112,5(5)	C(9)-C(10)-C(11)	108,3(4)
C(12)-C(10)-C(11)	106,8(4)	C(7)-C(10)-C(11)	109,4(4)	O(4)-C(12)-N(1)	121,6(4)
O(4)-C(12)-C(10)	123,7(5)	N(1)-C(12)-C(10)	114,7(5)	C(14)-C(13)-C(18)	120,5(5)
C(14)-C(13)-N(1)	117,5(5)	C(18)-C(13)-N(1)	121,9(5)	C(18)-C(13)-N(1)	121,9(5)
C(13)-C(14)-C(15)	120,9(5)	C(14)-C(15)-C(16)	119,0(6)	C(17)-C(16)-C(15)	120,0(5)
C(16)-C(17)-C(18)	121,0(5)	C(13)-C(18)-C(17)	118,5(5)		

Éthyl-3,3-diméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undecan-9-carboxylate cis-41 et trans-41



La séparation des deux composés isomères du trioxane

41 est réalisée par chromatographie sur colonne d'alumine basique 90 Merck (0,063-0,200 mm), 1,2 x 35 cm, dépôt de 90 mg de produit, éluant hexane/DCM

gradient de 80/20 à 60/40. Dans ces conditions on obtient une trentaine de mg de chacun des isomères et une fraction de mélange de 20 mg. Le suivi de la séparation se fait sur plaque de silice (éluant DCM/Et₂O, 95/5, v/v), révélation à l'acide phosphomolybdique.

Isomère 1 :

CCM : R_f = 0,40 (DCM/Et₂O, 95/5, v/v).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 263 K) δ (ppm) 4,13 (q, ³J = 7,3 Hz, 2H, CO₂CH₂), 3,76 (d, ²J = 11,5 Hz, 1H, HC5), 3,42 (d, ²J = 11,5 Hz, 1H, HC5), 2,38 (m, 1H, HC9), 1,50 (s, 3H, H₃C13), 1,25 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1,09 (s, 3H, H₃C12), 1,67 et 2,63 (2H, H₂C7 ou H₂C11), 1,68 et 1,88 (2H, H₂C8 ou H₂C10), 1,51 et 1,77 (2H, H₂C10 ou H₂C8), 1,82 et 1,88 (2H, H₂C11 ou H₂C7).

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 263 K) δ (ppm) 172,2 (CO), 101,2 (C3), 77,1 (C6), 66,4 (C5), 60,6 (CO₂CH₂), 41,7 (C9), 32,9 (C10 ou C8), 26,5 (C7 ou C11), 24,6 (C8 ou C10), 24,3 (C11 ou C7), 22,9 (C12), 21,9 (C13), 14,3 (CO₂CH₂CH₃).

De plus, comme l'attestent les corrélations ¹H-¹H de la COSY, les atomes de carbone, dont les déplacements chimiques sont à 24,6 et 26,5 ppm, sont en α position. D'une manière similaire, les atomes de carbone, dont les déplacements chimiques sont à 24,3 et 32,9 ppm, sont en α position.

Isomère 2 :

CCM : R_f = 0,44 (DCM/Et₂O, 95/5, v/v).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 253 K) δ (ppm) 4,11 (q, ³J = 7,3 Hz, 2H, CO₂CH₂), 3,88 (d, ²J = 12,2 Hz, 1H, HC5), 3,42 (d, ²J = 12,2 Hz, 1H, HC5), 2,35 (tt, ³J = 11,0 Hz et ³J = 3,7 Hz, 1H, HC9), 1,51 (s, 3H, H₃C13), 1,24 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1,11 (s, 3H, H₃C12), 1,42 et 2,85 (2H, H₂C7 ou H₂C11), 1,73 et 1,92 (2H, H₂C8 ou H₂C10), 1,59 et 1,87 (2H, H₂C10 ou H₂C8), 1,71 et 1,87 (2H, H₂C11 ou H₂C7).

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 253 K) δ (ppm) 175,4 (CO), 101,2 (C3), 77,1 (C6), 66,7 (C5), 60,6 (CO₂CH₂), 42,1 (C9), 33,8 (C10 ou C8), 26,9 (C7 ou C11), 24,9 (C8 ou C10), 24,6 (C11 ou C7), 22,9 (C12), 21,9 (C13), 14,4 (CO₂CH₂CH₃).

De plus, comme l'attestent les corrélations ¹H-¹H de la COSY, les atomes de carbone, dont les déplacements chimiques sont à 24,9 et 26,9 ppm, sont en α position. D'une manière similaire, les atomes de carbone, dont les déplacements chimiques sont à 24,6 et 33,8 ppm, sont en α position.

2-[(3,3,9-triméthyl-1,2,5-trioxaspiro[5,5]undec-9-yl)-carbonyl]1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoléin-4-one (*R, trans*)-**53**, (*R, cis*)-**53**, (*S, trans*)-**53** et (*S, cis*)-**53**

Le protocole expérimental du couplage de chacun des stéréoisomères du composé **53** est identique à celui donné page 145.

Énantiomères (*R, trans*)-**53** et (*S, trans*)-**53**

$[\alpha]_D = -95$ ($c = 2,9 \cdot 10^{-3}$, DCM), e.e. > 95%, e.d. > 98% pour le (*R,trans*)-**53**.

$[\alpha]_D = +90$ ($c = 2,5 \cdot 10^{-3}$, DCM), e.e. > 90%, e.d. > 98% pour le (*S,trans*)-**53**.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 273 K) δ (ppm) 7,29-7,23 (m, 3H, HC9, HC10 et HC11), 7,22 (d, ³J = 7,5 Hz, 1H, HC8), 5,09 (s large, 1H, HC1), 4,88-4,80 (m, 3H, HC3, HC6 et HC11b), 4,02 (d, ²J = 17,5 Hz, 1H, HC3), 3,83 (d, ²J = 12,1 Hz, 1H, HC5'), 3,42 (d, ²J = 12,1 Hz, 1H, HC5'), 3,05-2,84 (m, 3H, HC1, HC6 et HC7), 2,80 (dd, ²J = 15,3 Hz, ³J = 4,1 Hz, 1H, HC7), 2,57 (dt, ²J = 17,5 Hz, ³J = 6,6 Hz, 1H, HC7' ou HC11'), 2,25-2,15 (m, 2H, H₂C8' ou H₂C10'), 1,87-1,72 (m, 3H, H₂C8' ou H₂C10', HC7' ou HC11'), 1,68-1,56 (m, 2H, HC7' ou HC11'), 1,52 (d, ⁴J = 4,1 Hz, 3H, H₃C14'), 1,34 (s, 3H, H₃C13'), 1,11 (s, 3H, H₃C15').

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 273 K) δ (ppm) 174,7 (C12'), 164,6 (C4), 134,9 (C7a), 132,5 (C11a), 129,6 (C8), 127,6 (C9), 127,0 (C10), 125,4 (C11), 101,3 (C3'), 77,1 (C6'), 66,6 (C5'), 55,0 (C11b), 50,0 (C3), 48,6 (C1), 42,7 (C9'), 39,0 (C6), 33,4 (C8' ou C10'), 32,0 (C8' ou C10'), 28,8 (C7), 25,2 (C7' ou C11'), 25,1 (C7' ou C11'), 24,8 (C13'), 22,9 (C15'), 21,9 (C14').

Énantiomères (*R, cis*)-**53** et (*S, cis*)-**53**

$[\alpha]_D = -100$ ($c = 3,0 \cdot 10^{-3}$, DCM), e.e. > 95%, e.d. > 98% pour le (*R,cis*)-**53**.

$[\alpha]_D = +96$ ($c = 2,1 \cdot 10^{-3}$, DCM), e.e. > 90%, e.d. > 98% pour le (*S,cis*)-**53**.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 273 K) δ (ppm) 7,32 (d, ³J = 7,2 Hz, 1H, HC11), 7,30-7,27 (m, 2H, HC9 et HC10), 7,22 (d, ³J = 7,6 Hz, 1H, HC8), 5,13 (dd, ²J = 12,9 Hz, ³J = 5,7 Hz, 1H, HC1), 4,89-4,81 (m, 3H, HC3, HC6 et HC11b), 4,00 (d, ²J = 16,4 Hz, 1H, HC3), 3,82 (d, ²J = 10,9 Hz, 1H, HC5'), 3,46 (d, ²J = 10,9 Hz, 1H, HC5'), 3,05-2,86 (m, 3H, HC1, HC6 et HC7), 2,81 (dd, ²J = 16,4 Hz, ³J = 2,7 Hz, 1H, HC7), 2,30-2,15 (m, 4H, H₂C7' ou H₂C11', H₂C8' ou H₂C10'), 1,90-1,68 (m, 2H, H₂C8' ou H₂C10'), 1,68-1,49 (m, 2H, H₂C7' ou H₂C11'), 1,54 (s, 3H, H₃C14'), 1,36 (s, 3H, H₃C13'), 1,12 (s, 3H, H₃C15').

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃, 273 K) δ (ppm) 175,0 (C12'), 164,7 (C4), 134,9 (C7a), 132,5 (C11a), 129,5 (C8), 127,5 (C9), 127,0 (C10), 125,6 (C11), 101,3 (C3'), 77,0 (C6'), 66,7 (C5'), 55,1 (C11b), 50,0 (C3), 48,7 (C1), 42,5 (C9'), 39,0 (C6), 31,2 (C8' ou C10'), 28,8 (C8' ou C10'), 28,5 (C7), 24,7 (C13'), 24,0 (C7' ou C11'), 23,7 (C7' ou C11'), 22,9 (C15'), 22,0 (C14').

V – BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ma C., Zhang Q.-F., Tan Y.-B., Wang L. Total synthesis of (-)-praziquantel: an anthelmintic drug. *J. Chem. Res.* **2004**, 186-187.
- [2] Zhang Y. Synthesis of stable-isotope labeled [M+7] and [M+6] 2-(methylamino)imidazole. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2002**, 45, 1055-1064.
- [3] Cox E.D., Cook J.M. The Pictet-Spengler condensation: a new direction for an old reaction. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 1797-1842.
- [4] Kelly J.W., He L., Stewart J.T. Liquid chromatographic separation of praziquantel enantiomers in serum using a cellulose-based chiral stationary phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, 11, 1141-1144.
- [5] Polisel Jabor V.A., Melo Rocha G., Bonato P.S. Enantioselective analysis of praziquantel in plasma samples. *J. Chromatography B* **1997**, 696, 307-311.
- [6] Gotor V. Non-conventional hydrolase chemistry: amid and carbamate bond formation catalysed by lipases. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2189-2197.
- [7] Djeghaba Z. Les enzymes en synthèse organique IX: acylation enzymatique des amines secondaires cycliques. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1995**, 104, 161-164.
- [8] Balkenhohl F., Ditrich K., Hauer B., Ladner W. Optisch aktive Amine durch Lipase-katalysierte Methoxyacetylierung. *J. Prakt. Chem.* **1997**, 339, 381-384.
- [9] Lutz S. Engineering lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, 15, 2743-2748.
- [10] Maugard T., Remaud-Simeon, Petre D., Monsan P. Enzymatic amidification for the synthesis of biodegradable surfactants: synthesis of *N*-acylated hydroxylated amines. *J. Mol. Cat. B : Enzymatic* **1998**, 5, 13-17.
- [11] Iglesias L.E., Sanchez V.M., Rebollo F., Gotor V. *Candida antarctica* B lipase catalyzed resolution of (\pm)-1-(heteroaryl)ethylamines. *Tetrahedron Asymmetry* **1997**, 8, 2675-2677.
- [12] Chiou T.-W., Chang C.-C., Lai C.-T., Tai D.-F. Kinetic resolution of propanolol by a lipase-catalyzed *N*-acetylation. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 7, 433-436.
- [13] Asensio G., Andreu C., Marco J.A. : Enzyme-mediated enantioselective acylation of secondary amines in organic solvents. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 4197-4198.
- [14] Garcia Ruano J.L., Alcudia A., del Prado M., Barros D., Maestro M.C., Fernandez I. Addition of enantiopure α -sulfinyl carbanions to (*S*)-*N*-sulfinimines: asymmetric synthesis of β -amino sulfoxides and β -amino alcohols. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 2856-2862.
- [15] Kumareswaran R., Hassner A. Asymmetric synthesis of 1,4-dideoxy-1,4-imino-*D*-ribitol via stereoselective addition of allylphenylsulfone to an aryl *N*-sulfinylimine. *Tetrahedron Asymmetry* **2001**, 12, 3409-3415.
- [16] Wolf C., Pranatharhiharan L., Volpe E.C. A convenient method for the determination of the absolute configuration of chiral amines. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 3287-3290.
- [17] Dale J.A., Dull D.L., Mosher D.S. α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic acid reagent for the determination of enantiomeric composition of alcohols and amines. *J. Org. Chem.* **1969**, 34, 2543-2549.

- [18] Hoye T.R., Renner M.K. Applications of MTPA (Mosher)Amides of secondary amines: assignment of absolute configuration in chiral cyclic amines. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8469-8495.
- [19] Kanger T., Kriis K., Pehk T., Müürisep A.-M., Lopp M. Asymmetric synthesis of novel C_2 -symmetric bismorpholines. *Tetrahedron Asymmetry* **2002**, *13*, 857-865.
- [20] King S.B., Ganem B. Synthetic studies on Mannostatin A and its derivatives: a new family of glycoprotein processing inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 562-570.
- [21] Sheeian J.C., Yang D.-D. H. The use of *N*-formylamino acids in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *80*, 1154-1158.
- [22] a - Pohlke R., US 4,049,659, 20/09/1977 ; b – Pohlke R., DT 25 08 947 A1, 09/09/1976.
- [23] Pohlke R., DT 23 31 713 A1, 23/01/1975.

4^{ème} PARTIE : ACTIVITÉ BIOLOGIQUE

Des évaluations biologiques des trioxaquantels ont été entreprises, en collaboration avec A. Théron, J. Boissier du Laboratoire de Parasitologie Fonctionnelle et Évolutive de Perpignan (UMR 5555 CNRS-UP). Les activités antischistosomiales sur les stades larvaires et adultes de *Schistosoma mansoni* chez des souris ont été réalisées. La souche de *S. mansoni* utilisée est originaire du Brésil et n'a jamais été soumise au praziquantel.

I – MÉTHODOLOGIE DU TEST *IN VIVO*

I.1 – Techniques d'infestation

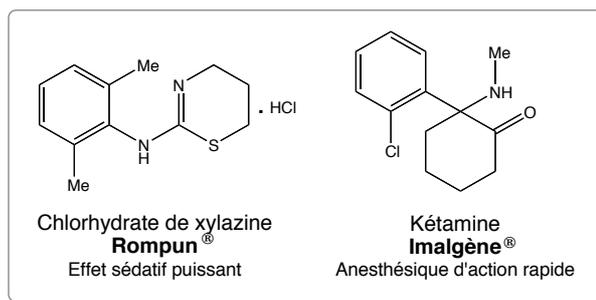
I.1.1 – Récolte des œufs et infestations des hôtes intermédiaires

Les œufs de *S. mansoni* sont prélevés à partir du foie de souris infestées. Cet organe est particulièrement riche en œufs. Le foie est broyé dans un mortier contenant du sérum physiologique (NaCl 8,5‰). Les œufs sont ensuite isolés par filtration à travers une série de tamis de diamètres 425 µm, 188 µm, 106 µm et 45 µm. Un double choc thermique et osmotique provoque l'éclosion des œufs et la libération des larves. Les miracidia ont un phototactisme positif. Une lampe placée au-dessus du récipient permet donc d'attirer les larves à la surface du milieu.

Les mollusques *B. glabrata*, destinés à être infestés par *S. mansoni*, sont isolés dans des piluliers ou des plaques à cupules contenant de l'eau à la température de 25°C. Les miracidia sont prélevés un par un à la pipette pasteur sous la loupe binoculaire et mis en présence des mollusques. Vingt-quatre heures plus tard, les hôtes intermédiaires sont placés en bacs ou isolés dans des verres et maintenus à 25°C sous une photopériode équilibrée 12-12.

I.1.2 – Récolte des cercaires et infestations des souris

Les mollusques *B. glabrata* émetteurs de cercaires sont rincés, isolés dans des piluliers contenant tous la même quantité d'eau à 25°C, et placés en fin de matinée sous une source lumineuse. En début d'après-midi, les souris sont alors infestées par voie transcutanée selon la méthode de Smithers *et al.* [1]. Les souris sont anesthésiées avec un mélange de Rompun® (0,5 mL) et d'Imalgène® (1 mL), avec 8,5 mL de chlorure de sodium (NaCl 8,5‰) autoclavé. La solution est injectée aux souris par voie intrapéritonéale, à raison de



0,1 mL d'anesthésique pour 10 g de masse corporelle. Quelques minutes après l'injection, les animaux s'endorment (effet maintenu pendant 1 heure environ). L'abdomen des souris anesthésiées est soigneusement rasé sur une surface d'environ 9 cm². La peau nue est mouillée par de l'eau de forage à 25°C pour éviter toute interface gazeuse entre la paroi de l'abdomen et l'eau contenant les cercaires.

Cent vingt cercaires, prélevées à la pipette Pasteur, sont placées dans de petits cristallisoirs en verre. Les souris anesthésiées et rasées sont couchées sur le ventre au-dessus du cristallisoir, la peau de l'abdomen étant en contact avec l'eau infestée par les cercaires. Le contact hôte-parasite dure 45 minutes. L'infectivité, c'est-à-dire le nombre de cercaires qui se développe chez la souris pour donner des vers adultes par rapport au nombre de cercaires dans le cristallisoir est comprise entre 15 et 35%. Les souris étant infectées avec le même pool de cercaires au même moment, il n'existe aucune source de variation entre les différents lots (témoins et traités). Cette technique permet une infectivité précise et reproductible contrairement à la technique de pataugeage largement utilisée dans la littérature [2]. Le jour d'inoculation des souris est le jour 0.

1.2 – Traitement des souris

Le traitement est effectué sur des stades jeunes du parasite (3 semaines post-infestation) ou des stades adultes (sept semaines post-infestation). L'excipient utilisé pour l'administration du médicament est important : le DMSO, le Crémophor EL sont souvent utilisés en laboratoire pour tester diverses molécules, mais ont un effet " accélérateur ". En effet, ils favorisent l'absorption des molécules et sont donc peu acceptables pharmacologiquement. Nous avons donc opté pour des excipients plus neutres comme des mélanges Tween 80-méthylcellulose pour les administrations par voie orale et éthanol-Tween 80-NaCl par voie intrapéritonéale.

Traitement par voie orale

Les molécules à tester et les médicaments de référence (praziquantel et artéméther) sont administrées par gavage dans un mélange Tween 80 à 0,5 vol% dans une solution aqueuse de méthylcellulose (0,6% wt/v). Pour étudier l'effet sur les stades âgés, les souris sont traitées pendant cinq jours consécutifs à partir de J = 49 post-infestation. Pour les stades jeunes, les souris sont traitées pendant cinq jours consécutifs à partir de J=22.

Traitement par voie intrapéritonéale

Les molécules sont administrées de façon intrapéritonéale dans un mélange éthanol-Tween 80-NaCl à 0,85 wt%, 5/2,5/97,5, v/v/v à partir de J = 49 post-infestation (= stades adultes).

I.3 – Comptage des schistosomes après le traitement

Dix semaines après l'infestation, c'est-à-dire 3 ou 7 semaines après la fin du traitement, les souris sont perfusées par la technique de perfusion hépatique mise au point par Duvall *et al.* [3]. Les souris sont sacrifiées par injection d'une dose létale d'anesthésique (Pentobarbital sodique), diluée dans 10 mL d'éthanol à 10%. L'injection par voie intrapéritonéale est faite à raison de 0,8 mL d'anesthésique par souris. Le pentobarbital sodique agit non seulement sur l'hôte, provoquant ainsi une anesthésie immédiate, mais aussi sur les schistosomes. Il induit une paralysie des vers qui se détachent de l'endothélium des capillaires mésentériques et sont entraînés par le courant sanguin vers le foie.

Lorsque la souris est inerte, elle est suspendue par les pattes avant et arrière gauches sur le support vertical de la cuvette à perfusion, le dos contre la paroi. Le pelage thoracique et abdominal est mouillé à l'éthanol pour éviter la dispersion des poils au cours de la manipulation. L'abdomen et le thorax sont incisés pour dégager l'intestin, le foie et le cœur. La veine porte est sectionnée à sa sortie du mésentère, une aiguille hypodermique est immédiatement introduite dans le ventricule du cœur gauche où le liquide de perfusion (solution de NaCl [0,85%] et de citrate de sodium [0,75%] dans de l'eau distillée) est injecté au moyen d'une pompe péristaltique. Le liquide passe par l'aorte et atteint d'une part le réseau capillaire mésentérique via l'artère mésentérique, et d'autre part le réseau capillaire hépatique par l'artère hépatique. Cette double action refoule les schistosomes dans la veine porte d'où ils s'échappent par l'incision précédemment pratiquée à ce niveau. Les vers adultes tombent sur un tamis placé sur un verre à pied placé sous le foie. Lorsque le foie et le ventricule gauche sont décolorés, la perfusion est terminée. Le foie et l'appareil digestif sont prélevés et dilacérés pour vérifier qu'il n'y ait pas de vers emprisonnés dans les capillaires.

II – RÉSULTATS

II.1 – Expérience préliminaire : DE₅₀ du praziquantel sur la souche de *Schistosoma mansoni* étudiée

Le DE₅₀ est la dose de drogue nécessaire pour réduire de 50 % la charge totale en parasites. Ainsi, une gamme de sept doses a été choisie pour déterminer la DE₅₀ du praziquantel de la souche de *S. mansoni* chez la souris. Les doses administrées de J = 49 à 53 post-infestation sont de 6,25, 12,5, 25, 50, 100 mg/kg/j (gavage avec 200 µL de solution) 150 et 300 mg/kg/j (gavage avec 2 x 200 µL de solution).

La DE₅₀ est de l'ordre de 108 mg/kg/j de praziquantel administrée par voie orale à J = 49 post-infestation. Cette valeur peut sembler élevée. Cependant les souches ayant une DE₅₀ de cet ordre sont considérées comme sensibles. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle estimée à 81 mg/kg par Cioli *et al.* chez des souris infectées par *S. mansoni* et traitées par voie orale avec des solutions dans le crémosphor EL (vecteur favorisant le passage des molécules) [2]. Par ailleurs, il est à rappeler que la dose entraînant une réduction supérieure à 95% des parasites chez l'homme est 35 fois plus faible que celle qui entraîne la même réduction chez la souris [4].

II.2 – Activités des trioxaquantels par voie orale sur les stades âgés

Nous avons étudié l'activité des trioxaquantels 9'H-43, 9'Me-53 et 9'F-54 en mélange des deux diastéréoisomères racémiques sur *S. mansoni*. La DE₅₀ du praziquantel (PZQ) sur notre souche ayant été évaluée à 108 mg/kg/j, nous avons décidé de tester les molécules aux doses de 100 et 200 mg/kg/j pendant 5 jours consécutifs à partir de J = 49 post-infestation. La dose de 100 mg/kg/j se situe dans la zone de la DE₅₀ du praziquantel ; la dose à 200 mg/kg est suffisamment éloignée pour donner une seconde mesure de l'activité des molécules. Pour comparer l'activité de nos molécules à celle de l'artéméter (Artn), un traitement à 400 mg/kg pendant 5 jours consécutifs a été réalisé. Les souris sont gavées avec 2 x 200 µL de solution. Les résultats sont regroupés dans le tableau 1 ci-dessous.

Entrée	Molécule	Dose journalière (mg/kg)	Nombre total de vers			Réduction du nombre total de vers (%) ⁴
1	—	—	\bar{x}^1	$(\sigma_{n-1})^2$	n^3	Témoin
2	9'H-43	100	42,0	(6,3)	5	16
3	9'H-43	200	35,2	(10,2)	5	11
4	9'Me-53	100	37,2	(5,5)	5	0
5	9'Me-53	200	41,8	(5,4)	5	12
6	9'F-54	100	37,0	(10,6)	5	4
7	9'F-54	200	40,2	(8,7)	5	27
[8	9'F-54	400	30,6	(9,0)	5	~0] ⁵
9	PZQ	100	37,4	(8,9)	3	73
10	PZQ	200	11,2	(7,4)	5	98
[11	Artm	400	1,0	(1,4)	5	41] ⁵
			21,7	(2,1)	3	

¹ \bar{x} : nombre moyen de vers. ² σ_{n-1} : écart-type. ³n : effectif des lots. ⁴Réduction = 100 – (nombre de vers des souris/nombre de vers des témoins) x 100. ⁵Essai réalisé au cours d'une expérience différente, dans laquelle le nombre de vers des souris non traitées est de 37,3. En effet, l'infestivité varie légèrement d'une expérience à l'autre en fonction du lot de cercaires utilisées : 33% ± 3%, produisent 40 ± 4 vers adultes chez les souris témoins.

Tableau 1 : Taux de réduction du nombre de vers après 1 dose orale de molécule pendant 5 jours consécutifs chez des souris infectées par *S. mansoni* et traitées à J = 49 post-infestation.

En mélange de diastéréoisomères, les trioxaquantels 9'H-43 et le 9'Me-53 n'induisent pas de réduction significative du nombre total de vers à des doses de 100 et 200 mg/kg/j administrés pendant cinq jours consécutifs, de J = 49 à 53 post-infestation. Seul le trioxaquantel 9'F-54 semble indiquer un début d'activité avec une réduction de la charge totale en vers de 27% après le traitement à 200 mg/kg/j. Cette observation est infirmée puisqu'à 400 mg/kg aucune réduction significative du nombre de vers n'est observée. Le contrôle praziquantel est quant à lui normal. De même, l'activité de l'artéméther à la dose orale de 400 mg/kg est conforme à ce qui est attendu (51% de réduction [5]).

II.3 – Activités de deux stéréoisomères purifiés du trioxaquantel 9'Me-53 par voie intrapéritonéale sur les stades âgés

Afin de vérifier que la non-réduction du nombre de vers du trioxaquantel 9'-Me-53 obtenue précédemment ne soit pas due à un défaut d'absorption du composé par voie orale nous avons également testé l'activité par voie intrapéritonéale (injection de 200 µL de solution). Par ailleurs, nous avons décidé de tester dans un premier temps deux des quatre stéréoisomères du trioxaquantel 9'Me-53. Les résultats sont regroupés dans le tableau 2.

Entrée	Molécule	Dose journalière (mg/kg)	Nombre total de vers			Réduction du nombre total de vers (%) ⁴
			\bar{x}^1	$(\sigma_{n-1})^2$	n^3	
1	—	—	37,3	(3,5)	3	Témoin
2	PZQ	50	12,7	(4,0)	3	66
3	(<i>R, cis</i>)-9'Me-53	50	36,7	(7,0)	3	2
4	(<i>R, trans</i>)-9'Me-53	50	38,3	(6,4)	3	0
5	Artm	50	17,7	(1,5)	3	53

¹ \bar{x} : nombre moyen de vers. ² σ_{n-1} : écart-type. ³ n : effectif des lots. ⁴Réduction = 100 – (nombre de vers des souris/nombre de vers des témoins) x 100.

Tableau 2 : Taux de réduction du nombre de vers après 1 dose intrapéritonéale de molécule pendant 5 jours consécutifs chez des souris infectées par *S. mansoni* et traitées à J = 49 post-infestation.

Les stéréoisomères (*R, cis*) et (*R, trans*) du trioxaquantel 9'Me-53 n'ont pas d'activité schistosomicide à la dose de 50 mg/kg/j par voie ip. Le mélange éthanol-Tween 80-méthylcellulose utilisé comme vecteur pour les administrations ip des molécules n'a aucune influence sur la parasitose. Le nombre moyen de vers est en accord avec l'infectivité attendue. Par voie intrapéritonéale, le praziquantel est plus efficace que par voie orale. En effet, la DE₅₀ est inférieure à 50 mg/kg/j. La DE₅₀ de l'artémether par voie intrapéritonéale est de l'ordre de 50 mg/kg/j.

II.4 – Activité du trioxaquantel 9'Me-53 par voie orale sur les stades jeunes

Les dérivés de l'artémisinine sont essentiellement actifs sur les stades jeunes schistosomules. Compte tenu de la présence d'un trioxane supposé réagir comme les dérivés de l'artémisinine, nous avons donc testé l'activité du trioxaquantel 9'Me-53 (mélange des 4 stéréoisomères) sur les stades jeunes. Les souris sont donc traitées 22 jours post-infestation (gavage avec 2 x 200 µL de solution). Les résultats sont donnés au tableau 3 et comparés.

Entrée	Molécule	Dose journalière (mg/kg)	Nombre total de vers			Réduction du nombre total de vers (%) ⁴
			\bar{x}^1	$(\sigma_{n-1})^2$	n^3	
1	Artm	150	20,0	(5,6)	3	46
2	9'Me-53*	150	38,7	(5,5)	3	0

* mélange des 4 stéréoisomères. ¹ \bar{x} : nombre moyen de vers. ² σ_{n-1} : écart-type. ³ n : effectif des lots. ⁴Réduction = 100 – (nombre de vers des souris/nombre de vers des témoins) x 100, avec nombre de vers des témoins = 37 compte tenu de l'infectivité.

Tableau 3 : Taux de réduction du nombre de vers après 1 dose orale de molécule pendant 5 jours consécutifs chez des souris infectées par *S. mansoni* et traitées à J = 23 post-infestation.

En l'absence de traitement et compte tenu de l'infectivité nous estimons à 37 le nombre de vers chez des souris non traitées. Le trioxaquantel 9'Me-**53** à la dose de 150 mg/kg/j n'induit pas de réduction du nombre de vers. Par ailleurs, le contrôle avec l'artéméther est normal.

II.5 – Analyse des résultats

Dans les essais effectués, les trioxaquantels 9'H-**43**, 9'Me-**53** et 9'F-**54** n'ont pas d'activité schistosomicide. Les mélanges des quatre stéréoisomères administrés à des doses de 200 ou 400 mg/kg/j par voie orale sur les stades âgés du parasite (49 JPI [jour post-infestation]) n'induisent aucune réduction du nombre de vers de même que l'administration de deux des stéréoisomères isolés du 9'Me-**53** à 50 mg/kg/j par voie ip sur les stades âgés.

Malgré la présence d'un trioxane dans les molécules testées, les résultats obtenus sur les stades jeunes du parasite (23 JPI) sont moins bons qu'avec l'artéméther à 150 mg/kg/j par voie orale. L'administration par voie orale ou intrapéritonéale ne modifie pas les résultats, ce n'est donc pas un problème non-absorption par voie orale. En outre, le morceau trioxane fait perdre l'activité du fragment praziquantel qui est intégralement présent. Cette perte d'activité du fragment praziquantel serait-elle due à l'inhibition d'une interaction très spécifique du praziquantel avec une protéine ?

Il est bon de rappeler que seuls les stéréoisomères (*R, cis*) et (*R, trans*) du 9'Me-**53** ont été testés et n'ont induit aucune réduction. Si les stéréoisomères (*S, cis*) et (*S, trans*) du 9'Me-**53** (non encore testés) ont une activité (ou un seul des deux) alors la dose de 150 mg/kg/j administrée à 23 JPI (tableau 3, entrée 2) est bien inférieure à la DE₅₀.

Concernant les traitements à l'artéméther, une activité similaire a été notée avec des doses de 150 mg/kg/j par voie orale à 23 JPI, de 400 mg/kg/j par voie orale à 49 JPI et de 50 mg/kg/j par voie ip à 49 JPI. La dose est divisée par un facteur 8 quand on passe d'un traitement oral à un traitement ip. Il est donc envisageable d'obtenir une activité semblable à 23 JPI par l'injection d'une dose d'artéméther bien inférieure à 150 mg/kg/j.

Des tests complémentaires permettraient de compléter ces résultats. Tout d'abord, il pourrait être intéressant d'observer l'activité des trioxaquantels *in vitro*. En incubant, des schistosomules avec l'artéméther ou un trioxaquantel, en présence ou non d'hème, selon un protocole similaire à celui décrit par Tanner *et al.*, nous pourrions voir si les trioxaquantels infligent des dommages aux parasites [6]. Par ailleurs, les conditions supposées les plus

favorables pour diminuer les DE_{50} de l'artéméthér (et par conséquence des trioxanes) correspondent à des traitements avant 21 jours PI, pendant 5 jours consécutifs ou l'administration de trois doses de drogue à 2 semaines d'intervalle (administration à 7, 21, 35 JPI [5] ou à 14, 28, 42 JPI [7]). Un tel protocole, avec des administrations par voie orale ou ip, pourrait être appliqué. Par ailleurs l'activité de stéréosiomères (*S, cis*) et (*S, trans*) devrait être évaluée.

III – PARTIE EXPÉRIMENTALE

Pour les différents traitements, les souris d'une même cage reçoivent la même dose de drogue. Une semaine avant le traitement, elles sont pesées et le poids moyen par cage est calculé et sert à déterminer les quantités de molécule à peser pour chacune des doses. Les solutions pour le traitement des souris sont préparées de manière extemporanée.

Solution de méthylcellulose (0,6% wt/v) : 0,75 g de méthylcellulose est placé dans un erlenmeyer de 250 mL, à température ambiante. On ajoute le minimum d'eau et on place le récipient sous vive agitation magnétique jusqu'à l'obtention d'une crème translucide. On dilue alors progressivement à l'eau jusqu'à avoir au final 125 mL d'eau et on maintient la solution sous forte agitation pendant trois heures. L'agitation est coupée, on laisse décanter la solution qui est ensuite conservée au réfrigérateur pendant sept jours.

Solutions de gavage des souris : On pèse, dans un tube à hémolyse en verre, la quantité exacte de poudre (molécule de référence ou trioxaquantel) nécessaire à la préparation d'un millilitre de solution de gavage. On ajoute alors 5,0 μ L (0,5% v/v final) à la pipette automatique de Tween 80, préalablement chauffé à 37°C. On mélange sous agitation magnétique jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène. On ajoute alors la solution de méthylcellulose à la pipette automatique de façon à avoir un volume final de 1 mL, la contribution de la poudre au volume final étant estimée à 1 mL par gramme. Le mélange est homogénéisé (agitation magnétique, vortex, ultrasons) jusqu'à l'obtention d'une suspension laiteuse. La solution est alors placée sous agitation magnétique à 37°C jusqu'au traitement des souris.

Solutions de traitement intrapéritonéal des souris : On pèse, dans un tube à hémolyse en verre, la quantité exacte de poudre (molécule de référence ou trioxaquantel) nécessaire à la préparation d'un millilitre de solution injectable. On ajoute alors 25 μ L (2,5% v/v_{final}) à la pipette automatique de Tween 80, préalablement chauffé à 37°C. On mélange sous agitation

magnétique jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène. On ajoute alors l'éthanol de la pharmacopée européenne à la pipette automatique 50 µL (5% v/v_{final}) et on complète à 1 mL avec une solution de chlorure de sodium (8,5 ‰), la contribution de la poudre au volume final étant estimée à 1 mL par gramme. Le mélange est homogénéisé (agitation magnétique, vortex, ultrasons) jusqu'à l'obtention d'une suspension laiteuse. La solution est alors placée sous agitation magnétique à 37°C jusqu'au traitement des souris.

IV – BIBLIOGRAPHIE

- [1] Smithers S.R., Terry R.J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitol.* **1965**, *55*, 695-700.
- [2] Pica-Mattocchia L., Cioli D. Sex-and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. *Int. J. Parasitol.* **2004**, *34*, 527-533.
- [3] Duvall R.H., DeWitt W.B. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1967**, *16*, 483-486.
- [4] Andrews P. Praziquantel : mechanisms of anti-schistosomal activity. *Pharmac. Ther.* **1985**, *29*, 129-156.
- [5] Utzinger J., Chollet J., Tu Z., Xiao S.-H., Tanner M. Comparative study of the effects of artemether and artesunate on juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in experimentally infected mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *96*, 318-323.
- [6] Xiao S.-H., Chollet J., Utzinger J., Matile H., Jinyan M., Tanner M. Artemether administered together with haemin damages schistosomes *in vitro*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2001**, *95*, 67-71.
- [7] Utzinger J., Xiao S.-H., N'Goran E.,K., Bergquist R., Tanner M. The potential of artemether for the control of schistosomiasis. *Int. J. Parasitol.* **2001**, *31*, 1549-1562.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Depuis la découverte des schistosomias, il y a près de 4000 ans, de nombreuses molécules ont été testées au cours des 100 dernières années pour leur activité antischistosomose. Pourtant, aujourd'hui, le praziquantel est quasiment la seule molécule efficace contre cette maladie. Les dérivés de l'artémisinine aux propriétés antipaludiques éprouvées ont une certaine efficacité contre les schistosomes, mais ne peuvent être utilisés en monothérapie. Cette situation soulève deux problèmes majeurs. Le praziquantel étant utilisé systématiquement, une baisse de son efficacité en raison de l'apparition de résistance innée et/ou du développement de résistance acquise est à craindre. Par ailleurs, la maladie sévissant dans des régions impaludées, une perte de l'efficacité des dérivés de l'artémisinine, utilisés dans le cadre de programme de traitement des schistosomoses, pourrait apparaître. Dans ce contexte, il devient donc urgent de synthétiser de nouvelles molécules schistosomicides efficaces sur toutes les souches et bon marché.

Au cours de cette thèse, nous avons abordé deux aspects de la chimie thérapeutique dans le domaine de deux maladies parasitaires : les schistosomias et le paludisme. Dans le premier cas, il s'est agi de préparer et d'évaluer de nouvelles molécules. Dans le second cas, c'est une étude du mécanisme d'action de molécules ayant en commun un motif trioxane.

Dans la revue bibliographique, nous avons présenté le rôle de l'hème ainsi que l'importance du processus de détoxification par la polymérisation de l'hème-fer(II) libre toxique pour divers parasites hématophages (*Schistosoma*, *Plasmodium*, *Rhodnius*). L'étude du mécanisme d'action de trioxanes antipaludiques nous a permis de décrire l'activation réductrice du pont peroxyde par l'hème libéré lors de la digestion de l'hémoglobine par le parasite. Dans ce cas, l'hème " libre " joue à la fois les rôles d'activateur et de cible de ces trioxanes. Les trioxanes ont donc potentiellement un intérêt pour toutes les maladies dans lesquelles l'hème joue un rôle important.

Face aux problèmes de résistance des agents pathogènes, il est recommandé d'associer au moins deux composés actifs pour augmenter l'efficacité du traitement et retarder l'apparition de résistance. Nous avons donc envisagé de lier de manière covalente, dans une même molécule, deux pharmacophores ayant pour cible des stades différents du développement des schistosomes chez l'homme. Un individu porteur de la maladie présente en effet, à un instant t, des parasites d'âges variés. Un tel traitement aurait ainsi une efficacité sur tous les stades et donc augmenterait les chances de guérison. Les trioxaquantels, molécules duales, sont des hybrides du praziquantel, médicament classique des

schistosomiasis et d'un trioxane, susceptible de réagir avec l'hème. Deux générations de molécules ont été préparées. Pour la seconde génération, nous avons réussi à développer une synthèse nous permettant d'obtenir, via une synthèse convergente, les différents stéréoisomères de la molécule.

L'activité biologique des trioxaquantels a été évaluée sur des souris infectées par une souche brésilienne de *Schistosoma mansoni*. Les résultats sont décrits dans le dernier chapitre de ce mémoire. L'âge des parasites ainsi que la voie d'administration de la drogue ont été pris en compte. Il est apparu que les 3 trioxaquantels (possédant un atome d'hydrogène, de fluor ou un groupement méthyl en position 9') administrés en mélange des quatre stéréoisomères n'ont pas d'activité notable par voie orale ou intrapéritonéale. Si un seul des quatre stéréoisomères est actif, il peut alors avoir été administré en quantité inférieure à sa DE₅₀.

En conclusion, l'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire décrit une nouvelle famille de composés de structure simple, de synthèse aisée et facilement modulables : les trioxaquantels. L'activité antischistosomiasis *in vivo* de ces composés est à ce jour décevante. L'absence d'activité des trioxaquantels suggère fortement que la cible pharmacologique du praziquantel est une protéine spécifique, ce qui interdit probablement des modifications structurales importantes sur la partie cyclohexyle de ce médicament.

Ces travaux doivent trouver leur prolongement dans différentes directions. L'incubation *in vitro* de schistosomules et de trioxaquantels permettra de mesurer directement l'action de la drogue sur les parasites et de voir si des dommages leur sont infligés. Par ailleurs, l'activité des différents stéréoisomères des trioxaquantels doit être évaluée individuellement, particulièrement sur les stades jeunes du parasite. D'autres modulations de structure au niveau du trioxane pourraient être réalisées et permettre d'exemplifier cette famille de composés. Quand un produit actif aura été synthétisé, il sera intéressant de comparer l'activité du trioxaquantel à celle du mélange composé de praziquantel et de trioxane ainsi que d'étudier sa capacité à alkyler l'hème.

Pour finir, les molécules synthétisées présentent un trioxane susceptible de réagir avec l'hème, il serait intéressant d'évaluer leur activité sur d'autres organismes hématophages (*Plasmodium* [responsable du paludisme], *Rhodnius* [responsable de la maladie de Chaga], *Aede* [responsable de la dengue, de la fièvre jaune], *Boophilus* [responsable de l'anaplasmose], *Leishmania* [responsable de la leishmaniose], *babesia* [responsable de la piroplasmose], etc).

