



HAL
open science

Synthèse d'anti-androgènes organométalliques non stéroïdiens et application au traitement du cancer de la prostate

Olivier Payen

► **To cite this version:**

Olivier Payen. Synthèse d'anti-androgènes organométalliques non stéroïdiens et application au traitement du cancer de la prostate. Chimie. Chimie ParisTech, 2007. Français. NNT: . pastel-00002253

HAL Id: pastel-00002253

<https://pastel.hal.science/pastel-00002253>

Submitted on 9 Sep 2010

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.

Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie (Paris VI)

École doctorale de Chimie Moléculaire

Spécialité : Chimie Organométallique

Présentée par Olivier PAYEN

Pour obtenir le grade de docteur de l'université Paris VI

Synthèse d'anti-androgènes organométalliques non stéroïdiens et application au traitement du cancer de la prostate.

Soutenue le 14 Mars 2007,

devant le jury composé de

Mr Michael J. McGlinchey, Rapporteur

Mr Michel Pfeffer, Rapporteur

Mr Max Malacria, Examineur

Mr Gérard Jaouen, Examineur

Mr Siden Top, Directeur de thèse

Préparée à l'École nationale supérieure de chimie de Paris



Remerciements

Ce travail de recherche a été effectué dans le Laboratoire de Chimie et Biochimie des Complexes Moléculaires, situé à l'ENSCP (Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris), associé au CNRS UMR 7576.

Je remercie le Pr. Gérard Jaouen pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Ce travail n'aurait pas pu se faire sans son aide précieuse, sa patience, sa gentillesse, ses compétences en chimie et son professionnalisme. Ses encouragements, associés aux moyens matériels dont j'ai disposés, m'ont permis de mener à bien la recherche présentée dans ce rapport. C'est pourquoi je lui exprime ma plus grande gratitude.

Je remercie le Dr. Siden Top qui a encadré ce travail de toutes ses connaissances précieuses en chimie et de toute sa gentillesse. Je le remercie d'avoir été patient à mon égard, d'avoir su me guider dans ce travail, d'avoir été présent chaque fois que j'en avais besoin. Sa grande culture de la chimie organométallique a été une source de solutions pour tous les problèmes qui se sont présentés durant ces trois années. Enfin, je le remercie pour avoir toujours été disponible, dans les bons comme dans les mauvais moments.

Je remercie le Dr. Michel Pfeffer (Directeur de Recherche, Université de Strasbourg), ainsi que le Pr. Michael J. McGlinchey (University College Dublin, Irlande), d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie également le Pr. Max Malacria (Jussieu, Paris 6) pour avoir accepté d'être membre de mon jury. C'est pour moi un honneur et un privilège de leur présenter mon travail de recherche. Je leur exprime ma plus grande gratitude et mon plus profond respect.

J'adresse aussi mes remerciements à la partie biologie du laboratoire, en particulier à Mme A. Vessières Jaouen (Directeur de recherche), et à Mlle M. A. Plamont (Assistante ingénieur) pour les tests biologiques comprenant le calcul des RBA et les tests anti-prolifératifs. Leur aide et leur sympathie m'ont été très précieuses tout au long de ce travail. Je remercie aussi Dr. M. N. Rager pour avoir effectué les spectres RMN, ainsi que pour sa disponibilité.

Je remercie les membres permanents de la partie chimie du laboratoire : Mr S. Dagorne (ex Chargé de recherche au laboratoire), Mr P. Haquette (Maître de conférences), Mr F. Lebideau (Chargé de recherche), Mr P. Pigeon (Ingénieur recherche), pour leur disponibilité, leur soutien, leur professionnalisme, leurs connaissances en chimie et pour leur extrême gentillesse. Les conversations que nous avons eues, surtout avec Mr Lebideau et Mr Pigeon, furent extrêmement utiles ainsi qu'un plaisir.

Je présente enfin mes amitiés à tous les étudiants qui ont travaillé dans ce laboratoire, durant cette période, et à tous les doctorants ou ex-doctorants de notre laboratoire, que j'ai eu le plaisir de rencontrer, Dr. Benoît Ferber, Dr. Vincent Lecomte, Mlle Anh Nguyen (2^{ème} année), et M. Jean Hugues Mirebeau (1^{ère} année). Ils ont fait de cette thèse un travail très intéressant et agréable et m'ont beaucoup apporté sur le plan humain.

Abréviations

<i>Abréviation</i>	<i>Définition</i>
RBA	Relative Binding Affinity
AR	Androgen Receptor
DHT	Dihydrotestostérone
HSD	Hydroxystéroïde Deshydrogénase
DHEA	Déhydroépiandrostérone
LH	Luteinising Hormone
GnRH	Gonadotropine Releasing Hormone
BPH	Benign Prostate Hypertrophy
ER	Estrogen Receptor
NTD	N-Terminal Domain
DBD	DNA Binding Domain
LBD	Ligand Binding Domain
AF	Activation Function
NLS	Nuclear Localisation Signal
LBP	Ligand Binding Pocket
HSP	Heat Shock Protein
ARE	Androgen Response Element
PSA	Prostate Specific Antigen
DIMP	N-[(3,5-dimethyl)-4-isoxazolyl] methyl] phthalimide
SARM	Selective Androgen Receptor Modulator
t.a.	Température ambiante
TBAF	Fluorure de Tétrabutylammonium
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
THF	Tétrahydrofurane
DMF	N,N-Diméthylformamide
DMA	N,N-Diméthylacétamide
R _f	Rapport frontal
Mp	Point de fusion
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Cp	Cyclopentadiényle
Ts	<i>para</i> -Toluènesulfonyl
TBDMS	<i>tert</i> -butyl-diméthyl-silyl
NFP	N-Formylpipéridine
APTS	Acide <i>para</i> -toluènesulfonique
<i>tert</i> ou <i>sec</i> -Bu	<i>tert</i> ou <i>sec</i> -butyl

Sommaire

REMERCIEMENTS.....	2
ABREVIATIONS.....	3
INTRODUCTION GENERALE.....	7
CHAPITRE 1 : SITUATION DU TRAVAIL.....	10
I. Généralités sur les stéroïdes.....	12
I.1. Stéroïdes et androgènes.....	12
I.2. Les récepteurs à androgènes.....	16
II. Les cancers de la prostate hormono-dépendants.....	21
II.1. Généralités sur le cancer de la prostate.....	21
II.2. Généralités sur les anti-androgènes.....	23
II.3. Les anti-androgènes non stéroïdiens.....	24
III. Relation Structure/Activité entre les ligands et le récepteur AR.....	30
III.1. Les SARMs (Selective Androgen Receptor Modulators).....	30
III.2. Domaine de liaison au ligand du récepteur AR lié à un androgène.....	32
III.3. Domaine de liaison au ligand de AR lié à un anti-androgène.....	33
CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE ET ÉTUDE DE DÉRIVÉS FERROCÉNIQUES DE LA FLUTAMIDE, DU 2-HYDROXYFLUTAMIDE ET DE LA BICALUTAMIDE.....	34
I. Introduction.....	36
II. Synthèse des analogues ferrocéniques de la flutamide.....	38
II.1. Synthèse du dérivé ferrocénique 5	38
II.2. Synthèse des dérivés ferrocéniques 6 et 7	40

III.	Synthèse du 2-hydroxyflutamide et des analogues ferrocéniques de la bicalutamide.....	41
III.1.	Synthèse du 2-hydroxyflutamide 8	41
III.2.	Synthèse des dérivés ferrocéniques 15 et 16 de la bicalutamide.....	42
IV.	Résultats des tests biologiques.....	44
IV.1.	Tests RBA.....	44
IV.2.	Tests d'activité anti-proliférative sur les cellules tumorales LNCaP.....	47
IV.3.	Tests d'activité anti-proliférative sur les cellules tumorales PC3.....	51
IV.4.	Résultats des calculs d'IC50.....	53
V.	Conclusion.....	54
VI.	Partie expérimentale.....	55
	CHAPITRE 3 : SYNTHÈSE ET ÉTUDE DE DÉRIVÉS FERROCÉNIQUES DE LA NILUTAMIDE.....	66
I.	Introduction.....	68
II.	Synthèse et études biologiques d'analogues N-ferrocénylalkyles.....	69
II.1.	Stratégie de synthèse.....	69
II.2.	Les étapes de la synthèse.....	70
II.3.	Résultats des tests biologiques.....	74
III.	Synthèse et études biologiques d'analogues 4'-ferrocényles.....	81
III.1.	Introduction.....	81
III.2.	Synthèse.....	82
III.3.	Résultats des tests biochimiques.....	83
IV.	Conclusion.....	88
V.	Partie expérimentale.....	90

CHAPITRE 4 : SYNTHÈSE DE DERIVES FERROCENIQUES D'ANTI-ANDROGENES CONTENANT UN FERROCENE DISUBSTITUE.....	101
I. Introduction.....	103
II. Synthèse de l'analogue ferrocénique 1,2-disubstitué de la nilutamide.....	105
II.1. Généralités sur les ferrocènes 1,2-disubstitués.....	105
II.2. Stratégie de synthèse du composé 43	105
II.3. Les étapes de la synthèse.....	107
III. Résultats des tests biochimiques.....	111
III.1. Tests RBA.....	111
III.2. Tests d'activité anti-proliférative sur les cellules PC3.....	113
III.3. Résultats des calculs d'IC50.....	115
III.4. Conclusion.....	115
IV. Synthèse d'un analogue ferrocénique 1,2-disubstitué des carboranes.....	116
IV.1. Introduction.....	116
IV.2. Stratégie de synthèse.....	117
IV.3. Les étapes de la synthèse.....	117
V. Conclusion.....	121
VI. Partie expérimentale.....	123
CONCLUSION GENERALE.....	135
ANNEXE 1.....	142
ANNEXE 2.....	144

Introduction Générale

Notre laboratoire s'intéresse depuis de nombreuses années à l'utilisation de composés organométalliques dans le cadre de la recherche de nouvelles approches thérapeutiques. En effet, leur potentiel cytotoxique ou radioactif, peut être bénéfique dans la lutte contre de nombreuses maladies. Le laboratoire s'inscrit précisément dans le domaine de la chimie bio-organométallique utilisée à des fins thérapeutiques. Son objectif est de synthétiser des analogues de molécules d'intérêt biologique comportant un groupe organométallique cytotoxique tel que le ferrocène, les complexes de manganèse, de rhénium, de technétium ou de rhodium. Ces molécules seraient susceptibles de traiter plusieurs formes de cancers hormono-dépendants ou non. Les cancers auxquels le laboratoire s'intéresse sont parmi les plus répandus, tels le cancer du sein et de la prostate.

Dans le cas des cancers du sein hormono-dépendants, de nombreux travaux ont été effectués et publiés dans la littérature. Par exemple, le tamoxifène et son métabolite actif, le 4-hydroxytamoxifène (Figure 1), ont été découverts par Harper et Walpole¹. Ce sont des ligands de récepteurs à oestrogènes possédant un effet anti-oestrogénique dans les seins. Des études ont montré leur efficacité pour le traitement du cancer du sein.^{2,3} Partant de cette découverte, le laboratoire s'est intéressé à la synthèse de dérivés ferrocéniques de ces molécules. En effet, leur utilisation en chimie bio-organométallique permet d'envisager des molécules plus actives, le ferrocène entrant via des mécanismes encore mal connus, menant à la destruction de cellules cancéreuses. L'ion ferricinium est probablement responsable de cette activité cytotoxique.⁴⁻⁶

De nombreux travaux ont été réalisés au laboratoire pour exalter cette propriété. En effet, différentes molécules organométalliques, telles que les hydroxyferrocifènes⁷⁻⁹ ou les dérivés

¹ Harper M.J., Walpole A.L., *Nature*, **1966**, 212, 87.

² Dhingra K., *Invest. New Drugs*, **1999**, 17, 285.

³ McGregor J.I., Jordan V.C., *Pharmacol. Rev.*, **1998**, 50, 151.

⁴ Köpf-Maier P., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1994**, 47, 1.

⁵ Köpf-Maier P., Köpf H., *Chem Rev.*, **1987**, 87, 1137.

⁶ Mason R.W., McGrouther K., Ranatunge-Bandarage P.R.R., Robinson B.H., Simpson J., *Appl. Organomet. Chem.*, **1999**, 13, 163.

⁷ Top S., Tang J., Vessières A., Carrez D., Provot C., Jaouen G., *Chem. Commun.*, **1996**, 955.

⁸ Top S., Vessières A., Leclercq G., Quivy J., Tang J., Vaissermann J., Huché M., Jaouen G., *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 5223.

⁹ Jaouen G., Top S., Vessières A., Pigeon P., Leclercq G., Laios I., *Chem. Commun.*, **2001**, 383.

organométalliques de l'éthynyloestradiol¹⁰⁻¹³ ont récemment été développées (Figure 1). Les hydroxyferrocifènes sont des analogues très actifs qui miment le comportement du 4-hydroxytamoxifène, mais vont au delà. Ils ont montré, sur des cellules *in vitro*, des résultats prometteurs contre le cancer du sein tant hormono-dépendant qu'indépendant.

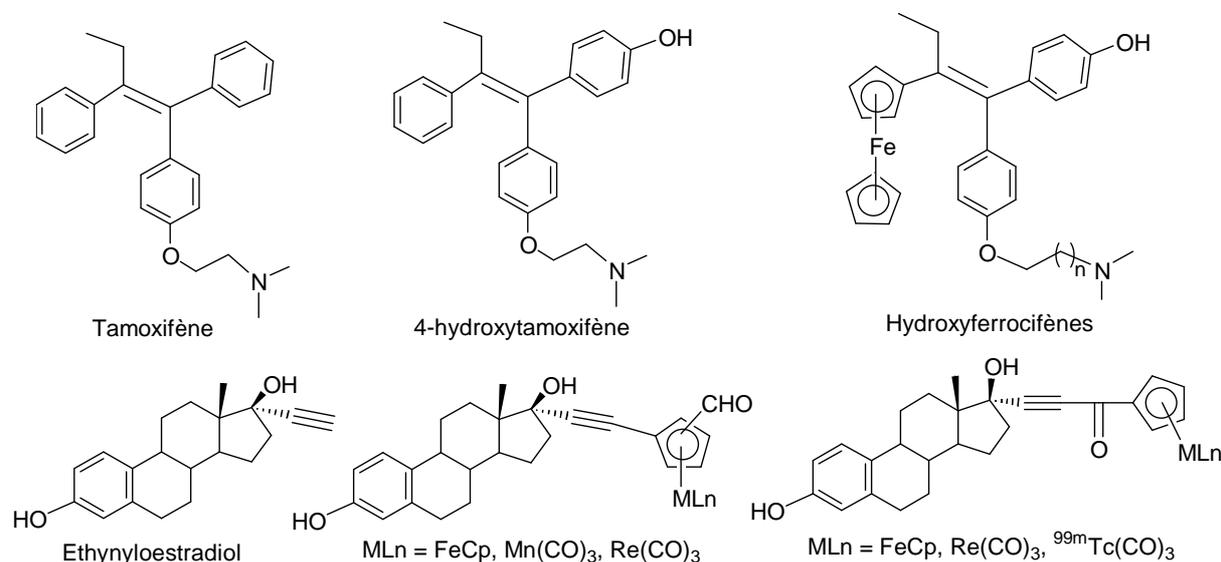


Figure 1 : Exemples d'antioestrogènes et d'analogues organométalliques développés au laboratoire

Concernant les cancers de la prostate hormono-dépendants, des travaux préalables ont été entrepris au sein du laboratoire sur des stéroïdes complexés par le groupe organométallique CpRe(CO)₃.^{14, 15} Cette stratégie consistant à introduire des groupes organométalliques adaptés a été appliquée. On peut, par conséquent, élaborer de nouvelles molécules organométalliques, en l'occurrence ferrocéniques, qui sont des analogues d'anti-androgènes. Ces composés seraient susceptibles d'agir contre le cancer de la prostate, mais surtout d'améliorer les effets.

Ce rapport présente la synthèse de quelques analogues, dont quelques exemples sont présentés sur la Figure 2. Dans un premier temps, nous nous intéresserons à la synthèse de dérivés ferrocéniques d'anti-androgènes non stéroïdiens connus tels que la flutamide, l'hydroxyflutamide et la bicalutamide. Nous avons, dans un deuxième temps, envisagé la synthèse de dérivés ferrocéniques d'un autre anti-androgène non stéroïdien connu, la

¹⁰ Masi S., Top S., Boubeker L., Jaouen G., Mundwiler S., Spingler B., Alberto R., *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2004**, 2013.

¹¹ Ferber B., Top S., Jaouen G., *J. Organomet. Chem.*, **2004**, 689, 4872.

¹² Ferber B., Top S., Welter R., Jaouen G., *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 2081.

¹³ Ferber B., Top S., Vessières A., Welter R., Jaouen G., *Organometallics*, **2006**, 25, 5730.

¹⁴ Le Bideau F., El Bachir K., Haquette P., Kernbach U., Marrot J., Stéphan E., Top S., Vessières A., Jaouen G., *Chem. Commun.*, **2000**, 211.

¹⁵ Le Bideau F., Perez-Luna A., Marrot J., Rager M.N., Stéphan E., Top S., Jaouen G., *Tetrahedron*, **2001**, 57, 3939.

nilutamide. Dans un troisième temps, nous avons développé une synthèse d'analogues ferrocéniques comportant un ferrocène 1,2-disubstitué.

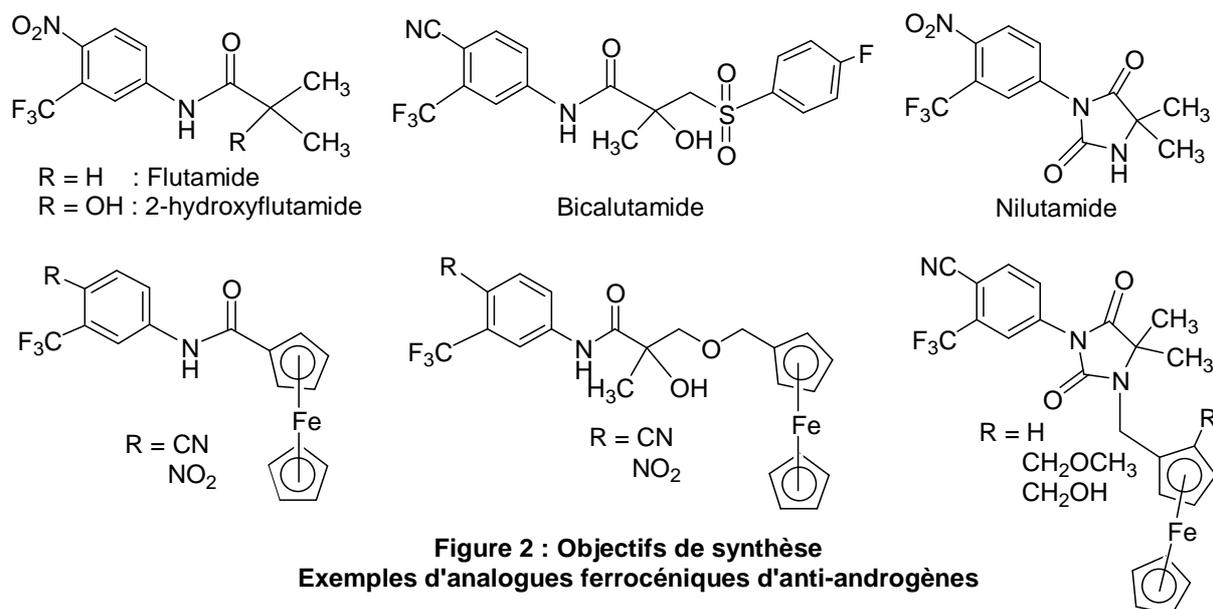


Figure 2 : Objectifs de synthèse
Exemples d'analogues ferrocéniques d'anti-androgènes

Une fois synthétisées, ces molécules sont soumises à une série de tests biologiques entrepris au sein du laboratoire. Ces tests sont, d'une part, des tests d'affinité relative de liaison (RBA) au récepteur à androgènes (AR) effectués sur des récepteurs AR purifiés et, d'autre part, une série de tests anti-prolifératifs réalisés *in vitro* sur des lignées cellulaires tumorales prostatiques hormono-dépendantes (LNCaP) et hormono-indépendantes (PC3). Ces tests nous permettront de définir si ces molécules possèdent un intérêt particulier dans le cadre de la lutte contre le cancer de la prostate hormono-dépendant ou indépendant.

Chapitre 1 : Situation du travail

SOMMAIRE

I.	Généralités sur les stéroïdes.....	12
I.1.	Stéroïdes et androgènes.....	12
I.1.a.	Les stéroïdes.....	12
I.1.b.	Les androgènes.....	14
I.1.c.	Synthèse et métabolisme de la testostérone.....	14
I.2.	Les récepteurs à androgènes.....	16
I.2.a.	Généralités.....	16
I.2.b.	Structure du gène et de la protéine AR.....	17
I.2.c.	Conformation et fonction du récepteur AR.....	19
II.	Les cancers de la prostate hormono-dépendants.....	21
II.1.	Généralités sur le cancer de la prostate.....	21
II.1.a.	Quelques chiffres.....	21
II.1.b.	Les différents traitements utilisés contre le cancer de la prostate....	21
II.1.c.	Les traitements hormonaux.....	21
II.2.	Généralités sur les anti-androgènes.....	23
II.2.a.	Définition.....	23
II.2.b.	Classification.....	23
II.3.	Les anti-androgènes non stéroïdiens.....	24
II.3.a.	Description des anti-androgènes non stéroïdiens commerciaux.....	25
II.3.b.	Utilisation des anti-androgènes dans le traitement hormonal.....	26

II.3.c. Autres exemples d'anti-androgènes non stéroïdiens.....	27
III. Relation Structure/Activité entre les ligands et le récepteur AR.....	30
III.1. Les SARMs (Selective Androgen Receptor Modulators).....	30
III.1.a. Concept.....	30
III.1.b. Relation Structure/Activité.....	31
III.2. Domaine de liaison au ligand du récepteur AR lié à un androgène.....	32
III.3. Domaine de liaison au ligand de AR lié à un anti-androgène.....	33

I. Généralités sur les stéroïdes

Dans cette partie d'introduction, nous présenterons différentes notions nécessaires à la compréhension du sujet. Ainsi, nous définirons quelques éléments incontournables de biologie et de biochimie pour justifier le sujet de recherche abordé dans ce travail. Ces généralités traiteront, dans un premier temps, des androgènes et de leur influence sur les cancers de la prostate hormono-dépendants, dans le but d'introduire le concept de chimie bio-organométallique. Nous traiterons ensuite des anti-androgènes et les études de relation structure/activité qui ont été démontrées sur des récepteurs à androgènes AR.

I.1. Stéroïdes et androgènes

I.1.a. Les stéroïdes

En 1905, William M. Bayliss et Ernest H. Starling¹⁶ ont défini pour la première fois le concept d'hormones. Les hormones sont des messagers chimiques de l'organisme, agissant sur un organe ou un tissu cible situé à distance de l'organe émetteur. Cette définition regroupe un très grand nombre de molécules, certaines protéiniques, d'autres peptidiques, des amines et bien d'autres molécules, parmi lesquelles les stéroïdes.

Le terme générique « stéroïde » rend compte des caractéristiques physico-chimiques des premiers représentants de cette famille, isolés de la fraction insaponifiable d'extraits lipidiques animaux. Il s'agissait, en effet, d'alcools secondaires se singularisant par leur état solide cristallisé et fondant à des températures supérieures à 100°C. Le nom « stérol », issu du mot grec *stéréos* (= solide) et de la désinence -ol, spécifique des alcools, traduit ces propriétés. Le premier de ces composés fut isolé, vers 1770, de calculs biliaires, par Poulletier de la Salle, puis trouvé aussi, en 1816, dans les graisses animales, par M. E. Chevreul.¹⁷ Il fut nommé « cholestérine » (du grec *khole* = bile et *stéréos* = solide) en souvenir de la source où il avait été découvert initialement. En 1859, M. Berthelot, prenant en considération l'alcool, modifia le nom en cholestérol. Depuis lors, d'autres composés voisins ont été isolés.

A partir de 1936, le terme générique « stéroïde » est donné à tous les corps chimiques possédant un noyau de type gonane (Figure 3), identique ou proche de celui des stérols, alors

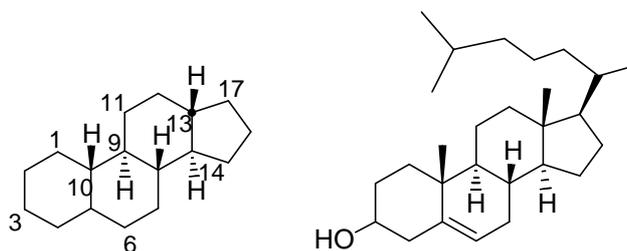


Figure 3 : Le noyau de type gonane et le cholestérol

¹⁶ Starling E.H., *Lancet*, **1905**, 2, 339.

¹⁷ Chevreul M.E., *Ann. Chim. Phys.*, **1816**, 2, 339.

que la dénomination « stérol » est réservée aux seuls 3β -hydroxystéroïdes porteurs d'une chaîne en position 17 et de deux méthyles en position 10 et 13.

Enfin, les nombreuses propriétés thérapeutiques des stéroïdes hormonaux et des molécules apparentées ont rendu nécessaires leur production industrielle. Celle-ci est effectuée principalement par synthèse chimique. Depuis plus de 50 ans, l'industrie pharmaceutique les prépare, soit par héli-synthèse à partir de stéroïdes naturels, soit par synthèse totale.

La famille des stéroïdes a été divisée par les scientifiques en cinq grandes classes, suivant la réponse biologique qu'ils entraînent. Quelques exemples de ces stéroïdes ont été présentés sur la Figure 4.

- *les glucocorticoïdes* (ex : Cortisol) : ils sont synthétisés par la glande corticosurrénale et interviennent dans les mécanismes luttant contre le stress et les inflammations.
- *les minéralocorticoïdes* (ex : Aldostérone) : ils sont synthétisés par la glande corticosurrénale ; ils régulent l'activité des reins et sont employés par la médecine comme des anesthésiants locaux.
- *les hormones progestatives* (ex : Progestérone) : elles sont sécrétées par les ovaires ou le placenta chez la femme et régulent le cycle menstruel.
- *les oestrogènes* (ex : Oestradiol) : ils sont sécrétés par les gonades, le cerveau (hypothalamus) et les tissus adipeux (seins). Ces hormones sont nécessaires à la sexualité de la femme adulte et provoquent l'oestrus (= phase de l'ovulation).
- *les androgènes* (ex : Testostérone, 5α -dihydrotestostérone ou 5α -DHT) : ce sont des hormones sexuelles mâles sécrétées par les gonades. Elles interviennent dans le processus de la puberté et sont nécessaires à la sexualité de l'homme adulte.

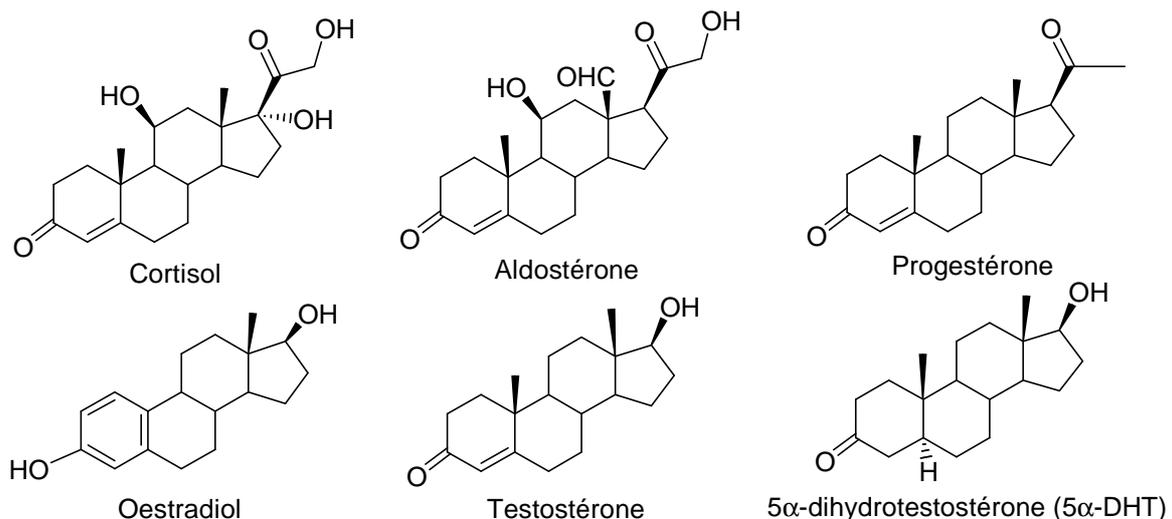


Figure 4 : Exemple de stéroïdes

I.1.b. Les Androgènes

Comme le montre la Figure 4, les androgènes possèdent des caractéristiques communes aux autres classes, à l'exception des oestrogènes. En effet, le cycle A se présente sous la forme d'un cyclohexénone, tandis qu'il se présente sous la forme d'un phénol dans le cas des oestrogènes. Cette famille comprend principalement la testostérone, la 5 α -DHT et l'androstènedione. L'androstènedione est sécrétée par les glandes surrénales. La testostérone est sécrétée à 95% par les testicules (cellules de Leydig) et à 5% par les glandes surrénales. Elle existe aussi chez la femme où c'est la matière première utilisée dans l'ovaire pour fabriquer l'oestradiol. L'identification chimique de ces androgènes remonte à la deuxième moitié des années 1920 et aux années 1930. Ils ont été isolés à partir des urines humaines ou animales (Butenandt, 1934 ; Fieser, 1959). L'androstènedione est convertie en testostérone par la 17 β -hydroxystéroïde deshydrogénase (17 β -HSD). La testostérone est ensuite transformée, par la 5 α -réductase, en 5 α -DHT qui est le métabolite actif de la testostérone.

I.1.c. Synthèse et métabolisme de la testostérone

La testostérone est synthétisée à partir du cholestérol, suivant le Schéma 1, dans les cellules

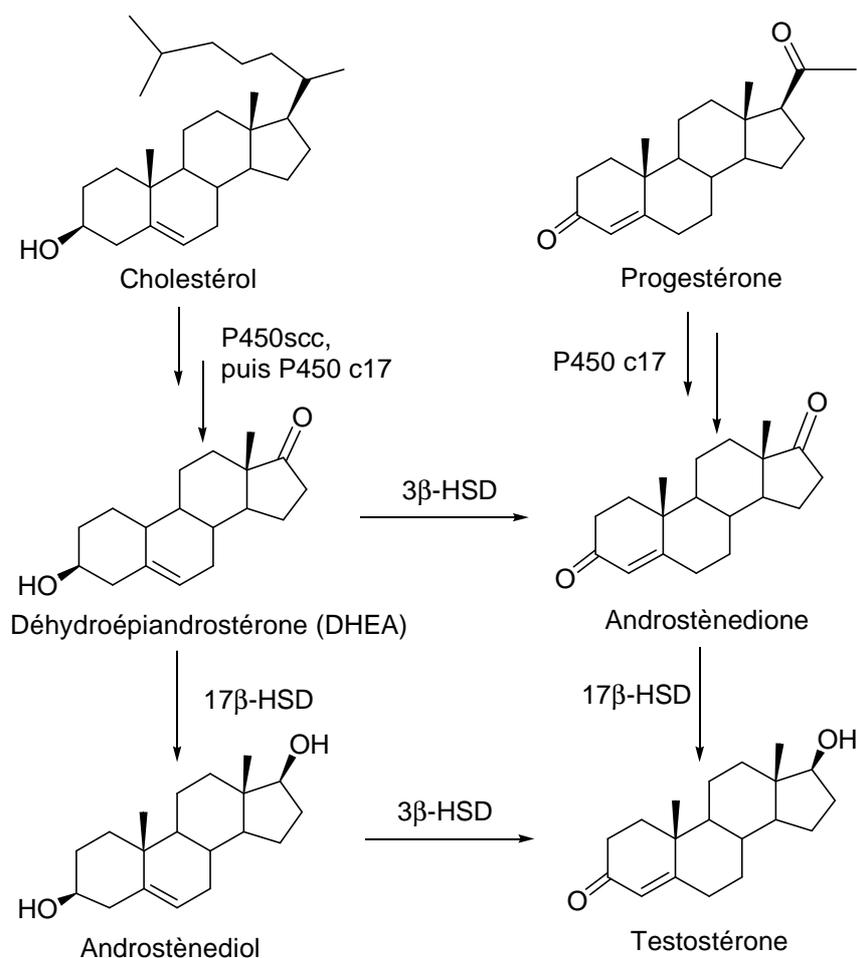


Schéma 1 : Synthèse de la testostérone

de Leydig situées dans les testicules.¹⁸ Elle est aussi synthétisée dans le foie et dans l’ovaire chez la femme. L’étape limitante de cette synthèse est le clivage de la chaîne latérale du cholestérol par l’intermédiaire d’une enzyme, le cytochrome P450_{sc}. Elle est régulée par l’hormone lutéinique (LH). Cette hormone est produite dans la glande pituitaire et sa sécrétion est contrôlée par la gonado-libérine (GnRH), cette hormone peptidique étant produite dans l’hypothalamus. La sécrétion de LH est également régulée par la testostérone elle-même au niveau de la glande pituitaire et de l’hypothalamus. Des stéroïdes précurseurs inactifs, tels que la déhydroépiandrostérone (DHEA) et l’androstènedione, sont convertis en androgènes actifs dans de nombreux tissus, incluant la prostate.

Le métabolisme de la testostérone est présenté sur le Schéma 2.¹⁹ La testostérone est métabolisée soit dans ses organes cibles, soit dans le foie.²⁰⁻²² Dans la glande prostatique, la peau et le foie²³, elle est réduite en 5 α -DHT par la 5 α -réductase en présence d’un cofacteur, le NADPH.²⁴ D’autre part, une petite quantité (0,2%) peut aussi être convertie en oestradiol par une enzyme, la P450 aromatasase. Elle permet le clivage du groupe méthyle C19 et

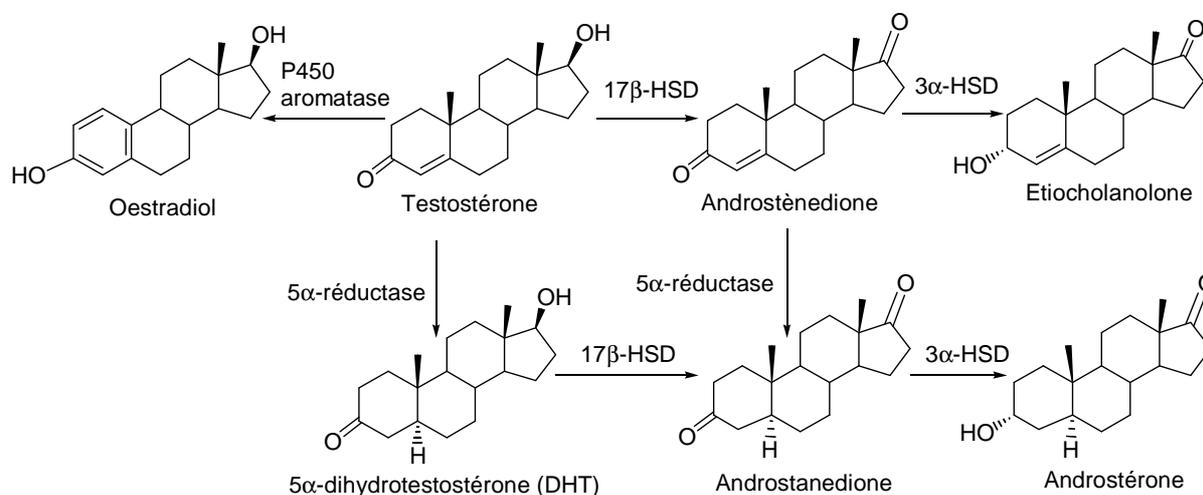


Schéma 2 : Métabolisme de la testostérone

¹⁸ Miller W.L., *Endocr. Rev.*, **1988**, 9, 295.

¹⁹ Bélanger A., Pelletier G., Labrie F., Barbier O., Chouinard S., *Trends Endocrinol. Metab.*, **2003**, 14, 473.

²⁰ Burger A., Abraham D.J., *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*, 6th ed., Wiley: Hoboken, NJ, **2003**.

²¹ Dorfman R.I., Ungar F., *Metabolism of steroid hormones*, 2nd ed., Academic Press: New York, **1965**.

²² Verderame M., *CRC handbook of hormones, vitamins and radiopaques*, CRC Press: Boca Raton, FL, **1986**.

²³ Thigpen A.E., Silver R.I., Guileyardo J.M., Casey M.L., McConnell J.D., Russell D.W., *J. Clin. Invest.*, **1993**, 92, 903.

²⁴ Russell D.W., Berman D.M., Bryant J.T., Cala K.M., Davis D.L., Landrum C.P., Prihoda J.S., Silver R.I., Thigpen A.E., Wigley W.C., *Recent Prog. Horm. Res.*, **1994**, 49, 275.

l'aromatisation du cycle A, principalement dans les tissus adipeux chez l'homme et dans les ovaires chez la femme. Ces deux processus sont irréversibles. Après administration de testostérone radioactive, environ 90% de la radioactivité se retrouve dans l'urine et 6% dans les fèces.²⁵ Les principaux métabolites retrouvés dans l'urine comprennent l'androstérone et l'étiocolanone et sont inactifs. Après administration orale, la demi vie de la testostérone est de moins de 30 minutes. En effet, 90% de la testostérone est métabolisée dans le foie, avant d'atteindre la circulation systémique.

Chez les hommes adultes, il a été clairement établi que les androgènes jouent un rôle majeur dans les désordres prostatiques, tels que l'hypertrophie bénigne de la prostate (BPH) et le cancer de la prostate.²⁶ Ils jouent aussi un rôle majeur dans les maladies cutanées, telles que l'acné, l'hirsutisme (ou hyperpilosité féminine) et l'alopecie androgénique (ou calvitie).^{27, 28} En effet, il a été montré qu'ils permettaient la sécrétion de la glande sébacée pour stimuler la croissance pileuse chez les femmes hirsutes. Ils ont deux effets principaux : un effet anabolisant exprimé dans les muscles et les os et un effet androgénique exprimé dans les organes reproducteurs (prostate, vésicule séminale, testicules). Ces effets sont consécutifs à leur liaison sur un récepteur spécifique appelé récepteur à androgènes (AR).

I.2. Les récepteurs à androgènes

I.2.a. Généralités

Le récepteur à androgènes AR appartient à la superfamille des récepteurs stéroïdiens et nucléaires.²⁹⁻³¹ Parmi ces récepteurs, seuls cinq sont connus chez les Vertébrés : les récepteurs à oestrogènes (ER), à progestérone, gluco- et minéralo-corticoïdiens, et le récepteur AR. Comme tous ces récepteurs, AR est une protéine soluble qui fonctionne comme un facteur de transcription intracellulaire. AR est particulièrement exprimé dans les tissus cibles des androgènes, tels que la prostate, les muscles, le foie et le système nerveux central, avec un niveau d'expression très élevé observé dans la prostate.³² Il est aussi localisé dans la peau,

²⁵ Goodman L.S., Hardman J.G., Limbird L.E., Gilman A.G., *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed., McGraw-Hill Medical Pub. Division: New York, **2001**.

²⁶ Sciarra F., Toscano G., Concolino G., Di Silverio F., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1990**, 37, 349.

²⁷ Cunliffe W.J., Simpson N.B., *Percutaneous Absorption of Steroids*, Academic Press, New York, **1980**.

²⁸ Dorfman R.I., Shipley R.A., *Androgens: Biochemistry, Physiology and Clinical Significance*, John Wiley and Sons, New York, **1956**.

²⁹ Evans R.M., *Science*, **1988**, 240, 889.

³⁰ Rosen J., Day A., Jones T.K., Jones E.T., Nadzam A.M., Stein R.B., *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 4855.

³¹ Freedman L.P., *Molecular Biology of steroid and nuclear hormone receptors*, Birkhauser: Boston, MA, **1998**.

³² Johansen K.L., *Semin. Dial.*, **2004**, 17, 202.

notamment dans les glandes sébacées. Physiologiquement, le récepteur AR activé par la liaison d'androgènes est responsable de la différenciation sexuelle et des changements morphologiques observés lors de la puberté.

I.2.b. Structure du gène et de la protéine AR

En 1981, Migeon a localisé pour la première fois le gène AR situé sur le chromosome humain X.³³ En 1988, Lubahn a cloné l'ADN génomique humain codant pour le récepteur AR, en utilisant une séquence consensus à partir du domaine de liaison à l'ADN de la famille des récepteurs nucléaires.³⁴ La même année, plusieurs groupes ont cloné des ADNc humains codant pour le récepteur AR.³⁵⁻³⁷ A ce jour, un seul gène codant pour le récepteur AR a été identifié chez l'homme.

Le gène codant pour le récepteur AR a une longueur de 90 kb et code une protéine de 919 acides aminés possédant trois principaux domaines fonctionnels (Figure 5). Le domaine N-terminal (NTD), codé par l'exon 1 (1586 bp), a une fonction modulateur. Le domaine de

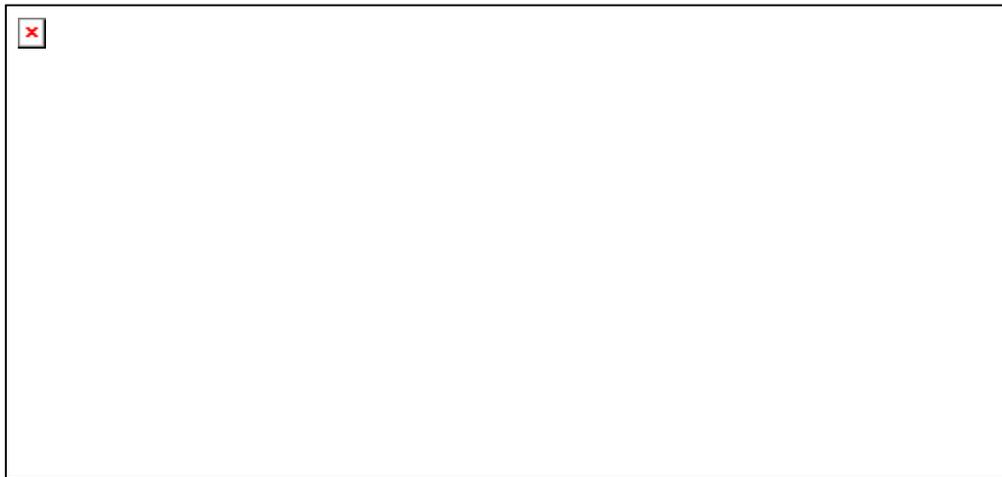


Figure 5 : Structure du gène et de la protéine AR.³⁸

³³ Migeon B.R., Brown T.R., Axelman J., Migeon C.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1981**, 78, 6339.

³⁴ Lubahn D.B., Joseph D.R., Sullivan P.M., Willard H.F., French F.S., Wilson E.M., *Science*, **1988**, 240, 327.

³⁵ Chang C.S., Kokontis J., Liao S.T., *Science*, **1988**, 240, 324.

³⁶ Lubahn D.B., Joseph D.R., Sar M., Tan J., Higgs H.N., Larson R.E., French F.S., Wilson E.M., *Mol. Endocrinol.*, **1988**, 2, 1265.

³⁷ Trapman J., Klaassen P., Kuiper G.G., Van der Korput J.A., Faber P.W., Van Rooij H.C., Geurts van Kessel A., Voorhorst M.M., Mulder E., Brinkmann A.O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1988**, 153, 241.

³⁸ McEwan I.J., *Endocr. Relat. Cancer*, **2004**, 11, 281.

liaison à l'ADN (DBD) est codé par les exons 2 et 3 (152 et 117 bp respectivement).³⁸ Le domaine de liaison au ligand (LBD) C-terminal est codé par cinq exons (4-8) variant de 131 à 288 bp en longueur. Il existe également une petite région charnière entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison au ligand. Deux fonctions de transactivation ont aussi été identifiées. La fonction d'activation 1 N-terminale (AF1) est active dans un récepteur tronqué qui ne contient pas de LBD et n'est pas conservée dans la séquence, alors que la fonction d'activation 2 C-terminale (AF2) fonctionne d'une manière dépendante du ligand et est mieux conservée dans la séquence.³⁹ Un signal de localisation nucléaire (NLS) se trouve dans une région comprise entre le DBD et la région charnière.

Les structures cristallographiques des domaines de liaison au ligand et à l'ADN de différents récepteurs nucléaires ont été résolues ; néanmoins, aucune structure cristallographique d'un récepteur entier n'est encore disponible à ce jour. La première structure tridimensionnelle du LBD du récepteur AR a été résolue en 2000 par Matias.⁴⁰ Ce domaine partage une structure tridimensionnelle similaire aux autres récepteurs stéroïdiens, comme le récepteur à oestrogènes ER. La structure cristallographique du domaine de liaison

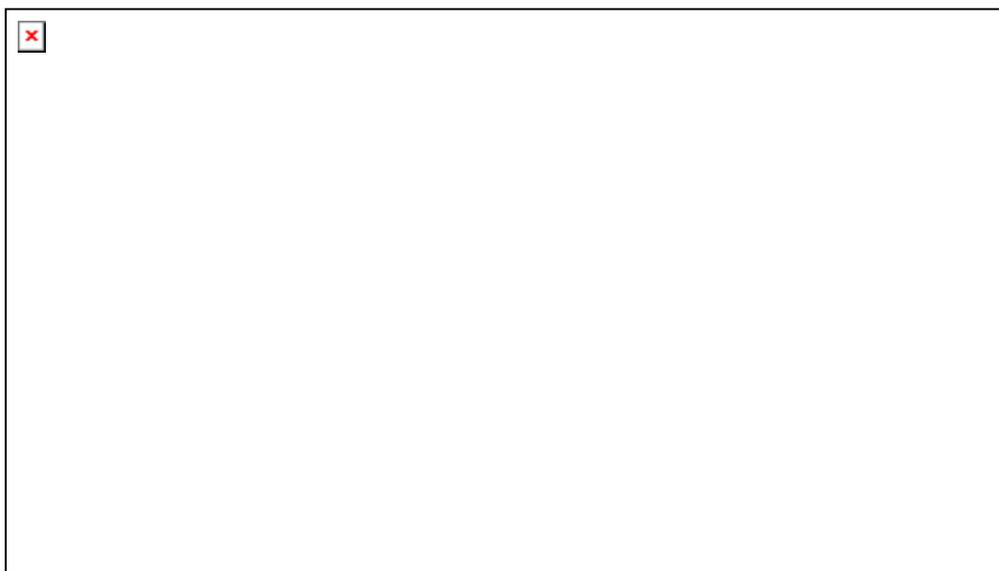


Figure 6 : Structures cristallographiques du domaine de liaison au ligand de AR avec DHT. (A) vue de devant ; (B) vue du ligand. Les atomes de carbone et d'oxygène sont coloriés en noir et en rouge. La région AF2 (hélices H3, H4 et H12) est coloriée en vert.⁴⁰

³⁸ McEwan I.J., *Endocr. Relat. Cancer*, **2004**, *11*, 281.

³⁹ Chawnsang C., *Androgens and androgen receptor: mechanisms, functions and clinical applications*, Kluwer Academic Publishers: Boston, MA, **2002**.

⁴⁰ Matias P.M., Donner P., Coelho R., Thomaz M., Peixoto C., Macedo S., Otto N., Joschko S., Scholz P., Wegg A., Basler S., Schafer M., Egner U., Carrondo M.A., *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 26164.

du récepteur AR sauvage a été résolue avec un ligand stéroïdien, le 5 α -DHT, et a été proposée par Gao (Figure 6).⁴¹

La protéine comprend onze hélices α (H) et deux courts coudes β (β), qui sont arrangés selon trois couches pour former un « sandwich d'hélices α » antiparallèle. Il faut noter que l'hélice H2 n'est pas présente dans le LBD, ce qui différencie AR des autres récepteurs stéroïdiens. Les hélices H1 et H3 forment une face du LBD, pendant que les hélices H4 et H5, le premier coude β 1, et les hélices H8 et H9 constituent la couche centrale de la structure, et que les hélices H6, H7, H10 et H11 forment la deuxième face. H5, la région N-terminale de H3 ainsi que la région C-terminale des hélices H10 et H11 constituent la majeure partie de la poche hydrophobe de liaison au ligand (LBP).⁴¹ Lorsqu'un androgène se lie à AR, l'hélice H12 sert de « couvercle » recouvrant la LBP afin de stabiliser le ligand. La fin de la région C-terminale du LBD forme le deuxième coude β 2 qui fonctionne comme un « verrou » afin de stabiliser la conformation du « couvercle » H12.

I.2.c. Conformation et fonction du récepteur AR

Comme les autres récepteurs stéroïdiens, AR est principalement localisé dans le cytoplasme et est associé avec un complexe de protéines chaperons (HSP pour Heat Shock Protein) par l'intermédiaire d'interactions avec le LBD.⁴² Lorsque AR est lié à un agoniste, il se passe une série de changements conformationnels provoquant la dissociation des HSPs. Ainsi, ces changements de conformation déclenchent des processus de dimérisation, de phosphorylation et la translocation de AR dans le noyau qui est déclenchée par le signal de localisation nucléaire (NLS). Ensuite, le récepteur se lie à l'élément de réponse aux androgènes (ARE), caractérisé par une séquence consensus de six nucléotides 5' - TGTTCT -3' et localisé dans la région « enhancer » des cibles du gène codant pour le récepteur AR. Le recrutement d'autres co-régulateurs de transcription (co-activateurs et co-répresseurs)⁴³ et de la machinerie de transcription⁴⁴ assure l'activation de l'expression du gène régulé par AR.

Tous ces processus sont initiés par les changements de conformation de AR induits par l'association d'un ligand sur le LBD. Ainsi, ces changements permettent la formation d'une région de fonction d'activation (AF2) située sur la surface du LBD. Cette région est cruciale à la fois pour l'interaction de type N/C-terminale (N/C) du récepteur AR et pour le recrutement de co-régulateurs durant la transcription. La région AF2 est un sillon hydrophobe constitué par la région C-terminale de H3, H4 et H12.⁴⁵ Elle serait essentielle pour le recrutement de co-régulateurs car le motif « LXXLL »⁴⁶ (X = un acide aminé quelconque) qui se trouve, chez

⁴¹ Gao W., Bohl C.E., Dalton J.T., *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 3352.

⁴² Pratt W.B., Toft D.O., *Endocr. Rev.*, **1997**, 18, 306.

⁴³ Heinlein C.A., Chang C., *Endocr. Rev.*, **2002**, 23, 175.

⁴⁴ Shang Y., Myers M., Brown M., *Mol. Cell*, **2002**, 9, 601.

⁴⁵ Wurtz J.M., Bourguet W., Renaud J.P., Vivat V., Chambon P., Moras D., Gronemeyer H., *Nat. Struct. Biol.*, **1996**, 3, 87.

⁴⁶ Heery D.M., Kalkhoven E., Hoare S., Parker M.G., *Nature*, **1997**, 387, 733.

des co-activateurs, dans un domaine interagissant avec un récepteur nucléaire (NID) se lierait spécifiquement sur AF2.⁴⁷ De plus, d'autres motifs sur le domaine N-terminal de AR, ²³FXXLF²⁷ et ⁴³³WXXLF⁴³⁷, pourraient aussi interagir avec AF2.⁴⁸ Ainsi, ces deux interactions pourraient entrer en compétition pour le même site de liaison vis-à-vis de AF2.

Les changements de conformation de AR induits par un ligand fournissent une base structurale pour le recrutement de cofacteurs et de la machinerie de transcription. En effet, il a été montré que la formation d'un complexe d'activation implique AR, des co-activateurs, et l'ARN polymérase II qui sont liés sur les régions « enhancer » et promotrices du gène codant pour l'antigène spécifique à la prostate (PSA).⁴⁴ La formation d'un complexe de répression implique des facteurs qui sont seulement liés à la région promotrice. Puisque la formation de la région AF2 fonctionnelle fournit une base structurale pour l'interaction protéine/protéine, le recrutement de co-régulateurs pourrait être crucial pour l'activité agoniste ou antagoniste des ligands du récepteur AR.⁴⁹

La liaison à l'ADN est aussi requise pour l'expression du gène régulé par le récepteur AR. La séquence de l'élément de réponse aux androgènes (ARE) peut être arrangée selon des répétitions, soit inversées, soit directes.⁵⁰⁻⁵³ Le récepteur AR reconnaît et se lie au site de l'ARE par l'intermédiaire de deux doigts de zinc (« zinc fingers ») localisés dans le domaine de liaison à l'ADN. Tout comme les autres récepteurs stéroïdiens, AR forme des homodimères et semble former des dimères « têtes contre têtes ».⁵⁴ La reconnaissance sélective de séquences spécifiques de l'ARE pourrait être régulée, soit par la liaison au ligand,⁵⁵ soit par la présence d'autres facteurs de transcription qui se lient à leurs propres sites de liaison à l'ADN, ou bien par les deux mécanismes.⁵⁶

En conclusion, les changements de conformation de la poche de liaison de AR dus à la liaison d'un antagoniste n'ont pas encore été élucidés à ce jour. On a vu précédemment que

⁴⁷ Bourguet W., Germain P., Gronemeyer H., *Trends Pharmacol. Sci.*, **2000**, 21, 381.

⁴⁸ He B., Minges J.T., Lee L.W., Wilson E.M., *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 10226.

⁴⁴ Shang Y., Myers M., Brown M., *Mol. Cell*, **2002**, 9, 601.

⁴⁹ Hodgson M.C., Astapova I., Cheng S., Lee L.J., Verhoeven M.C., Choi E., Balk S.P., Hollenberg A.N., *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 6511.

⁵⁰ Nantermet P.V., Xu J., Yu Y., Hodor P., Holder D., Adamski S., Gentile M.A., Kimmel D.B., Harada S., Gerhold D., Freedman L.P., Ray W.J., *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 1310.

⁵¹ Nelson P.S., Clegg N., Arnold H., Ferguson C., Bonham M., White J., Hood L., Lin B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, 99, 11890.

⁵² Claessens F., Verrijdt G., Schoenmakers E., Haelens A., Peeters B., Verhoeven G., Rombauts W., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2001**, 76, 23.

⁵³ Haelens A., Verrijdt G., Callewaert L., Christiaens V., Schauwaers K., Peeters B., Rombauts W., Claessens F., *Biochem. J.*, **2003**, 369, 141.

⁵⁴ Shaffer P.L., Jivan A., Dollins D.E., Claessens F., Gewirth D.T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2004**, 101, 4758.

⁵⁵ Hsiao P.W., Thin T.H., Lin D.L., Chang C., *Mol. Cell. Biochem.*, **2000**, 206, 169.

⁵⁶ Remenyi A., Scholer H.R., Wilmanns M., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2004**, 11, 812.

AR joue un rôle critique dans de nombreux processus physiologiques, incluant le développement des caractéristiques sexuelles mâles secondaires telles que les muscles, les cheveux, la masse osseuse et la spermatogenèse. AR est aussi impliqué dans le développement de cancers de la prostate hormono-dépendants.

II. Les cancers de la prostate hormono-dépendants

II.1. Généralités sur le cancer de la prostate

II.1.a. Quelques chiffres

Avec plus de 40000 nouveaux cas par an en France, le cancer de la prostate est le premier cancer diagnostiqué chez l'homme, aussi bien en France que dans les pays occidentaux en général. C'est également la deuxième cause de décès par cancer chez l'homme, derrière le cancer du poumon. Il s'agit d'une maladie évolutive dont le risque augmente avec l'âge. En effet, près de 85% des cas sont diagnostiqués chez les hommes de plus de 60 ans. Le cancer de la prostate peut être dépendant ou indépendant des hormones mâles, mais la plupart d'entre eux sont hormono-dépendants. Les causes sont encore mal connues, mais l'influence d'une alimentation riche en graisses semblerait être un facteur prédominant. Par ailleurs, une influence génétique semblerait également être un facteur de risques, même si cela n'a pas été clairement mis en évidence.

II.1.b. Les différents traitements utilisés contre le cancer de la prostate

Les principaux moyens développés par la médecine pour lutter contre ce problème de santé publique sont les suivants :

- Prostatectomie radicale : C'est la première méthode utilisée pour traiter le cancer de la prostate. Elle a été conçue par Huggins en 1941.⁵⁷ Elle consiste en une ablation de la glande prostatique et des vésicules séminales par voie chirurgicale. Il s'agit encore du traitement de référence pour les patients jeunes, lorsque le cancer est localisé. C'est un traitement efficace ; cependant, il comporte des effets indésirables qui sont essentiellement l'impuissance sexuelle et l'incontinence urinaire.
- Traitement par radiothérapie : Ce traitement est proposé aux patients atteints d'un cancer localisé qui ne peuvent pas subir d'opération chirurgicale. Il consiste à exposer la prostate à des irradiations qui créent des lésions dans l'ADN. C'est un traitement efficace qui, cependant, présente des inconvénients tels que le risque d'impuissance sexuelle.

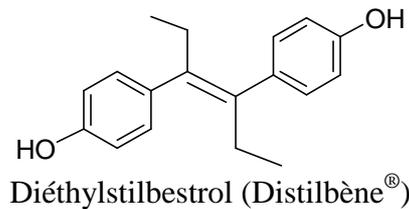
II.1.c. Les traitements hormonaux

Le traitement hormonal, encore appelé hormonothérapie, est basé sur la notion d'hormono-

⁵⁷ Huggins C., Hodges C.V., *Cancer Res.*, **1941**, 1, 293.

dépendance de la prostate. En effet, le cancer de la prostate est largement dépendant des androgènes. Ce traitement n'est pas curatif ; il a plutôt une action palliative choisie lorsque le patient est âgé, lorsque le cancer est déjà à un stade avancé, ou lorsqu'il n'est plus limité à la prostate. Ce traitement est en général prescrit en association avec les traitements locaux (prostatectomie, radiothérapie). L'objectif essentiel de l'hormonothérapie est de ralentir la progression du cancer, en s'opposant à la fabrication et/ou à l'action des androgènes, et d'accroître la survie du patient tout en lui conférant une qualité de vie décente. L'hormonothérapie peut être de trois types :

- Castration chirurgicale : Ce traitement, encore appelé orchidectomie vraie, consiste en une ablation des testicules afin de prévenir la fabrication de la testostérone. Elle assure une diminution d'environ 95% du taux d'androgènes dans le sang.
- Castration médicale ou chimique : Encore appelée orchidectomie, elle consiste en l'utilisation de médicaments hormonaux actifs afin de diminuer le niveau de testostérone dans le sang. Les médicaments utilisés sont les suivants :
 - Oestrogènes (exemple : le Diéthylstilbestrol ou Distilbène[®]) : Ce traitement a été découvert en 1941 par Huggins.⁵⁷ Ils agissent en réduisant la sécrétion de LH et réduisent ainsi la sécrétion de testostérone. Ils se sont avérés efficaces ; ils présentent, cependant, des risques cardio-vasculaires, même à faible dose. Par conséquent, ce traitement a été abandonné depuis les années 1980.



- Agonistes de la LHRH (ou gonado-libérine) : La LHRH entraîne une stimulation de l'hypophyse avec une augmentation de la sécrétion de LH et donc de la testostérone. Cependant, une administration continue à des taux élevés de LHRH entraîne un épuisement rapide de la production de LH et donc une suppression quasi complète de la fabrication de testostérone. Ce traitement est couramment utilisé depuis 1980, car il permet de réaliser une castration médicale sans les effets indésirables des oestrogènes. En revanche, il présente d'autres effets indésirables tels que les bouffées de chaleur, l'impuissance sexuelle, la baisse de la libido, ou la gynécomastie (= augmentation de volume de la poitrine).
- Blocage androgénique : Il consiste en l'utilisation de molécules antagonistes des androgènes au niveau des récepteurs AR, appelées anti-androgènes. Ces molécules se sont avérées prometteuses pour le traitement du cancer de la prostate ; c'est pourquoi nous nous limiterons à l'étude de ces molécules.

⁵⁷ Huggins C., Hodges C.V., *Cancer Res.*, **1941**, *1*, 293.

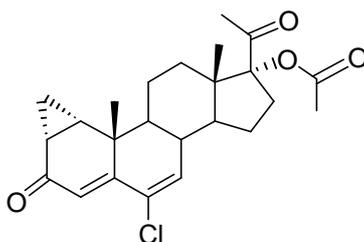
II.2. Généralités sur les anti-androgènes

II.2.a. Définition

Nous avons vu précédemment que les médicaments cités étaient efficaces mais présentaient beaucoup trop d'inconvénients. Par conséquent, il était nécessaire de trouver une autre stratégie pour combattre le cancer de la prostate hormono-dépendant. Dans le cas de tels cancers, la présence d'androgènes liés au récepteur AR induit la multiplication des cellules tumorales de façon continue, sans moyen de restriction. Cependant, les scientifiques ont constaté que certaines molécules pouvaient être antagonistes des androgènes pour AR. Ces molécules sont appelées anti-androgènes. Leur principal effet est d'inhiber de manière compétitive les effets de la testostérone et de la 5 α -DHT, au niveau du site de liaison de AR. De tels composés ont, par conséquent, un potentiel thérapeutique intéressant dans le traitement des maladies androgéno-dépendantes, aussi bien cutanées (acné, alopecie, hirsutisme) chez les femmes que prostatiques (cancer, BPH) chez les hommes.

II.2.b. Classification

Ces molécules sont classées en deux catégories, selon leur structure chimique : les anti-androgènes stéroïdiens et non stéroïdiens.⁵⁸



Acétate de cyprotérone (Androcur®)

Parmi les anti-androgènes stéroïdiens, le médicament le plus utilisé est l'acétate de cyprotérone (ou Androcur®).^{59, 60} C'est le premier anti-androgène à avoir été utilisé en tant que médicament.⁶¹ Or, il avait été conçu, à la base, pour d'autres traitements. En effet, l'acétate de cyprotérone est une molécule possédant une double activité. Elle a une faible activité anti-androgénique, même si elle se lie à AR avec une bonne affinité.⁶² Elle a aussi une activité progestative en supprimant la libération de gonadotrophine, entraînant ainsi une diminution de la sécrétion de LH et donc de la testostérone.⁶³ Or, du fait qu'elle interagit aussi avec d'autres récepteurs que AR, tels que les récepteurs des glucocorticoïdes et de la

⁵⁸ Singh S.M., Gauthier S., Labrie F., *Curr. Med. Chem.*, **2000**, 7, 211.

⁵⁹ Neumann F., *Horm. Metab. Res.*, **1977**, 9, 1.

⁶⁰ Neumann F., *Exp. Clin. Endocrinol.*, **1994**, 102, 1.

⁶¹ McLeod D.G, *Cancer*, **1993**, 71, 1046.

⁶² Fang S., Liao S., *Mol. Pharmacol.*, **1969**, 5, 428.

⁶³ Neri R.O., *Adv. Sex Horm. Res.*, **1976**, 2, 233.

progestérone,⁶⁴ ce médicament est à l'origine de nombreux effets indésirables, comme la thrombose, la perte de libido ou la gynécomastie.⁶⁵ En conséquence, son utilisation en tant que drogue contre le cancer de la prostate a été progressivement abandonnée, voire totalement comme aux Etats-Unis. Ce médicament s'est avéré aussi efficace contre l'acné et l'hirsutisme chez la femme ; mais il doit être utilisé en association avec un contraceptif oral car un risque de féminisation de fœtus masculins a été démontré chez les femmes enceintes.⁶⁶

En conclusion, l'utilisation d'anti-androgènes stéroïdiens est limitée à cause de leur faible biodisponibilité orale, de leur hépatotoxicité potentielle et de leur manque de spécificité envers les récepteurs AR. En outre, leur modification structurale est limitée à cause du squelette stéroïdien. Donc, pour tenter de résoudre tous ces problèmes, des homologues non stéroïdiens ont été développés pour traiter le cancer de la prostate. Les anti-androgènes non stéroïdiens ont pour principal avantage de se lier exclusivement à AR, même si leur affinité de liaison au récepteur est faible. C'est pourquoi ils ont été aussi appelés anti-androgènes purs. Leur biodisponibilité orale a été considérablement augmentée, du fait de leur demi-vie *in vivo* variant de quelques heures à une semaine chez l'homme. De même, ces ligands permettent d'envisager un ensemble de modifications structurales non négligeable. Tous ces avantages font que ces ligands sont de plus en plus utilisés pour ce traitement. Par conséquent, nous avons décidé de nous focaliser sur ces molécules.

II.3. Les anti-androgènes non stéroïdiens

Parmi les anti-androgènes non stéroïdiens, trois molécules sont commercialisées et utilisées à des fins thérapeutiques⁶⁷ : la flutamide⁶⁸⁻⁷¹ (Eulexin[®]) et son métabolite actif, le 2-hydroxyflutamide, la nilutamide^{72, 73} (Anandron[®]), et la bicalutamide⁷⁴⁻⁷⁶ (Casodex[®]). Ces molécules sont représentées sur la Figure 7. Ils permettent de préserver la sexualité, notamment chez les patients plus jeunes. Néanmoins, des effets secondaires indésirables existent, tels les bouffées de chaleur, la gynécomastie ou la baisse de la libido.

⁶⁴ Moguilewsky M., Bouton M.M., *J. Steroid Biochem.*, **1988**, 31, 699.

⁶⁵ Neumann F., Jacobi G.H., *J. Clin. Oncol.*, **1982**, 1, 41.

⁶⁶ Venturoli S., Marescalchi O., Colombo F.M., Macrelli S., Ravaioli B., Bagnoli A., Paradisi R., Flamigni C., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1999**, 84, 1304.

⁶⁷ Harris M.G., Coleman S.G., Faulds D., Chrisp P., *Drugs Aging*, **1993**, 3, 9.

⁶⁸ Neri R., Peets E., Watnick A., *Biochem. Soc. Trans.*, **1979**, 7, 565.

⁶⁹ Koch H., *Drugs Today*, **1984**, 20, 561.

⁷⁰ Labrie F., *Cancer*, **1993**, 72, 3816.

⁷¹ Wong C.I., Kelce W.R., Sar M., Wilson E.M., *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 19998.

⁷² Raynaud J.P., Bonne C., Moguilewsky M., Lefèbre F.A., Bélanger A., Labrie F., *The Prostate*, **1984**, 5, 299.

⁷³ Kuhn J.M., Billebaud T., Navratil H., Moulounguet A., Friet J., Grise P., Louis J.F., Costa P., Husson J.M., Dahan R., Bertagna C., Edelstein R., *N. Engl. J. Med.*, **1989**, 321, 413.

⁷⁴ Tucker H., Crook J.W., Chesterson G.J., *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 954.

⁷⁵ Furr B.J.A., *Eur. Urol.*, **1996**, 29 (suppl. 2), 83.

⁷⁶ Kolvenbag G.J.C.M., Blackledge G.R.P., *Urology*, **1996**, 47 (suppl. 1A), 70.

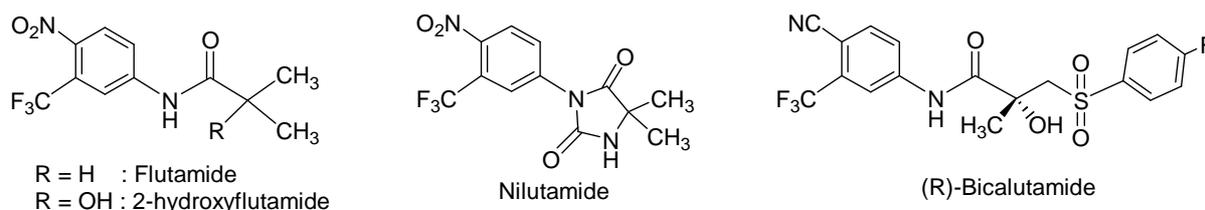


Figure 7 : Anti-androgènes non stéroïdiens commerciaux

II.3.a. Description des anti-androgènes non stéroïdiens commerciaux

La flutamide est le premier anti-androgène pur à avoir été découvert. Elle a été synthétisée pour la première fois par Neri en 1967. Après administration orale, la flutamide est complètement absorbée et est métabolisée en 2-hydroxyflutamide, qui est le principal métabolite, et en un produit d'hydrolyse, le 3-trifluorométhyl-4-nitro-aniline. Le 2-hydroxyflutamide est un anti-androgène plus puissant *in vivo* avec une meilleure affinité de liaison à AR que la flutamide.⁷⁷ Elle a une demi-vie d'élimination d'environ 8 heures, chez l'homme.⁷⁸ L'hydrolyse de la liaison amide représente la voie métabolique majeure pour générer le métabolite actif qu'est le 2-hydroxyflutamide.⁷⁹ La flutamide est utilisée à des doses thérapeutiques de 750 mg/jour, dans le but de réaliser un blocage complet de AR. Cependant, comme cette molécule est métabolisée par le foie, ce métabolisme engendre la formation d'un grand nombre de produits d'hydrolyse, notamment le 4-nitro-3-trifluorométhyl-aniline qui pourrait être à l'origine de l'hépatotoxicité de ce médicament.⁸⁰ Ainsi, son utilisation après une administration à long terme est particulièrement limitée.

La nilutamide est un analogue de la flutamide possédant un noyau de type hydantoïne. Tout comme la flutamide, cette molécule est éliminée exclusivement par métabolisme, en particulier la réduction du groupe nitro situé sur le cycle aromatique.⁸¹ Bien que l'hydrolyse d'une des deux fonctions carbonyles ait aussi été identifiée, cette molécule est moins susceptible au métabolisme hépatique que l'hydrolyse de la liaison amide observée chez la flutamide. Ceci a pour conséquence une augmentation considérable de la demi-vie d'élimination chez l'homme (2 jours). Cependant, la réduction du groupe nitro^{82, 83} engendre la formation d'un radical anion libre qui pourrait être associé à l'hépatotoxicité de la nilutamide chez l'homme. Ceci serait observé quand la dose thérapeutique administrée par voie orale nécessaire pour le blocage androgénique (150-300 mg/jour) est grande.

⁷⁷ Wakeling A.E., Furr B.J., Glen A.T., Hughes L.R., *J. Steroid Biochem.*, **1981**, 15, 355.

⁷⁸ Schulz M., Schmoldt A., Donn F., Becker H., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1988**, 34, 633.

⁷⁹ Katchen B., Buxbaum S., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1975**, 41, 373.

⁸⁰ Fau D., Eugene D., Berson A., Letteron P., Fromenty B., Fisch C., Pessayre D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1994**, 269, 954.

⁸¹ Creaven P.J., Pendyala L., Tremblay D., *Urology*, **1991**, 37, 13.

⁸² Berson A., Wolf C., Berger V., Fau D., Chachaty D., Fromenty B., Pessayre D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1991**, 257, 714.

⁸³ Fau D., Berson A., Eugene D., Fromenty B., Fisch C., Pessayre D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1992**, 263, 69.

La bicalutamide a remplacé la flutamide et la nilutamide comme l'anti-androgène de choix pour le traitement du cancer de la prostate. En effet, cette molécule présente moins de toxicité pour le foie et une demi-vie d'élimination prolongée chez l'homme (6 jours), ce qui autorise une administration par voie orale à une dose thérapeutique plus faible (50 mg/jour, une fois par jour).⁸⁴ En tant qu'analogue structural de la flutamide, elle partage la liaison amide. Pourtant, l'hydrolyse de cette liaison a été seulement observée chez le rat,^{85, 86} et non chez l'homme, ce qui pourrait expliquer l'allongement de la demi-vie d'élimination chez l'homme. La bicalutamide est principalement métabolisée par hydroxylation et par glucuronidation. En outre, le remplacement du groupe nitro aromatique par un groupe nitrile évite la réduction du groupe nitro qui a été observée dans le cas de la nilutamide et du 2- hydroxyflutamide. Comme la structure de la molécule présente un carbone chiral, elle est administrée par voie orale en tant qu'un mélange racémique de deux énantiomères. Néanmoins, son activité anti-androgénique *in vivo* provient exclusivement de l'isomère (R) qui a une affinité de liaison d'environ 30 fois supérieure à celle de l'isomère (S).⁸⁷

II.3.b. Utilisation des anti-androgènes dans le traitement hormonal

Le cancer de la prostate étant l'un des cancers les plus sensibles à l'hormonothérapie, les anti-androgènes non stéroïdiens sont, par conséquent, des composés de plus en plus utilisés pour le traitement du cancer de la prostate. En effet, ils permettent un blocage androgénique plus efficace que leurs homologues stéroïdiens. Cependant, comme ce sont des anti-androgènes purs, leur action est réduite exclusivement au blocage de la testostérone et de son métabolite actif, la 5 α -DHT, au niveau des récepteurs AR. De plus, le blocage de AR au niveau de la prostate et de la glande pituitaire a pour conséquence une augmentation du niveau de testostérone dans le plasma. Par conséquent, ils n'empêchent pas la production d'autres hormones, telles que la LH, qui stimule la production de testostérone dans l'organisme. Ils ne sont donc pas suffisamment puissants pour bloquer totalement la sécrétion d'androgènes dans l'organisme. En conséquence, pour être efficaces, ces molécules doivent être associées à des traitements hormonaux tels que la castration chimique. La combinaison de ces deux traitements constitue le blocage androgénique complet. Le principe est d'utiliser les anti-androgènes purs avec les analogues de la LH-RH qui inhibent la sécrétion de LH et donc bloquent la production d'androgènes au niveau des testicules et de la prostate.

De nombreuses études ont démontré le potentiel de cette méthode par rapport à la castration chimique seule. En effet, chez les patients atteints d'un cancer à un stade avancé, ont été observés un allongement de leur durée de vie de plusieurs mois, voire de plusieurs années, et surtout une qualité de vie nettement améliorée, car ce traitement combiné présente moins

⁸⁴ Cockshott I.D., *Clin. Pharmacokinet.*, **2004**, *43*, 855.

⁸⁵ Boyle G.W., McKillop D., Phillips P.J., Harding J.R., Pickford R., McCormick A.D., *Xenobiotica*, **1993**, *23*, 781.

⁸⁶ McKillop D., Boyle G.W., Cockshott I.D., Jones D.C., Phillips P.J., Yates R.A., *Xenobiotica*, **1993**, *23*, 1241.

⁸⁷ Mukherjee A., Kirkovsky L., Yao X.T., Yates R.C., Miller D.D., Dalton J.T., *Xenobiotica*, **1996**, *26*, 117.

d'inconvénients. Tout ceci fait que ce traitement est à l'heure actuelle une méthode de choix pour combattre le cancer de la prostate.⁸⁸

II.3.c. Autres exemples d'anti-androgènes non stéroïdiens

Les anti-androgènes sont de plus en plus utilisés, malgré la présence d'effets secondaires indésirables, comme la gynécomastie, dûs à l'augmentation du taux d'androgènes dans l'organisme et à une augmentation de la conversion de testostérone en oestrogènes. Alors, pour tenter de remédier à ces problèmes, d'autres séries d'anti-androgènes ont été développées ou sont en cours de développement. Ces composés ont seulement démontré une activité anti-androgénique potentielle dans des modèles *in vitro* et précliniques. Quelques exemples parmi les études récentes sont montrés dans ce rapport.

Des modifications structurales de la nilutamide ont abouti au développement d'une série d'analogues bicycliques de type 1H-isoindeole-1,3-(2H)-dione qui agissent comme des antagonistes de AR (Figure 8). Les composés de référence, BMS-1 et BMS-15⁸⁹, se lient avec une grande affinité au récepteur AR sauvage. La structure de type 4-nitro-naphthyl favorise également l'affinité de liaison à AR, comme le montrent les composés BMS-337143⁹⁰ et BMS-434681.⁹¹ Tout comme le 2-hydroxyflutamide, les dérivés BMS-15, BMS-337143 et

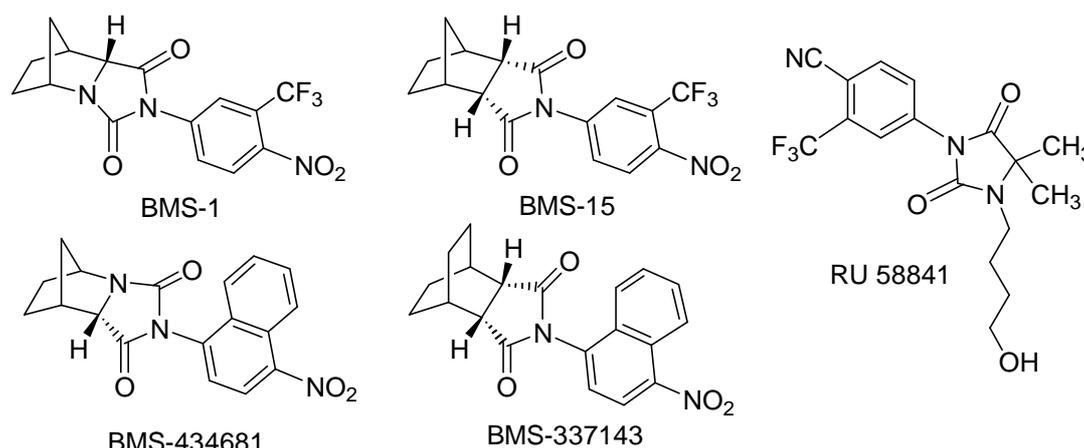


Figure 8 : Anti-androgènes non stéroïdiens - Dérivés de type hydantoïne

⁸⁸ Labrie F., Cusan L., Gomez J., Luu-The V., Candas B., Bélanger A., Labrie C., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2004**, 92, 327.

⁸⁹ Salvati M.E., Balog A., Wei D.D., Pickering D., Attar R.M., Geng J., Rizzo C.A., Hunt J.T., Gottardis M.M., Weinmann R., Martinez R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 389.

⁹⁰ Salvati M.E., Balog A., Shan W., Wei D.D., Pickering D., Attar R.M., Geng J., Rizzo C.A., Gottardis M.M., Weinmann R., Krystek S.R., Sack J., An Y., Kish K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 271.

⁹¹ Balog A., Salvati M.E., Shan W., Mathur A., Leith L.W., Wei D.D., Attar R.M., Geng J., Rizzo C.A., Wang C., Krystek S.R., Tokarski J.S., Hunt J.T., Gottardis M.M., Weinmann R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 6107.

BMS-434681 sont des antagonistes du récepteur AR sauvage, mais agissent comme des agonistes envers le récepteur AR mutant (T877A). Cependant, BMS-1 maintiendrait une activité antagoniste, même chez le récepteur AR mutant. En outre, des études de cristallographie par rayons X et de modélisation moléculaire ont suggéré que l'azote du noyau hydantoïne des molécules BMS-1 et BMS-434681 serait un accepteur de liaisons H pour l'acide aminé N705, ce qui pourrait améliorer l'affinité de liaison de tels ligands.

En plus de leur utilisation contre les maladies de la prostate, les anti-androgènes sont aussi efficaces et sont utilisés pour le traitement de maladies cutanées chez les femmes, telles que l'alopécie (ou calvitie), l'acné et l'hirsutisme (ou hyperpilosité féminine). Ainsi, d'autres dérivés de la nilutamide, comme le composé RU58841 (Figure 8), ont été développés en Europe pour traiter localement l'acné et l'alopécie.^{92, 93} Par exemple, RU58841 a un temps de demi-vie court de moins de 1 heure. Son application locale évite donc non seulement un métabolisme hépatique important, mais aussi fournit un traitement efficace au niveau de la peau sans apparition d'une activité anti-androgénique qui serait due à la formation du métabolite actif.⁹⁴

Un exemple d'anti-androgènes non stéroïdiens en devenir inclut les dérivés de type phthalimide (Figure 9). Le composé de référence, le N-[(3,5-diméthyl-4-isoxazolyl)-méthyl]-phthalimide (DIMP), a été découvert en 1981 et est intéressant dans le sens où il ne possède qu'une activité anti-androgénique. Des années plus tard, plusieurs analogues du DIMP ont été développés, utilisant des similarités structurales entre le DIMP et la thalidomide.⁹⁵ La thalidomide est une drogue qui avait été utilisée pour traiter le cancer de la prostate, car elle

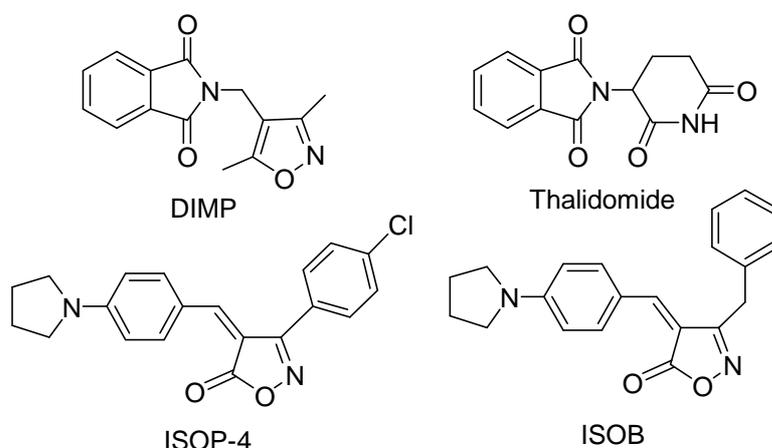


Figure 9 : Anti-androgènes non stéroïdiens - Dérivés de type phthalimide

⁹² Battmann T., Bonfils A., Branche C., Humbert J., Goubet F., Teutsch G., Philibert D., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1994**, 48, 55.

⁹³ Van Dort M.E., Jung Y.W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 1045.

⁹⁴ Cousty-Berlin D., Bergaud B., Bruyant M.C., Battmann T., Branche C., Philibert D., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1994**, 51, 47.

⁹⁵ Hashimoto Y., *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, 10, 461.

régulait la production de cytokines. Mais elle a été retirée du marché car ce médicament avait des effets tératogènes importants et provoquait donc des malformations chez les nouveau-nés. Ces ligands ont montré une bonne affinité de liaison envers AR ; cependant, leurs activités anti-androgéniques *in vivo* n'ont pas encore été reportées.⁹⁶

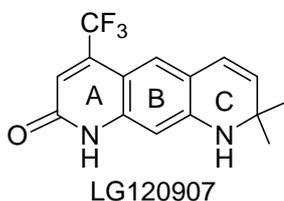


Figure 10 : Anti-androgène non stéroïdien - Dérivé de type quinolinone

Il s'est avéré qu'un blocage complet de AR au niveau de la prostate et de la glande pituitaire résulte en une augmentation du taux de testostérone dans le plasma. Alors, des antagonistes sélectifs de AR ont été proposés comme de meilleurs anti-androgènes pour traiter le cancer de la prostate. En effet, ce sont des composés agissant comme des antagonistes de AR dans la prostate, mais pas dans la glande pituitaire. Ainsi, une série de dérivés de type quinolinone (Figure 10), contenant une structure tricyclique linéaire, se lie à AR avec une très bonne affinité et fonctionne comme des antagonistes de AR. En effet, il a été démontré chez les rats que ces dérivés induisent une activité antagoniste dans la prostate et les vésicules séminales sans augmenter le taux de LH et de testostérone dans le plasma.⁹⁷ Cependant, cette sélectivité n'a pas encore été prouvée chez l'homme.

Une série de dérivés de type *trans*-N-aryl-2,5-diméthylpipérazine (Figure 11) a récemment été reportée.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Parmi ces dérivés, plusieurs ont montré une activité anti-androgénique plus

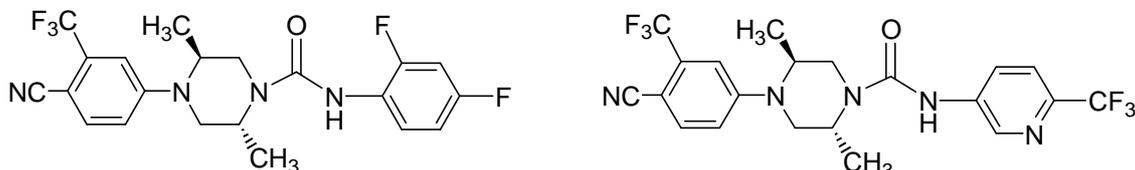


Figure 11 : Anti-androgènes non stéroïdiens - Dérivés de type pipérazine

⁹⁶ Ishioka T., Kubo A., Koiso Y., Nagasawa K., Itai A., Hashimoto Y., *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 1555.

⁹⁷ Hamann L.G., Higuchi R.I., Zhi L., Edwards J.P., Wang X.N., Marschke K.B., Kong J.W., Farmer L.J., Jones T.K., *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 623.

⁹⁸ Kinoyama I., Taniguchi N., Yoden T., Koutoku H., Furutani T., Kudoh M., Okada M., *Chem. Pharm. Bull.*, **2004**, *52*, 1330.

⁹⁹ Kinoyama I., Taniguchi N., Kawanimani E., Nozawa E., Koutoku H., Furutani T., Kudoh M., Okada M., *Chem. Pharm. Bull.*, **2005**, *53*, 402.

¹⁰⁰ Kinoyama I., Taniguchi N., Toyoshima A., Nozawa E., Kamikubo T., Imamura M., Matsuhisa A., Samizu K., Kawanimani E., Niimi T., Hamada N., Koutoku H., Furutani T., Kudoh M., Okada M., Ohta M., Tsukamoto S., *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 716.

puissante encore que la bicalutamide, à la fois *in vitro* et *in vivo*. De plus, ils ont démontré une plus grande sélectivité pour AR ainsi que pour les tissus. En effet, ils agissent essentiellement au niveau de la prostate, sans agir au niveau de l'hypothalamus, ce qui fait que le taux de testostérone dans le plasma n'a pas augmenté. Par conséquent, ces molécules seraient de futurs candidats pour traiter le cancer de la prostate par monothérapie.

Enfin, une autre série de dérivés, contenant un dicarba-*closo*-dodécaborane (ou *p*-carborane) à la place du squelette stéroïdien, a été reportée sur la Figure 12. Les carboranes sont des amas de bore polyhédraux, tels une cage, contenant deux atomes de carbone. Ils ont des propriétés remarquables, telles qu'une géométrie sphérique, une grande stabilité thermique et chimique et une surface moléculaire hydrophobe.^{101, 102} Ces caractéristiques permettent leur application en tant que nouvelle structure hydrophobe dans des molécules biologiquement actives. Il a été montré que ces dérivés sont des antagonistes de AR aussi puissants que le 2-hydroxyflutamide.^{103, 104}

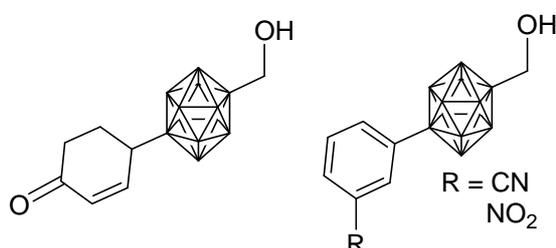


Figure 12 : Anti-androgènes non stéroïdiens - Dérivés de type carborane

III. Relation Structure/Activité entre les ligands et le récepteur AR

III.1. Les SARMs (Selctive Androgen Receptor Modulators)

III.1.a. Concept

Plusieurs pharmacophores possédant une grande affinité de liaison à AR ont été identifiés durant le développement d'anti-androgènes non stéroïdiens. Des modifications au niveau de la structure des anti-androgènes ont abouti à la découverte de plusieurs classes de ligands non stéroïdiens pouvant être agonistes ou antagonistes envers AR selon le type de tissus. Ainsi a émergé le concept des SARMs.¹⁰⁵ Ce sont des composés qui sont antagonistes ou faiblement agonistes dans la prostate ; cependant, ils sont agonistes dans les muscles, les os et dans la glande pituitaire. De plus, ils sont absorbés par voie orale avec une faible hépatotoxicité.

¹⁰¹ Yamamoto K., Endo Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 2389.

¹⁰² Endo Y., Yamamoto K., Kagechika H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 4089.

¹⁰³ Fujii S., Hashimoto Y., Suzuki T., Ohta S., Endo Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 227.

¹⁰⁴ Fujii S., Goto T., Ohta K., Hashimoto Y., Suzuki T., Ohta S., Endo Y., *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 4654.

¹⁰⁵ Negro-Vilar A., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1999**, *84*, 3459.

Des modifications structurales de la bicalutamide ont mené à la découverte de la première génération de SARMs (Figure 13). Ces composés non seulement se lient à AR avec une meilleure affinité que la bicalutamide, mais aussi démontrent une grande sélectivité au niveau des organes chez des modèles animaux. En effet, ils présentent, chez des rats, une activité antagoniste au niveau de la prostate sans abolir les effets anabolisants des androgènes dans les muscles ou accroître la libération de gonadotrophine et les concentrations de testostérone dans le plasma.¹⁰⁶ Ces observations suggèrent que les SARMs ayant une faible activité intrinsèque dans la prostate seraient utilisés comme une thérapie alternative pour traiter l'hyperplasie bénigne de la prostate (BPH), ou le cancer de la prostate. En outre, les effets suppressifs de cette classe de SARMs, comme il l'a été montré chez des rats normaux et castrés, suggèrent que ces composés pourraient être utilisés pour la contraception masculine. Ces deux ligands sont aussi administrés par voie orale avec des demi-vies *in vivo* d'environ 4 heures chez le rat.¹⁰⁷ Les études concernant le métabolisme ont montré que l'hydrolyse de la liaison amide ainsi que la réduction du groupe NO₂, comme il a été observé pour le 2-hydroxyflutamide et la nilutamide, sont les principales voies métaboliques observées *in vivo*. Ces analogues sont éliminés dans le foie. En conclusion, c'est la première classe de ligands non stéroïdiens à avoir démontré une sélectivité importante au niveau des organes.

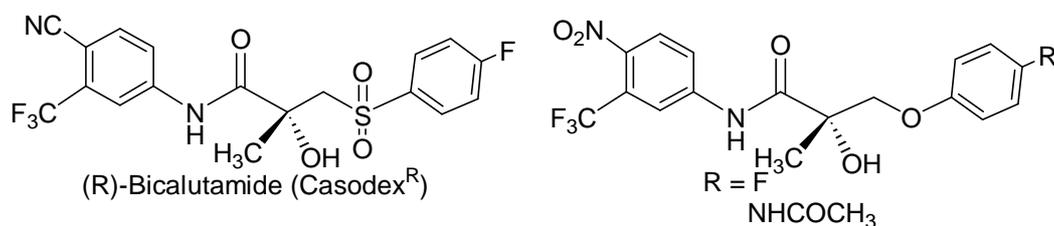


Figure 13 : Exemples de Selective Androgen Receptor Modulators (SARM)

III.1.b. Relation Structure/Activité

Des études précédentes ont démontré le rôle important du lien éther et de la substitution en *para* de groupes plus encombrants sur le cycle B pour l'activité agoniste des dérivés de la bicalutamide.¹⁰⁸ En effet, les composés possédant un lien éther pourrait adopter une conformation plus compacte que la bicalutamide qui possède un lien sulfone. Ceci pourrait être dû à l'établissement d'une liaison hydrogène intramoléculaire. Ceci permettrait également au cycle B d'éviter l'encombrement stérique avec l'acide aminé W741.

En résumé, des modifications au niveau de la structure des anti-androgènes peuvent aboutir à un changement de types de ligands AR (antagonistes ou agonistes). Or, on ne sait toujours pas quel type d'interaction ligands/récepteurs AR détermine l'activité agoniste ou antagoniste

¹⁰⁶ Gao W., Kearbey J.D., Nair V.A., Chung K., Parlow A.F., Miller D.D., Dalton J.T., *Endocrinology*, **2004**, *145*, 5420.

¹⁰⁷ Kearbey J.D., Wu D., Gao W., Miller D.D., Dalton J.T., *Xenobiotica*, **2004**, *34*, 273.

¹⁰⁸ Yin D., He Y., Perera M.A., Hong S.S., Marhefka C., Stourman N., Kirkovsky L., Miller D.D., Dalton J.T., *Mol. Pharmacol.*, **2003**, *63*, 211.

du ligand. Ceci est largement dû à la connaissance limitée concernant la conformation du récepteur quand il se lie à un antagoniste.

III.2. Domaine de liaison au ligand du récepteur AR lié à un androgène

La cristallographie reste le meilleur moyen d'illustrer le mécanisme de liaison moléculaire de différents ligands. La modélisation moléculaire devient très utile pour prédire les modifications structurales. Pourtant, prévoir ou modéliser le mécanisme de liaison de ces ligands reste problématique. La structure cristallographique du domaine de liaison de AR de type à la fois sauvage et mutant a été résolue avec la DHT (Figures 14A et 14C).^{109, 41}

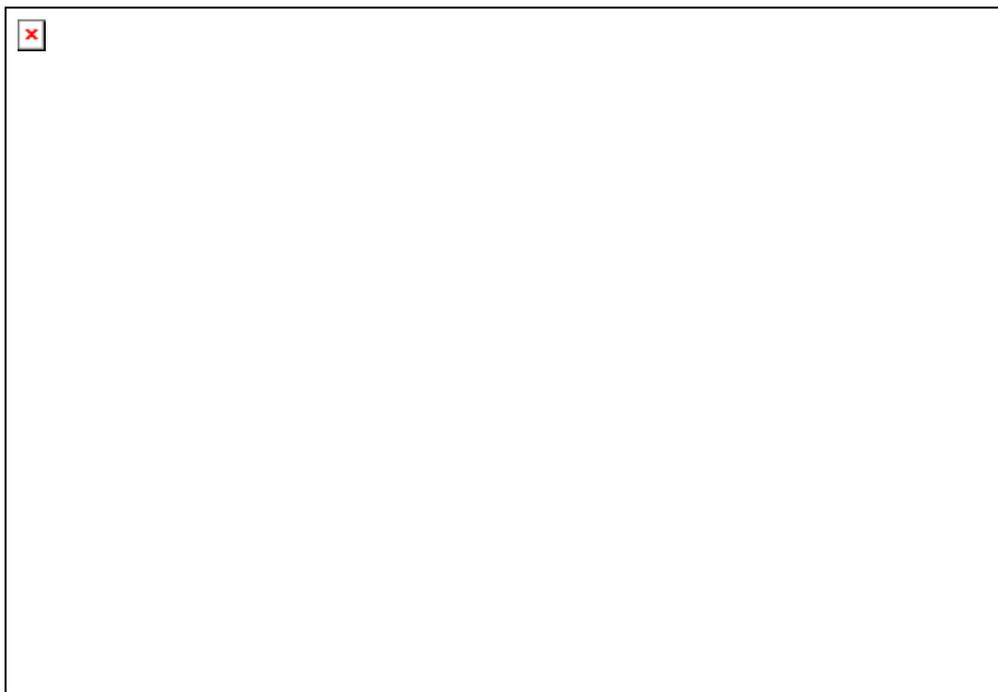


Figure 14 : Structure des domaines de liaison de AR interagissant avec des ligands stéroïdiens (DHT) et non stéroïdiens (R-bicalutamide). Le complexe AR mutant (W741L)-R-Bicalutamide (vert) et le complexe AR sauvage-DHT (doré) sont représentés de profil (A, B) et au dessus (C, D) du plan stéroïdien. Les liaisons H sont hachurées en jaune.¹⁰⁹

D'une part, les interactions hydrophobes jouent un rôle essentiel pour la liaison à AR car le squelette stéroïdien interagit, via des interactions hydrophobes, avec la poche hydrophobe de liaison au ligand. D'autre part, les liaisons hydrogène jouent un rôle important pour la liaison à AR. En effet, la cétone (accepteur de liaisons H) en position 3 sur le noyau A forme des liaisons H avec les deux acides aminés, Q711 et R752, directement ou indirectement par

¹⁰⁹ Marhefka C.A., Moore B.M., Bishop T.C., Kirkovsky L., Mukherjee A., Dalton J.T., Miller D.D., *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 1729.

⁴¹ Gao W., Bohl C.E., Dalton J.T., *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 3352.

l'intermédiaire d'une molécule d'eau. Le noyau C du squelette stéroïdien est en contact avec la chaîne principale de L704 et la chaîne latérale de N705. Enfin, la fonction alcool (donneur de liaisons H) en position 17 β sur le noyau D interagit avec les acides aminés N705 et T877.

En conclusion, les androgènes sont des molécules constituées par un squelette stéroïdien encombrant et hydrophobe stabilisé dans la poche de liaison de AR via des interactions hydrophobes. Ce squelette incorpore à ses deux extrémités deux groupements polaires, une cétone en position 3 sur le noyau A et un alcool en position 17 β sur le noyau D. Ces deux fonctions permettent de stabiliser l'ensemble de la structure au niveau de AR, via des liaisons H. Par conséquent, elles permettent aux ligands d'avoir une meilleure affinité pour AR.

III.3. Domaine de liaison au ligand de AR lié à un anti-androgène

Bien que plusieurs classes de composés non stéroïdiens démontrent de fortes affinités de liaison, le mécanisme de liaison pour ces composés était inconnu jusqu'à présent. La première structure cristallographique du domaine de liaison du récepteur AR lié à un ligand non stéroïdien a été résolue. Il s'agit d'un domaine mutant (W741L) lié à la bicalutamide (Figures 14B et 14D).^{110, 41} La majorité de la molécule (noyau A et liaison amide) occupe le plan stéroïdien mais le noyau B pointe vers le haut de la poche de liaison ; elle a donc une conformation courbée. De plus, le nitrile (accepteur de liaisons H) en *para* sur le noyau A forme des liaisons H avec les acides aminés Q711 et R752, comme la cétone dans le cas des androgènes. L'alcool chiral forme des liaisons H avec les acides aminés L704 et N705, exactement comme l'alcool présent chez les androgènes. Ces liaisons sont importantes pour l'affinité du ligand à AR. En conclusion, la plupart des ligands non stéroïdiens, qu'ils soient agonistes ou antagonistes, possèdent les mêmes caractéristiques structurales que les androgènes. Elles joueraient un rôle primordial pour l'affinité des ligands envers AR.

- Ces molécules doivent mimer le squelette stéroïdien des androgènes pour maintenir en place le ligand dans la poche de liaison selon des interactions hydrophobes.
- Ces molécules doivent contenir deux groupes polaires, un accepteur de liaisons H imitant la cétone en position 3 et un donneur de liaisons H imitant l'alcool en position 17 β . Ces deux fonctions forment des liaisons H nécessaires pour stabiliser la structure et donc pour une meilleure affinité envers AR.

Cependant, seuls les domaines de liaison au ligand de AR liés à un agoniste ont été cristallisés à ce jour, puisque les domaines de AR liés à un antagoniste ont été cristallisés avec des AR mutants dans lesquels ils se comportent comme des agonistes. Aucune structure cristallographique du domaine de liaison de AR sauvages lié à un antagoniste n'a été résolue. Par conséquent, le mécanisme moléculaire expliquant l'antagonisme de ligands non stéroïdiens reste inexpliqué.

¹¹⁰ Bohl C.E., Gao W., Miller D.D., Bell C.E., Dalton J.T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2005**, *102*, 6201.

⁴¹ Gao W., Bohl C.E., Dalton J.T., *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 3352.

Chapitre 2 : Synthèse et étude de dérivés ferrocéniques de la flutamide, du 2-hydroxyflutamide et de la bicalutamide

SOMMAIRE

I.	Introduction.....	36
II.	Synthèse des analogues ferrocéniques de la flutamide.....	38
II.1.	Synthèse du dérivé ferrocénique 5	38
II.1.a.	Stratégie de synthèse.....	38
II.1.b.	Synthèse de l'aminoferrocène 4	38
II.1.c.	Fin de la synthèse.....	40
II.2.	Synthèse des dérivés ferrocéniques 6 et 7	40
III.	Synthèse du 2-hydroxyflutamide et des analogues ferrocéniques de la bicalutamide.....	41
III.1.	Synthèse du 2-hydroxyflutamide 8	41
III.2.	Synthèse des dérivés ferrocéniques 15 et 16 de la bicalutamide.....	42
III.2.a.	Stratégie de synthèse.....	42
III.2.b.	Les étapes de la synthèse.....	42
III.2.c.	Structure cristallographique du composé 16	44
IV.	Résultats des tests biologiques.....	44
IV.1.	Tests RBA.....	44
IV.1.a.	Résultats.....	46
IV.1.b.	Interprétation des résultats.....	46
IV.2.	Tests d'activité anti-proliférative sur les cellules tumorales LNCaP.....	47

IV.2.a.	Résultats obtenus pour les analogues de la flutamide.....	47
IV.2.b.	Résultats obtenus pour les analogues de la bicalutamide.....	49
IV.3.	Tests d'activité anti-proliférative sur les cellules tumorales PC3.....	51
IV.3.a.	Résultats.....	51
IV.3.b.	Interprétation des résultats.....	51
IV.4.	Résultats des calculs d'IC50.....	53
V.	Conclusion.....	54
VI.	Partie expérimentale.....	55

I. Introduction

Le but de ce travail est de synthétiser des analogues organométalliques d'anti-androgènes non stéroïdiens qui présentent une grande affinité de liaison envers AR et des effets anti-prolifératifs importants envers des cellules tumorales prostatiques. Pour cela, un groupement organométallique possédant des propriétés cytotoxiques doit être incorporé au niveau de la structure des anti-androgènes. Le choix du complexe organométallique s'est porté sur le ferrocène car il possède des propriétés cytotoxiques et est beaucoup moins coûteux que d'autres complexes, tels que les complexes de rhénium, de manganèse ou de rhodium.

Une fois le groupe organométallique choisi, la question est de savoir où le ferrocène doit être introduit dans la structure de la flutamide, du 2-hydroxyflutamide et de la bicalutamide. D'après de nombreuses études portant sur la relation structure/activité de ces molécules, il s'est avéré que plusieurs caractéristiques structurales sont importantes pour augmenter l'affinité de liaison envers AR. Des schémas de modélisation du 2-hydroxyflutamide (Figure 15) et de la bicalutamide (Figures 14B et 14D) dans le site de liaison de AR ont été proposés par Marhefka¹⁰⁹ et Bohl¹¹⁰. Ces caractéristiques sont les suivantes¹⁰⁹ :

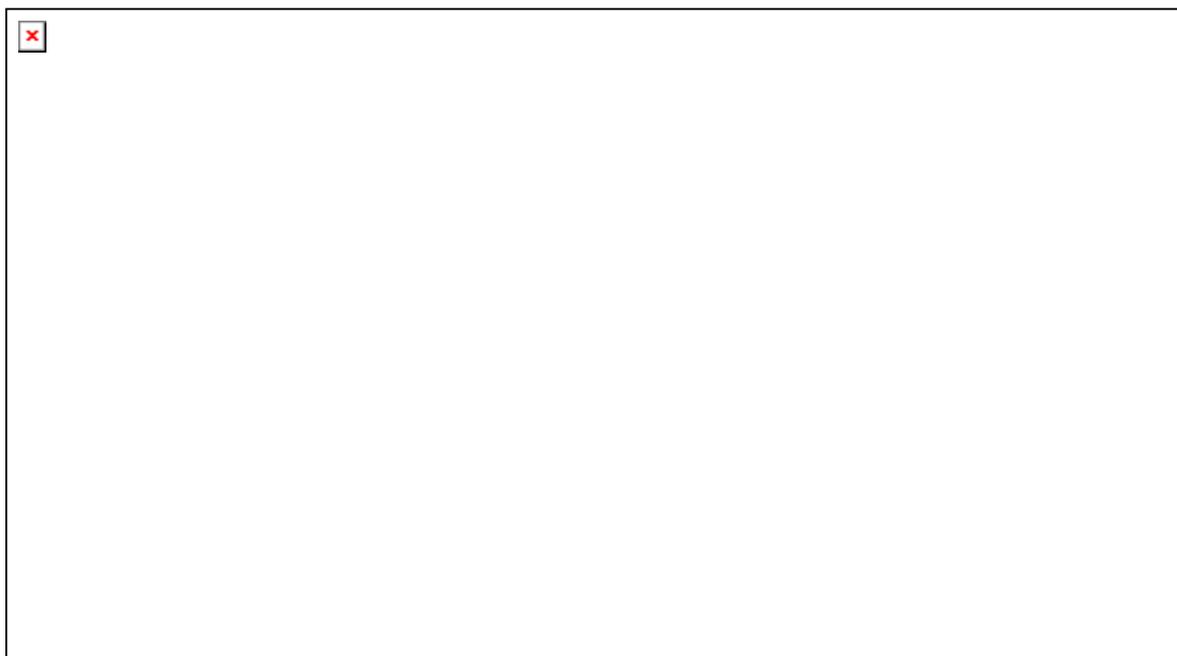


Figure 15 : Schéma du site de liaison de AR lié au 2-hydroxyflutamide (blanc) et à la testostérone (bleu).¹⁰⁹

¹⁰⁹ Marhefka C.A., Moore B.M., Bishop T.C., Kirkovsky L., Mukherjee A., Dalton J.T., Miller D.D., *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 1729.

¹¹⁰ Bohl C.E., Gao W., Miller D.D., Bell C.E., Dalton J.T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2005**, *102*, 6201.

- Présence d'un noyau aromatique A déficient en électrons car il comprend deux groupes attracteurs d'électrons : un groupe accepteur de liaison hydrogène en position 4 (NO₂ ou CN) et un groupe trifluorométhyle CF₃ hydrophobe en position 3 (Figure 16). En effet, d'une part, ce groupe hydrophobe interagit avec une région hydrophobe (Val746 et Met742) se trouvant à l'intérieur de la poche de liaison de AR, permettant ainsi aux anti-androgènes de se stabiliser et d'avoir une meilleure affinité pour AR. D'autre part, le groupe NO₂ ou CN interagit par l'intermédiaire de liaisons H avec les acides aminés Gln711 et Arg752, favorisant ainsi la liaison à AR.
- Présence d'un groupe donneur de liaison hydrogène (alcool) dans le cas du 2-hydroxyflutamide et de la bicalutamide. Il interagit essentiellement avec l'acide aminé Asn705. Cette interaction est cruciale dans la mesure où la perte d'affinité du ligand vis-à-vis de AR est due en partie à l'absence de l'alcool en α du carbonyle.
- Présence du noyau aromatique B, dans le cas de la bicalutamide, lié au reste de la molécule par un lien accepteur de liaison hydrogène (sulfone SO₂, thioéther ou éther). En effet, il pourrait interagir avec l'acide aminé Thr877. C'est une région importante de AR, car elle défavoriserait les interactions avec des stéroïdes possédant des groupements trop encombrants en position 17, tels les minéralocorticoïdes, oestrogènes et progestins. La mutation T877A observée dans les cellules LNCaP permettrait à ces ligands de se lier à AR et provoquerait donc une diminution de la spécificité de liaison.¹¹¹ De plus, le noyau B se situe dans une poche hydrophobe formée par les acides aminés Met780, Cys784 et Met787. Il formerait des interactions hydrophobes, notamment avec les deux méthionines. Ces acides aminés joueraient un rôle important en empêchant les substituants encombrants en *para* de se lier à AR.

En conclusion, dans un premier temps, a été envisagée la synthèse du dérivé ferrocénique de la flutamide **5** où le noyau A a été substitué par le ferrocène. Dans un deuxième temps, la synthèse d'analogues ferrocéniques de la flutamide **6** et **7**, dans lesquels le noyau A a été conservé, a été réalisée. Dans un troisième temps, a été entreprise la synthèse du 2-hydroxyflutamide **8**, ainsi que la synthèse des analogues ferrocéniques de la bicalutamide **15** et **16**. Ces analogues comprennent un ferrocène, à la place du noyau B, relié au reste de la molécule par un lien éther. Le choix du remplacement du lien sulfone par le lien éther a été motivé par des études pharmacocinétiques antérieures. Elles ont permis d'identifier le lien thioéther ou sulfone comme un site métabolique important, suggérant un métabolisme rapide en métabolites actifs.¹¹² En outre, l'analogue éthéré de la bicalutamide possède une affinité de liaison à AR deux fois supérieure à celle de la bicalutamide ; toutefois, il possède une activité agoniste.¹¹³ Ceci pourrait s'expliquer par le fait que cette molécule adopterait une

¹¹¹ Veldscholte J., Berrevoets C.A., Ris-Stalpers C., Kuiper G.G.J.M., Jenster G., Trapman J., Brinkmann A.O., Mulder E., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1992**, *41*, 655.

¹¹² Yin D., Xu H., He Y., Kirkovsky L.I., Miller D.D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2003**, *304*, 1323.

¹¹³ Marhefka C.A., Gao W., Chung K., Kim J., He Y., Yin D., Bohl C., Dalton J.T., Miller D.D., *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 993.

conformation plus compacte que la bicalutamide. En effet, elle serait probablement due à l'établissement d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'alcool chiral et l'oxygène du lien éther et à la flexibilité de ce lien. Cette conformation permettrait au noyau B de se placer dans la poche, tout en évitant la gêne stérique avec la chaîne latérale encombrante de l'acide aminé W741, qui a été observée dans le cas de la bicalutamide.¹⁰⁸ Le reste de la molécule comprend un alcool chiral en α du carbonyle. Ces molécules sont présentées sur la Figure 16.

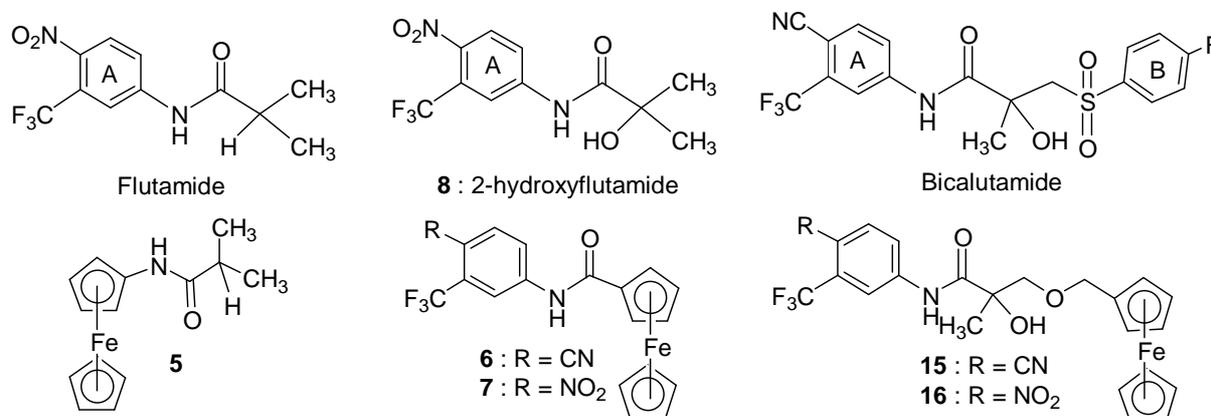


Figure 16 : Les anti-androgènes non stéroïdiens et leurs analogues ferrocéniques

II. Synthèse des analogues ferrocéniques de la flutamide

II.1. Synthèse du dérivé ferrocénique 5

II.1.a. Stratégie de synthèse

Dans un premier temps, a été envisagée la synthèse du composé ferrocénique 5. La stratégie globale de synthèse consiste en une réaction de couplage entre un chlorure d'acide commercial, le chlorure d'isobutyryle, et l'aminoferrocène 4 (Schéma 3). L'aminoferrocène a été synthétisé à partir du ferrocène, suivant la réaction de réarrangement de Curtius.

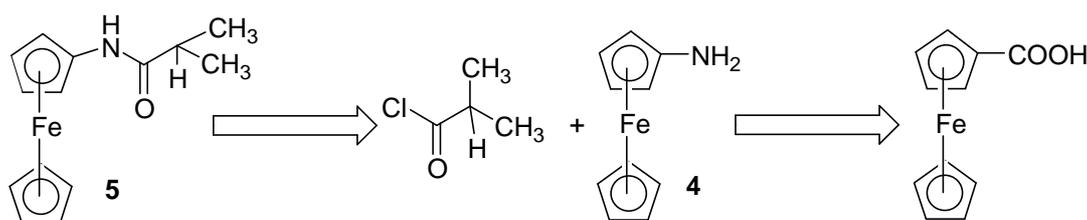


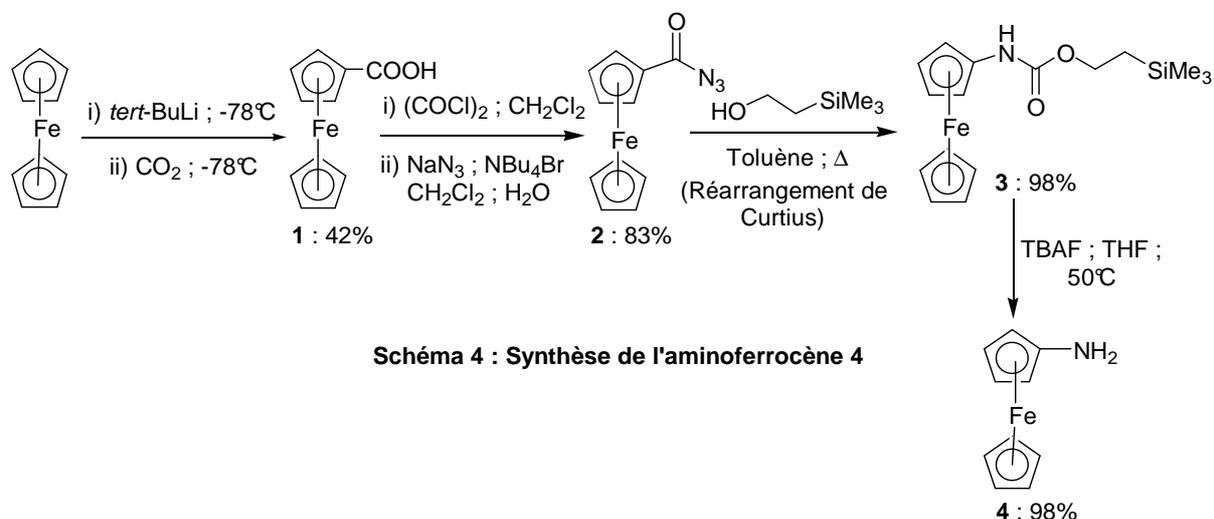
Schéma 3 : Stratégie de synthèse de l'analogue 5

II.1.b. Synthèse de l'aminoferrocène 4

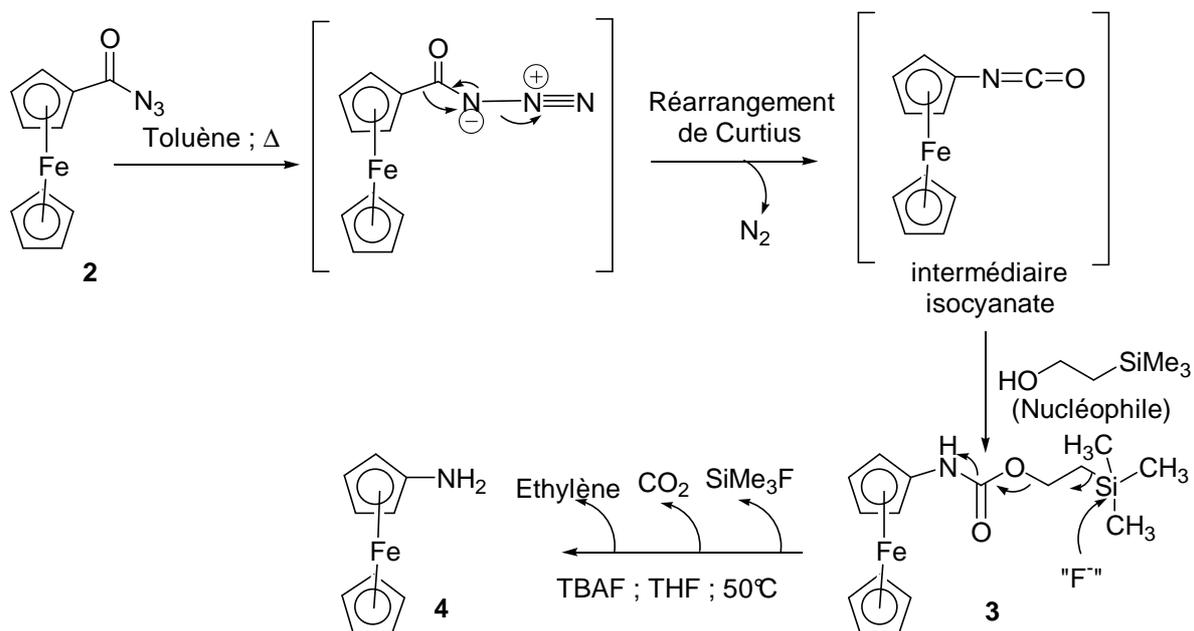
La synthèse de 4 se fait à partir du ferrocène et est présentée sur le Schéma 4. Le ferrocène

¹⁰⁸ Yin D., He Y., Perera M.A., Hong S.S., Marhefka C., Stourman N., Kirkovsky L., Miller D.D., Dalton J.T., *Mol. Pharmacol.*, **2003**, 63, 211.

est utilisé pour synthétiser le précurseur de la réaction qui est l'acide carboxylique du ferrocène **1**. Ensuite, l'acide est activé en un chlorure d'acide électrophile qui va réagir avec un nucléophile, l'azoture de sodium NaN_3 , pour former le dérivé acyle azide du ferrocène **2**. Ce produit est le précurseur de la réaction de réarrangement de Curtius.¹¹⁴



Le mécanisme de ce réarrangement est détaillé sur le Schéma 5 et comprend deux étapes. La première étape consiste en un chauffage de l'acyle azide à reflux du toluène qui provoque un dégagement d'azote N_2 pour former un isocyanate. La deuxième étape consiste en une



¹¹⁴ Butler D.C.D., Richards C.J., *Organometallics*, **2002**, *21*, 5433.

addition nucléophile d'un alcool silylé, le 2-triméthylsilyl-éthanol¹¹⁵, sur l'isocyanate électrophile. Cette étape aboutit à la formation du dérivé carbamate silylé du ferrocène **3**.

Le carbamate silylé **3** est en fait un groupe protecteur des amines ; par conséquent, la fin de la synthèse va consister en une réaction de déprotection de la fonction amine. Cette réaction s'effectue en présence d'un réactif nucléophile utilisé pour enlever les dérivés silylés, le fluorure de tétrabutylammonium (TBAF). Cette réaction entraîne un dégagement gazeux d'éthylène et de CO₂, et permet ainsi la formation de l'aminoferrocène **4**.¹¹⁶ L'ensemble de la synthèse a été réalisé avec un rendement global excellent (81% à partir de **1**).

II.1.c. Fin de la synthèse

L'inconvénient majeur de l'aminoferrocène est sa forte instabilité vis-à-vis de l'air et de la lumière. Ce réactif ne peut pas se conserver, car il se dégrade facilement, et doit être utilisé rapidement. La fin de la synthèse consiste en une réaction de couplage effectuée en milieu basique entre l'aminoferrocène nucléophile **4** et le chlorure d'isobutyryle (Schéma 6).¹¹⁷ Elle a abouti à la formation de l'amide correspondant **5** avec un rendement moyen (43%).

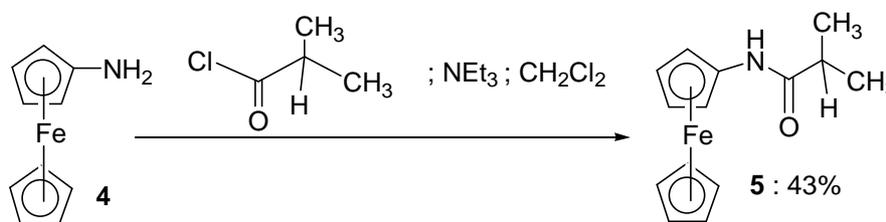


Schéma 6 : Synthèse de l'analogue **5**

II.2. Synthèse des dérivés ferrocéniques **6** et **7**

Dans un deuxième temps, a été envisagée la synthèse des analogues **6** et **7**. La synthèse de ces dérivés est montrée sur le Schéma 7. Ce sont des composés dans lesquels le noyau aromatique contenant le groupe NO₂ ou CN a été conservé. La stratégie globale de synthèse consiste en une réaction de couplage effectuée en milieu basique entre une aniline commerciale et un chlorure d'acide généré *in situ*.

Le chlorure d'acide a été engendré par la réaction entre l'acide carboxylique du ferrocène **1** et le chlorure d'oxalyle (COCl)₂.¹¹⁴ Le 4-cyano-3-trifluorométhyl-aniline a été synthétisé à partir du 4-bromo-3-trifluorométhyl-aniline¹¹⁸ commercial, selon la procédure décrite par

¹¹⁵ Capson T.L., Poulter C.D., *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 3515.

¹¹⁶ Van Leusen D., Hessen B., *Organometallics*, **2001**, 20, 224.

¹¹⁷ Taylor M.J., Hoffman T.Z., Yli-Kauhaluoma J.T., Lerner R.A., Janda K.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 12783.

¹¹⁴ Butler D.C.D., Richards C.J., *Organometallics*, **2002**, 21, 5433.

¹¹⁸ Friedman L., Shechter H., *J. Org. Chem.*, **1961**, 26, 2522.

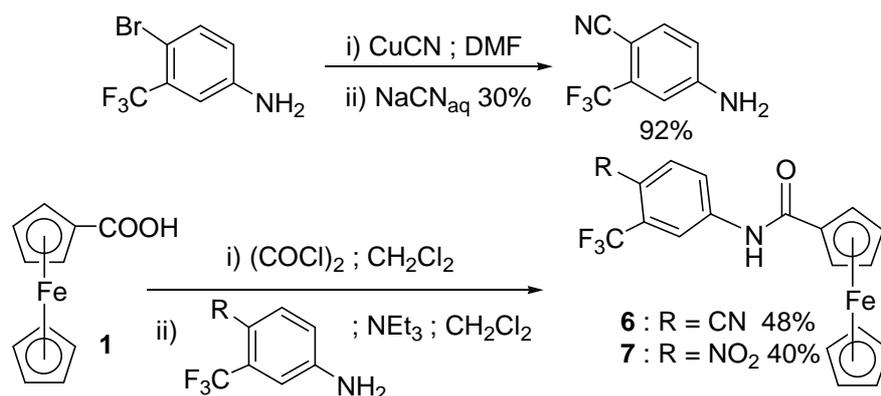


Schéma 7 : Synthèse des analogues 6 et 7

Jones.¹¹⁹ Le 4-nitro-3-trifluorométhyl-aniline est un produit commercial. Ces anilines réagissent en présence du chlorure d'acide pour former les amides **6** et **7** avec des rendements moyens (48% pour le composé **6** et 40% pour le composé **7**).¹¹⁷

III. Synthèse du 2-hydroxyflutamide et des analogues ferrocéniques de la bicalutamide

III.1. Synthèse du 2-hydroxyflutamide **8**

Dans un premier temps, a été envisagée la synthèse du métabolite actif de la flutamide, le 2-hydroxyflutamide **8**. La synthèse de ce composé est présentée sur le Schéma 8. La stratégie globale de synthèse consiste en une réaction de couplage effectuée entre le 4-nitro-3-trifluorométhyl-aniline commercial et un chlorure d'acide généré *in situ*.¹²⁰ Le chlorure d'acide a été engendré par la réaction de l'acide 2-hydroxyisobutyrique avec le chlorure de thionyle SOCl_2 . Il réagit avec le 4-nitro-3-trifluorométhyl-aniline pour former le 2-

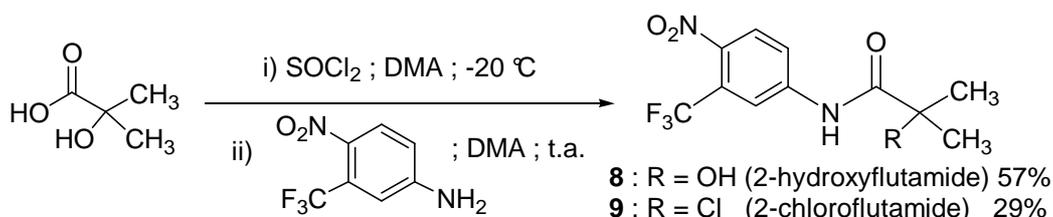


Schéma 8 : Synthèse du 2-hydroxyflutamide

¹¹⁹ Jones T.R., Varney M.D., Webber S.E., Lewis K.K., Marzoni G.P., Palmer C.L., Kathardekar V., Welsh K.M., Webber S., Matthews D.A., Appelt K., Smith W.W., Janson C.A., Villafranca J.E., Bacquet R.J., Howland E.F., Booth C.L.J., Herrmann S.M., Ward R.W., White J., Moomaw E.W., Bartlett C.A., Morse C.A., *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 904.

¹¹⁷ Taylor M.J., Hoffman T.Z., Yli-Kauhalauma J.T., Lerner R.A., Janda K.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 12783.

¹²⁰ Morris J.J., Hughes L.R., Glen A.T., Taylor P.J., *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 447.

hydroxyflutamide **8**. Cette réaction a été effectuée avec un rendement correct (environ 60%). Néanmoins, elle a conduit à la formation d'un sous-produit chloré, le 2-chloroflutamide **9**, qui résulte de l'action de SOCl_2 sur le 2-hydroxyflutamide formé. Il a été obtenu avec un rendement non négligeable de 30%.

III.2. Synthèse des analogues ferrocéniques **15** et **16** de la bicalutamide

Dans un deuxième temps, a été envisagée la synthèse des dérivés **15** et **16** (Figure 17). Ce sont des dérivés ferrocéniques de la bicalutamide possédant une fonction éther à la place d'un sulfone, un alcool chiral en α de l'amide et un noyau aromatique contenant CN ou NO_2 en position 4. Ces composés chiraux ont été synthétisés en série racémique.

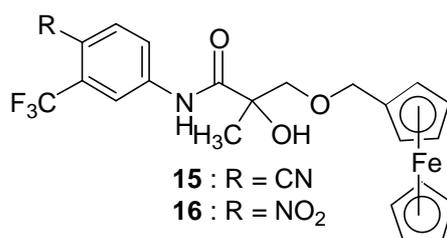


Figure 17 : Dérivés ferrocéniques de la bicalutamide

III.2.a. Stratégie de synthèse

La stratégie globale de synthèse est présentée sur le Schéma 9 et consiste en une réaction d'addition nucléophile du ferrocénylméthanol **14** sur un époxyde. Le ferrocénylméthanol est synthétisé à partir du ferrocèncarboxaldéhyde, alors que l'époxyde est synthétisé à partir d'un alcène.

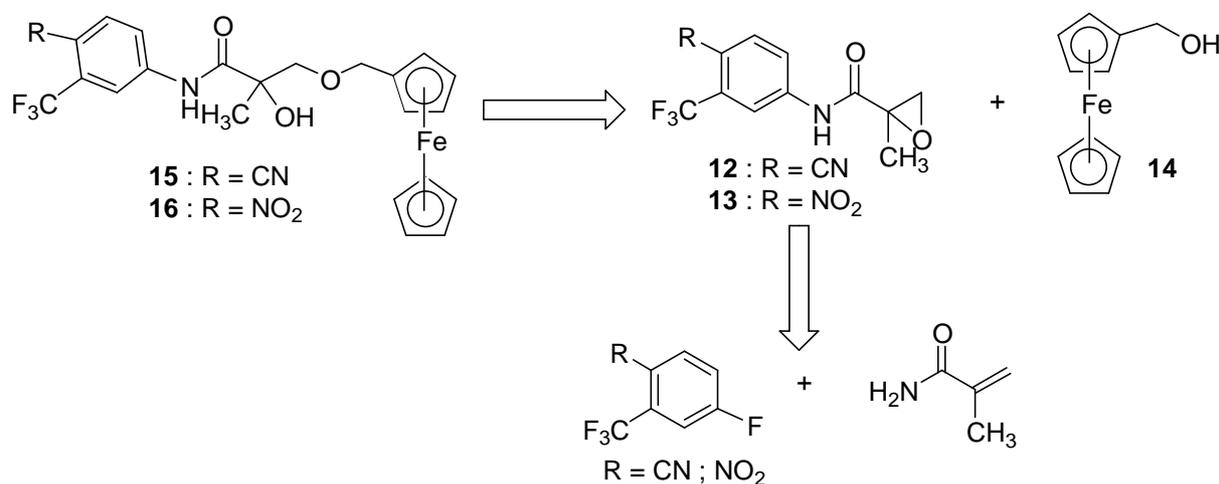


Schéma 9 : Stratégie de synthèse des analogues **15** et **16**

III.2.b. Les étapes de la synthèse

- Synthèse de l'intermédiaire époxyde : La synthèse des époxydes **12** et **13** est présentée sur le Schéma 10. Elle a été effectuée en deux étapes. La première étape est la réaction

de formation des alcènes **10** et **11**. Pour cela, deux stratégies de synthèse ont été utilisées. Dans un premier temps, a été envisagée une réaction de couplage¹¹⁷ entre le 4-nitro-3-trifluorométhyl-aniline et un chlorure d'acide généré à partir de l'acide méthacryloïque commercial. Cette réaction a fonctionné ; toutefois elle a été effectuée avec un rendement faible (autour de 20%). Cette réaction doit donc être optimisée. Pour cela, une autre stratégie a été adoptée. Elle fait intervenir une réaction de substitution nucléophile en milieu basique entre deux produits commerciaux, le méthacrylamide et le 4-(cyano ou nitro)-3-trifluorométhyl-fluorobenzène.¹²¹ Cette réaction a été effectuée avec des rendements corrects (50% pour le dérivé cyano **10** et 88% pour le dérivé nitro **11**). La deuxième étape consiste en une réaction d'époxydation de l'alcène. Cette réaction a été réalisée en présence de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et d'anhydride trifluoroacétique.¹²¹ Elle a permis la formation du dérivé époxyde avec de très bons rendements (87% pour le dérivé cyano **12** et 62% pour le dérivé nitro **13**).

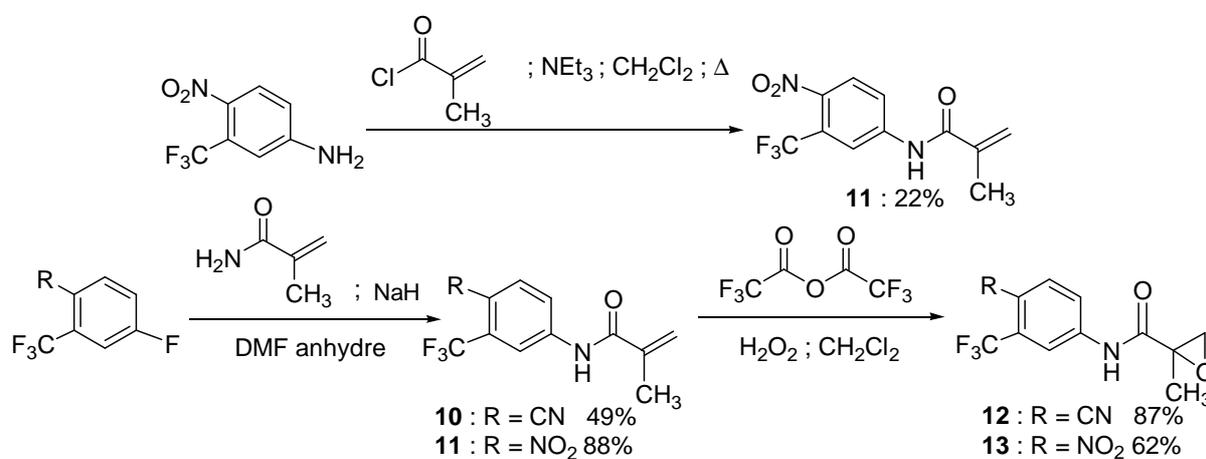


Schéma 10 : Synthèse des époxydes 12 et 13

- Synthèse du ferrocénylméthanol **14** (Schéma 11) : Elle consiste en une réaction de réduction du produit commercial, le ferrocèncarboxaldéhyde, en présence d'hydrure d'aluminium lithium LiAlH₄.¹²² Elle a été effectuée avec un rendement quantitatif.
- Fin de la synthèse : Elle consiste en une réaction d'addition nucléophile en milieu basique du ferrocénylméthanol **14** sur les époxydes **12** et **13** (Schéma 11).¹²¹ Elle a été effectuée en milieu basique et a permis la formation des deux analogues **15** et **16** avec des rendements faibles (autour de 30%).

¹¹⁷ Taylor M.J., Hoffman T.Z., Yli-Kauhaluoma J.T., Lerner R.A., Janda K.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 12783.

¹²¹ Chen B.C., Zhao R., Gove S., Wang B., Sundeen J.E., Salvati M.E., Barrish J.C., *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 10181.

¹²² Lednicer D., Lindsay J.K., Hauser C.R., *J. Org. Chem.*, **1958**, 23, 653.

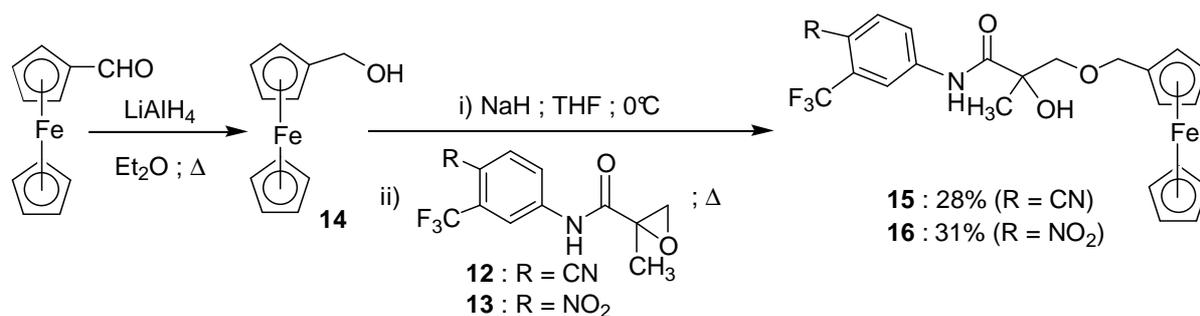


Schéma 11 : Synthèse du ferrocénylméthanol 14 et des deux analogues 15 et 16

III.2.c. Structure cristallographique du composé 16

La structure cristallographique de la molécule **16** a été déterminée par analyse structurale aux rayons X dans le laboratoire du Professeur M. J. McGlinchey de l'Université de Dublin. Cette structure est présentée sur la Figure 18 (page suivante) et correspond bien au composé dont la synthèse a été envisagée. Les données cristallographiques de cette molécule sont indiquées en annexe.

IV. Résultats des tests biologiques

Une fois synthétisés, les analogues ferrocéniques (Figure 19) sont soumis à plusieurs études biochimiques. Pour cela, ils doivent avoir une pureté supérieure ou égale à 98%, déterminée par HPLC. Les études biochimiques comprennent les tests d'affinité relative de liaison au récepteur AR (tests RBA), des études d'activité anti-proliférative effectuées sur les lignées cellulaires tumorales prostatiques, LNCaP et PC3, et des calculs d'IC₅₀ effectués sur PC3.

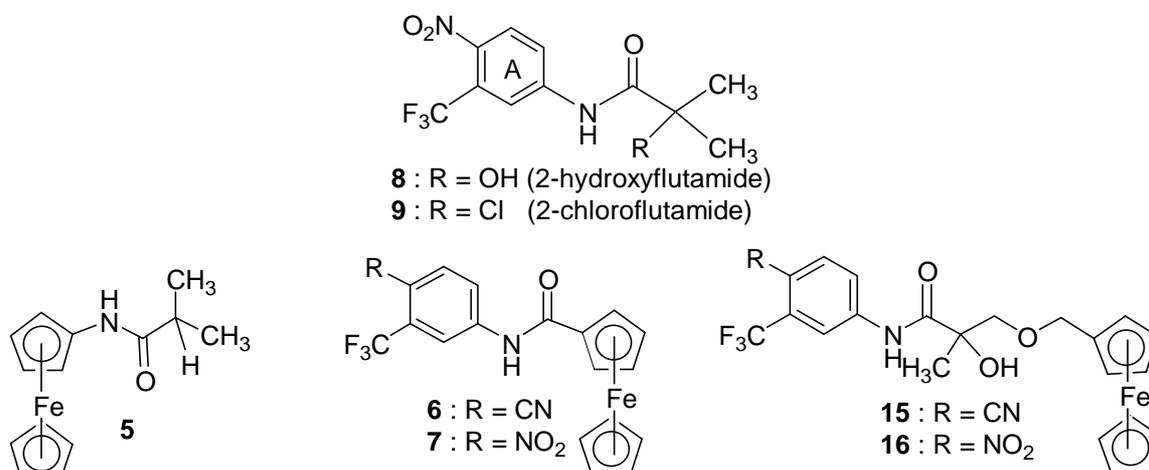


Figure 19 : Liste des molécules pour les tests biologiques

IV.1. Tests RBA

Ce test est appelé test RBA pour Relative Binding Affinity et a été effectué sur des récepteurs AR purifiés. Les valeurs de RBA ont été mesurées en % par rapport à un composé de référence, ici la DHT, dont la valeur RBA est fixée à 100% par définition.

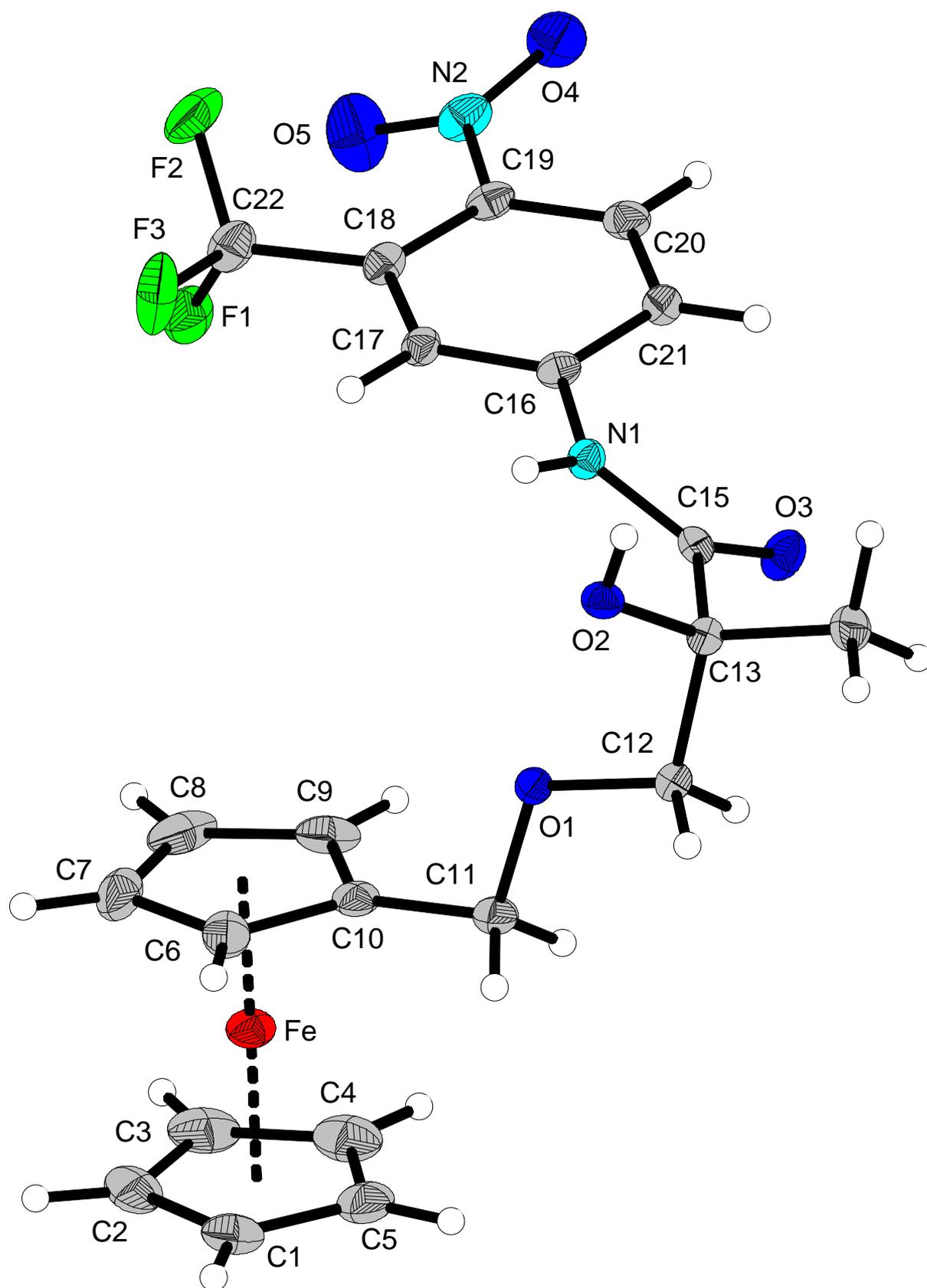


Figure 18 : Structure aux rayons X du composé 16

IV.1.a. Résultats

Les valeurs de RBA des analogues ferrocéniques **5**, **6**, **7**, **15** et **16**, ainsi que les valeurs du 2-hydroxyflutamide **8** et du 2-chloroflutamide **9**, sont reportées sur le Tableau 1. Les valeurs du log Po/w des produits sont aussi reportées sur le Tableau 1. Le log Po/w mesure le caractère hydrophobe de la molécule.¹²³

Molécule	RBA (%)	log Po/w
DHT	100	
2-hydroxyflutamide 8	0,204 ± 0,010	3,75
2-chloroflutamide 9	0,010 ± 0,010	4,15
5	0,000	2,64
6	0,000	4,10
7	0,007 ± 0,050	4,42
15	0,040 ± 0,010	4,63
16	0,084 ± 0,020	5,01

Tableau 1 : Résultats des tests RBA et log Po/w

IV.1.b. Interprétation des résultats

Il faut tout d'abord noter la faible valeur de RBA trouvée pour le 2-hydroxyflutamide **8** ; il en est d'ailleurs de même pour la plupart des anti-androgènes de synthèse. Ceci est dû à la géométrie du site actif du récepteur qui épouse précisément la forme de la testostérone, laissant peu de place pour des modifications structurales. En outre, dans le cas du 2-chloroflutamide **9**, la substitution de l'hydroxyle par le chlore fait encore baisser l'affinité. Ce résultat confirme l'importance de l'alcool chiral dans la reconnaissance du récepteur AR.

En ce qui concerne le produit **5**, la valeur de RBA est nulle. Par conséquent, il ne reconnaît pas du tout AR. Ce résultat confirme l'importance du noyau aromatique A dans la reconnaissance de AR. En outre, la molécule ne semble pas stable, probablement par oxydation du ferrocène. Les analogues **6** et **7** ont des valeurs de RBA quasiment nulles, voire nulles, confirmant que la présence du noyau aromatique A n'est pas suffisante pour augmenter l'affinité de liaison à AR.

Enfin, les valeurs de RBA des analogues ferrocéniques **15** (0,040 ± 0,010%) et **16** (0,084 ± 0,020%) sont encore plus faibles en comparaison avec celle du 2-hydroxyflutamide **8** (0,204 ± 0,010%), mais sont plus grandes que celles obtenues pour les autres dérivés ferrocéniques. Ces résultats vérifient donc les hypothèses énoncées précédemment, à savoir que la présence du noyau A, ainsi que de l'alcool, favoriserait la liaison à AR. D'autre part, en comparant les produits **15** et **16**, on constate que le dérivé nitro **16** a une affinité de liaison deux fois plus

¹²³ Pomper M.G., Van Brocklin H., Thieme M.M., Thomas R.D., Kiesewetter D.O., Carlson K.E., Mathias C.J., Welch M.J., Katzenellenbogen J.A., *J. Med. Chem.*, **1990**, 33, 3143.

élevée que le dérivé cyano **15**. Ce résultat serait dû au fait que le groupe NO₂ est plus électroattracteur que CN.¹²⁴

Les valeurs de log Po/w des analogues ferrocéniques, sont supérieures à celle du 2-hydroxyflutamide (3,75), à l'exception du dérivé **5** (2,64). Ce résultat indique que les composés sont hydrophobes. Il a été aussi constaté une amélioration de la valeur RBA en fonction de l'hydrophobicité de la molécule. Ainsi, le dérivé **16**, qui est le plus hydrophobe (log Po/w = 5,01), a la meilleure affinité de liaison envers AR (RBA = 0,084 ± 0,020%).

IV.2. Tests d'activité anti-proliférative sur les cellules tumorales LNCaP

Cette série de tests *in vitro* a été effectuée sur des lignées cellulaires LNCaP. Ce sont des cellules prostatiques tumorales hormono-dépendantes qui contiennent des récepteurs AR mutés au niveau d'un seul acide aminé T877A.^{125, 126} Ces tests nous permettront donc de savoir si les dérivés ferrocéniques ont une activité anti-androgénique vis-à-vis du cancer de la prostate. Les résultats des tests d'activité, concernant les analogues ferrocéniques **5**, **6**, **7**, **15** et **16**, ainsi que le 2-hydroxyflutamide **8**, la DHT et un contrôle (cellules incubées sans produits), sont présentés sur quatre graphiques.

IV.2.a. *Résultats obtenus pour les analogues de la flutamide*

Le graphique 1 représente l'évolution de l'activité anti-androgénique des analogues de la flutamide **5**, **6** et **7** en fonction du temps d'incubation.

La dihydrotestostérone (DHT), incubée à une concentration de 1.10⁻⁶ M, a une faible activité proliférative qui décroît au cours du temps et a même tendance à inhiber la prolifération cellulaire. Ce résultat est en concordance avec des études précédentes confirmant la non-stimulation de ces cellules par des androgènes, à des concentrations élevées (à partir de 1.10⁻⁸ M).^{127, 128} C'est pourquoi on a décidé d'incuber la DHT à une dose de 1.10⁻⁹ M, lors des études anti-prolifératives ultérieures.

D'autre part, les dérivés ferrocéniques de la flutamide **5**, **6** et **7**, incubés à des doses de 1.10⁻⁵ M, se manifestent par une activité anti-proliférative faible pour le composé **5**, et plus importante pour les composés **6** et **7**. Cette activité persiste au cours du temps avec un maximum obtenu au bout de 5 jours. C'est pourquoi on s'est par la suite focalisé sur ce temps

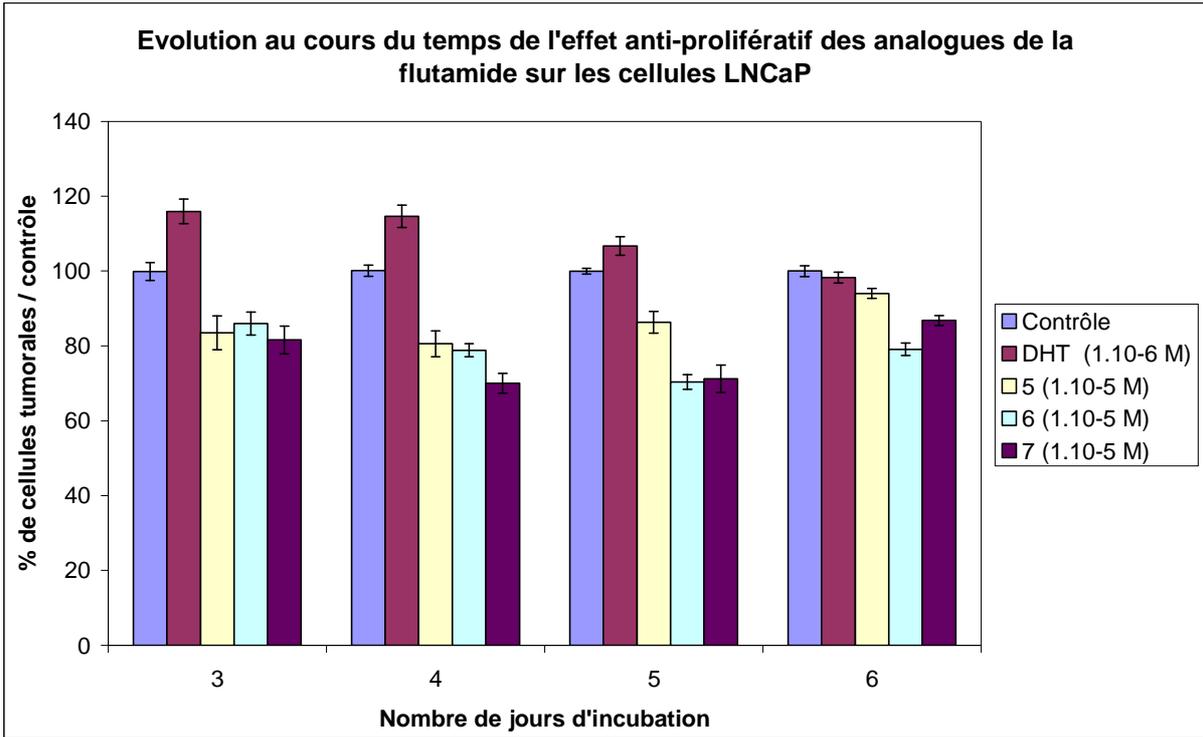
¹²⁴ He Y., Yin D., Perera M., Kirkovsky L., Stourman N., Li W., Dalton J.T., Miller D.D., *Eur. J. Med. Chem.*, **2002**, 37, 619.

¹²⁵ Horoszewicz J.S., Leong S.S., Kawinski E., Karr J.P., Rosenthal H., Ming Chu T., Mirand E.A., Murphy G.P., *Cancer Res.*, **1983**, 43, 1809.

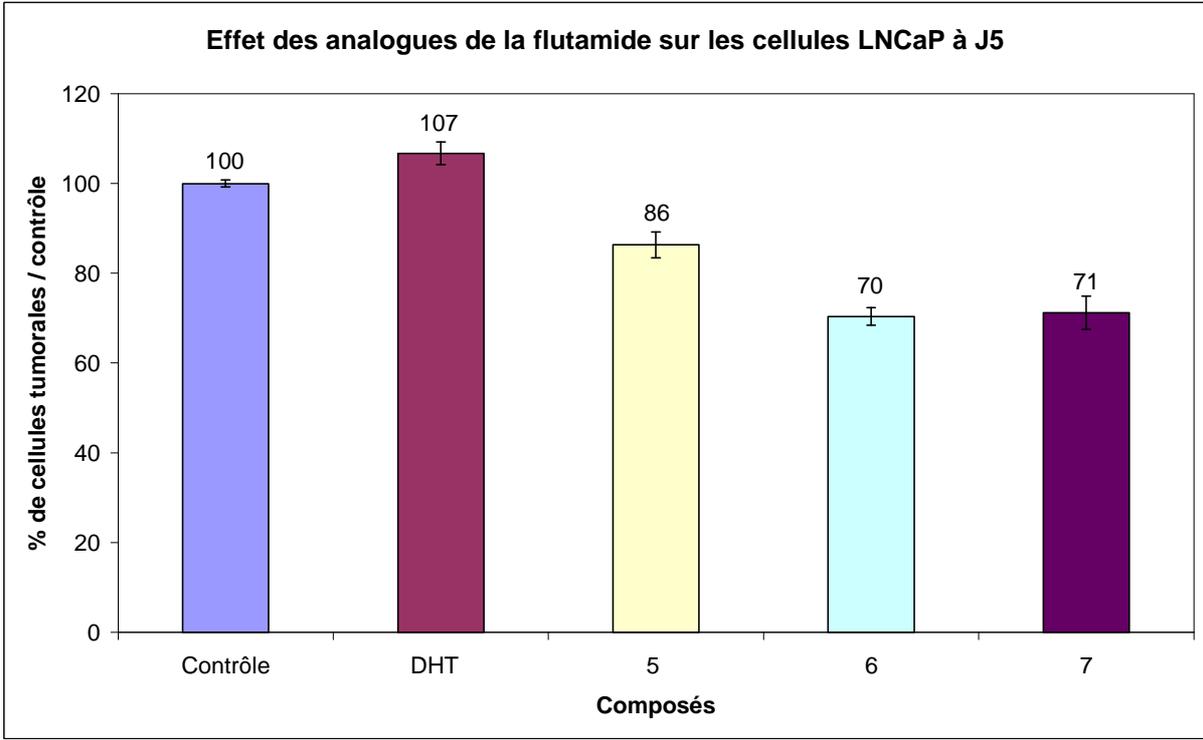
¹²⁶ Beer H.D., Florence C., Dammeier J., McGuire L., Werner S., Duan D.R., *Oncogene*, **1997**, 15, 2211.

¹²⁷ Sonnenschein C., Olea N., Pasanen M.E., Soto A.M., *Cancer Res.*, **1989**, 49, 3474.

¹²⁸ Joly-Pharaboz M.O., Soave M.C., Nicolas B., Mebarki F., Renaud M., Foury O., Morel Y., Andre J.G., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1995**, 55, 67.



Graphique 1



Graphique 2 : Effet anti-prolifératif des analogues de la flutamide à 1.10⁻⁵ M, sauf pour DHT (1.10⁻⁶ M)

pour pouvoir comparer les activités des différents composés ferrocéniques. Les valeurs ont été montrées sur le graphique 2 qui représente le pourcentage de cellules tumorales restantes par rapport au contrôle, 5 jours après incubation des analogues ferrocéniques de la flutamide.

D'après le graphique 2, on remarque, d'une part, que le composé **5** inhibe la prolifération des cellules tumorales LNCaP d'environ 15%. L'effet observé ne peut être attribué à un effet anti-hormonal puisque la reconnaissance du récepteur AR est nulle. Par conséquent, la nature de l'effet pourrait être la cytotoxicité du ferrocène à 1.10^{-5} M. D'autre part, les produits **6** et **7** ont une activité anti-proliférative, envers des cellules tumorales, plus importante que le composé **5**, et similaire entre eux. En effet, ils inhibent la prolifération des cellules LNCaP d'environ 30%. Ce résultat supposerait que le noyau aromatique A serait impliqué dans la stimulation de l'activité anti-androgénique, mais on ne peut exclure un effet cytotoxique associé au ferrocène, puisque la reconnaissance du récepteur AR est quasiment nulle.

IV.2.b. Résultats obtenus pour les analogues de la bicalutamide

Le graphique 3 représente l'évolution de l'activité androgénique/anti-androgénique des composés synthétisés **8**, **15** et **16** en fonction du temps d'incubation.

La dihydrotestostérone (DHT), incubée à une concentration de 1.10^{-9} M, possède une activité proliférative considérable qui décroît légèrement au cours du temps. Ce résultat a été confirmé par des études précédentes.^{127, 129} Elles démontrent, d'une part, que la stimulation de ces cellules par des androgènes décroît après 7 jours de culture. D'autre part, elle est dépendante de la dose d'androgènes incubée et elle est optimale pour des concentrations de 0,1-1 nM.

Comme cela a été observé par Veldschote¹¹¹, le 2-hydroxyflutamide **8**, incubé à une dose de 1.10^{-6} M, a une activité proliférative considérable, à trois jours, qui est maintenue au cours du temps. Son activité agoniste pourrait être expliquée par la présence de récepteurs AR mutants (T877A) dans les cellules LNCaP. Ainsi, cette mutation pourrait permettre au 2-hydroxyflutamide d'activer les gènes cibles du récepteur AR (PSA = Prostate Specific Antigène) et de stimuler la croissance tumorale.¹³⁰ L'activation de PSA serait en outre amplifiée en présence de ARA70, qui est un coactivateur de AR.¹³¹

En revanche, les dérivés ferrocéniques de la bicalutamide **15** et **16** ont une faible activité anti-proliférative, à des concentrations de 1.10^{-6} M. Ce résultat suggère que la présence du ferrocène jouerait un rôle non négligeable dans la reconnaissance de récepteurs AR mutants,

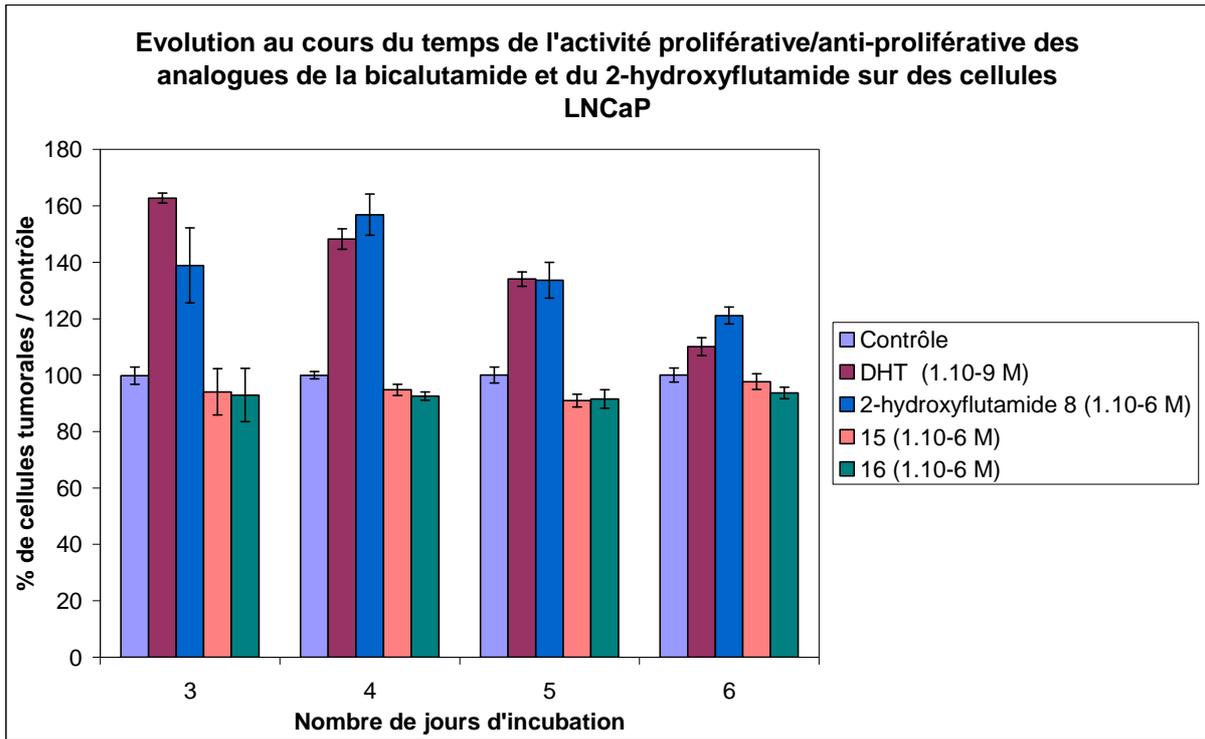
¹²⁷ Sonnenschein C., Olea N., Pasanen M.E., Soto A.M., *Cancer Res.*, **1989**, 49, 3474.

¹²⁹ Berns E.M.J.J., de Boer W., Mulder E., *The Prostate*, **1986**, 9, 247.

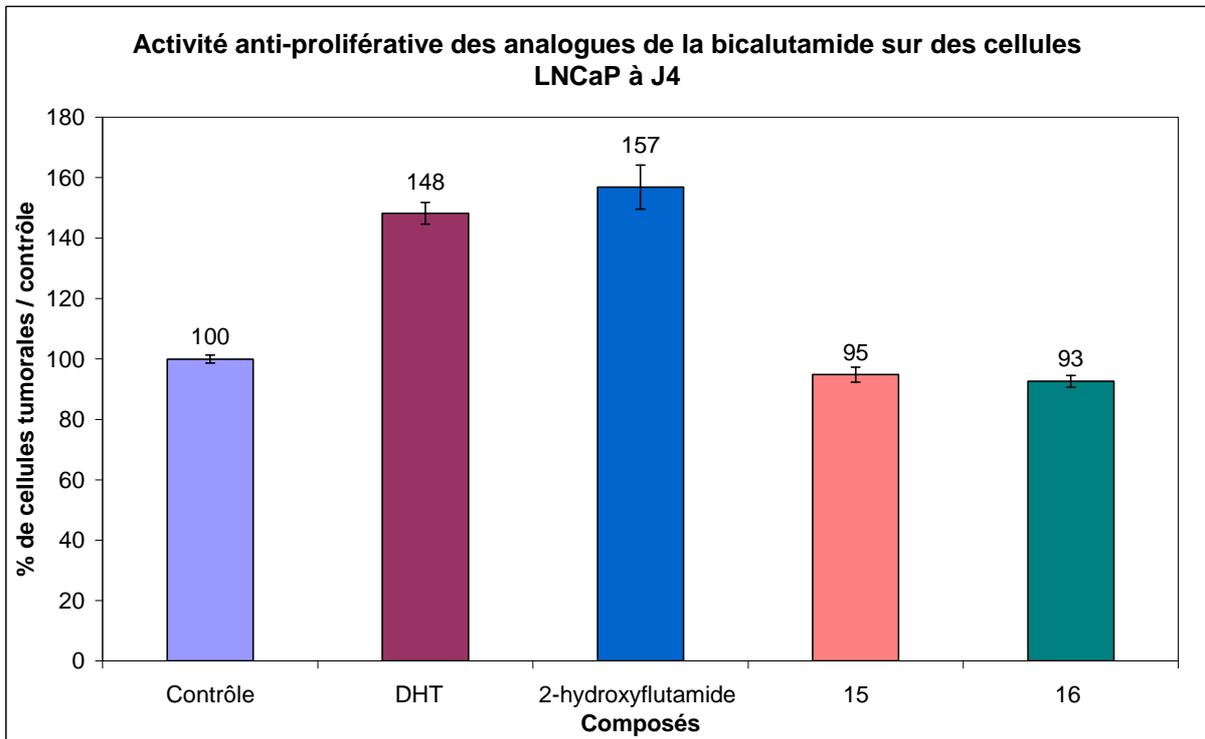
¹¹¹ Veldscholte J., Berrevoets C.A., Ris-Stalpers C., Kuiper G.G.J.M., Jenster G., Trapman J., Brinkmann A.O., Mulder E., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1992**, 41, 655.

¹³⁰ Miyamoto H., Yeh S., Wilding G., Chang C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1998**, 95, 7379.

¹³¹ Yeh S., Miyamoto H., Chang C., *The Lancet*, **1997**, 349, 852.



Graphique 3



Graphique 4 : Effet des composés à 1.10^{-6} M, sauf pour la DHT (1.10^{-9} M).

mais la dualité d'un effet cytotoxique due au ferrocène ne peut être écartée. La liaison à de tels récepteurs impliquerait alors une non-prolifération des cellules cancéreuses. De plus, le faible effet anti-prolifératif des composés **15** et **16** est maintenu au cours du temps. La faible activité anti-androgénique des composés **15** et **16** a été mise en évidence sur le graphique 4 qui représente le pourcentage de cellules tumorales restantes par rapport au contrôle, 4 jours après incubation des composés.

IV.3. Tests d'activité anti-proliférative sur les cellules tumorales PC3

IV.3.a. *Résultats*

Cette série de tests *in vitro* a été effectuée sur des lignées cellulaires PC3. Ce sont des cellules prostatiques tumorales hormono-indépendantes qui n'expriment pas le gène codant pour le récepteur AR sauvage. Par conséquent, elles ne contiennent pas AR.¹³² Ces tests nous permettront donc de savoir si les composés synthétisés agissent ou non sur de telles cellules et, en conséquence, si de tels analogues ont un pouvoir cytotoxique. Les résultats de ces tests d'activité, concernant les analogues ferrocéniques **5**, **6**, **7**, **15** et **16**, ainsi que le 2-hydroxyflutamide **8**, la DHT et un contrôle (cellules incubées sans produits), sont présentés sur deux graphiques. Le graphique 5 représente l'évolution de l'activité anti-androgénique des composés synthétisés en fonction du temps d'incubation.

IV.3.b. *Interprétation des résultats*

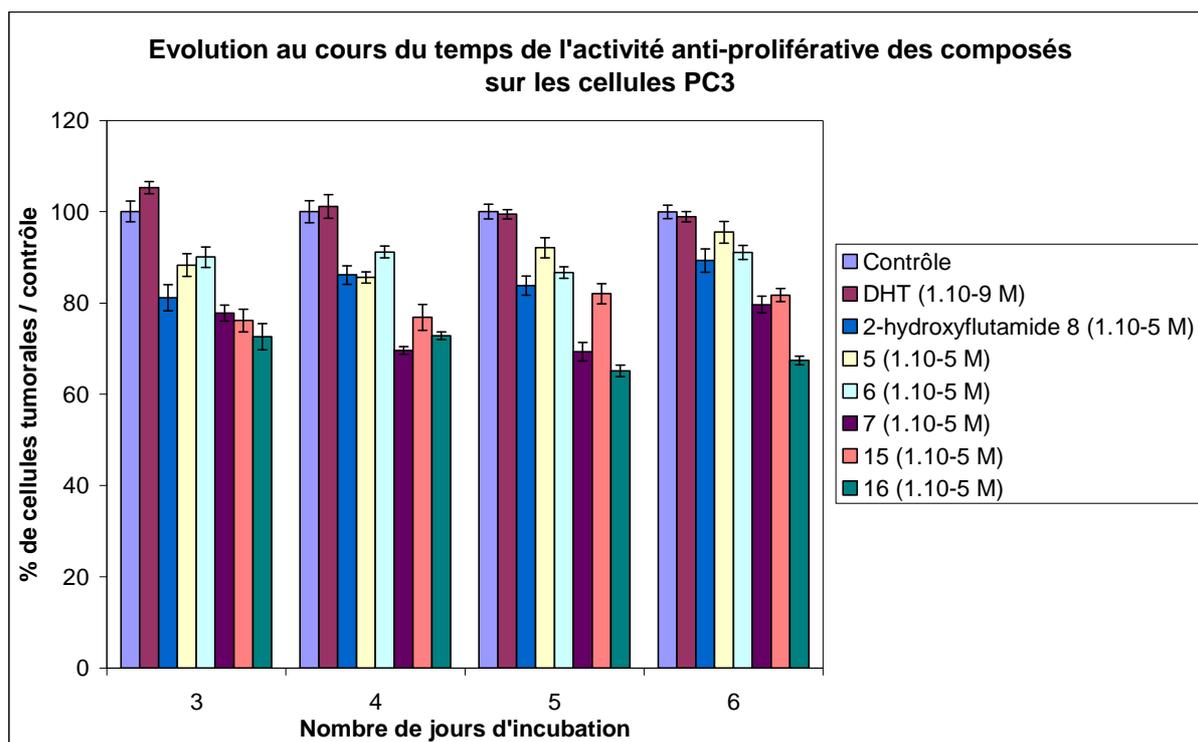
La dihydrotestostérone (DHT) ne possède aucune activité proliférative. Ce résultat est attendu puisque les cellules PC3 ne contiennent pas de récepteurs AR.

Le 2-hydroxyflutamide **8** possède une activité anti-proliférative (environ 20% de cellules tumorales tuées), à une dose de 1.10^{-5} M, qui est maintenue au cours du temps. Ce résultat mettrait en évidence le rôle joué par l'association entre AR et le coactivateur ARA70 dans l'expression de l'androgénicité du 2-hydroxyflutamide qui a été constatée précédemment sur des cellules tumorales LNCaP.

L'analogue ferrocénique de la flutamide **5** se caractérise par une activité anti-proliférative comparable à celle du 2-hydroxyflutamide, pour une concentration de 1.10^{-5} M. Cette activité est constante au cours du temps, ce qui démontre la faible cytotoxicité de cette molécule.

Les dérivés ferrocéniques cyano **6** et **15**, incubés à des doses de 1.10^{-5} M, ont une activité anti-tumorale constante au cours du temps. Toutefois, le composé **15** a une activité anti-proliférative envers les cellules cancéreuses PC3 meilleure que celle du composé **6**. Ce résultat confirmerait le rôle important joué par la fonction alcool dans l'expression de l'activité cytotoxique. Une conclusion similaire pourrait être déduite en comparant les

¹³² Ohtsu H., Xiao Z., Ishida J., Nagai M., Wang H.K., Itokawa H., Su C.Y., Shih C., Chiang T., Chang E., Lee Y.F., Tsai M.Y., Chang C., Lee K.H., *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 5037.



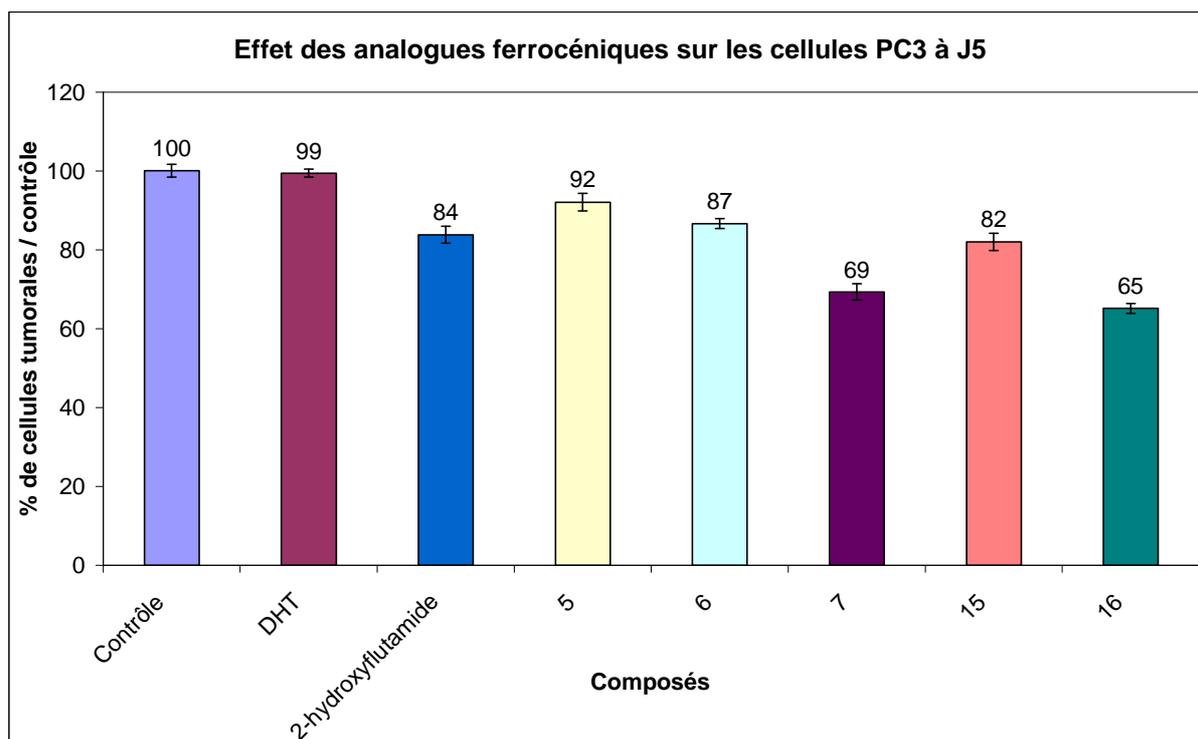
Graphique 5

analogues ferrocéniques nitro **7** et **16**. En effet, le composé **16** a une activité anti-proliférative envers les cellules PC3 supérieure à celle du composé **7**.

Parmi les analogues ferrocéniques nitro **7** et **16**, la molécule **16** est intéressante au niveau de son activité anti-tumorale. En effet, elle se manifeste par une activité anti-proliférative plus importante par rapport au 2-hydroxyflutamide et à son homologue cyano **15**, et surtout qui augmente au cours du temps, pour une concentration de 1.10^{-5} M. Ces résultats démontrent une cytotoxicité accrue des composés nitro par rapport aux composés cyano et au 2-hydroxyflutamide.

Le graphique 6 représente le pourcentage de cellules tumorales restantes par rapport au contrôle, 5 jours après incubation des produits. Il permet de mettre en évidence la différence de cytotoxicité entre les produits cyano **6** et **15** et les dérivés nitro **7** et **16**. On remarque, d'une part, que les composés cyano **6** et **15** inhibent la prolifération des cellules tumorales PC3 entre 15 et 20%, pour des doses de 1.10^{-5} M. En revanche, les dérivés nitro **7** et **16** inhibent la prolifération des cellules cancéreuses PC3 d'environ 30 à 35%, pour des doses de 1.10^{-5} M. Par conséquent, ces deux molécules sont intéressantes. Cette activité cytotoxique significative serait probablement due à la présence de la fonction nitro à la place du cyano. Le groupement NO_2 aurait donc des propriétés cytotoxiques très intéressantes.

En conclusion, les composés **7** et **16**, qui ne reconnaissent AR qu'avec une faible affinité, possèdent une activité anti-tumorale considérable, surtout vis-à-vis des cellules tumorales PC3. Par conséquent, ils seraient des composés de choix pour l'élaboration de nouvelles molécules plus actives contre certains cancers de la prostate.



Graphique 6 : Effet des composés à 1.10^{-5} M, sauf pour DHT (1.10^{-9} M)

IV.4. Résultats des calculs d'IC₅₀

L'IC₅₀ d'un produit représente la concentration d'un produit qui est suffisante pour tuer 50% de cellules tumorales. Plus cette concentration est faible, plus le produit est efficace. Les valeurs d'IC₅₀ ont été évaluées sur la lignée cellulaire PC3. En revanche, les calculs d'IC₅₀ n'ont pas pu être effectués sur les cellules LNCaP. En effet, les résultats obtenus n'ont pas pu être reproductibles, probablement à cause des mutations sur les récepteurs AR qui rendent ces cellules instables. Les valeurs d'IC₅₀ des analogues ferrocéniques synthétisés **5**, **6**, **7**, **15** et **16**, ainsi que celle du 2-hydroxyflutamide **8**, ont été reportées sur le Tableau 2.

Molécule	Effet anti-prolifératif sur PC3 (%) ^a	IC ₅₀ PC3 (μM) ^b	IC ₅₀ MDA-MB231 (μM) ^b
8	84	-	-
5	92	-	-
6	87	-	-
7	69	30,5 ± 1,4	20,3 ± 0,3
15	82	-	-
16	65	16,8 ± 2,0	28,5 ± 1,4

^a pour une concentration de 10 μM après 5 jours d'incubation.

^b Les valeurs d'IC₅₀ sur PC3 et MDA-MB231 ont été déterminées lorsqu'un effet anti-prolifératif significatif a été observé à 10 μM sur PC3.

Tableau 2 : Résultats des IC₅₀

Dans un premier temps, les valeurs d'IC₅₀ de ces produits obtenues sur les cellules PC3 ont été comparées. D'une part, on note que les valeurs d'IC₅₀ du 2-hydroxyflutamide, ainsi que des dérivés ferrocéniques **5**, **6** et **15**, sont largement supérieures à 10 µM, ce qui démontre que ces molécules ne sont pas efficaces envers des cellules cancéreuses prostatiques.

En outre, les résultats d'IC₅₀ démontrent une efficacité plus importante des analogues ferrocéniques nitro, **7** et **16**, par rapport aux analogues cyano, **6** et **15**. Ceci pourrait suggérer que la présence d'un groupe NO₂ en position *para* serait primordiale pour augmenter l'efficacité des anti-androgènes. Enfin, une similitude des résultats a été observée entre les dérivés ferrocéniques **7** et **16**, ce qui laisserait penser que la fonction alcool et le lien éther ne seraient pas indispensables pour accroître l'efficacité.

Comme les valeurs d'IC₅₀ des analogues nitro **7** et **16** évaluées sur des cellules PC3 sont intéressantes, on a décidé, dans un deuxième temps, de les tester sur une autre lignée cellulaire tumorale disponible dans le laboratoire, les cellules MDA-MB231. Ce sont des cellules tumorales des seins hormono-indépendantes. Ces cellules ne contiennent pas le récepteur nucléaire alpha des oestrogènes (ERα), mais elles contiennent ERβ.

Les valeurs d'IC₅₀ des deux molécules **7** et **16** ont donc été évaluées sur les cellules tumorales MDA-MB231 pour évaluer la spécificité de ces molécules vis-à-vis d'un tissu. Les valeurs sont de 20,3 ± 0,3 µM pour le composé **7** et de 28,5 ± 1,4 µM pour le composé **16**. Une similitude des résultats a donc été observée sur les deux lignées cellulaires, ce qui suppose que ces deux molécules auraient aussi une activité cytotoxique envers des cellules présentes dans le cancer du sein.

En résumé, les résultats d'IC₅₀ démontrent une efficacité des dérivés nitro **7** et **16** sur des cellules tumorales hormono-indépendantes de la prostate (PC3) et du sein (MDA-MB231) qui ne contiennent pas AR. Ces résultats, associés aux faibles valeurs de RBA de ces molécules envers AR, suggèrent que d'autres cibles protéiques sont non seulement possibles, mais probables.

V. Conclusion

Les premiers analogues ferrocéniques de la flutamide et de la bicalutamide ont été synthétisés. Ces molécules ont été testées au niveau de leur affinité relative de liaison envers le récepteur AR, de leur activité anti-androgénique et au niveau de leur cytotoxicité envers des cellules tumorales prostatiques. Les tests biologiques ont montré l'existence de deux molécules prometteuses, les analogues **7** et **16**, pour le traitement du cancer de la prostate. En effet, ces composés, bien qu'ils aient une affinité de liaison envers AR plus faible que le 2-hydroxyflutamide, exhibent une activité anti-tumorale importante, surtout sur des cellules hormono-indépendantes. Ces résultats ont été confirmés par des valeurs d'IC₅₀ sur PC3 de l'ordre de 10 µM.

D'autre part, les analogues ferrocéniques chiraux de la bicalutamide **15** et **16** ont été synthétisés en série racémique. Or, des études portant sur la relation structure/activité ont été effectuées sur la bicalutamide et ses dérivés. Elles ont montré que les énantiomères (R) et (S)

de la bicalutamide ne possédaient pas du tout la même affinité envers AR. En effet, l'isomère (R) exhibe une meilleure affinité de liaison pour AR qui est environ 30 fois plus importante que l'isomère (S). De plus, il exhibe une activité anti-tumorale plus importante.⁸⁷

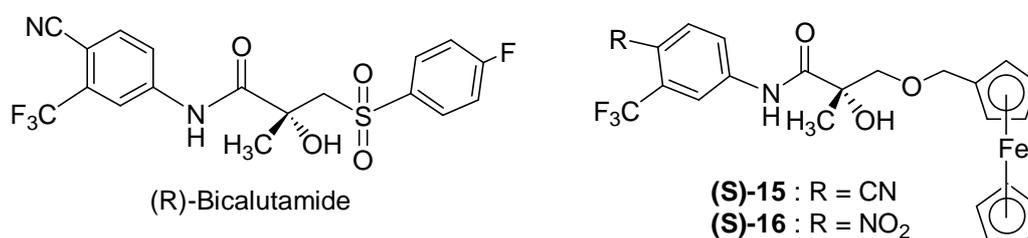


Figure 20 : Perspectives de synthèse

Par conséquent, une synthèse des analogues ferrocéniques **15** et **16** énantiomériquement purs (énantiomère S) doit être envisagée à l'avenir (Figure 20). En effet, des études précédentes ont montré que AR reconnaît de manière stéréosélective l'énantiomère (S) des dérivés éthers de la bicalutamide.¹¹³ Ceci pourrait confirmer le caractère énantiosélectif de la liaison à AR et donc de l'activité anti-tumorale. Dans ce sens, des synthèses énantiomériques de la (R)-bicalutamide et d'analogues éthers de configuration (S) ont déjà été effectuées dans la littérature.^{133, 134, 109, 113}

VI. Partie expérimentale

Toutes les réactions ont été effectuées sous atmosphère d'argon. L'éther, le THF et le toluène ont été distillés avec un mélange sodium/benzophénone. Le dichlorométhane a été distillé avec P₂O₅. Les autres réactifs et solvants utilisés, tels que le DMF anhydre, sont des produits commerciaux. Les chromatographies sur colonne ont été réalisées sur gel de silice Merck 60 (40-63 µm). Les points de fusion des produits ont été mesurés à l'aide d'un banc Köfler. Les spectres infra-rouges ont été enregistrés sur un spectromètre IR-FT BOMEM Michelson-100. Les analyses RMN ¹H et ¹³C ont été effectuées sur un appareil Bruker 300 MHz. Les solvants RMN utilisés sont le chloroforme deutéré CDCl₃ et l'acétone-d₆. Les déplacements chimiques (δ) sont mesurés en parties par millions (ppm) et les constantes de couplage (J) sont calculées en Hertz (Hz). Les analyses élémentaires des nouveaux produits ont été effectuées au Service de Microanalyse de l'I.C.S.N. à Gif sur Yvette.

⁸⁷ Mukherjee A., Kirkovsky L., Yao X.T., Yates R.C., Miller D.D., Dalton J.T., *Xenobiotica*, **1996**, 26, 117.

¹¹³ Marhefka C.A., Gao W., Chung K., Kim J., He Y., Yin D., Bohl C., Dalton J.T., Miller D.D., *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 993.

¹³³ Tucker H., Chesterson G.J., *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 885.

¹³⁴ Kirkovsky L., Mukherjee A., Yin D., Dalton J.T., Miller D.D., *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 581.

¹⁰⁹ Marhefka C.A., Moore B.M., Bishop T.C., Kirkovsky L., Mukherjee A., Dalton J.T., Miller D.D., *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 1729.

Synthèse de l'acide carboxylique du ferrocène (1) : Une solution de ferrocène (31,625 g ; 0,170 mol) dans le THF (200 mL) est refroidie à -78°C. Une solution de *tert*-BuLi 1,7 M (100 mL ; 1 équivalent) dans le pentane est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est agité pendant 10 minutes à -78°C, puis à température ambiante pendant 5 minutes. Elle est ramenée à -78°C et du CO₂ sous forme solide (250 g) est ajouté sous forme de poudre. La réaction est instantanée et est laissée jusqu'à température ambiante. Une première extraction est réalisée en milieu basique avec le dichlorométhane ; la phase organique récupérée contient du ferrocène. De l'acide chlorhydrique concentré est ajouté à la phase aqueuse jusqu'à pH = 3. Cette phase est extraite avec le dichlorométhane. La phase organique contient un résidu insoluble filtré sur célite. Un solide jaune orangé correspondant au diacide est obtenu (4,780 g ; 10,3%). Le filtrat est lavé à l'eau, séché sur MgSO₄, filtré et évaporé. Un solide orange correspondant au produit **1** est obtenu (16,475 g ; 42,1%). R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:1) : 0,39. Mp : 210-212°C (littérature : 214-216°C¹³⁵).

Synthèse de l'acylazidoferrocène (2)¹¹⁴ : L'acide carboxylique du ferrocène **1** (1,150 g ; 5,00 mmol) est suspendu dans le dichlorométhane distillé (20 mL). Le chlorure d'oxalyle (COCl)₂ (0,870 mL ; 10,0 mmol) est ajouté lentement, suivi par une goutte de DMF. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 h. Ensuite, le solvant et le chlorure d'oxalyle restant sont évaporés sous vide. Le solide obtenu est solubilisé dans du dichlorométhane distillé (20 mL). Le bromure de tétrabutylammonium Bu₄NBr (0,005 g ; 0,015 mmol) est ajouté, suivi par une solution d'azoture de sodium NaN₃ (0,480 g ; 7,40 mmol) dans l'eau (5 mL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 18 h. De l'eau (50 mL) est ajoutée à la solution et la phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec le dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le résidu solide obtenu (1,280 g) est purifié sur colonne (éluant : dichlorométhane/éther de pétrole 1:1). Un solide rouge correspondant au produit **2** est obtenu (1,063 g ; 83,4%). R_f (dichlorométhane/éther de pétrole 1:1) : 0,59. Mp : 88°C.

IR (ν_{max} ; dichlorométhane) : 2136 (N₃), 1683 (CO) cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 4,25 (5H, s, C₅H₅), 4,51 (2H, t, C₅H₄, Hβ, J = 2,0 Hz), 4,82 (2H, t, C₅H₄, Hα, J = 2,0 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 70,4 (C₅H₅); 70,5 (2C, C₅H₄); 72,8 (2C, C₅H₄), 177,3 (CO).

Synthèse du N-Ferrocényl-carbamate de 2-triméthylsilyléthyle (3)¹¹⁴ : Le composé **2** (0,775 g ; 3,04 mmol) est dissout dans le toluène (15 mL). La solution est chauffée à 105°C et le 2-triméthylsilyl-éthanol (0,890 mL ; 2 équivalents) est ajouté à la solution. La solution est agitée pendant 3 h à reflux. Le mélange est refroidi à température ambiante, une solution de soude 1 M (64 mL) est ajoutée et la solution est agitée pendant 5 minutes. La phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec le dichlorométhane. La phase organique est

¹³⁵ Reeves P.C., *Org. Synth.*, **1977**, *56*, 28.

¹¹⁴ Butler D.C.D., Richards C.J., *Organometallics*, **2002**, *21*, 5433.

séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Un solide orange correspondant au produit **3** est obtenu (1,045 g ; 98,1%). R_f (dichlorométhane/éther de pétrole 1:1) : 0,36. Mp : 93-94°C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 0,06 (9H, s, SiMe₃), 1,03 (2H, t, CH₂Si, J = 8,4 Hz), 3,96 (2H, s, C₅H₄, Hβ), 4,16 (5H, s, C₅H₅), 4,22 (2H, t, OCH₂, J = 8,4 Hz), 4,46 (2H, s, C₅H₄, Hα), 5,83 (1H, s, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = -1,4 (SiMe₃); 17,8 (CH₂Si); 36,4 (CH); 60,8 (2C, C₅H₄); 63,5 (CH₂O); 64,4 (2C, C₅H₄); 69,2 (C₅H₅); 96,5 (C_{ipso}, C₅H₄); 154,6 (CO).

Synthèse de l'aminoferrocène (4)¹¹⁴ : Le carbamate **3** (0,880 g ; 2,56 mmol) est dissout dans le THF (30 mL). La solution est chauffée à 50°C, puis une solution de fluorure de tétrabutylammonium TBAF 1 M dans le THF (10,5 mL) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité à 50°C pendant 15 minutes. Le solvant est évaporé sous vide, puis de l'eau et du dichlorométhane sont ajoutés. La phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec le dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le solide marron obtenu est recristallisé dans dichlorométhane/pentane. Un solide orange correspondant au produit **4** est obtenu (0,508 g ; 98,7%). R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2) : 0,32. Mp : 147-149°C (littérature : 148-150°C¹³⁶).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 2,57 (2H, s, NH₂), 3,84 (2H, s, C₅H₄, Hβ), 4,00 (2H, s, C₅H₄, Hα), 4,10 (5H, s, C₅H₅).

Synthèse du N-(ferrocényl)-isobutyramide (5) : L'amine **4** (0,310 g ; 1,54 mmol) et la triéthylamine NEt₃ (0,220 mL ; 1 équivalent) sont dissoutes dans le dichlorométhane (20 mL). La solution est refroidie à 0°C et le chlorure d'isobutyryle (0,160 mL ; 1 équivalent) est ajouté goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à température ambiante. De l'eau et du dichlorométhane sont ajoutés et la phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec le dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le résidu (0,439 g) est purifié sur colonne (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2). Un solide orange correspondant au produit **5** est obtenu (0,179 g ; 42,9%). Le solide est recristallisé dans dichlorométhane/pentane. R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2) : 0,60. Mp : 172-174°C.

IR (ν_{max} ; dichlorométhane) : 1733 (CO) cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 1,20 (3H, s, CH₃), 1,23 (3H, s, CH₃), 2,39 (1H, septuplet, CH, J = 6,9 Hz), 4,03 (2H, s, C₅H₄, Hβ), 4,16 (5H, s, C₅H₅), 4,65 (2H, s, C₅H₄, Hα), 6,43 (1H, s, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 19,8 (2 CH₃); 36,4 (CH); 61,4 (2C, C₅H₄); 64,8 (2C, C₅H₄); 69,6 (C₅H₅); 95,9 (C_{ipso}, C₅H₄); 175,2 (CO).

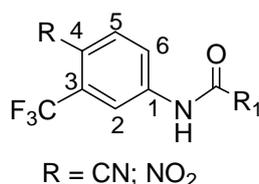
¹¹⁴ Butler D.C.D., Richards C.J., *Organometallics*, **2002**, *21*, 5433.

¹³⁶ Montserrat N., Parkins A.W., Tomkins A.R., *J. Chem. Res. (S)*, **1995**, 336.

MS (m/z ; ED): 271 [M^+].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μ m L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = CH₃CN/H₂O 70/30 ; Temps de rétention = 4,93 min ; Pureté = 100%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour C₁₄H₁₇FeNO : C 62,02, H 6,32, N 5,17 ; trouvée : C 61,96, H 6,31, N 5,29.



Synthèse du N-[4-cyano-3-trifluorométhyl-phényl]-ferrocèncarboxamide (6) : L'acide carboxylique du ferrocène **1** (0,460 g ; 2,00 mmol) est suspendu dans le dichlorométhane distillé (20 mL). Le chlorure d'oxalyle (COCl)₂ (0,350 mL ; 2 équivalents) est ajouté goutte à goutte, suivi par une goutte de DMF. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 h. Ensuite, le solvant et le chlorure d'oxalyle restant sont évaporés sous vide. Le solide obtenu (chlorure d'acide) est solubilisé dans le dichlorométhane distillé (20 mL). Le 4-cyano-3-trifluorométhyl-aniline (0,372 g ; 1 équivalent) et la triéthylamine NEt₃ (0,280 mL ; 1 équivalent) sont dissouts dans le dichlorométhane (20 mL). Cette solution est refroidie à 0°C et le chlorure d'acide est ajouté goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h. De l'eau et du dichlorométhane sont ajoutés et la phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec le dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le résidu (1,838 g) est purifié sur colonne (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:3). Un solide orange correspondant au produit **6** est obtenu (0,383 g ; 48,1%). Le solide est recristallisé dans acétate d'éthyle/pentane. R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 2:3) : 0,69. Mp : 205°C.

IR (ν_{\max} ; dichlorométhane) : 2230 (CN), 1687 (CO) cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, acétone-d₆) : δ = 4,25 (5H, s, C₅H₅), 4,51 (2H, t, C₅H₄, H β , J = 2,0 Hz), 5,01 (2H, t, C₅H₄, H α , J = 2,0 Hz), 7,99 (1H, d, H₅, ³J = 8,4 Hz), 8,27 (1H, dd, H₆, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 2,0 Hz), 8,43 (1H, d, H₂, ⁴J = 2,0 Hz), 9,45 (1H, s, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, acétone-d₆) : δ = 69,7 (2C, C₅H₄); 70,7 (C₅H₅); 72,2 (2C, C₅H₄); 76,1 (C_{ipso}, C₅H₄); 104,0 (C₄); 116,5 (CN); 118,0 (C₂); 123,0 (C₆); 124,0 (q, CF₃, J = 262,5 Hz); 134,0 (q, C₃); 137,0 (C₅); 144,9 (C₁); 171,2 (CO).

MS (m/z ; ED): 398 [M^+].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μ m L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = CH₃CN/H₂O 70/30 ; Temps de rétention = 8,79 min ; Pureté = 100%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour $C_{19}H_{13}F_3FeN_2O$: C 57,31, H 3,29, N 7,04 ; trouvée : C 57,16, H 3,43, N 7,22.

Synthèse du N-[4-nitro-3-trifluorométhyl-phényl]-ferrocèncarboxamide (7) : L'acide carboxylique du ferrocène **1** (0,460 g ; 2,00 mmol) est suspendu dans le dichlorométhane distillé (20 mL). Le chlorure d'oxalyle $(COCl)_2$ (0,350 mL ; 2 équivalents) est ajouté lentement, suivi par une goutte de DMF. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 h. Ensuite, le solvant et le chlorure d'oxalyle restant sont évaporés sous vide. Le solide obtenu (chlorure d'acide) est solubilisé dans le dichlorométhane distillé (20 mL). Le 4-nitro-3-trifluorométhyl-aniline (0,412 g ; 1 équivalent) et la triéthylamine NEt_3 (0,280 mL ; 1 équivalent) sont dissouts dans le dichlorométhane (20 mL). Cette solution est refroidie à $0^\circ C$ et le chlorure d'acide est ajouté goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h. De l'eau et du dichlorométhane sont ajoutés et la phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec le dichlorométhane. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée. Le résidu (0,931 g) est purifié sur colonne (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole 2:3). Un solide orange correspondant au produit **7** est obtenu (0,332 g ; 39,7%). Le solide est recristallisé dans acétate d'éthyle / pentane. R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 2:3) : 0,69. Mp : $224-225^\circ C$.

IR (ν_{max} ; dichlorométhane) : $1687 (CO) \text{ cm}^{-1}$.

RMN 1H (300 MHz, acétone- d_6) : $\delta = 4,27$ (5H, s, C_5H_5), $4,52$ (2H, t, C_5H_4 , $H\beta$, $J = 1,8$ Hz), $5,03$ (2H, t, C_5H_4 , $H\alpha$, $J = 1,8$ Hz), $8,14$ (1H, d, H_5 , $^3J = 9,0$ Hz), $8,33$ (1H, dd, H_6 , $^3J = 9,0$ Hz, $^4J = 2,1$ Hz), $8,45$ (1H, d, H_2 , $^4J = 2,1$ Hz), $9,54$ (1H, s, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, acétone- d_6) : $\delta = 69,7$ (2C, C_5H_4); $70,7$ (C_5H_5); $72,3$ (2C, C_5H_4); $76,0$ (C_{ipso} , C_5H_4); $118,8$ (C2); $122,5$ (q, CF_3); $123,2$ (C6); $124,5$ (q, C3); $128,1$ (C5); $143,0$ (C4); $145,0$ (C1); $170,4$ (CO).

MS (m/z ; EI) : 418 [M^+].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 $10 \mu m$ L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; $\lambda = 254$ nm ; Eluant = CH_3CN/H_2O 70/30 ; Temps de rétention = 9,72 min ; Pureté = 100%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour $C_{18}H_{13}F_3FeN_2O_3$: C 51,70, H 3,13, N 6,70 ; trouvée : C 51,14, H 3,22, N 6,31.

Synthèse du 2-hydroxyflutamide (8)¹²⁰ : Le chlorure de thionyle $SOCl_2$ (0,850 mL ; 2 équivalents) est ajouté goutte à goutte à une solution d'acide 2-hydroxy-isobutyrique (1,010 g ; 9,70 mmol) dans le diméthylacétamide (DMA) (15 mL) à $-20^\circ C$. Le mélange est agité pendant 30 minutes à $-20^\circ C$. Une solution de 4-nitro-3-trifluorométhyl-aniline (1,000 g ; 4,85

¹²⁰ Morris J.J., Hughes L.R., Glen A.T., Taylor P.J., *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 447.

mmol) dans le DMA (10 mL) est ajoutée et le mélange est agité à température ambiante pendant 3 h. L'eau et l'acétate d'éthyle sont ajoutés. La phase organique est extraite à l'acétate d'éthyle, puis lavée à l'eau et avec une solution saturée de NaCl. Elle est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée pour donner une huile orange (2,352 g). Cette huile est purifiée sur colonne (éluant : dichlorométhane, puis acétate d'éthyle). Trois fractions sont obtenues.

Une première fraction est un solide jaune clair correspondant au produit chloré **9** (0,438 g ; 29,0%). Il est recristallisé dans dichlorométhane/hexane. R_f (dichlorométhane) : 0,73. Mp : 117-118°C.

IR (KBr) : 3368 (NH), 1703 (CO) cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 1,90 (6H, s, C(CH₃)₂), 7,99 (2H, s, 2 H aromatiques), 8,07 (1H, s, 1 H aromatique), 8,92 (1H, s, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 31,0 (C(CH₃)₂); 69,6 (C(Cl)); 118,7 (C2); 121,6 (q, CF₃, J = 273,3 Hz); 122,6 (C6); 125,5 (q, C3); 127,1 (C5); 141,5 (C4); 143,7 (C1); 171,1 (NHCO).

MS (m/z; EI) : 310 [M⁺].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = CH₃CN/H₂O 80/20 ; Temps de rétention = 5,34 min ; Pureté = 100%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour C₁₁H₁₀ClF₃N₂O₃ : C 42,53, H 3,24, N 9,02, Cl 11,41 ; trouvée : C 42,26, H 3,05, N 9,18, Cl 11,54.

Une deuxième fraction est un solide jaune correspondant à l'aniline de départ (0,113 g ; 11,3%). R_f (dichlorométhane) : 0,62.

Une dernière fraction est un solide blanc jaunâtre correspondant au produit **8** (0,808 g ; 57,0%). Il est recristallisé dans dichlorométhane/hexane. R_f (dichlorométhane) : 0,19. Mp : 150-152°C (littérature : 152°C¹³⁷).

IR (KBr) : 3367 (NH + OH), 1683 (CO) cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, acétone-d₆) : δ = 1,47 (6H, s, C(CH₃)₂), 5,03 (1H, s, OH), 8,13 (1H, d, H5, ³J = 9,0 Hz), 8,35 (1H, dd, H6, ³J = 9,0 Hz, ⁴J = 2,3 Hz), 8,54 (1H, d, H2, ⁴J = 2,3 Hz), 10,02 (1H, s, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, acétone-d₆) : δ = 28,0 (C(CH₃)₂); 74,2 (C(OH)); 119,0 (C2); 123,1 (q, CF₃, J = 272,9 Hz); 123,6 (C6); 124,6 (q, C3, J = 33,6 Hz); 128,0 (C5); 143,4 (C4); 144,3 (C1); 177,2 (NHCO).

¹³⁷ Bayles R., Johnson M.C., Maisey R.F., Turner R.W., *Synthesis*, **1977**, 31.

MS (m/z ; EI) : 292 [M^+].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 70/30 ; Temps de rétention = 4,57 min ; Pureté = 98,42%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$: C 45,21, H 3,79, N 9,59 ; trouvée : C 44,92, H 3,98, N 9,25.

Synthèse du N-(4-cyano-3-trifluorométhylphényl)-méthacrylamide (10) : Le 4-fluoro-2-trifluorométhyl-benzonitrile (1,000 g ; 5,29 mmol) est ajouté à une solution de méthacrylamide (0,765 g ; 1,7 équivalents) dans le DMF anhydre (20 mL). Le mélange est refroidi à -20°C et l'hydrure de sodium NaH (0,550 g ; 2,6 équivalents) est ajouté par petites portions à ce mélange. Le mélange réactionnel est agité pendant 4 h à température ambiante. De l'eau (25 mL) est ajoutée, suivi par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 18% (6 mL) et de l'hexane (25 mL). La solution est agitée toute la nuit à température ambiante. Il se forme un précipité blanc qui est filtré, lavé à l'eau et à l'hexane, puis séché. Un solide blanc correspondant au produit **10** est obtenu (0,660 g ; 49,1%). R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2) : 0,65. Mp : $134\text{-}137^\circ\text{C}$ (littérature : $137\text{-}139^\circ\text{C}$ ¹²¹).

IR (KBr) : 3388 (NH), 2229 (CN), 1693 (CO), 1637 (alcène) cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 2,07 (3H, s, CH_3), 5,60 (1H, s, CH éthylénique), 5,87 (1H, s, CH éthylénique), 7,78 (1H, d, H5, 3J = 8,7 Hz), 7,99 (1H, dd, H6, 3J = 8,7 Hz, 4J = 2,1 Hz), 8,08 (1H, d, H2, 4J = 2,1 Hz), 8,11 (1H, s, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 18,7 (CH_3); 104,2 (C4); 115,8 (CN); 117,7 (C2); 121,8 (CH_2); 122,3 (C6); 122,6 (q, CF_3); 134,3 (q, C3); 135,9 (C5); 140,2 (C1); 142,4 (C éthylénique); 167,1 (NHCO).

Synthèse du N-(4-nitro-3-trifluorométhylphényl)-méthacrylamide (11). Méthode (a) : Le 4-nitro-3-trifluorométhyl-aniline (2,000 g ; 9,70 mmol) et la triéthylamine NEt_3 (1,400 mL ; 1 équivalent) sont dissouts dans le dichlorométhane (30 mL). Cette solution est refroidie à 0°C et le chlorure de méthacryloyle (0,950 mL ; 1 équivalent) est ajouté goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 4 h. De l'eau et du dichlorométhane sont ajoutés et la phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec le dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée pour donner une huile orange foncée (3,476 g). Cette huile est purifiée sur colonne (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:3). Un solide jaune correspondant au produit **11** est obtenu (0,587 g ; 22,1%). Le solide est recristallisé dans dichlorométhane/hexane.

¹²¹ Chen B.C., Zhao R., Gove S., Wang B., Sundeen J.E., Salvati M.E., Barrish J.C., *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 10181.

Méthode (b) : Le 4-nitro-3-trifluorométhyl-fluorobenzène (1,400 mL ; 9,56 mmol) est ajouté à une solution de méthacrylamide (1,384 g ; 1,7 équivalents) dans le DMF anhydre (35 mL). Le mélange est refroidi à -20°C. L'hydrure de sodium NaH (0,995 g ; 2,6 équivalents) est ajouté par petites portions à ce mélange. Le mélange réactionnel est agité pendant 3 h à température ambiante. De l'eau (25 mL) est ajoutée, suivi par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 18% (6 mL) et de l'acétate d'éthyle (25 mL). Le mélange est extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée pour donner un produit brut (4,787 g). Il est purifié sur colonne (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2). Un solide jaune correspondant au produit **11** est obtenu (2,308 g ; 88,0%). Il est recristallisé dans dichlorométhane/hexane. R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2) : 0,55. Mp : 104-106°C (littérature : 105-106°C⁷⁴).

IR (KBr) : 3401 (NH), 1693 (CO), 1638 (alcène) cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 2,08 (3H, s, CH₃), 5,60 (1H, s, CH éthylénique), 5,87 (1H, s, CH éthylénique), 7,96- 8,02 (3H aromatiques), 8,12 (1H, s, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 18,8 (CH₃); 118,7 (C2); 121,7 (q, CF₃, J = 273,7 Hz); 121,9 (CH₂); 122,6 (C6); 125,4 (q, C3, J = 34,3 Hz); 127,3 (C5); 140,2 (C1); 142,5 (C4); 143,2 (C éthylénique); 167,1 (NHCO).

MS (m/z; EI) : 274 [M⁺].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = CH₃CN/H₂O 80/20 ; Temps de rétention = 4,26 min ; Pureté = 99,64%.

Synthèse du N-(4-cyano-3-trifluorométhylphényl)-méthyl-oxirane-carboxamide (12) : Une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ 30% (0,400 mL ; 6 équivalents) est ajoutée à une solution de **10** (0,500 g ; 1,97 mmol) dans le dichlorométhane (10 mL). L'anhydride trifluoroacétique (1,400 mL ; 5 équivalents) est ajouté lentement et le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h 30. Il est dilué avec de l'eau puis extrait avec le dichlorométhane. La phase organique est lavée avec de l'eau, une solution aqueuse saturée de bisulfite de sodium NaHSO₃, une solution aqueuse saturée de bicarbonate de soude NaHCO₃ et de l'eau salée. Elle est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Un solide blanc correspondant au produit **12** est obtenu (0,465 g ; 87,4%). R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2) : 0,54. Mp : 147-148°C (littérature: 149-150°C¹²¹).

IR (KBr) : 3334 (NH), 2230 (CN), 1706 (CO) cm⁻¹.

⁷⁴ Tucker H., Crook J.W., Chesterson G.J., *J. Med. Chem.*, **1988**, *31*, 954.

¹²¹ Chen B.C., Zhao R., Gove S., Wang B., Sundeen J.E., Salvati M.E., Barrish J.C., *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 10181.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 1,67 (3H, s, CH₃), 2,99 (2H, s, CH₂ époxyde), 7,78 (1H, d, H5, ³J = 8,7 Hz), 7,90 (1H, dd, H6, ³J = 8,7 Hz, ⁴J = 2,1 Hz), 8,02 (1H, d, H2, ⁴J = 2,1 Hz), 8,44 (1H, s, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 16,8 (CH₃); 54,2 (CH₂ époxyde); 56,8 (C(CH₃)); 104,8 (C4); 115,5 (CN); 117,4 (C2); 122,0 (C6); 122,1 (q, CF₃, J = 273,9 Hz); 134,0 (q, C3, J = 33,0 Hz); 136,0 (C5); 141,4 (C1); 169,4 (NHCO).

Synthèse du N-(4-nitro-3-trifluorométhylphényl)-méthyl-oxirane-carboxamide (13) :

Une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ 30% (1,400 mL ; 6 équivalents) est ajoutée à une solution de **11** (2,000 g ; 7,30 mmol) dans le dichlorométhane (20 mL). L'anhydride trifluoroacétique (5,200 mL ; 5 équivalents) est ajouté lentement et le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 3 h. Il est dilué avec de l'eau puis extrait avec le dichlorométhane. La phase organique est lavée avec de l'eau, une solution aqueuse saturée de bisulfite de sodium NaHSO₃, une solution aqueuse saturée de bicarbonate de soude NaHCO₃ et de l'eau salée. Elle est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée pour donner un résidu (1,758 g). Il est purifié sur colonne (éluant : dichlorométhane/éther de pétrole 3:1). Un solide jaune clair correspondant au produit **13** est obtenu (1,304 g ; 61,6%). R_f (dichlorométhane) : 0,62. Mp : 120-122°C (littérature : 120-121°C⁷⁴).

IR (KBr) : 3339 (NH), 1708 (CO) cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 1,68 (3H, s, CH₃), 3,01 (2H, s, CH₂ époxyde), 7,96-8,01 (3H aromatiques), 8,48 (1H, s, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 16,9 (CH₃); 54,4 (CH₂ époxyde); 56,9 (C(CH₃)); 118,5 (C2); 121,9 (q, CF₃, J = 273,6 Hz); 122,3 (C6); 125,6 (q, C3, J = 34,2 Hz); 127,3 (C5); 141,5 (C1); 143,5 (C4); 169,5 (NHCO).

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = CH₃CN/H₂O 80/20 ; Temps de rétention = 3,92 min ; Pureté = 99,35%.

Synthèse du ferrocénylméthanol (14) : Une suspension de LiAlH₄ (0,798 g ; 4,5 équivalents) dans l'éther (30 mL) est chauffée à reflux. Une solution de ferrocèncarboxaldéhyde (1,000 g ; 4,67 mmol) dans l'éther est ajoutée doucement. Le mélange réactionnel est agité pendant 3 h à reflux. La solution est refroidie à 0°C et sont ajoutés doucement de l'éther et de l'eau. Le mélange est extrait à l'éther. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Un solide orange correspondant au produit **14** est obtenu (1,115 g). R_f (éther/éther de pétrole 1:1) : 0,39. Mp : 78-80°C (littérature : 79-81°C¹³⁸).

⁷⁴ Tucker H., Crook J.W., Chesterson G.J., *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 954.

¹³⁸ Graham P.J., Lindsey R.V., Parshall G.W., Peterson M.L., Whitman G.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 3416.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 1,58 (1H, s, OH), 4,19 (7H, s, C_5H_5 + C_5H_4), 4,25 (2H, s, C_5H_4), 4,32 (2H, s, CH_2OH).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 60,9 (CH_2OH); 68,1 (C_5H_4); 68,5 (C_5H_5 + C_5H_4); 88,7 (C_{ipso} , C_5H_4).

Synthèse du N-(4-cyano-3-trifluorométhylphényl)-3-ferrocénylméthoxy-2-hydroxy-2-méthyl-propanamide (15) : L'hydruire de sodium NaH (0,192 g ; 2,6 équivalents) est ajouté par portions dans une solution de ferrocénylméthanol **14** (0,520 g ; 1,3 équivalents) dans le THF (10 mL) à 0°C. La solution est agitée pendant 5 minutes, puis une solution d'époxyde **12** (0,500 g ; 1,85 mmol) dans le THF (12 mL) est ajoutée à 0°C. Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 2 h 30, puis refroidi à température ambiante. Le THF est évaporé sous vide et le résidu est dissout dans l'acétate d'éthyle. La solution est extraite avec l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée pour obtenir un résidu (1,694 g) qui est purifié sur colonne (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2). Un solide jaune correspondant au produit **15** est obtenu (0,250 g ; 28%). Il est recristallisé dans dichlorométhane/hexane. R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2) : 0,34. Mp : 102-104°C.

IR (KBr) : 3410 (OH), 3311 (NH), 2232 (CN), 1691 (CO) cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 1,40 (3H, s, CH_3), 3,44 (1H, d, CH_2O , $J = 9,0$ Hz), 3,49 (1H, s, OH), 3,87 (1H, d, CH_2O , $J = 9,0$ Hz), 4,14 (5H, s, C_5H_5), 4,19 (2H, s, C_5H_4 , H β), 4,21 (2H, s, C_5H_4 , H α), 4,31 (1H, d, CH_2 (ferrocène), $J = 11,3$ Hz), 4,41 (1H, d, CH_2 (ferrocène), $J = 11,3$ Hz), 7,77 (1H, d, H5, $^3J = 8,5$ Hz), 7,88 (1H, dd, H6, $^3J = 8,5$ Hz, $^4J = 1,6$ Hz), 8,01 (1H, d, H2, $^4J = 1,6$ Hz), 9,09 (1H, s, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 23,3 (CH_3); 68,8 (C_5H_5); 69,2 (2C, C_5H_4); 69,8 (2C, C_5H_4); 70,3 (CH_2); 74,0 (CH_2); 75,6 (C(OH)); 82,3 (C_{ipso} , C_5H_4); 104,6 (C4); 115,8 (CN); 117,4 (C2); 122,0 (C6); 134,0 (q, C3); 136,0 (C5); 141,8 (C1); 174,1 (NHCO).

MS (m/z ; EI) : 486 [M^+].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; $\lambda = 254$ nm ; Eluant = $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 80/20 ; Temps de rétention = 5,89 min ; Pureté = 99,09%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{FeN}_2\text{O}_3$: C 56,81, H 4,35, N 5,76 ; trouvée : C 56,41, H 4,72, N 5,31.

Synthèse du 3-ferrocénylméthoxy-2-hydroxy-2-méthyl-N-(4-nitro-3-trifluorométhylphényl)-propanamide (16) : Une solution de ferrocénylméthanol **14** (0,610 g ; 1,3 équivalents) dans le THF (10 mL) est ajoutée doucement à 0°C à une solution d'hydruire de sodium NaH (0,226 g ; 2,6 équivalents) dans le THF. La solution est agitée pendant 5 minutes, puis une solution d'époxyde **13** (0,500 g ; 2,17 mmol) dans le THF (15 mL) est ajoutée à 0°C. Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 3 h, puis refroidi à

température ambiante. Le THF est évaporé sous vide et le résidu est dissout dans l'acétate d'éthyle. La solution est extraite avec l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée pour obtenir un produit brut (1,384 g) qui est purifié sur colonne (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:3, puis 1:2). Une huile rouge orangée correspondant au produit **16** est obtenue (0,273 g ; 31,3%). Elle est cristallisée dans dichlorométhane/hexane pour donner un solide rouge orangé. R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2) : 0,29. Mp : 146-148°C.

IR (KBr) : 3523 (OH), 3306 (NH), 1696 (CO) cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 1,39 (3H, s, CH₃), 3,41 (1H, d, CH₂O, J = 9,0 Hz), 3,46 (1H, s, OH), 3,84 (1H, d, CH₂O, J = 9,0 Hz), 4,21 (5H, s, C₅H₅), 4,27 (6H, m, C₅H₄ + CH₂ (ferrocène)), 7,95-7,99 (3H aromatiques), 9,10 (1H, s, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 23,2 (CH₃); 69,4 (C₅H₅); 69,8 (2C, C₅H₄); 70,2 (CH₂); 70,3 (2C, C₅H₄); 73,9 (CH₂); 75,4 (C(OH)); 82,9 (C_{ipso}, C₅H₄); 118,3 (C2); 121,8 (q, CF₃, J = 266,5 Hz); 122,1 (C6); 125,2 (q, C3); 127,2 (C5); 141,8 (C1); 143,2 (C4); 174,0 (NHCO).

MS (m/z; EI) : 506 [M⁺].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = CH₃CN/H₂O 80/20 ; Temps de rétention = 6,40 min ; Pureté = 98,52%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour C₂₂H₂₁F₃FeN₂O₅ : C 52,19, H 4,18, N 5,53 ; trouvée : C 52,23, H 4,24, N 5,49.

Chapitre 3 : Synthèse et étude de dérivés ferrocéniques de la nilutamide

SOMMAIRE

I.	Introduction.....	68
II.	Synthèse et études biologiques d’analogues N-ferrocénylalkyles.....	69
II.1.	Stratégie de synthèse.....	69
II.2.	Les étapes de la synthèse.....	70
II.2.a.	Synthèse des dérivés ferrocéniques 19 et 22	70
II.2.b.	Synthèse de l’isocyanatobenzène 23	71
II.2.c.	Fin de la synthèse.....	72
II.2.d.	Structure cristallographique des composés 26 et 27	72
II.3.	Résultats des tests biologiques.....	74
II.3.a.	Tests RBA.....	74
II.3.b.	Tests d’activité anti-proliférative sur les cellules LNCaP.....	76
II.3.c.	Tests d’activité anti-proliférative sur les cellules PC3.....	78
II.3.d.	Résultats des calculs d’IC ₅₀	80
III.	Synthèse et études biologiques d’analogues 4’-ferrocényles.....	81
III.1.	Introduction.....	81
III.2.	Synthèse.....	82
III.2.a.	Stratégie de synthèse.....	82
III.2.b.	Les étapes de la synthèse.....	82
III.3.	Résultats des tests biochimiques.....	83

III.3.a. Tests RBA.....	83
III.3.b. Tests d'activité anti-proliférative sur les cellules LNCaP.....	84
III.3.c. Tests d'activité anti-proliférative sur les cellules PC3.....	86
III.3.d. Résultats des calculs d'IC ₅₀	86
IV. Conclusion.....	88
V. Partie expérimentale.....	90

I. Introduction

L'objectif de ce chapitre est de synthétiser des analogues ferrocéniques de la nilutamide ayant une meilleure affinité de liaison envers AR, une meilleure activité anti-tumorale et cytotoxique vis-à-vis de cellules tumorales prostatiques.

Le ferrocène doit être incorporé sur la structure de la nilutamide. Pour cela, nous nous sommes basés sur des études antérieures concernant la relation structure/activité de la molécule. Un schéma de modélisation de la nilutamide dans le site de liaison de AR (Figure 21) a été proposé par Marhefka.¹⁰⁹ Nous nous sommes aussi basés sur des études concernant l'affinité de liaison à AR et l'activité anti-androgénique d'analogues organiques de la nilutamide.

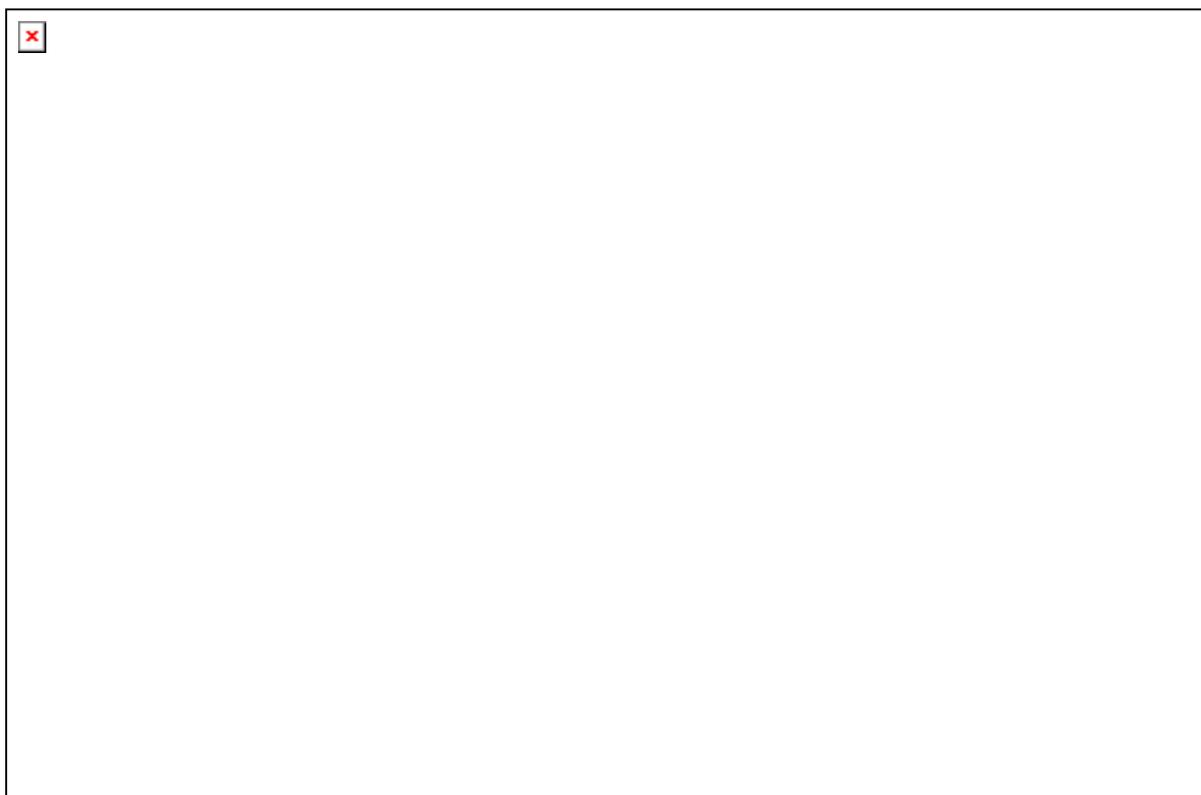


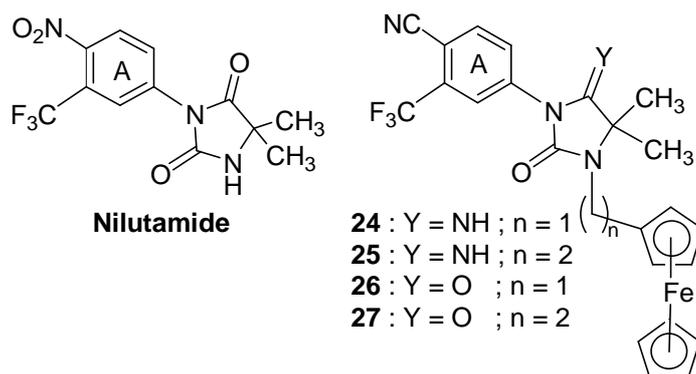
Figure 21 : Schéma du site de liaison de AR lié à la nilutamide (vert) et à la testostérone (violet).¹⁰⁹

Concernant la relation structure/activité, il a été démontré que l'hydrogène de l'amide appartenant au cycle hydantoïne forme une liaison hydrogène avec l'acide aminé Thr877 de

¹⁰⁹ Marhefka C.A., Moore B.M., Bishop T.C., Kirkovsky L., Mukherjee A., Dalton J.T., Miller D.D., *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 1729.

AR. Cependant, il existe des interactions stériques entre le noyau hydantoïne et des acides aminés se trouvant dans le site de liaison de AR.¹⁰⁹ D'autre part, la présence du noyau aromatique A est importante pour la liaison à AR. En effet, il comprend un groupe CN ou NO₂ en position 4, qui sont des accepteurs de liaisons H, et un groupe CF₃ hydrophobe en position 3. Le groupe CN ou NO₂ interagit, par l'intermédiaire de liaisons H, directement avec l'acide aminé Gln711, et indirectement par l'intermédiaire d'une molécule d'eau avec l'acide aminé Arg752, favorisant ainsi la liaison à AR.¹⁰⁹ De son côté, le groupe CF₃ se lie, selon des interactions hydrophobes, dans la même poche de liaison qui a été observée dans le cas de la flutamide et de la bicalutamide. Enfin, le groupe diméthyle du cycle hydantoïne se lie dans la poche hydrophobe.

La nilutamide est un composé intéressant du point de vue structural, dans la mesure où le NH du noyau hydantoïne a été modifié avec une large variété de substituants qui ont abouti à une amélioration de l'affinité de liaison à AR.^{93, 139} En effet, il s'est avéré que la poche de liaison de AR pouvait tolérer et interagir positivement avec des substituants encombrants (alcools primaires, nitriles, noyau aromatique, ...). C'est pourquoi nous avons décidé, dans un premier temps, d'incorporer une chaîne N-ferrocénylalkyle plus ou moins longue (1 et 2 carbones). La synthèse de tels analogues (Figure 22) a donc été réalisée. Ils ont été testés au niveau de leur affinité de liaison pour AR et de leur activité anti-proliférative envers des lignées cellulaires cancéreuses.



II. Synthèse et études biologiques d'analogues N-ferrocénylalkyles

II.1. Stratégie de synthèse

La stratégie globale de synthèse des analogues ferrocéniques **24**, **25**, **26** et **27** est présentée sur les Schémas 12 et 13. Elle est commune et consiste en une réaction de formation du noyau hydantoïne. Elle a été effectuée entre le 4-cyano-3-trifluorométhyl-isocyanatobenzène **23** et

¹⁰⁹ Marhefka C.A., Moore B.M., Bishop T.C., Kirkovsky L., Mukherjee A., Dalton J.T., Miller D.D., *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 1729.

⁹³ Van Dort M.E., Jung Y.W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 1045.

¹³⁹ Van Dort M.E., Robins D.M., Wayburn B., *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 3344.

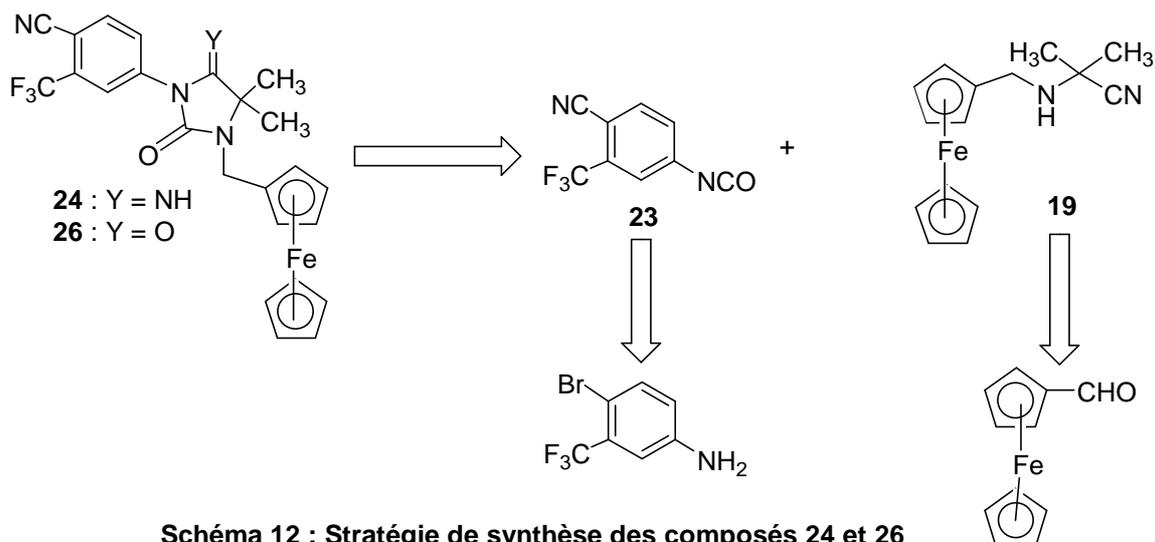


Schéma 12 : Stratégie de synthèse des composés 24 et 26

un dérivé ferrocénique avec une chaîne alkyle plus ou moins longue ($n = 1$ et 2) contenant une amine secondaire et un nitrile. L'isocyanatobenzène **23** a été obtenu à partir du 4-cyano-3-trifluorométhyl-aniline. De leur côté, les dérivés ferrocéniques **19** et **22** ont été obtenus à partir de deux produits commerciaux, le ferrocène-carboxaldéhyde ($n = 1$) et l'iodure de ferrocénylméthyltriméthylammonium ($n = 2$).

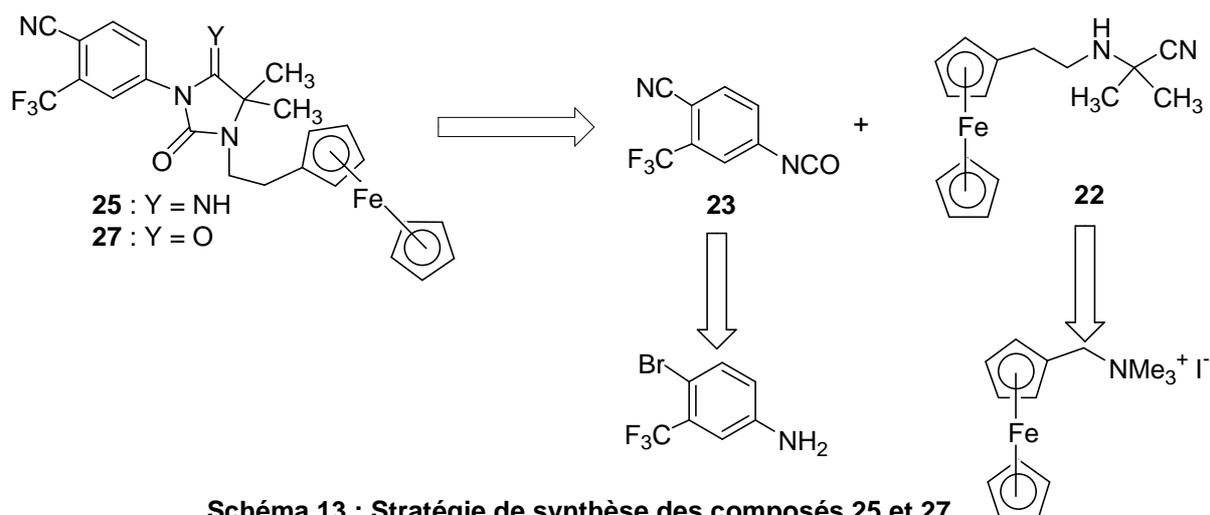


Schéma 13 : Stratégie de synthèse des composés 25 et 27

II.2. Les étapes de la synthèse

II.2.a. Synthèse des dérivés ferrocéniques **19** et **22**

Dans un premier temps, les dérivés ferrocéniques **19** et **22** ont été synthétisés, suivant deux mécanismes différents. En effet, le composé **19** a été obtenu en trois étapes à partir du ferrocène-carboxaldéhyde. Sa synthèse est présentée sur le Schéma 14. La première étape est une addition nucléophile de l'hydrochlorure de hydroxylamine $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ sur l'aldéhyde pour former l'oxime **17**. Un mélange des deux stéréoisomères (E) et (Z) est obtenu avec un

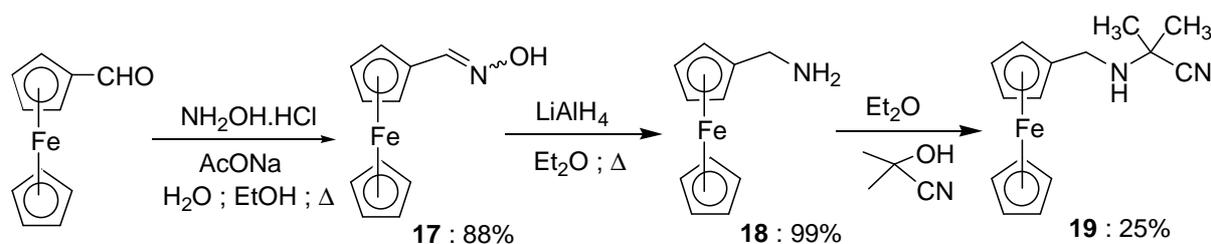


Schéma 14 : Synthèse du composé ferrocénique 19

excellent rendement (88%).¹⁴⁰ Dans la deuxième étape, l'oxime est réduite en une amine par LiAlH_4 avec un rendement quantitatif.¹²² L'amine **18** a été obtenue sous forme d'une huile qui a été directement utilisée pour la réaction suivante. La dernière étape consiste en un couplage entre l'amine et le 2-hydroxy-isobutyronitrile. Cette réaction a permis d'obtenir le composé **19** avec un faible rendement (25%).¹⁴¹

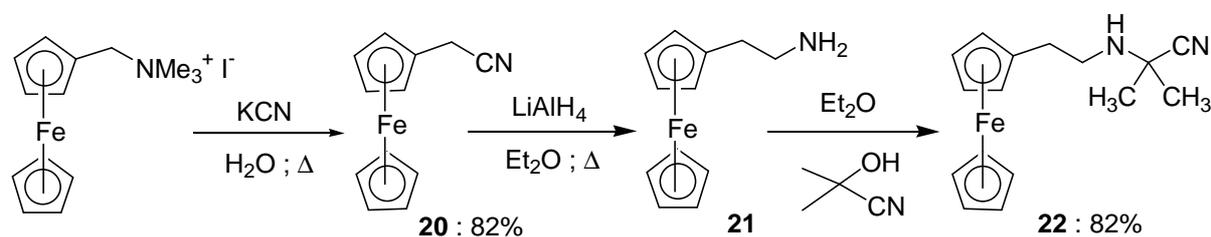


Schéma 15 : Synthèse du composé ferrocénique 22

Le composé **22** a aussi été synthétisé en trois étapes à partir de l'iodure de ferrocénylméthyltriméthylammonium. Sa synthèse est présentée sur le Schéma 15. Seule la première étape est différente. Elle consiste en une réaction de substitution nucléophile où le groupe partant triméthylammonium a été remplacé par un groupe nitrile.^{122, 138} Elle a permis la formation du cyanométhylferrocène **20** avec un très bon rendement (82%). Toutefois, ce produit est instable à l'air, à la chaleur et à la silice, et doit donc être utilisé sans purification ultérieure. Les deux dernières étapes sont identiques à la synthèse précédente. En effet, le nitrile **20** est réduit en une amine **21** qui a été obtenue sous forme d'une huile qui a été directement utilisée pour la réaction suivante. Elle a été convertie, par réaction avec le 2-hydroxyisobutyronitrile, en un composé **22** obtenu avec un excellent rendement (82%).

II.2.b. Synthèse de l'isocyanatobenzène 23

Cette synthèse est réalisée en deux étapes à partir du 4-bromo-3-trifluorométhyl-aniline

¹⁴⁰ Huikai S., Qingmin W., Runqiu H., Heng L., Yonghong L., *J. Organomet. Chem.*, **2002**, 655, 182.

¹²² Lednicer D., Lindsay J.K., Hauser C.R., *J. Org. Chem.*, **1958**, 23, 653.

¹⁴¹ Teutsch G., Goubet F., Battmann T., Bonfils A., Bouchoux F., Cerede E., Gofflo D., Gaillard-Kelly M., Philibert D., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1994**, 48, 111.

¹³⁸ Graham P.J., Lindsey R.V., Parshall G.W., Peterson M.L., Whitman G.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 3416.

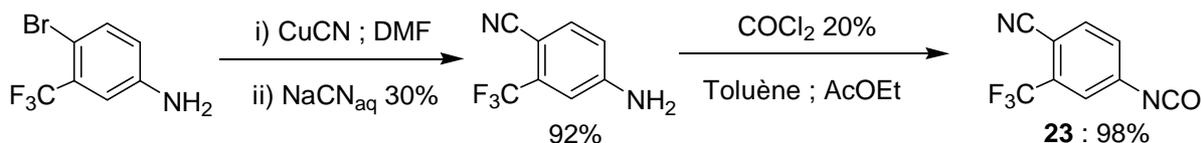


Schéma 16 : Synthèse du 4-cyano-3-trifluorométhyl-isocyanatobenzène 23

commerciale, suivant le Schéma 16. Dans une première étape, ce composé a été converti en 4-cyano-3-trifluorométhyl-aniline, suivant une réaction de substitution nucléophile aromatique effectuée entre le groupe partant brome et le cyanure de cuivre CuCN.¹¹⁹ Cette réaction a été effectuée avec un excellent rendement (92%). Dans une deuxième étape, l'aniline a été activée en un isocyanatobenzène très électrophile, avec un rendement quantitatif.⁹² Cette réaction a été réalisée avec beaucoup de précaution, car une solution de phosgène COCl₂ a été utilisée. Cette réaction rapide et exothermique libère de l'acide chlorhydrique gazeux qui a été piégé par une solution aqueuse de soude. La réaction se termine par une distillation des solvants anhydres jusqu'au dégagement total d'acide. Le produit obtenu, le 4-cyano-3-trifluorométhyl-isocyanatobenzène **23**, est un composé sensible à l'air ; par conséquent, il a été conservé à l'abri de l'air à très basse température et a été utilisé sans purification ultérieure pour la suite de la synthèse.

II.2.c. Fin de la synthèse

La fin de la synthèse est représentée sur le Schéma 17 et consiste en la réalisation de deux étapes communes. La première étape, dont le mécanisme est détaillé sur le Schéma 17, est la plus intéressante.⁹² En effet, cette réaction effectuée en milieu basique fait intervenir deux additions nucléophiles simultanées. La première addition intermoléculaire se fait entre l'amine et l'isocyanate **23** pour donner un intermédiaire carbamate très réactif contenant un groupe nitrile. La seconde addition est intramoléculaire et se fait entre le NH et le nitrile. Elle permet ainsi la formation d'un cycle hydantoïne à cinq chaînons stable possédant une fonction imine. Les produits **24** et **25** sont obtenus avec des rendements moyens (34% pour **24** et 50% pour **25**). Dans la dernière étape, les imines sont hydrolysées en milieu acide pour donner des produits dicarbonylés.⁹² Cette étape permet la formation des analogues **26** et **27** avec de très bons rendements compris entre 80 et 90%.

II.2.d. Structure cristallographique des composés 26 et 27

Les structures cristallographiques des molécules **26** et **27** ont été déterminées par analyse structurale aux rayons X dans le laboratoire du Professeur M. J. McGlinchey de l'Université de Dublin. Les structures sont présentées sur les Figures 23 et 24 et correspondent aux deux

¹¹⁹ Jones T.R., Varney M.D., Webber S.E., Lewis K.K., Marzoni G.P., Palmer C.L., Kathardekar V., Welsh K.M., Webber S., Matthews D.A., Appelt K., Smith W.W., Janson C.A., Villafranca J.E., Bacquet R.J., Howland E.F., Booth C.L.J., Herrmann S.M., Ward R.W., White J., Moomaw E.W., Bartlett C.A., Morse C.A., *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 904.

⁹² Battmann T., Bonfils A., Branche C., Humbert J., Goubet F., Teutsch G., Philibert D., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1994**, 48, 55.

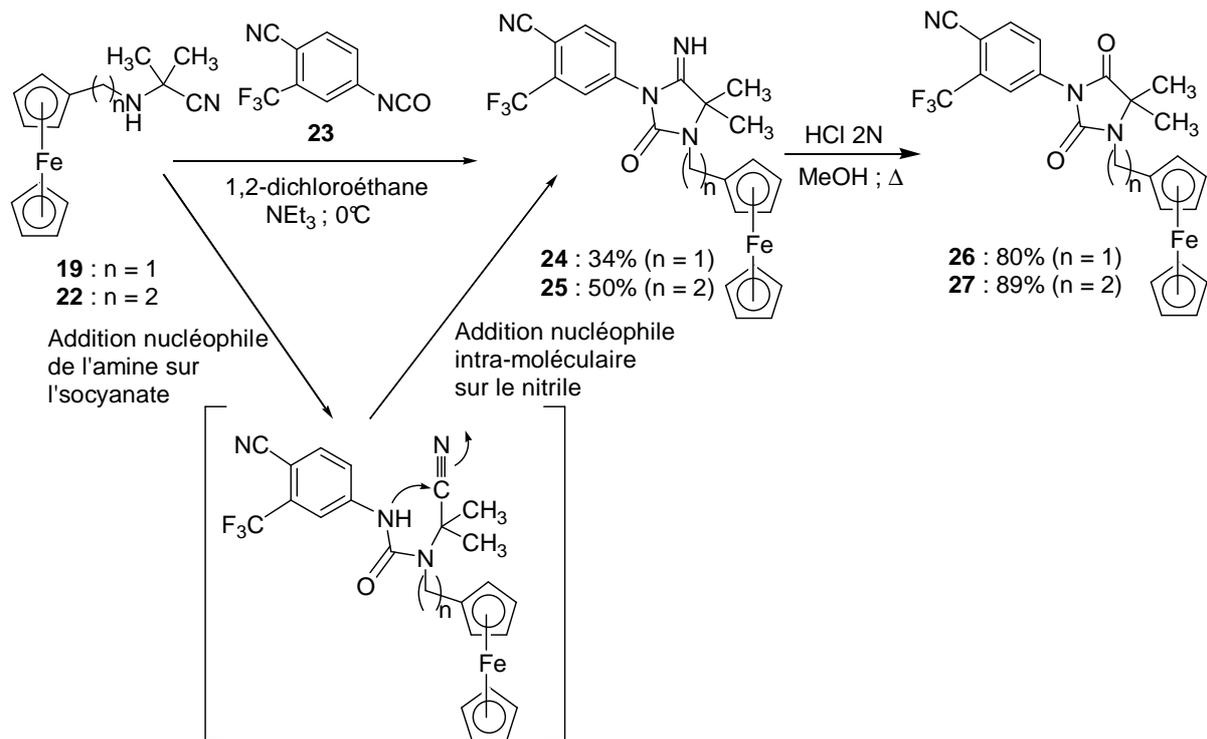


Schéma 17 : Synthèse des analogues ferrocéniques 24, 25, 26 et 27

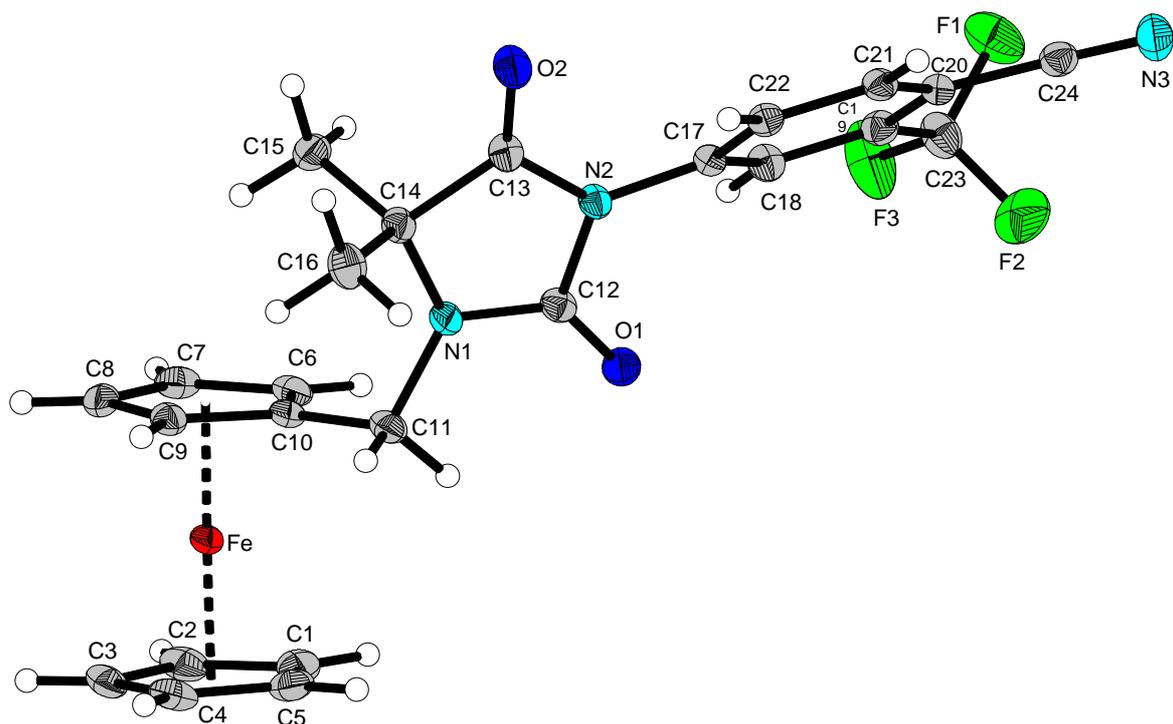


Figure 23 : Structure aux rayons X du composé 26

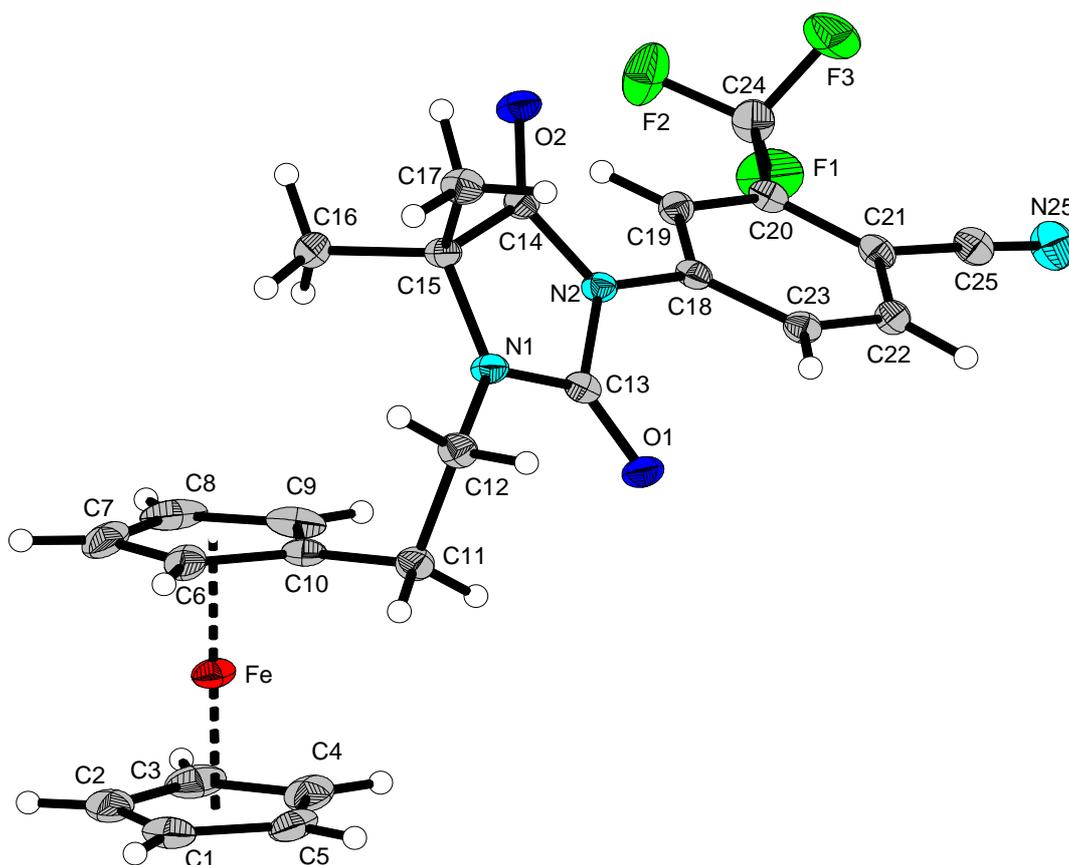


Figure 24 : Structure aux rayons X du composé 27

composés dont la synthèse a été envisagée. Les données cristallographiques de chaque molécule sont indiquées en annexe.

II.3. Résultats des tests biologiques

Une fois synthétisés, les analogues ferrocéniques (Figure 25) sont soumis à plusieurs études biochimiques. Pour cela, ils doivent avoir une pureté supérieure ou égale à 98%, déterminée par HPLC. Les études biochimiques comprennent les tests d'affinité relative de liaison au récepteur AR (tests RBA), des études d'activité anti-proliférative effectuées sur les lignées cellulaires tumorales prostatiques, LNCaP et PC3, et des calculs d'IC₅₀ effectués sur PC3.

II.3.a. *Tests RBA*

Les tests RBA ont été effectués sur des récepteurs AR purifiés. Les valeurs de RBA ont été mesurées en % par rapport à un composé de référence, ici la DHT, dont la valeur de RBA est fixée à 100% par définition. Les valeurs de RBA des analogues ferrocéniques **24**, **25**, **26**, **27** et de la nilutamide, ainsi que les valeurs de log Po/w sont reportées sur le Tableau 3.

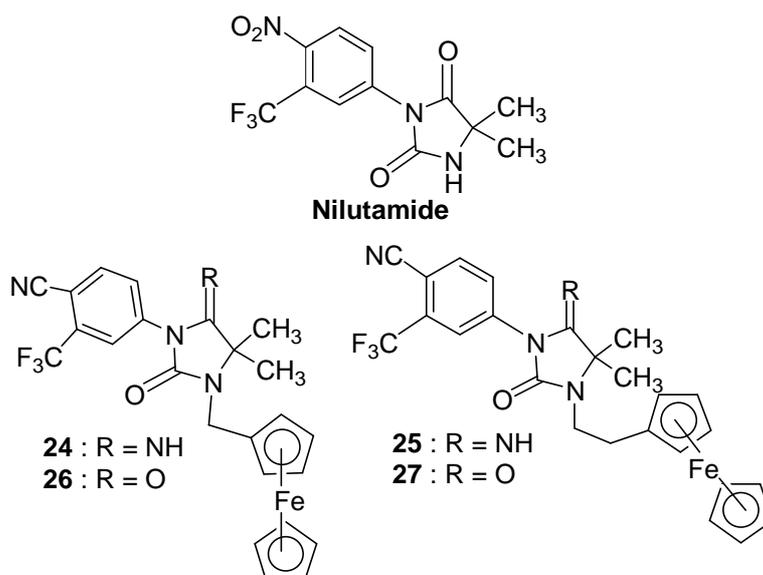


Figure 25 : Liste des molécules pour les tests biologiques

Molécule	RBA (%)	log Po/w
DHT	100	
Nilutamide	0,049 ± 0,070	
24	0,067 ± 0,005	4,68
25	0,093 ± 0,045	5,04
26	0,523 ± 0,200	5,23
27	0,217 ± 0,070	5,62

Tableau 3 : Résultats des tests RBA et log Po/w

On note d'abord que la nilutamide a une très faible valeur de RBA ($0,049 \pm 0,070\%$). Ce résultat confirme des études antérieures démontrant une faible affinité de ce composé envers AR.^{64, 77}

Les analogues N-ferrocénylalkyles **24**, **25**, **26** et **27** ont une meilleure affinité de liaison pour AR que la nilutamide. Ce résultat serait dû à la présence de la chaîne latérale N-ferrocénylalkyle et aux propriétés du ferrocène. D'une part, le ferrocène est un substituant hydrophobe et encombrant qui serait toléré par la poche hydrophobe de AR. Il favoriserait ainsi la liaison à AR, par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes. D'autre part, le ferrocène est constitué de deux cycles cyclopentadiényles qui pourraient interagir avec le site de liaison de AR via des interactions électroniques π . Cette hypothèse a été énoncée pour expliquer les valeurs élevées de RBA des dérivés N-iodopropényles⁹³ et N-cyanométhyles¹⁴².

⁶⁴ Moguilewsky M., Bouton M.M., *J. Steroid Biochem.*, **1988**, 31, 699.

⁷⁷ Wakeling A.E., Furr B.J., Glen A.T., Hughes L.R., *J. Steroid Biochem.*, **1981**, 15, 355.

⁹³ Van Dort M.E., Jung Y.W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 1045.

¹⁴² Battmann T., Branche C., Bouchoux F., Cerede E., Philibert D., Goubet F., Teutsch G., Gaillard-Kelly M., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1998**, 64, 103.

Les analogues carbonylés **26** et **27** ont aussi une meilleure affinité envers AR que leurs homologues imines **24** et **25**. Ce résultat pourrait s'expliquer par le rôle que jouerait la fonction carbonyle qui est un accepteur de liaisons H. En effet, la substitution de ce carbonyle par une fonction imine, qui est un donneur de liaisons H, défavoriserait la liaison à AR.

Enfin, la molécule **26** a une meilleure affinité de liaison pour AR ($0,523 \pm 0,200\%$) que le composé **27** ($0,217 \pm 0,070\%$). Ce résultat suggère que la longueur de la chaîne N-alkyle jouerait un rôle non négligeable dans la reconnaissance de AR. Une chaîne méthyle favoriserait ainsi la liaison au récepteur, par rapport à une chaîne éthyle. Ce résultat confirme des études antérieures menées sur des composés N-substitués. Elles ont montré que l'augmentation d'une unité de la chaîne alkyle résultait en une perte d'affinité de liaison envers AR.⁹³

Les valeurs de log Po/w des analogues ferrocéniques, sont toutes supérieures à 4,50. Ce résultat indique que tous ces composés sont hydrophobes. En outre, il a été constaté que l'amélioration de la valeur de RBA ne dépendrait pas forcément de l'hydrophobicité de la molécule. Ainsi, le composé **27**, qui est le plus hydrophobe (log Po/w = 5,62), n'a pas la meilleure affinité de liaison envers AR (RBA = $0,217 \pm 0,070\%$). Elle est, en effet, inférieure à celle du composé **26** (RBA = $0,523 \pm 0,200\%$) qui est moins hydrophobe (log Po/w = 5,23). Cette observation indiquerait que le caractère hydrophobe d'une molécule ne serait pas le seul paramètre pour expliquer la liaison d'une molécule à AR.

II.3.b. Tests d'activité anti-proliférative sur les cellules LNCaP

Cette série de tests *in vitro* a été effectuée sur des lignées cellulaires LNCaP. Ce sont des cellules prostatiques tumorales hormono-dépendantes contenant des récepteurs AR mutés au niveau d'un seul acide aminé T877A.^{125, 126} Ces tests nous permettront donc de savoir si les dérivés ferrocéniques ont une activité anti-androgénique vis-à-vis du cancer de la prostate. Les résultats des tests d'activité, concernant les analogues ferrocéniques **24**, **25**, **26** et **27**, ainsi que la nilutamide, la DHT et un contrôle (cellules incubées sans produits), sont présentés sur deux graphiques. Le graphique 7 représente l'évolution de l'activité anti-androgénique des composés synthétisés en fonction du temps d'incubation.

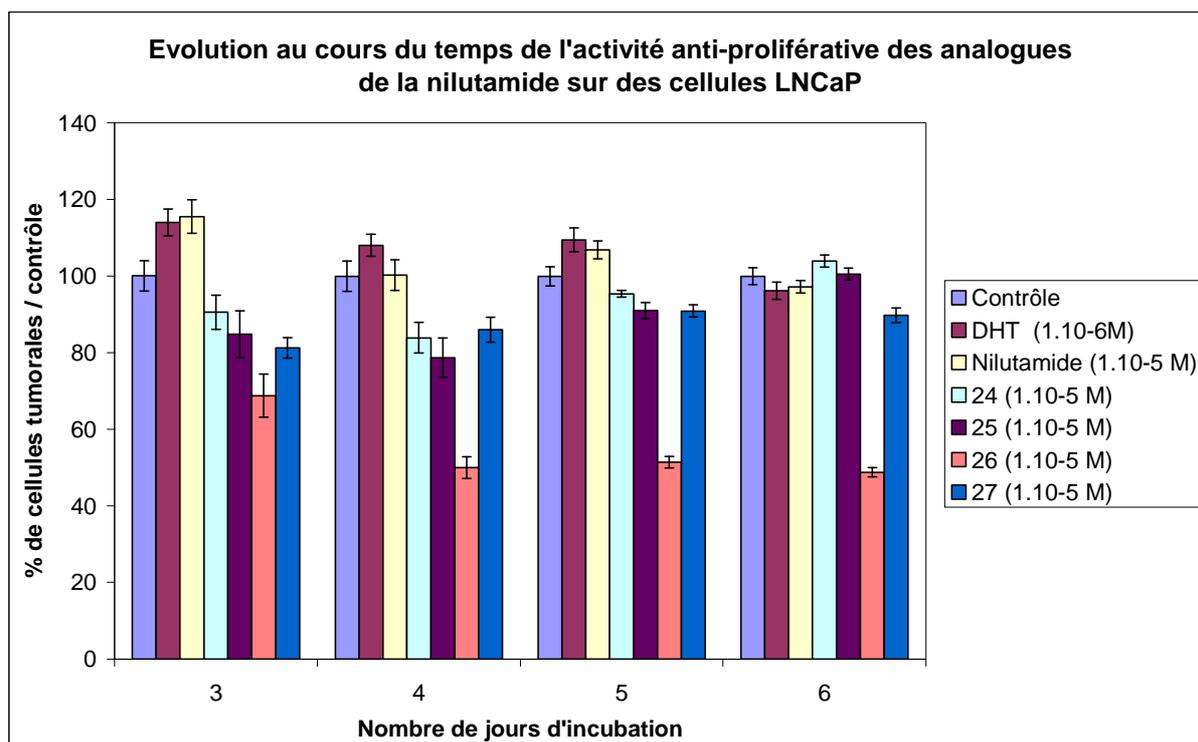
La nilutamide, incubée à une dose de 1.10^{-5} M, n'a aucun effet prolifératif sur les cellules LNCaP. Cette absence d'activité se maintient au cours du temps. Or, des études précédentes ont montré que l'activité agoniste des anti-androgènes est stimulée en fonction de la concentration de produits incubés. Elle est optimale pour une concentration de 1.10^{-7} M.¹²⁸

⁹³ Van Dort M.E., Jung Y.W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 1045.

¹²⁵ Horoszewicz J.S., Leong S.S., Kawinski E., Karr J.P., Rosenthal H., Ming Chu T., Mirand E.A., Murphy G.P., *Cancer Res.*, **1983**, *43*, 1809.

¹²⁶ Beer H.D., Florence C., Dammeier J., McGuire L., Werner S., Duan D.R., *Oncogene*, **1997**, *15*, 2211.

¹²⁸ Joly-Pharaboz M.O., Soave M.C., Nicolas B., Mebarki F., Renaud M., Foury O., Morel Y., Andre J.G., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1995**, *55*, 67.

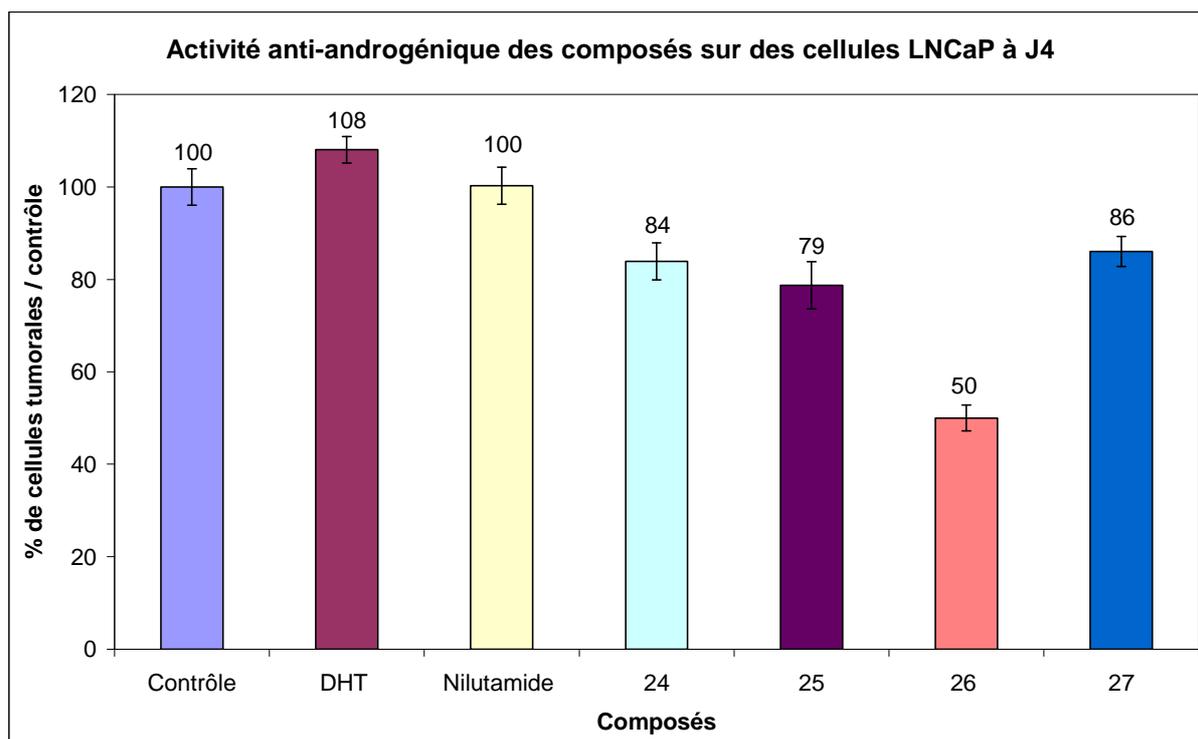


Graphique 7

Les deux analogues ferrocéniques imines **24** et **25** ont une activité anti-proliférative meilleure que la nilutamide, ce qui mettrait en évidence le rôle important joué par le ferrocène. Néanmoins, l'activité anti-tumorale de ces dérivés décroît au cours du temps. Ce résultat pourrait être dû à une instabilité des composés imines qui pourraient être dégradés en un métabolite qui stimulerait la croissance des cellules cancéreuses LNCaP.

D'autre part, les dérivés ferrocéniques carbonylés **26** et **27**, incubés à des concentrations de 1.10^{-5} M, se manifestent par une différence d'activité anti-proliférative élevée qui augmente au cours du temps. En effet, la molécule **26** a une activité anti-tumorale importante qui persiste au cours du temps, alors que le composé **27** a une faible activité anti-proliférative ne persistant pas avec le temps. Ce résultat suggère que le composé N-ferrocénylméthyle **26** aurait une action prolongée par rapport au composé N-ferrocényléthyle **27**, compte tenu de sa meilleure affinité de liaison à AR.

Cette évolution de l'activité au cours du temps a été mise en évidence sur le graphique 8 qui représente le pourcentage de cellules tumorales restantes par rapport au contrôle, 4 jours après incubation des dérivés de la nilutamide. D'après le graphique 8, parmi les analogues ferrocéniques carbonylés **26** et **27**, le dérivé **26** est le plus intéressant et le plus prometteur au niveau de son activité anti-proliférative envers des lignées cellulaires tumorales prostatiques. En effet, à une concentration de 1.10^{-5} M, environ la moitié de ces cellules cancéreuses ont été détruites au bout de quatre jours. De plus, cette activité persiste au cours du temps. Ce résultat pourrait suggérer que la présence du ferrocène lié à l'atome d'azote par une chaîne méthyle pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'expression de l'effet anti-tumoral envers des cellules cancéreuses de la prostate.



Graphique 8 : Effet anti-prolifératif des analogues de la nilutamide à 1.10^{-5} M, sauf pour DHT (1.10^{-6} M)

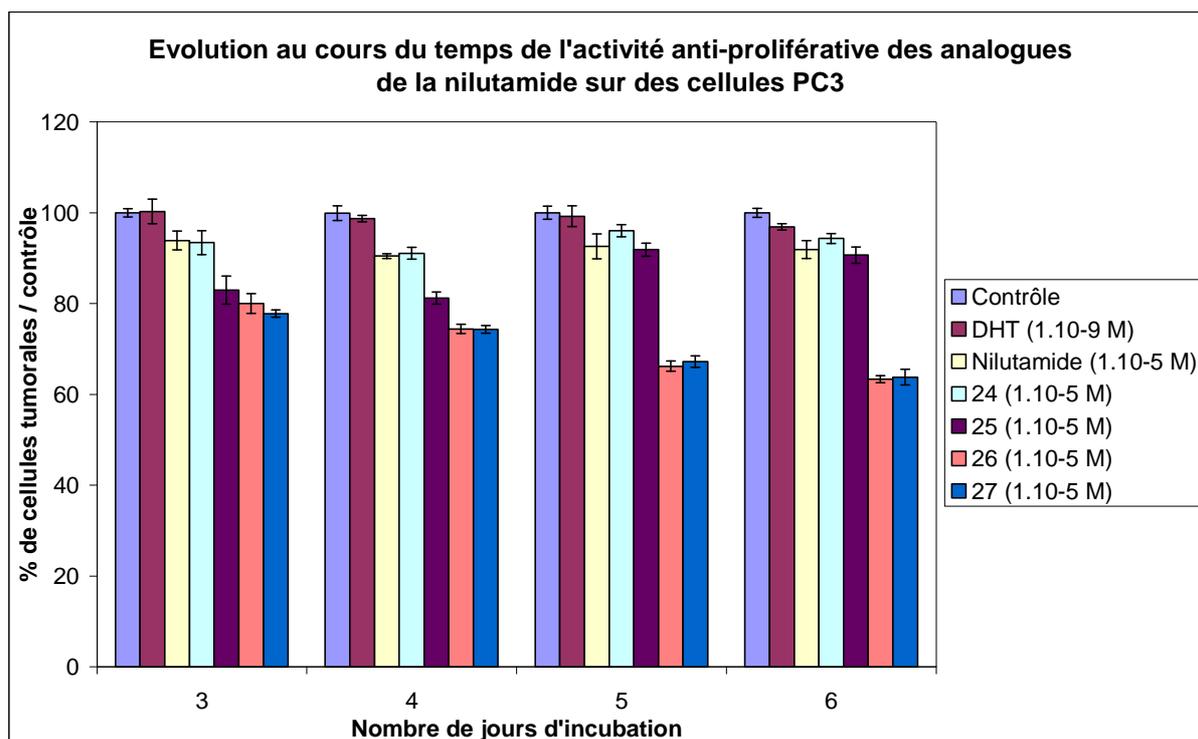
En conclusion, le composé **26**, en plus de sa bonne reconnaissance par AR, possède une activité anti-tumorale intéressante, ce qui en ferait un composé de choix pour l'élaboration de nouvelles molécules plus actives contre certains cancers de la prostate.

II.3.c. Tests d'activité anti-proliférative sur les cellules PC3

Cette série de tests *in vitro* a été effectuée sur des lignées cellulaires PC3. Ce sont des cellules prostatiques tumorales hormono-indépendantes qui n'expriment pas le gène codant pour le récepteur AR sauvage. Par conséquent, elles ne contiennent pas AR. Ces tests nous permettront donc de savoir si les composés synthétisés agissent ou non sur de telles cellules et, en conséquence, si de tels analogues ont un pouvoir cytotoxique.¹³² Les résultats de ces tests d'activité, concernant les analogues ferrocéniques **24**, **25**, **26** et **27**, ainsi que la nilutamide, la DHT et un contrôle (cellules incubées sans produits), sont présentés sur deux graphiques. Le graphique 9 représente l'évolution de l'activité anti-androgénique des composés synthétisés en fonction du temps d'incubation.

La nilutamide a une faible activité anti-proliférative (environ 10% de cellules tumorales

¹³² Ohtsu H., Xiao Z., Ishida J., Nagai M., Wang H.K., Itokawa H., Su C.Y., Shih C., Chiang T., Chang E., Lee Y.F., Tsai M.Y., Chang C., Lee K.H., *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 5037.



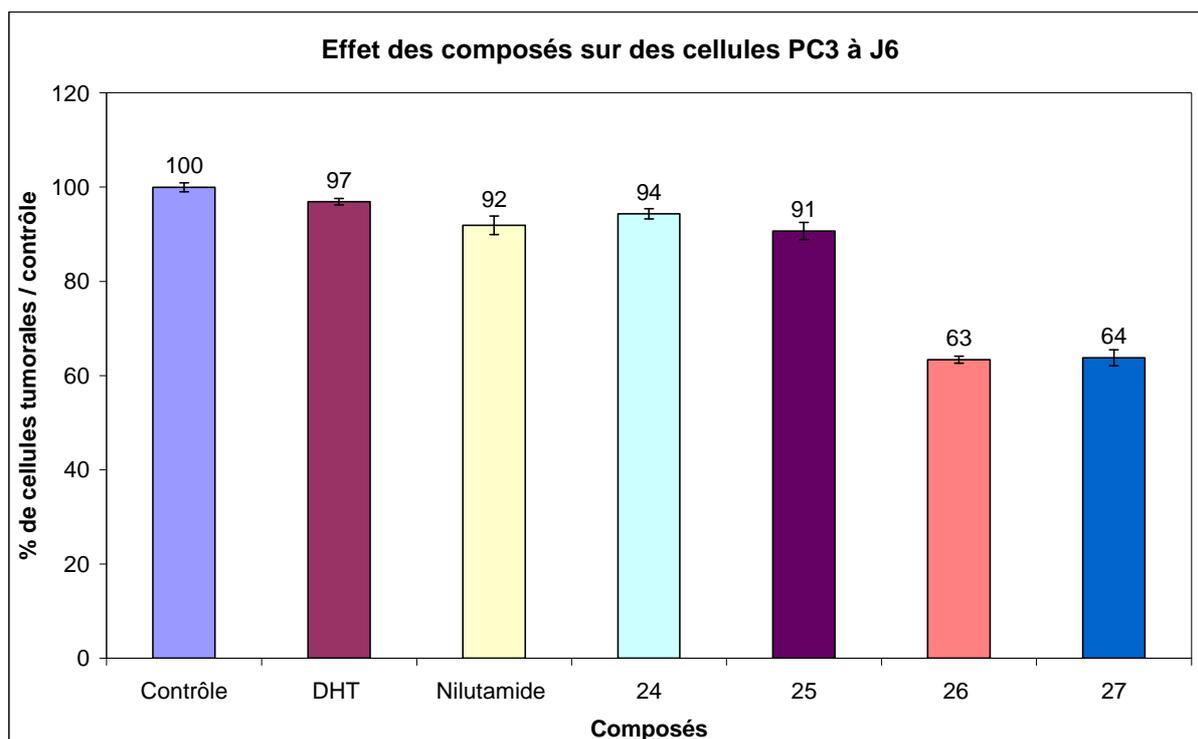
Graphique 9

tuées), à une dose de 1.10^{-5} M, qui est maintenue au cours du temps. Ce résultat mettrait en évidence la faible cytotoxicité de la nilutamide.

De même, les analogues ferrocéniques imines **24** et **25**, incubés à une concentration de 1.10^{-5} M, ont une activité anti-proliférative comparable avec celle de la nilutamide. Cette faible activité est constante au cours du temps, ce qui démontrerait la faible cytotoxicité des dérivés imines **24** et **25**.

Par contre, les dérivés ferrocéniques carbonylés **26** et **27** se sont avérés intéressants au niveau de leur activité anti-tumorale envers des cellules tumorales PC3. En effet, à une concentration de 1.10^{-5} M, ils se manifestent par une activité anti-proliférative qui augmente avec le temps et surtout plus importante que celle de la nilutamide et des composés imines **24** et **25**. Ces résultats démontrent une cytotoxicité accrue des analogues ferrocéniques carbonylés par rapport aux analogues imines et à la nilutamide.

Le graphique 10 représente le pourcentage de cellules tumorales restantes par rapport au contrôle, 6 jours après incubation des produits. Il permet de mettre en évidence la différence de cytotoxicité observée entre les dérivés carbonylés **26**, **27** et les dérivés imines **24** et **25**. D'après le graphique 10, on remarque que la nilutamide et les composés imines **24** et **25**, incubés à des doses de 1.10^{-5} M, inhibent la prolifération des cellules tumorales PC3 d'environ 10%. En revanche, les dérivés carbonylés **26** et **27**, incubés aux mêmes concentrations, inhibent la prolifération des cellules cancéreuses PC3 de presque 40%. Ce résultat permet de valider une hypothèse énoncée précédemment, à savoir que la cytotoxicité



Graphique 10 : Effet anti-prolifératif des analogues ferrocéniques de la nilutamide à 1.10^{-5} M, sauf pour DHT (1.10^{-9} M)

de ces molécules serait liée, en grande partie, à la présence du ferrocène. Il est lié à l'atome d'azote par une chaîne alkyle de différente longueur.

II.3.d. Résultats des calculs d' IC_{50}

Les valeurs d' IC_{50} ont été évaluées sur la lignée cellulaire tumorale prostatique hormono-indépendante PC3. Les valeurs d' IC_{50} des analogues ferrocéniques de la nilutamide **24**, **25**, **26** et **27**, ainsi que de la nilutamide, ont été reportées sur le Tableau 4.

Molécule	Effet anti-prolifératif sur PC3 (%) ^a	IC_{50} PC3 (μ M) ^b	IC_{50} MDA-MB231 (μ M) ^b
Nilutamide	92	-	-
24	94	-	-
25	91	-	-
26	63	$68,1 \pm 28,0$	$81,6 \pm 2,3$
27	64	$67,2 \pm 2,0$	$140,0 \pm 3,0$

^a pour une concentration de 10μ M après 6 jours d'incubation.

^b Les valeurs d' IC_{50} sur PC3 et MDA-MB231 ont été déterminées lorsqu'un effet anti-prolifératif significatif a été observé à 10μ M sur PC3.

Tableau 4 : Résultats d' IC_{50}

D'une part, on note que les valeurs d'IC₅₀ de la nilutamide, ainsi que des dérivés ferrocéniques imines **24** et **25**, sont largement supérieures à 10 µM, ce qui démontre que ces molécules ne sont pas efficaces envers des cellules cancéreuses prostatiques. D'autre part, ces résultats démontrent une efficacité plus importante des analogues ferrocéniques carbonylés **26** et **27**, par rapport aux dérivés imines **24** et **25**, et à la nilutamide. Ceci suggère que la présence d'une fonction carbonyle, ainsi que l'ajout d'un groupe ferrocène hydrophobe sur l'atome d'azote, seraient des facteurs importants permettant d'accroître l'efficacité de ces molécules. Enfin, une similitude des résultats a été observée entre les dérivés ferrocéniques **26** et **27**, ce qui montre que la longueur de la chaîne latérale N-alkyle ne serait pas indispensable pour moduler l'efficacité.

Comme les valeurs d'IC₅₀ des analogues carbonylés **26** et **27** évaluées sur des cellules PC3 sont intéressantes, on a décidé, dans un deuxième temps, de les tester sur une autre lignée cellulaire tumorale disponible dans le laboratoire, les cellules MDA-MB231. Ce sont des cellules tumorales des seins hormono-indépendantes. Ces cellules ne contiennent pas le récepteur nucléaire alpha des oestrogènes (ERα), mais elles contiennent ERβ.

Les valeurs d'IC₅₀ des molécules **26** et **27** ont donc été évaluées sur les cellules tumorales MDA-MB231 pour évaluer la spécificité de ces molécules vis-à-vis d'un tissu. Les valeurs sont égales à 81,6 ± 2,3 µM pour le composé **26** et à 140 ± 3 µM pour le composé **27**. Elles sont largement supérieures à celles observées sur les cellules PC3 (68,0 µM), ce qui suppose que ces molécules sont plus efficaces envers des cellules prostatiques tumorales.

III. Synthèse et études biologiques d'analogues 4'-ferrocényles

III.1. Introduction

Des études antérieures ont montré que des analogues organiques de la nilutamide, contenant un alcool primaire^{92,93} et un nitrile¹⁴² sur la chaîne N-alkyle, avaient une affinité de

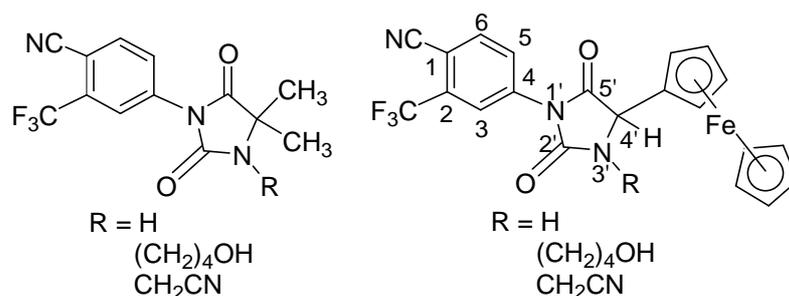


Figure 26 : Objectifs de synthèse

⁹² Battmann T., Bonfils A., Branche C., Humbert J., Goubet F., Teutsch G., Philibert D., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1994**, 48, 55.

⁹³ Van Dort M.E., Jung Y.W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 1045.

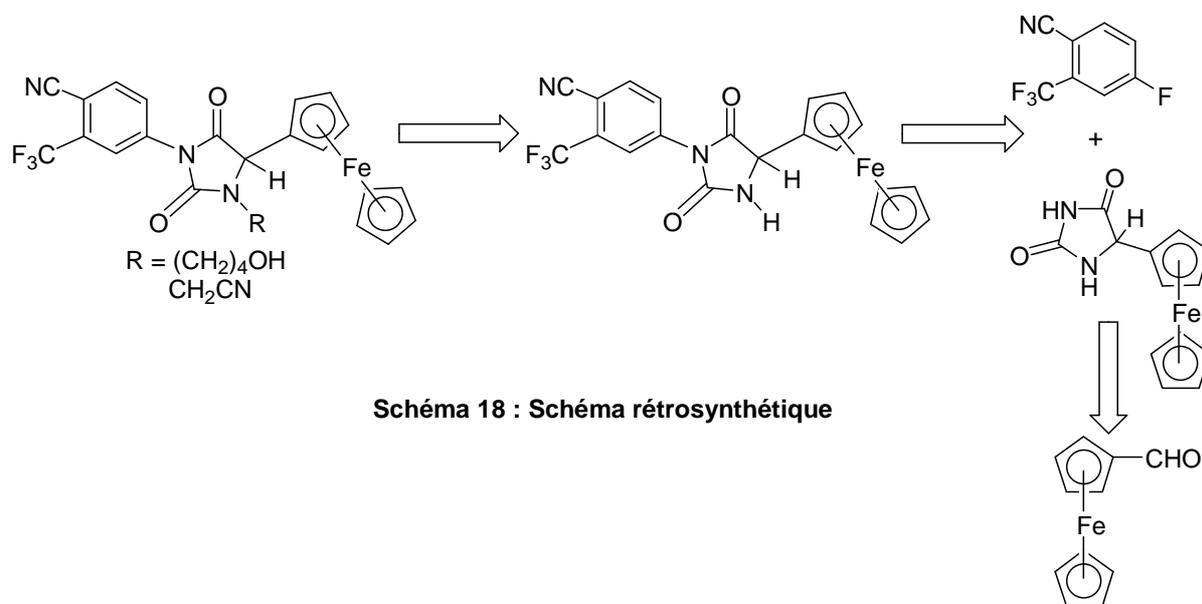
¹⁴² Battmann T., Branche C., Bouchoux F., Cerede E., Philibert D., Goubet F., Teutsch G., Gaillard-Kelly M., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1998**, 64, 103.

liaison importante pour AR, ainsi qu'une activité anti-androgénique importante. C'est pourquoi nous avons décidé, dans une deuxième partie, d'entreprendre la synthèse de nouveaux analogues ferrocéniques (Figure 26). Ces analogues conservent la même chaîne alkyle et le ferrocène a été incorporé à la place du groupement diméthyle. Ils ont été synthétisés en série racémique et ont été testés au niveau de leur affinité de liaison pour AR et de leur activité anti-proliférative envers les lignées cellulaires LNCaP et PC3.

III.2. Synthèse

III.2.a. Stratégie de synthèse

La stratégie de synthèse de ces analogues est présentée sur le Schéma 18. Elle consiste en une réaction de couplage entre le 4-fluoro-2-trifluorométhyl-benzonitrile, et le 4'-ferrocényl-2',5'-imidazolidinedione. Cette molécule est synthétisée à partir du ferrocèncarboxaldéhyde. La réaction de couplage permet d'obtenir un dérivé ferrocénique de la nilutamide ne contenant pas de chaîne N-alkyle. Cette chaîne est ensuite ajoutée au niveau de la structure, par l'intermédiaire d'une réaction de substitution nucléophile avec un halogénure.



III.2.b. Les étapes de la synthèse

La première étape de la synthèse est une réaction de formation du cycle hydantoïne (Schéma 19). Pour cela, une solution aqueuse de bisulfite de sodium est ajoutée au ferrocèncarboxaldéhyde. Cette solution est ensuite ajoutée à une solution aqueuse de cyanure de potassium KCN et de carbonate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pour donner le 4'-ferrocényl-2',5'-imidazolidinedione **28** avec un rendement moyen (40%).¹³⁸

¹³⁸ Graham P.J., Lindsey R.V., Parshall G.W., Peterson M.L., Whitman G.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 3416.

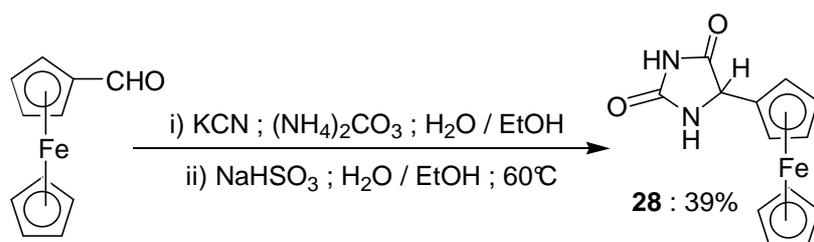


Schéma 19 : Synthèse du 4'-ferrocényl-imidazolidinone **28**

La deuxième étape de la synthèse consiste en une réaction de couplage entre le 4-fluoro-2-trifluorométhyl-benzonitrile, et le 4'-ferrocényl-2',5'-imidazolidinedione **28** (Schéma 20). C'est une réaction de substitution nucléophile aromatique effectuée en milieu basique.¹⁴³ Cependant, malgré le remplacement d'une base forte NaH par une base plus faible K_2CO_3 , le produit attendu ne s'est pas formé. En effet, il s'est formé un composé biaromatique **29** qui a été isolé et purifié. Ce produit a été obtenu avec un faible rendement compris autour de 40%. Ce composé a été formé car l'atome d'hydrogène situé en position 4' est un hydrogène très mobile qui a donc été facilement déprotoné par une base même faible. Cette forte mobilité peut s'expliquer par la présence des deux groupes carbonyle et ferrocène qui stabilisent l'intermédiaire formé.

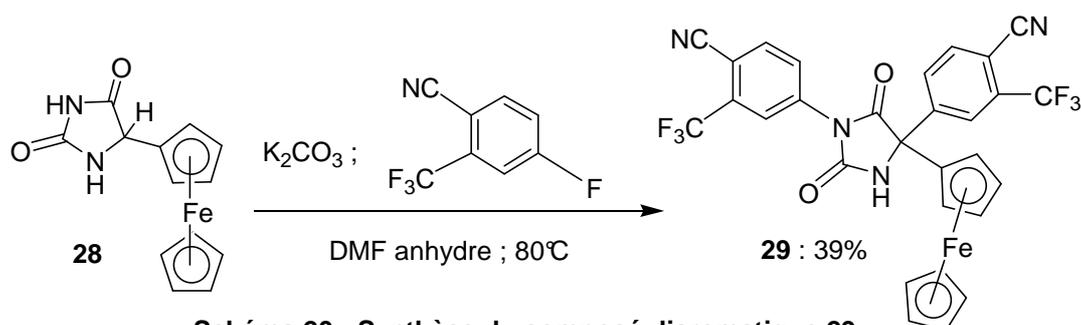


Schéma 20 : Synthèse du composé diaromatique **29**

III.3. Résultats des tests biochimiques

Une fois synthétisé, l'analogue ferrocénique **29** est soumis à plusieurs études biochimiques. Pour cela, une pureté supérieure ou égale à 99% a été déterminée par HPLC. Les études biochimiques comprennent les tests d'affinité relative de liaison au récepteur AR (tests RBA), des études d'activité anti-proliférative effectuées sur les lignées cellulaires tumorales prostatiques, LNCaP et PC3, et des calculs d' IC_{50} effectués sur PC3.

III.3.a. Tests RBA

Les tests RBA ont été effectués sur des récepteurs AR purifiés. Les valeurs de RBA sont mesurées en % par rapport à un composé de référence, la DHT, dont la valeur RBA est fixée à 100% par définition. Les valeurs RBA de l'analogue ferrocénique **29** et de la nilutamide, ainsi que la valeur de $\log Po/w$ du composé **29**, sont reportées sur la Figure 27.

¹⁴³ Cogan P.S., Koch T.H., *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 5258.

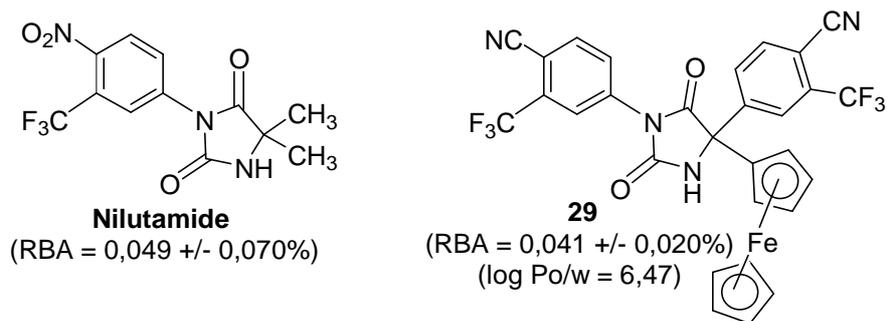


Figure 27 : Résultats des tests RBA et log Po/w

Les résultats des tests RBA ont montré que l'analogue ferrocénique **29** a une faible affinité de liaison à AR. Toutefois, elle est équivalente à celle de la nilutamide. Ce résultat démontre que la substitution d'un groupe diméthyle par deux entités à la fois plus encombrantes et plus hydrophobes, le ferrocène et le noyau aromatique contenant un trifluorométhyle et un nitrile, ne modifie pas la reconnaissance du ligand envers AR. Par conséquent, la poche hydrophobe de AR serait suffisamment grande pour pouvoir accepter la présence de ces deux substituants.

D'autre part, la molécule **29** a une affinité de liaison à AR plus faible que les analogues ferrocéniques **26** (RBA = 0,523 ± 0,200%) et **27** (RBA = 0,217 ± 0,070%) qui contiennent une chaîne latérale N-ferrocénylalkyle. Ce résultat démontrerait l'importance d'une chaîne latérale hydrophobe sur l'atome d'azote pour améliorer la reconnaissance de AR.

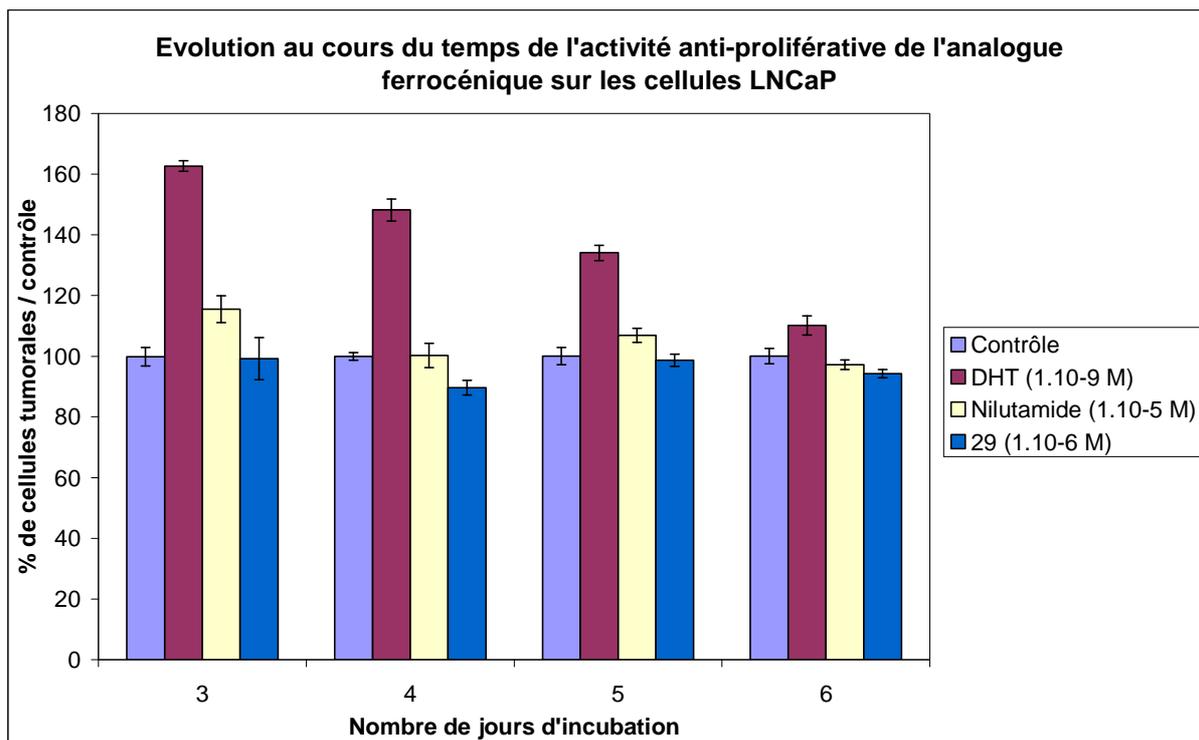
La valeur de log Po/w de l'analogue ferrocénique **29** est égale à 6,47. Ce composé est très hydrophobe. Malgré cela, il a une valeur de RBA plus faible que les analogues ferrocéniques **26** (log Po/w = 5,23) et **27** (log Po/w = 5,62) qui sont plus hydrophiles. L'amélioration de la valeur de RBA ne dépendrait donc pas de l'hydrophobicité de la molécule.

III.3.b. Tests d'activité anti-proliférative sur les cellules LNCaP

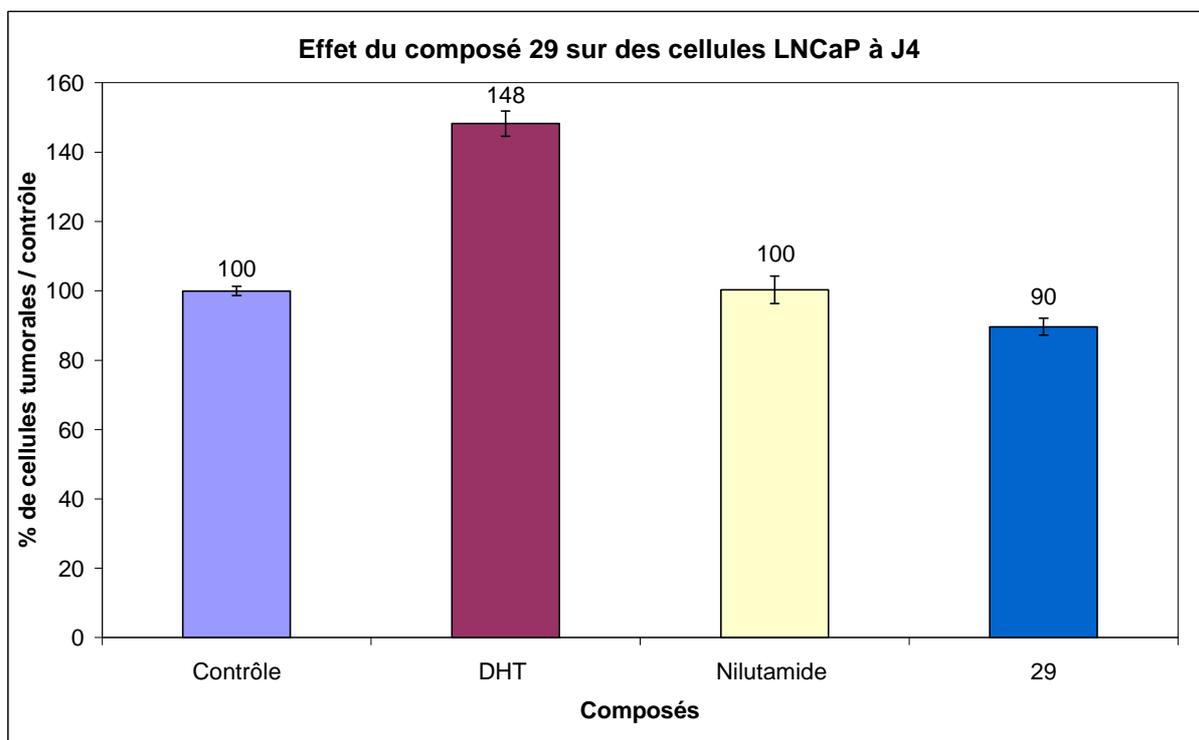
Les résultats des tests d'activité anti-proliférative effectués sur des lignées cellulaires LNCaP, concernant l'analogue ferrocénique **29**, ainsi que la nilutamide, la DHT et un contrôle (cellules incubées sans produits), sont présentés sur deux graphiques.

Le graphique 11 représente l'évolution de l'activité anti-androgénique du composé **29** en fonction du temps d'incubation. Sur ce graphique, l'analogue ferrocénique **29**, incubé à une dose de $1 \cdot 10^{-6}$ M, montre une légère activité anti-proliférative, alors que la nilutamide a un effet prolifératif, ce qui mettrait en évidence le rôle joué par le ferrocène. Néanmoins, son activité anti-tumorale reste faible au cours du temps.

Le graphique 12 représente le pourcentage de cellules tumorales restantes par rapport au contrôle, 4 jours après incubation des produits. Il permet de mieux mettre en évidence la différence d'activité observée entre le composé **29** et la nilutamide. D'après le graphique 12, on note que le composé **29**, incubé à une concentration de $1 \cdot 10^{-6}$ M, inhibe la prolifération des cellules LNCaP d'environ 10%, après 4 jours d'incubation. Ce résultat permettrait, d'une part, de valider une hypothèse énoncée précédemment, à savoir que la présence du ferrocène jouerait un rôle important dans l'expression de l'activité anti-tumorale de cette molécule.



Graphique 11

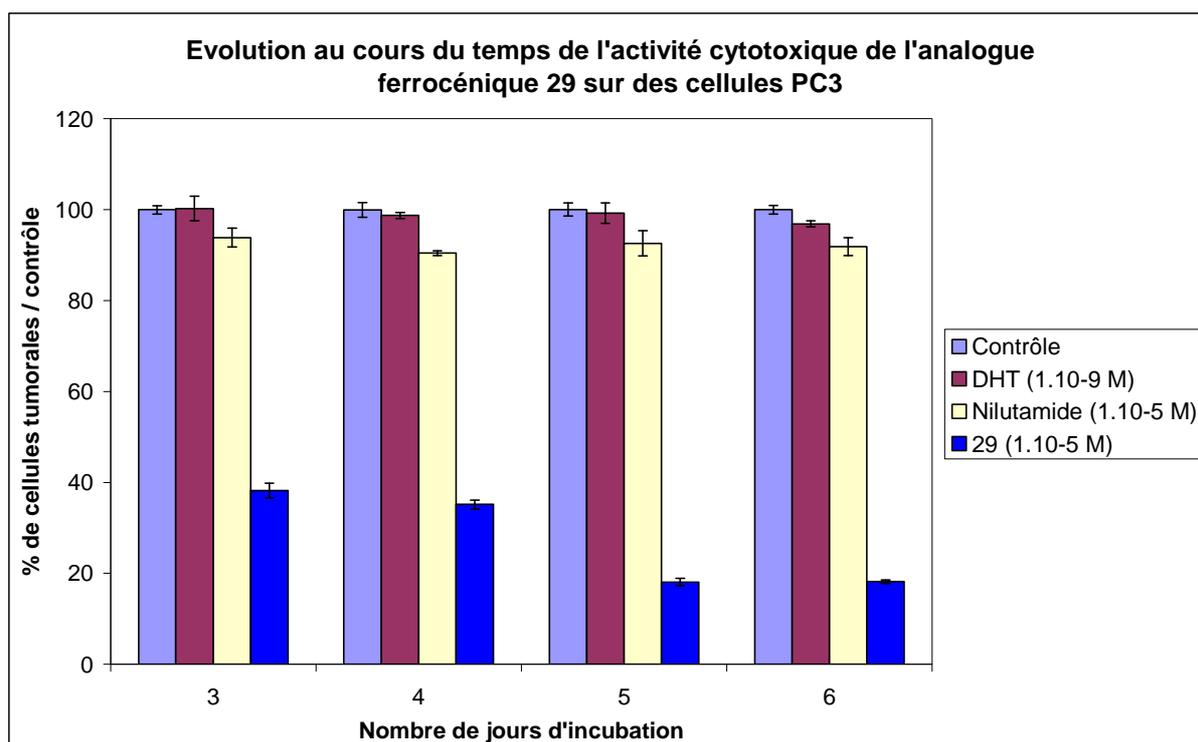


Graphique 12 : Effet anti-prolifératif du composé 29 à 1.10^{-6} M ; la DHT est incubée à 1.10^{-9} M et la nilutamide à 1.10^{-5} M.

Cette activité anti-proliférative serait aussi due à la présence d'un deuxième noyau aromatique, le 4-cyano-3-trifluorométhyl-phényle, substitué sur le carbone chiral.

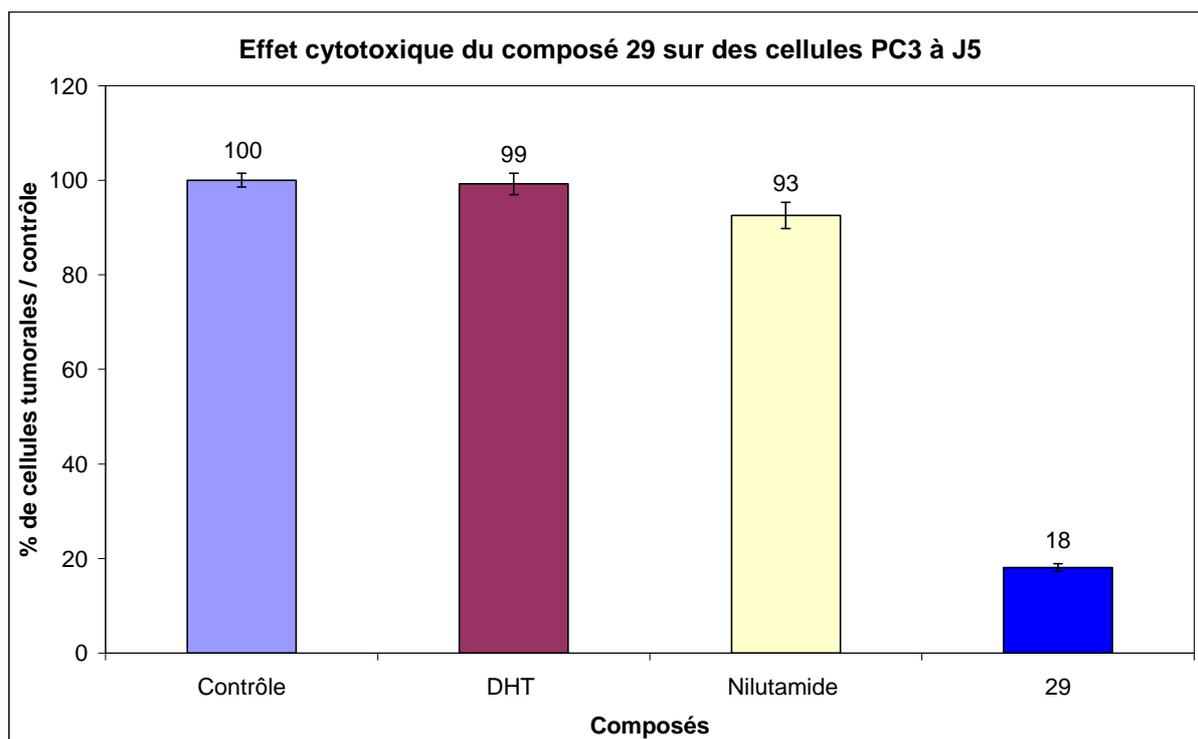
III.3.c. Tests d'activité anti-proliférative sur les cellules PC3

Les résultats des tests d'activité anti-proliférative effectués sur des lignées cellulaires PC3, concernant l'analogue ferrocénique **29**, ainsi que la nilutamide, la DHT et un contrôle (cellules incubées sans produits), sont présentés sur deux graphiques. Le graphique 13 représente l'évolution de l'activité anti-proliférative du composé **29** en fonction du temps d'incubation. Le graphique 14 représente le pourcentage de cellules tumorales restantes par rapport au contrôle, 5 jours après incubation du composé **29**.



Graphique 13

L'analogue ferrocénique **29** s'est avéré intéressant et prometteur au niveau de son activité anti-tumorale envers des cellules tumorales PC3. En effet, à une concentration de 1.10^{-5} M, le pourcentage restant de cellules cancéreuses est d'environ 20%, après cinq jours d'incubation. De plus, l'activité cytotoxique de ce composé augmente avec le temps. Ce résultat permettrait donc de valider une hypothèse énoncée précédemment, à savoir que la cytotoxicité de cette molécule serait due, en partie, à la présence du ferrocène. Il est situé à la place du groupe diméthyle présent dans la structure de la nilutamide. En outre, ce résultat serait expliqué par la présence du deuxième noyau aromatique, substitué sur le carbone chiral, qui comprend deux substituants électroattracteurs que sont CN en *para* et CF₃ en *méta*. Un composé diaromatique non organométallique permettrait donc de savoir si ce second groupe aromatique a une influence sur l'effet anti-prolifératif.



Graphique 14 : Effet cytotoxique des composés à 1.10^{-5} M, sauf pour DHT (1.10^{-9} M)

III.3.d. Résultats des calculs d' IC_{50}

La valeur d' IC_{50} du composé ferrocénique **29** a été évaluée sur la lignée cellulaire hormono-indépendante PC3. Elle est égale à $6,03 \pm 0,15 \mu\text{M}$. Ce résultat met en évidence une excellente efficacité de cette molécule par rapport aux dérivés N-ferrocénylalkyles et à la nilutamide. Ce résultat serait relié à l'ajout de deux groupes hydrophobes encombrants, que sont le ferrocène à la place du groupe diméthyle, et le noyau aromatique. La présence de ces deux entités serait primordiale pour expliquer l'augmentation spectaculaire de cette efficacité.

Comme la valeur d' IC_{50} du composé **29** évaluée sur des cellules PC3 est intéressante, on a décidé, dans un deuxième temps, de le tester sur une autre lignée cellulaire tumorale disponible dans le laboratoire, les cellules MDA-MB231. Ce sont des cellules tumorales des seins hormono-indépendantes. Ces cellules ne contiennent pas le récepteur nucléaire alpha des oestrogènes ($ER\alpha$), mais elles contiennent $ER\beta$.

La valeur d' IC_{50} de la molécule **29** a donc été évaluée sur la lignée cellulaire tumorale MDA-MB231 pour évaluer la spécificité de ces molécules vis-à-vis d'un tissu. Elle est égale à $7,37 \pm 0,12 \mu\text{M}$. Une similitude des résultats a donc été observée sur les deux lignées cellulaires, ce qui suppose que cette molécule serait aussi efficace envers deux types de cancers classés hormono-indépendants : le cancer de la prostate et le cancer du sein.

Enfin, des tests RBA ont été effectués vis-à-vis de $ER\beta$. Ils nous indiquent qu'il n'existe pas de compétition pour ce récepteur entre le produit et les oestrogènes. Ceci signifie que

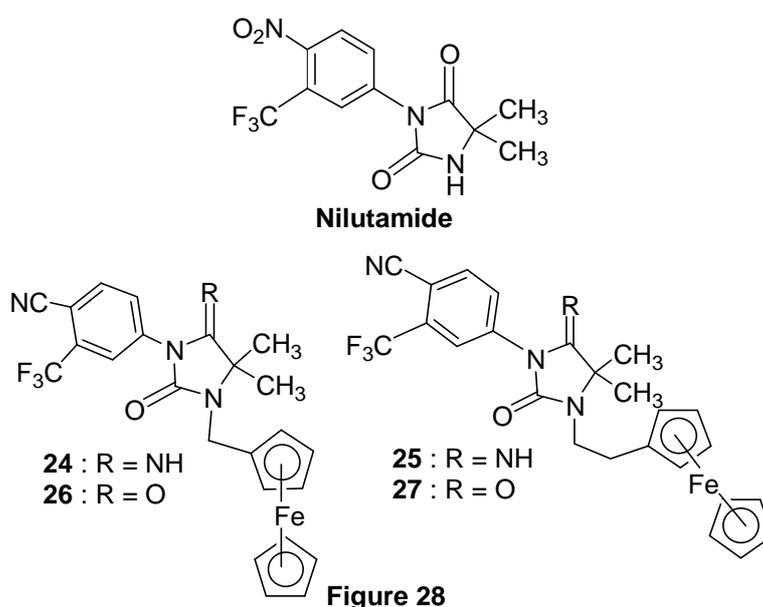
cette molécule n'a aucune affinité de liaison envers ER β . Par conséquent, les récepteurs ER β ne seraient pas la cible de ce produit. Cette molécule devrait donc interagir avec une autre cible, à la fois présente dans les cellules hormono-indépendantes PC3 et MDA MB231. Celle-ci reste à définir.

En résumé, les résultats d'IC₅₀ démontrent une efficacité du composé **29** sur les lignées cellulaires tumorales hormono-indépendantes PC3 et MDA-MB231. Ces résultats, associés aux faibles valeurs de RBA de ces molécules envers AR et ER β , suggèrent que d'autres cibles protéiques sont non seulement possibles, mais probables. Il reste que le composé **29** est le premier représentant efficace de ce type de structure.

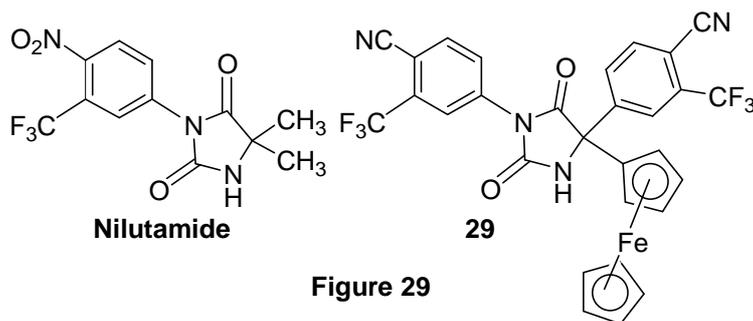
IV. Conclusion

Dans ce chapitre, a été réalisée la synthèse des premiers analogues ferrocéniques de la nilutamide. Ces molécules ont été testées au niveau de leur affinité de liaison envers le récepteur AR (test RBA), de leur activité anti-androgénique et au niveau de leur cytotoxicité.

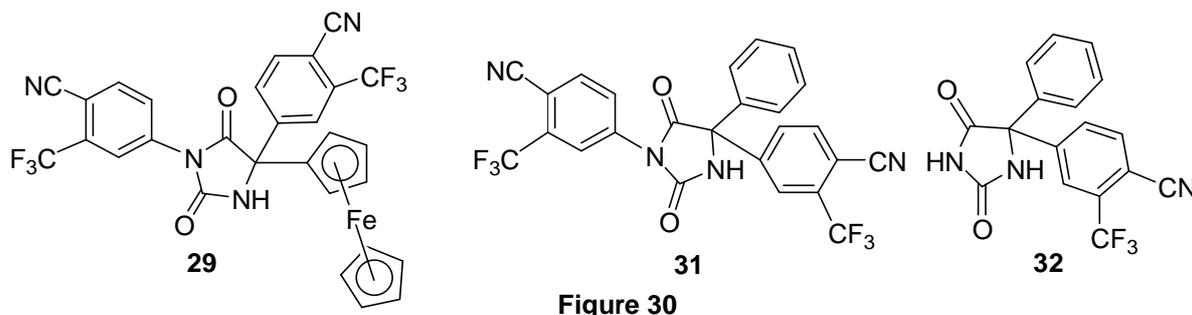
Dans une première partie, la synthèse des analogues N-ferrocénylalkyles de la nilutamide a été entreprise (Figure 28). Ce choix s'est avéré judicieux, puisque les tests biologiques ont montré l'existence d'une molécule prometteuse, l'analogue **26**, pour le traitement du cancer de la prostate. En effet, ce composé, en plus d'avoir une affinité de liaison envers AR plus importante que la nilutamide (environ 10 fois supérieure), exhibe une activité anti-tumorale plus importante, aussi bien sur des cellules hormono-dépendantes qu'indépendantes. Ces résultats ont été confirmés par une valeur d'IC₅₀ de l'ordre de 10 μ M. Par conséquent, la molécule **26** serait un point de départ intéressant dans le but d'élaborer des analogues ferrocéniques encore plus actifs (chapitre 4).



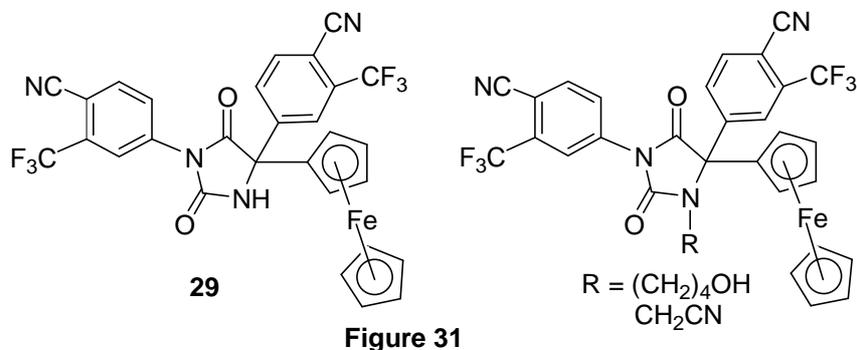
Dans une deuxième partie, il a été envisagé de synthétiser des dérivés contenant à la fois un ferrocène à la place du groupe diméthyle et une chaîne N-alkyle. La synthèse de tels



analogues a été effectuée en série racémique. Le composé **29** a été obtenu et testé (Figure 29). Cette molécule s'est avérée être très prometteuse d'un point de vue biologique. En effet, même si elle a une faible affinité de liaison pour AR, elle a montré une excellente activité anti-tumorale, à une dose de 1.10^{-5} M, vis-à-vis des cellules prostatiques PC3. Ce résultat, couplé à une valeur d' IC_{50} égale à $6,03 \pm 0,15$ μ M, laisse supposer que le composé **29** aurait un mécanisme d'action différent de celui de la nilutamide. Une autre cible présente dans les cellules tumorales de la prostate devrait donc être reconnue pour pouvoir expliquer son efficacité potentielle envers des cellules hormono-indépendantes.

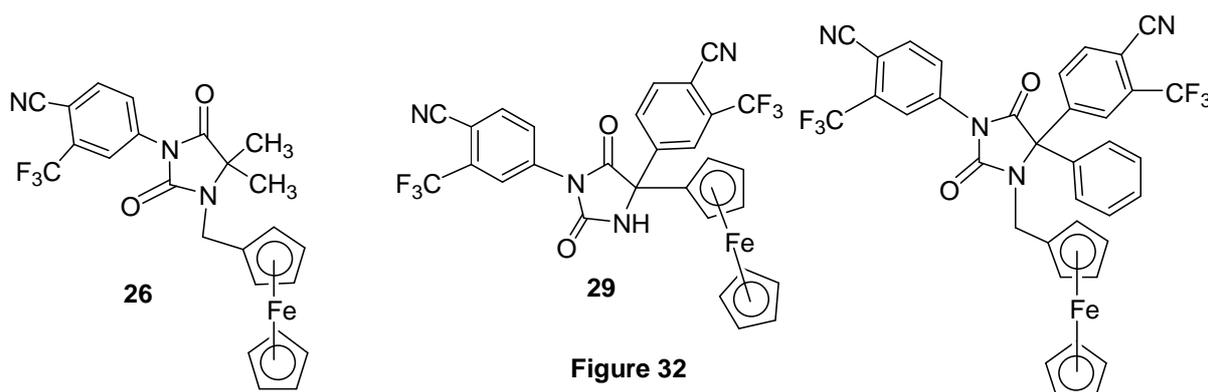


Compte tenu des résultats obtenus dans la partie précédente, la synthèse de l'analogue organique **31**, contenant un phényle à la place du ferrocène, a été envisagée. La synthèse de cet analogue a été effectuée en série racémique selon un mode opératoire identique à la synthèse précédente. Un mélange de deux molécules, le composé attendu **31** et le produit **32**, a été obtenu (Figure 30) avec de faibles rendements (environ 30% pour chaque molécule). Une fois purifiée, la molécule **31** sera soumise aux tests biologiques pour évaluer l'influence du ferrocène sur l'action anti-tumorale vis-à-vis de cellules cancéreuses prostatiques.



Compte tenu des résultats obtenus pour la molécule **29**, une synthèse énantiomériquement pure doit être envisagée à l'avenir pour connaître l'importance de la chiralité à ce niveau (Figure 31). Néanmoins, ce composé a une faible affinité de liaison à AR. Des études précédentes ont montré que des analogues organiques de la nilutamide, contenant des chaînes latérales N-hydroxyalkyles^{92, 93} et N-cyanoalkyles¹⁴², avaient des affinités de liaison plus importantes pour AR que la nilutamide. Par conséquent, l'ajout de ces chaînes latérales sur la molécule **29** pourrait permettre d'obtenir des molécules qui reconnaîtraient mieux AR. Une synthèse de ces molécules est envisagée en série racémique (Figure 31).

En conclusion, d'après les études biologiques réalisées sur les composés **26** et **29**, la molécule **26** a démontré, non seulement une affinité de liaison à AR meilleure que la nilutamide, mais aussi une meilleure activité anti-tumorale envers des cellules cancéreuses. De son côté, la molécule **29** a montré des propriétés cytotoxiques excellentes envers des cellules tumorales hormono-indépendantes. Cependant, il se lie à AR avec une affinité équivalente à celle de la nilutamide, ce qui laisse supposer que la poche hydrophobe de AR serait suffisamment grande pour tolérer la présence de deux substituants plus encombrants et hydrophobes que le groupe diméthyle. En comparaison, la molécule **26**, qui comprend une chaîne latérale N-ferrocénylméthyle, présente une meilleure RBA, ce qui démontre l'importance de cette chaîne latérale hydrophobe pour améliorer la reconnaissance de AR. Par conséquent, la synthèse d'un analogue N-ferrocénylméthyle comprenant deux structures aromatiques à la place du diméthyle est envisagée pour l'avenir (Figure 32).



V. Partie expérimentale

Toutes les réactions ont été effectuées sous atmosphère d'argon. L'éther, l'acétate d'éthyle et le toluène ont été distillés avec un mélange sodium/benzophénone. Les autres réactifs et

⁹² Battmann T., Bonfils A., Branche C., Humbert J., Goubet F., Teutsch G., Philibert D., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1994**, 48, 55.

⁹³ Van Dort M.E., Jung Y.W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 1045.

¹⁴² Battmann T., Branche C., Bouchoux F., Cerede E., Philibert D., Goubet F., Teutsch G., Gaillard-Kelly M., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1998**, 64, 103.

solvants utilisés, tels que le DMF anhydre, sont des produits commerciaux. Les chromatographies sur colonne ont été réalisées sur gel de silice Merck 60 (40-63 μm). Les points de fusion des produits ont été mesurés à l'aide d'un banc Köfler. Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un spectromètre IR-FT BOMEM Michelson-100. Les analyses RMN ^1H et ^{13}C ont été effectuées sur un appareil Bruker 300 MHz. Les solvants RMN utilisés sont le chloroforme deutéré CDCl_3 , l'acétone- d_6 et le DMSO- d_6 . Les déplacements chimiques (δ) sont mesurés en parties par millions (ppm) et les constantes de couplage (J) sont calculées en Hertz (Hz). Les analyses élémentaires des nouveaux produits ont été effectuées au Service de Microanalyse de l'I.C.S.N. à Gif-sur-Yvette.

Synthèse du ferrocèneoxime (17)¹⁴⁰ : Une solution d'hydrochlorure d'hydroxylamine $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (1,946 g ; 2 équivalents) dans l'eau (15 mL) est ajoutée à une solution de ferrocénecarboxaldéhyde (3,000 g ; 14,0 mmol) dans l'éthanol (40 mL), suivie par AcONa (3,445 g ; 3 équivalents). Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 3 h, refroidi à température ambiante et concentré sous vide. Ensuite, du chloroforme (40 mL) est ajouté goutte à goutte et la solution est agitée pendant 20 minutes à température ambiante. Le précipité obtenu est filtré sur celite et le filtrat est évaporé. Un résidu solide (3,441 g) est obtenu et est purifié sur colonne (éluant : acétate d'éthyle/pentane 1:3). Deux fractions correspondant aux 2 stéréoisomères (E) et (Z) de l'oxime **17** sont obtenues (solide orange de masse 2,833 g ; 88,2%). R_f (acétate d'éthyle/pentane 1:3) : 0,58 (Z) et 0,38 (E). Mp : 138-140°C. Un spectre RMN du mélange avant purification nous indique un rapport (E):(Z) d'environ 75:25.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 4,20 (Z) et 4,22 (E) (5H, s, C_5H_5), 4,37 (E + Z) (2H, t, C_5H_4 , $\text{H}\beta$, J = 2,1 Hz), 4,53 (E) et 4,81 (Z) (2H, t, C_5H_4 , $\text{H}\alpha$, J = 2,1 Hz), 7,24 (CH *anti*, Z) et 7,98 (CH *syn*, E) (1H, s, CH oxime).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 67,7 (E) et 71,7 (Z) (2C, C_5H_4); 69,4 (E) et 69,5 (Z) (C_5H_5); 70,2 (E) et 70,6 (Z) (2C, C_5H_4); 147,6 (Z) et 150,1 (E) (CH oxime).

Synthèse de l'aminométhylferrocène (18)¹²² : Une suspension d'hydrure d'aluminium lithium LiAlH_4 (0,746 g ; 4,5 équivalents) dans l'éther (30 mL) est agitée à reflux. La solution est refroidie à température ambiante et une solution d'oxime **17** (1,000 g ; 4,37 mmol) dans l'éther (100 mL) est ensuite ajoutée lentement. Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 2 h. La solution est refroidie à 0°C et sont ajoutés doucement de l'éther, de l'eau (quelques mL), une solution aqueuse de soude 20% (m/v) (20 mL) et de l'eau (20 mL). La solution est extraite à l'éther. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée. Le produit obtenu **18** est une huile orange (0,928 g ; 98,8%). Elle est directement utilisée pour la suite de la réaction. R_f (acétone/triéthylamine 10:1) : 0,59.

¹⁴⁰ Huikai S., Qingmin W., Runqiu H., Heng L., Yonghong L., *J. Organomet. Chem.*, **2002**, 655, 182.

¹²² Lednicer D., Lindsay J.K., Hauser C.R., *J. Org. Chem.*, **1958**, 23, 653.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 3,47 (2H, s, CH_2NH_2), 4,03 (2H, t, C_5H_4 , $\text{H}\beta$, $J = 1,8$ Hz), 4,07 (5H, s, C_5H_5), 4,09 (2H, t, C_5H_4 , $\text{H}\alpha$, $J = 1,8$ Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 41,3 (CH_2NH_2); 67,2 (2C, C_5H_4); 67,7 (2C, C_5H_4); 68,3 (C_5H_5); 91,0 (C_{ipso} , C_5H_4).

Synthèse du 2-cyano-2-[N-(ferrocénylméthyl)-amino]-propane (19) : Une solution d'amine **18** (0,500 g ; 2,33 mmol) dans l'éther (12 mL) est ajoutée au 2-hydroxyisobutyronitrile (2,700 mL ; 13,5 équivalents). Le mélange réactionnel est agité pendant 3 h à température ambiante. Il est ensuite extrait à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée pour donner une huile orange foncée (0,870 g) qui est purifiée par filtration sur silice (éluant : éther/éther de pétrole 1:1). Un solide orange correspondant au produit **19** est obtenu (0,163 g ; 25,0%). R_f (éther/éther de pétrole 1:1) : 0,48. Mp : 62°C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 1,51 (6H, s, 2 CH_3), 3,60 (2H, s, CH_2NH), 4,14 (2H, t, C_5H_4 , $\text{H}\beta$, $J = 1,8$ Hz), 4,16 (5H, s, C_5H_5), 4,22 (2H, t, C_5H_4 , $\text{H}\alpha$, $J = 1,8$ Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 27,6 (2 CH_3); 44,5 (CH_2NH); 51,8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 68,1 (2C, C_5H_4); 68,2 (2C, C_5H_4); 68,6 (C_5H_5); 86,0 (C_{ipso} , C_5H_4); 123,0 (CN).

MS (m/z ; EI) : 282 [M^+].

Analyse élémentaire calculée (%) pour $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{FeN}_2$: C 63,85, H 6,43, N 9,93 ; trouvée : C 63,71, H 6,65, N 9,94.

Synthèse du cyanométhylferrocène (20) : Une solution d'iodure de ferrocénylméthyltriméthylammonium (2,500 g ; 6,49 mmol) et de cyanure de potassium KCN (2,508 g ; 38,5 mmol) dans l'eau (25 mL) est agitée à reflux pendant 2 h. Le mélange réactionnel est refroidi à température ambiante et est extrait à l'éther. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. Un solide jaune correspondant au produit **20** est obtenu (1,197 g ; 81,9%). Il est recristallisé dans l'hexane. R_f (éther) : 0,89. Mp : 85-88°C (littérature : 81-83°C¹²²).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 3,42 (2H, s, CH_2CN), 4,17 (2H, t, C_5H_4 , $\text{H}\beta$, $J = 1,8$ Hz), 4,24 (5H, s, C_5H_5), 4,25 (2H, t, C_5H_4 , $\text{H}\alpha$, $J = 1,8$ Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 19,0 (CH_2CN); 68,1 (2C, C_5H_4); 68,4 (2C, C_5H_4); 69,3 (C_5H_5); 118,0 (CN).

Synthèse de l'aminoéthylferrocène (21)¹²² : Une suspension d'hydrure d'aluminium lithium LiAlH_4 (0,506 g ; 3 équivalents) dans l'éther (25 mL) est agitée à reflux. Une solution de cyanométhylferrocène **20** (1,000 g ; 4,44 mmol) dans l'éther (20 mL) est ensuite ajoutée

¹²² Lednicer D., Lindsay J.K., Hauser C.R., *J. Org. Chem.*, **1958**, 23, 653.

lentement. Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 2 h. La solution est refroidie à 0°C et sont ajoutés doucement de l'éther, de l'eau (quelques mL), une solution aqueuse de soude 20% (m/v) (20 mL) et de l'eau (40 mL). La solution est extraite à l'éther. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le produit obtenu **21** est une huile orange (1,081 g). Elle est directement utilisée pour la suite de la réaction. R_f (acétone/triéthylamine 10:1) : 0,58.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 2,48 (2H, t, CH₂, J = 6,9 Hz), 2,80 (2H, t, CH₂NH₂, J = 6,9 Hz), 4,05-4,11 (9H, ferrocène).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 34,1 (CH₂); 43,6 (CH₂NH₂); 67,5 (2C, C₅H₄); 68,4 (2C, C₅H₄); 68,6 (C₅H₅); 86,3 (C_{ipso}, C₅H₄).

Synthèse du 2-cyano-2-[N-(ferrocényléthyl)-amino]-propane (22) : Une solution d'amine **21** (1,000 g ; 4,36 mmol) dans l'éther (18 mL) est ajoutée doucement au 2-hydroxyisobutyronitrile (2,500 mL ; 6,3 équivalents). Le mélange réactionnel est agité pendant 3 h à température ambiante. Il est ensuite extrait à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée pour donner une huile orange foncée (1,289 g) qui est purifiée par filtration sur silice (éluant : éther/éther de pétrole 1:1). Une huile orange correspondant au produit **22** est obtenue (1,064 g ; 82,3%). Elle est cristallisée dans le pentane pour donner un solide orange. R_f (éther/éther de pétrole 2:1) : 0,52. Mp : 74-76°C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 1,46 (6H, s, 2 CH₃), 2,57 (2H, t, CH₂, J = 7,2 Hz), 2,87 (2H, t, CH₂NH, J = 7,2 Hz), 4,05-4,12 (9H, ferrocène).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 27,6 (2 CH₃); 30,2 (CH₂); 46,0 (CH₂NH); 51,5 (C(CH₃)₂); 67,7 (2C, C₅H₄); 68,4 (2C, C₅H₄); 68,7 (C₅H₅); 85,7 (C_{ipso}, C₅H₄); 122,9 (CN).

MS (m/z; EI) : 296 [M⁺].

Analyse élémentaire calculée (%) pour C₁₆H₂₀FeN₂ : C 64,88, H 6,81, N 9,46 ; trouvée : C 64,92, H 6,91, N 8,83.

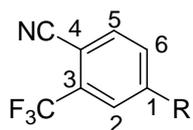
Synthèse du 4-cyano-3-trifluorométhyl-aniline¹¹⁹ : Un mélange de 4-bromo-3-trifluorométhyl-aniline (6,000 g ; 25,0 mmol), de cyanure de cuivre CuCN (2,685 g ; 1,2 équivalents) et de DMF anhydre (4 mL) est agité à reflux pendant 2 h. Le mélange est versé dans une solution aqueuse de cyanure de sodium NaCN 30% (m/v) (75 mL). La solution est extraite à l'éther. La phase organique est lavée successivement avec une solution aqueuse de NaCN 10%, de l'eau et de l'eau salée. Elle est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée.

¹¹⁹ Jones T.R., Varney M.D., Webber S.E., Lewis K.K., Marzoni G.P., Palmer C.L., Kathardekar V., Welsh K.M., Webber S., Matthews D.A., Appelt K., Smith W.W., Janson C.A., Villafranca J.E., Bacquet R.J., Howland E.F., Booth C.L.J., Herrmann S.M., Ward R.W., White J., Moomaw E.W., Bartlett C.A., Morse C.A., *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 904.

Le produit brut (4,611 g) est purifié sur colonne (éluant : éther). Un solide blanc correspondant au produit attendu est obtenu (4,290 g ; 92,2%). R_f (éther) : 0,73. Mp : 142-143°C (littérature : 136-139°C¹¹⁹).

RMN ¹H (300 MHz, acétone-d₆) : δ = 6,10 (2H, s, NH₂), 6,97 (1H, dd, H₆, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 2,4 Hz), 7,13 (1H, d, H₂, ⁴J = 2,4 Hz), 7,62 (1H, d, H₅, ³J = 8,4 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, acétone-d₆) : δ = 95,0 (C₄); 112,2 (C₂); 116,9 (C₆); 117,6 (CN); 124,0 (q, CF₃, J = 271,2 Hz); 134,2 (q, C₃, J = 31,3 Hz); 137,2 (C₅); 153,7 (C₁).



R = NH₂ ; NCO

Synthèse du 4-cyano-3-trifluorométhyl-isocyanatobenzène (23)⁹² : Une solution de 4-cyano-3-trifluorométhyl-aniline (2,000 g ; 10,8 mmol) dans l'acétate d'éthyle distillé (15 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0°C à une solution de phosgène COCl₂ 20% (m/v) dans le toluène (7 mL ; 13,0 mmol). Le montage de la réaction comprend un dispositif contenant une solution aqueuse de soude 20% qui a pour fonction de neutraliser l'acide chlorhydrique formé lors de cette réaction. L'addition dure 15 minutes et le mélange réactionnel est agité pendant 30 minutes à 0°C. Le mélange est porté à température ambiante, puis chauffé à reflux de l'acétate d'éthyle. Une partie de l'acétate d'éthyle est distillée et est remplacée par du toluène distillé (20 mL). La distillation continue jusqu'au dégagement total d'acide. Il se forme un précipité qui est filtré et le filtrat est évaporé sous vide. Une huile orange correspondant au produit **23** est obtenue (2,270 g ; 99,6%).

IR (ν_{\max} ; dichlorométhane) : 2268 (NCO), 2233 (CN) cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7,39 (1H, dd, H₆, ³J = 8,3 Hz, ⁴J = 2,2 Hz), 7,50 (1H, d, H₂, ⁴J = 2,2 Hz), 7,82 (1H, d, H₅, ³J = 8,3 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 107,1 (C₄); 114,9 (CN); 121,7 (q, CF₃, J = 265,3 Hz); 123,4 (C₂); 126,3 (NCO); 128,4 (C₆); 134,2 (q, C₃); 136,3 (C₅); 138,7 (C₁).

Synthèse du 4-(4',4'-diméthyl-3'-ferrocénylméthyl-5'-imino-2'-oxo-1'-imidazolidinyl)-2-trifluorométhyl-benzonitrile (24) : Une solution d'isocyanate **23** (1,348 g ; 1 équivalent)

¹¹⁹ Jones T.R., Varney M.D., Webber S.E., Lewis K.K., Marzoni G.P., Palmer C.L., Kathardekar V., Welsh K.M., Webber S., Matthews D.A., Appelt K., Smith W.W., Janson C.A., Villafranca J.E., Bacquet R.J., Howland E.F., Booth C.L.J., Herrmann S.M., Ward R.W., White J., Moomaw E.W., Bartlett C.A., Morse C.A., *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 904.

⁹² Battmann T., Bonfils A., Branche C., Humbert J., Goubet F., Teutsch G., Philibert D., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1994**, 48, 55.

dans le 1,2-dichloroéthane (50 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0°C à une solution contenant le produit **19** (1,793 g ; 6,35 mmol) dissout dans le 1,2-dichloroéthane (30 mL) et de la triéthylamine (0,600 mL). Le mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 2 h. La solution revient à température ambiante, puis le 1,2-dichloroéthane est évaporé sous vide. Le résidu obtenu (3,912 g) est purifié sur colonne (éluant : éther). Une fraction correspondant au produit **24** (1,058 g ; 33,7%) est recristallisée dans dichlorométhane/hexane pour donner un solide jaune orangé. R_f (éther) : 0,33. Mp : 220°C.

IR (KBr) : 3281 (NH), 2229 (CN), 1723 (CO), 1661 (imine) cm^{-1} .

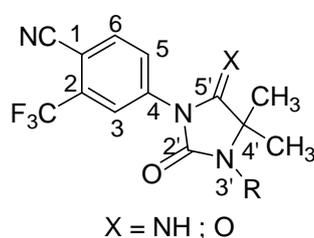
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 1,42 (6H, s, 2 CH_3), 4,15 (2H, t, C_5H_4 , H_β , $J = 1,8$ Hz), 4,19 (5H, s, C_5H_5), 4,31 (2H, t, C_5H_4 , H_α , $J = 1,8$ Hz), 4,38 (2H, s, CH_2N), 7,42 (1H, s, NH), 7,92 (1H, d, H_6), 8,08 (1H, dd, H_5), 8,24 (1H, d, H_3).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 25,6 (2 CH_3); 39,7 (CH_2N); 61,1 (C_4'); 68,6 (2C, C_5H_4); 68,9 (C_5H_5); 69,9 (2C, C_5H_4); 83,3 (C_{ipso} , C_5H_4); 124,3 (C_3); 129,1 (C_5); 135,0 (C_6); 153,2 (C_2'); 168,3 (C_5').

MS (m/z ; EI) : 494 [M^+].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 80/20 ; Temps de rétention = 6,04 min ; Pureté = 100%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{FeN}_4\text{O}$: C 58,32, H 4,28, N 11,33 ; trouvée : C 57,79, H 4,29, N 11,41.



Synthèse du 4-(4',4'-diméthyl-3'-ferrocényléthyl-5'-imino-2'-oxo-1'-imidazolidinyl)-2-trifluorométhyl-benzonitrile (25) : Une solution d'isocyanate **23** (0,716 g ; 1 équivalent) dans le 1,2-dichloroéthane (50 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0°C à une solution contenant le produit **22** (1,000 g ; 3,38 mmol) dissout dans le 1,2-dichloroéthane (30 mL) et de la triéthylamine (0,300 mL). Le mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 2 h. La solution revient à température ambiante, puis le 1,2-dichloroéthane est évaporé sous vide. Le résidu obtenu (1,914 g) est purifié sur colonne (éluant : éther). Une fraction correspondant au produit **25** (0,857 g ; 50,0%) est recristallisée dans dichlorométhane/hexane pour donner un solide jaune orangé. R_f (éther) : 0,46. Mp : 210°C.

IR (KBr) : 3283 (NH), 2234 (CN), 1725 (CO), 1662 (imine) cm^{-1} .

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 1,42 (6H, s, 2 CH₃), 2,76 (2H, m, CH₂), 3,40 (2H, m, CH₂N), 4,10 (4H, s, C₅H₄), 4,14 (5H, s, C₅H₅), 7,42 (1H, s, NH), 7,92 (1H, d, H₆), 8,08 (1H, dd, H₅), 8,24 (1H, d, H₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 25,4 (2 CH₃); 29,5 (CH₂); 41,9 (CH₂N); 61,4 (C₄'); 67,9 (2C, C₅H₄); 68,4 (2C, C₅H₄); 68,8 (C₅H₅); 84,7 (C_{ipso}, C₅H₄); 124,4 (C₃); 129,3 (C₅); 135,3 (C₆); 153,4 (C₂'); 168,3 (C₅').

MS (*m/z*; EI) : 508 [M⁺].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = CH₃CN/H₂O 80/20 ; Temps de rétention = 7,29 min ; Pureté = 98,51%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour C₂₅H₂₃F₃FeN₄O : C 59,07, H 4,56, N 11,02 ; trouvée : C 58,81, H 4,63, N 10,78.

Synthèse du 4-(4',4'-diméthyl-2',5'-dioxo-3'-ferrocénylméthyl-1'-imidazolidinyl)-2-trifluorométhyl-benzonitrile (26) : Une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 2 N (3,2 mL) est ajoutée à une solution d'imine **24** (0,391 g ; 0,791 mmol) dans le méthanol (20 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à reflux. Il est ensuite refroidi à température ambiante et il est versé dans l'eau froide (100 mL). Le mélange est extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Un solide jaune orangé correspondant au produit **26** est obtenu (0,315 g ; 80,4%). Il est recristallisé dans acétate d'éthyle/hexane. R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2) : 0,62. Mp : 173-174°C.

IR (KBr) : 2230 (CN), 1777 et 1716 (2 CO) cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 1,44 (6H, s, 2 CH₃), 4,17 (2H, t, C₅H₄, H_β, J = 1,8 Hz), 4,19 (5H, s, C₅H₅), 4,32 (2H, t, C₅H₄, H_α, J = 1,8 Hz), 4,41 (2H, s, CH₂N), 7,89 (1H, d, H₆, ³J = 8,7 Hz), 7,98 (1H, dd, H₅, ³J = 8,7 Hz, ⁴J = 1,8 Hz), 8,14 (1H, d, H₃, ⁴J = 1,8 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 23,7 (2 CH₃); 39,8 (CH₂N); 61,9 (C₄'); 68,8 (2C, C₅H₄); 68,9 (C₅H₅); 70,0 (2C, C₅H₄); 82,7 (C_{ipso}, C₅H₄); 115,2 (CN); 123,1 (C₃); 128,0 (C₅); 134,0 (q, C₂); 135,3 (C₆); 136,5 (C₄); 152,7 (C₂'); 174,8 (C₅').

MS (*m/z*; EI) : 495 [M⁺].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = CH₃CN/H₂O 80/20 ; Temps de rétention = 8,29 min ; Pureté = 99,40%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour C₂₄H₂₀F₃FeN₃O₂ : C 58,20, H 4,07, N 8,48 ; trouvée : C 58,16, H 4,11, N 8,51.

Synthèse du 4-(4',4'-diméthyl-2',5'-dioxo-3'-ferrocényléthyl-1'-imidazolidinyl)-2-trifluorométhyl-benzonitrile (27) : Une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 2 N (3,2

mL) est ajoutée à une solution d'imine **25** (0,620 g ; 1,22 mmol) dans le méthanol (40 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 h à reflux. Il est ensuite refroidi à température ambiante et il est versé dans l'eau froide (100 mL). Le mélange est extrait avec l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le produit brut (0,668 g) est purifié sur colonne (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:1). Un solide jaune correspondant au produit **27** est obtenu (0,552 g ; 88,9%). Il est recristallisé dans acétate d'éthyle/hexane. R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2) : 0,66. Mp : 140-142°C.

IR (KBr) : 2230 (CN), 1777 et 1720 (2 CO) cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 1,43 (6H, s, 2 CH₃), 2,79 (2H, m, CH₂), 3,44 (2H, m, CH₂N), 4,11 (4H, s, C₅H₄), 4,15 (5H, s, C₅H₅), 7,92 (1H, d, H₆, ³J = 8,4 Hz), 8,02 (1H, dd, H₅, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 1,8 Hz), 8,17 (1H, d, H₃, ⁴J = 1,8 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 23,5 (2 CH₃); 29,3 (CH₂); 41,9 (CH₂N); 62,0 (C4'); 67,9 (2C, C₅H₄); 68,3 (2C, C₅H₄); 68,8 (C₅H₅); 84,4 (C_{ipso}, C₅H₄); 108,3 (C1); 115,1 (CN); 123,0 (C3); 127,9 (C5); 134,0 (q, C2); 135,3 (C6); 136,6 (C4); 152,8 (C2'); 174,7 (C5').

MS (m/z; EI) : 509 [M⁺].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = CH₃CN/H₂O 80/20 ; Temps de rétention = 9,65 min ; Pureté = 100%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour C₂₅H₂₂F₃FeN₃O₂ : C 58,96, H 4,35, N 8,25 ; trouvée : C 58,76, H 4,39, N 8,26.

Synthèse du 4'-ferrocényl-2',5'-imidazolidinedione (28**)**¹³⁸ : D'une part, une solution 1 contenant du cyanure de potassium KCN (1,369 g ; 4,5 équivalents) et du carbonate d'ammonium (NH₄)₂CO₃ (4,040 g ; 9 équivalents) dans un mélange eau (25 mL) / éthanol absolu (5 mL) est préparée. D'autre part, une solution de ferrocèncarboxaldéhyde (1,000 g ; 4,67 mmol) dans l'éthanol absolu (25 mL) est ajoutée à une solution de bisulfite de sodium NaHSO₃ (0,972 g ; 2 équivalents) dans l'eau (20 mL). Ce mélange constitue la solution 2. Cette solution est rapidement ajoutée à la solution 1. Le mélange réactionnel est agité à 60°C pendant 2 h, refroidi à température ambiante et l'éthanol absolu est évaporé sous vide. Le précipité obtenu est filtré et lavé à l'éther. Un solide jaune foncé correspondant au produit **28** est obtenu (0,517 g ; 39,0%). R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:1) : 0,16. Mp : 252-254°C (littérature : 250-252°C¹⁴⁴).

IR (KBr) : 3407 et 3203 (2 NH), 1775 et 1724 (2 CO) cm⁻¹.

¹³⁸ Graham P.J., Lindsey R.V., Parshall G.W., Peterson M.L., Whitman G.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 3416.

¹⁴⁴ Loev B., Flores M., *J. Org. Chem.*, **1961**, 26, 3595.

RMN ¹H (300 MHz, acétone-d₆) : δ = 4,25 (5H, s, C₅H₅), 4,28 (2H, t, C₅H₄, J = 1,2 Hz), 4,47 (1H, t, C₅H₄, J = 1,2 Hz), 4,50 (1H, t, C₅H₄, J = 1,2 Hz), 5,85 (1H, s, H4'), 7,79 (1H, s, NH), 9,57 (1H, s, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) : δ = 56,7 (C4'); 65,3 (1C, C₅H₄); 66,5 (1C, C₅H₄); 67,7 (1C, C₅H₄); 69,0 (C₅H₅); 69,1 (1C, C₅H₄); 84,1 (C_{ipso}, C₅H₄); 157,4 (C2'); 173,5 (C5').

Synthèse du 4'-ferrocényl-1',4'-[bis-(2-trifluorométhyl-1-cyano-phényl)]-2',5'-imidazolidinedione (29) : Une solution de 4'-ferrocényl-2',5'-imidazolidinedione **28** (1,126 g ; 1,5 équivalents) dans le DMF anhydre (35 mL) et le carbonate de potassium K₂CO₃ (0,548 g ; 1,5 équivalents) sont ajoutés à une solution de 4-fluoro-2-trifluorométhyl-benzonitrile (0,500 g ; 2,64 mmol) dans le DMF anhydre (5 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 4 h à 80°C. Le mélange est ensuite dilué dans l'acétate d'éthyle et est filtré sur célite. Le filtrat est évaporé pour donner un produit brut (1,550 g) qui est purifié sur colonne (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2, puis 1:1). Un solide jaune orangé correspondant au produit **29** (0,643 g ; 39,1%) est obtenu. Il est purifié par HPLC (éluant : CH₂CN/H₂O 80:20), puis cristallisé dans l'éther. R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2) : 0,33. Mp : 200-202°C.

IR (KBr) : 3309 (NH), 2238 (CN), 1792 et 1739 (2 CO) cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, acétone-d₆) : δ = 4,23 (5H, s, C₅H₅), 4,40-4,42 (3H, m, C₅H₄), 4,77 (1H, m, C₅H₄), 8,14 (3H, m, H3, H5 et H6), 8,32 (3H, m, H3, H5 et H6), 9,21 (1H, s, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, acétone-d₆) : δ = 66,6 (C4'); 67,7 (2C, C₅H₄); 69,6 (C₅H₅); 70,3 (2C, C₅H₄); 90,5 (C_{ipso}, C₅H₄); 108,8 et 110,3 (2 C1); 115,6 (CN); 123,2 et 123,3 (q, 2 CF₃, J = 271,6 Hz); 124,1 et 125,2 (2 C3); 129,8 et 131,8 (2 C5); 132,4 et 133,1 (q, 2 C2, J = 32,7 Hz); 136,2 et 136,9 (2 C6); 137,3 et 145,9 (2 C4); 154,3 (C2'); 170,6 (C5').

MS (m/z; EI) : 622 [M⁺].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = CH₃CN/H₂O 80/20 ; Temps de rétention = 7,04 min ; Pureté = 99,90%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour C₂₉H₁₆F₆FeN₄O₂ : C 55,97, H 2,59, N 9,00 ; trouvée : C 56,02, H 2,93, N 8,67.

Synthèse du 4'-phényl-2',5'-imidazolidinedione (30)¹⁴⁵ : Une solution de benzaldéhyde (0,960 mL ; 1,000 g ; 9,42 mmol) dans l'éthanol (20 mL) est ajoutée à une solution contenant du cyanure de potassium KCN (0,736 g ; 1,2 équivalents) et du carbonate d'ammonium (NH₄)₂CO₃ (4,527 g ; 5 équivalents) dans l'eau (25 mL). Le mélange réactionnel est agité à 60°C pendant 3 h, puis à reflux pendant 2 h, pour éliminer l'excès de carbonate d'ammonium.

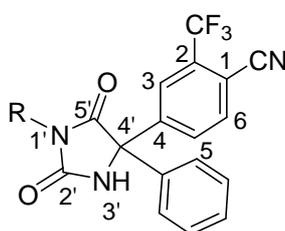
¹⁴⁵ Garcia M.J., Azerad R., *Tetrahedron Asymmetry*, **1997**, 8, 85.

Le mélange est refroidi à température ambiante, puis à 0°C. De l'acide chlorhydrique concentré est ajouté à la solution jusqu'à obtention d'un pH acide (2-3). Un précipité blanc est obtenu. Il est filtré, lavé à l'eau et séché. Le solide blanc correspond au produit **30** (1,455 g ; 87,7%). R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:1) : 0,22. Mp : 179-180°C (littérature : 179-180°C¹⁴⁶).

IR (KBr) : 3438 et 3307 (2 NH), 1753 et 1721 (2 CO) cm^{-1} .

RMN ¹H (300 MHz, DMSO- d_6) : δ = 5,14 (1H, s, H4'), 7,30-7,42 (5H, m, C₆H₅), 8,37 (1H, s, NH), 10,76 (1H, s, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO- d_6) : δ = 61,2 (C4'); 126,7 (2C, C₆H₅); 128,3 (1C, C₆H₅); 128,7 (2C, C₆H₅); 136,1 (C_{ipso}, C₆H₅); 157,6 (C2'); 174,2 (C5').



Synthèse du 4'-phényl-1',4'-[bis-(2-trifluorométhyl-1-cyano-phényl)]-2',5'-imidazolidinedione (31) et du 4'-phényl-4'-(2-trifluorométhyl-1-cyano-phényl)-2',5'-imidazolidinedione (32) : Une solution de 4'-phényl-2',5'-imidazolidinedione **30** (0,500 g ; 2,84 mmol) dans le DMF anhydre (10 mL) est ajoutée doucement à une suspension d'hydrure de sodium NaH (0,295 g ; 2 équivalents) dans le DMF anhydre (10 mL). Le mélange réactionnel est d'abord agité à température ambiante, jusqu'à ce que H₂ s'évapore totalement, puis à 60°C pendant 2 h. Il est refroidi à température ambiante et une solution de 4-fluoro-2-trifluorométhyl-benzonitrile (1,074 g ; 2 équivalents) dans le DMF anhydre (5 mL) est ajoutée par petites portions au mélange. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante, puis à reflux pendant 3 h. Il est refroidi à température ambiante et est extrait avec l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée pour donner une huile jaune orangée (2,877 g) qui est purifiée sur colonne (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2, puis 1:1, puis acétate d'éthyle). Quatre fractions sont obtenues.

Une première fraction correspond au 4-fluoro-2-trifluorométhyl-benzonitrile (0,150 g ; 14,0%). Le solide jaune clair est recristallisé dans dichlorométhane/hexane pour donner un solide blanc. R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:1) : 0,88. Mp : 160-161°C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7,31 (1H, dd, H5, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 2,4 Hz), 7,48 (1H, d, H3, ⁴J = 2,4 Hz), 7,91 (1H, d, H6, ³J = 8,4 Hz).

¹⁴⁶ Gramain J.C., Remuson R., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1982**, 2341.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 106,4 (C1); 114,8 (CN); 118,1 (C3); 121,8 (q, CF_3 , J = 272,6 Hz); 122,2 (C5); 135,9 (q, C2, J = 33,4 Hz); 137,4 (C6); 158,5 (C4).

Une deuxième fraction est une huile jaune correspondant au produit **31** (0,440 g ; 30,1%). Elle est cristallisée dans éther/pentane pour donner un solide blanc. R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2) : 0,25. Mp : 122-125°C.

IR (KBr) : 2231 (CN), 1784 et 1733 (2 CO) cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 7,35-7,46 (5H, m, C_6H_5), 7,89 (1H, d, H6, 3J = 8,4 Hz), 7,93 (1H, d, H6, 3J = 8,4 Hz), 7,98 (2H, dd, 2 H5, 3J = 8,4 Hz, 4J = 1,8 Hz), 8,04 (1H, s, H3), 8,11 (1H, d, H3, 4J = 1,8 Hz), 8,72 (1H, s, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 69,4 (C4'); 109,2 et 110,7 (2 C1); 114,9 (CN); 123,4 et 125,3 (2 C3); 126,5 (2C, C_6H_5); 128,4 (1C, C_6H_5); 129,7 (2C, C_6H_5); 129,8 et 131,1 (2 C5); 133,8 (q, C2); 135,3 et 135,6 (2 C6); 135,8 (C_{ipso} , C_6H_5); 137,8 et 144,1 (2 C4); 153,4 (C2'); 170,4 (C5').

MS (m/z ; ESI en mode négatif) : 513 ([M-H]).

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 70/30 ; Temps de rétention = 8,50 min ; Pureté = 100%.

Une troisième fraction est un solide jaune clair correspondant au produit **32** (0,305 g ; 31,2%). Il est recristallisé dans dichlorométhane/hexane pour donner un solide blanc. R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:1) : 0,41. Mp : 220-221°C.

IR (KBr) : 3190 (NH), 2235 (CN), 1784 et 1729 (2 CO) cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, acétone- d_6) : δ = 7,37-7,47 (5H, m, C_6H_5), 8,07 (2H, m, H5 et H6), 8,18 (1H, m, H3), 8,46 (1H, s, NH), >10,00 (1H, s, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, acétone- d_6) : δ = 126,3 (C3); 127,7 (2C, C_6H_5); 129,8 (1C, C_6H_5); 130,0 (2C, C_6H_5); 132,6 (C5) ; 136,5 (C6); 140,3 (C_{ipso} , C_6H_5); 155,9 (C2'); 174,0 (C5').

MS (m/z ; ESI en mode négatif) : 344 ([M-H]).

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 70/30 ; Temps de rétention = 3,26 min ; Pureté = 94,88%.

Une dernière fraction correspond au produit **30** (0,102 g ; 20,4%). R_f (acétate d'éthyle / éther de pétrole 1:1) : 0,24. Mp : 180-182°C.

Chapitre 4 : Synthèse de dérivés ferrocéniques d'anti-androgènes contenant un ferrocène disubstitué

SOMMAIRE

I.	Introduction.....	103
II.	Synthèse de l'analogue ferrocénique 1,2-disubstitué de la nilutamide.....	105
II.1.	Généralités sur les ferrocènes 1,2-disubstitués.....	105
II.2.	Stratégie de synthèse du composé 43	105
II.2.a.	Stratégie générale.....	105
II.2.b.	Choix du groupe protecteur X.....	106
II.2.c.	Choix du groupe ortho directeur.....	107
II.3.	Les étapes de la synthèse.....	107
II.3.a.	Synthèse du 1,2-diformylferrocène 36	107
II.3.b.	Synthèse du dérivé tosylate 39	109
II.3.c.	Fin de la synthèse.....	109
II.3.d.	Structure cristallographique du composé 43	111
III.	Résultats des tests biochimiques.....	111
III.1.	Tests RBA.....	111
III.1.a.	Résultats.....	111
III.1.b.	Interprétation des résultats.....	112
III.2.	Tests d'activité anti-proliférative sur les cellules PC3.....	113
III.3.	Résultats des calculs d'IC50.....	115
III.4.	Conclusion.....	115

IV.	Synthèse d'un analogue ferrocénique 1,2-disubstitué des carboranes.....	116
IV.1.	Introduction.....	116
IV.2.	Stratégie de synthèse.....	117
IV.3.	Les étapes de la synthèse.....	117
IV.3.a.	Réaction de couplage de Stille.....	117
IV.3.b.	Réaction de couplage d'Ei-ichi Negishi.....	119
IV.3.c.	Fin de la synthèse.....	121
V.	Conclusion.....	121
VI.	Partie expérimentale.....	123

I. Introduction

Le chapitre précédent a permis de réaliser la synthèse des premiers analogues ferrocéniques de la nilutamide. Les composés **26** et **29** (Figure 33), ont présenté des résultats remarquables au niveau des tests biologiques. En effet, la molécule **26** a montré une affinité de liaison à AR meilleure que la nilutamide et aussi une meilleure activité anti-tumorale *in vitro*. De son côté, la molécule **29** a montré des propriétés cytotoxiques intéressantes envers des cellules PC3. Toutefois, il se lie à AR avec une affinité équivalente à celle de la nilutamide, ce qui suppose que la poche hydrophobe de AR serait suffisamment grande pour tolérer la présence de deux substituants encombrants et hydrophobes. En comparaison, la molécule **26**, qui comprend une chaîne latérale N-ferrocénylalkyle hydrophobe et un groupement diméthyle peu encombrant, présente une meilleure RBA, ce qui démontre l'importance de cette chaîne latérale pour améliorer la reconnaissance de AR. Par conséquent, le composé **26** serait un point de départ intéressant pour développer de nouvelles molécules potentiellement actives contre le cancer de la prostate.

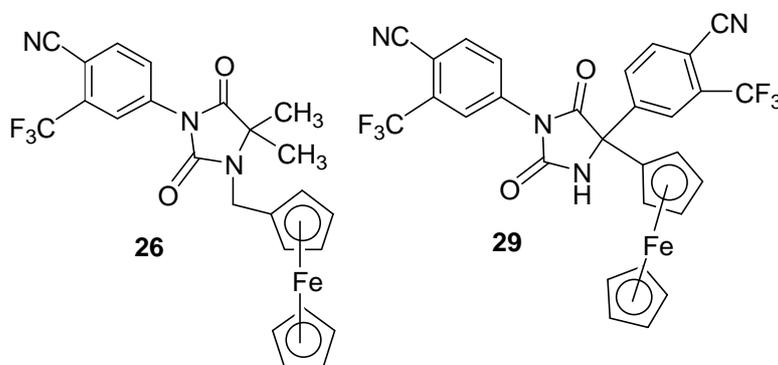


Figure 33 : Analogues ferrocéniques de la nilutamide

En outre, dans le chapitre précédent, a été évoquée la possibilité d'incorporer une large gamme de substituants au niveau du NH libre de la nilutamide. Des études antérieures effectuées sur des analogues organiques de la nilutamide ont ainsi prouvé qu'un grand nombre de substituants en cette position a pu aboutir à une amélioration conséquente de la valeur de RBA. Les exemples les plus marquants sont des analogues comprenant une chaîne N-hydroxyalkyle (molécule RU58841^{92, 93}) et N-cyanométhyle (molécule RU58642¹⁴²) (Figure 34). En effet, ces deux molécules, non seulement reconnaissent AR avec des valeurs de RBA importantes, mais aussi elles présentent des activités anti-tumorales prometteuses lors d'études biochimiques *in vitro* et *in vivo*. D'autre part, le cas du composé RU58841 a été mentionné dans le premier chapitre. Il est intéressant, dans la mesure où il a été développé pour traiter des maladies cutanées, telles que l'acné, l'hirsutisme et l'alopecie.⁹²

⁹² Battmann T., Bonfils A., Branche C., Humbert J., Goubet F., Teutsch G., Philibert D., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1994**, 48, 55.

⁹³ Van Dort M.E., Jung Y.W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 1045.

¹⁴² Battmann T., Branche C., Bouchoux F., Cerede E., Philibert D., Goubet F., Teutsch G., Gaillard-Kelly M., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1998**, 64, 103.

Par conséquent, un des objectifs de ce chapitre est de combiner ces études à celles qui ont été effectuées lors du chapitre précédent. La synthèse d'un analogue N-ferrocénylméthyl de la nilutamide **43** comprenant un ferrocène 1,2-disubstitué a été ainsi envisagée dans une première partie (Figure 34). Comme la molécule **26**, le ferrocène est incorporé au niveau de la chaîne N-alkyle, mais comprend en plus une fonction alcool en position 2. Elle a été introduite pour vérifier si elle exerce une influence au niveau de l'affinité de liaison à AR et au niveau de l'activité anti-tumorale vis-à-vis de cellules cancéreuses. La synthèse de cet analogue a donc été réalisée et les tests biochimiques *in vitro* ont été effectués.

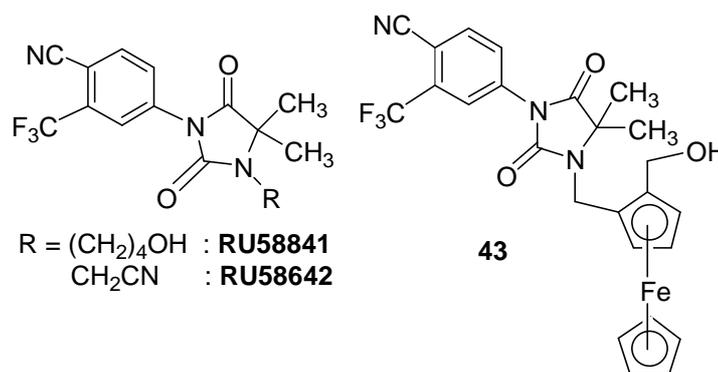


Figure 34 : Objectif de synthèse. Produit 1,2-disubstitué **43**

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à une classe d'anti-androgènes non stéroïdiens récemment découverte. Elle correspond à une série de dérivés, contenant un dicarba-*closo*-dodécaborane (ou *p*-carborane) à la place du squelette stéroïdien (Figure 35). Les carboranes sont des amas de bore polyédraux, tels une cage, contenant deux atomes de carbone. Ils ont des propriétés remarquables, telles une géométrie sphérique, une grande stabilité thermique et chimique et une surface moléculaire hydrophobe.^{101, 102} Toutes ces caractéristiques permettent leur application en tant que nouvelle structure hydrophobe dans des molécules biologiquement actives. Des tests d'affinité de liaison à AR et des études anti-prolifératives ont été effectués sur plusieurs dérivés carboranes. Il a été montré que les valeurs optimales de RBA sur AR ont été relevées pour des carboranes contenant un noyau aromatique, avec un groupe CN ou NO₂ en position *mé*ta, et une chaîne hydroxyméthyle. De plus, ces composés possèdent une activité anti-androgénique très intéressante, environ 10 fois supérieure à celle du 2-hydroxyflutamide.¹⁰⁴

Par conséquent, la synthèse d'un analogue ferrocénique des carboranes, dans lequel la cage carborane a été substituée par le ferrocène, a été envisagée. Cet analogue comprend un groupe hydroxyméthyle et un groupe *mé*ta-nitrophényle substitués sur le ferrocène en position 1,2 (Figure 35). Il a été synthétisé en série racémique.

¹⁰¹ Yamamoto K., Endo Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 2389.

¹⁰² Endo Y., Yamamoto K., Kagechika H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 4089.

¹⁰⁴ Fujii S., Goto T., Ohta K., Hashimoto Y., Suzuki T., Ohta S., Endo Y., *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 4654.

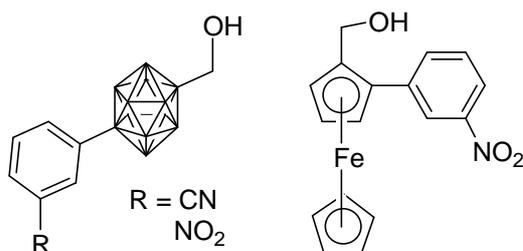
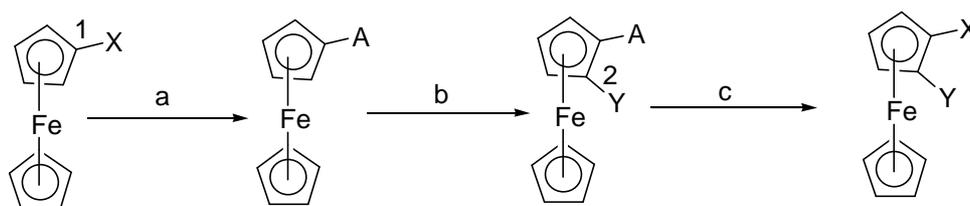


Figure 35 : Objectif de synthèse. Analogue ferrocénique 1,2-disubstitué des carboranes

II. Synthèse de l'analogue ferrocénique 1,2-disubstitué de la nilutamide

II.1. Généralités sur les ferrocènes 1,2-disubstitués

De nombreux exemples de ferrocènes 1,2 racémiques et énantiomériquement purs ont été reportés dans la littérature.^{13, 147-149} Ils sont obtenus en trois étapes (Schéma 20). Leur obtention nécessite la protection de la fonction X en position 1 par un groupe *ortho* directeur, suivie par une fonctionnalisation de la position 2 et par une déprotection de la fonction X. Par conséquent, cette stratégie de synthèse a été envisagée dans le but d'obtenir l'analogue ferrocénique **43** de la nilutamide.



- a) Protection de la fonction X par un groupe ortho-directeur A en position 1
 b) Introduction d'un groupe électrophile Y en position 2
 c) Déprotection de la fonction X

Schéma 20 : Synthèse générale de ferrocènes 1,2-disubstitués

II.2. Stratégie de synthèse du composé **43**

II.2.a. Stratégie générale

La stratégie générale de synthèse de l'analogue ferrocénique **43** est présentée sur le Schéma 21. Elle consiste en une réaction de substitution nucléophile entre la cyanonilutamide **40** et un mélange racémique d'un ferrocène 1,2-disubstitué **39**. La cyanonilutamide a été obtenue en

¹³ Ferber B., Top S., Vessières A., Welter R., Jaouen G., *Organometallics*, **2006**, 25, 5730.

¹⁴⁷ (a) Riant O., Samuel O., Kagan H.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 5835. (b) Riant O., Samuel O., Flessner T., Taudien S., Kagan H.B., *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 6733.

¹⁴⁸ Overman L.E., Donde Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 2933.

¹⁴⁹ Chiffre J., Coppel Y., Balavoine G.G.A., Daran J.C., Manoury E., *Organometallics*, **2002**, 21, 4552.

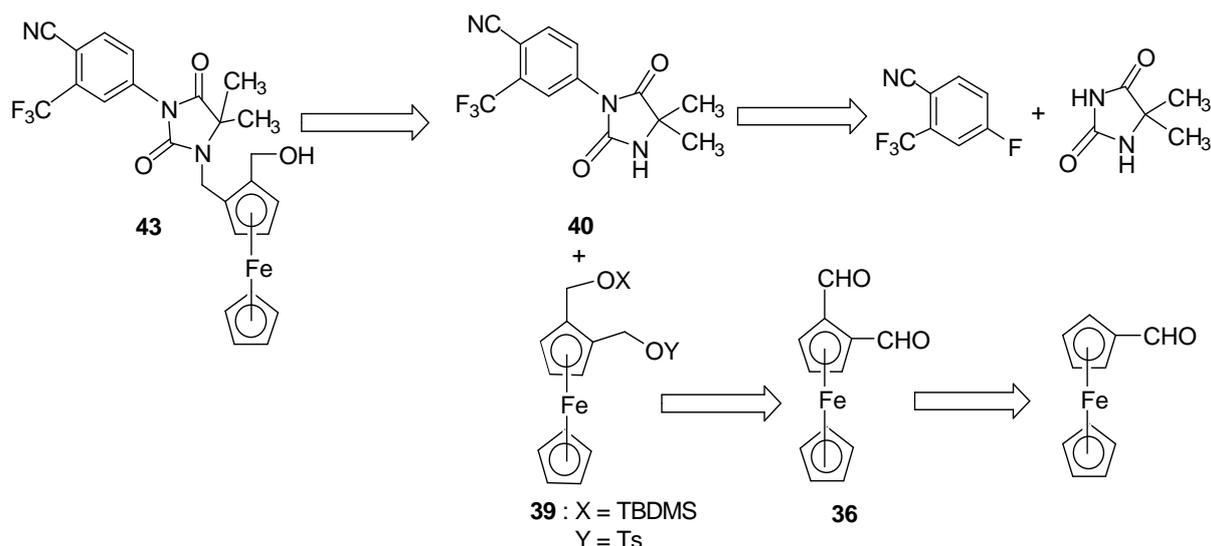


Schéma 21 : Stratégie de synthèse du composé 43

une étape à partir de deux produits commerciaux, le 5,5-diméthyl-hydantoïne et le 4-fluoro-2-trifluorométhyl-benzonitrile. Le ferrocène 1,2-disubstitué **39** a été obtenu à partir d'un composé, comprenant deux chaînes hydroxyméthyles, qui a été obtenu à partir du 1,2-diformyl-ferrocène. Les deux fonctions alcools doivent être protégées par deux groupes différents, un groupe protecteur X et un groupe activateur Y. Pour le groupe Y, le tosylo (Ts) a été choisi car, le groupe OTs est facile à synthétiser et, en plus, est un excellent groupe partant. Le 1,2-diformyl-ferrocène a été synthétisé à partir du ferrocèncarboxaldéhyde.

II.2.b. Choix du groupe protecteur X

Dans la partie précédente, il a été mentionné que le ferrocène 1,2-disubstitué avait deux fonctions alcools protégées. Une d'entre elles a été activée en tosylate (OTs) qui est un excellent groupe partant. L'autre alcool doit être protégé, en vue de la réaction de substitution nucléophile effectuée en milieu basique, par un groupe protecteur X. En effet, si cet alcool n'était pas protégé, alors une réaction de substitution nucléophile intramoléculaire entre l'alcool et le tosylate serait entrée en compétition avec la réaction souhaitée de substitution nucléophile intermoléculaire entre l'amine de la cyanonilutamide et le tosylate.

Il a fallu donc choisir un groupe protecteur X stable en milieu basique. Nous nous sommes tournés vers les dérivés silylés car ce sont d'excellents groupes protecteurs des alcools. En effet, ils permettent de former facilement des dérivés O-silylés stables en milieu basique, la liaison covalente Si-O étant suffisamment stable dans ce milieu. D'autre part, ils permettent



Schéma 22 : Protection d'un alcool par TBDMSCI

aussi une déprotection facile de l'alcool par clivage de la liaison Si-O. Ce clivage se fait suivant deux méthodes : l'utilisation de fluorures ou l'hydrolyse en milieu acide.

Dans cette synthèse, le groupe protecteur X choisi est le groupe *tert*-butyl-diméthyl-silyle (TBDMS). L'alcool est protégé par réaction avec le chlorure de *tert*-butyl-diméthyl-silyle (TBDMSCl). Ce groupe protecteur a été choisi car cette réaction de protection a été testée sur le ferrocénylméthanol avec un excellent rendement (90%) (Schéma 22).¹⁵⁰

II.2.c. Choix du groupe *ortho* directeur

Comme l'analogue ferrocénique **43** a été synthétisé en série racémique, la synthèse d'un mélange racémique de ferrocènes 1,2-disubstitués a donc été envisagée. Par conséquent, pour effectuer cette synthèse, le dioxane a été choisi. En effet, c'est un groupe protecteur des aldéhydes et des cétones qui joue aussi le rôle de groupe *ortho* directeur achiral. En outre, cette réaction de protection a déjà été effectuée avec d'excellents rendements¹⁵¹, aussi bien pour l'acétylferrocène (83%) que pour le ferrocèncarboxaldéhyde (88%). La réaction de protection du ferrocèncarboxaldéhyde a été effectuée, suivant les conditions décrites dans la littérature (conditions Dean Stark).¹⁵¹ L'acétal **33** a été obtenu avec un rendement correct (73%) (Schéma 23).

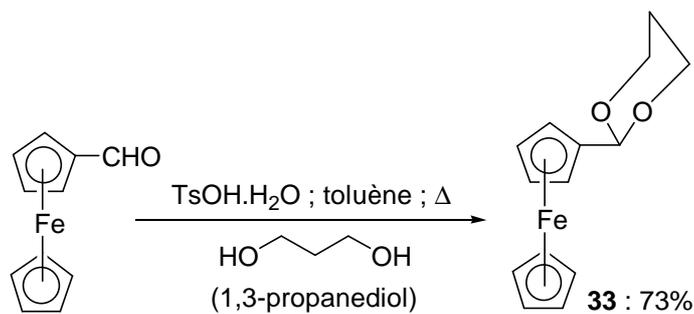


Schéma 23 : Synthèse du 2-ferrocényl-dioxane **33**

II.3. Les étapes de la synthèse

II.3.a. Synthèse du 1,2-diformylferrocène **36**

Cette synthèse a été effectuée en reprenant la stratégie générale d'obtention des ferrocènes 1,2-disubstitués (Schéma 20). Après obtention du 2-ferrocényl-dioxane **33** (Schéma 23), a été envisagée une réaction de lithiation, suivie par l'addition d'un électrophile en position 2. Cette réaction est présentée sur le Schéma 24. La question qui se pose est de savoir quelle base et quel électrophile vont être utilisés en vue de cette étape cruciale.

¹⁵⁰ Top S., Jaouen G., Vessières A., Abjean J.P., Davoust D., Rodger C.A., Sayer B.G., McGlinchey M.J., *Organometallics*, **1985**, 4, 2143.

¹⁵¹ Steffen W., Laskoski M., Collins G., Bunz U.H.F., *J. Organomet. Chem.*, **2001**, 630, 132.

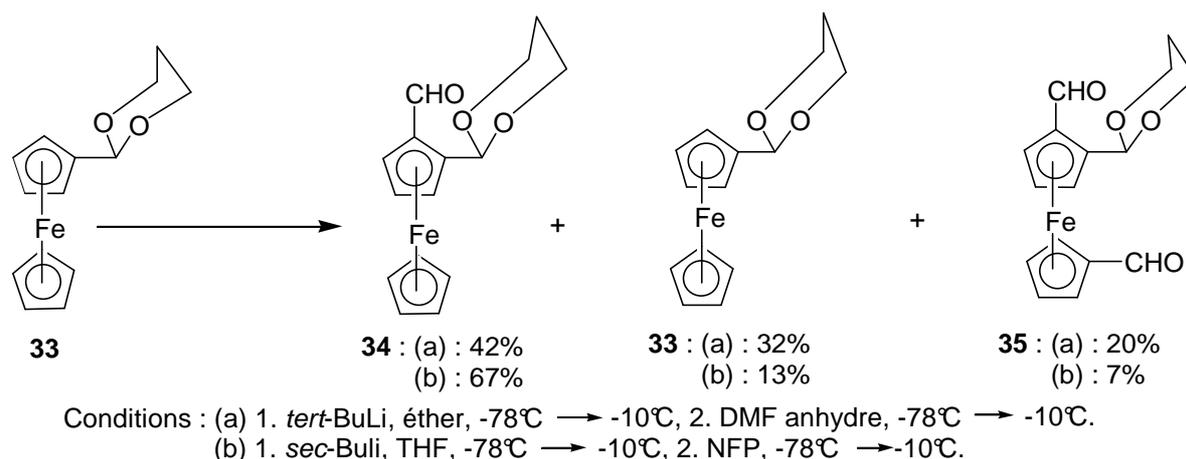


Schéma 24 : Réaction d'ortholithiation du 2-ferrocényl-dioxane 33

Dans un premier temps, on a décidé d'utiliser le *tert*-BuLi en tant que base et le N,N-diméthylformamide (DMF) en tant qu'agent électrophile.¹⁵² D'une part, la réaction de déprotonation en position 2 du composé par le *tert*-BuLi a été réalisée à très basse température (entre -78°C et -10°C). En effet, des études ont montré que cette réaction, lorsqu'elle a été réalisée aussi bien à 0°C qu'à température ambiante, résultait en une déprotection de l'acétal, partielle à 0°C, voire substantielle à température ambiante. Par conséquent, la température a été conservée en dessous de -10°C pour empêcher le clivage du cycle dioxane. D'autre part, cette réaction a généré la formation de deux espèces lithiées et il a été montré que la formation de l'espèce monolithiée souhaitée est favorisée à basse température (en dessous de -10°C), pour des temps de réaction longs (2 heures).¹⁵¹ Une fois la lithiation effectuée, le DMF a été ajouté en conservant la température en dessous de -10°C. Un mélange de trois produits, le 2-ferrocényl-dioxane **33**, le produit 1,2-disubstitué **34** et le sous-produit diformylé **35**, est obtenu avec des rendements de 32%, 42% et 20% respectivement. Cette réaction n'est pas totale et n'est pas très sélective vis-à-vis de la position *ortho*. Par conséquent, cette réaction doit être optimisée et les conditions réactionnelles doivent être changées. Or, il a été montré, dans la littérature, que le produit souhaité a été obtenu avec un très bon rendement (73%) en utilisant un dérivé lithié moins encombrant (*sec*-BuLi) en tant que base et un agent électrophile plus puissant, la N-formylpipéridine (NFP).¹⁵¹ Ces réactifs ont été utilisés en suivant le même protocole expérimental. Après optimisation de la réaction, les trois produits **33**, **34** et **35** sont obtenus avec des rendements de 13%, 67% et 7%.

La fin de la synthèse se caractérise par une réaction de déprotection du groupe *ortho* directeur acétal qui permet de régénérer la fonction aldéhyde. Cette réaction est présentée sur le Schéma 25 et correspond à une hydrolyse acide de l'acétal du composé **34**, en présence de l'acide *para*-toluènesulfonique (APTS).¹⁵¹ Dans ces conditions, le produit d'hydrolyse, le 1,2-diformylferrocène **36**, est obtenu avec un rendement de 57%.

¹⁵² Steffen W., Laskoski M., Morton J.G.M., Bunz U.H.F., *J. Organomet. Chem.*, **2004**, 689, 4345.

¹⁵¹ Steffen W., Laskoski M., Collins G., Bunz U.H.F., *J. Organomet. Chem.*, **2001**, 630, 132.

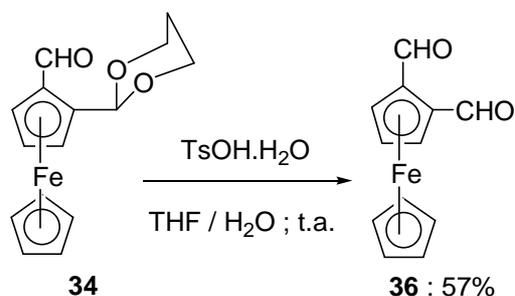


Schéma 25 : Synthèse du 1,2-diformylferrocène 36

II.3.b. Synthèse du dérivé tosylate 39

La suite de la synthèse est montrée sur le Schéma 26. Dans une première étape, les deux fonctions aldéhydes du 1,2-diformylferrocène **36** sont réduites, en présence de borohydrure de sodium NaBH_4 , en deux alcools primaires. Le composé **37** est obtenu avec un excellent rendement (95%).¹⁵³ La fin de la synthèse consiste en une série de réactions de protection des deux alcools du composé **37** par deux groupes différents. Dans un premier temps, l'un des alcools est protégé en un dérivé silylé **38**. Cette réaction est effectuée en présence de TBDMSCl, dans les conditions expérimentales identiques à celles proposées dans le Schéma 22. Le composé silylé est obtenu avec un bon rendement (70%). Dans un deuxième temps, l'alcool de la molécule **38** est activé en un tosylate **39**, en présence de chlorure de *para*-toluènesulfonyle (TsCl) et de pyridine anhydre, utilisée en tant que base et solvant.^{154, 155} Le produit obtenu est utilisé sans purification ultérieure et conservé à très basse température.

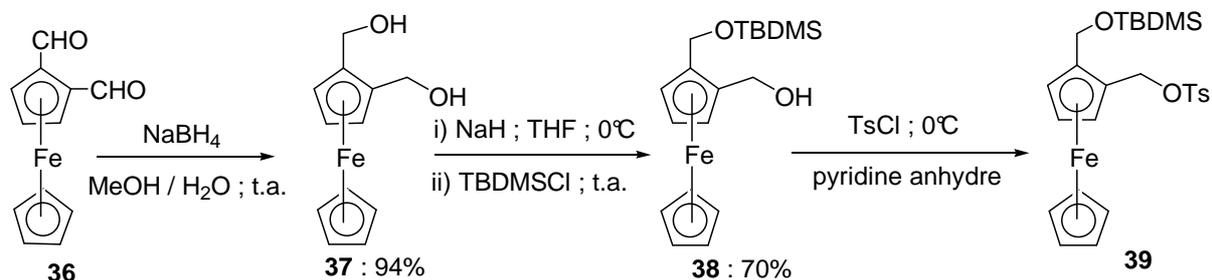


Schéma 26 : Synthèse du dérivé tosylate 39

II.3.c. Fin de la synthèse

Le tosylate (OTs) étant un excellent groupe partant, le composé **39** intervient dans une réaction de substitution nucléophile avec la cyanonilutamide **40**. Ce composé est synthétisé en une seule étape, suivant le Schéma 27.¹⁴³ Elle consiste en une réaction de couplage effectuée

¹⁵³ Marr G., Rockett B.W., Rushworth A., *J. Organomet. Chem.*, **1969**, 16, 141.

¹⁵⁴ Tipson J., *J. Org. Chem.*, **1944**, 9, 239.

¹⁵⁵ Kochi J.K., Hammond G.S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 3443.

¹⁴³ Cogan P.S., Koch T.H., *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 5258.

en milieu basique entre le 5,5-diméthylhydantoïne et le 4-fluoro-2-trifluorométhylbenzonitrile. La cyanonilutamide **40** a été obtenue avec un rendement moyen (51%).

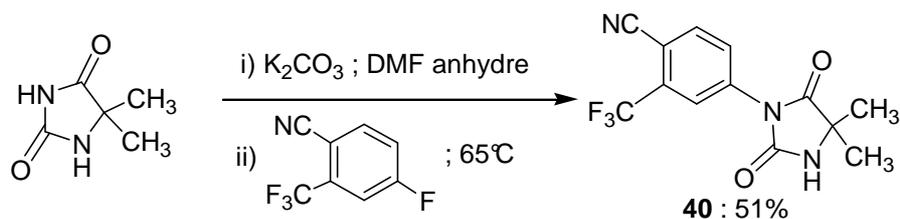


Schéma 27 : Synthèse de la cyanonilutamide 40

La fin de la synthèse est présentée sur le Schéma 28. Elle comporte une étape clé qui est la réaction de substitution nucléophile réalisée en milieu basique (NaH dans le DMF anhydre⁹²) entre la cyanonilutamide **40** et la molécule **39**. Un analogue ferrocénique silylé de la nilutamide **41** est obtenu avec un faible rendement compris autour de 30%.

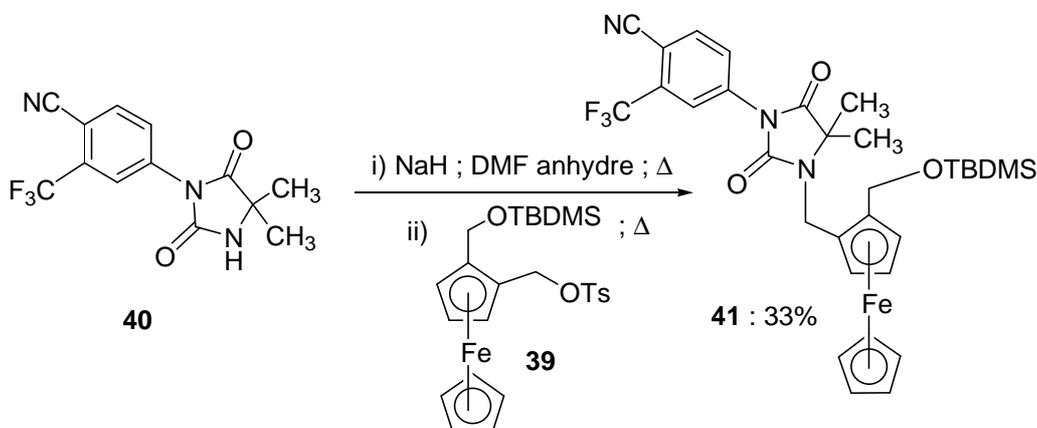
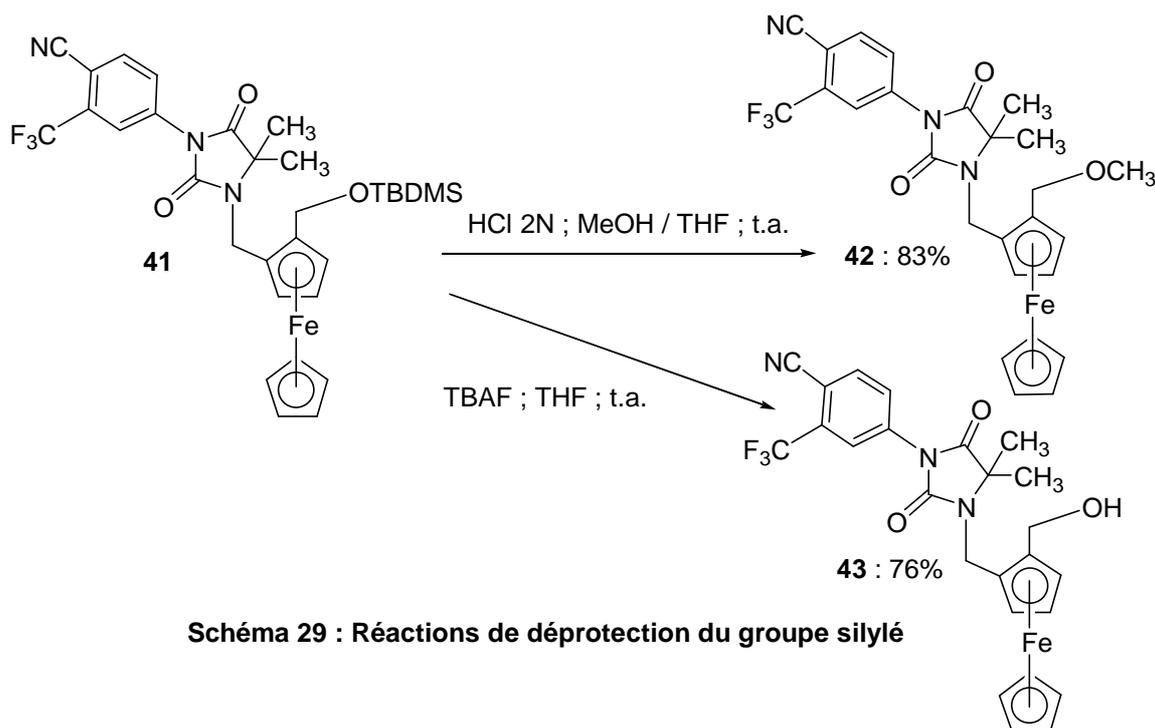


Schéma 28 : Synthèse du dérivé silylé 41

La dernière étape de la synthèse consiste en une réaction de déprotection de l'alcool par clivage du groupe silylé du dérivé **41** (Schéma 29). La méthode employée pour enlever le groupe silylé est une hydrolyse en milieu acide⁹² effectuée dans un mélange méthanol/THF. Un produit **42** est obtenu ; cependant ce composé ne correspond pas à l'alcool attendu. En effet, il s'est formé un analogue méthoxy qui a pu être isolé et purifié. Cette molécule a été obtenue avec un très bon rendement (83%). Comme l'hydrolyse acide n'a pas donné l'alcool souhaité, on a décidé de changer de méthode de déprotection des dérivés silylés. Or, une méthode employée pour enlever les groupes silylés est l'utilisation du fluorure de tétrabutylammonium (TBAF). Cette réaction a été reprise avec le TBAF et a permis d'obtenir l'alcool **43** avec un bon rendement (76%).

⁹² Battmann T., Bonfils A., Branche C., Humbert J., Goubet F., Teutsch G., Philibert D., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1994**, 48, 55.



II.3.d. Structure cristallographique du composé **43**

La structure cristallographique de la molécule **43** a été déterminée par rayons X dans le laboratoire du Professeur M. J. McGlinchey de l'Université de Dublin. Elle est présentée sur la Figure 36 (page suivante) sous la forme de deux molécules dans la maille et correspond au composé dont la synthèse a été envisagée. Les données cristallographiques de cette molécule sont indiquées en annexe. On observe la présence d'une liaison H intermoléculaire entre les deux fonctions alcools. En outre, la stabilité de la structure est encore plus favorisée par l'établissement d'une liaison H supplémentaire intramoléculaire entre l'alcool et le carbonyle du noyau hydantoïne. Les liaisons H ont été représentées dans la structure sous la forme de traits hachurés.

III. Résultats des tests biochimiques

III.1. Tests RBA

Les analogues ferrocéniques **42** et **43** de la nilutamide sont soumis à plusieurs études biochimiques. Les études biochimiques comprennent les tests d'affinité relative de liaison au récepteur AR (tests RBA), des études d'activité anti-proliférative effectuées sur la lignée cellulaire PC3, et des calculs d'IC₅₀ effectués sur PC3.

III.1.a. Résultats

Les tests RBA ont été effectués sur des récepteurs AR purifiés. Les valeurs de RBA ont été mesurées en % par rapport à un composé de référence, ici la DHT, dont la valeur RBA est

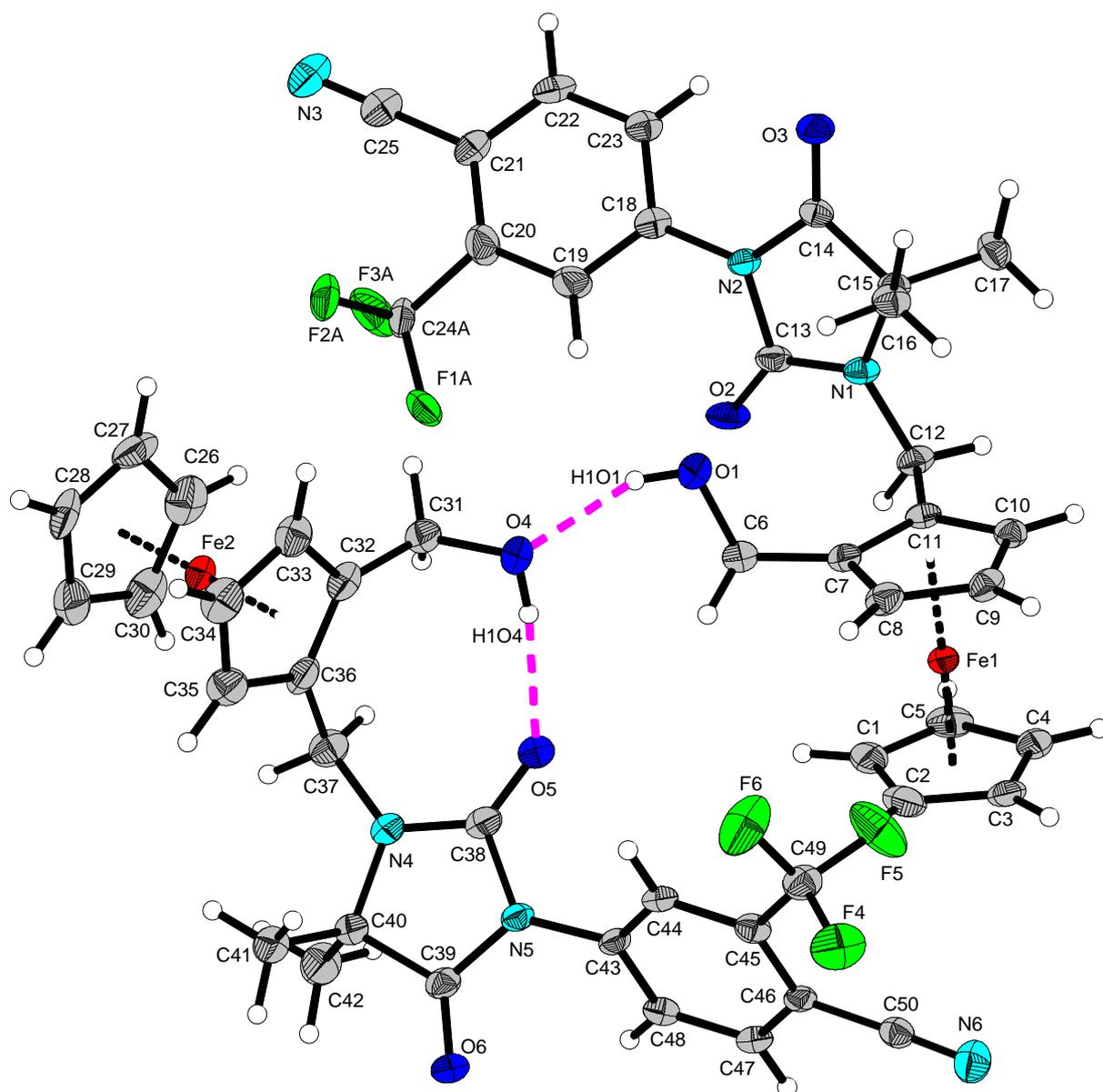


Figure 36 : Structure aux rayons X du composé 43

fixée à 100% par définition. Les valeurs de RBA des analogues ferrocéniques **42**, **43** et de la nilutamide sont reportées sur la Figure 37. Les valeurs de $\log Po/w$ des composés **42** et **43**, ont aussi été reportées sur la Figure 37.

III.1.b. Interprétation des résultats

On note d'abord que les composés méthoxy **42** et alcool **43** ont une affinité de liaison envers AR inférieure à la nilutamide et à l'analogue ferrocénique monosubstitué **26** ($RBA = 0,523 \pm 0,200\%$). Ce résultat suppose que la présence d'un substituant oxygéné (alcool ou éther) en position *ortho* sur le ferrocène défavoriserait fortement la liaison à AR.

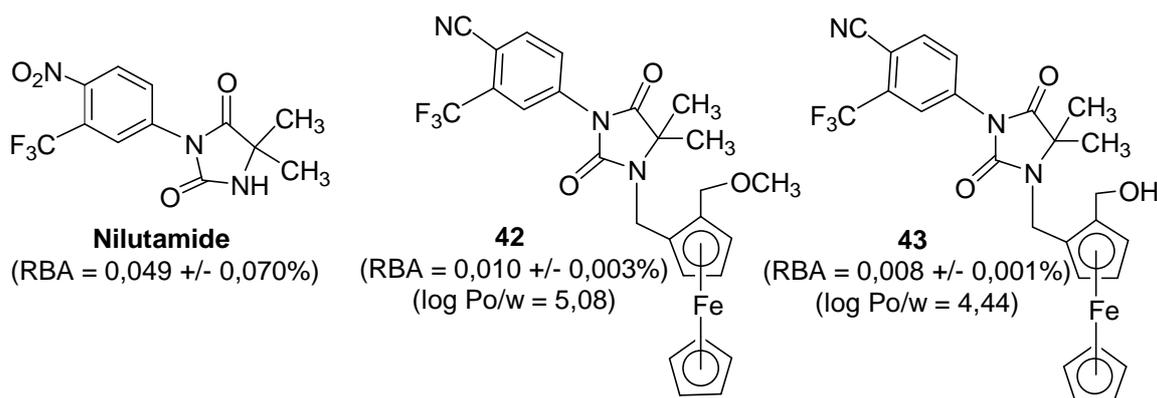


Figure 37 : Résultats des tests RBA et log Po/w

D'autre part, les valeurs de RBA des molécules **42** et **43** sont similaires. Ce résultat démontre que la substitution d'un éther par un alcool en position *ortho* sur le ferrocène ne changerait en rien l'affinité de liaison à AR. Deux hypothèses pourraient expliquer cette observation : soit, ces substituants ne seraient en aucun cas reconnus par la poche de liaison, soit, l'alcool serait mal localisé dans le site de liaison pour pouvoir interagir efficacement via des liaisons H avec un acide aminé polaire.

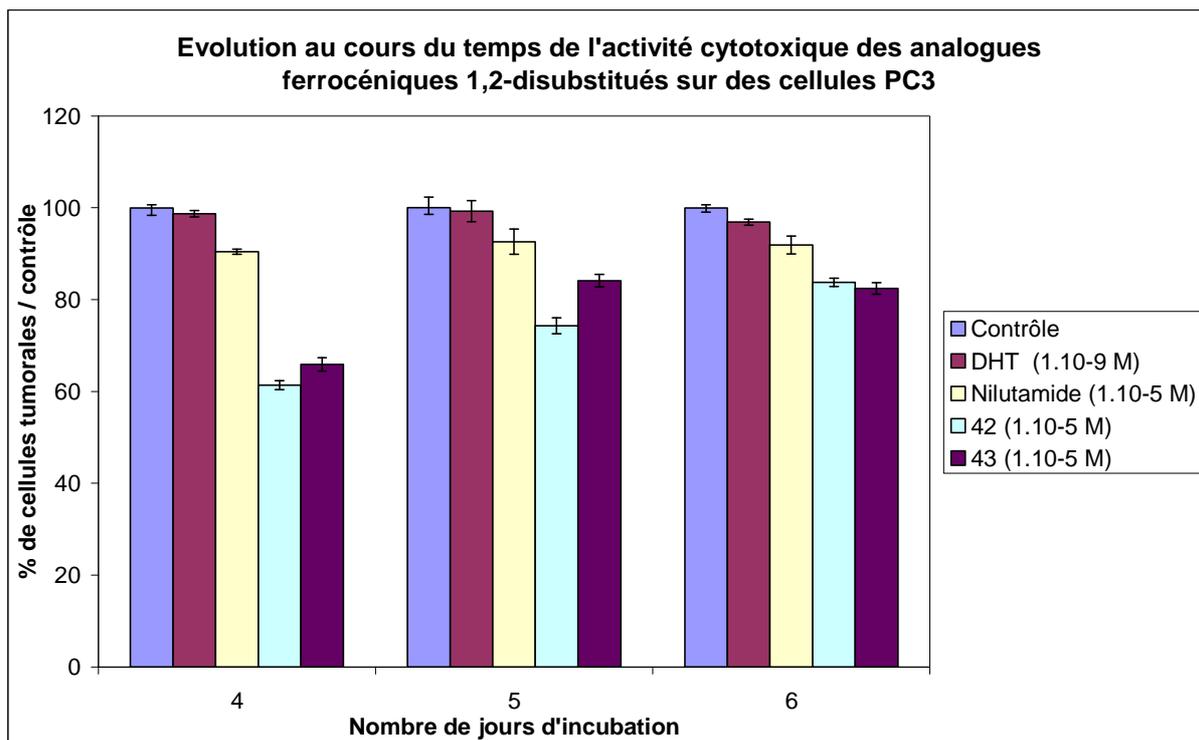
Les valeurs de log Po/w des analogues ferrocéniques **42** et **43**, indiquent que ces composés sont hydrophobes. En outre, il a été constaté que l'amélioration de la valeur de RBA serait probablement dépendante de l'hydrophobicité de la molécule. Ainsi, le composé **43**, qui est le plus hydrophile (log Po/w = 4,44), n'a pas la meilleure affinité de liaison pour AR (RBA = 0,008 ± 0,001%). Elle est, en effet, inférieure à celle du composé **26** (RBA = 0,523 ± 0,200%) qui est plus hydrophobe (log Po/w = 5,23). L'amélioration de la valeur de RBA dépendrait de l'hydrophobicité de la molécule.

III.2. Tests d'activité anti-proliférative sur les cellules PC3

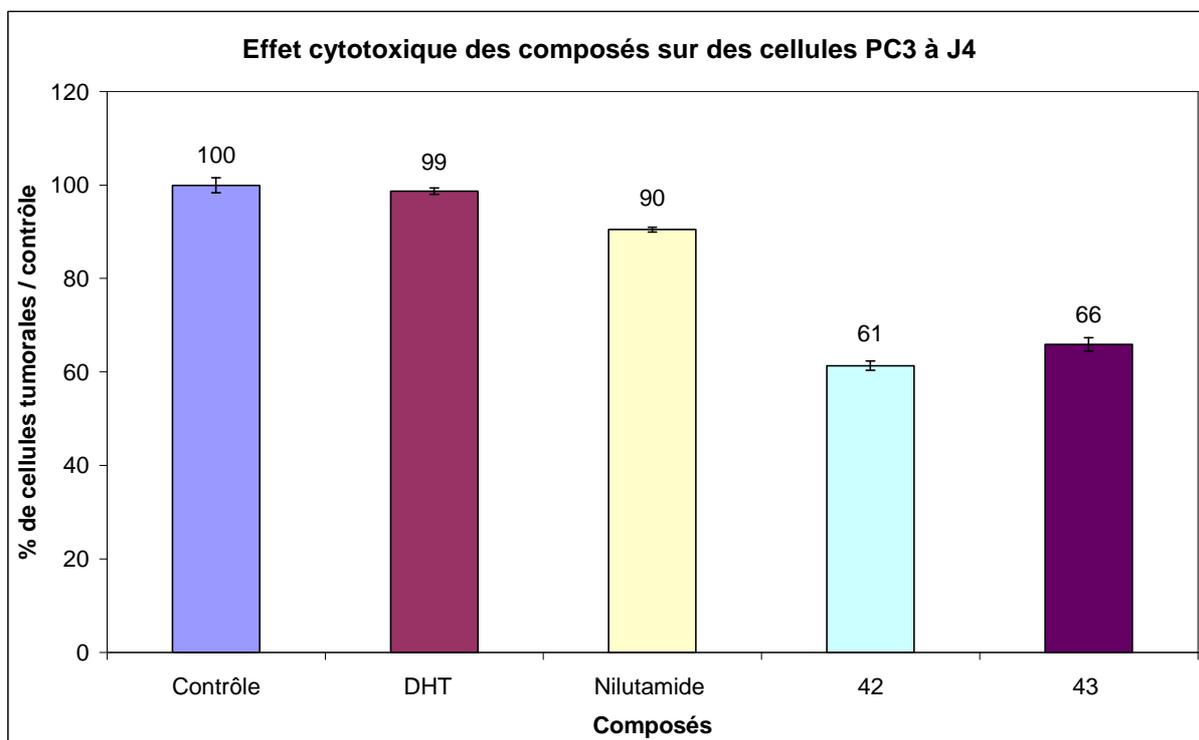
Cette série de tests *in vitro* a été effectuée sur des lignées cellulaires PC3 qui sont des cellules prostatiques tumorales hormono-indépendantes. Ces tests nous permettront donc de savoir si les composés synthétisés agissent ou non sur de telles cellules et, en conséquence, si de tels analogues ont un pouvoir cytotoxique.

Les résultats des tests d'activité anti-proliférative, concernant les analogues ferrocéniques **42** et **43**, ainsi que la nilutamide, la DHT et un contrôle (cellules sans incubation de produits), sont présentés sur deux graphiques. Le graphique 15 représente l'évolution de l'activité cytotoxique des composés synthétisés en fonction du temps d'incubation. Le graphique 16 représente le pourcentage de cellules tumorales restantes par rapport au contrôle, 4 jours après incubation des analogues ferrocéniques.

On note que les analogues ferrocéniques **42** et **43** ont une activité anti-proliférative meilleure que la nilutamide, pour une concentration similaire de 1.10^{-5} M. Ce résultat confirme l'importance du ferrocène dans l'augmentation de la cytotoxicité de ces molécules. En outre, les dérivés ferrocéniques **42** et **43** ont une activité anti-tumorale comparable avec les



Graphique 15



Graphique 16 : Effet cytotoxique des analogues ferrocéniques 1,2-disubstitués de la nilutamide à 1.10⁻⁵ M. La nilutamide est incubée à 1.10⁻⁵ M et la DHT à 1.10⁻⁹ M.

analogues ferrocéniques monosubstitués **26** et **27**. Ce résultat démontre que la présence d'un substituant (OMe ou OH) en *ortho* du ferrocène ne serait pas importante pour augmenter la cytotoxicité de ces molécules.

Enfin, si on compare les composés **42** et **43**, ils ont une activité anti-proliférative similaire envers des cellules PC3. Néanmoins, l'activité anti-tumorale des deux analogues diminue au cours du temps. Ce résultat suppose que la présence d'un substituant oxygéné (méthoxy et alcool) diminuerait la stabilité de ces molécules qui se seraient probablement dégradées en métabolites inactifs vis-à-vis des cellules PC3.

D'après le graphique 16, on remarque que les analogues ferrocéniques 1,2-disubstitués **42** et **43**, incubés à des doses de 1.10^{-5} M, inhibent la prolifération des cellules PC3 d'environ 35 à 40%. Ces résultats sont comparables avec ceux obtenus pour les dérivés ferrocéniques monosubstitués **26** et **27** qui, à partir de 5 jours, inhibent la prolifération des cellules PC3 de presque 40%, à des doses similaires. La similitude des deux résultats démontre que l'ajout d'un substituant en position *ortho* sur le ferrocène ne jouerait pas un rôle majeur dans la cytotoxicité de ces molécules.

III.3. Résultats des calculs d'IC₅₀

Les valeurs d'IC₅₀ ont été évaluées sur les cellules PC3. Les valeurs d'IC₅₀ des deux analogues ferrocéniques **42** et **43**, ainsi que de la nilutamide, sont reportées sur la Figure 38.

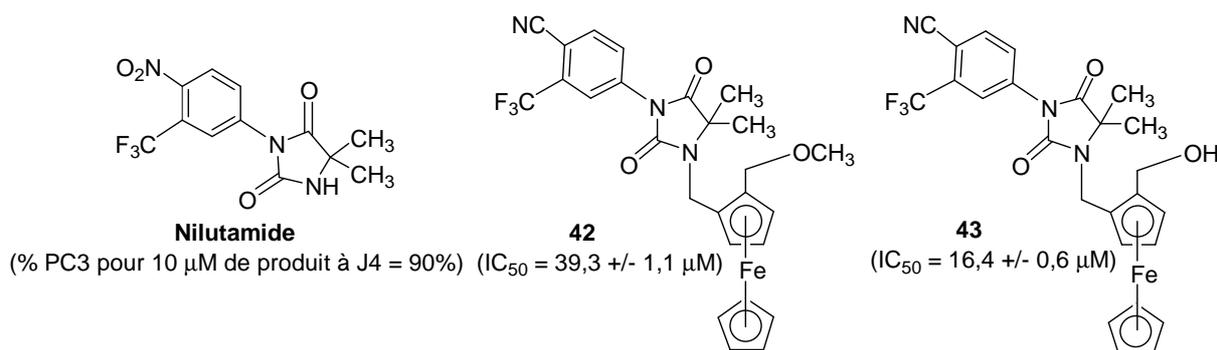


Figure 38 : Résultats des IC₅₀

Les résultats d'IC₅₀ démontrent, d'une part, une efficacité plus importante des analogues ferrocéniques **42** et **43** par rapport à la nilutamide. Ce résultat confirme que la présence d'une chaîne latérale N-ferrocénylméthyle hydrophobe serait un facteur important permettant d'accroître l'efficacité de ces molécules. D'autre part, ces molécules seraient plus efficaces envers des cellules tumorales PC3 que leur homologue monosubstitué **26** (IC₅₀ = 68,1 \pm 28,0 μ M). Ce résultat suggère que la présence d'un substituant alcool **43** ou éther **42** en position *ortho* sur le ferrocène permettrait d'augmenter l'efficacité de ces composés envers des tumeurs prostatiques. Cette efficacité augmenterait surtout avec la fonction alcool.

III.4. Conclusion

En conclusion, les tests biologiques réalisés *in vitro* sur les analogues disubstitués **42** et **43** ont montré des résultats intéressants. D'une part, ces molécules sont moins bien reconnues par

AR que leur homologue monosubstitué **26**. Ce résultat suggère que la présence d'une fonction oxygénée hydrophile (alcool ou méthoxy), au sein de la poche hydrophobe du récepteur, déstabilise la reconnaissance de AR pour le ligand. D'autre part, les études anti-prolifératives, effectuées sur les cellules PC3, ont montré des résultats significatifs pour les analogues **42** et **43**. En effet, ils ont démontré une activité anti-tumorale comparable avec celle de leur homologue monosubstitué **26**, à une dose de 1.10^{-5} M. Enfin, les résultats d'IC₅₀ sur les cellules PC3 confirment l'importance d'un substituant oxygéné en position *ortho* du ferrocène pour augmenter l'efficacité du produit. En effet, les deux analogues possèdent des valeurs d'IC₅₀ inférieures à celle du composé **26**.

IV. Synthèse d'un analogue ferrocénique 1,2-disubstitué des carboranes

IV.1. Introduction

Les dérivés carboranes sont des anti-androgènes non stéroïdiens qui ont été récemment découverts. Ils contiennent une structure particulière constituée par 12 atomes de bore et deux atomes de carbone qui sont disposés selon une cage. Cette structure est appelée dicarba-*closo*-dodécaborane (ou *p*-carborane)^{101, 102} (Figure 39) et possède des propriétés remarquables, telles qu'une géométrie sphérique, une grande stabilité thermique et chimique et une surface moléculaire hydrophobe. Ces caractéristiques permettent leur application en tant que nouvelle structure hydrophobe dans des molécules biologiquement actives. Or, les études basées sur la relation structure/activité, concernant la bicalutamide et le 2-hydroxyflutamide, ont montré que deux structures se sont avérées intéressantes au niveau de l'affinité de liaison à AR. Ce sont le noyau aromatique, un cyanophényle ou un nitrophényle, et un groupe hydroxyle. Des tests d'affinité de liaison à AR et des études anti-prolifératives ont été également effectués sur plusieurs dérivés carboranes. Ces études ont démontré l'importance des deux structures citées plus haut au niveau de l'affinité. En effet, il a été montré que les valeurs optimales de RBA sur AR ont été relevées pour des carboranes contenant à la fois un noyau aromatique, contenant un nitrile ou un nitro en position *mé*ta, et une chaîne hydroxyméthyle. De plus, ces composés possèdent une activité anti-androgénique intéressante, environ 10 fois supérieure à celle du 2-hydroxyflutamide.¹⁰⁴

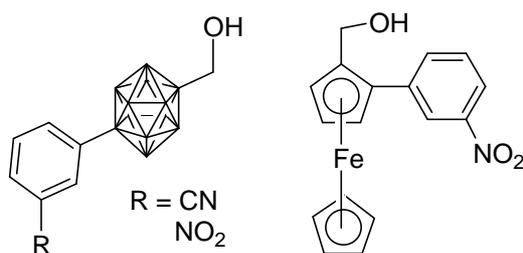


Figure 39 : Objectif de synthèse

¹⁰¹ Yamamoto K., Endo Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 2389.

¹⁰² Endo Y., Yamamoto K., Kagechika H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 4089.

¹⁰⁴ Fujii S., Goto T., Ohta K., Hashimoto Y., Suzuki T., Ohta S., Endo Y., *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 4654.

Par conséquent, la synthèse d'un analogue ferrocénique des carboranes, dans lequel la cage carborane a été substituée par le ferrocène, a été envisagée en série racémique. Cet analogue comprend un groupe hydroxyméthyle et un groupe *mé*ta-nitrophényle substitués sur le ferrocène en position 1,2 (Figure 39).

IV.2. Stratégie de synthèse

La stratégie générale de synthèse de cet analogue ferrocénique est présentée sur le Schéma 30. Elle consiste en une synthèse du 1-formyl-2-*mé*ta-nitrophényl-ferrocène **51** qui ensuite est réduit en alcool. Le problème majeur de cette synthèse est d'obtenir le composé aldéhyde. Pour cela, il a été synthétisé à partir du ferrocénecarboxaldéhyde en deux grandes étapes. Une première étape consiste en une réaction classique de protection de l'aldéhyde en un groupe acétal *ortho* directeur pour donner le 2-ferrocényl-dioxane **33** (Schéma 23).¹⁵¹ La deuxième étape constitue l'étape clé de cette synthèse et consiste en une introduction du groupement nitrophényle en position 2, suivie par une déprotection de l'acétal. L'introduction du nitrophényle en position 2 sur le ferrocène a été effectuée suivant une réaction de couplage entre un halogénure aromatique commercial (en l'occurrence, le 3-iodo-nitrobenzène) et un ferrocène 1,2-disubstitué, contenant un groupe métallique, synthétisé à partir du 2-ferrocényl-dioxane **33**. Dans ce but, deux stratégies de couplage, le couplage de Stille et le couplage d'Ei-ichi Negishi, ont été envisagées et testées.

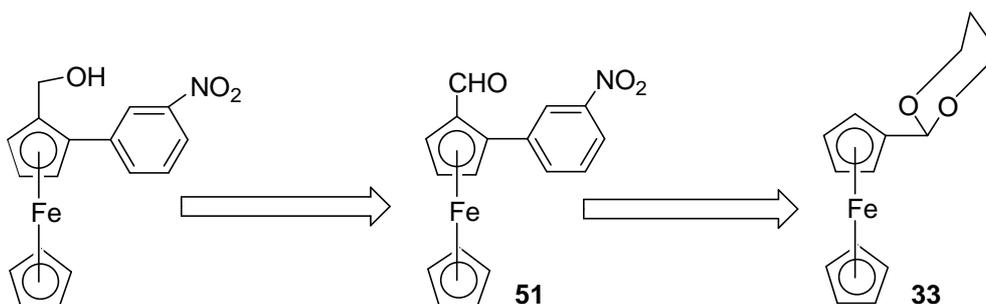


Schéma 30 : Stratégie de synthèse

IV.3. Les étapes de la synthèse

Dans un premier temps, le couplage de Stille a été envisagé. En effet, il a été montré dans la littérature que le couplage effectué entre le (n-tributylstannyl)-ferrocène **44** et un halogénobenzène avait permis d'obtenir le phénylferrocène souhaité avec un rendement de 50%.¹⁵⁶

IV.3.a. *Réaction de couplage de Stille*

Cette réaction a été reprise entre le 3-iodo-nitrobenzène et le 1-dioxanyl-2-(n-tributylstannyl)-ferrocène. Ce dérivé a été obtenu par addition électrophile du chlorure de n-

¹⁵¹ Steffen W., Laskoski M., Collins G., Bunz U.H.F., *J. Organomet. Chem.*, **2001**, 630, 132.

¹⁵⁶ Guillaneux D., Kagan H.B., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 2502.

tributylstannyle ($n\text{-Bu}_3\text{SnCl}$) sur le 2-ferrocényl-dioxane **33**. Dans une première étape, une réaction d'ortholithiation du composé **33**, suivie par l'addition de l'électrophile $n\text{-Bu}_3\text{SnCl}$, a été effectuée. Les conditions expérimentales, décrites dans la littérature¹⁵⁶ pour la synthèse du (n -tributylstannyl)-ferrocène **44**, ont d'abord été testées sur cette synthèse. Cette réaction a été effectuée à partir du ferrocène, suivant le Schéma 31. Trois produits ont été obtenus, le composé mono-stannylé attendu **44**, le sous-produit bi-stannylé **45** et le ferrocène, avec des rendements qui sont respectivement de 63%, 29% et 8%. Cette synthèse est totale, puisque tout le produit de départ a réagi. Par conséquent, le même mode opératoire a été repris pour la synthèse du 1-dioxanyl-2-(n -tributylstannyl)-ferrocène **47**. Trois composés ont été obtenus, le composé mono-stannylé attendu **47**, le sous-produit bi-stannylé **48** et le 2-ferrocényl-dioxane **33**, avec des rendements de 31%, 20% et 46% respectivement (Schéma 32). Cette réaction n'est pas totale, puisque quasiment 50% du produit de départ n'a pas réagi.

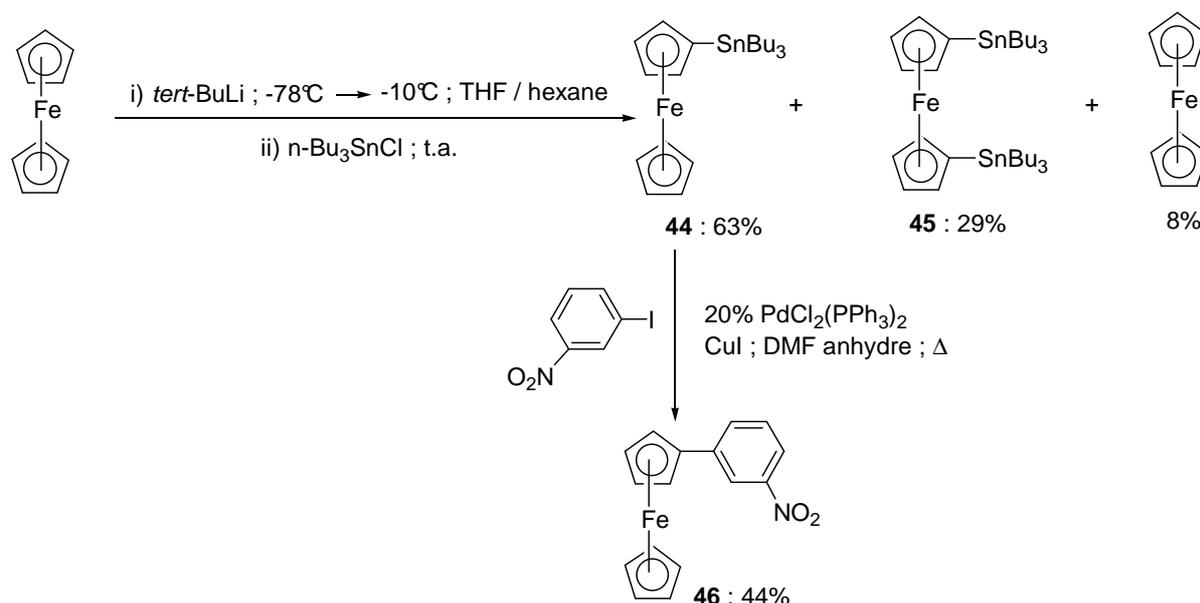


Schéma 31 : Réaction de couplage de Stille pour le composé **46**

Dans une deuxième étape, un couplage de type Stille a été effectué dans le DMF anhydre, en présence d'iodure de cuivre (I) (CuI) et d'un complexe de palladium (II), le dichlorobis(triphénylphosphine)palladium $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (20% mol).¹⁵⁶ Ces conditions expérimentales ont d'abord été testées sur la molécule **44** et le 3-iodo-nitrobenzène. Cette réaction a permis d'obtenir le (3-nitrophényl)-ferrocène **46** avec un rendement moyen (44%) (Schéma 31). Ce mode opératoire a été repris pour le couplage effectué entre le composé **47** et le 3-iodo-nitrobenzène. Or, ce couplage n'a pas donné les résultats escomptés. En effet, le produit de couplage, le 1-dioxanyl-2-(*mé*ta-nitrophényl)-ferrocène **49** a été obtenu avec un faible rendement (16%) (Schéma 32). Par conséquent, cette réaction doit être optimisée. Pour cela, nous avons décidé de tester un autre type de couplage, le couplage d'Ei-ichi Negishi.

¹⁵⁶ Guillaeneux D., Kagan H.B., *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 2502.

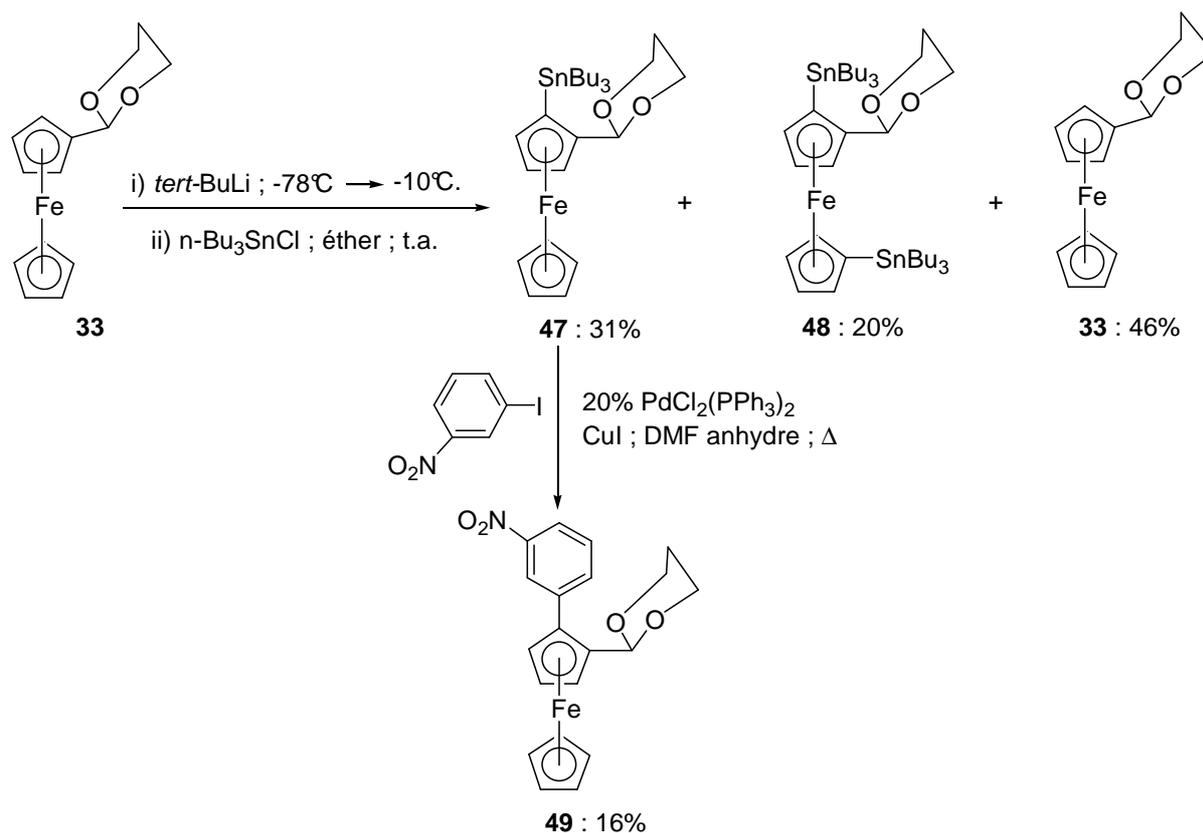


Schéma 32 : Réaction de couplage de Stille

IV.3.b. Réaction de couplage d'Et-ichi Negishi

La réaction a été reprise à partir du 2-ferrocényl-dioxane **33**, en utilisant des conditions expérimentales décrites dans la littérature.^{157, 158} Le couplage d'Et-ichi Negishi est effectué en présence d'un catalyseur préparé *in situ*, un complexe de palladium (0), et d'un co-catalyseur commercial, le chlorure de zinc (ZnCl_2).

La réaction est présentée sur le Schéma 33. Dans un premier temps, le 2-ferrocényl-dioxane **33** réagit avec un lithien, le *sec*-BuLi, pour former un intermédiaire *ortho*-lithié.¹⁵¹ Du chlorure de zinc anhydre, qui a préalablement été chauffé autour de 150°C sous argon¹⁵⁹, est ajouté pour permettre une réaction d'échange métal/métal entre le lithium et le zinc. Un intermédiaire zincique **50** est ainsi formé *in situ*.¹⁵⁷

¹⁵⁷ Negishi E., King A.O., Okukado N., *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, 1821.

¹⁵⁸ Negishi E., Okukado N., King A.O., Van Horn D.E., Spiegel B.I., *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 2254.

¹⁵¹ Steffen W., Laskoski M., Collins G., Bunz U.H.F., *J. Organomet. Chem.*, **2001**, *630*, 132.

¹⁵⁹ Palmgren A., Thorarensen A., Bäckvall J.E., *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 3764.

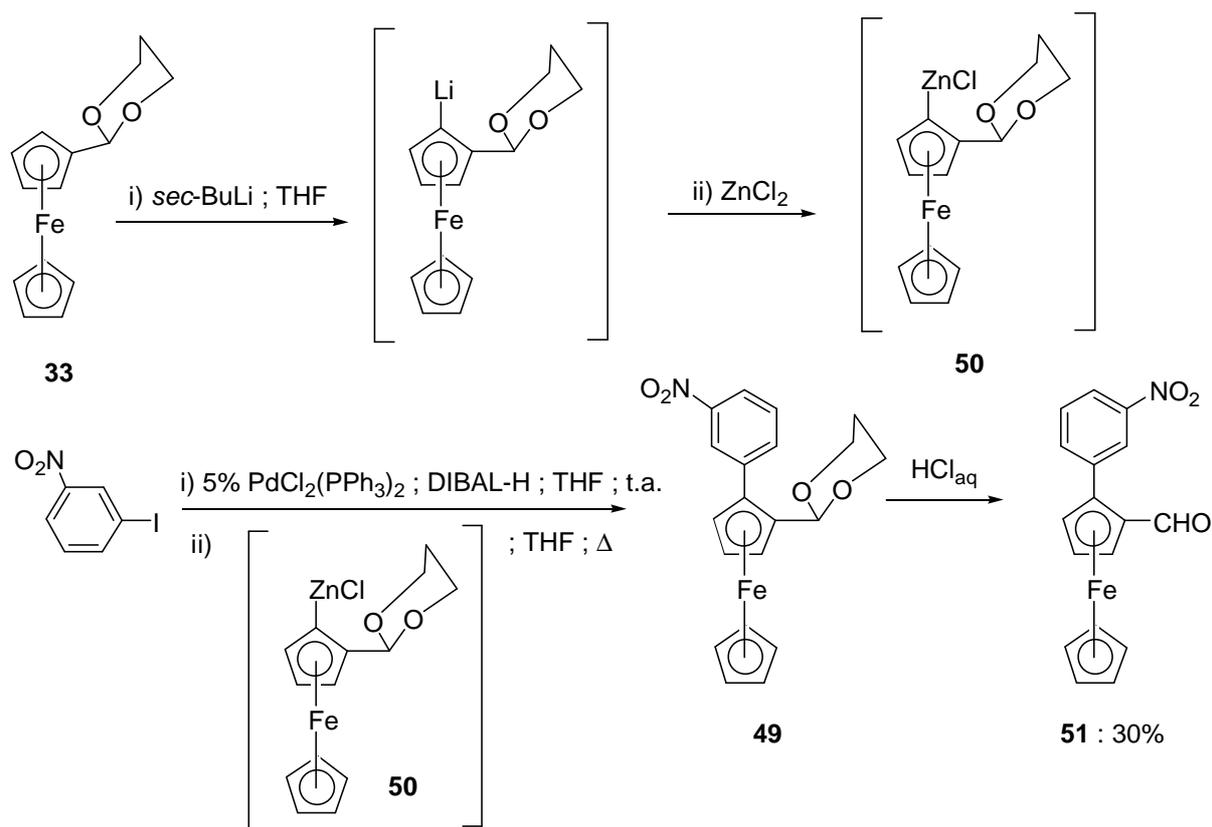


Schéma 33 : Réaction de couplage d'Et-ichi Negishi

Dans un deuxième temps, le catalyseur a été préparé à partir d'un complexe de palladium (II), le dichlorobis(triphénylphosphine)palladium $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (5% mol), et d'un réducteur, l'hydruide de di-isobutyl-aluminium DIBAL-H (2 équivalents par rapport au Pd(II)).¹⁶⁰ Ce réducteur est utilisé ici en tant qu'agent d'hydrométallation.

Dans un troisième temps, le 3-iodo-nitrobenzène est ajouté, constituant ainsi l'étape d'addition oxydante du cycle catalytique. Ensuite, une réaction de transmétallation a été effectuée, après l'ajout de l'intermédiaire zincique **50**. Cette réaction est suivie par une étape d'élimination réductrice du complexe de Pd(0), qui est ainsi régénéré. Il se forme le 1-dioxanyl-2-(méta-nitrophényl)-ferrocène **49**. Enfin, la dernière étape du mécanisme correspond à une hydrolyse acide de l'acétal du composé **49**. Elle permet la formation du produit suivant, le 1-formyl-2-(méta-nitrophényl)-ferrocène **51**.

En conclusion, cette réaction est intéressante dans la mesure où le produit **51** a été formé en une réaction « one pot » à partir du 2-ferrocényl-dioxane. Cette réaction comporte trois étapes clés qui sont la formation de l'intermédiaire zincique **50**, la réaction de couplage, et l'hydrolyse acide de l'acétal. Le composé **51** a cependant été obtenu avec un faible rendement

¹⁶⁰ Baba S., Negishi E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 6729.

(30%). Ceci s'explique par le fait qu'une grande partie du nitrobenzène de départ et du ferrocène-carboxaldéhyde, qui est le produit d'hydrolyse du 2-ferrocényl-dioxane, se retrouvent en fin de réaction.

IV.3.c. Fin de la synthèse

La fin de la synthèse est présentée sur le Schéma 34. Elle consiste en une réaction de réduction de l'aldéhyde du produit **51** en un alcool, dans des conditions classiques (utilisation de NaBH_4). Un produit **52** s'est formé, contenant l'alcool à la place de l'aldéhyde ; cependant, l'hydrure a aussi réduit le groupe nitro en amine primaire. Le composé **52** correspond donc au 1-(*mé*ta-aminophényl)-2-(hydroxyméthyl)-ferrocène et a été obtenu avec un excellent rendement (97%).

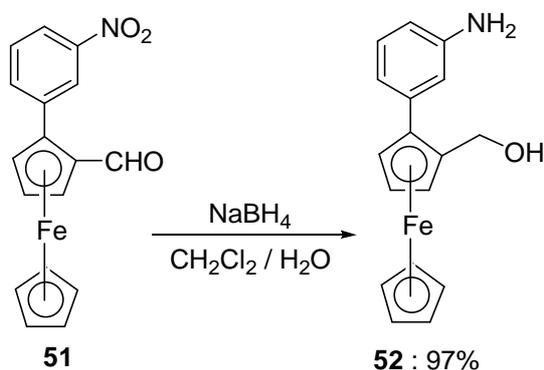
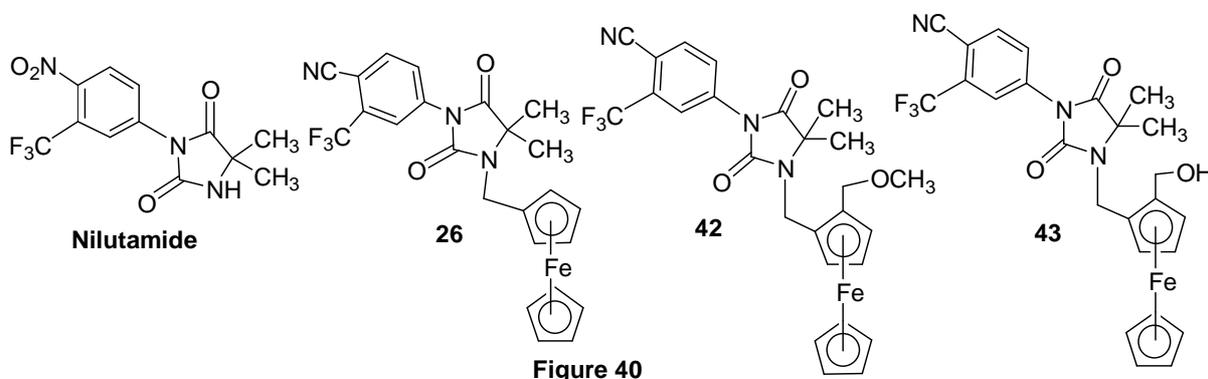


Schéma 34 : Fin de la synthèse

V. Conclusion

Dans le chapitre précédent, d'après les résultats des tests biologiques de la molécule **26** (Figure 40), il a été suggéré que ce composé serait un point de départ intéressant dans le but d'élaborer des analogues ferrocéniques encore plus actifs. Ainsi, dans ce chapitre, une synthèse d'analogues ferrocéniques 1,2-disubstitués de la nilutamide a d'abord été envisagée. Ces molécules sont analogues au composé **26**, mais contiennent un substituant (éther et alcool) en *ortho* sur le ferrocène. Les composés **42** et **43** ont été synthétisés, puis testés au niveau de leur affinité de liaison envers le récepteur AR (test RBA) et au niveau de leur cytotoxicité. Par conséquent, dans une première partie, ce chapitre présente la synthèse de



dérivés ferrocéniques de la nilutamide **42** et **43**, contenant un ferrocène 1,2-disubstitué (Figure 40). La synthèse de ces analogues a été effectuée en série racémique, en appliquant la méthode générale de synthèse des ferrocènes 1,2-disubstitués. Les tests biologiques ont ensuite été effectués sur ces molécules. Ces deux molécules sont moins bien reconnues par AR que leur homologue monosubstitué **26**. Ce résultat suggère que la présence de fonctions hydrophiles (alcool, méthoxy), au sein de la poche hydrophobe du récepteur, diminue la reconnaissance de AR pour le ligand. D'autre part, les études anti-prolifératives, effectuées sur les cellules PC3, ont montré des résultats significatifs pour les deux molécules. En effet, elles ont démontré une activité anti-tumorale sur des cellules PC3 comparable avec celle du dérivé monosubstitué **26**, à une dose de 1.10^{-5} M. Ce résultat démontre que la présence d'un substituant (OMe ou OH) en *ortho* du ferrocène ne serait pas importante pour augmenter la cytotoxicité de ces molécules. Enfin, les résultats d'IC₅₀ sur les cellules PC3 confirment l'importance d'un substituant oxygéné en position *ortho* du ferrocène pour augmenter l'efficacité du produit. En effet, les deux analogues possèdent des valeurs d'IC₅₀ inférieures à celle du composé **26**.

Dans un deuxième temps, ce chapitre présente une classe d'anti-androgènes prometteurs, les carboranes. Par conséquent, la synthèse d'un analogue ferrocénique, contenant un ferrocène 1,2-disubstitué à la place d'une cage carborane, a été envisagée. Cette synthèse est intéressante dans la mesure où elle nous a permis de tester deux réactions de couplage catalysées par des complexes de palladium. Cette étape clé a été optimisée et, après réduction de l'aldéhyde, un autre composé, le produit **52**, (Figure 41), a été obtenu en série racémique. Les études biologiques concernant cette molécule sont en cours.

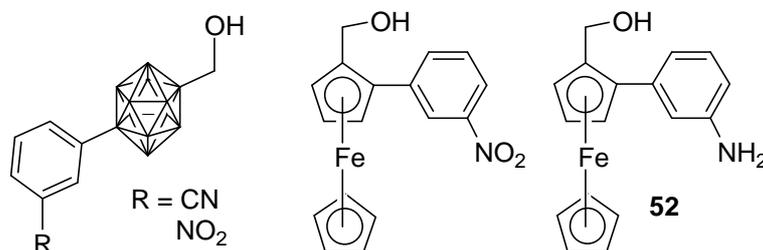


Figure 41

Toutes les molécules synthétisées dans ce chapitre comprennent des ferrocènes 1,2-disubstitués présentant une chiralité plane. Or, elles ont été toutes obtenues en série

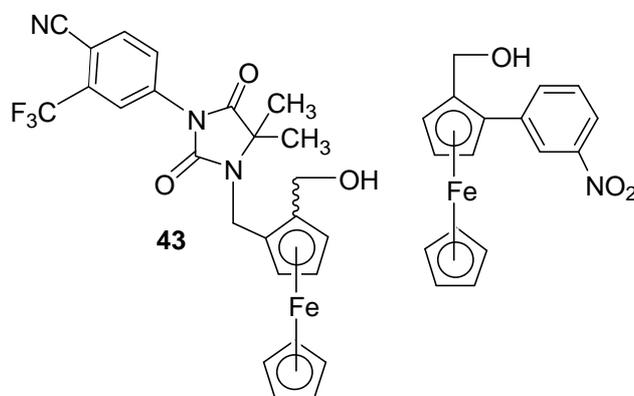
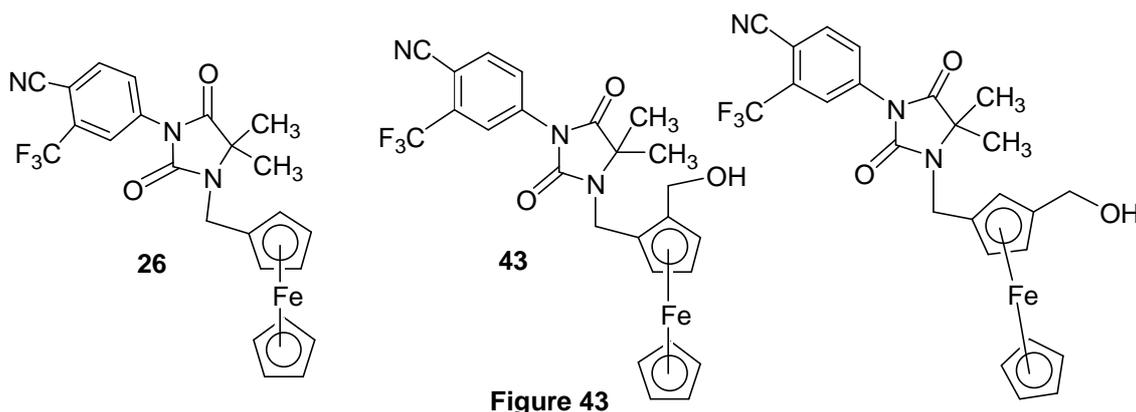


Figure 42

racémique. Leur synthèse, notamment celle du composé **43**, devra être donc envisagée en série énantiomériquement pure pour savoir si un énantiomère est plus efficace que l'autre (Figure 42). En outre, étant donné que la molécule **52** n'avait pas été souhaitée au départ, la synthèse de l'analogue ferrocénique du carborane, contenant un nitro aromatique, doit être reprise en série racémique (Figure 42).

D'après les études biologiques réalisées sur les composés **26** et **43**, la molécule **43** a démontré une affinité de liaison à AR inférieure à la molécule **26**. Cependant, ces deux composés ont montré une activité anti-tumorale similaire envers des cellules PC3. En outre, les résultats d'IC₅₀ de ces composés **26** et **43** montrent une meilleure efficacité du produit **43** sur PC3. Ce résultat, associé à une valeur de RBA faible de la molécule **43** envers AR, suggère que d'autres cibles protéiques sont non seulement possibles, mais probables. Les résultats d'IC₅₀ sur les cellules PC3 confirment donc l'importance d'un substituant oxygéné (alcool) en *ortho* du ferrocène pour augmenter l'efficacité du produit. Or, le produit **43** reconnaît moins bien AR que le composé **26**. Deux hypothèses pourraient expliquer cette observation : soit, le substituant alcool ne serait en aucun cas reconnu par la poche de liaison de AR, soit, il serait mal placé dans le site de liaison pour pouvoir interagir efficacement via des liaisons H avec un acide aminé polaire. Par conséquent, pour vérifier la deuxième hypothèse, la synthèse d'un analogue N-ferrocénylméthyle 1,3-disubstitué chiral est envisagée pour l'avenir, en tenant compte de la chiralité plane (Figure 43).



VI. Partie expérimentale

Toutes les réactions, sauf mention contraire, ont été effectuées sous atmosphère d'argon. L'éther, le THF, le toluène et l'hexane ont été distillés avec un mélange sodium / benzophénone. Les autres réactifs et solvants utilisés, tels que le DMF anhydre et la pyridine anhydre, sont des produits commerciaux. Les chromatographies sur colonne sont réalisées sur gel de silice Merck 60 (40-63 μm). Les points de fusion des produits sont mesurés à l'aide d'un banc Köfler. Les spectres infrarouges sont enregistrés sur un spectromètre IR-FT BOMEM Michelson-100. Les analyses RMN ¹H et ¹³C sont effectuées sur un appareil Bruker 300 MHz. Les solvants RMN utilisés sont le chloroforme deutéré CDCl₃, l'acétone-d₆ et le DMSO-d₆. Les déplacements chimiques (δ) sont mesurés en parties par millions (ppm) et les constantes de couplage (J) sont calculées en Hertz (Hz). Les analyses élémentaires des nouveaux produits sont effectuées au Service de Microanalyse de l'I.C.S.N. à Gif-sur-Yvette.

Synthèse du 2-ferrocényl-dioxane (33) : Le ferrocèncarboxaldéhyde (3,000 g ; 14,0 mmol) et l'acide *para*-toluènesulfonique TsOH.H₂O (0,240 g ; 0,09 équivalents) sont dissouts dans le toluène (80 mL). Le 1,3-propanediol (5,000 mL ; 5 équivalents) est ajouté à la solution et le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 4 h à l'abri de la lumière (montage de type Dean-Stark). Le mélange est ensuite refroidi à température ambiante, filtré sur silice (éluant : acétate d'éthyle) et évaporé. Un solide noir (8,226 g) est obtenu et est purifié sur colonne (éluant : éther de pétrole/triéthylamine 10%). Un solide orange correspondant au produit **33** est obtenu (2,790 g ; 73,2%). R_f (éther de pétrole / triéthylamine 10%) : 0,63. Mp : 116-118°C (littérature : 117°C¹⁵¹).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 1,36-1,41 (1H, m, CH₂ acétal), 2,13-2,17 (1H, m, CH₂ acétal), 3,91 (2H, dt, CH₂ acétal, J = 12,3 Hz, J = 2,4 Hz), 4,12 (2H, t, C₅H₄, Hβ, J = 1,8 Hz), 4,18 (5H, s, C₅H₅), 4,18-4,23 (2H, m, CH₂ acétal), 4,31 (2H, t, C₅H₄, Hα, J = 1,8 Hz), 5,36 (1H, s, CH acétal).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 25,9 (CH₂ acétal); 66,5 (2C, C₅H₄); 67,3 (CH₂ acétal); 68,0 (2C, C₅H₄); 68,9 (C₅H₅); 86,3 (C_{ipso}, C₅H₄); 100,6 (CH acétal).

Synthèse du 1-dioxanyl-2-formyl-ferrocène (34). Méthode (a) : Le 2-ferrocényl-dioxane **33** (0,500 g ; 1,84 mmol) est dissout dans l'éther (45 mL). La solution est refroidie à -78°C et une solution de *tert*-BuLi 1,7 M dans le pentane (1,200 mL ; 1,1 équivalents) est ajoutée lentement. La solution est agitée pendant 2 h de -78°C à -10°C. La solution est refroidie à -78°C et le DMF anhydre (0,600 mL ; 4 équivalents) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité pendant 1 h jusqu'à -10°C, puis à température ambiante pendant 30 minutes. De l'eau salée est ajoutée et la solution est extraite à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée pour donner une huile rouge foncée (0,623 g). Cette huile est purifiée sur colonne (éluant : éther/éther de pétrole 2:1, puis éther). Trois fractions sont obtenues.

Une première fraction est un solide jaune correspondant au 2-ferrocényl-dioxane **33** (0,160 g ; 32,0%). R_f (éther/éther de pétrole 2:1) : 0,90.

Une deuxième fraction est un solide rouge correspondant au produit **34** (0,234 g ; 42,4%). R_f (éther/éther de pétrole 2:1) : 0,53.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 1,42 (1H, m, CH₂ acétal), 2,13-2,17 (1H, m, CH₂ acétal), 3,98 (2H, dt, CH₂ acétal, J = 12,9 Hz, J = 2,1 Hz), 4,20 (2H, m, CH₂ acétal), 4,28 (5H, s, C₅H₅), 4,54 (1H, t, C₅H₃, J = 2,7 Hz), 4,78 (2H, m, C₅H₃), 5,69 (1H, s, CH acétal), > 10,00 (s, 1H, CHO).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 25,9 (CH₂ acétal); 67,4 (CH₂ acétal); 70,2 (1C, C₅H₃); 70,6 (C₅H₅); 71,8 (1C, C₅H₃); 72,4 (1C, C₅H₃); 88,4 (C_{ipso} (acétal), C₅H₃); 99,4 (CH acétal); 194,7 (CHO).

¹⁵¹ Steffen W., Laskoski M., Collins G., Bunz U.H.F., *J. Organomet. Chem.*, **2001**, 630, 132.

Une dernière fraction est une huile rouge correspondant au produit diformylé **35** (0,120 g ; 20,0%). R_f (éther/éther de pétrole 2:1) : 0,22.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 1,49 (1H, m, CH_2 acétal), 2,09-2,26 (1H, m, CH_2 acétal), 3,96 (2H, m, CH_2 acétal), 4,17-4,32 (2H, m, CH_2 acétal), 4,58 (1H, t, C_5H_3 , $J = 2,5$ Hz), 4,66 (2H, m, C_5H_4), 4,82 (1H, t, C_5H_4), 4,85 (2H, m, C_5H_3), 4,89 (1H, m, C_5H_4), 5,55 (1H, s, CH acétal), 9,83 (1H, s, CHO), 9,89 (1H, s, CHO).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 25,7 (CH_2 acétal); 67,3 (CH_2 acétal); 70,8, 71,2, 71,9, 72,6, 73,5, 74,9 et 75,1 (7 CH ferrocène); 77,9 et 80,9 (C_{ipso} (CHO), C_5H_3 et C_{ipso} (CHO), C_5H_4); 89,6 (C_{ipso} (acétal), C_5H_3); 98,2 (CH acétal); 193,4 et 194,1 (2 CHO).

Méthode (b) : Le 2-ferrocényl-dioxane **33** (0,606 g ; 2,23 mmol) est dissout dans le THF (20 mL). La solution est refroidie à -78°C pendant 10 minutes et une solution de *sec*-BuLi 1,4 M dans le cyclohexane (1,750 mL ; 1,1 équivalents) est ajoutée à la solution. La solution est agitée pendant 20 minutes à -78°C , puis pendant 2 h de -78°C à -10°C . La solution est refroidie à -78°C et la N-formylpipéridine (NFP) (0,300 mL ; 1,2 équivalents) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 1 h jusqu'à -10°C , puis à température ambiante pendant 1 h. De l'eau salée est ajoutée et la solution est extraite à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée. Une huile rouge foncée (0,765 g) est obtenue et est purifiée sur colonne (éluant : éther/éther de pétrole 2:1, puis éther). Trois fractions sont obtenues.

Une première fraction est un solide jaune correspondant au 2-ferrocényl-dioxane **33** (0,076 g ; 12,5%). R_f (éther/éther de pétrole 2:1) : 0,90.

Une deuxième fraction est un solide rouge correspondant au produit **34** (0,445 g ; 66,6%). R_f (éther/éther de pétrole 2:1) : 0,53. Mp : $96-98^\circ\text{C}$ (littérature : 87°C^{151}).

Une dernière fraction est une huile rouge correspondant au produit diformylé **35** (0,050 g ; 6,8%). R_f (éther/éther de pétrole 2:1) : 0,22.

Synthèse du 1,2-diformyl-ferrocène (36) : La réaction d'hydrolyse acide de l'acétal n'a pas été effectuée sous argon. Le produit **34** (0,220 g ; 0,730 mmol) et l'acide *para*-toluènesulfonique $\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0,148 g ; 1 équivalent) sont dissouts dans du THF contenant de l'eau (5 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 4 h à température ambiante. De l'eau et du dichlorométhane sont ajoutés et la solution est extraite avec le dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée pour donner un produit brut (0,200 g). Ce résidu est purifié sur colonne (éluant : éther/éther de pétrole 2:1). Un solide rouge correspondant au produit **36** est obtenu (0,100 g ; 56,8%). Il est recristallisé dans éther / hexane. R_f (éther/éther de pétrole 2:1) : 0,47. Mp : $170-172^\circ\text{C}$ (littérature : 172°C^{151}).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 4,40 (5H, s, C_5H_5), 4,94 (1H, t, C_5H_3 , $J = 2,7$ Hz), 5,21 (2H, d, C_5H_3 , $J = 2,7$ Hz).

¹⁵¹ Steffen W., Laskoski M., Collins G., Bunz U.H.F., *J. Organomet. Chem.*, **2001**, 630, 132.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : $\delta = 71,6$ (C_5H_5); 75,5 (2C, C_5H_3); 75,8 (1C, C_5H_3); 80,4 (2C_{ipso} (CHO), C_5H_3); 193,5 (2 CHO).

Synthèse du 1,2-di(hydroxyméthyl)-ferrocène (37) : La réaction de réduction n'a pas été effectuée sous argon. Le produit **36** (0,540 g ; 2,23 mmol) est dissout dans le méthanol (30 mL). Une solution de borohydrure de sodium NaBH_4 (0,584 g ; 7 équivalents) dans de l'eau (20 mL) est ajoutée. Le mélange est agité à température ambiante pendant 45 minutes. De l'eau est ajoutée et la solution est extraite à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée pour donner un solide orange qui est recristallisé dans dichlorométhane / hexane. Un solide jaune orangé correspondant au produit **37** est obtenu (0,518 g ; 94,4%). R_f (éther/éther de pétrole 10:1) : 0,22. Mp : 116-118°C (littérature : 117-118°C¹⁵³).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : $\delta = 3,41$ (2H, s, OH), 4,08 (5H, s, C_5H_5), 4,11 (1H, t, C_5H_3 , $J = 2,5$ Hz), 4,22 (2H, d, C_5H_3 , $J = 2,5$ Hz), 4,25 (2H, d, CH_2OH , $^2J = 12,0$ Hz), 4,48 (2H, d, CH_2OH , $^2J = 12,0$ Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : $\delta = 59,4$ (2 CH_2OH); 67,2 (1C, C_5H_3); 68,8 (C_5H_5); 70,2 (2C, C_5H_3); 86,1 (2C_{ipso} (CH_2OH), C_5H_3).

Synthèse du 1-(tert-butyldiméthylsilyloxyméthyl)-2-hydroxyméthyl-ferrocène (38) : Le diol **37** (0,400 g ; 1,63 mmol) est dissout dans le THF (40 mL). La solution est refroidie à 0°C et de l'hydrure de sodium NaH (0,065 g ; 1 équivalent) est ajouté doucement. Le mélange est agité pendant 10 minutes à 0°C et le chlorure de tert-butyl-diméthyl-silyle TBDMSCl (0,245 g ; 1 équivalent) est ajouté doucement. Le mélange réactionnel est agité pendant 3 h à température ambiante. De l'eau et de l'éther sont ajoutés et la solution est extraite à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée pour donner une huile orange (0,630 g). Cette huile est purifiée sur colonne (éluant : éther/éther de pétrole 1:1). Une huile orange correspondant au produit **38** est obtenue (0,410 g ; 70%). Elle cristallise au froid en un solide jaune orangé. R_f (éther/éther de pétrole 1:1) : 0,66.

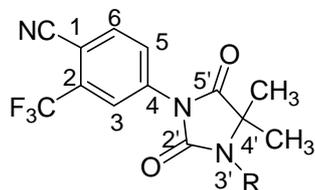
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : $\delta = 0,00$ (3H, s, CH_3), 0,10 (3H, s, CH_3), 0,89 (9H, s, tert-butyl), 2,73 (1H, s, OH), 4,07 (1H, m, C_5H_3), 4,10 (5H, s, C_5H_5), 4,13 (1H, m, C_5H_3), 4,20 (1H, m, C_5H_3), 4,24 (1H, d, CH_2OH , $^2J = 13,0$ Hz), 4,37 (1H, d, CH_2OSi , $^2J = 11,7$ Hz), 4,62 (1H, d, CH_2OH , $^2J = 13,0$ Hz), 4,73 (1H, d, CH_2OSi , $^2J = 11,7$ Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : $\delta = -5,3$ et $-5,1$ (SiMe_2); 18,3 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 26,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 59,9 (CH_2OH); 61,0 (CH_2OSi); 66,3 (1C, C_5H_3); 68,9 (C_5H_5); 69,7 (2C, C_5H_3); 86,1 et 87,4 (2C_{ipso} , C_5H_3).

Synthèse du 1-(tert-butyldiméthylsilyloxyméthyl)-2-(para-toluènesulfoxyméthyl)-ferrocène (39) : Le produit **38** (0,530 g ; 1,47 mmol) est dissout dans la pyridine anhydre (12 mL). La solution est refroidie à 0°C et le chlorure de para-toluènesulfonyle TsCl (0,280 g ; 1

¹⁵³ Marr G., Rockett B.W., Rushworth A., *J. Organomet. Chem.*, **1969**, 16, 141.

équivalent) est ajouté par portions. Le mélange est agité à 0°C pendant 1 h, puis à température ambiante pendant 1 h. Après avoir évaporé la pyridine sous vide, de l'eau et du dichlorométhane sont ajoutés. La solution est extraite avec le dichlorométhane ; la phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée pour donner un solide jaune marron. Il correspond au produit **39** (0,756 g ; 100%).



Synthèse du 4-(4',4'-diméthyl-2',5'-dioxo-1'-imidazolidinyl)-2-trifluorométhyl-benzonitrile (40)¹⁴³ : Le 5,5-diméthylhydantoïne (2,033 g ; 2 équivalents) et le carbonate de potassium K₂CO₃ (1,644 g ; 1,5 équivalents) sont ajoutés à une solution de 4-fluoro-2-trifluorométhyl-benzonitrile (1,500 g ; 7,93 mmol) dans le DMF anhydre (20 mL). La suspension est agitée pendant 24 h à 65°C. L'acétate d'éthyle est ajouté au mélange refroidi à température ambiante. Un précipité se forme et est filtré sur célite. Le filtrat est évaporé pour donner une pâte jaune (5,062 g) qui est purifiée sur colonne (éluant : acétate d'éthyle / éther de pétrole 1:1). Un solide blanc correspondant au produit **40** est obtenu (1,200 g ; 50,9%). R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:1) : 0,31. Mp : 210-211°C (littérature : 208-210°C¹⁴³).

IR (KBr) : 3336 (NH), 2242 (CN), 1789 et 1727 (2 CO) cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) : δ = 1,47 (6H, s, (CH₃)₂), 8,05 (1H, dd, H5, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 1,8 Hz), 8,23 (1H, d, H3, ⁴J = 1,8 Hz), 8,34 (1H, d, H6, ³J = 8,4 Hz), 8,87 (1H, s, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, acétone-d₆) : δ = 25,7 (2 CH₃); 59,6 (C4'); 108,6 (C1); 116,4 (CN); 123,4 (q, CF₃, J = 271,4 Hz); 124,7 (C3); 130,4 (C5); 133,6 (q, C2); 137,0 (C6); 138,9 (C4); 154,5 (C2'); 177,1 (C5').

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = CH₃CN/H₂O 75/25 ; Temps de rétention = 4,93 min ; Pureté = 99,47%.

Synthèse du 4-(3'-[ortho-(tert-butyl)diméthylsilyloxyméthyl]-ferrocénylméthyl-4',4'-diméthyl-2',5'-dioxo-1'-imidazolidinyl)-2-trifluorométhyl-benzonitrile (41) : Le produit **40** (0,402 g ; 1,35 mmol) est dissout dans le DMF anhydre (10 mL). De l'hydrure de sodium NaH (0,060 g ; 1,1 équivalent) est ajouté à température ambiante, par portions, à la solution. La solution est agitée à 50°C pendant 1 h, puis à reflux pendant 1 h. Le mélange est refroidi à température ambiante et une solution du tosylate **39** (0,765 g ; 1,1 équivalent) dissout dans le DMF anhydre (20 mL) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 3 h. Il

¹⁴³ Cogan P.S., Koch T.H., *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 5258.

est refroidi à température ambiante et de l'eau et de l'éther sont ajoutés. La solution est extraite à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Une huile foncée (1,043 g) est obtenue et est purifiée sur colonne (éluant : éther/éther de pétrole 1:2). Un solide jaune correspondant au produit **41** est obtenu (0,282 g ; 32,6%). Il est recristallisé dans dichlorométhane/hexane. R_f (éther/éther de pétrole 1:2) : 0,30. Mp : 168-170°C.

IR (KBr) : 2228 (CN), 1778 et 1715 (2 CO) cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 0,06 (3H, s, Si(CH₃)₂), 0,07 (3H, s, Si(CH₃)₂), 0,85 (9H, s, *tert*-butyl), 1,36 (3H, s, CH₃), 1,40 (3H, s, CH₃), 4,13 (5H, s, C₅H₅), 4,13-4,15 (1H, m, C₅H₃), 4,20 (1H, m, C₅H₃), 4,31 (1H, m, C₅H₃), 4,46 (1H, d, CH₂OSi, ²J = 11,8 Hz), 4,48 (1H, d, CH₂N, ²J = 15,2 Hz), 4,64 (1H, d, CH₂OSi, ²J = 11,8 Hz), 4,70 (1H, d, CH₂N, ²J = 15,2 Hz), 7,91 (1H, d, H₆, ³J = 8,4 Hz), 8,02 (1H, dd, H₅, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 2,0 Hz), 8,18 (1H, d, H₃, ⁴J = 2,0 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = -5,2 et -5,0 (SiMe₂); 18,4 (SiC(CH₃)₃); 23,2 (2 CH₃); 26,0 (C(CH₃)₃); 37,7 (CH₂N); 59,8 (CH₂OSi); 61,8 (C^{4'}); 67,6 (1C, C₅H₃); 69,4 (C₅H₅); 70,1 (1C, C₅H₃); 70,3 (1C, C₅H₃); 82,6 (C_{ipso} (CH₂N), C₅H₃); 86,0 (C_{ipso} (CH₂OSi), C₅H₃); 108,1 (C1); 115,2 (CN); 122,4 (q, CF₃); 122,9 (C3); 127,8 (C5); 134,0 (q, C2); 135,2 (C6); 136,8 (C4); 152,6 (C2'); 175,1 (C5').

MS (*m/z*; EI) : 639 [M⁺].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = CH₃CN ; Temps de rétention = 6,44 min ; Pureté = 100%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour C₃₁H₃₆F₃FeN₃O₃Si : C 58,22, H 5,67, N 6,57 ; trouvée : C 58,76, H 5,86, N 6,22.

Synthèse du 4-[4',4'-diméthyl-2',5'-dioxo-1'-imidazolidinyl-(3'-*ortho*-méthoxyméthylferrocénylméthyl)]-2-trifluorométhyl-benzonitrile (42**)** : La réaction de déprotection de l'alcool n'a pas été effectuée sous argon. Le produit **41** (0,106 g ; 0,166 mmol) est dissout dans un mélange méthanol/THF (10 mL). Une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 2 N (0,200 mL ; 2,3 équivalents) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 30 minutes. La solution est versée dans l'eau et est extraite avec le dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée pour donner une huile orange (0,106 g). Cette huile est cristallisée dans le pentane, puis est recristallisée dans éther/pentane. Un solide jaune orangé correspondant au produit **42** est obtenu (0,072 g ; 82,8%). R_f (éther/éther de pétrole 2:1) : 0,56. Mp : 140-142°C.

IR (KBr) : 2228 (CN), 1777 et 1718 (2 CO) cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 1,28 (3H, s, CH₃), 1,43 (3H, s, CH₃), 3,28 (3H, s, OCH₃), 4,10 (1H, d, CH₂OCH₃, ²J = 11,0 Hz), 4,15 (5H, s, C₅H₅), 4,15-4,17 (1H, m, C₅H₃), 4,27-4,31 (2H, m, C₅H₃), 4,32 (1H, d, CH₂N, ²J = 15,3 Hz), 4,59 (1H, d, CH₂OCH₃, ²J = 11,0 Hz), 4,86 (1H, d, CH₂N, ²J = 15,3 Hz), 7,91 (1H, d, H₆, ³J = 8,5 Hz), 7,99 (1H, dd, H₅, ³J = 8,5 Hz, ⁴J = 2,0 Hz), 8,15 (1H, d, H₃, ⁴J = 2,0 Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 22,9 (CH_3); 23,6 (CH_3); 37,8 (CH_2N); 58,1 (CH_2OCH_3); 62,0 ($\text{C}4'$); 67,7 (1C, C_5H_3); 69,4 (1C, C_5H_3); 69,6 (C_5H_5); 71,0 (1C, C_5H_3); 71,3 (OCH_3); 82,5 (C_{ipso} (CH_2N), C_5H_3); 83,6 (C_{ipso} (CH_2OCH_3), C_5H_3); 108,6 (C1); 115,7 (CN); 123,3 (C3); 128,1 (C5); 135,4 (C6); 137,0 (C4); 153,3 ($\text{C}2'$); 175,2 ($\text{C}5'$).

MS (m/z ; EI) : 539 [M^+].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 80/20 ; Temps de rétention = 8,39 min ; Pureté = 97,67%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{FeN}_3\text{O}_3$: C 57,90, H 4,49, N 7,79 ; trouvée : C 57,77, H 4,41, N 7,74.

Synthèse du 4-[4',4'-diméthyl-2',5'-dioxo-3'-*ortho*-hydroxyméthyl-ferrocénylméthyl-1'-imidazolidinyl]-2-trifluorométhyl-benzonitrile (43) : Le produit **41** (0,100 g ; 0,156 mmol) est dissout dans le THF (5 mL). Une solution de fluorure de tétrabutylammonium TBAF 1 M dans le THF (0,300 mL ; 2 équivalents) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 45 minutes. L'eau et le dichlorométhane sont ajoutés et la solution est extraite avec le dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée pour donner une huile orange (0,120 g) qui est cristallisée dans le pentane, puis recristallisée dans dichlorométhane/hexane. Un solide jaune correspondant au produit **43** est obtenu (0,062 g ; 75,6%). R_f (éther/éther de pétrole 2:1) : 0,24. Mp : 135-137°C.

IR (KBr) : 2232 (CN), 1777 et 1720 (2 CO) cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 1,50 (3H, s, CH_3), 1,56 (3H, s, CH_3), 3,26 (1H, m, OH, J = 13,2 Hz), 4,11 (1H, d, CH_2N , ^2J = 15,3 Hz), 4,18 (5H, s, C_5H_5), 4,20 (1H, m, C_5H_3), 4,27 (1H, m, C_5H_3), 4,34 (1H, m, C_5H_3), 4,38 (1H, m, CH_2OH , ^2J = 13,2 Hz), 4,67 (1H, d, CH_2OH , ^2J = 13,2 Hz), 4,81 (1H, d, CH_2N , ^2J = 15,3 Hz), 7,88 (1H, d, H6, ^3J = 8,4 Hz), 7,92 (1H, dd, H5, ^3J = 8,4 Hz, ^4J = 1,8 Hz), 8,07 (1H, d, H3, ^4J = 1,8 Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 23,0 (CH_3); 24,1 (CH_3); 38,3 (CH_2N); 59,1 (CH_2OH); 62,3 ($\text{C}4'$); 68,2 (C_5H_3); 69,3 (C_5H_5); 70,6 (C_5H_3); 81,4 (C_{ipso} (CH_2N), C_5H_3); 87,1 (C_{ipso} (CH_2OH), C_5H_3); 108,6 (C1); 115,7 (CN); 123,3 (C3); 128,3 (C5); 135,4 (C6); 136,3 (C4); 153,3 ($\text{C}2'$); 174,5 ($\text{C}5'$).

MS (m/z ; EI) : 525 [M^+].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; λ = 254 nm ; Eluant = $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 80/20 ; Temps de rétention = 4,86 min ; Pureté = 98,86%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{FeN}_3\text{O}_3$: C 57,16, H 4,22, N 8,00 ; trouvée : C 56,97, H 4,28, N 7,99.

Synthèse du (n-tributylstannyl)-ferrocène (44)¹⁵⁶ : Une solution de ferrocène (2,000 g ; 10,75 mmol) dans un mélange THF (10 mL)/hexane anhydre (10 mL) est agitée pendant 30 minutes à température ambiante, puis refroidie à 0°C. Une solution de *tert*-BuLi 1,7 M dans le pentane (13,0 mL ; 2 équivalents) est ajoutée goutte à goutte pendant 5 minutes. Le mélange est agité à 0°C pendant 30 minutes, puis le chlorure de n-tributylétain n-Bu₃SnCl (4,4 mL ; 1,5 équivalents) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est agité à température ambiante pendant 1 h 30. Une solution de soude 2 M (10 mL ; 2 équivalents) est ensuite ajoutée. Le produit est extrait avec l'éther et la phase organique est lavée à l'eau salée et à l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Une huile rouge (6,928 g) est obtenue et purifiée sur colonne (éluant : éther de pétrole). Trois fractions sont obtenues.

Une première fraction est une huile orange correspondant au produit distannylé **45** (2,384 g ; 29,0%). R_f (éther de pétrole) : 0,84.

Une deuxième fraction est une huile rouge correspondant au produit **44** (3,195 g ; 63,0%). R_f (éther de pétrole) : 0,72.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 0,92 (9H, t, CH₃), 1,02 (6H, t, CH₂Sn, J = 8,1 Hz), 1,30-1,63 (12H, m, 2CH₂), 4,02 (2H, t, C₅H₄, Hβ, J = 1,5 Hz), 4,10 (5H, s, C₅H₅), 4,33 (2H, t, C₅H₄, Hα, J = 1,5 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 10,4 (CH₂Sn, SnBu₃); 13,9 (CH₃, SnBu₃); 27,6 (CH₂, SnBu₃); 29,4 (CH₂, SnBu₃); 68,1 (C₅H₅); 70,4 (2C, C₅H₄); 74,6 (2C, C₅H₄).

Une dernière fraction est un solide orange correspondant au ferrocène (0,160 g ; 8,0%). R_f (éther de pétrole) : 0,62.

Synthèse du (méta-nitrophényl)-ferrocène (46)¹⁵⁶ : L'iodure de cuivre (CuI) (0,144 g ; 1,2 équivalents) et le dichlorobis(triphénylphosphine)palladium PdCl₂(PPh₃)₂ (0,089 g ; 20% mol) sont solubilisés dans le DMF anhydre (6 mL). Le 3-iodo-nitrobenzène (0,189 g ; 1,2 équivalents) est ajouté à la solution qui est agitée pendant 30 minutes à reflux. La solution est refroidie à température ambiante et une solution du produit **44** (0,300 g ; 0,63 mmol) dans le DMF anhydre (6 mL) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 2 h, puis refroidi à température ambiante. Le mélange est filtré sur célite et le filtrat est extrait à l'éther. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique, de l'eau salée et de l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée pour donner un résidu (0,413 g) qui est purifié sur colonne (éluant : éther/éther de pétrole 1:10). Un solide rouge correspondant au produit de couplage **46** est obtenu (0,085 g ; 44,0%). R_f (éther/éther de pétrole 1:10) : 0,42. Mp : 86-88°C.

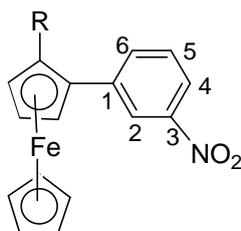
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 4,06 (5H, s, C₅H₅), 4,41 (2H, t, C₅H₄, Hβ, J = 1,8 Hz), 4,72 (2H, t, C₅H₄, Hα, J = 1,8 Hz), 7,44 (1H, t, H5, ³J = 8,1 Hz), 7,76 (1H, dt, H6, ³J = 8,1 Hz, ⁴J = 1,8 Hz), 8,03 (1H, dt, H4, ³J = 8,1 Hz, ⁴J = 1,8 Hz), 8,28 (1H, t, H2, ⁴J = 1,8 Hz).

¹⁵⁶ Guillaneux D., Kagan H.B., *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 2502.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : $\delta = 66,9$ (2C, C_5H_4); 69,9 (C_5H_5); 70,0 (2C, C_5H_4); 82,6 (C_{ipso} , C_5H_4); 120,5 (C4); 120,6 (C2); 129,4 (C5); 131,8 (C6); 142,3 (C1); 149,0 (C3).

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; $\lambda = 254$ nm ; Eluant = $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 80/20 ; Temps de rétention = 9,27 min ; Pureté = 97,51%.

Analyse élémentaire calculée (%) pour $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{FeNO}_2$: C 62,57, H 4,27, N 4,56 ; trouvée : C 62,36, H 4,08, N 4,58.



Synthèse du 1-dioxanyl-2-(n-tributylstannyl)-ferrocène (47)¹⁵⁶ : Le 2-ferrocényldioxane **33** (0,988 g ; 3,63 mmol) est dissout dans l'éther (60 mL). La solution est refroidie à -78°C et une solution de *tert*-BuLi 1,7 M dans le pentane (2,400 mL ; 1,1 équivalents) est ajoutée lentement. La solution est agitée pendant 2 h de -78°C à -10°C . La solution est refroidie à -78°C et le chlorure de n-tributylétain $n\text{-Bu}_3\text{SnCl}$ (2,000 mL ; 2 équivalents) est ajouté. Le mélange est agité pendant 1 h jusqu'à -10°C , puis à température ambiante pendant 1 h 30. De l'eau est ajoutée et la solution est extraite à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée pour donner une huile rouge (3,434 g) qui est purifiée sur colonne (éluant : éther/éther de pétrole 1:10). Trois fractions sont obtenues.

Une première fraction est une huile orange correspondant au produit distannylé **48** (0,630 g ; 20,4%). R_f (éther/éther de pétrole 1:10) : 0,83.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : $\delta = 0,92$ (18H, t, CH_3), 1,02 (12H, t, CH_2Sn), 1,26-1,42 (13H, m, $\text{CH}_2 + \text{CH}_2$ acétal), 1,51-1,70 (12H, m, CH_2), 2,10-2,20 (1H, m, CH_2 acétal), 3,94 (5H, m, (2H, CH_2 acétal) + (2H, C_5H_4 , H β) + 1H, C_5H_3), 4,06 (1H, s, C_5H_3), 4,16 (2H, m, CH_2 acétal), 4,27 (2H, m, C_5H_4 , H α), 4,42 (1H, s, C_5H_3), 5,33 (1H, s, CH acétal).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : $\delta = 10,3$ et $11,0$ (2 CH_2Sn , SnBu_3); 13,8 (CH_3 , SnBu_3); 25,9 (CH_2 acétal); 27,8 (CH_2 , SnBu_3); 29,5 (CH_2 , SnBu_3); 67,1 (CH_2 acétal); 69,0, 70,5, 71,4, 72,2, 74,5, 74,7 et 75,5 (7 CH ferrocène); 101,5 (CH acétal).

Une deuxième fraction est une huile orange correspondant au produit **47** (0,640 g ; 31,4%). R_f (éther/éther de pétrole 1:10) : 0,55.

¹⁵⁶ Guillaneux D., Kagan H.B., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 2502.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 0,92 (9H, t, CH_3), 1,05 (6H, m, CH_2Sn), 1,27-1,42 (7H, m, $\text{CH}_2 + \text{CH}_2$ acétal), 1,51-1,65 (6H, m, CH_2), 2,04-2,17 (1H, m, CH_2 acétal), 3,87 (2H, m, CH_2 acétal), 3,98 (1H, dd, C_5H_3 , $J = 2,4$ Hz, $J = 1,2$ Hz), 4,12 (5H, s, C_5H_5), 4,16 (2H, m, CH_2 acétal), 4,27 (1H, t, C_5H_3 , $J = 2,4$ Hz), 4,48 (1H, dd, C_5H_3 , $J = 2,4$ Hz, $J = 1,2$ Hz), 5,32 (1H, s, CH acétal).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 11,0 (CH_2Sn , SnBu_3); 13,8 (CH_3 , SnBu_3); 26,0 (CH_2 acétal); 27,8 (CH_2 , SnBu_3); 29,5 (CH_2 , SnBu_3); 67,2 (CH_2 acétal); 68,3 (C-Sn, C_5H_3); 68,8 (C_5H_5); 70,3 (C_5H_3); 74,8 (C_5H_3); 91,5 (C_{ipso} , C_5H_3); 101,4 (CH acétal).

Une dernière fraction est un solide orange correspondant au 2-ferrocényl-dioxane **33** (0,458 g ; 46,4%). R_f (éther/éther de pétrole 1:10) : 0,24.

Synthèse du 1-dioxanyl-2-(méta-nitrophényl)-ferrocène (49) : L'iodure de cuivre (CuI) (0,246 g ; 1,2 équivalents) et le dichlorobis(triphénylphosphine)palladium $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0,151 g ; 20% mol) sont dissouts dans le DMF anhydre (15 mL). Le 3-iodo-nitrobenzène (0,322 g ; 1,2 équivalents) est ajouté à la solution qui est agitée pendant 30 minutes à reflux. La solution est refroidie à température ambiante et une solution du produit **47** (0,604 g ; 1,08 mmol) dans le DMF anhydre (12 mL) est ajoutée. Le mélange est agité à reflux pendant 3 h, puis refroidi à température ambiante. Il est filtré sur célite et le filtrat est extrait à l'éther. La phase organique est lavée avec de l'eau salée et de l'eau. Elle est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée pour donner un résidu (0,567 g) qui est purifié sur colonne (éluant : dichlorométhane /éther de pétrole 1:1, puis 3:1). Une fraction correspondant au produit de couplage **49** est obtenue (0,068 g ; 16,1%). R_f (dichlorométhane/éther de pétrole 3:1) : 0,44.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 1,56 (1H, m, CH_2 acétal), 2,17-2,32 (1H, m, CH_2 acétal), 3,98 (2H, m, CH_2 acétal), 4,13 (5H, s, C_5H_5), 4,29 (2H, m, CH_2 acétal), 4,35 (1H, t, C_5H_3 , $J = 2,4$ Hz), 4,55 (1H, dd, C_5H_3 , $J = 2,4$ Hz, $J = 1,5$ Hz), 4,63 (1H, dd, C_5H_3 , $J = 2,4$ Hz, $J = 1,5$ Hz), 5,46 (1H, s, CH acétal), 7,46 (1H, t, H_5 , $^3J = 8,1$ Hz), 7,94 (1H, dd, H_6 , $^3J = 8,1$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz), 8,07 (1H, dd, H_4 , $^3J = 8,1$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz), 8,61 (1H, t, H_2 , $^4J = 2,0$ Hz).

Synthèse du 1-formyl-2-(méta-nitrobenzène)-ferrocène (51) : Le 2-ferrocényl-dioxane **33** (0,500 g ; 1,84 mmol) est dissout dans le THF (15 mL). La solution est refroidie à -78°C pendant 10 minutes et une solution de *sec*-BuLi 1,4 M dans le cyclohexane (1,500 mL ; 1,1 équivalents) est ajoutée. La solution est agitée pendant 20 minutes à -78°C , puis pendant 2 h de -78°C à -10°C . La solution est refroidie à -78°C et une solution de chlorure de zinc ZnCl_2 anhydre (0,250 g ; 1 équivalent), séché sous vide à 150°C , dans le THF (20 mL) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité pendant 1 h de -78°C jusqu'à température ambiante.

Pendant ce temps, le catalyseur de la réaction a été préparé. En effet, une solution contenant le complexe de palladium (II), $\text{Pd}(\text{Cl})_2(\text{PPh}_3)_2$, (0,064 g ; 5% mol) dans le THF (10 mL) est préparée. Ensuite, une solution d'hydrure de diisobutyl aluminium DIBAL-H 1 M dans le toluène (0,190 mL ; 2 équivalents par rapport au $\text{Pd}(\text{Cl})_2(\text{PPh}_3)_2$) est ajoutée à température ambiante. Le mélange est agité à température ambiante pendant 30 minutes. Il se forme un complexe de palladium (0).

Ensuite, une solution de 3-iodo-nitrobenzène (0,320 g ; 0,7 équivalent) dans le THF (30 mL) est ajoutée à la solution de catalyseur, suivie par la solution contenant le dérivé zincique **50**. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h, puis à reflux pendant 1 h. Il est refroidi à température ambiante, puis une solution aqueuse d'acide chlorhydrique et du dichlorométhane sont ajoutés. Cette solution est extraite avec le dichlorométhane et est lavée à l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée pour donner une huile rouge foncée (0,855 g). Cette huile est purifiée sur colonne (éluant : éther/éther de pétrole 1:2, puis 1:1). Trois fractions sont obtenues.

Une première fraction est une huile foncée correspondant au 3-iodo-nitrobenzène (0,254 g ; 55,5%). Elle est cristallisée dans éther/pentane pour donner un solide blanc. R_f (éther/éther de pétrole 1:2) : 0,89.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 7,29 (1H, t, H5, ³J = 8,1 Hz), 8,03 (1H, qd, H6, ³J = 8,1 Hz, ⁴J = 2,4 Hz, ⁴J = 1,2 Hz), 8,20 (1H, qd, H4, ³J = 8,1 Hz, ⁴J = 2,4 Hz, ⁴J = 1,2 Hz), 8,57 (1H, t, H2, ⁴J = 2,4 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 93,6 (C1); 122,9 (C4); 130,8 (C5); 132,6 (C2); 143,6 (C6); 148,2 (C3).

Une deuxième fraction est un solide rouge correspondant au produit d'hydrolyse du 2-ferrocényl-dioxane **33**, c'est-à-dire le ferrocénecarboxaldéhyde (0,270 g ; 68,7%). R_f (éther / éther de pétrole 1:2) : 0,58.

Une dernière fraction est une huile rouge correspondant au produit **51** (0,187 g ; 30,4%). R_f (éther/éther de pétrole 1:2) : 0,48.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ = 4,29 (5H, s, C₅H₅), 4,79 (1H, t, C₅H₃, J = 2,7 Hz), 4,94 (1H, dd, C₅H₃, J = 2,7 Hz, J = 1,2 Hz), 5,03 (1H, dd, C₅H₃, J = 2,7 Hz, J = 1,2 Hz), 7,52 (1H, t, H5, ³J = 8,1 Hz), 7,88 (1H, d, H6, ³J = 8,1 Hz), 8,16 (1H, dd, H4, ³J = 8,1 Hz, ⁴J = 1,8 Hz), 8,45 (1H, t, H2, ⁴J = 1,8 Hz), > 10,00 (1H, s, CHO).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 71,2 (1C, C₅H₃); 71,6 (C₅H₅); 72,8 (1C, C₅H₃); 76,0 (1C, C₅H₃); 89,0 et 91,7 (2C_{ipso}, C₅H₃); 122,2 (C4); 124,3 (C2); 129,2 (C5); 135,6 (C6); 139,2 (C1); 151,5 (C3); 192,3 (CHO).

Synthèse du 1-(méta-aminophényl)-2-hydroxyméthyl-ferrocène (52) : La réaction de réduction n'a pas été effectuée sous argon. L'aldéhyde **51** (0,174 g ; 0,519 mmol) est dissout dans un mélange méthanol (10 mL)/dichlorométhane (5 mL). Une solution de borohydrure de sodium NaBH₄ (0,079 g ; 4 équivalents) dans de l'eau (5 mL) est ajoutée à la solution d'aldéhyde. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 30 minutes. De l'eau est ajoutée et la solution est extraite avec le dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Une huile orange est obtenue (0,155 g ; 96,9%) et est cristallisée dans éther/pentane pour donner un solide orange correspondant au produit **52**. R_f (éther/éther de pétrole 1:1) : 0,22. Mp : 106-108°C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 4,10 (5H, s, C_5H_5), 4,24 (1H, t, C_5H_3 , $J = 2,4$ Hz), 4,35 (1H, dd, C_5H_3 , $J = 2,4$ Hz, $J = 1,5$ Hz), 4,49 (1H, dd, C_5H_3 , $J = 2,4$ Hz, $J = 1,5$ Hz), 4,53 (1H, d, CH_2OH , $^2J = 12,0$ Hz), 4,60 (1H, d, CH_2OH , $^2J = 12,0$ Hz), 6,59 (1H, dd, H6, $^3J = 7,8$ Hz, $^4J = 1,2$ Hz), 6,94 (1H, t, H2, $^4J = 1,2$ Hz), 7,02 (1H, dd, H4, $^3J = 7,8$ Hz, $^4J = 1,2$ Hz), 7,11 (1H, t, H5, $^3J = 7,8$ Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 60,0 (CH_2OH); 67,5 (C_5H_3); 69,9 (C_5H_5); 70,7 (C_5H_3); 84,8 (C_{ipso} (aromatique), C_5H_3); 87,9 (C_{ipso} (CH_2OH), C_5H_3); 113,5 (C4); 115,6 (C2); 119,6 (C6); 129,2 (C5); 139,2 (C1); 146,3 (C3).

MS (m/z ; EI) : 307 [M^+].

HPLC analytique : Colonne Kromasil C18 10 μm L = 25 cm D = 4,6 mm ; Débit = 1 mL / min ; $\lambda = 254$ nm ; Eluant = $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 80/20 ; Temps de rétention = 3,36 min ; Pureté = 99,09%.

Conclusion Générale

Ce rapport de thèse présente les synthèses de plusieurs analogues d'anti-androgènes non stéroïdiens. Ces analogues contiennent un groupement organométallique, le ferrocène, qui est constitué de deux cycles cyclopentadiényles complexés par un atome de fer. Ces analogues ferrocéniques de molécules biologiquement actives ont fait l'objet d'études biologiques. Elles ont été effectuées sur les récepteurs des androgènes AR (RBA) et sur des lignées cellulaires prostatiques tumorales hormono-dépendantes LNCaP et hormono-indépendantes PC3 (tests anti-prolifératifs et calcul des IC_{50}).

Le premier chapitre de ce rapport rappelle quelques notions élémentaires pour la situation de ce travail. Il rappelle, d'une part, ce que sont les stéroïdes, et tout particulièrement les androgènes, et leurs rôles joués dans les cancers de la prostate hormono-dépendants. D'autre part, il introduit le concept des anti-androgènes (Figure 44) et présente les différents types d'anti-androgènes existants. Enfin, il rappelle ce que sont les récepteurs à androgènes AR et les études portant sur la relation structure/activité des ligands vis-à-vis de ces récepteurs.

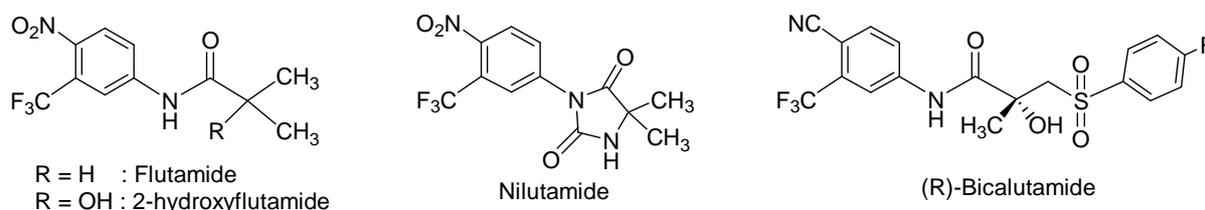


Figure 44 : Anti-androgènes non stéroïdiens commerciaux

Dans le second chapitre, la synthèse des premiers analogues ferrocéniques de la flutamide et de la bicalutamide a été proposée (Figure 45). Les tests biologiques effectués au cours de ce travail ont démontré l'existence de deux molécules prometteuses, les analogues **7** et **16**, pour le traitement du cancer de la prostate. En effet, ces composés, même si ils sont moins bien reconnus par le récepteur AR que le 2-hydroxyflutamide, exhibent une activité anti-tumorale importante surtout sur des cellules hormono-indépendantes. Ces résultats ont été confirmés par des valeurs d' IC_{50} de l'ordre de 10 μ M.

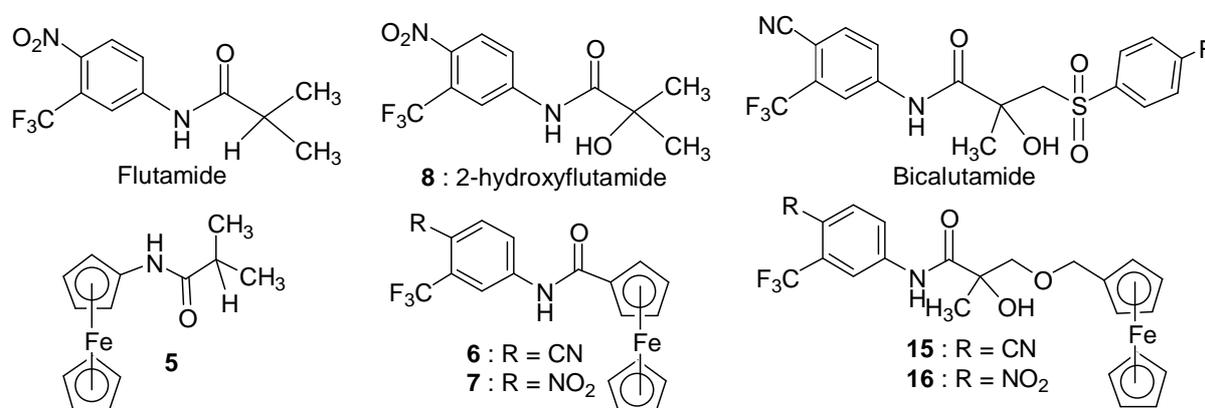
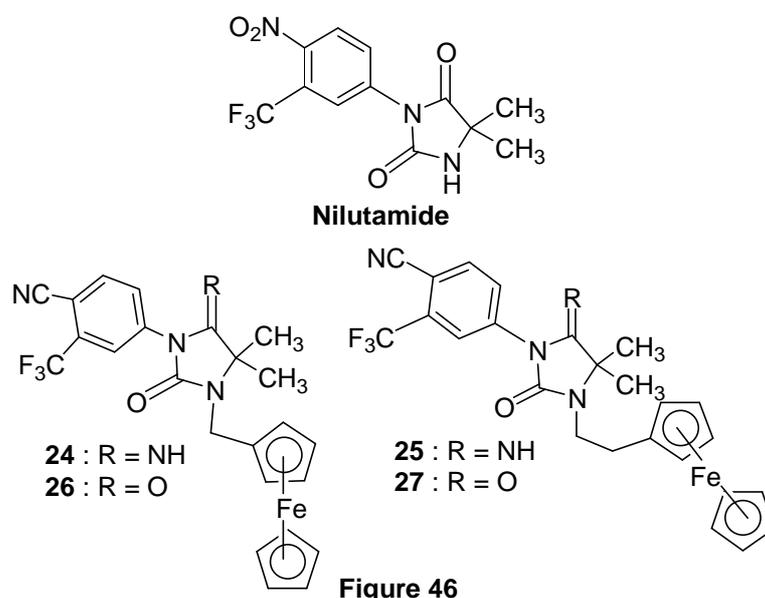
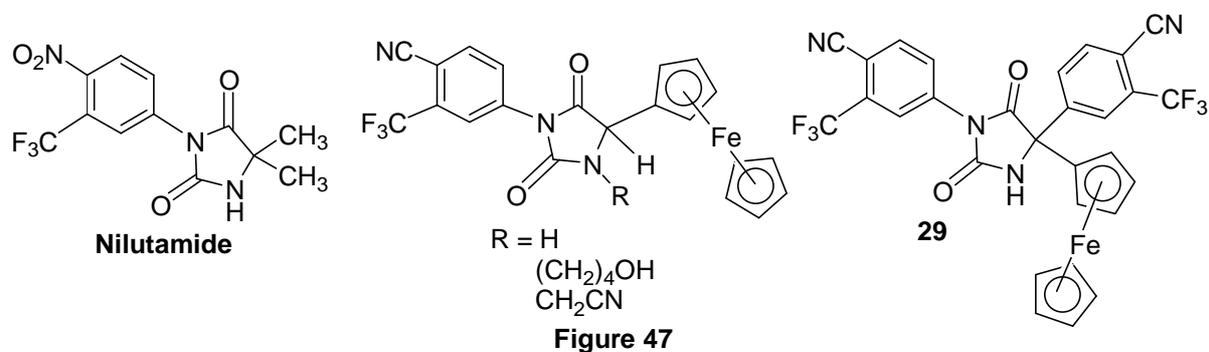


Figure 45

Le troisième chapitre présente la synthèse des premiers dérivés ferrocéniques de la nilutamide. Or, la nilutamide est un composé intéressant du point de vue structural, dans la mesure où le NH libre du noyau hydantoïne a été modifié avec une large variété de substituants qui ont abouti à une amélioration de l'affinité relative de liaison au récepteur AR. C'est pourquoi, dans une première partie, la synthèse d'analogues N-ferrocénylalkyles de la nilutamide a été entreprise (Figure 46). Ce choix s'est avéré judicieux, puisque les tests biologiques ont démontré l'existence d'une molécule prometteuse, l'analogue **26**, pour le traitement du cancer de la prostate. En effet, ce composé, en plus d'avoir une affinité de liaison envers le récepteur AR plus importante que la nilutamide (environ 10 fois supérieure), exhibe une activité anti-tumorale plus importante, aussi bien sur des cellules hormono-dépendantes que hormono-indépendantes. Ces résultats ont été confirmés par une valeur d'IC₅₀ de l'ordre de 10 μM.



Des études antérieures ont démontré que des analogues organiques N-hydroxyalkyles et N-cyanométhyles de la nilutamide avaient une affinité de liaison importante pour AR, ainsi qu'une activité anti-androgénique importante. C'est pourquoi la synthèse de nouveaux analogues ferrocéniques a été envisagée, dans une deuxième partie. Ces analogues conservent la même chaîne alkyle et le ferrocène a été incorporé à la place du groupement diméthyle. La synthèse de tels analogues a été effectuée en série racémique. Le composé **29** a été obtenu et a



été testé (Figure 47). Cette molécule s'est avérée être très prometteuse d'un point de vue biologique. En effet, même si son affinité de liaison au récepteur AR est faible, elle a démontré une excellente activité anti-tumorale, à une dose de 1.10^{-5} M, vis-à-vis de cellules PC3. Ce résultat, couplé à une valeur d'IC₅₀ sur les cellules PC3 égale à $6,03 \pm 0,15$ μ M, laisserait supposer que le composé **29** aurait un mécanisme d'action différent de celui de la nilutamide. Une autre cible présente dans les cellules tumorales de la prostate devrait donc être reconnue pour pouvoir expliquer son efficacité potentielle envers des cellules PC3.

Compte tenu des résultats obtenus pour la molécule **29**, la synthèse de l'analogue organique **31** (Figure 48), contenant un groupe phényle à la place du ferrocène, a ensuite été envisagée. La synthèse de cet analogue a été effectuée en série racémique et a été réalisée selon un mode opératoire identique à la synthèse précédente. Une fois purifiée, la molécule **31** sera soumise aux tests biochimiques pour évaluer l'influence du ferrocène sur l'action anti-tumorale vis-à-vis de cellules cancéreuses prostatiques.

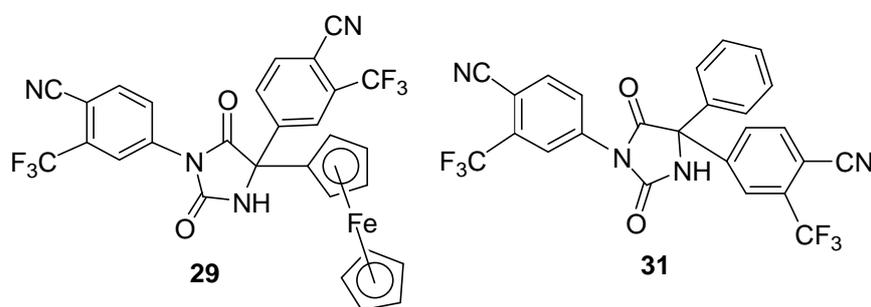


Figure 48

Comme le composé **26** semble être un point de départ intéressant pour le développement de nouvelles molécules potentiellement actives contre le cancer de la prostate, le dernier chapitre présente la synthèse des premiers dérivés ferrocéniques de la nilutamide **42** et **43**, contenant un ferrocène 1,2-disubstitué (Figure 49). Comme la molécule **26**, le ferrocène est incorporé au niveau de la chaîne N-alkyle, mais comprend en plus un substituant méthoxy ou alcool en position 2. Ces fonctions ont été introduites pour vérifier si elles exercent une influence au niveau de l'affinité de liaison au récepteur AR et au niveau de l'activité anti-tumorale vis-à-vis de cellules cancéreuses. La synthèse de ces analogues a été effectuée en série racémique, en appliquant la méthode générale de synthèse des ferrocènes 1,2-disubstitués. Les tests biologiques ont ensuite été réalisés sur ces molécules. Les composés **42** et **43** ont une affinité

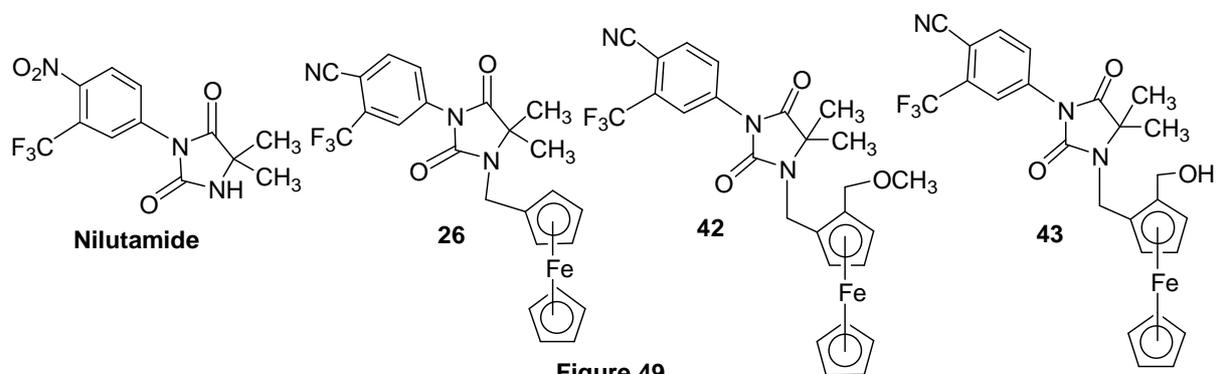


Figure 49

de liaison au récepteur AR inférieure à leur homologue monosubstitué **26**. Ce résultat suggère que la présence de substituants hydrophiles méthoxy et alcool, au sein de la poche hydrophobe du récepteur, déstabiliserait la reconnaissance de AR pour le ligand. D'autre part, les études anti-prolifératives, effectuées sur les cellules PC3, ont montré des résultats significatifs pour les deux molécules. En effet, elles ont démontré une activité anti-tumorale comparable avec celle de leur analogue monosubstitué **26**, à une dose de 1.10^{-5} M. Enfin, les résultats d' IC_{50} sur les cellules PC3 confirment l'importance d'un substituant oxygéné sur le ferrocène pour augmenter l'efficacité du produit. En effet, les deux analogues possèdent des valeurs d' IC_{50} inférieures à celle du composé **26**.

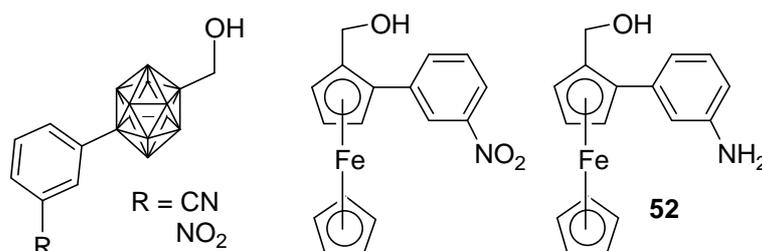


Figure 50

Dans un deuxième temps, ce chapitre présente une classe d'anti-androgènes non stéroïdiens récemment découverte, les carboranes. En effet, des tests RBA sur le récepteur AR et des études anti-prolifératives ont été effectués sur plusieurs dérivés carboranes. Ces études ont démontré l'importance au niveau de l'affinité de deux entités, un cyanophényle ou un nitrophényle, et un groupe hydroxyle. En effet, il a été montré que les valeurs optimales de RBA sur le récepteur AR ont été relevées pour des carboranes contenant à la fois un noyau aromatique, avec un groupe CN ou NO_2 en position *mé*ta, et une chaîne hydroxyméthyle. De plus, ces composés possèdent aussi une activité anti-androgénique très intéressante, environ 10 fois supérieure à celle du 2-hydroxyflutamide. Par conséquent, la synthèse d'un analogue ferrocénique racémique, contenant un ferrocène 1,2-disubstitué à la place du carborane, a été effectuée. Cette synthèse est intéressante dans la mesure où elle nous a permis de tester plusieurs réactions de couplage catalysées par des complexes de palladium. Cette étape clé a été optimisée et, après réduction de l'aldéhyde, un autre composé, le produit **52**, (Figure 50), a été obtenu. Les études biologiques concernant cette molécule sont en cours.

Parmi les composés synthétisés, les molécules **7**, **16**, **26**, **27**, **29**, **42** et **43**, se sont révélées intéressantes au niveau de leur activité anti-tumorale envers des cellules prostatiques. En

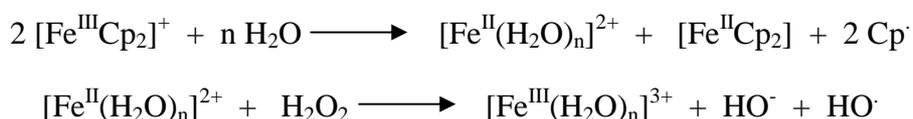
Molécule	IC_{50} PC3 (μM)	IC_{50} MDA-MB231 (μM)
7	$30,5 \pm 1,4$	$20,3 \pm 0,3$
16	$16,8 \pm 2,0$	$28,5 \pm 1,4$
26	$68,1 \pm 28,0$	$81,6 \pm 2,3$
27	$67,2 \pm 2,0$	$140,0 \pm 3,0$
29	$6,03 \pm 0,15$	$7,37 \pm 0,12$
42	$39,3 \pm 1,1$	-
43	$16,4 \pm 0,6$	-

Tableau 5 : Valeurs d' IC_{50} sur des cellules PC3 et MDA-MB231

effet, leurs valeurs d'IC₅₀ sur des cellules PC3 sont comprises entre 6 et 70 µM (Tableau 5). Ces résultats démontrent une cytotoxicité accrue de ces dérivés ferrocéniques en comparaison avec les anti-androgènes commerciaux. Par conséquent, le ferrocène jouerait un rôle majeur dans la destruction de cellules cancéreuses. Le mécanisme d'action des ferrocènes sur la destruction de ces cellules est en cours d'études. On sait maintenant que cette activité cytotoxique est due à l'ion ferricinium généré par l'oxydation du ferrocène.^{4, 161} Les études électrochimiques et spectroscopiques (RPE) menées par Osella et al. semblent montrer que les dérivés ferrocéniques agissent selon le mécanisme de la réaction de Fenton.^{162, 163} Cette réaction fait intervenir le Fe^{II} dans la génération du radical hydroxyle HO· à partir de l'eau oxygénée H₂O₂, selon le mécanisme suivant.



Osella a montré que la dégradation de l'ion ferricinium dans l'eau conduit à la formation du complexe [Fe^{II}(H₂O)_n]²⁺ et de Cp·. Ce complexe déclencherait donc la réaction de Fenton conduisant à la destruction des cellules cancéreuses par le radical HO·, généré, selon le mécanisme suivant.



Un autre mécanisme d'action des ferrocènes est également à l'étude au laboratoire. Les expériences électrochimiques menées sur des dérivés ferrocéniques d'anti-oestrogènes de type hydroxyferrocifène, contenant un groupe phénol, favorisent la formation d'un quinone méthide (QM) responsable de la destruction des cellules cancéreuses du sein.¹⁶⁴ Ce mécanisme d'oxydation se fait en présence de pyridine, utilisée en tant que base, et est présenté sur le Schéma 35.

Cette réaction est possible uniquement dans le cas où le groupe ferrocénique est en conjugaison avec un groupe phénol. Or, les dérivés ferrocéniques synthétisés dans ce rapport ne présentent pas ce type de structure. Par conséquent, les composés **7**, **16**, **26**, **27**, **29**, **42** et **43** ne peuvent pas agir selon ce dernier mécanisme. Par contre, leur action selon la réaction de Fenton reste encore plausible.

⁴ Köpf-Maier P., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1994**, 47, 1.

¹⁶¹ Tamura H., Miwa M., *Chem. Lett.*, **1997**, 1177.

¹⁶² Osella D., Ferrali M., Zanello P., Laschi F., Fontani M., Nervi C., Cavigliolo G., *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, 306, 42.

¹⁶³ Tabbi G., Cassino C., Cavigliolo G., Colangelo D., Ghiglia A., Viano I., Osella D., *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 5786.

¹⁶⁴ Hillard E., Vessières A., Thouin L., Jaouen G., Amatore C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 285.

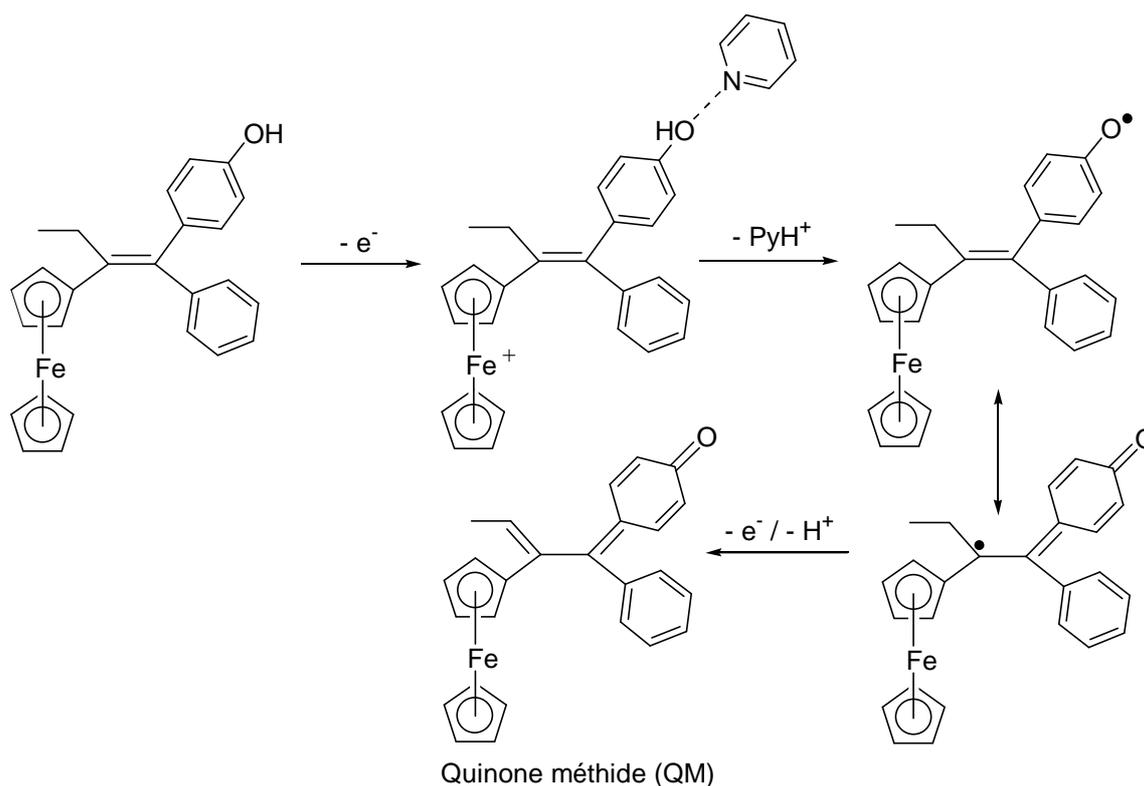


Schéma 35 : Mécanisme d'oxydation d'un hydroxyferrocène en un quinone méthide

Par ailleurs, des études menées sur plusieurs sels ferricinium ont montré que la cytotoxicité des molécules dépendait de la stabilité en milieu aqueux et du caractère hydrophobe des composés.^{162, 163} En effet, plus une molécule est stable et hydrophobe, plus un nombre important de molécules actives serait diffusé à travers la cellule pour produire des radicaux HO \cdot et ainsi induire la destruction des cellules tumorales. Ainsi, on peut supposer que la cytotoxicité importante du composé **29** (IC₅₀ = 6,03 ± 0,15 μM) serait due à la grande stabilité de son sel ferricinium en milieu aqueux et à une hydrophobicité supérieure aux autres dérivés ferrocéniques (log Po/w = 6,47).

En outre, les molécules **16**, **26**, **27**, **29**, **42** et **43** se caractérisent par une faible affinité de liaison vis-à-vis de AR. Certaines d'entre elles présentent une chiralité. Cette chiralité est due à la présence, soit d'un carbone asymétrique, soit d'un ferrocène disubstitué (chiralité plane). Or, la synthèse de toutes les molécules chirales a été réalisée exclusivement en série racémique. Ceci pourrait expliquer en partie les faibles valeurs de RBA obtenues durant ce travail. Par conséquent, une des suites logiques de ce travail est d'envisager à l'avenir le développement de ces produits chiraux en série énantiomériquement pure (Figure 51).

¹⁶² Osella D., Ferrali M., Zanello P., Laschi F., Fontani M., Nervi C., Cavigliolo G., *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, 306, 42.

¹⁶³ Tabbi G., Cassino C., Cavigliolo G., Colangelo D., Ghiglia A., Viano I., Osella D., *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 5786.

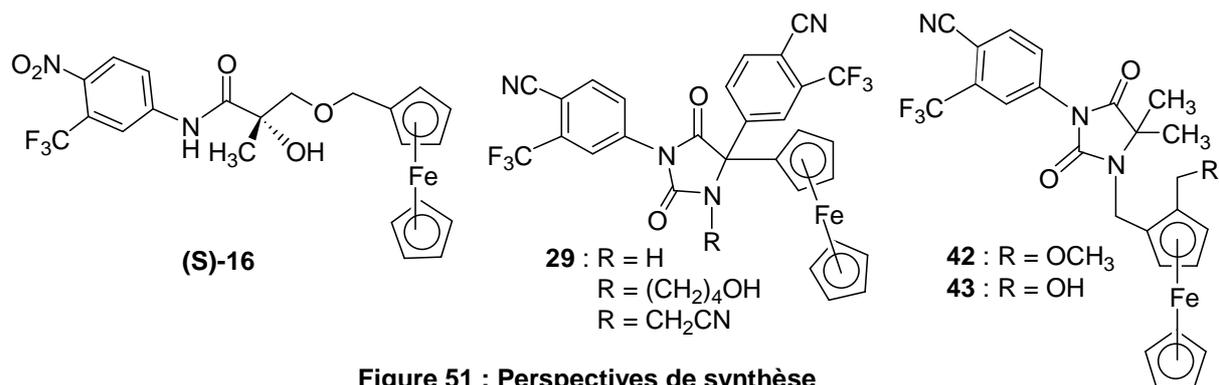


Figure 51 : Perspectives de synthèse

Par ailleurs, le composé **29** a une affinité de liaison à AR équivalente à celle de la nilutamide. Or, des études précédentes ont montré que des analogues organiques de la nilutamide, contenant des chaînes latérales N-hydroxyalkyles et N-cyanométhyles, reconnaissent mieux AR que la nilutamide. Par conséquent, l'ajout de ces chaînes latérales sur la molécule **29** pourrait permettre d'obtenir des molécules qui reconnaîtraient mieux AR. Une synthèse de ces molécules est donc envisagée en série racémique (Figure 51).

Annexe 1 : Description des Tests Biologiques

Matériels : Le 17β -oestradiol et la DHT proviennent de Sigma-Aldrich (France). Les solutions Stocks (1.10^{-3} M) des composés à tester ont été préparées dans l'éthanol et ont été conservées à 4°C à l'abri de la lumière ; dans ces conditions, elles sont stables pendant au moins deux semaines. Les dilutions des produits dans l'éthanol (ou le DMSO) ont été préparées juste avant la répartition en plaques. Le DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) provient de Gibco/Invitrogen. Le sérum fœtal de veau, la glutamine et la kanamycine proviennent de Invitrogen. Le sulfate de protamine provient de Sigma. Les cellules LNCaP, PC3 et MDA-MB231 sont issues de la banque cellulaire ATCC (American Type Culture Collection).

Détermination de l'affinité relative de liaison (RBA) des molécules pour AR : Les valeurs de RBA ont été mesurées sur des récepteurs AR commerciaux 750 pmol provenant de Panvera et de Invitrogen. Ils sont dissous dans le DMSO, puis plusieurs aliquotes de 10 μL d'AR ont été effectués et conservés dans l'azote. Le jour de la manipulation, sont ajoutés 10 mL de tampon contenant 10% glycérol, 50 mM Tris pH 7,5, 0,8 M NaCl, 2 mM DTT et 0,1% BSA. Des aliquotes (200 μL) de AR dans des tubes de polypropylène ont été incubés pendant 3 h 30 à 4°C avec la $[1,2-^3\text{H}]$ -DHT, qui a une activité spécifique de 1,6 TBq/mmol, en présence de neuf concentrations d'hormones. A la fin de la période d'incubation, les fractions libres et liées ont été séparées par précipitation au sulfate de protamine. La diminution de liaison à la DHT* (Y) a été calculée en utilisant $\ln [Y/1-Y]$ sur le logarithme de la masse du composé en compétition avec la DHT*. La concentration de produits requise pour déplacer 50% de la liaison à la DHT* a été calculée pour chaque produit testé et a été comparée à la concentration de DHT qui est requise pour déplacer 50% de la liaison au DHT*. Le rapport de ces deux concentrations constitue le RBA qui est exprimé en %. La valeur de RBA obtenue pour la DHT est par définition égale à 100%.

Détermination de l'affinité relative de liaison (RBA) des molécules pour ER β : Les valeurs de RBA ont été mesurées sur des récepteurs ER β commerciaux, Human Recombinant 750 pmol, provenant d'Invitrogen. Ils sont dissous dans le DMSO, puis plusieurs aliquotes de 10 μL d'ER β ont été effectués et conservés dans l'azote. Le jour de la manipulation, sont ajoutés 10 mL de tampon contenant 10% glycérol, 50 mM Bis-Tris-Propane pH 9, 400 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA et 0,1% BSA. Des aliquotes (200 μL) de ER β dans des tubes de polypropylène ont été incubés pendant 3 h à 0°C avec la $[^3\text{H}]$ -oestradiol en présence de neuf concentrations d'hormones. A la fin de la période d'incubation, les fractions libres et liées ont été séparées par précipitation au sulfate de protamine. La diminution de liaison de la $[^3\text{H}]$ -oestradiol (Y) a été calculée en utilisant $\ln [Y/1-Y]$ sur le logarithme de la masse du composé en compétition avec la $[^3\text{H}]$ -oestradiol. La concentration de produits requise pour déplacer 50% de la liaison à l'oestradiol radioactif a été calculée pour chaque produit testé et a été comparée à la concentration d'oestradiol qui est requise pour déplacer 50% de la liaison à l'oestradiol radioactif. Le rapport de ces deux concentrations constitue le RBA qui est exprimé en %. La valeur de RBA obtenue pour l'oestradiol est par définition égale à 100%.

Détermination du Coefficient de Partage Octanol/Eau (log Po/w) des composés : Les valeurs de log Po/w des composés ont été déterminées par HPLC en phase inverse sur une

colonne C8 (Kromasil C8 provenant de la société AIT), selon la méthode précédemment décrite par Minick¹⁶⁵ et Pomper¹²³. La mesure des facteurs de capacité chromatographique (k') pour chaque molécule a été effectuée à différentes concentrations dans le méthanol (95-80%) contenant 0,25% d'octanol et dans une phase aqueuse comprenant 0,15% de n-décylamine dans un tampon 0,02 M MOPS (acide 3-morpholinopropanesulfonique) pH 7,4 (préparé dans de l'eau saturée en 1-octanol). Ces facteurs de capacité k' sont extrapolés à 100% de la phase aqueuse, donnant ainsi la valeur de k_w' . Le $\log P_o/w$ est alors obtenu par la formule $\log P_o/w = 0,13418 + 0,98452 \log k_w'$.

Conditions de la culture cellulaire : Les cellules ont été maintenues dans le DMEM avec rouge phénol, contenant 9% de sérum fœtal de veau décomplémenté, 0,9% de glutamine et 0,9% de kanamycine, à 37°C dans un incubateur sous une atmosphère humide remplie par 5% de CO₂. Pour les tests prolifératifs, les cellules sont distribuées dans des puits contenant 1 mL de DMEM sans rouge phénol, auquel sont rajoutés 9% de sérum fœtal de veau déstéroïdé au charbon-dextran, 0,9% de glutamine et 0,9% de kanamycine, etensemencées. Le jour suivant (J0), 1 mL du même milieu contenant les différents produits à tester, qui sont préalablement dilués dans le DMSO, a été distribué dans les puits (4 puits pour chaque produit). Après 3 jours (J3), le milieu d'incubation a été changé et 2 mL de milieu contenant les produits à tester ont été distribués dans les puits. A différents jours (J3, J4, J5 et J6), les protéines sont dosées par coloration au bleu de méthylène de la manière suivante. Les cellules ont été fixées pendant 1 h dans le méthanol, puis colorées pendant 1 h avec le bleu de méthylène (1 mg/mL) dans le PBS, et enfin lavées à l'eau. 1 mL de HCl 0,1 M est ajouté et l'absorbance de chaque puits a été mesurée à 655 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Biorad. Les résultats sont exprimés en pourcentage de protéines versus contrôle éthanol.

¹⁶⁵ Minick D.J., Frenz J.H., Patrick M.A., Brent D.A., *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 1923.

¹²³ Pomper M.G., Van Brocklin H., Thieme M.M., Thomas R.D., Kiesewetter D.O., Carlson K.E., Mathias C.J., Welch M.J., Katzenellenbogen J.A., *J. Med. Chem.*, **1990**, 33, 3143.

Annexe 2 : Données cristallographiques

I. Molécule 16

Table 1: Crystal data and structure refinement for compound 16

Identification code	16
Empirical formula	C ₂₂ H ₂₁ N ₂ O ₅ F ₃ Fe
Formula weight	506.26
Temperature	100(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	Triclinic
Space group	P-1 (#2)
Unit cell dimensions	a = 9.5084(9) Å α = 67.137(2)°. b = 11.3147(11) Å β = 76.914(2)°. c = 11.3550(11) Å γ = 74.081(2)°.
Volume	1072.53(18) Å ³
Z	2
Density (calculated)	1.568 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.767 mm ⁻¹
F(000)	520
Crystal size	0.40 x 0.30 x 0.28 mm ³
Theta range for data collection	1.96 to 26.00°.
Index ranges	-11<=h<=11, -13<=k<=13, -13<=l<=13
Reflections collected	8771
Independent reflections	4116 [R(int) = 0.0168]
Completeness to theta = 26.00°	97.7 %
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Max. and min. transmission	0.8139 and 0.6331
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	4116 / 0 / 307
Goodness-of-fit on F ²	1.068
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0352, wR2 = 0.0902
R indices (all data)	R1 = 0.0384, wR2 = 0.0931
Largest diff. peak and hole	0.827 and -0.321 e.Å ⁻³

II. Molécule 26

Table 2: Crystal data and structure refinement for compound **26**

Identification code	26	
Empirical formula	$C_{24}H_{20}N_3O_2F_3Fe$	
Formula weight	495.28	
Temperature	103(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	$P2_1/c$ (#14)	
Unit cell dimensions	$a = 7.4693(8)$ Å	$\alpha = 90^\circ$.
	$b = 21.493(2)$ Å	$\beta = 100.415(2)^\circ$.
	$c = 13.6280(14)$ Å	$\gamma = 90^\circ$.
Volume	$2151.8(4)$ Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.529 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.754 mm ⁻¹	
F(000)	1016	
Crystal size	0.60 x 0.40 x 0.40 mm ³	
Theta range for data collection	1.79 to 27.00°.	
Index ranges	$-9 \leq h \leq 9, -27 \leq k \leq 27, -17 \leq l \leq 17$	
Reflections collected	35463	
Independent reflections	4703 [R(int) = 0.0313]	
Completeness to theta = 27.00°	100.0 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.7524 and 0.5721	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	4703 / 0 / 378	
Goodness-of-fit on F ²	1.060	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0296, wR2 = 0.0736	
R indices (all data)	R1 = 0.0325, wR2 = 0.0751	
Largest diff. peak and hole	0.411 and -0.248 e.Å ⁻³	

III. Molécule 27

Table 3: Crystal data and structure refinement for compound **27**

Identification code	27	
Empirical formula	C ₂₅ H ₂₂ N ₃ O ₂ F ₃ Fe	
Formula weight	509.31	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	C2/c (#15)	
Unit cell dimensions	a = 28.248(3) Å b = 7.2952(7) Å c = 23.437(2) Å	α = 90°. β = 110.530(2)°. γ = 90°.
Volume	4523.0(7) Å ³	
Z	8	
Density (calculated)	1.496 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.720 mm ⁻¹	
F(000)	2096	
Crystal size	0.80 x 0.35 x 0.35 mm ³	
Theta range for data collection	1.86 to 25.99°.	
Index ranges	-34 ≤ h ≤ 34, -8 ≤ k ≤ 8, -28 ≤ l ≤ 28	
Reflections collected	16721	
Independent reflections	4401 [R(int) = 0.0301]	
Completeness to theta = 25.99°	99.7 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.7868 and 0.6010	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	4401 / 0 / 395	
Goodness-of-fit on F ²	1.038	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0316, wR2 = 0.0765	
R indices (all data)	R1 = 0.0371, wR2 = 0.0792	
Largest diff. peak and hole	0.425 and -0.324 e.Å ⁻³	

IV. Molécule 43

Table 4: Crystal data and structure refinement for compound 43

Identification code	43	
Empirical formula	C ₂₅ H ₂₂ N ₃ O ₃ F ₃ Fe	
Formula weight	525.31	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	C2/c (#15)	
Unit cell dimensions	a = 49.348(3) Å b = 12.5159(9) Å c = 14.9173(11) Å	α = 90°. β = 95.684(1)°. γ = 90°.
Volume	9168.2(11) Å ³	
Z	16	
Density (calculated)	1.522 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.716 mm ⁻¹	
F(000)	4320	
Crystal size	0.80 x 0.70 x 0.50 mm ³	
Theta range for data collection	0.83 to 24.00°.	
Index ranges	-56 ≤ h ≤ 56, -14 ≤ k ≤ 14, -17 ≤ l ≤ 17	
Reflections collected	31235	
Independent reflections	7193 [R(int) = 0.0488]	
Completeness to theta = 24.00°	99.9 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.7160 and 0.5013	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	7193 / 0 / 674	
Goodness-of-fit on F ²	1.052	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0571, wR2 = 0.1352	
R indices (all data)	R1 = 0.0689, wR2 = 0.1429	
Largest diff. peak and hole	2.859 and -1.073 e.Å ⁻³	

Table 5: Hydrogen bonds for compound **43** [Å and °]

D–H...A	d(D–H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(4)–H(1O4)...O(5)	0.84	1.93	2.765(4)	170.3
O(1)–H(1O1)...O(4)#1	0.84	1.96	2.748(4)	155.6

Synthèse d'anti-androgènes organométalliques non stéroïdiens et application au traitement du cancer de la prostate.

Le cancer de la prostate est un problème de société majeur équivalent au cancer du sein chez la femme. La plupart de ces cancers sont hormono-dépendants et un des traitements utilisés est l'administration d'anti-androgènes non stéroïdiens. Ce sont des molécules qui inhibent de manière compétitive les effets des androgènes en se fixant sur le site de liaison du récepteur AR. Les anti-androgènes non stéroïdiens commerciaux sont la flutamide et son métabolite actif, le 2-hydroxyflutamide, la nilutamide et la bicalutamide. Néanmoins, à cause des phénomènes de résistance aux médicaments qui se manifestent après un traitement de longue durée, il devient impératif de concevoir de nouvelles molécules plus efficaces. Nous avons choisi d'incorporer un groupe ferrocène au niveau de la structure des anti-androgènes, car il possède des propriétés cytotoxiques intéressantes. Ce travail de recherche présente donc la synthèse d'analogues d'anti-androgènes non stéroïdiens commerciaux couplés avec des groupements ferrocène. Une fois synthétisés, ils sont soumis à une série de tests biologiques entrepris au sein du laboratoire. Ils comprennent, d'une part, des tests d'affinité relative de liaison (RBA) au récepteur à androgènes (AR) et, d'autre part, une série de tests anti-prolifératifs réalisés *in vitro* sur des lignées cellulaires tumorales prostatiques. Ces tests nous permettront de définir si ces molécules possèdent un intérêt particulier dans le cadre de la lutte contre le cancer de la prostate hormono-dépendant ou indépendant.

Mots Clés : cancer de la prostate, anti-androgènes, flutamide, nilutamide, bicalutamide, bio-organométallique, ferrocène.

Synthesis of non steroidal organometallic anti-androgens and application to prostate cancer treatment.

Prostate cancer is a major societal problem equivalent to that of breast cancer in women. The majority of these cancers are hormone-dependent and one of the commonly used treatments consists in the administration of non steroidal anti-androgens. These molecules inhibit the effects caused by androgens, by competing with the same AR receptor binding site. The commercial non steroidal anti-androgens are flutamide and its active metabolite, 2-hydroxyflutamide, nilutamide and bicalutamide. However, because of the phenomenon of drug resistance that frequently occurs with long-term treatment, the search for more effective molecules becomes imperative. We chose to add a ferrocenyl group on the anti-androgen structure, because it has interesting cytotoxic properties. This research work presents the synthesis of novel ferrocenyl analogues of commercial anti-androgens. Once they are synthesized, they are tested for their relative binding affinity to AR receptor and for their *in vitro* anti-proliferative activity on prostate cancer cell lines. These biological tests will allow us to know whether these molecules are promising for the treatment of prostate cancer.

Key Words: prostate cancer, anti-androgens, flutamide, nilutamide, bicalutamide, bio-organometallic, ferrocene.