

**THÈSE PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LILLE 1**

Discipline : Molécules et Matière Condensée

Par

Gang AHN

**Conception, synthèse et évaluation du potentiel
antitumoral d'indénoisoquinoléine-5,11-diones
polyfonctionnalisées**

Directeur de thèse : Dr. Axel COUTURE

Jury :

Président : Francine AGBOSSOU, Directrice de recherche, CNRS, UCCS, Lille

Rapporteurs : Robert DODD, Directeur de Recherche CNRS, ICSN, Gif-sur-Yvette
Jean-Claude FLORENT, Directeur de Recherche CNRS, Institut Curie, Paris

Examineurs : Gérald GUILLAUMET, Professeur, ICOA, Orléans
Axel COUTURE, Directeur de recherche CNRS, EA CMF 4478, Lille
Pierre GRANDCLAUDON, Professeur Emérite, ENSC Lille, Lille

“(My motto would be) Keen observation and everlasting effort”

Taikyue Ree, South Korea, inventor of the Ree-Eyring theory in Physical Chemistry

“I would say the science world is flat”

Ryōji Noyori, Japan, Nobel Laureate in Chemistry (2001)

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé dans l'équipe « Développements méthodologiques en synthèse. Applications » dirigée par le Dr. Axel COUTURE, Directeur de Recherche CNRS, au sein de l'Equipe d'Accueil Chimie Moléculaire et Formulation (EA CMF 4478), à l'Université de Lille 1 – Lille Nord de France.

Je tiens particulièrement à exprimer mes remerciements les plus sincères au Dr. Axel COUTURE, pour toutes choses durant ces trois années. Je le remercie de m'avoir intégré dans son équipe, de sa confiance, de ses aides et de conseils précieux, de son soutien ainsi que sa disponibilité durant toute la durée de la réalisation de ce travail.

J'exprime également ma gratitude au Pr. Pierre GRANDCLAUDON, Professeur Emérite à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille, pour sa disponibilité, sa confiance, son soutien et ses conseils avisés.

J'exprime également ma reconnaissance au :

Dr. Francine AGBOSSOU, Directrice de Recherche CNRS de l'Unité de Catalyse et de Chimie du Solide (UCCS) de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille, qui m'a fait l'honneur de juger ce travail et de présider cette thèse.

Dr. Robert DODD, Directeur de Recherche CNRS à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles et Dr. Jean-Claude FLORENT, Directeur de Recherche CNRS à l'Institut Curie, d'avoir consacré leur temps pour évaluer ce travail et en être les rapporteurs.

Pr. Gérald GUILLAUMET, Vice-Président de l'Université d'Orléans et Professeur à l'Institut de Chimie Organique Analytique, d'avoir accepté notre invitation.

Je tiens par ailleurs à remercier tout particulièrement le Dr. Adina RYCKEBUSCH, Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille. Elle a initié ce projet et son encadrement sans faille m'a permis de progresser dans ce sujet mais aussi dans tous les domaines de la chimie organique et de la pharmacochimie. Je tiens également à la remercier pour sa grande disponibilité, ses nombreux conseils et son soutien durant cette thèse.

Ces remerciements s'adressent aussi au Dr. Vangélis AGOURIDAS, Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille, pour son aide, ses conseils, sa disponibilité depuis son arrivée au laboratoire à ma dernière année de thèse.

Mes remerciements s'adressent au Pr. Jean-François GOOSSENS, et au Dr Nadège SCHIFANO-FAUX, respectivement Professeur et Chercheuse à l'Equipe d'Accueil Groupe de Recherche Interdisciplinaire Innovation et Optimisation Thérapeutique (EA 4481) à la Faculté de pharmacie de Lille pour leur aide et leurs conseils permanents lors de l'évaluation biologique de mes composés. Je souhaite également remercier le Dr. Amélie LANSIAUX du Laboratoire Pharmacologique Antitumorale du Centre Oscar Lambret et et Mme Brigitte BALDEYROU pour leurs disponibilités, leur aide, et leurs gentillesse.

Je tiens également à remercier plus spécialement Mlle Mélanie DUBOIS, technicienne chimiste et ACMO pour son extrême gentillesse, ses disponibilités et ses soutiens durant toutes ces années.

Je remercie le Dr. Stéphane LEBRUN, Maître de Conférences à l'Université Lille 1 – Lille Nord de France, pour sa disponibilité et ses conseils théoriques mais aussi pratiques à la paillasse. J'ajoute mes remerciements au Pr. Eric DENIAU, Professeur à l'Université Lille 1 – Lille Nord de France pour m'avoir fait partager son talent de chimiste organicien à la paillasse.

Je n'oublie pas l'équipe du Pr. Philippe COTELLE, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille, en l'occurrence le Dr. Cédric LION et le Dr. Fabrice BAILLY, Maîtres de Conférences à l'Université Lille 1 – Lille Nord de France.

Ces remerciements ne pourraient exister sans une pensée pour mes anciens et actuels camarades de laboratoire. Merci au Dr. David DUMOULIN (Merci pour le template de cette thèse ☺). Merci aux demoiselles du C3 2^{ème} étage, notamment au futur Dr. Virginie SUCHAUD pour ses jolis sourires et sa gentillesse. Merci également au Dr. Muriel BILLAMBOZ et Romain SALLIO.

Enfin, *last but not least*, merci à mon père et ma mère qui m'ont soutenu et encouragé depuis Séoul, à 10 000 km d'ici. Merci à ma petite sœur Ahram et ma compagne Jeongmin de m'avoir supporté. Surtout Merci à Jeongmin nuna pour tous les travaux graphiques. Merci également à mes amis de « Classe Euro », qui sont loin mais qui m'ont toujours soutenu, notamment Pierre, Fred, Aurélie, Laure, Max, Julien.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	7
ABBREVIATIONS	11
Introduction générale	13
Chapitre I. Généralités sur le cancer	17
1. Les causes du cancer	18
2. Caractéristiques du cancer	19
2.1. Biologie du cancer	19
2.2. Génétique du cancer.....	20
3. Etapes de croissance des cellules cancéreuses.....	21
4. Traitement du cancer et la chimiothérapie	23
5. Conclusion du chapitre	26
Références bibliographiques et notes relatives au Chapitre I.....	27
Chapitre II. Les topoisomérases et les indenoisoquinoléines	29
1. L'ADN et les topoisomérases	30
1.1. Le modèle d'ADN par Watson et Crick et les problèmes spatiaux induits.....	30
1.2. Les ADN topoisomérases.....	34
1.3. La classification des ADN topoisomérases	36
1.3.1. Les ADN topoisomérases de type I.....	36
1.3.2. Les ADN topoisomérases de type II	38
2. Les inhibiteurs de topoisomérase II	44
2.1. Les poisons intercalants des Topo II	45
2.2. Les poisons non intercalants des Topo II	47
2.3. Les inhibiteurs catalytiques de Topo II	47

2.4. De la stabilisation du complexe de clivage à l'apoptose	48
2.5. Limites à l'utilisation des inhibiteurs de Topo II	51
3. Les indéno[1,2- <i>c</i>]isoquinoléine-5,11-diones	52
3.1. Historique de la famille des indéno[1,2- <i>c</i>]isoquinoléine-5,11-diones	52
3.2. Mode d'action des INDOs et propriétés pharmacologiques	54
3.3. Relations structure-activité	56
3.3.1. Influences des groupements sur les cycles aromatiques A/D	57
3.3.2. Influences des groupements sur les cycles aromatiques B/C.....	59
3.3.3. Influence de la substitution en position N6.....	60
4. Notre projet	63
Références bibliographiques et notes relatives au Chapitre II	66
Chapitre III. Synthèse de dérivés indénoisoquinoléine-5,11-diones.....	71
1. Méthodes de synthèse des INDOs	72
1.1. Synthèse des INDOs par formation d'intermédiaire arylisoquinolone.....	72
1.2. Synthèse des INDOs par formation de l'intermédiaire 2-arylindanedione.....	75
1.3. Synthèse des INDOs par cycloaddition entre un benzonitrile et un toluamide	77
2. Synthèse des INDOs de la série I.....	79
2.1. Stratégie de synthèse pour les molécules de la série I	79
2.2. Synthèse des aldimines	80
2.2.1. Substitution nucléophile des chaînes aminoalkoxy	80
2.2.2. Elaboration des imines.....	82
2.3. Condensation des imines avec l'anhydride homophtalique.....	83
2.3.1. Nos résultats.....	83
2.3.2. Considérations mécanistiques	86
2.4. Synthèse des INDOs (55-68)	89
2.5. Bilan des synthèses des molécules de la série I	92
3. Synthèse des dérivés conjugués aux acides aminés.....	92
3.1. Stratégie de synthèse des molécules de la série II	92
3.2. Synthèse de la benz[<i>d</i>]indéno[1,2- <i>b</i>]pyran-5,11-dione.....	94

3.3. Greffe des bras espaceurs.....	96
3.3.1. Synthèse des INDOs hydroxyalkylées.....	96
3.3.2. Synthèse des INDOs aminoalkylées.....	97
3.4. Greffe des acides aminés <i>N</i> -protégés sur les INDOs.....	99
3.4.1. Protection de la fonction amine des acides aminés.....	99
3.4.2. Couplage avec les INDOs : ester en tant que fonction de connexion.....	101
3.4.3. Couplage avec les INDOs : amide en tant que fonction de connexion.....	103
3.5. La déprotection. Obtention des INDOs ciblés.....	108
3.6. Bilan des synthèses des molécules de la série II.....	111
4. Conclusion générale du chapitre.....	112
Références bibliographiques et notes relatives au Chapitre III.....	114
Chapitre IV. Evaluations biologiques.....	118
1. Introduction.....	119
2. Etude du potentiel de liaison à l'ADN.....	120
2.1. Mesure de T_m par UV-visible.....	120
2.1.1. Mesures de ΔT_m sur les molécules de série I.....	121
2.1.2. Mesures de ΔT_m sur les molécules de série II.....	123
2.2. Mesures des constantes d'affinité K_{app} par fluorimétrie.....	126
2.2.1. Eléments théoriques.....	126
2.2.2. Résultats de K_{app} pour les molécules de la série I.....	127
2.2.3. Mesures de K_{app} pour les molécules de la série II.....	130
2.3. Conclusion sur les interactions ADN-molécules.....	133
3. Etude des modes de liaison à l'ADN.....	134
3.1. Eléments théoriques.....	134
3.2. Résultats pour les molécules de série I.....	135
4. Inhibition de la relaxation de l'ADN par les Topo I et Topo II.....	137
4.1. Inhibition de la relaxation de l'ADN par les Topo I.....	137
4.2. Inhibition de la relaxation de l'ADN par les Topo II.....	139
4.2.1. Tests sur les molécules de série I.....	140

4.2.2. Tests sur les molécules de série II.....	141
4.2.3. Conclusion sur les tests d'inhibition des Topo I et Topo II.....	142
5. Cytotoxicité.....	143
5.1. Résultats pour les molécules de la série I	143
5.2. Résultats pour les molécules de série II.....	145
6. Conclusion du chapitre	148
Références et notes relatives au Chapitre IV	150
Conclusion générale	152
Partie expérimentale	156
1. Chemistry, General.....	157
2. Series I.....	157
3. Series II	192
4. Biological evaluations.....	231

ABBREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

APTS : acide *para*-toluène sulfonique

Arg : arginine

BET : bromure d'éthidium

br : élargi (RMN)

CPT : camptothécine

d : doublet (RMN)

DCM : dichlorométhane

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMF : diméthylformamide

EDCI : 1-Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl)carbodiimide

Eto : étoposide

EtOAc : acétate d'éthyle

Gly : glycine

His : histidine

IC₅₀ : concentration inhibitrice à 50 %

IGF-1 : *insulin growth factor 1*

IGF-2 : *insulin growth factor 2*

IL-3 : *interleukin 3*

Im : imidazole

INDO: indénoisoquinoléine

K_{app} : constant d'affinité apparente (ADN)

Lin : *linear* (ADN)

Lys : lysine

m : multiplet (RMN)

MeOH : méthanol

Asn : asparagine

Nck : nicked (ADN)

NF1 : *necrosis factor 1* (facteur de nécrose 1)

norINDO : norindénoisoquinoléine

q : quadruplet (RMN)

Rel : *relaxed* (relaxé, ADN)

RMN : résonance magnétique nucléaire

Ser : sérine

s : singulet (RMN)

Sc : *supercoiled* (surenroulé, ADN)

shRNA : *short hairpin ribonucleic acid*

t : triplet (RMN)

T_m : température de fusion (ADN)

THF : tétrahydrofurane

Topo : topoisomérase humaine

Topo I : topoisomérase I humaine

Topo II : topoisomérase II humaine

Tyr : tyrosine

Introduction générale

Les quelques 10^{13} cellules constituant le corps humain naissent, vivent et meurent de façon à maintenir la forme, l'architecture et les fonctions propres à chaque organe ou système. Des programmes génétiquement définis de chaque type de cellule ainsi que les contacts avec les autres cellules permettent de maintenir l'harmonie de l'ensemble durant la vie de l'individu. Le propre du cancer est de briser cette harmonie.

La lutte contre cette pathologie dure depuis les périodes les plus anciennes de l'Histoire. Des progrès considérables durant les dernières décennies écoulées ont permis à l'Humanité de rendre cette maladie, autrefois jugée incurable, difficile à traiter mais pas impossible à soigner. Néanmoins, cette pathologie constitue encore, de nos jours, la deuxième cause de mortalité dans le monde.

Actuellement, plusieurs types de traitement du cancer existent : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie sont les plus couramment invoquées. La combinaison de ces trois modes de traitement est utilisée pour guérir un certain nombre de cancers ou diminuer la prolifération des cellules cancéreuses, ce qui permet d'augmenter fortement l'espérance de vie des personnes atteintes par cette pathologie.

Parmi les différentes catégories d'agents anticancéreux constituant l'arsenal thérapeutique à notre disposition, les inhibiteurs de topoisomérase ont la capacité de bloquer le fonctionnement de l'enzyme dénommée topoisomérase, présente sous deux formes dénommées type I et type II. Cette protéine régule la topologie de l'ADN de tout organisme vivant. Elle est indispensable pour le bon fonctionnement de l'organisme, plus particulièrement dans la phase de réplication. Etant donné leur abondance proportionnellement plus élevée dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales, la topoisomérase constitue incontestablement une cible de choix majeure pour le traitement du cancer.

Les inhibiteurs de topoisomérase voient le jour en 1974 avec l'approbation par la FDA de la commercialisation de la doxorubicine, un inhibiteur de la topoisomérase type II. Depuis, six autres inhibiteurs de la topoisomérase de type II ainsi que deux inhibiteurs de la topoisomérase de type I ont été approuvés et sont utilisés dans le milieu médical. Cependant, du fait de leurs défauts intrinsèques, des recherches sont menées depuis plusieurs années pour

découvrir, synthétiser et développer de nouveaux dérivés en ciblant toute une série d'améliorations tant au niveau des propriétés pharmacologiques que pharmacocinétiques.

Récemment, il a été découvert que les molécules de la famille des indéno[1,2-*c*]isoquinoléine-5,11-diones possédaient des propriétés particulièrement intéressantes et susceptibles de remplacer les dérivés de la camptothécine en tant que composés inhibiteurs de la topoisomérase de type I. D'autres dérivés ont par la suite été découverts, dotés cette fois-ci d'une activité inhibitrice vis-à-vis des topoisomérases de type II. Des travaux ont été d'ores et déjà réalisés ou sont en cours sur cette famille de composés, mais beaucoup d'autres pistes restent à explorer pour améliorer ses performances.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est de concevoir, de synthétiser et d'évaluer l'activité biologique de nouveaux dérivés d'indéno[1,2-*c*]isoquinoléine-5,11-diones inhibitrices de la topoisomérase de type II.

Chapitre I. Généralités sur le cancer

1. Les causes du cancer

Le cancer est généralement considéré comme une maladie génétique mais il dépend aussi de facteurs environnementaux. La première relation entre l'apparition du cancer et un agent de l'environnement a été établie par un chirurgien britannique, Percival Pott, en 1775.¹ Celui-ci a démontré que l'exposition chronique à la suie était à l'origine du cancer de la cavité nasale et de la peau du scrotum chez les ramoneurs. Depuis, les recherches ont permis d'identifier une myriade d'agents carcinogènes pouvant être répartis dans trois catégories de nature différente et qui ont pour propriété commune la capacité à altérer le génome :

- Les agents chimiques de toute sorte: amiante, anilines, goudrons, arsenic, chrome, nickel, silice, benzène, suies, poussière de bois...
- Les agents physiques : UV et diverses radiations ionisantes, les brûlures et cicatrices...
- Certains virus, répartis en deux groupes : les virus tumoraux à ADN (virus du papillome humain HPV, le virus d'Epstein-Barr EBV etc.) et les virus tumoraux à ARN (un sous-type de virus d'herpès HHV-8, etc), en fonction du type d'acide nucléique trouvé dans les particules virales matures.
- Certaines bactéries telles que l'*Helicobacter pylori* dont l'infection chronique peut engendrer certains lymphomes gastriques.

Néanmoins, peu de certitudes existent quant aux causes exactes de la plupart des cancers chez l'Homme. En effet, même si les fumées de cigarettes conduisent vraisemblablement à l'apparition du cancer du poumon, l'Homme vit dans des environnements complexes : il est exposé à une myriade d'agents potentiellement carcinogènes, ce qui rend difficile la détermination des causes du cancer chez un individu. Il est à noter aussi que, dans la grande majorité des cas, si certains gènes dont nous pouvons hériter « prédisposent » à certains cancers, ils ne constituent pas un facteur suffisant pour enclencher eux-mêmes un cancer.

¹ G. Karp, *Biologie Cellulaire et Moléculaire*, 2^{ème} édition française, De Boeck, 2004.

2. Caractéristiques du cancer

2.1. Biologie du cancer

Le cancer est une maladie fréquente à l'échelle de la planète. Les différentes estimations des organismes de la santé dans le monde donnent des estimations convergentes pour un individu. Le risque de l'apparition du cancer avant l'âge de 75 ans serait estimé à près de 19 %, et ce taux augmente très fortement si l'on vit dans un pays développé (26 %).²

Cependant, au niveau cellulaire, le développement d'une tumeur maligne est plutôt un phénomène « rarissime ». Les différentes études biologiques réalisées sur cette pathologie ont démontré que le cancer est provoqué par une prolifération anarchique résultant d'une modification génétique d'une seule cellule sur les quelques 10^{14} cellules que renferme un corps humain. Même si le cancer est par définition une maladie génétique, une seule altération au niveau du génome de cette cellule ne suffit pas pour la transformer en une cellule tumorale: la cancérogénèse est en effet un processus très long, multiétape et multifactoriel, qui transforme progressivement une cellule normale en une cellule maligne, qui se caractérise par un certain nombre de phénomènes :³

1. **Une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance** : ce phénomène est notamment lié à la production autocrine de facteurs de croissance, une surexpression des récepteurs pour les facteurs de croissance, une mutation/activation constitutionnelle de ces récepteurs...
2. **Une insensibilité aux signaux d'inhibition de la croissance cellulaire** : celle-ci conduit à une perte du contrôle de la prolifération cellulaire par l'organisme, notamment suite à une inactivation des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire tels que les gènes *RB*, *p16*, les facteurs de transcription comprenant *TP53*, une inactivation des systèmes de transduction de signaux antiprolifératifs comme la *NF1* (signal) ou le TGF- β (récepteur)...
3. **Un potentiel répliatif illimité**

² J. Ferlay, H.R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D.M. Parkin, *Int. J. Cancer* **2010**, in press (doi: 10.1002/ijc.25516).

³ D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57.

4. **Un échappement au phénomène d'apoptose (mort de cellule programmée)**, notamment par endommagement du facteur de transcription *p53* pouvant orienter une cellule vers la mort, par une sécrétion autocrine de facteurs de survie cellulaire tels que les IGF-1, IGF-2, IL3, par une inactivation d'activateurs physiologiques de l'apoptose, en particulier une surexpression d'inhibiteurs d'apoptose comme *BCL2* etc...
5. **Une capacité d'induire une néoangiogénèse** par formation de nouveaux vaisseaux, nécessaire au soutien de la croissance tumorale, par modification de l'équilibre entre activateurs et inhibiteurs d'angiogénèse...
6. **Une capacité d'invasion des tissus normaux** et de développement de **métastases**.
7. **Une perte d'inhibition de contact et une perte de dépendance vis-à-vis de l'ancrage** : une cellule normale en effet ne peut croître sans un substrat solide, ni lorsque sa croissance devient limitée par la présence d'autres cellules.

2.2. Génétique du cancer

Dans un organisme vivant, les gènes qui influencent l'étape de la carcinogénèse sont divisés en deux catégories (**Figure 1**):

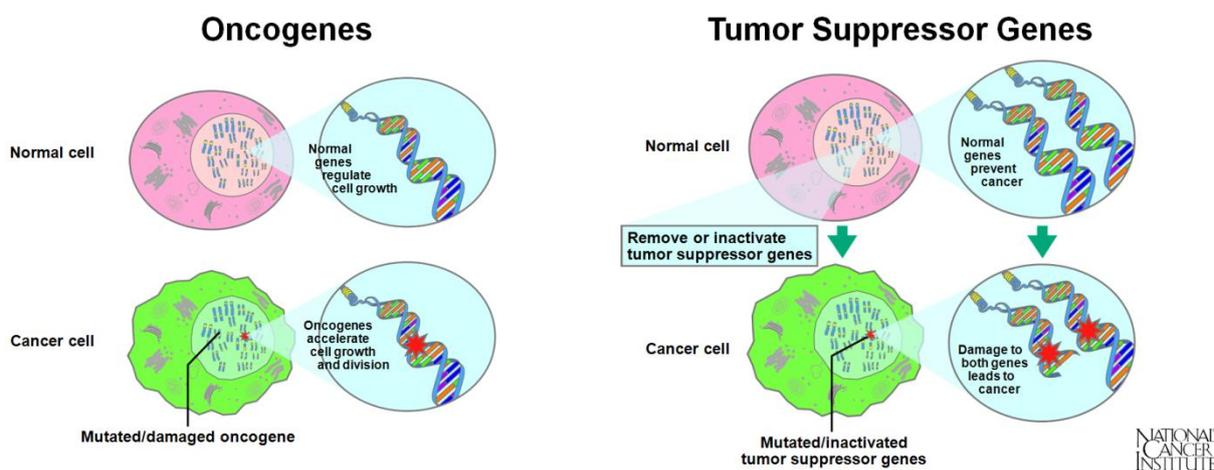


Figure 1. (Gauche) Les oncogènes. (Droite) les gènes suppresseurs de tumeurs.⁴

⁴ Images disponibles au National Cancer Institute, U.S. National Institute of Health, *Understanding Cancer Series: Cancer*

- **les oncogènes**, promoteurs de prolifération cellulaire et qui peuvent être des formes mutés de proto-oncogènes. Ces derniers codent des protéines qui interviennent, en conditions physiologiques, dans la stimulation de la croissance cellulaire et qui sont détournés dans les phénomènes de carcinogénèse,
- **les gènes suppresseurs de tumeurs** (ou anti-oncogènes), qui ont une action opposée aux premiers, en exerçant un contrôle négatif dans le mécanisme de la prolifération et qui sont réprimés lors de la carcinogénèse.

Dans un des processus physiologiques, on assiste à un équilibre entre les expressions de ces deux gènes. De ce fait, il existe un équilibre permanent entre facteurs activateurs (stimulateurs de la division cellulaire) et facteurs inhibiteurs (freins de la division cellulaire) régulant la réplication des cellules. Toute perturbation de cet équilibre par altération génétique – activation d'oncogènes et/ou inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs par des altérations au niveau des gènes et aussi au niveau des chromosomes – peut faire pencher la balance soit du côté inhibiteur, et dans ce cas la cellule meurt et disparaît, soit du côté activateur et la cellule se divise alors de façon incontrôlée.

Il est à noter que, pour le développement d'un cancer, il a été démontré qu'une altération génétique unique s'avère être insuffisante : en effet, une altération simultanée au niveau des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs est constatée sur la grande majorité de tumeurs malignes, conjuguées à des mutations des gènes comme ceux codant les molécules d'adhésion cellulaire et les protéases intracellulaires. Parmi les cancers les plus connus mais aussi les plus mortels, le cancer colorectal semble être déclenché à partir de plus de 20 gènes mutés, avec en outre plus de 100 mutations non-synonymes (mutations qui modifient la protéine que le gène code habituellement).⁵

3. Etapes de croissance des cellules cancéreuses

Trois phases caractérisent l'évolution naturelle des tumeurs solides : une phase infraclinique, une phase clinique et une phase terminale.

⁵ T. Sjöblom, S. Jones, L. D. Wood, D. W. Parsons, J. Lin, T. D. Barber, D. Mandelker, R. J. Leary, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, P. Buckhaults, C. Farrell, P. Meeh, S. D. Markowitz, J. Willis, D. Dawson, J. K. V. Willson, A. F. Gazdar, J. Hartigan, L. Wu, C. Liu, G. Parmigiani, B. H. Park, K. E. Bachman, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, *Science* **2006**, *314*, 268.

1. **La phase infraclinique** comporte :

- une étape d'**initiation** aboutissant à une transformation cellulaire (acquisition d'un phénotype de cellule maligne) sur une seule cellule. Il s'agit d'une étape acquise par action conjointe sur le génome d'agents carcinogènes mutagènes (initiateurs)
- Une étape de **promotion**, lente et réversible, dans lequel on assiste à l'apparition d'un phénotype cellulaire tumoral indépendant des contrôles tissulaires, grâce notamment aux promoteurs (facteurs de croissance-*like* tels que les cytokines,⁶ les hormones...)
- Enfin, une étape de **progression** qui, couplée à l'étape de promotion, conduit à l'hyperplasie, puis la dysplasie, avec enfin à l'apparition d'une masse tumorale. L'instabilité d'ordre génétique grandit au fur et à mesure de la progression du développement de la tumeur (**Figure 2**).

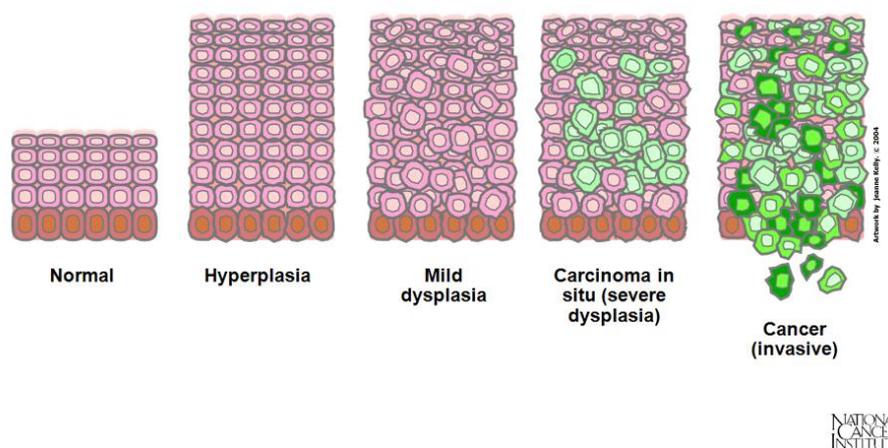


Figure 2. Différentes phases dans le développement tumoral.⁴

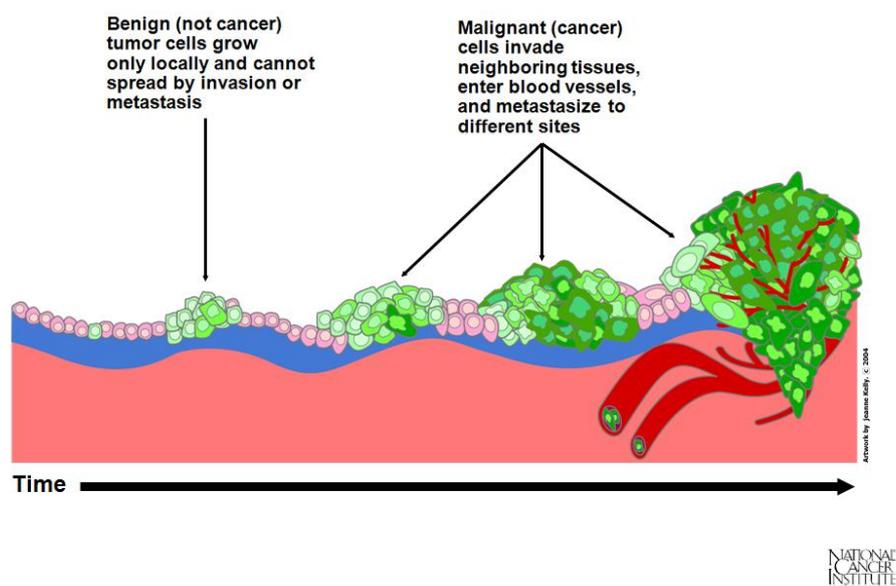
2. **La phase clinique** apparaît lors du développement de plus 10^9 cellules tumorales (**Figure 3**). Une progression métastatique apparaît après une première phase d'**invasivité locale**.

La **métastase** résulte de multiples étapes toutes limitantes :

- croissance de la tumeur primitive (angiogénèse)
- invasion (sécrétion d'enzymes protéolytiques et migration cellulaire)
- survie dans la circulation générale

⁶ G. Dranoff, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 11.

- arrêt dans les organes cibles (adhésion spécifique à l'endothélium vasculaire et aux membranes basales)
- extravasation (sécrétion d'enzymes protéolytiques et migration cellulaire)
- croissance dans l'environnement tissulaire spécifique au sein de l'organe cible, de la métastase primaire (récepteurs aux facteurs de croissance, autocrine)
- métastases secondaires



*Figure 3. Invasion puis métastase au cours de la progression du cancer.*⁴

3. La **phase terminale** est le résultat d'un échappement thérapeutique. Les cellules tumorales sont caractérisées par une autonomie de croissance, une adaptabilité métabolique cellulaire ainsi que des phénomènes de pharmacorésistance.

Il est à noter que d'autres classifications existent, telles que la classification anatomopathologique (décrivant les tumeurs en fonction de leur tissu d'origine), la classification TNM (permettant d'évaluer le pronostic). Elles sont principalement utilisées en clinique.

4. Traitement du cancer et la chimiothérapie

La meilleure stratégie dont on dispose, à l'heure actuelle, pour éradiquer les cellules cancéreuses qui attaquent l'organisme reste l'intervention chirurgicale. De nos jours, la

chirurgie est souvent combinée à la radiothérapie, la chimiothérapie et/ou l'hormonothérapie afin de "maximiser" les chances de la guérison complète. Néanmoins, la chirurgie reste limitée notamment par la taille de la tumeur et son degré d'envahissement.

Dans les stades plus avancés du cancer, la chimiothérapie constitue à peu près la seule option disponible pour combattre les cellules tumorales généralisées dans l'organisme (**Figure 4**).

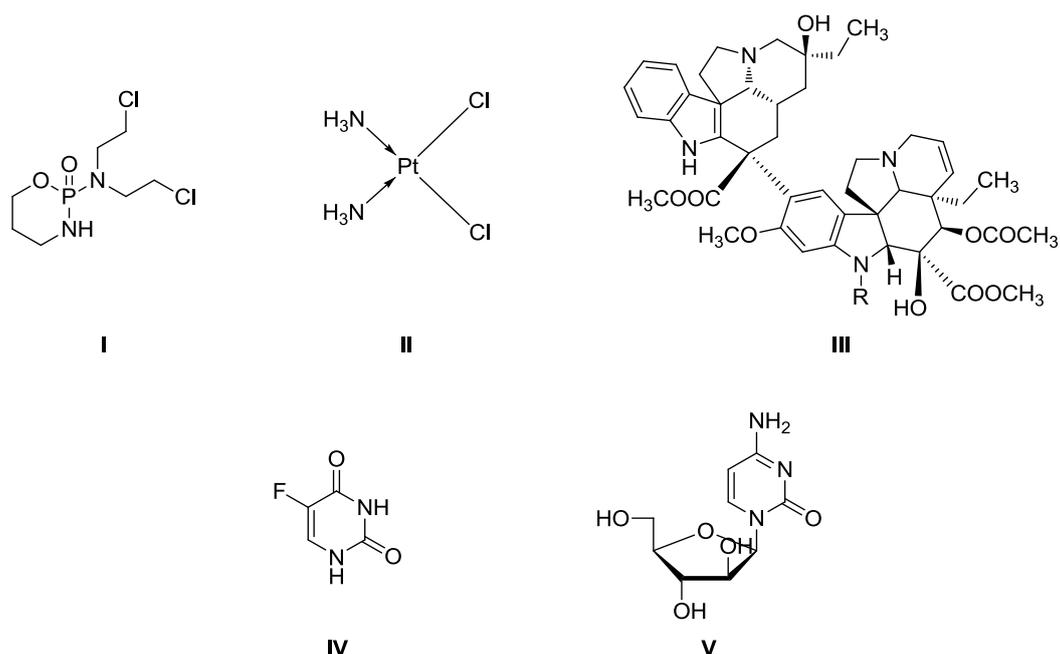


Figure 4. Exemples d'agents anticancéreux. **I** (cyclophosphamide, agent alkylant), **II** (cisplatine, agent alkylant), **III** ($R = CH_3$: vinblastine, $R = CHO$: vincristine, antitubulines), **IV** (5-FU, antipyrimidiques, antimétabolites), **V** (ARA-C, antipyrimidiques, antimétabolites).

Cependant, la plupart des médicaments cytotoxiques utilisés agissant soit sur l'ADN, soit sur les fuseaux au cours des divisions cellulaires, ils manquent de sélectivité vis-à-vis des cellules tumorales et induisent entre autres des effets secondaires parfois graves.

Les recherches actuelles dans le domaine de la thérapie du cancer se concentrent donc sur la conception et le développement de molécules agissant de manière plus spécifique sur les altérations caractéristiques des cellules cancéreuses, avec le souci d'épargner au maximum les cellules normales non atteintes par la maladie. L'inhibition des topoisomérases, qui va constituer notre sujet d'étude, peut entrer dans cette optique. En effet le phénomène de réplication dans lequel interviennent ces enzymes est très largement supérieur dans les

cellules cancéreuses que dans les cellules normales, ce qui confère aux molécules inhibitrices une sélectivité relativement plus élevée, comparée à celle de la chimiothérapie classique vis-à-vis des cellules tumorales. Ces enzymes ainsi que ses inhibiteurs seront traités de manière plus détaillée dans le chapitre suivant.

Parallèlement, du fait des phénomènes de résistance observés chez les cellules cancéreuses, les chercheurs explorent d'autres cibles. Grâce à l'avancée notamment des connaissances dans le domaine de la biologie moléculaire et cellulaire, de nouveaux axes de lutte contre le cancer ont ainsi vu le jour au cours des vingt dernières années et dont voici un certain nombre de caractéristiques :⁷

- Inhibition des signaux inter et intracellulaires : inhibiteurs de protéines kinases, anticorps monoclonaux etc,
- Action sur les vaisseaux alimentant les cellules cancéreuses : inhibiteurs d'angiogénèse,
- Interférence sur les modulateurs épigénétiques : phénotype résultant de toute modification (ou facteur) affectant l'organisation des chromosomes sans modification des séquences du génome),⁸
- Promotion de l'apoptose,
- Dégradation des protéines par inhibition des protéines Hsp90,
- Interférence sur le phénomène de mitose.

L'une des stratégies mise en œuvre à l'heure actuelle porte sur l'association entre les agents qui peuvent endommager l'ADN – tels que les inhibiteurs de topoisomérases – et les inhibiteurs des signaux inter et intracellulaires provenant des oncogènes favorables à la croissance des cellules cancéreuses. Les inhibiteurs des protéines kinases, en compagnie des anticorps monoclonaux (mAbs), occupent un rôle central dans cette stratégie, avec les premiers pouvant atteindre aussi bien les cibles sur la surface cellulaire que celles à l'intérieur, alors que les mAbs ciblent exclusivement les récepteurs membranes cellulaires.

⁷ W. W. Ma, Alex A. Adjei, *CA Cancer J. Clin.* **2009**, 59, 111.

⁸ S. L. Berger, T. Kouzarides, R. Shiekhattar, A. Shilatifard, *Genes Dev.* **2009**, 23, 781.

5. Conclusion du chapitre

Le cancer est donc une maladie génétique caractérisée par une prolifération incontrôlée de cellules qui survient suite aux altérations d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs, qui sont des gènes intervenant dans les mécanismes de contrôle de la croissance cellulaire. Ce phénomène anormal au niveau du génome, s'il survit aux divers mécanismes de réparation de l'ADN et de la mort programmée de la cellule, engendre la formation des tumeurs qui, dans un premier temps, envahissent les tissus ou organes adjacents avant de se propager ensuite vers des sites plus éloignés dans l'organisme.

Plusieurs éléments environnementaux (carcinogènes) interviennent dans la formation d'une seule cellule maligne unique dont le génotype et le phénotype sont modifiés pour lui permettre d'acquérir les propriétés d'une cellule cancéreuse. Les travaux sur le génome commencés surtout vers la fin du 20^{ème} siècle ont permis de déceler la nature des gènes altérés. Il a été aussi découvert que les modifications de quelques-uns de ces gènes ne suffisent pas : plusieurs sont nécessaires pour déclencher et installer le cancer dans l'organisme. Néanmoins, il faut reconnaître que le mécanisme exact de la formation du cancer n'est pas encore tout à fait connu à l'heure actuelle.

Les chimiothérapies classiques à visée curative ou à visée palliative ont toutes pour défaut une faible sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses (les agents alkylants et les antimétabolites...). Ceci induit notamment des toxicités importantes et n'améliore pas la qualité de vie des patients. Les inhibiteurs de topoisomérase constituent sans doute une alternative dans la mesure où cette cible possède une plus grande sélectivité en visant la topoisomérase qui modifie la topologie de l'ADN. Ces agents entrent actuellement dans une stratégie thérapeutique dans laquelle on essaie de détruire les ADN des cellules cancéreuses mais avec le souci majeur d'observer une très grande sélectivité.

Références bibliographiques et notes relatives au Chapitre I

1. G. Karp, *Biologie Cellulaire et Moléculaire*, 2^{ème} édition française, De Boeck, **2004**.
2. J. Ferlay, H.R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D.M. Parkin, *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 2893.
3. D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57.
4. Images disponibles au National Cancer Institute, U.S. National Institute of Health, *Understanding Cancer Series: Cancer*
5. T. Sjöblom, S. Jones, L. D. Wood, D. W. Parsons, J. Lin, T. D. Barber, D. Mandelker, R. J. Leary, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, P. Buckhaults, C. Farrell, P. Meeh, S. D. Markowitz, J. Willis, D. Dawson, J. K. V. Willson, A. F. Gazdar, J. Hartigan, L. Wu, C. Liu, G. Parmigiani, B. H. Park, K. E. Bachman, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, *Science* **2006**, *314*, 268.
6. G. Dranoff, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 11.
7. W. W. Ma, Alex A. Adjei, *CA Cancer J. Clin.* **2009**, *59*, 111.
8. S. L. Berger, T. Kouzarides, R. Shiekhattar, A. Shilatifard, *Genes Dev.* **2009**, *23*, 781.

Chapitre II. Les topoisomérases et les indenoisoquinoléines

1. L'ADN et les topoisomérases

1.1. Le modèle d'ADN par Watson et Crick et les problèmes spatiaux induits

La molécule d'ADN, une macromolécule biologique dont la structure a été découverte par Watson et Crick en 1953,¹ se présente généralement sous la forme d'un double brin enroulé en hélice avec des séquences de nucléotides parfaitement complémentaires : une adénine (A) est toujours complémentaire d'une thymine (T), une cytidine (C) d'une guanine (G) (**Figure 5**). Cette structure est maintenue par un ensemble de liaisons non covalentes : liaisons hydrogènes entre les bases appariées, interactions d'empilements des bases (π -stacking) et interactions électrostatiques entre les groupes phosphates et les ions Na^+ au niveau de la surface externe de l'ADN.

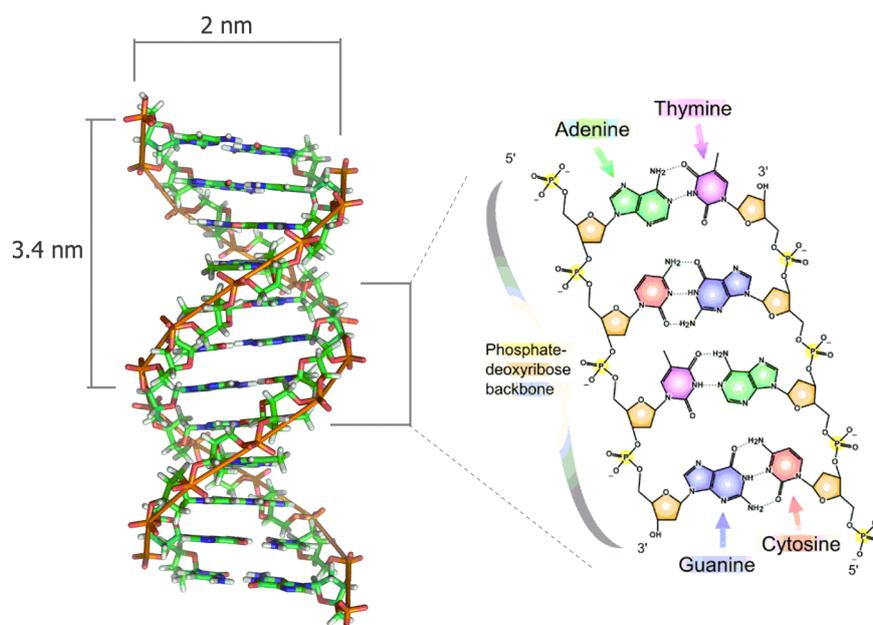


Figure 5. Structure de l'ADN.

Tous les processus biologiques nécessaires au maintien en vie des organismes et à la régulation de ses fonctions, à savoir la respiration, la division et la croissance des cellules, la lutte contre les agressions extérieures ou transformation de différents métabolites, etc. sont assurés par les protéines et les enzymes synthétisées à partir de ces informations. Néanmoins, cette molécule d'ADN avait suscité, lors de sa présentation, de nombreuses objections de la

¹ J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 964.

part du monde scientifique. En effet, la structure de la molécule décrite par Watson et Crick était considérée comme étant trop rigide et « idéale ». La suggestion par l'équipe de l'Université de Cambridge de l'orientation des bases puriques et pyrimidiques vers l'intérieur de la double hélice – ce qui engendre de manière inéluctable la nécessité de l'ouverture de la double hélice et donc d'endommager l'ADN pour avoir un accès aux informations génétiques contenues dans les séquences nucléotidiques – rendait perplexes les biologistes de l'époque.

A tout cela viennent s'ajouter deux autres problèmes qui ont pour conséquence de rendre encore plus complexe l'organisation spatiale de l'ADN. Le premier est la superhélicité de l'ADN (**Figure 6**). Les observations sur les ADN chez les bactéries² et chez les virus^{3,4} dans les années 1960 ont conduit les scientifiques à démontrer l'existence *in vivo* de l'ADN sous forme surenroulée chez les procaryotes avec les ADN circulaires. Plus tard, ces surenroulements d'ADN ont été découverts chez les eucaryotes où les segments de la molécule sont enroulés autour de noyaux protéiques appelés nucléosomes.

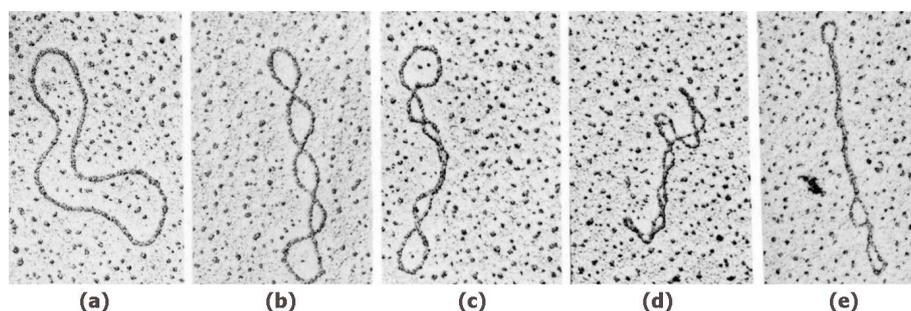


Figure 6. Micrographies électroniques des différents états de surenroulement de l'ADN (plasmide de mini ColE1). L'image (a) montre de l'ADN relaxée. Le surenroulement de l'ADN (négatif dans ce cas) sur elle-même est introduit au niveau (b) et (c). Lors d'un surenroulement négatif, la molécule d'ADN, du fait des contraintes d'ordre topologiques, a tendance, comme le montre (d) et (e), à se vriller sur elle-même et donne naissance à des ADN plus compacts. Image modifiée de la version originale.⁵

Pour être plus précis sur les surenroulements de l'ADN, il est à noter qu'une molécule de la double hélice relâchée, comme présentée sur la **Figure 5**, comporte 10 pb (paires de bases) par tour de spire. Or, l'ADN des mammifères, long de 2 m environ, doit être contenu dans le noyau d'une cellule dont le volume est approximativement égal à 10^{-17} m^3 . L'extrême

² J. Cairns, *J. Mol. Biol.* **1963**, 6, 208.

³ R. Dulbecco, M. Vogt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1963**, 50, 236.

⁴ R. Weil, J. Vinograd, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1963**, 50, 730.

⁵ A. Kornberg, T. A. Baker, *DNA replication* (2nd édition), W. H. Freeman, **1992**.

compaquetage de la molécule génétique engendre alors des contraintes topologiques importantes. Il est à signaler que topologiquement, boucles et molécules linéaires dont les extrémités sont attachées sont équivalentes et réagissent de la même manière aux contraintes topologiques. Les études topologiques sur les molécules d'ADN circulaires sont donc transposables sur l'ADN humain dont les extrémités sont attachées sur la matrice nucléaire, notamment lors de la réplication de l'ADN (**Figure 7**).

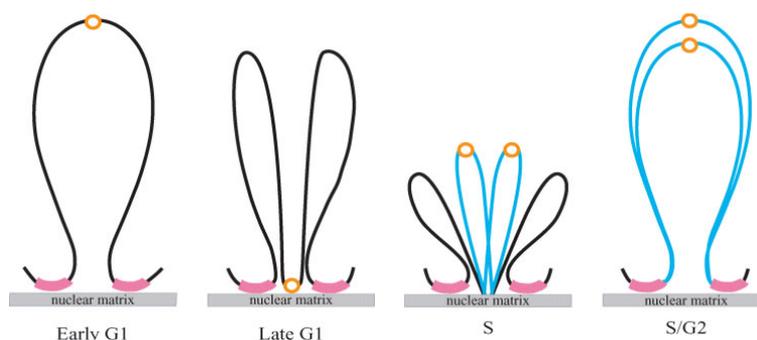


Figure 7. Modèle de réplication d'ADN. L'ADN « parental » forme une courbure, avec ses extrémités attachées au niveau de la matrice nucléaire (couleur grise). L'origine de la fourche de réplication est représentée en orange (cercle orange) et l'ADN nouvellement synthétisée en bleu. Image modifiée de la version originale.⁶

Ces contraintes topologiques se traduisent par des entrelacements, des courbures, des surenroulements etc. Pour une molécule d'ADN, un surenroulement positif désigne un surenroulement effectué dans le sens de la rotation de la double hélice (sens anti-horaire) tandis que le surenroulement négatif est un surenroulement effectué dans le sens opposé par rapport à la rotation de la double hélice (sens des aiguilles d'une montre) (**Figure 8**).

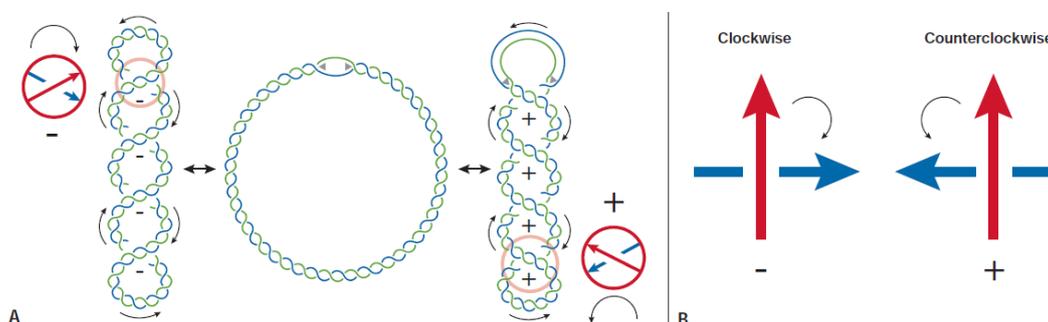


Figure 8. (A) Représentation d'une ADN négativement surenroulé (gauche) et de l'ADN positivement surenroulé (droite). (B) signes représentant les surenroulements, vue de dessus. La flèche rouge représente le brin au-dessus.⁷

⁶ B. Anachkova, V. Djeliova, G. Russev, *J. Cell. Biochem.* **2005**, 96, 951.

Lors de la réplication (**Figure 9A**), la molécule d'ADN, qui ne peut tourner autour de son axe pour se relaxer, voit apparaître des surenroulements positifs en amont de la fourche de réplication où se trouve l'équipement enzymatique intervenant dans le processus de réplication d'ADN (**Figure 9B**). De même, d'autres structures telles que les précatéanes apparaissent en aval de la fourche de la réplication (**Figure 9C**).

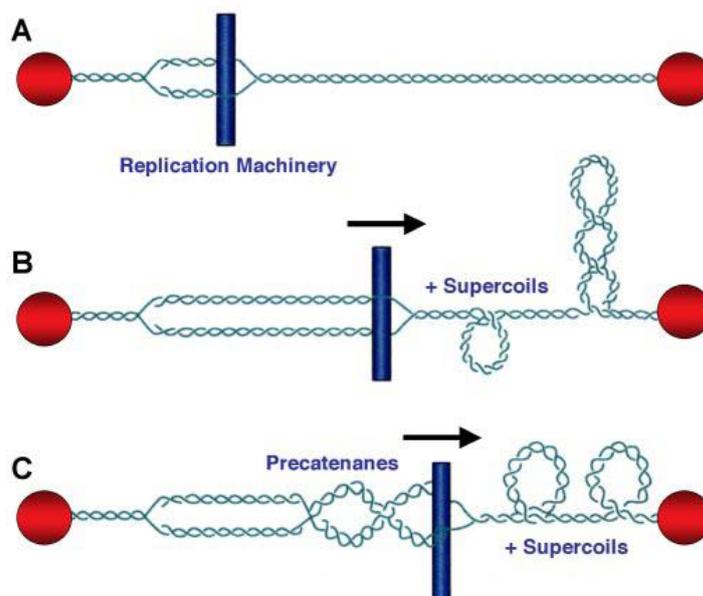


Figure 9. Surenroulement de l'ADN générés par l'avancée des fourches de réplication.⁸

Ces « domaines topologiques » sont délétères pour la cellule s'ils s'accumulent. En effet, les surenroulements positifs empêchent l'ouverture des deux brins de l'ADN et donc la fourche de réplication est au final stoppée.⁹ Et les précatéanes, s'ils ne sont pas résolus, conduisent au final à la caténation des chromosomes. La conjugaison de ces phénomènes engendre une instabilité génomique pouvant aller jusqu'à des réarrangements chromosomiques engendrant ainsi soit la mort de la cellule, soit la conversion en une cellule cancéreuse.

Le deuxième problème concerne la réplication, plus précisément la ségrégation des chromosomes. En effet, lors de la réplication des cellules, l'ADN se trouve dans un état surenroulé et condensé dans des chromosomes mitotiques. Lors de l'anaphase et donc lors de la division des centromères suivie de la séparation des chromatides, les molécules d'ADN se

⁷ J. B. Schwartzman, A. Stasiak, *EMBO Rep.* **2004**, 5, 256.

⁸ A. K. McClendon, A. C. Rodriguez, N. Osheroff, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 39337.

⁹ J. C. Wang, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2002**, 3, 430.

retrouvent enchevêtrées les unes dans les autres, le tout avec beaucoup de contraintes d'ordre spatial. Une fois de plus, le phénomène est délétère pour la cellule si ce problème n'est pas résolu. Le modèle d'ADN de Watson et Crick et la théorie de la réplication semi-conservative a, au bilan, soulevé de nombreux problèmes et des polémiques.

1.2. Les ADN topoisomérases

Ces problèmes de l'accès à l'information génétique et de « l'organisation physique », en d'autres termes la topologie de l'ADN évoqués ci-dessus, ont été résolus en 1971 avec la découverte par le Pr. James Wang, chez les *Escherichia coli*, d'une protéine dénommée ω capable de relaxer les ADN surenroulés négativement.¹⁰ L'année suivante, Champoux et Dulbecco ont démontré l'existence des entités parfois dénommées *swivelases* capables de relaxer les ADN surenroulés positivement et négativement chez les mammifères.¹¹ En 1974, ce type de protéine a été décelé chez les souris¹² et, en 1976 ont été découvertes chez les *Escherichia coli* des ADN gyrases dotées de la faculté d'introduire des surenroulements négatifs sur les ADN circulaires relaxés.¹³ Enfin, les topoisomérases chez l'Homme ont été caractérisées en 1975.¹⁴ Ces différentes enzymes, additionnées à celles découvertes dans les années suivantes, ont été regroupées sous le terme de topoisomérases.

Les topoisomérases constituent la solution à tous les problèmes d'ordre topologique provenant de la structure de l'ADN en double hélice, en coupant, manipulant et reliant cette dernière dans un même événement catalytique et de façon coordonnée (**Figure 10**), le tout par de simples mais élégantes réactions de transestérification.

¹⁰ J. C. Wang, *J. Mol. Biol.* **1971**, 55, 523.

¹¹ J. J. Champoux, R. Dulbecco, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1972**, 69, 143.

¹² H. P. Vosberg, L. I. Grossman, J. Vinograd, *Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* **1974**, 33, 1356, Abstr. No. 751.

¹³ M. Gellert, K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, H. A. Nash, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1976**, 73, 3872.

¹⁴ W. Keller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1975**, 72, 2550.

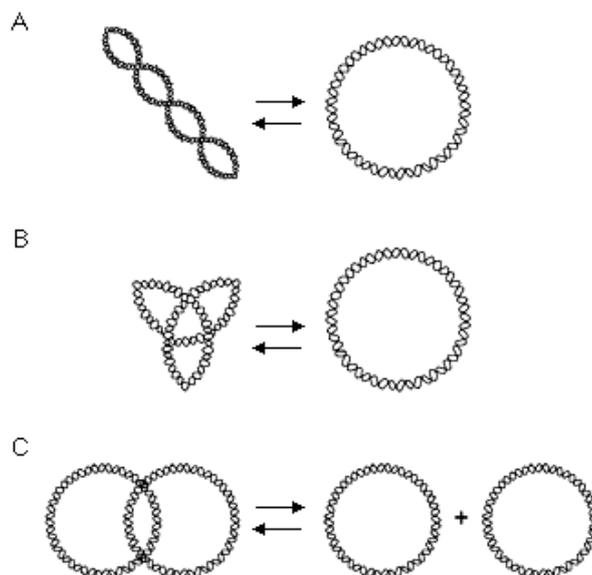


Figure 10. Action des topoisomérases sur l'ADN circulaire.¹⁵

Ces enzymes modifient le degré de surenroulement de l'ADN (**Figure 10A**) afin de permettre un accès aux informations génétiques contenues dans la séquence de bases puriques et pyrimidiques lors de la réplication et la transcription de l'ADN. Elles peuvent, par ailleurs, démêler les segments larges d'ADN (**Figure 10B**), caténer et décaténer ces molécules (**Figure 10C**), permettant ainsi une séparation des chromosomes lors de la réplication des cellules et ce, sans endommager les gènes.

Comme l'on pouvait s'y attendre, un déficit en topoisomérases dans les cellules ou une malformation de ces topoisomérases suite à une ou plusieurs mutations au niveau de la génétique engendre des défauts lors de la réplication de l'ADN¹⁶ ainsi qu'une croissance très lente et une augmentation de la mortalité chez l'organisme concerné.¹⁷ Chez l'Homme, une déficience en topoisomérases est connue pour engendrer le développement de pathologies graves, notamment au niveau rénal.¹⁸

¹⁵ G. Karp, *Biologie Cellulaire et Moléculaire*, 2^{ème} édition française, De Boeck, **2004**

¹⁶ (a) L. Postow, N. J. Crisona, B. J. Peter, C. D. Hardy, N. R. Cozzarelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 8219. (b) M. Maftahi, C. S. Han, L. D. Langston, J. C. Hope, N. Zigouras, G. A. Freyer, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 4715. (c) A. Goodwin, S. W. Wang, T. Toda, C. Norbury, I. D. Hickson, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 4050.

¹⁷ (a) E. Massé, M. Drolet, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 16659. (b) Q. Zhu, P. Pongpech, R. J. DiGate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 9766.

¹⁸ (a) L. V. Ivanova, P. Rudolph, U. Kellner, A. Jurgensen, I. E. Tareeva, P. Alm, D. Proppe, *Kidney Int.* **2000**, 58, 1603. (b) L. V. Ivanova, P. Rudolph, Y. M. Shilov, F. Gieseler, P. Alm, I. E. Tareeva, D. Proppe, *Am. J. Kidney Dis.* **2001**, 38, 102.

1.3. La classification des ADN topoisomérases

La classification des topoisomérases est fondée sur leur mécanisme d'action et, plus précisément, sur le nombre de brins d'ADN que celles-ci coupent. Elle a été introduite lorsque les recherches ont montré une très nette différence des mécanismes d'action de la protéine ω et du *swivelase* d'un côté, l'ADN gyrase et les décatanases eucaryotes de l'autre.¹⁹ Ainsi, à ce jour, deux types de topoisomérases ont pu être identifiés : les topoisomérases de type I (EC 5.99.1.2) et les topoisomérases de type II (EC 5.99.1.3). Dans le cadre de notre étude, nous nous intéresserons en priorité aux topoisomérases de type II.

1.3.1. Les ADN topoisomérases de type I

Les topoisomérases de type I, divisées en trois sous-familles type IA, IB et IC, coupent un seul brin d'ADN. A ce jour, quatre topoisomérases de type I sont présentes dans le corps humain :

- topoisomérase I nucléaire de type IB (Topo I), codée par *TOP1*,
- topoisomérase I mitochondriale, également de type IB, codée par *TOP1MT*,
- isoforme α de topoisomérase III, de type IA, codée par *TOP3A*,
- isoforme β de topoisomérase III, de type IA. Codée par *TOP3B*.

Mécanistiquement, les topoisomérases de type IA se lient à l'extrémité 5' phosphate de l'ADN clivé, tandis que les topoisomérases de type IB se lient à l'extrémité 3' de l'ADN clivé (*Figure II*).

¹⁹ L. F. Liu, C. C. Liu, B. M. Alberts, *Cell* **1980**, *19*, 697.

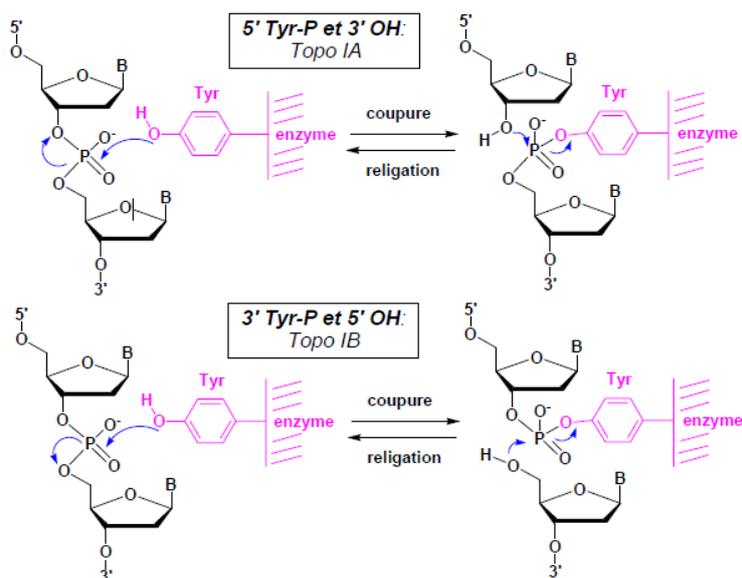


Figure 11. Mécanisme d'action des topoisomérases de type I.²⁰

Les Topo I occupent une fonction essentielle lors de la réplication de l'ADN et des cellules (devenant ainsi la cible des inhibiteurs de topoisomérase I) notamment dans l'élimination des surenroulements positifs en amont de la fourche de la réplication en combinaison avec la Topo II, tandis que le rôle des topoisomérases III n'est pas encore tout à fait établi : les récents résultats montrent que la topoisomérase III interagit avec une famille d'enzymes appelées RecQ hélicases pour empêcher la formation des intermédiaires pouvant sérieusement perturber la bonne recombinaison des chromosomes.²¹

Le **Tableau 1** rassemble toute une série de caractéristiques de ces enzymes.

²⁰ M. Duca, *Nouveaux inhibiteurs de topoisomérase II dérivés de la 4'-déméthylépipodophyllotoxine dirigés sur des séquences spécifiques de l'ADN : conception, synthèse et applications*, Thèse de doctorat du Muséum National d'Histoire Naturelle, spécialité Biochimie Moléculaire, Paris, soutenue le **28 Février 2005**.

²¹ C. R. Lopez, S. Yang, R. W. Deibler, S. A. Ray, J. M. Pennington, R. J. Digate, P. J. Hastings, S. M. Rosenberg, E. L. Zechiedrich, *Mol. Microbiol.* **2005**, 58, 80.

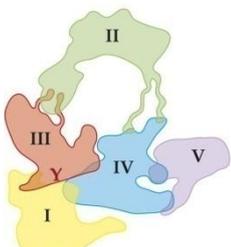
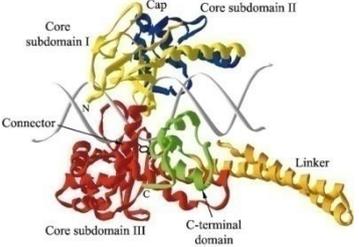
	Topoisomérases de type IA	Topoisomérases de type IB	Topoisomérases de type IC
localisation	Bactéries Eucaryotes Archéobactéries	Bactéries Virus Eucaryotes	Archéobactéries (<i>M. kandleri</i>)
caractéristiques structurales	<ul style="list-style-type: none"> • Monomériques, de structure toroïdale générée par une protéine constituée de 4 à 5 domaines, la surface de la cavité étant couverte de résidus Lys et Arg. • Résidu Tyr319 dans le domaine III 	<ul style="list-style-type: none"> • Monomériques, taille allant de 33-36 kDa chez les bactéries et chez les virus à 90 kDa chez les eucaryotes, avec 4 domaines distincts. • Résidu Tyr723 localisé dans le domaine C-terminal. 	<ul style="list-style-type: none"> • Taille supérieure à 100 kDa • Eléments d'activité de relaxation d'ADN localisée dans la partie N-terminale (61 kDa).
Caractéristiques mécanistiques	<ul style="list-style-type: none"> • Relaxe les surenroulements négatifs • Etablissement de la liaison avec l'ADN <i>via</i> la liaison covalente entre l'atome d'oxygène du résidu Tyr319 et l'atome de phosphore du groupement phosphate à l'extrémité 5' scissile de l'ADN (G-segment) • Mg²⁺ dépendante 	<ul style="list-style-type: none"> • Relaxe les surenroulements négatifs et positifs • Etablissement de la liaison avec l'ADN <i>via</i> la liaison covalente entre l'atome d'oxygène du résidu Tyr723 et l'atome de phosphore du groupement phosphate à l'extrémité 3' de l'ADN • Non Mg²⁺ dépendante 	<ul style="list-style-type: none"> • Relaxe les surenroulements négatifs et positifs, à une température d'activité optimale comprise entre 70 et 90 °C. • C-terminale impliquée dans la réparation d'ADN

Tableau 1. Les topoisomérases de type I.

1.3.2. Les ADN topoisomérases de type II

Les topoisomérases de type II clivent, quant à elles, les deux brins d'ADN *via* le processus de double transestérification. Elles ont été pendant longtemps considérées comme appartenant à une seule famille indivisible, et ceci jusqu'en 1997, date à laquelle la découverte des topoisomérases VI chez les Archéobactéries possédant une structure différente a finalement

conduit à une subdivision de cette famille en deux sous-familles : les topoisomérases de type IIA et les topoisomérases de type IIB. Contrairement aux topoisomérases de type I, ces enzymes sont toutes ATP-dépendantes.

Chez l'Homme, trois types de topoisomérase de type II existent :

- isoforme α de topoisomérase de type IIA (Topo II α), codée par *TOP2A*,
- isoforme β de topoisomérase de type IIA (Topo II β), codée par *TOP2B*,
- Spo11, un homologue de topoisomérase de type IIB, codée par *SPO11*.

Dans le cadre de notre étude, les topoisomérases de type IIB ne seront pas abordées de manière extensive.

Les Topo II α se trouvent dans toutes les cellules et sont essentielles dans la réplication/transcription d'ADN, ainsi que dans la condensation et la ségrégation des chromosomes lors de la réplication des cellules.²² En effet, contrairement aux ADN gyrases de chez *Escherichia coli*, les Topo II, qui peuvent effectuer des transports de l'ADN inter- et intramoléculaire (l'ADN gyrase ne peut qu'effectuer un transport de l'ADN intramoléculaire),²³ peuvent également :

- relaxer les surenroulements, notamment ceux générés en amont de la fourche de réplication (surenroulements positifs),²⁴
- éliminer les précatéanes qui se forment en aval de la fourche de réplication et qui peuvent être également délétères si elles persistent dans l'organisme,

Par ailleurs, ces Topo II α sont connues pour intervenir dans la condensation de la chromatine même si, à l'heure actuelle, leur rôle précis ainsi que son mécanisme d'action n'ont pas été encore élucidés.²³ Quant aux Topo II β , celles-ci ne seraient pas indispensables dans les processus de réplication de l'ADN et des cellules, ce qui justifierait la présence de ce type d'enzyme seulement dans certaines cellules. Néanmoins, ces protéines sont connues pour être

²² J. L. Nitiss, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9, 327.

²³ J. Roca, *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, 721.

²⁴ J. Baxter, J. F. Diffley, *Mol. Cell.* **2008**, 30, 790.

incontournables dans la régulation d'activité de certaines cellules ainsi que dans la survie des cellules neuronales.²² Des travaux récents ont mis en lumière l'intervention de ces Topo II β dans l'initiation du processus de transcription d'ADN de certains gènes.²⁵

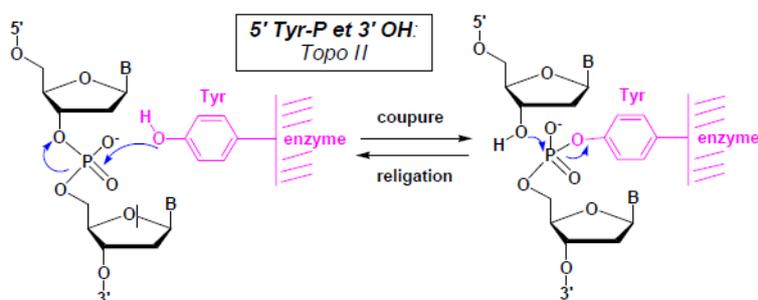


Figure 12. Transestérification effectuée par le résidu tyrosine catalytique de la Topo II.²⁰

Tout comme pour les topoisomérases de type IA, le clivage de la double hélice par le résidu tyrosine de l'enzyme est effectué par formation d'une liaison phosphotyrosyle avec le phosphate en position 5' (**Figure 12**). Cette réaction de transestérification est effectuée sur les deux brins de l'ADN.

Le mécanisme d'action global de la topoisomérase II est communément appelé mécanisme à « deux portes » (*two-gate mechanism*) (**Figure 13**).

²⁵ B. G. Ju, V. V. Lunnyak, V. Perissi, I. Garcia-Bassets, D. W. Rose, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld, *Science* **2006**, 312, 1798.

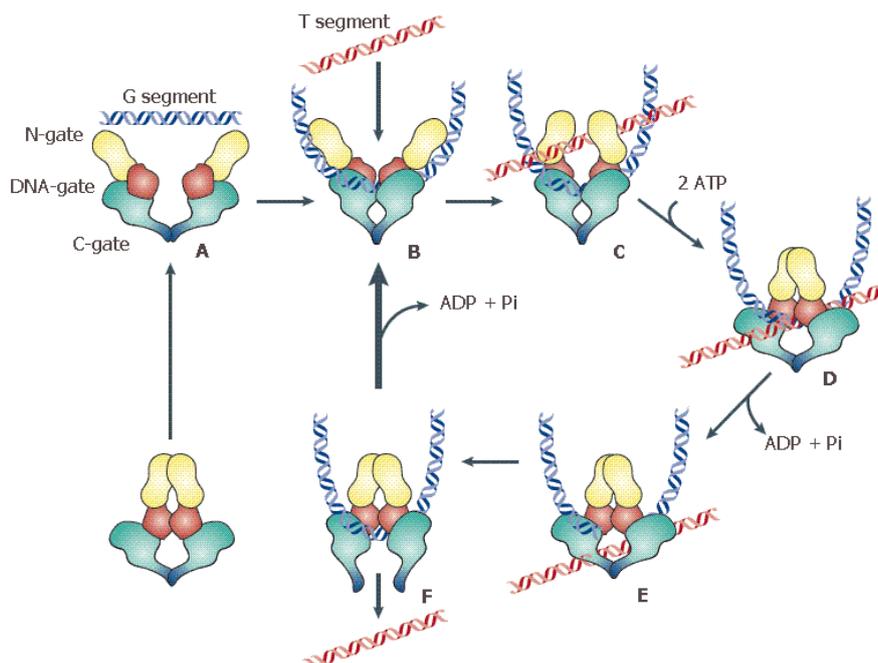


Figure 13. Mécanisme d'action des Topo II. L'hélice G (G-segment) est en bleu, et l'hélice T (T-segment) en rouge. Image modifiée de la version originale.²²

Ce mécanisme consiste en une coupure des deux brins de l'ADN clivable appelé hélice G (G pour *Gate*), suivi du passage du brin d'ADN intact dénommé hélice T (T pour *Transfer*) à travers la brèche et enfin la religation du brin clivé. Le cycle catalytique se déroule de la manière suivante :

- **Étape 1 :** la topoisomérase reconnaît la partie de l'hélice G à cliver et se lie de façon non covalente à elle (A). Le *DNA-gate* se ferme aussitôt à son approche et l'hélice G se « pose » à ce niveau. Il est à noter que la *C-gate* reste fermée. Par la suite, l'hélice T interagit alors avec l'ADN et se place dans la cavité formée par le *N-gate* et le *DNA-gate* fermé (B, C).
- **Étape 2 :** la fixation de deux molécules d'ATP dans les deux domaines N-terminaux engendre des changements conformationnels qui conduisent à la fermeture du *N-gate* (D). En présence d'un cation divalent (Mg^{2+}), capturé par un domaine dénommé TOPRIM se trouvant au niveau de *DNA-gate*, la topoisomérase II introduit alors transitoirement dans l'hélice G une coupure double-brin, suivant le mécanisme reporté sur la **Figure II**. Le complexe ADN-enzyme ainsi formé est appelé **complexe de clivage**.

- **Étape 3** : la brèche créée par le clivage de l'hélice G permet le passage de l'hélice T de la cavité formée par la *N-gate* vers la *C-gate* qui reste encore fermée (**E**). Cette migration est accompagnée de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP fixée lors de l'étape précédente.
- **Étape 4** : une fois la migration de la double hélice T réalisée, l'enzyme procède à la religation de l'ADN de l'hélice G au niveau de *DNA-gate*. Cette réaction engendre la sortie de l'hélice T par la *C-gate*, facilitée par la réduction de l'espace disponible dans la cavité dans laquelle l'hélice T est entrée à l'étape précédente (**F**).
- **Étape 5** : l'hydrolyse de la deuxième molécule d'ATP permet la fermeture de *C-gate* et la réouverture de *N-gate*, permettant à l'enzyme de retrouver sa capacité à s'engager dans un nouveau cycle catalytique.

Les caractéristiques générales des topoisomérases de type II sont présentées dans le **Tableau 2**. Il est à noter qu'à ce jour, aucune structure cristallographique de la topoisomérase type II n'a pu être obtenue, notamment du fait de la taille et de la flexibilité de l'enzyme.²² Chez l'Homme, seul le domaine ATPase dans le domaine N-terminal a pu être obtenu par cristallographie.²⁶ Les domaines N-terminal et C-terminal ont été déterminés chez *Saccharomyces cerevisiae*, une autre espèce eucaryote.²⁷ Les informations structurales et biochimiques disponibles à ce jour permettent de dégager des informations concernant la structure globale de ces enzymes, d'autant plus que cette classe de topoisomérases présente une forte homologie de séquence, ce qui a considérablement aidé à l'identification des différents domaines structuraux.

En ce qui concerne le complexe binaire ADN-topoisomérase de type II, seule la structure cristallographique du domaine de liaison-clivage de l'ADN de *Saccharomyces cerevisiae* a été élucidé à ce jour, qui a notamment montré une courbure de l'ADN de 150° lors de sa liaison à l'enzyme.²⁸

²⁶ H. Wei, A. J. Ruthenburg, S. K. Bechis, G. L. Verdine, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 37041.

²⁷ (a) S. Classen, S. Olland, J. M. Berger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 10629. (b) J. M. Berger, S. J. Gamblin, S. C. Harrison, J. C. Wang, *Nature* **1996**, 379, 225. (c) D. Fass, C. E. Bogden, J. M. Berger, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 322.

²⁸ K. C. Dong, J. M. Berger, *Nature* **2007**, 450, 1201.

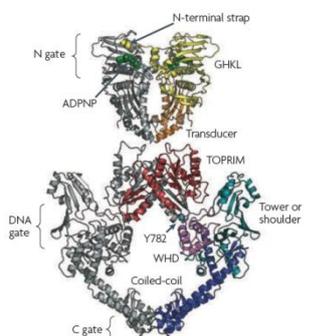
	Topoisomérases de type IIA	Topoisomérases de type IIB
localisation	Bactéries Bactériophages Eucaryotes	Archéobactéries Certaines plantes (algues vertes et rouges) Bactéries Eucaryotes (Spo11)
Caractéristiques structurales	<ul style="list-style-type: none"> • homodimères (eucaryotes), hétérotétramères de type A₂B₂ (bactéries) et hétérohexamères (bactériophages) • Existence de deux isoformes α et β chez les mammifères. • Possèdent toutes un domaine ATPase, dans le domaine N-terminal chez les eucaryotes. • Résidu Tyr impliqué dans la liaison avec l'ADN localisé dans la région C-terminal chez les eucaryotes (Tyr805 pour Topo IIα et Tyr821 pour Topo IIβ).²⁹ Chez la levure, le résidu tyrosine catalytique est placé en Tyr782 (image ci-dessous²²). 	<ul style="list-style-type: none"> • hétérotétramères, de type A₂B₂ • possède un domaine ATPase, comme pour les topoisomérases de type IIA, mais globalement peu de similarité sur le plan des séquences de protéines avec les premiers, notamment au niveau du TOPRIM, distincte de celle de topoisomérases de type IIA : elle est homologue à SPO11, une enzyme intervenant dans la recombinaison méiotique • Peu de données disponibles, pas de cristaux isolés sur l'intégrité de l'enzyme à ce jour.
Caractéristiques mécanistiques	<ul style="list-style-type: none"> • Génération de coupure des deux brins de l'ADN, avec, chez les eucaryotes, une sous-unité clivant un brin. • Mécanisme à « deux portes ». L'hydrolyse de deux molécules d'ATP est requise pour des changements conformationnels de l'enzyme : elle n'intervient pas dans le processus de clivage et la religation des brins de l'ADN. • Complexation de Mg²⁺ indispensable pour le clivage de l'ADN 	<ul style="list-style-type: none"> • Mécanisme similaire à celui des topoisomérases de type IIA sans l'étape de l'ouverture du C-gate

Tableau 2. Les topoisomérases de type II.

²⁹ J. H. Sng, V. J. Heaton, M. Bell, P. Maini, C. A. Austin, L. Mark Fisher, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1444, 395.

2. Les inhibiteurs de topoisomérase II

Les inhibiteurs de Topo II peuvent être classés, comme pour les inhibiteurs Topo I, en deux catégories : les poisons et les inhibiteurs catalytiques. Ces agents interfèrent au moins avec une étape du cycle catalytique (**Figure 14**) :

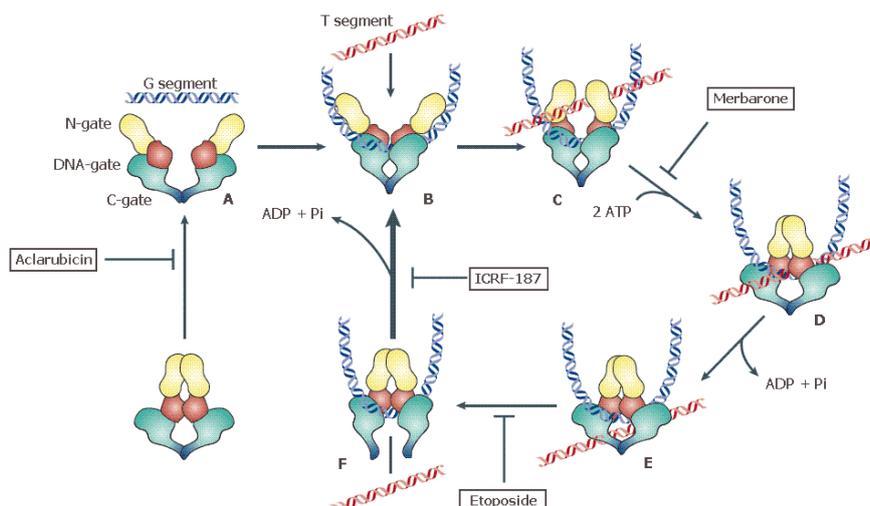


Figure 14. Cycle catalytique de Topo II avec les inhibiteurs. Image modifiée de la version originale.³⁰

Les molécules actuellement sur le marché sont toutes des poisons de l'enzyme et peuvent être classées en trois sous-familles, en fonction de leur structure chimique :

- les anthracyclines
- les anthracènediones
- les épipodophyllotoxines

Les deux premières familles de molécules sont des intercalants de l'ADN, tandis que les épipodophyllotoxines, beaucoup moins affines à l'ADN, agissent sur la stabilisation du complexe de clivage *via* des interactions protéine-médicament.

³⁰ J. L. Nitiss, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9, 338.

2.1. Les poisons intercalants des Topo II

Peu de données sont actuellement disponibles concernant le mécanisme d'action réel de ces poisons dans la mesure où, contrairement aux inhibiteurs de Topo I, la structure cristallographique du complexe ternaire ligand-ADN-Topo II n'a jamais pu être obtenue à ce jour.

L'hypothèse actuelle est que ces intercalants à l'ADN agiraient de la même façon que la camptothécine (CPT) sur la Topo I, à savoir par une inhibition interfaciale avec la Topo II qui se lie cette fois-ci non pas à l'extrémité 3' du groupement hydroxyle de l'ADN mais à 5' (**Figure 15**). Une inhibition interfaciale est un mode d'inhibition dans lequel l'agent actif se lie, de manière réversible et non compétitive à l'interface d'au moins deux macromolécules, avec le complexe multimérique résultant se trouvant dans un état de transition d'ordre structural.³¹

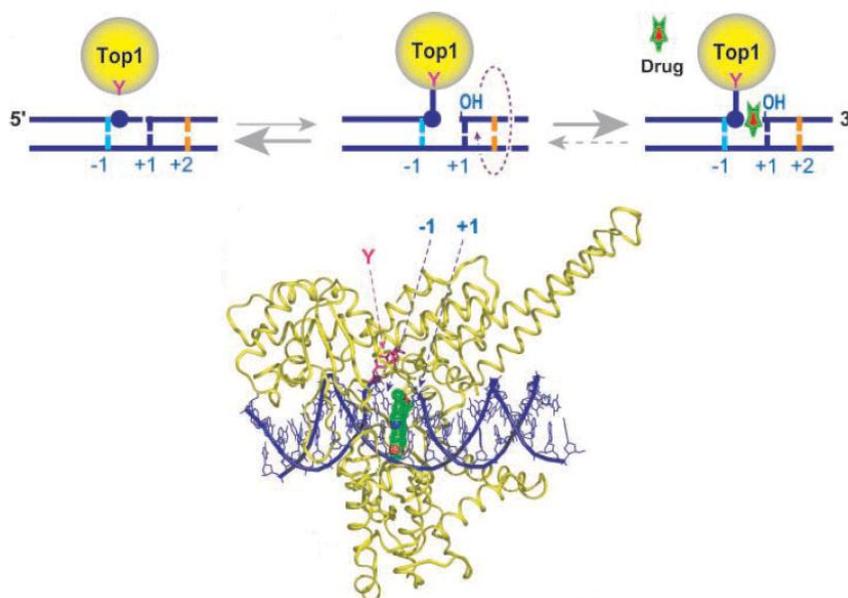


Figure 15. Mode d'action de la CPT sur la Topo I.³¹ Les bases -1 et +1 désignent respectivement les bases de l'ADN en aval et en amont du site de clivage.

Tout comme les inhibiteurs de Topo I, les poisons intercalants de Topo II se positionneraient entre les bases -1 et +1 (**Figure 15**), ce qui, au final, provoquerait une modification au niveau

³¹ C. Marchand, S. Antony, K. W. Kohn, M. Cushman, A. Ioanoviciu, B. L. Staker, A. B. Burgin, L. Stewart, Y. Pommier, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 287.

de la configuration spatiale du complexe de clivage, plus précisément au niveau de l'alignement entre la liaison phosphodiester du complexe ADN-Topo II et l'extrémité 3'-OH libre requise pour la religation de l'ADN, bloquant ainsi le cycle enzymatique.³²

Parmi les médicaments entrant dans cette catégorie (**Figure 16**), la famille des anthracyclines est constituée de molécules dont le lead, la doxorubicine/l'adriamycine (ADRIAMYCIN RDF®) **VI** est d'origine bactérienne, plus précisément issu de lignées *Streptomyces*,

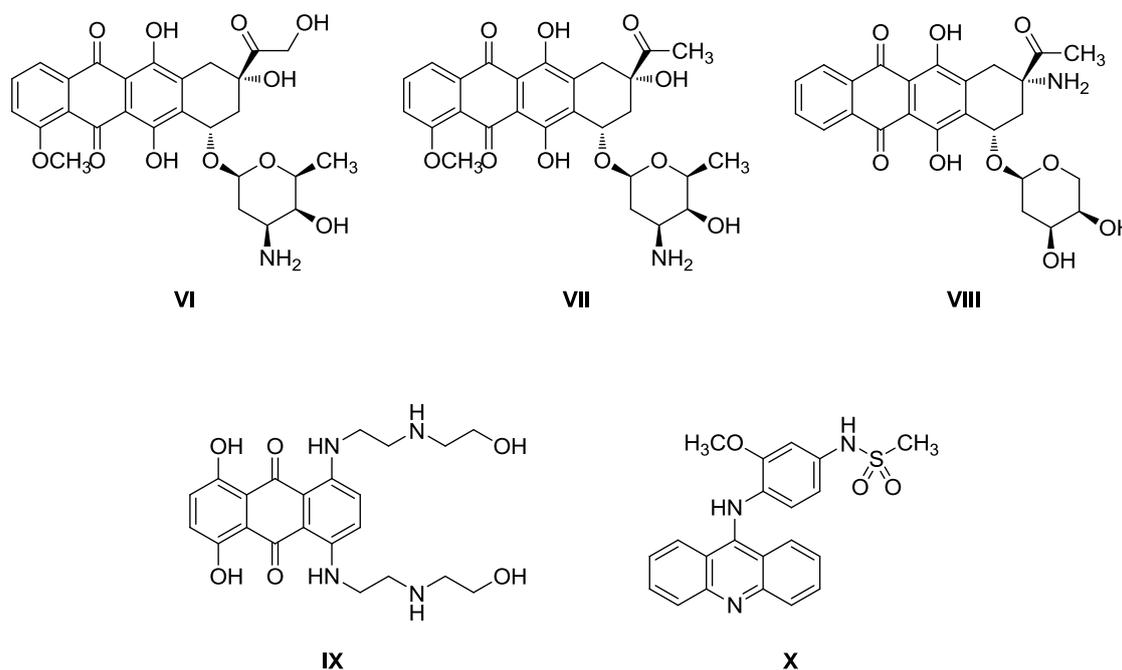


Figure 16. Exemples de poisons intercalants de Topo II. **VI** (doxorubicine/adriamycine), **VII** (daunorubicine/daunomycine), **VIII** (idarubicine), **IX** (mitoxantrone), **X** (amsacrine).

Les anthracyclines font partie actuellement des composés les plus efficaces pour divers types de cancer. On suppose que l'inhibition de Topo II est le principal mode d'action. Plusieurs autres mécanismes semblent également intervenir, notamment l'inhibition des enzymes appelées hélicases qui ont pour rôle de dissocier les ADN double-brin en ADN monobrin,³³ mais également la formation de radicaux au niveau du groupement quinone.³⁴ C'est la raison pour laquelle les anthracyclines, ainsi que la mitoxantrone sont parfois classées en tant qu'antibiotiques antitumoraux et non en tant qu'inhibiteurs de Topo II.

³² Y. Pommier, J. Cherfils, *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, 26, 138.

³³ N. R. Bachur, F. Yu, R. Johnson, R. Hickey, Y. Wu, L. Malkas, *Mol. Pharmacol.* **1992**, 41, 993.

³⁴ E. Feinstein, E. Canaani, L. M. Weiner, *Biochemistry* **1993**, 32, 13156.

2.2. Les poisons non intercalants des Topo II

La famille représentative des poisons non-intercalantes de Topo II est la famille des épipodophyllotoxines, dont les molécules représentatives sont l'étoposide (VEPESID[®], VM16[®]) et le téniposide (VUMON[®], VM26[®]) (**Figure 17**).

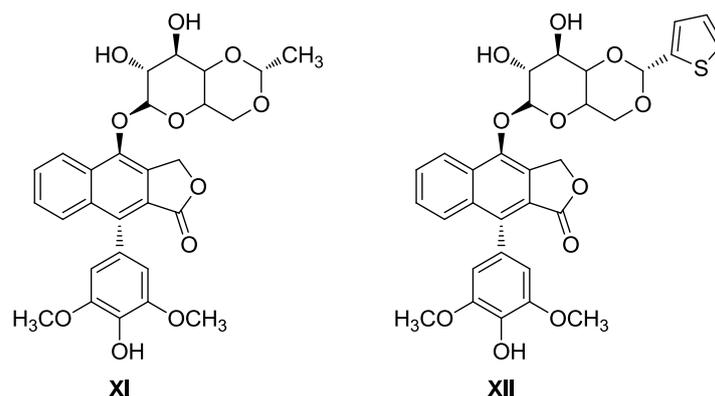


Figure 17. Exemples de poisons non-intercalants de Topo II. **XI** (étoposide), **XII** (téniposide).

Les épipodophyllotoxines sont connues pour ne pas avoir d'action directe avec l'ADN. Le mécanisme d'action de ces composés n'est pas encore élucidé. Il est assez probable que les épipodophyllotoxines auraient le même effet sur le complexe de clivage que les anthracyclines, à savoir une altération dans la configuration spatiale des acteurs de la religation des brins de l'ADN. Dans le cas ici évoqué, un complexe initial binaire ligand-Topo II serait important pour vectoriser la molécule vers le site où le complexe de clivage peut être formé.

2.3. Les inhibiteurs catalytiques de Topo II

Les inhibiteurs catalytiques interviennent sur les Topo II en inhibant l'activité enzymatique de ces derniers mais sans avoir d'action notable sur le complexe de clivage : l'inhibition peut être effectuée sur une, voire plusieurs étapes du cycle enzymatique des Topo II. Les différences sur le plan mécanistique de ces inhibiteurs catalytiques avec les poisons ont été mises en évidence par des observations de cultures de cellules *in vitro*.³⁵

³⁵ P. B. Jenen, M. Sehested, *Biochem. Pharmacol.* **1997**, 54, 755.

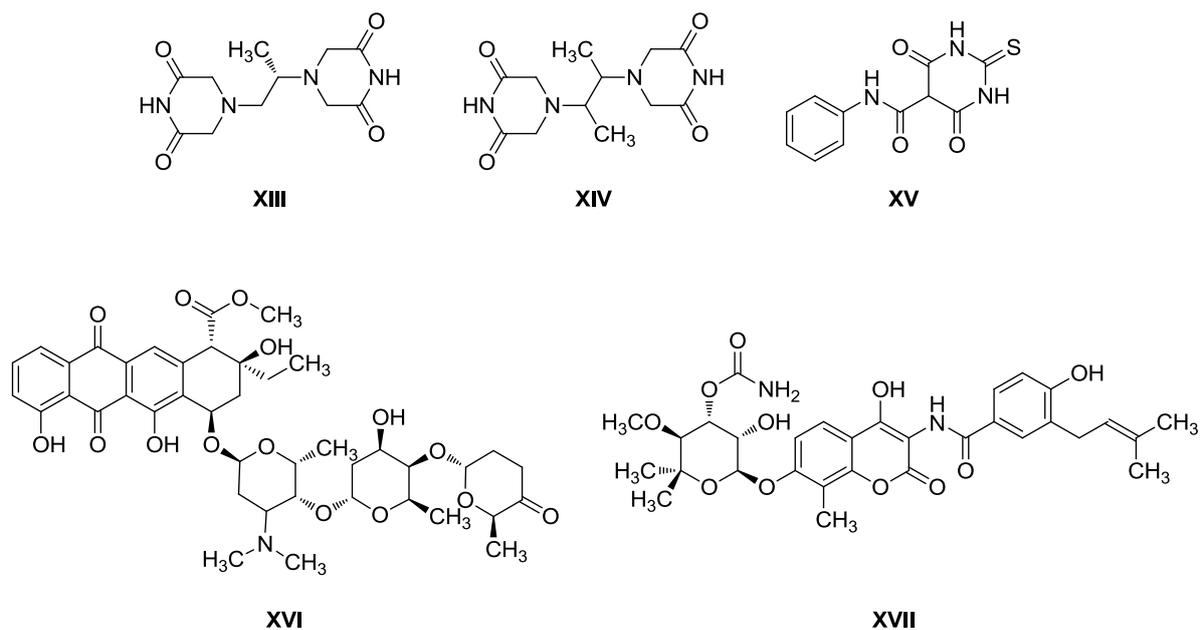


Figure 18. Exemples d'inhibiteurs catalytiques de Topo II. **XIII** (dexrazoxane/IRCF-187), **XIV** (IRCF-193), **XV** (merbarone), **XVI** (acliarubicine), **XVII** (novobiocine).

Plusieurs familles de molécules de structure très diverse appartiennent à cette classe d'inhibiteurs (**Figure 18**). La famille la plus connue est celle des bisdioxopipérazines, les seuls composés connus à ce jour aptes à cibler uniquement les Topo II.³⁰ Cette promiscuité est un problème majeur des inhibiteurs catalytiques et c'est pour cette raison que, hormis l'aclarubicine, ces agents sont la plupart du temps utilisés à d'autres fins que le traitement du cancer : la dexrazoxane est commercialisée en tant qu'agent de cardioprotection notamment lors de l'administration des anthracyclines, tandis que la novobiocine est utilisée pour promouvoir l'efficacité des agents alkylants et des inhibiteurs de topoisomérase.³⁶

2.4. De la stabilisation du complexe de clivage à l'apoptose

Nous avons mentionné dans le Chapitre I que l'un des moyens dont on dispose actuellement pour détruire les cellules cancéreuses consiste à altérer leurs ADN. A ce titre, il est important de signaler que l'effet thérapeutique des inhibiteurs de Topo II (également de Topo I) n'est pas le résultat de l'inhibition de l'activité catalytique de l'enzyme, mais de l'endommagement de l'ADN qui découle de stabilisation du complexe de clivage ADN-Topo II normalement

³⁶ A. K. Larsen, A. E. Escargueil, A. Skladanowski, *Pharmacol. Ther.* **2003**, 99, 167.

transitoire et réversible. En effet, c'est la fourche de la réplication qui est à l'origine de la mort des cellules tumorales, comme dans le cas des inhibiteurs de Topo I (**Figure 19**).

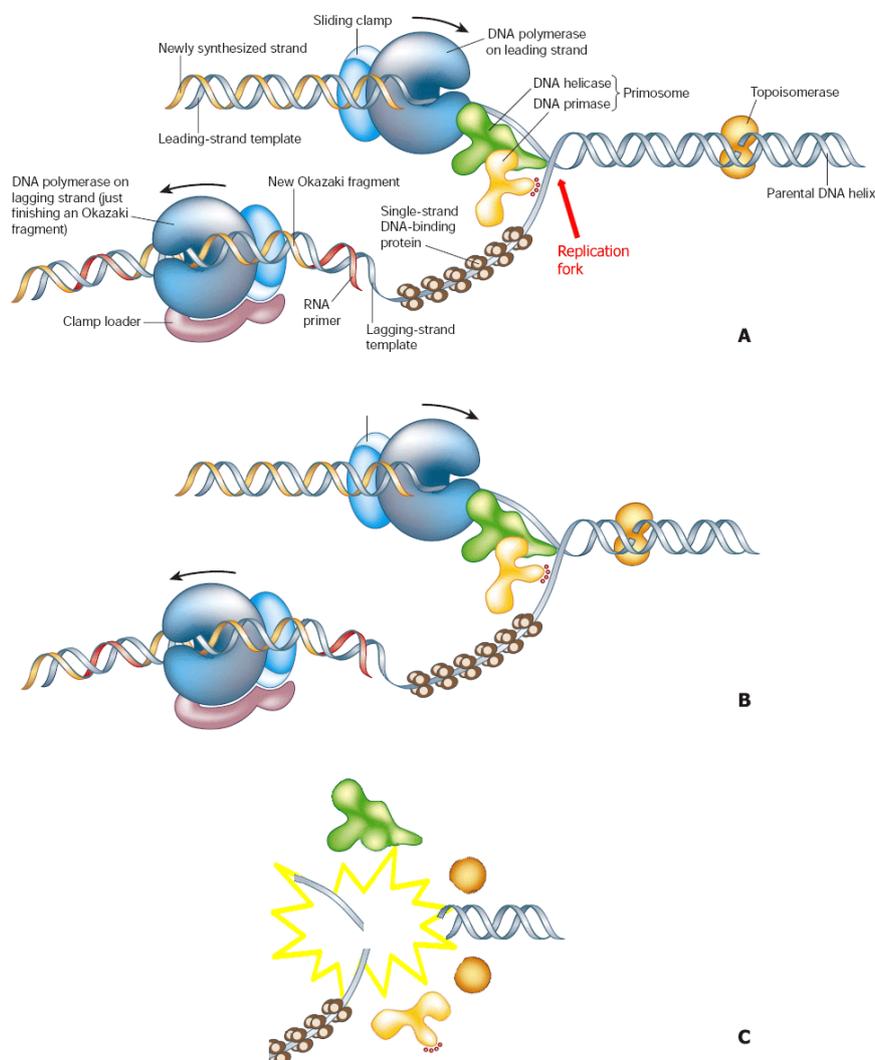


Figure 19. Coupure double brin générée par la stabilisation du complexe de clivage. **A** : schéma de la fourche de la réplication. La topoisomérase se trouve en amont de la fourche. **B** : La topoisomérase, bloquée, ne peut plus avancer, tandis que la fourche de la réplication s'approche du complexe de clivage stabilisé. **C** : la collision entre l'hélicase et le complexe de clivage stabilisé provoque la coupure double-brin de l'ADN. Image modifiée de la version originale.³⁷

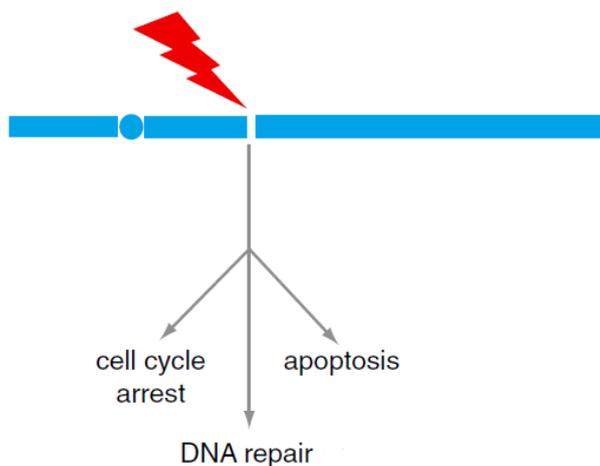
Le mécanisme actuellement admis dans le cas du complexe de clivage impliquant les Topo II est que la protéine dénommée hélicase, catalysant l'ouverture d'acides nucléiques appariés sous forme double brins et se trouvant au niveau de la fourche de réplication, entrerait en

³⁷ B. Alberts, *Nature* **2003**, 421, 431.

collision avec le complexe de clivage stabilisé et engendrerait alors des lésions irréversibles, notamment des coupures double-brin (*double-strand breaks, DSBs*), au niveau de l'ADN (*Figure 19C*). La transcription pourrait aussi générer des lésions au niveau à l'ADN mais on suppose que, surtout dans les cellules cancéreuses, la proportion des cassures des brins d'ADN induite par la transcription est moindre comparée à celle des cassures induite par la réplication.

Une fois ces lésions irréversibles repérées par différentes protéines (*checkpoint proteins*), une myriade de protéines forme des réseaux de signalisation, avec notamment la phosphorylation des différentes protéines par les kinases. Trois voies se présentent alors pour la cellule (*Figure 20*) :

- la réparation de l'ADN,
- l'arrêt du cycle cellulaire, suivi de la réparation d'ADN
- l'apoptose, ou la mort programmée de la cellule



*Figure 20. Réponse cellulaire face aux lésions à l'ADN. Image modifiée de la version originale.*³⁸

Le mécanisme sur lequel la cellule se base pour décider entre la réparation, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose demeure encore, à ce jour, inconnu. A vrai dire, ce mécanisme est loin d'être élucidé, tant il existe un nombre élevé de protéines activées. Une récente étude a montré qu'à partir des protéines dénommées ATM et ATR, jouant le rôle de détecteur de

³⁸ T. T. Su, *Annu. Rev. Genet.* **2006**, *40*, 187.

lésions à l'ADN et de transducteurs, plus de 700 protéines sont phosphorylées.³⁹ Néanmoins, comme l'a brièvement indiqué Pommier concernant les inhibiteurs de Topo I,⁴⁰ il est très probable que les altérations au niveau des signalisations ou des éléments intervenant à la réparation d'ADN et arrêt contribueraient à une « canalisation de la réponse cellulaire à l'endommagement de l'ADN » vers la mort programmée.

Mais d'autres voies de réparation ou l'arrêt du cycle cellulaire peuvent contribuer de manière négative aux actions thérapeutiques. C'est pour cette raison que l'une des stratégies élaborées de nos jours est d'utiliser les inhibiteurs de Topo avec des inhibiteurs de protéine kinase qui, en bloquant les signaux cellulaires de réparation, pourraient être utilisés en outre pour promouvoir le phénomène d'apoptose.

2.5. Limites à l'utilisation des inhibiteurs de Topo II

La résistance vis-à-vis des inhibiteurs de Topo II se manifeste le plus souvent par une réduction de l'expression des Topo II, c'est-à-dire une réduction du niveau de l'enzyme dans l'organisme. Les études biologiques actuelles montreraient que, dans ce cas, les activités de relaxation seraient transférées vers les Topo I, dont l'expression serait augmentée. Le phénomène contraire se déroule lors de l'inhibition de Topo I.³⁰

D'autres mécanismes de résistance incluent l'élimination des molécules par les transporteurs d'efflux. Les anthracyclines, tout comme la mitoxantrone, sont des substrats aux transporteurs d'efflux ABC tels que les transporteurs l'ABCB1 (également connu sous les acronymes Pgp et MDR1) et l'ABCG2 (aussi connu sous les acronymes MXR et BCRP). Quant aux épipodophyllotoxines, un des mécanismes de résistance serait provoqué par une mutation au niveau du résidu Ser1106 de la Topo II.⁴¹

Au niveau des effets secondaires, les inhibiteurs de Topo II affichent certaines toxicités cardiaques, hématologiques (myélosuppression) ainsi que la formation de leucémies secondaires qui limitent sévèrement leur utilisation.

³⁹ S. Matsuoka, B. A. Ballif, A. Smogorzewska, E. R. McDonald III, K. E. Hurov, J. Luo, C. E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S. P. Gygi, S. J. Elledge, *Science* **2007**, 316, 1160.

⁴⁰ Y. Pommier, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2894.

⁴¹ K. Chikamori, D. R. Grabowski, M. Kinter, B. B. Willard, S. Yadav, R. H. Aebersold, R. M. Bukowski, I. D. Hickson, A. H. Andersen, R. Ganapathi, M. K. Ganapathi, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 12696.

Tous ces désavantages poussent les organismes de recherches publics et privés vers le développement d'autres molécules supérieures en termes d'activité thérapeutique, engendrant moins d'effets secondaires graves et pouvant déjouer les divers mécanismes de résistance de la part des cellules cancéreuses. Parmi ces nombreuses molécules se trouvant à divers stades de développement les INDOs (indéno[1,2-*c*]isoquinoléine-5,11-diones), connues pour leur propriété inhibitrice de Topo I et dont certains dérivés ont récemment démontré des résultats *in vitro* très intéressants, occupent une place de choix.

3. Les indéno[1,2-*c*]isoquinoléine-5,11-diones

3.1. Historique de la famille des indéno[1,2-*c*]isoquinoléine-5,11-diones

Les premières descriptions des indéno[1,2-*c*]isoquinoléine-5,11-diones (INDOs) remontent à la deuxième moitié des années 1910⁴² où elles ont été présentées en tant que produits de dégradation d'un alcaloïde, la cryptopine. Cette observation a été confirmée en 1968.⁴³

Sur le plan synthétique, les travaux concernant l'élaboration de ces INDOs ont débuté dans les années 1960.⁴⁴ Cependant, un réel intérêt sur le plan de la synthèse pour cette famille de molécules n'a commencé que dix années plus tard, lorsque Cushman *et coll.* ont réussi à synthétiser « de manière fortuite » la molécule dénommée NSC 314622 (**Schéma 1, XIX**), alors qu'ils menaient des études sur la synthèse totale du chlorure de nitidine à partir de l'isoquinolone **XVIII** correspondante.⁴⁵

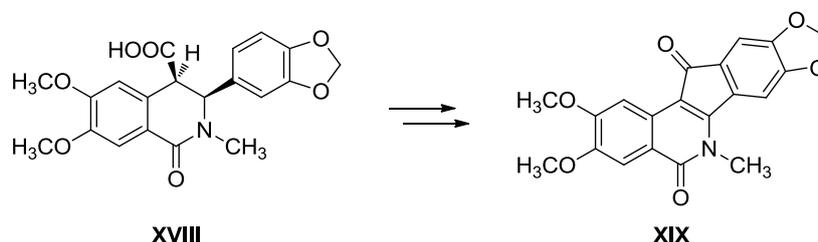


Schéma 1. Synthèse de la **XIX** (NSC 314622).

⁴² (a) W. H. Perkin, *J. Chem. Sec.* **1916**, 109, 815. (b) W. H. Perkin, *J. Chem. Sec.* **1919**, 115, 713.

⁴³ S. F. Dyke, D. W. Brown, *Tetrahedron* **1968**, 24, 1455.

⁴⁴ (a) J. N. Chatterjee, H. Mukherjee, *J. Indian. Chem. Sec.* **1960**, 37, 379. (b) S. Wawzonek, J. K. Stowell, R. E. Karll, *J. Org. Chem.* **1966**, 31, 1004. (c) S. Wawzonek, J. K. Stowell, *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 896.

⁴⁵ M. Cushman, L. Cheng, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 3781.

Pour autant les INDOs n'avaient, à l'époque, suscité aucun intérêt thérapeutique. En effet, les topoisomérases venaient alors juste d'être découvertes, et le mécanisme d'action de la CPT n'était pas encore connu.⁴⁶ Ce n'est que vingt années plus tard que l'analyse COMPARE a révélé que la molécule NSC 314622 possédait, en réalité, un profil de cytotoxicité proche de celui de la CPT et du saintopin⁴⁷ avec un mécanisme d'action similaire au premier sur la Topo 1.⁴⁸ Depuis, des travaux considérables ont été menés, aussi bien sur la conception et la synthèse des analogues actifs de la NSC 314622 que sur le mécanisme d'action, au niveau moléculaire, des composés de la famille des INDOs, notamment à travers les études cristallographiques des complexes ternaires ligand-ADN-Topo 1.

De nos jours, les INDOs sont considérées comme des molécules prometteuses. C'est ainsi que, récemment, une demande d'investigation d'un nouveau médicament (*Investigational New Drug Application*, IND) a été soumise auprès de la FDA sur deux molécules de cette famille, l'indimitecan (NSC 725776) et l'indotecan (NSC 724998) pour des essais cliniques de phase I comparant les deux molécules avec le γ H2AX en tant que biomarqueur pharmacodynamique (**Figure 21**).⁴⁰ La NSC 706744 (MJ-III-65) a également affiché de très bonnes activités pharmacologiques dans les tests précliniques.⁴⁹

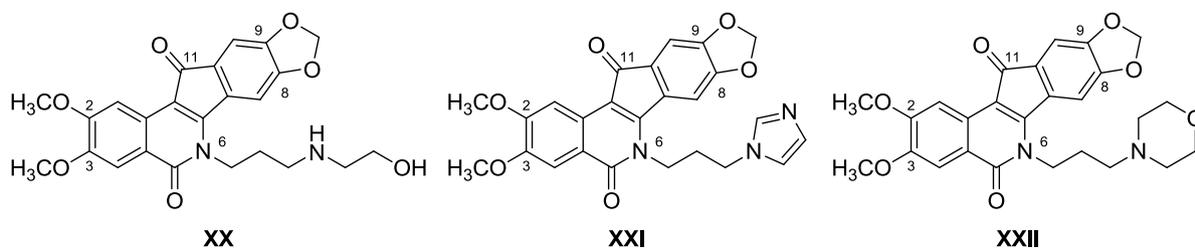


Figure 21. Dérivés INDOs biologiquement actifs. **XX** (NSC 706744/MJ-III-65), **XXI** (indimitecan/NSC 725776), **XXII** (indotecan/NSC 724998).

⁴⁶ Y. H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L. F. Liu, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 14873.

⁴⁷ F. Leteurtre, A. Fujimori, A. Tanizawa, A. Chhabra, A. Mazumder, G. Kohlhagen, H. Nakano, Y. Pommier, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 28702.

⁴⁸ G. Kohlhagen, K. D. Paull, M. Cushman, P. Nagafuji, Y. Pommier, *Mol. Pharmacol.* **1998**, 54, 50.

⁴⁹ (a) S. Antony, M. Jayaraman, G. Laco, G. Kohlhagen, K. W. Kohn, M. Cushman, Y. Pommier, *Cancer Res.* **2003**, 63, 7428.

(b) S. Antony, G. Kohlhagen, K. Agama, M. Jayaraman, S. Cao, F. A. Durrani, Y. M. Rustum, M. Cushman, Y. Pommier, *Mol. Pharmacol.* **2005**, 67, 523.

3.2. Mode d'action des INDOs et propriétés pharmacologiques

Ayant été initialement découvert et considéré comme étant inhibiteur de Topo 1, la compréhension du mode d'action au niveau moléculaire de cette famille de composés, proche de celui de CPT, a été pendant une longue période fondée sur la structure cristalline du complexe ternaire Topo 1-ADN double brin et la CPT⁵⁰ et sur l'hypothèse selon laquelle l'orientation du groupement lactame serait la même pour les INDOs que pour la CPT (**Figure 22**).⁵¹

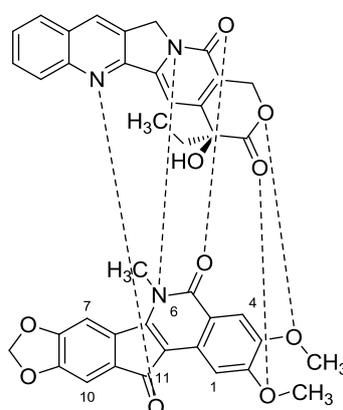


Figure 22. Analogies entre la CPT (au-dessus) et la NSC 314622 (en-dessous).⁵²

Le mécanisme d'action des INDOs est beaucoup mieux connu depuis 2005, grâce aux travaux de Staker *et coll.*⁵³ portant sur les analyses cristallographiques du complexe ternaire MJ-238-ADN-Topo 1 et la modélisation moléculaire par Xiao *et coll.*⁵² La première étude (**Figure 23**) a démontré que l'interaction entre la Topo 1 et le ligand se réalise à travers le groupement cétone en position C11 de la MJ-238 **XXIII** qui se projette du côté du petit sillon de l'ADN et qui effectue une liaison hydrogène avec les deux atomes d'azote ω et ω' du Arg364 de la Topo 1.

⁵⁰ B. L. Staker, K. Hjerrild, M. D. Feese, C. A. Behnke, A. B. Burgin, L. Stewart, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 15387.

⁵¹ M. Nagarajan, X. Xiao, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 5712.

⁵² X. Xiao, S. Antony, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3231.

⁵³ B. L. Staker, M. D. Feese, M. Cushman, Y. Pommier, D. Zembower, L. Stewart, A. B. Burgin, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2336.

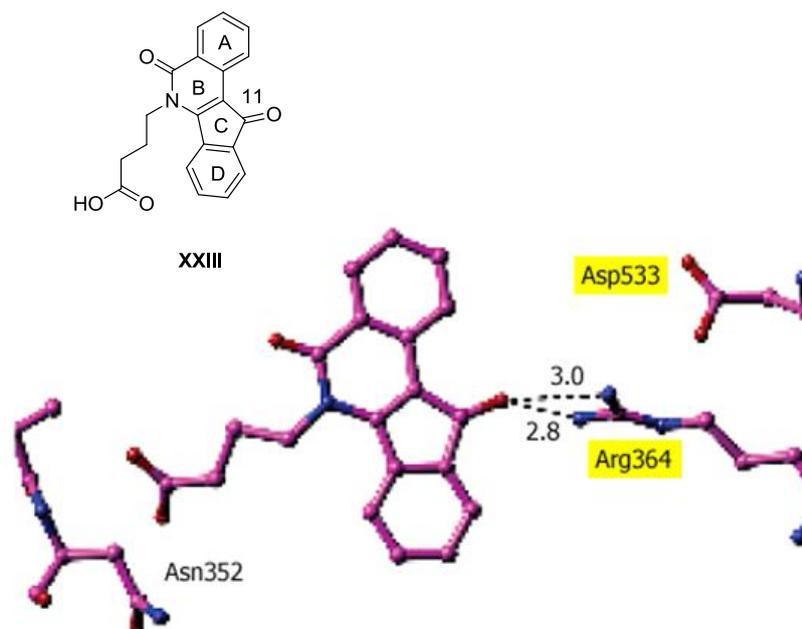


Figure 23. Modélisation des interactions de la MJ-238 (XXIII) avec les résidus acides aminés de la Topo I.⁵³

La chaîne latérale sur l'atome d'azote du groupement lactame de l'aromatique B comportant un groupement acide carboxylique se projette quant à elle dans le grand sillon et interagit notamment avec le résidu acide aminé Asn352. Par ailleurs, il a été suggéré que les cycles aromatiques C et D se plaçaient et s'empilaient avec les bases du côté du brin non clivé, tandis que les aromatiques A et B se situaient du côté des bases du brin clivé.

La deuxième étude (**Figure 24**) a consisté à réaliser une modélisation moléculaire grâce aux calculs quantiques sur un modèle simplifié comportant seulement le squelette intercalant dépouillé et un groupement méthyle sur l'azote lactamique N6.

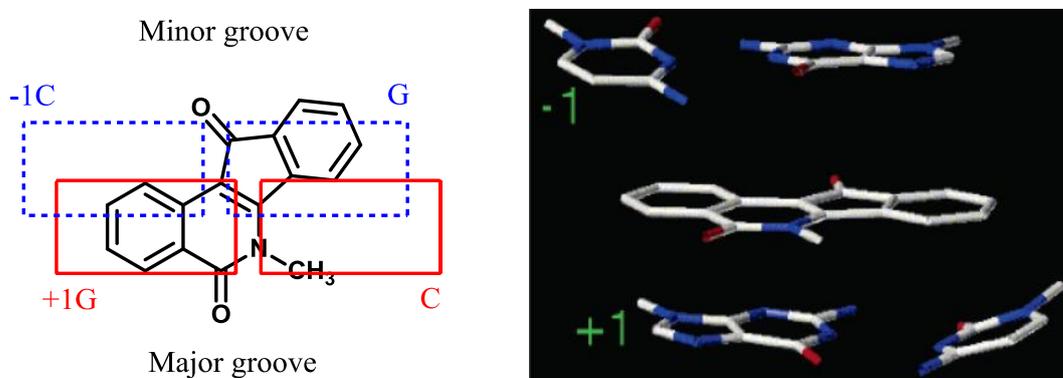


Figure 24. Modélisation du π - π stacking.⁵²

Les résultats ont bien confirmé ceux obtenus à partir des analyses cristallographiques de l'étude précédente. Les interactions entre les cycles aromatiques de la molécule et les paires de bases -1 et $+1$ voisines qui en résultent, de type π - π stacking, se sont révélées cruciales dans le sens où elles sont à l'origine de la liaison de la molécule au complexe ternaire et déterminent l'orientation globale de la molécule au niveau du site de clivage.

Plusieurs autres aspects mécanistiques distinguent les CPTs et les INDOs. Ces dernières sont connues pour stabiliser les complexes de clivage à des séquences d'ADN différentes de celles des premières, ce qui pourrait indiquer des différences quant aux effets sur les cellules, sur les gènes ciblés et sur les profils pharmacologiques. Parallèlement, les tests *in vitro* effectués sur la NSC 706744 (**Figure 21**) ont montré que les complexes de clivage stabilisés par celles-ci sont beaucoup moins réversibles que ceux générés par les CPTs, ce qui serait un avantage considérable sur le plan pharmacologique, dans la mesure où le temps d'infusion pourrait être réduit.

Hormis les composés synthétisés par Ryckebusch *et coll.*,⁵⁴ les INDOs ciblent de manière sélective les Topo I : les résistances observées dans les tests *in vitro* sur les cellules P388 (cellules leucémiques) déficientes en Topo I⁵⁵ et les résistances croisées sur les cellules dont les activités de l'enzyme ont été diminuées par la shRNA^{55a,56} confirment la sélectivité des agents pour les Topo 1. Ces tests *in vitro* ont également révélé que la NSC 724998, contrairement aux CPTs, n'est pas un substrat des transporteurs d'efflux ABC.

3.3. Relations structure-activité

En rassemblant les données à partir de la multitude de dérivés INDOs synthétisés jusqu'à ce jour, et dont la charpente principale et la numérotation (hétéro)atomique apparaissent sur la **Figure 25**, on peut dégager de nombreuses relations structure-activités, qui seront développées dans les paragraphes suivants.

⁵⁴ A. Ryckebusch, D. Garcin, A. Lansiaux, J. F. Goossens, B. Baldeyrou, R. Houssin, C. Bailly, J. P. Hénichart, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3617.

⁵⁵ (a) S. Antony, K. Agama, Z. H. Miao, K. Tagaki, M. H. Zright, A. I. Robles, L. Varticovski, M. Nagarajan, A. Morrell, M. Cushman, Y. Pommier, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10397. (b) M. R. Mattern, G. A. Hofman, R. M. Polsky, L. R. Funk, F. L. McCabe, R. K. Johnson, *Oncol. Res.* **1993**, *5*, 467.

⁵⁶ Z. H. Miao, A. Player, U. Shankavaram, Y. H. Wang, D. B. Zimonjic, P. L. Lorenzi, Z. Y. Liao, H. Liu, T. Shimura, H. L. Zhang, L. H. Meng, Y. W. Zhang, E. S. Kawasaki, N. C. Popescu, M. I. Aladjem, D. J. Goldstein, J. N. Zeinstein, Y. Pommier, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 8752.

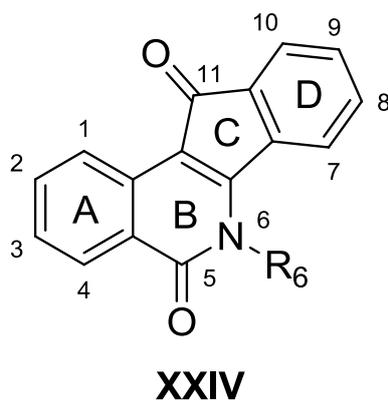


Figure 25. Structure générale de l'INDO.

3.3.1. Influences des groupements sur les cycles aromatiques A/D

Les relations structure-activité concernant les substitutions sur les aromatiques A et D ont été étudiées de manière extrêmement fouillée et jouent un rôle fondamental dans les activités biologiques des analogues (*Figure 26*).

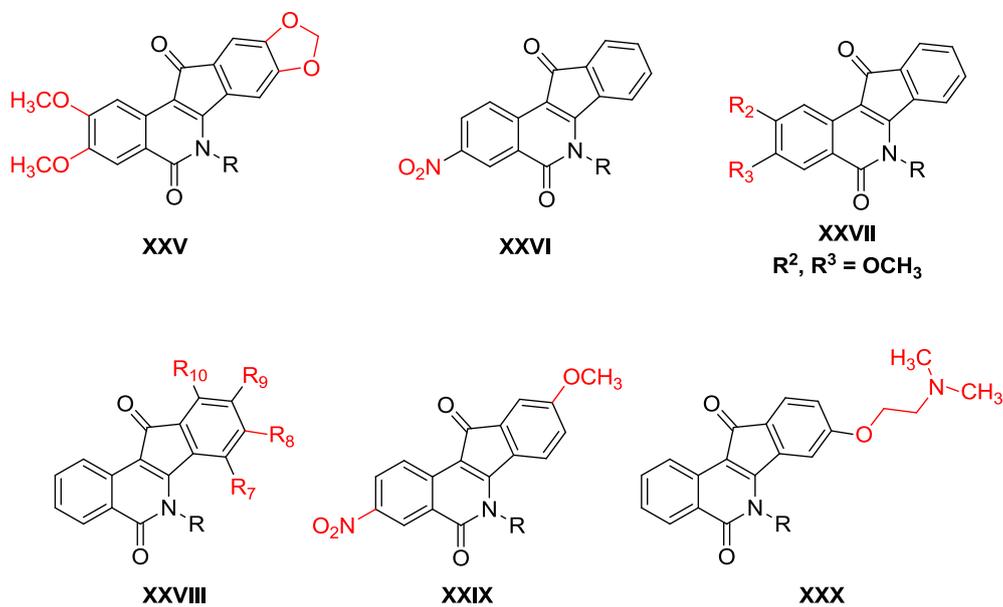


Figure 26. Influence des groupements sur les cycles aromatiques A/D.

- **La substitution des positions C2 et C3** par des groupements méthoxy et en position C8 et C9 par un groupement méthylènedioxy (**XXV**) engendre, d'une façon générale, une légère augmentation de la cytotoxicité et de l'activité inhibitrice des Topo 1.⁵⁷
- **La substitution en position C3** par un groupement électroattracteur tel que le groupement nitro permet une augmentation considérable de l'activité inhibitrice de la Topo I ainsi qu'une importante augmentation de la cytotoxicité (**XXVI**).^{58,59} Ce résultat a été confirmé par des analyses de la cartographie précisant la densité électronique du complexe de clivage et dans lesquelles on retrouve une complémentarité électrostatique au niveau de la zone du groupement nitro et du groupement méthylènedioxy entre la molécule intercalante (riche en électrons grâce au groupement nitro et méthylènedioxy) et les brins d'ADN.⁵⁹ Un remplacement du groupement nitro en position C3 par un groupement amino s'est traduit par une chute d'activité biologique à la fois en termes de cytotoxicité et d'inhibition de la Topo 1.^{58,59}
- **La substitution par le groupement méthoxy en position C2 et C3**, sans substituant sur l'aromatique D, au lieu d'un groupement nitro en position C3, augmente légèrement la cytotoxicité de la molécule mais diminue l'inhibition de la Topo 1 (**XXVII**).^{59,60}
- **Au niveau de la substitution sur l'aromatique D (XXIX)**, la présence d'un groupement méthylènedioxy contribue de façon positive aux activités biologiques.⁵⁷
La substitution de la position C9 et C10 par un benzène (le cycle D devient ainsi un naphthalène) diminue fortement les activités biologiques de la molécule.⁶¹
Une polysubstitution par des groupements méthoxy sur le cycle aromatique D a donné lieu à des pertes d'activité biologique de la molécule sur la Topo 1, du fait de la perte de la planéité dans cette région de la molécule, phénomène délétère pour l'intercalation.⁵⁹
Il a été montré que toute mono-substitution en position C9 par un groupement autre que le méthoxy, le fluor ou le nitrile a donné lieu à une diminution de la capacité d'inhibition des Topo 1.⁶² La combinaison de la substitution en position C3 par un groupement nitro et en position C9 par un groupement méthoxy, avec comme chaîne lactamique une chaîne

⁵⁷ M. Nagarajan, A. Morrell, B. C. Fort, M. R. Meckley, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5651.

⁵⁸ A. Morrell, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3659.

⁵⁹ A. Morrell, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7740.

⁶⁰ A. Morrell, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1846.

⁶¹ M. Cushman, M. Jayaraman, J. A. Vroman, A. K. Fukunga, B. M. Fox, G. Kohlhaen, D. Strumberg, Y. Pommier, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3688.

⁶² A. Morrell, M. Placzek, S. Parmley, B. Grella, S. Anthony, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4388.

aminopropyle, fournit des INDOs avec des activités biologiques remarquables (XXIX).^{59,62}

- **La substitution en position C8** par un groupement diméthylaminoéthoxy, avec également une chaîne aminoéthyl ou aminopropyl en position N6 fournit des composés ayant la faculté d'inhiber des Topo II et non Topo I (XXX).⁵⁴

3.3.2. Influences des groupements sur les cycles aromatiques B/C

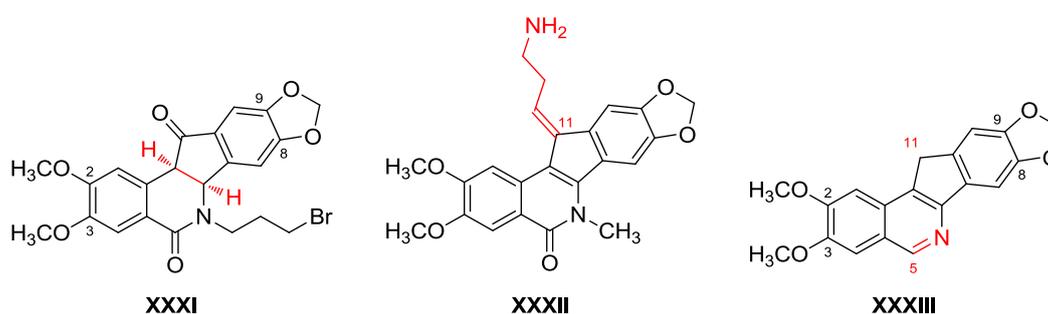


Figure 27. Influence des groupements sur les cycles aromatiques B/C.

- **La réduction de la liaison C = C** entre les aromatiques B et C (XXXI) rend généralement les molécules d'INDOs plus cytotoxiques que leurs analogues insaturés mais au détriment de la faculté d'inhibition des Topo 1. Il a été suggéré que ces dihydroindenoisoquinoléines agiraient en tant que prodrugs des INDOs dans les cellules cancéreuses *in vivo*.⁶³
- **La substitution du groupement carbonyle en position C11** par un groupement alkylidène projette ce dernier vers le petit sillon de l'ADN (XXXII). Son influence sur l'activité biologique dépend du substituant placé à l'extrémité de la chaîne. Il a été constaté que le groupement 3'-aminopropylidène en position C11 conférait à la molécule une très bonne cytotoxicité et une bonne capacité d'inhibition de la Topo 1.⁶⁴ La cytotoxicité, à la différence de l'inhibition de Topo I, est affectée par la variation de la longueur de cette chaîne. Cependant, une chaîne trop longue conduit à une disparition totale de l'activité biologique de la molécule. Il est à noter que seules les amines

⁶³ X. Xiao, Z. H. Miao, S. Antony, Y. Pommier, M. Cushman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2795.

⁶⁴ B. M. Fox, X. Xiao, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, B. L. Staker, L. Stewart, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3275.

primaires possèdent une certaine activité d'inhibition de la Topo I. Une polysubstitution en amines primaires sur cet alkylidène pourrait donner des composés avec des activités biologiques intéressantes mais l'addition des charges positives à pH physiologique s'avérerait pénalisante lors de la pénétration des membranes cellulaires et nucléaires.⁶⁵

- **Les norindénoisoquinoléines** (norINDOs) (**XXXIII**), sans substituants en position N6 lactamique, possèdent néanmoins une très bonne activité biologique à la fois en terme d'inhibition de Topo I et en terme de cytotoxicité, ce qui démontre qu'il n'y a pas exigence de la présence des groupements carbonyles en position C5 et C11 pour la stabilisation du complexe de clivage.⁶⁶

3.3.3. Influence de la substitution en position N6

Comme cela a été vu précédemment pour les norINDOs, les substituants en position N6 ne sont probablement pas un élément indispensable pour l'inhibition de la Topo, du moins de la Topo I. Cependant, les tests biologiques font état d'une influence considérable de ces substituants sur les activités biologiques des INDOs, d'autant plus que les molécules les plus actives possèdent toutes une chaîne alkyle fonctionnalisée de nature diverse sur le carbone terminal.

A l'heure actuelle, les dérivés INDOs considérés comme les plus efficaces *in vitro* sont tous équipés sur l'azote lactamique d'une chaîne aminopropylée simple ou éventuellement plus élaborée (exemples en **Figure 21**). Cet appendice est connu pour interagir soit avec les brins d'ADN, soit avec les résidus acides aminés constituant la Topo I ou la Topo II.

⁶⁵ X. Xiao, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5147.

⁶⁶ A. Ioanoviciu, S. Antony, Y. Pommier, B. L. Staker, L. Stewart, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4803.

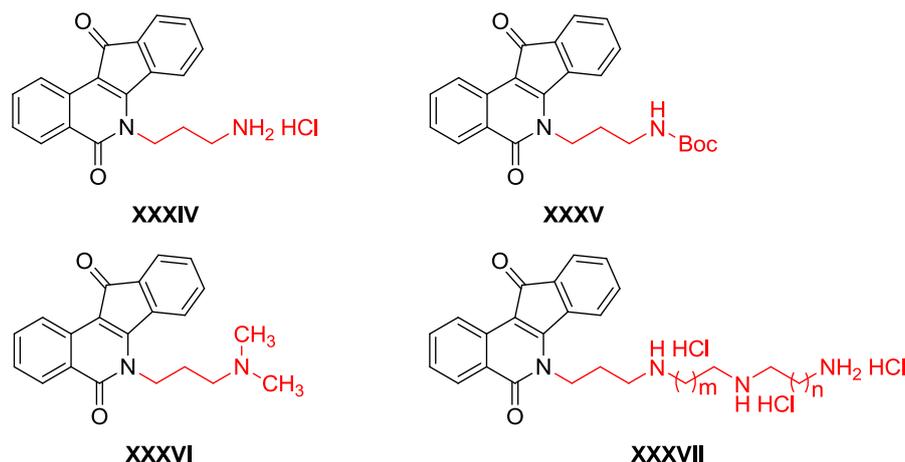


Figure 28. Influence de la substitution en position N6.

- **La substitution de l'azote lactamique par une chaîne 3-aminopropyle** confère à la molécule intercalante une excellente cytotoxicité et une bonne activité inhibitrice de Topo I (XXXIV).⁶¹ L'insertion ou la suppression d'un groupement méthylène dans cette chaîne aminopropyle n'a pas d'influence sur l'activité inhibitrice de la Topo I. Au niveau de la cytotoxicité, dans le premier cas, on constate une très légère diminution de la cytotoxicité, et dans le second cas une légère amélioration. Néanmoins, un allongement au-delà de quatre atomes de carbone s'avère délétère pour l'activité biologique.⁶⁷

Une protection de cette amine primaire par un groupement encombrant tel que le Boc ou le Fmoc diminue de manière drastique l'activité biologique de la molécule (XXXV).⁵¹ Par contre, une diméthylation de l'amine primaire ne semble pas avoir d'influence notable sur l'activité de la molécule (XXXVI).⁵¹

La substitution par une chaîne linéaire diaminée (une amine secondaire au milieu de la chaîne + une amine primaire sur le carbone terminal) ou triaminée (deux amines secondaires + amine primaire à l'extrémité) (XXXVII) fournit des INDOs généralement obtenues sous forme chlorhydrate, avec des cytotoxicités submicromolaires.⁵¹ La faculté d'inhibition de la Topo I par ces molécules est généralement bonne mais varie suivant la position relative des amines sur la chaîne.⁵¹ L'allongement de cette chaîne polyaminée avec addition d'une amine secondaire conduit à une perte de faculté d'inhibition de la Topo I.⁵¹

⁶⁷ A. Morrell, M. S. Placzek, J. D. Steffen, S. Antony, K. Agama, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2040.

- **Les INDOs dont l'azote lactamique est substitué par une chaîne alkyle linéaire terminée par un aminoalcool** (NSC 706744, **Figure 21, XX**) possèdent également d'excellentes activités biologiques, surtout en termes de cytotoxicité.⁶¹
- **La substitution de l'azote lactamique par un groupement propyle avec, à l'extrémité, un hétérocycle** dont l'hétéroatome joue le rôle d'accepteur de liaison hydrogène à pH physiologique, fournit des INDOs avec de très bonnes activités biologiques.⁶⁸

Parmi les hétérocycles à cinq atomes, l'imidazole (**Figure 21, XXI**) a montré de bonnes propriétés pharmacologiques, probablement dues à une interaction supplémentaire entre la Topo I (le résidu K436) et le deuxième atome d'azote, basique, en position 3 de l'imidazole. Le déplacement d'un des deux atomes d'azote pour donner un pyrazole fait chuter les activités biologiques de la molécule. La substitution du diazole par un triazole engendre une diminution de la cytotoxicité, mais l'inhibition de Topo I est conservée. En somme, il a été montré que l'hétéroatome acide séparé par un atome de carbone de l'hétéroatome basique, aussi bien exocyclique qu'endocyclique (*1,3-relationship between hydrogen-bond donors/acceptors*) semble représenter un enchaînement optimal pour l'activité biologique de la molécule.⁶⁸

En ce qui concerne les hétérocycles à six chaînons, la 1,4-morpholine (**Figure 21, XXII**) affiche de très bonnes capacités inhibitrices de Topo 1 mais une assez faible cytotoxicité, démontrant par là l'importance de la présence d'un hétéroatome accepteur de liaison hydrogène.⁶⁸ Il est à noter que la substitution de l'atome d'oxygène de la morpholine par une amine secondaire – donnant ainsi une pipérazine – fournit une INDO avec une très bonne cytotoxicité mais une faible inhibition de Topo I.⁶⁸

Les principales relations structure-activités évoquées ci-dessus se trouvent récapitulées sur la **Figure 29**. Il est à noter que, bien entendu, toutes n'ont pu être rapportées ici.

⁶⁸ M. Nagarajan, A. Morrell, A. Ioanoviciu, S. Antony, G. Kohlhagen, K. Agama, M. Hollingshead, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6283.

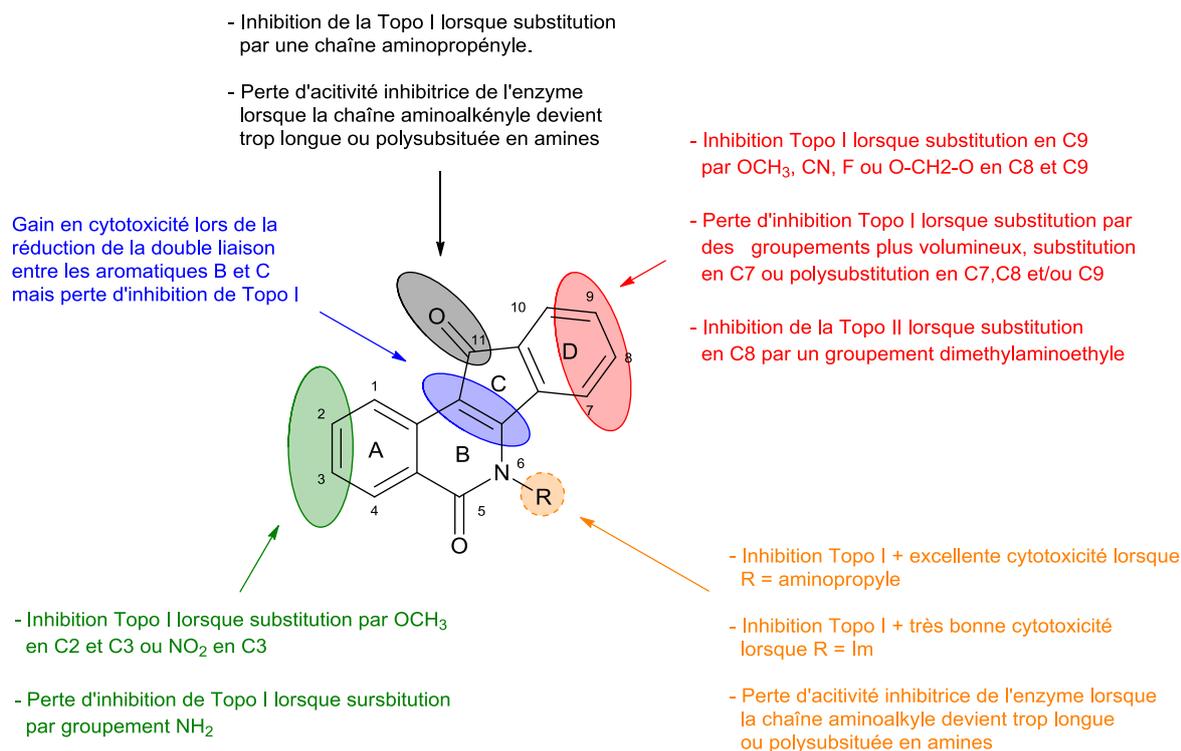


Figure 29. Principales relations structure-activités sur les INDOs

4. Notre projet

Le développement des dérivés INDOs menés par l'équipe du Pr Cushman à Purdue University a constitué une avancée majeure dans le domaine des inhibiteurs de Topo 1. Comme cela a été mentionné précédemment, plus de 400 dérivés INDOs synthétisés à ce jour et trois d'entre eux, la NSC 706744, l'indimitecan et l'indotécan ont dépassé le stade des essais précliniques. Les deux dernières molécules attendent l'autorisation de la FDA pour les tests cliniques de phase I (**Figure 21**).

Des recherches sur d'autres analogues INDOs ont démarré dans les années 2000 à l'Université Lille 2, en coopération avec l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille. Ces recherches ont été focalisées sur des dérivés portant une chaîne aminoalkyle à la fois sur l'azote lactamique et sur le cycle D, plus particulièrement en position C8 et C9 de l'INDO, afin notamment d'augmenter la solubilité de la molécule. Alors que l'on s'attendait plutôt à une activité thérapeutique sur les Topo I, les tests *in vitro* ont affiché de manière surprenante des capacités d'inhibition sur les Topo II, une première pour les INDOs.⁵⁴ Il a été montré que les dérivés possédant une chaîne aminoalkyle en position C8 possédaient des activités

pharmacologiques notables vis-à-vis des Topo II. En particulier l'AL85 (**Figure 30, XXXVIII**) a affiché une forte inhibition de la Topo II ainsi qu'une cytotoxicité de l'ordre de 0.6 μM .⁵⁴

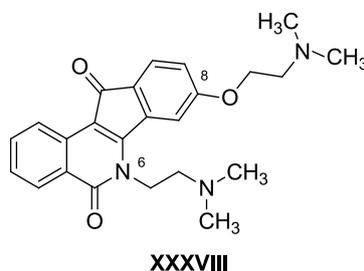


Figure 30. Structure de l'AL85 XXXVIII.

Notre projet s'inscrit dans le cadre de la synthèse et du développement de nouveaux dérivés INDOs, dont l'activité potentiellement antitumorale sera liée à l'inhibition de la Topo II. La première partie du travail de cette thèse consistera à explorer davantage les relations structure-activité au niveau du cycle D de l'INDO, notamment par le biais de greffage de chaînes aminoalkyles de longueurs variées en position C8 et C9 et par introduction, pour la première fois, de ces chaînes en position C7 (**Figure 31, XXXIX**).

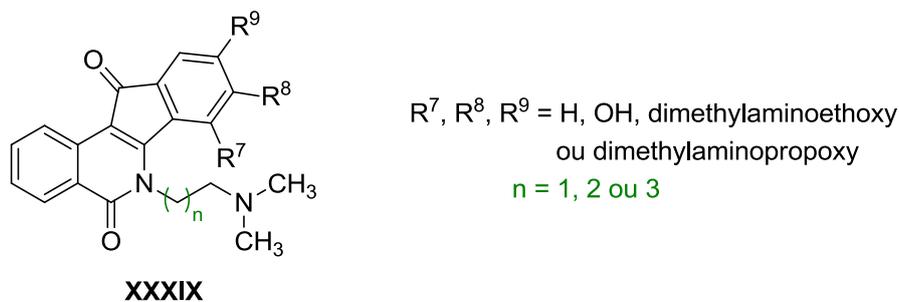


Figure 31. Nouveaux dérivés INDOs de série I.

Dans un deuxième temps, l'étude de nouveaux dérivés INDOs intégrant une chaîne latérale inédite au niveau de l'azote lactamique se projetant vers le grand sillon sera abordée. Un acide aminé chiral ou un reste d'acide aminé chiral sera greffé sur une chaîne carbonée de longueur optimale (deux ou trois atomes de carbone) par l'intermédiaire d'une fonction variable Y dérivant de la partie acide carboxylique de l'acide aminé (**Figure 32**). La partie amine de l'acide aminé pourra être protonée dans le milieu physiologique, conférant à la

molécule une meilleure solubilité en milieu aqueux et un meilleur ciblage de l'ADN par interaction électrostatique (**Figure 32, XL**).

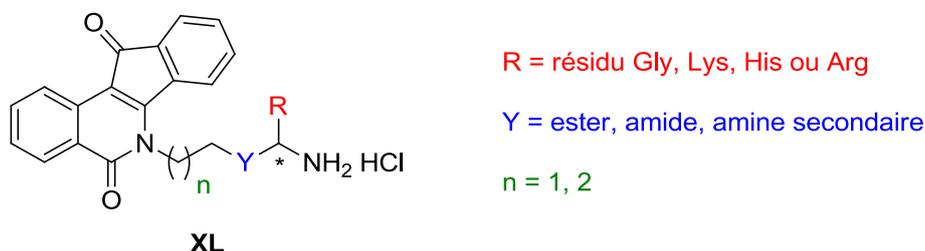


Figure 32. Nouveaux dérivés INDOs de série II.

Le choix d'introduire un acide aminé sur l'azote lactamique qui, jusqu'à présent et à notre connaissance, n'a jamais fait l'objet d'études sur les INDOs et analogues, paraît tout à fait naturel dans la mesure où la plupart des autres classes d'agents antitumoraux agissant sur l'ADN en tant qu'intercalants tels que les anthraquinones,⁶⁹ les naphthalimides,⁷⁰ les indolocarbazoles⁷¹ et les CPT⁷² ont déjà été équipées d'amino acides et ont montré une nette amélioration en terme de solubilité, de cytotoxicité ainsi qu'une diminution de résistance et de toxicité.

En outre, nous savons que la très grande majorité des enzymes qui existent dans le monde vivant comporte un site actif énantiosélectif. Nous souhaitons préciser par le biais des dérivés qui seront synthétisés si la Topo II présente également cette caractéristique vis-à-vis de nos composés. Dans ce but et à des fins de comparaison, les énantiomères et un racémique pour chaque type de molécule seront synthétisés. Les acides aminés sélectionnés seront des acides aminés basiques : lysine, histidine et arginine. Nous incorporons également la glycine qui jouera le rôle d'acide aminé « témoin ».

⁶⁹ (a) N. Dias, J. F. Goossens, B. Baldeyrou, A. Lansiaux, P. Colson, A. D. Salvo, J. Bernal, A. Turnbull, D. J. Mincher, C. Bailly, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 949. (b) C. J. Hsiao, T. K. Li, Y. L. Chan, L. W. Hsin, C. H. Liao, C. H. Lee, P. C. Lyu, J. H. Guh, *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 847. (c) L. W. Hsin, H. P. Wang, P. H. Kao, O. Lee, W. R. Chen, H. W. Chen, J. H. Guh, Y. L. Chen, C. P. His, M. S. Yang, T. K. Li, C. H. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1006.

⁷⁰ (a) Q. Yang, P. Yang, X. Qian, L. Tong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6210. (b) A. Wu, Y. Xu, X. Qian, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 592.

⁷¹ (a) P. Moreau, M. Sancelme, C. Bailly, S. Léonce, A. Pierré, J. Hickman, B. Pfeiffer, M. Prudhomme, *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 887. (b) Z. Li, F. Zhai, L. Zhao, Q. Guo, Q. You, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 406.

⁷² L. Song, R. Bevins, B. D. Anderson, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4344.

Références bibliographiques et notes relatives au Chapitre II

1. J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 964.
2. J. Cairns, *J. Mol. Biol.* **1963**, 6, 208.
3. R. Dulbecco, M. Vogt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1963**, 50, 236.
4. R. Weil, J. Vinograd, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1963**, 50, 730.
5. A. Kornberg, T. A. Baker, *DNA replication* (2nd edition), W. H. Freeman, **1992**.
6. B. Anachkova, V. Djeliova, G. Russev, *J. Cell. Biochem.* **2005**, 96, 951.
7. J. B. Schwartzman, A. Stasiak, *EMBO Rep.* **2004**, 5, 256.
8. A. K. McClendon, A. C. Rodriguez, N. Osheroff, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 39337.
9. J. C. Wang, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2002**, 3, 430.
10. J. C. Wang, *J. Mol. Biol.* **1971**, 55, 523.
11. J. J. Champoux, R. Dulbecco, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1972**, 69, 143.
12. H. P. Vosberg, L. I. Grossman, J. Vinograd, *Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* **1974**, 33, 1356, Abstr. No. 751.
13. M. Gellert, K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, H. A. Nash, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1976**, 73, 3872.
14. W. Keller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1975**, 72, 2550.
15. G. Karp, *Biologie Cellulaire et Moléculaire*, 2^{ème} édition française, De Boeck, **2004**
16. (a) L. Postow, N. J. Crisona, B. J. Peter, C. D. Hardy, N. R. Cozzarelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 8219. (b) M. Maftahi, C. S. Han, L. D. Langston, J. C. Hope, N. Zigouras, G. A. Freyer, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 4715. (c) A. Goodwin, S. W. Wang, T. Toda, C. Norbury, I. D. Hickson, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 4050.
17. (a) E. Massé, M. Drolet, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 16659. (b) Q. Zhu, P. Pongpech, R. J. DiGate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 9766.
18. (a) L. V. Ivanova, P. Rudolph, U. Kellner, A. Jurgensen, I. E. Tareeva, P. Alm, D. Proppe, *Kidney Int.* **2000**, 58, 1603. (b) L. V. Ivanova, P. Rudolph, Y. M. Shilov, F. Gieseler, P. Alm, I. E. Tareeva, D. Proppe, *Am. J. Kidney Dis.* **2001**, 38, 102.
19. L. F. Liu, C. C. Liu, B. M. Alberts, *Cell* **1980**, 19, 697.
20. M. Duca, *Nouveaux inhibiteurs de topoisomérase II dérivés de la 4'-déméthylépipodophyllotoxine dirigés sur des séquences spécifiques de l'ADN : conception, synthèse et applications*, Thèse de doctorat du Muséum National d'Histoire Naturelle, spécialité Biochimie Moléculaire, Paris, soutenue le **28 Février 2005**.

21. C. R. Lopez, S. Yang, R. W. Deibler, S. A. Ray, J. M. Pennington, R. J. Digate, P. J. Hastings, S. M. Rosenberg, E. L. Zechiedrich, *Mol. Microbiol.* **2005**, 58, 80.
22. J. L. Nitiss, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9, 327.
23. J. Roca, *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, 721.
24. J. Baxter, J. F. Diffley, *Mol. Cell.* **2008**, 30, 790.
25. B. G. Ju, V. V. Lunyak, V. Perissi, I. Garcia-Bassets, D. W. Rose, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld, *Science* **2006**, 312, 1798.
26. H. Wei, A. J. Ruthenburg, S. K. Bechis, G. L. Verdine, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 37041.
27. (a) S. Classen, S. Olland, J. M. Berger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 10629. (b) J. M. Berger, S. J. Gamblin, S. C. Harrison, J. C. Wang, *Nature* **1996**, 379, 225. (c) D. Fass, C. E. Bogden, J. M. Berger, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 322.
28. K. C. Dong, J. M. Berger, *Nature* **2007**, 450, 1201.
29. J. H. Sng, V. J. Heaton, M. Bell, P. Maini, C. A. Austin, L. Mark Fisher, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1444, 395.
30. J. L. Nitiss, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9, 338.
31. C. Marchand, S. Antony, K. W. Kohn, M. Cushman, A. Ioanoviciu, B. L. Staker, A. B. Burgin, L. Stewart, Y. Pommier, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, 5, 287.
32. Y. Pommier, J. Cherfils, *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, 26, 138.
33. N. R. Bachur, F. Yu, R. Johnson, R. Hickey, Y. Wu, L. Malkas, *Mol. Pharmacol.* **1992**, 41, 993.
34. E. Feinstein, E. Canaani, L. M. Weiner, *Biochemistry* **1993**, 32, 13156.
35. P. B. Jenen, M. Sehested, *Biochem. Pharmacol.* **1997**, 54, 755.
36. A. K. Larsen, A. E. Escargueil, A. Skladanowski, *Pharmacol. Ther.* **2003**, 99, 167.
37. B. Alberts, *Nature* **2003**, 421, 431.
38. T. T. Su, *Annu. Rev. Genet.* **2006**, 40, 187.
39. S. Matsuoka, B. A. Ballif, A. Smogorzewska, E. R. McDonald III, K. E. Hurov, J. Luo, C. E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S. P. Gygi, S. J. Elledge, *Science* **2007**, 316, 1160.
40. Y. Pommier, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2894.
41. K. Chikamori, D. R. Grabowski, M. Kinter, B. B. Willard, S. Yadav, R. H. Aebersold, R. M. Bukowski, I. D. Hickson, A. H. Andersen, R. Ganapathi, M. K. Ganapathi, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 12696.

42. (a) W. H. Perkin, *J. Chem. Sec.* **1916**, *109*, 815. (b) W. H. Perkin, *J. Chem. Sec.* **1919**, *115*, 713.
43. S. F. Dyke, D. W. Brown, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 1455.
44. (a) J. N. Chatterjea, H. Mukherjee, *J. Indian. Chem. Sec.* **1960**, *37*, 379. (b) S. Wawzonek, J. K. Stowell, R. E. Karll, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1004. (c) S. Wawzonek, J. K. Stowell, *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 896.
45. M. Cushman, L. Cheng, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3781.
46. Y. H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L. F. Liu, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 14873.
47. F. Leteurtre, A. Fujimori, A. Tanizawa, A. Chhabra, A. Mazumder, G. Kohlhagen, H. Nakano, Y. Pommier, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 28702.
48. G. Kohlhagen, K. D. Paull, M. Cushman, P. Nagafuji, Y. Pommier, *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 50.
49. (a) S. Antony, M. Jayaraman, G. Laco, G. Kohlhagen, K. W. Kohn, M. Cushman, Y. Pommier, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7428. (b) S. Antony, G. Kohlhagen, K. Agama, M. Jayaraman, S. Cao, F. A. Durrani, Y. M. Rustum, M. Cushman, Y. Pommier, *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 523.
50. B. L. Staker, K. Hjerrild, M. D. Feese, C. A. Behnke, A. B. Burgin, L. Stewart, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 15387.
51. M. Nagarajan, X. Xiao, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5712.
52. X. Xiao, S. Antony, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3231.
53. B. L. Staker, M. D. Feese, M. Cushman, Y. Pommier, D. Zembower, L. Stewart, A. B. Burgin, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2336.
54. A. Ryckebusch, D. Garcin, A. Lansiaux, J. F. Goossens, B. Baldeyrou, R. Houssin, C. Bailly, J. P. Hénichart, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3617.
55. (a) S. Antony, K. Agama, Z. H. Miao, K. Tagaki, M. H. Zright, A. I. Robles, L. Varticovski, M. Nagarajan, A. Morrell, M. Cushman, Y. Pommier, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10397. (b) M. R. Mattern, G. A. Hofman, R. M. Polsky, L. R. Funk, F. L. McCabe, R. K. Johnson, *Oncol. Res.* **1993**, *5*, 467.
56. Z. H. Miao, A. Player, U. Shankavaram, Y. H. Wang, D. B. Zimonjic, P. L. Lorenzi, Z. Y. Liao, H. Liu, T. Shimura, H. L. Zhang, L. H. Meng, Y. W. Zhang, E. S. Kawasaki, N. C. Popescu, M. I. Aladjem, D. J. Goldstein, J. N. Zeinstein, Y. Pommier, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 8752.

57. M. Nagarajan, A. Morrell, B. C. Fort, M. R. Meckley, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5651.
58. A. Morrell, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3659.
59. A. Morrell, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7740.
60. A. Morrell, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1846.
61. M. Cushman, M. Jayaraman, J. A. Vroman, A. K. Fukunga, B. M. Fox, G. Kohlhaen, D. Strumberg, Y. Pommier, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3688.
62. A. Morrell, M. Placzek, S. Parmley, B. Grella, S. Anthony, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4388.
63. X. Xiao, Z. H. Miao, S. Antony, Y. Pommier, M. Cushman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2795.
64. B. M. Fox, X. Xiao, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, B. L. Staker, L. Stewart, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3275.
65. X. Xiao, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5147.
66. A. Ioanoviciu, S. Antony, Y. Pommier, B. L. Staker, L. Stewart, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4803.
67. A. Morrell, M. S. Placzek, J. D. Steffen, S. Antony, K. Agama, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2040.
68. M. Nagarajan, A. Morrell, A. Ioanoviciu, S. Antony, G. Kohlhagen, K. Agama, M. Hollingshead, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6283.
69. (a) N. Dias, J. F. Goossens, B. Baldeyrou, A. Lansiaux, P. Colson, A. D. Salvo, J. Bernal, A. Turnbull, D. J. Mincher, C. Bailly, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 949. (b) C. J. Hsiao, T. K. Li, Y. L. Chan, L. W. Hsin, C. H. Liao, C. H. Lee, P. C. Lyu, J. H. Guh, *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 847. (c) L. W. Hsin, H. P. Wang, P. H. Kao, O. Lee, W. R. Chen, H. W. Chen, J. H. Guh, Y. L. Chen, C. P. His, M.S. Yang, T. K. Li, C. H. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1006.
70. (a) Q. Yang, P. Yang, X. Qian, L. Tong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6210. (b) A. Wu, Y. Xu, X. Qian, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 592.

71. (a) P. Moreau, M. Sancelme, C. Bailly, S. Léonce, A. Pierré, J. Hickman, B. Pfeiffer, M. Prudhomme, *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 887. (b) Z. Li, F. Zhai, L. Zhao, Q. Guo, Q. You, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 406.

72. L. Song, R. Bevins, B. D. Anderson, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4344.

Chapitre III. Synthèse de dérivés indénoisoquinoléine-5,11-diones

1. Méthodes de synthèse des INDOs

A ce jour, trois grandes voies de synthèse peuvent être adoptées pour la préparation des INDOs. Dans un premier temps, nous allons donner un bref aperçu des différentes stratégies conduisant au noyau INDO (**Figure 33**).

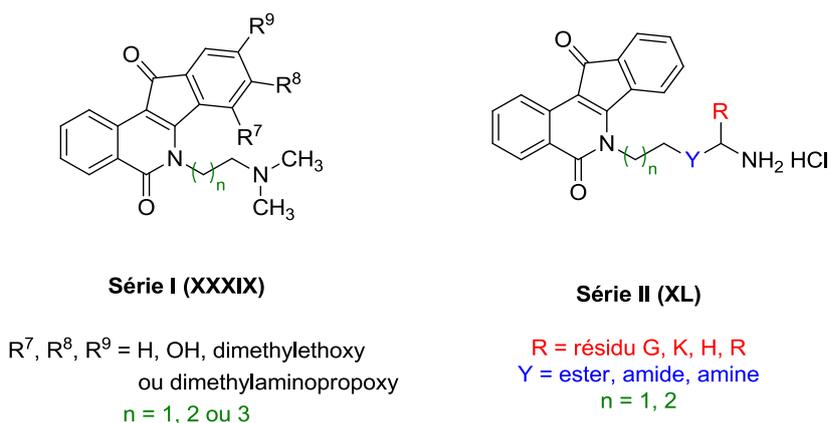


Figure 33. Les molécules ciblées

Dans un second temps, nous développerons, tour à tour, les stratégies de synthèse envisagées pour les séries d'INDOs I et II (**Figure 33**), ainsi que la description de leur préparation.

1.1. Synthèse des INDOs par formation d'intermédiaire arylisoquinolone

La stratégie de synthèse sans doute la plus utilisée à l'heure actuelle est celle mise au point par Cushman *et coll.* en 1978 (**Schéma 2**).¹

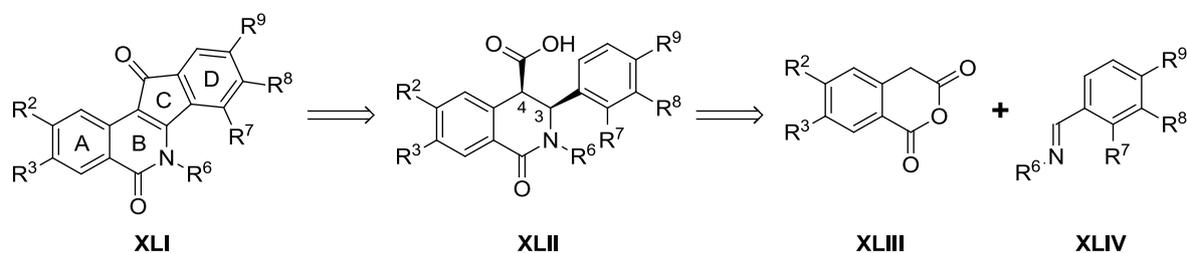


Schéma 2. Schéma rétrosynthétique de la voie de synthèse développée par Cushman *et coll.*

¹ M. Cushman, L. Cheng, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3781.

Dans cette approche, les dérivés INDOs **XXI** sont obtenus à partir de l'oxydation de la liaison C3-C4 puis d'une cyclisation intramoléculaire des *cis*-3-phényl-4-carboxyisoquinolones **XXII** provenant, quant à elles, de la condensation entre un anhydride homophtalique **XLIII** et une base de Schiff **XLIV**.

Cette méthode, classique pour la synthèse des INDOs, a pour avantage de pouvoir fournir les molécules ciblées équipées de divers substituants sur les cycles aromatiques A et D, à travers le choix préalable et approprié des anhydrides homophtaliques **XLIII** et des hydroxybenzaldéhydes, précurseurs de l'imine **XLIV**, munis des substituants souhaités. Cette technique permet également, par le choix judicieux d'amines et de benzaldéhydes substitués impliqués dans la synthèse de l'imine **XLIV**, de varier à la fois les substituants sur l'azote lactamique R⁶ et sur l'unité aromatique (R⁷-R⁹).

Cependant cette technique de synthèse recèle quelques inconvénients. En effet, dans l'étape d'annélation ultime, seules les isoquinolones **XXII** de configuration C3-C4 *cis* sont capables de conduire aux INDOs **XXI**, la forme *trans* se révélant non réactive. Dans le cas où le cycle aromatique D est porteur d'un unique substituant en position C8, une nouvelle diminution en rendement est à prévoir, du fait du manque de régiosélectivité de la réaction (**Schéma 3**).

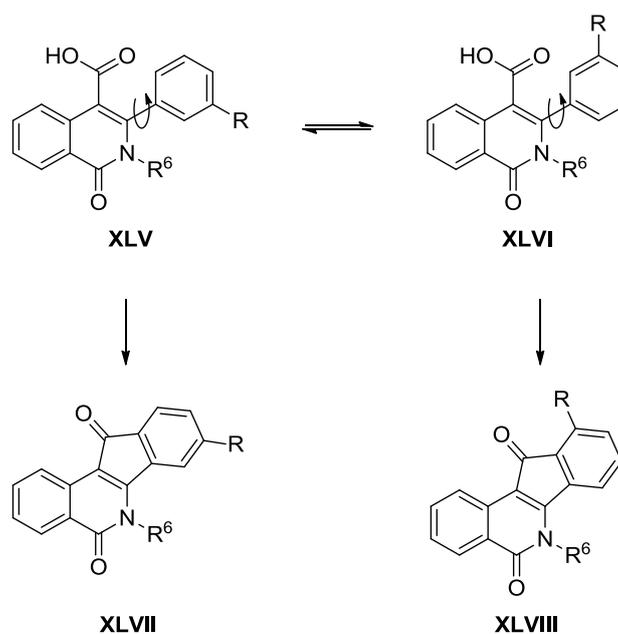


Schéma 3. Formation possible de régioisomères

Il est à noter que Morrell *et coll.* ont tenté de synthétiser des INDOs porteuses d'un groupement $R^8 = OCH_3$.² Cependant, tous leurs efforts pour obtenir les INDOs munies du groupement méthoxy en position C8 se sont soldés par des échecs, les régioisomères se révélant très difficilement séparables.

Dans le but d'augmenter le rendement de la réaction, une valorisation des isoquinolones de configuration *trans* a été envisagée. Ainsi, en 2005, Xiao et Cushman sont parvenus à élaborer la NSC 314622 partir d'isoquinolones *trans* **XLIX** (*Schéma 4*).³

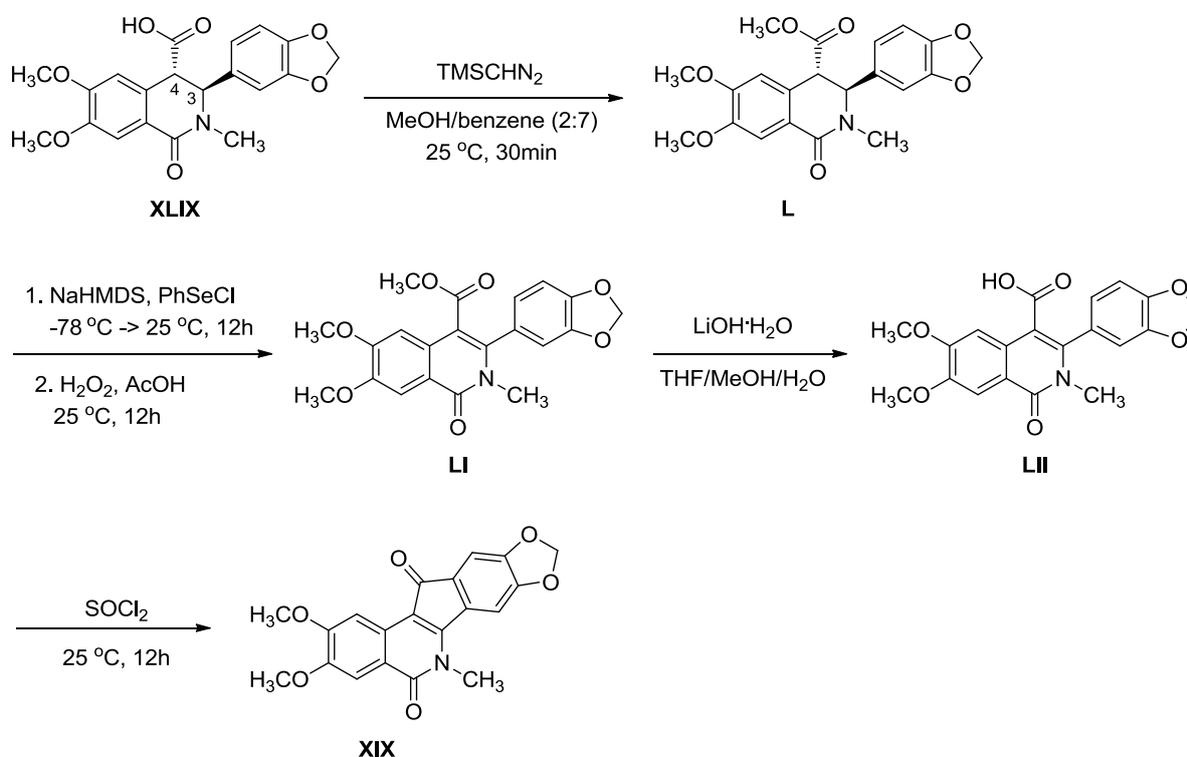


Schéma 4. Synthèse de XIX à partir de l'isoquinolone trans

Le groupement carboxy de l'isoquinolone **XLIX** est estérifié pour conduire au composé **L**. Celui-ci subit, par la suite, une déprotonation en position C4 et l'anion résultant est piégé par du chlorure de phénylsélénium. L'élimination du sélénoxyde permet d'obtenir le composé **LI**. Après libération de la fonction acide carboxylique **LII**, un traitement par le chlorure de sulfonyle permet d'effectuer la cyclisation pour fournir la NSC 314622 **XIX**.

² A. Morrell, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7740.

³ X. Xiao, M. Cushman, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6496.

Cette conversion apparaît satisfaisante mais, à notre connaissance, la NSC 314622 constitue la seule INDO ayant été préparée, à ce jour, selon cette méthode. Aucun autre dérivé équipé de chaînes latérales conférant à la molécule des propriétés biologiques notables n'a été synthétisé par cette voie.

1.2. Synthèse des INDOs par formation de l'intermédiaire 2-arylindanedione

Une deuxième approche repose, quant à elle, sur l'utilisation de dérivés 2-arylindanediones **LIII** (*Figure 34*) comme intermédiaire clé dans la préparation des INDOs.

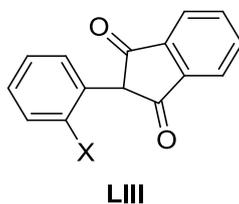


Figure 34. Dérivés 2-arylindanediones LIII

A partir des 2-arylindanediones, deux voies conduisant aux INDOs sont décrites dans la littérature. La première, évoquée par Wawzonek *et coll.* en 1966, repose sur l'analyse dégradative des INDOs.⁴ De cette étude, les auteurs ont proposé une stratégie de synthèse (*Schéma 5*), qui, à notre connaissance, n'a jamais été mise en pratique.

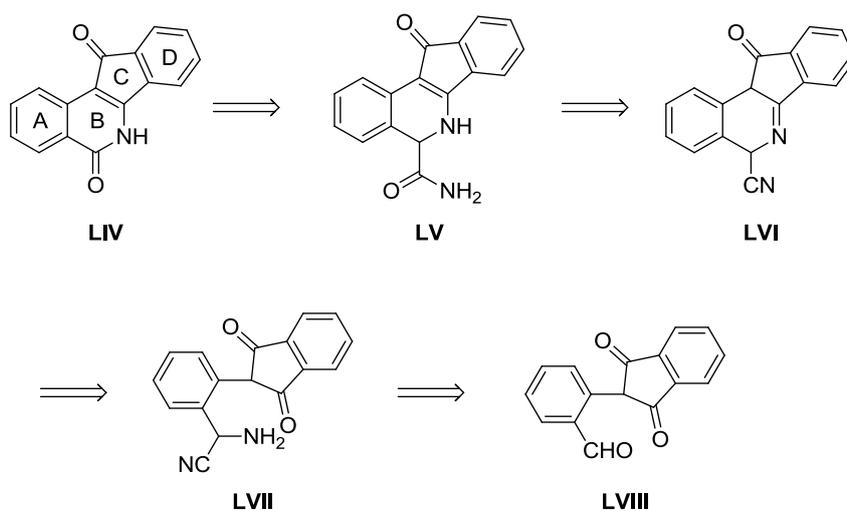


Schéma 5. Schéma rétrosynthétique proposée par Wawzonek et coll.

⁴ S. Wawzonek, J. K. Stowell, R. E. Karll, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1004.

Les INDOs **LIV** seraient obtenues par oxydation du groupement amide du composé **LV** issu de la 11-céto-dihydroisoquinoléine **LVI**. Ce dernier intermédiaire dériverait de la cyclisation intramoléculaire de l'arylindanedione **LVII**, dont le groupement 2-aminonitrile proviendrait de la première étape de la réaction de Strecker sur le groupement aldéhyde de l'arylindanedione **LVIII**.

Une variante de cette stratégie, dont les premières étapes ont été développées par Pailer *et coll.*⁵ (**Schéma 6**) a été, quant à elle, utilisée dans la synthèse de dérivés biologiquement actifs,⁶ à partir d'une arylindanedione équipée, cette fois, d'une fonction carboxylique.

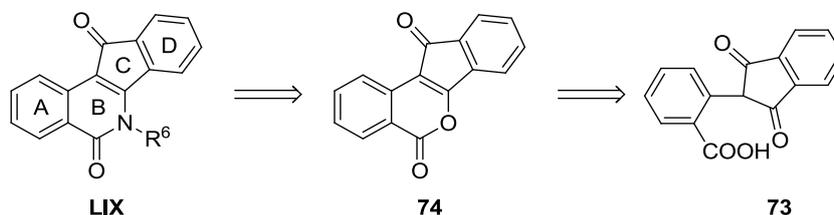


Schéma 6. Schéma rétrosynthétique de la synthèse des INDOs passant par l'indénopyrane **74**

Selon les auteurs, les INDOs **LIX** sont cette fois-ci issues d'une ammonolyse de l'indénopyrane **74**, dont le protocole a été mis au point par Michalsky *et coll.*⁷ Ce composé **74** dérive, quant à lui, d'une cyclisation intramoléculaire de la 2-(2-carboxyphényl)-indanedione **73**. Il est à noter que Wawzonek *et coll.*, dans un article postérieur à celui précédemment cité,⁴ avaient, eux aussi, mentionné l'indénopyrane dans leur approche d'analyse dégradative.⁸

L'avantage de cette méthode est sans doute la rapidité avec laquelle il nous est possible d'obtenir les INDOs, d'autant qu'en terme de rendement, seule la première étape n'est pas quantitative (rendement généralement inférieur à 75 %). Pour y remédier, une synthèse *one-pot* de l'indénopyrane **74** a été plus récemment proposée par Morrell *et coll.* (**Schéma 7**).⁹

⁵ M. Pailer, H. Wörther, A. Meller, *Monatsh. Chem.* **1961**, 92, 1037.

⁶ Pour exemples: (a) M. Nagarajan, A. Morrell, B. C. Fort, M. R. Meckley, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 5651. (b) M. Nagarajan, A. Morrell, S. Antony, G. Kohlhagen, K. Agama, Y. Pommier, P. A. Ragazzon, N. C. Garbett, J. B. Chaires, M. Hollingshead, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 5129.

⁷ (a) J. Michalsky, J. Hrbata, J. Krepelka, M. Melka, M. Miko, M. Hruby, M. Ferenc, E. Skacelova, I. Kejhova, R. Reichlova, A. Kargerova, J. Sediva, A. Kolonicny, J. Urbanec, US Patent 5 597 831, **1997**. (b) J. Hrbata, J. Krepelka, M. Melka, M. Miko, M. Hruby, M. Ferenc, E. Skacelova, I. Kejhova, R. Reichlova, A. Kargerova, J. Sediva, A. Kolonicny, J. Urbanec, J. Michalsky, European Patent 0 643 699, **1996**.

⁸ S. Wawzonek, J. K. Stowell, *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 896.

⁹ A. Morrell, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1846.

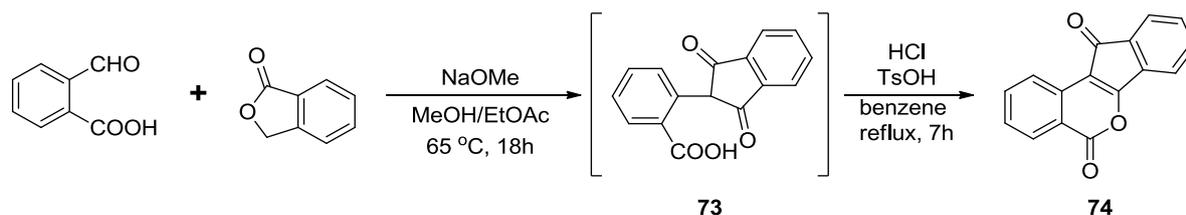


Schéma 7. Synthèse d'indénopyrane développée par Morrell et coll.

Cette synthèse passe par la condensation préalable du 2-carboxybenzaldéhyde et du phtalide pour conduire à la formation de la 2-(2-carboxyphényl)-indanedione **73**. Cet intermédiaire n'est pas isolé mais est directement engagé dans la réaction de cyclisation intramoléculaire, à l'aide d'un montage Dean-Stark, pour donner naissance à l'indénopyrane **74** souhaitée.

Très efficace et concise, la stratégie de synthèse reposant sur les 2-arylindanediones n'est toutefois pas dépourvue d'inconvénients. En effet, l'introduction des substituants sur les cycles aromatiques A et D s'avère difficile à réaliser en pratique, à l'instar des travaux de Morrell *et coll.* sur la synthèse des INDOs substitués en cycle A, décevants en terme de rendement global.⁹ Et, à notre connaissance, aucun dérivé INDO substitué sur l'aromatique D n'a été préparé *via* cette réaction, à ce jour.

1.3. Synthèse des INDOs par cycloaddition entre un benzonitrile et un toluamide

Plus récemment, une nouvelle voie de construction des INDOs a été élaborée par Cho *et coll.* (**Schéma 8**)¹⁰ Il s'agit d'une variante de l'approche synthétique développée par Cushman *et coll.* et a été initialement conçue pour la préparation des benzophénanthridines.¹¹

¹⁰ W. J. Cho, Q. M. Le, H. T. M. Van, K. Y. Lee, B. Y. Kang, E. S. Lee, S. K. Lee, Y. Kwon, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **2007**, *17*, 3531.

¹¹ (a) W. J. Cho, I. J. Kim, S. J. Park, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2000**, *21*, 1035. (b) T. N. Le, S. G. Gang, W. J. Cho, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2763. (c) T. N. Le, H. T. M. Van, S. H. Lee, H. J. Choi, K. Y. Lee, B. Y. Kang, W. J. Cho, *Arch. Pharm. Res.* **2008**, *31*, 6.

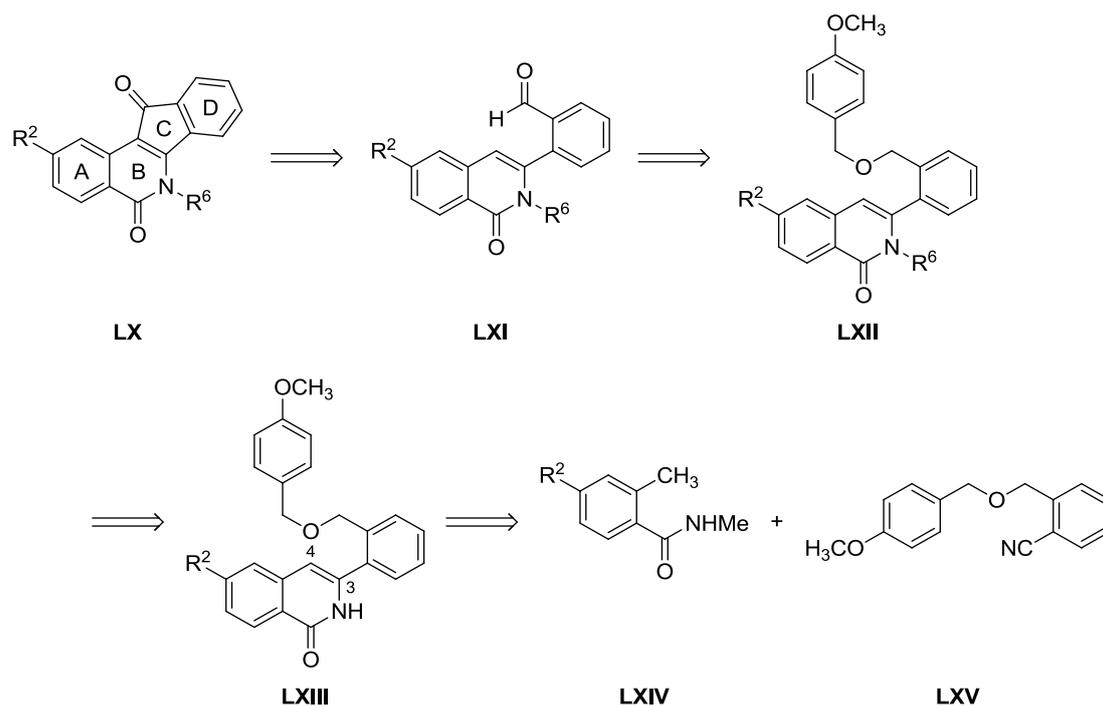


Schéma 8. Schéma rétrosynthétique de la synthèse d'INDO élaborée par Cho et coll.

Dans cette approche, les INDOs **LX** sont obtenues par la cyclisation intramoléculaire d'une isoquinolone munie d'une fonction aldéhyde sur l'une des unités aromatiques de **LXI** et qui a auparavant été protégée *via* un groupement éther **LXII**. Ce dernier composé résulte d'une *N*-substitution par le groupement R^6 de l'azote lactamique de l'isoquinolone **LXIII** issue, quant à elle, de la réaction entre un benzamide dimétalé **LXIV** et un benzonitrile **LXV**, selon le mécanisme développé par Poindexter.¹²

L'originalité de cette approche repose essentiellement sur le fait que la double liaison C3-C4 est formée à un stade précoce de la synthèse. Ce faisant, les auteurs se sont affranchis de problèmes liés à la configuration *cis-trans* rencontrés par Cushman *et coll.* lors de l'annélation ultime et des pertes de rendements qui en découlent. Par ailleurs, tout comme pour la méthode de Cushman *et coll.*, cette méthode semble être appropriée pour l'introduction de substituants divers sur les cycles aromatiques A et D. Cette faculté a été vérifiée sur les benzophénanthridines¹³ et, dans le cas des dérivés INDOs, des dérivés substitués en position C2 ont été synthétisés par cette stratégie.¹⁰

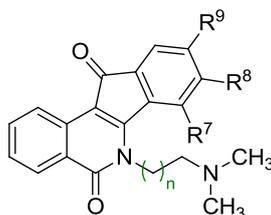
¹² G. S. Poindexter, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3787.

¹³ T. N. Le, S. G. Gang, W. J. Cho, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2768.

Néanmoins, un des inconvénients majeurs de ce chemin réactionnel reste sans doute la difficulté d'introduction, par *N*-alkylation sur l'azote lactamique, d'une chaîne R⁶ dont il faudra maîtriser la taille et la présence de groupes fonctionnels divers « sensibles ».

2. Synthèse des INDOs de la série I

2.1. Stratégie de synthèse pour les molécules de la série I



XXXIX

R⁷, R⁸, R⁹ = H, OH, diméthylaminoéthoxy
ou diméthylaminopropoxy
n = 1, 2 ou 3

Figure 35. Molécules de la série I

Les variations structurales envisagées pour les molécules de la série I concernent exclusivement le cycle D et la chaîne lactamique. Ainsi, les stratégies passant par les arylindanediones ont été rapidement écartées suite aux difficultés liées à l'introduction des substituants au niveau des cycles aromatiques A et D.

Concernant l'approche développée par Cho *et coll.*, il nous a semblé qu'elle n'était pas la plus appropriée pour assurer l'insertion du groupement de type diméthylaminoalkyle en position N6, modification structurale de première importance pour notre étude. En effet, à la fois l'accès à l'agent alkylant approprié pourrait se révéler problématique comme la N-substitution du modèle **LXIII** particulièrement congestionné sous l'angle stérique. En outre, cette approche ne supporterait pas la présence de groupements sensibles aux bases fortes sur le modèle parent **LXIV**.

L'approche de Cushman *et coll.* nous a, par conséquent, semblé être la stratégie la plus adaptée pour la synthèse de nos dérivés INDOs de série I (**Schéma 9**).

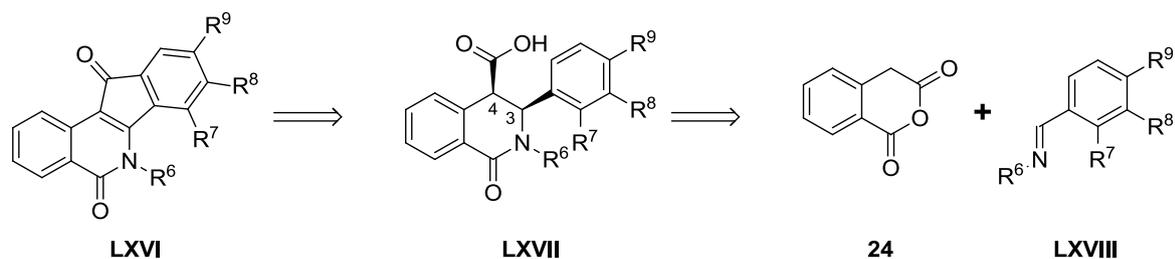


Schéma 9. Schéma rétrosynthétique des molécules de la série I

Les INDOs **LXVI** résulteraient alors de l'oxydation de la liaison C3-C4, suivie de la cyclisation intramoléculaire des *cis*-arylisoquinolones **LXVII**, provenant, quant à elles, de la condensation de l'acide homophthalique **24** avec les bases de Schiff **LXVIII** diversement substituées tant au niveau du cycle aromatique qu'au niveau de l'imine.

2.2. Synthèse des aldimines

2.2.1. Substitution nucléophile des chaînes aminoalkoxy

Les différentes bases de Schiff munies de chaînes aminoalkyles de longueur variable ont été synthétisées en deux étapes à partir des 2-, 3- et 4-hydroxybenzaldéhydes. La première étape a consisté en une réaction de substitution nucléophile du chlorure de diméthylaminoéthyle ou de diméthylaminopropyle par un hydroxybenzaldéhyde pour conduire à la formation des benzaldéhydes aminoalkoxyles **1-5** (Schéma 10).

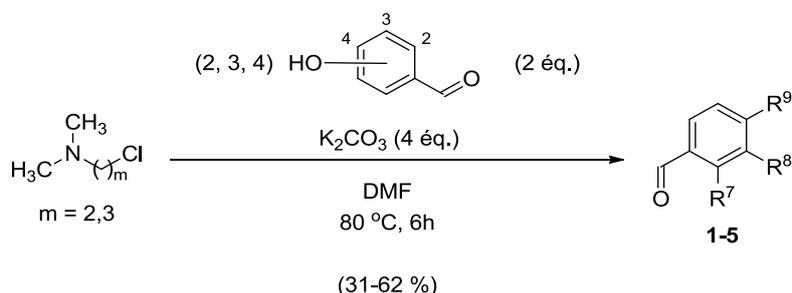


Schéma 10. Substitution nucléophile des chaînes aminoalkoxy sur les hydroxybenzaldéhydes **1-5**

Les différents benzaldéhydes synthétisés **1-5** apparaissent dans le **Tableau 3**.

Composé	R ⁷	R ⁸	R ⁹	Rendement
1	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	H	36 %
2	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	H	62 %
3	H	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	31 %
4	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	49 %
5	H	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	43 %

Tableau 3. Tableau récapitulatif de la synthèse des produits 1-5

Les dérivés dont la structure à l'étape finale ne comportera pas de chaîne aminoalkoxy sur le cycle D, ont été, quant à eux, acylés par un chlorure de benzoyle (*Schéma 11, Tableau 4*), dans des conditions opératoires standard, pour donner les benzoates **6** et **7**.

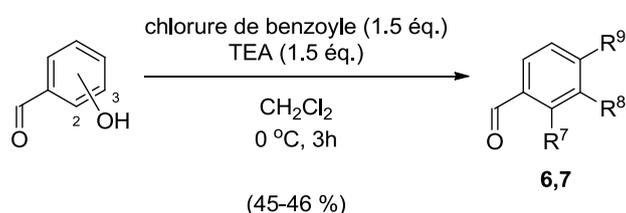


Schéma 11. Addition du chlorure de benzoyle sur les hydroxybenzaldéhydes **6** et **7**

Composé	R ⁷	R ⁸	R ⁹	Rendement
6	O-C(O)-Ph	H	H	45 %
7	H	O-C(O)-Ph	H	46 %

Tableau 4. Tableau récapitulatif de la synthèse des produits **6** et **7**

Les produits **1-7** obtenus ont été utilisés lors de l'étape suivante sans purification particulière. Il a été constaté, en ce qui concerne la première réaction (*Schéma 10*), que les chlorures de diméthylaminoéthyle fournissaient des produits **1** et **3** avec des rendements moins élevés que les chlorures de diméthylaminopropyle à chaîne plus longue **2** et **4** (*Tableau 3*). L'une des causes possibles de cette chute de rendement pourrait être la cyclisation du chlorure de diméthylaminoéthyle par attaque nucléophile intramoléculaire de l'atome d'azote tertiaire sur le carbone en α de l'atome de chlore, donnant naissance à un ion aziridinium. On pourrait penser que ces réactions indésirables seraient peut-être moins probables dans le cas des homologues d'ordre supérieur ($m = 3$), du fait de la difficulté à former un cycle à quatre chaînons.

2.2.2. Elaboration des imines

Dans la deuxième étape, les aldéhydes précédemment synthétisés **1-7** ont été mis en contact avec soit la *N,N*-diméthylethylènediamine, la 3-(diméthylamino)-1-propylamine ou encore le chlorhydrate de 4-(diméthylamino)-1-butylamine pour conduire à la formation de la base de Schiff désirée (*Schéma 12, Tableau 5*).

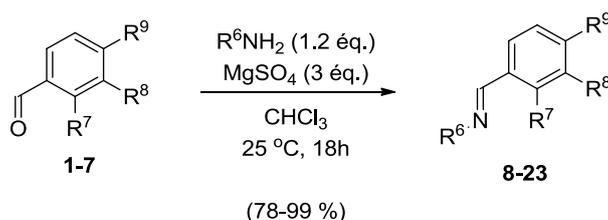


Schéma 12. Formation des imines (bases de Schiff) 8-23

Les composés, tous d'aspect huileux, ont été obtenus de manière quasi quantitative. Il est à noter que, pour la synthèse des composés **12** et **15**, l'ajout de triéthylamine (2 éq.) dans le milieu réactionnel a été nécessaire pour neutraliser le chlorhydrate et libérer ainsi l'amine.

Composé	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹	Rendement
8	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	H	81 %
9	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	H	89 %
10	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	H	94 %
11	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	H	99 %
12	(CH ₂) ₄ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	78 %
13	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	91 %
14	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	90 %
15	(CH ₂) ₄ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	79 %
16	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	90 %
17	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	98 %
18	N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	85 %
19	N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	92 %
20	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	O-CO-Ph	H	H	76 %
21	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	O-CO-Ph	H	H	69 %
22	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	O-CO-Ph	H	77 %
23	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	O-CO-Ph	H	97 %

Tableau 5. Tableau récapitulatif de la synthèse des produits 8-23

Les produits **8-23** ont été isolés sans purification particulière. En effet, la très bonne pureté affichée par les spectres RMN des différentes imines brutes a rendu la purification non nécessaire, d'autant plus que les imines aliphatiques sont connues pour mal supporter les traitements chromatographiques sur gel de silice.

Enfin, une série supplémentaire d'hydrazones, **18** et **19**, a été synthétisée afin de disposer, au final, des INDOs équipées d'une chaîne lactamique courte, sans aucun groupement méthylène entre les deux atomes d'azote.

2.3. Condensation des imines avec l'anhydride homophtalique

2.3.1. Nos résultats

L'addition de l'anhydride homophtalique **24**, préparé au préalable à partir de l'acide homophtalique commercial, aux bases de Schiff synthétisées précédemment **8-17**, **20-23** a conduit rapidement aux produits de cyclocondensation **25-40** (*Schéma 13*).

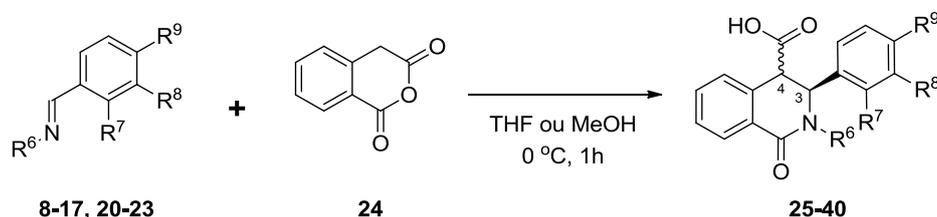


Schéma 13. Réaction de condensation entre les imines 8-23 et l'anhydride homophtalique 24

L'ensemble des produits assemblés par cette technique apparaît dans le *Tableau 6*.

Composé	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹	Rendement <i>cis+trans</i>	Ratio <i>cis/trans</i>
25	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	H	100 %	1:2,0
26	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	H	97 %	1:2,0
27	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	H	93 %	1:1,9
28	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	H	94 %	1:3,8
29	(CH ₂) ₄ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	100 %	1:4,6 1:2,3 (MeOH)
30	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	100 %	1:2,8 1:2,2 (MeOH)
31	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	100 %	1:6,6
32	(CH ₂) ₄ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	100 %	1:3,9 1:2,1 (MeOH)
33	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	96 %	1:1,4
34	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	96 %	1:3,3
35	N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	-	-
36	N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	-	-
37	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	O-CO-Ph	H	H	100 %	1:0,9
38	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	O-CO-Ph	H	H	100 %	non déterminée
39	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	O-CO-Ph	H	99 %	1:2,1 (MeOH)
40	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	O-CO-Ph	H	97 %	1:3,0 (MeOH)

Tableau 6. Tableau récapitulatif de la synthèse des produits **25-40**. Sauf mention contraire, le solvant utilisé pour la réaction a été le THF.

A l'exception des réactions impliquant les hydrazones **19** et **20** en lieu et place des aldimines (**Schéma 14**), les arylisoquinolones **25-40** ont été obtenues avec d'excellents rendements (supérieurs à 93 %) et systématiquement sous la forme d'un mélange de diastéréoisomères C3-C4 *cis/trans*, inséparables par chromatographie sur gel de silice. Cette impossibilité d'isoler de tels isomères a également été rapportée par Cushman lors de la préparation des 13-méthylprotoberbérines¹⁴ et les INDOs.²

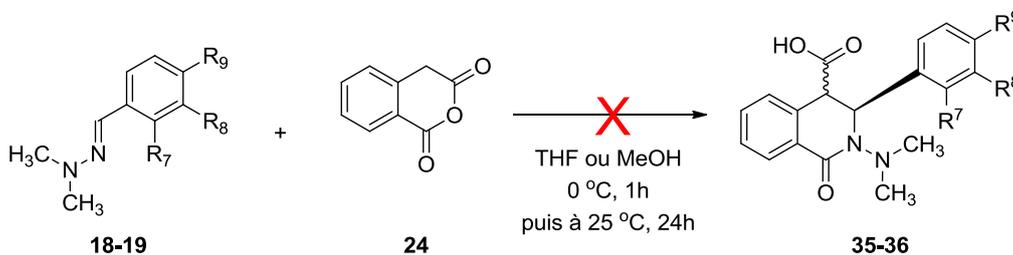


Schéma 14. Echec de la formation des composés (**35**) et (**36**)

¹⁴ M. Cushman, J. Gentry, F. W. Dekow, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1111.

Afin de déterminer la composition des mélanges *cis/trans*, nous nous sommes appuyés sur les données RMN recueillies pour les bruts réactionnels (exemple en **Figure 36**).

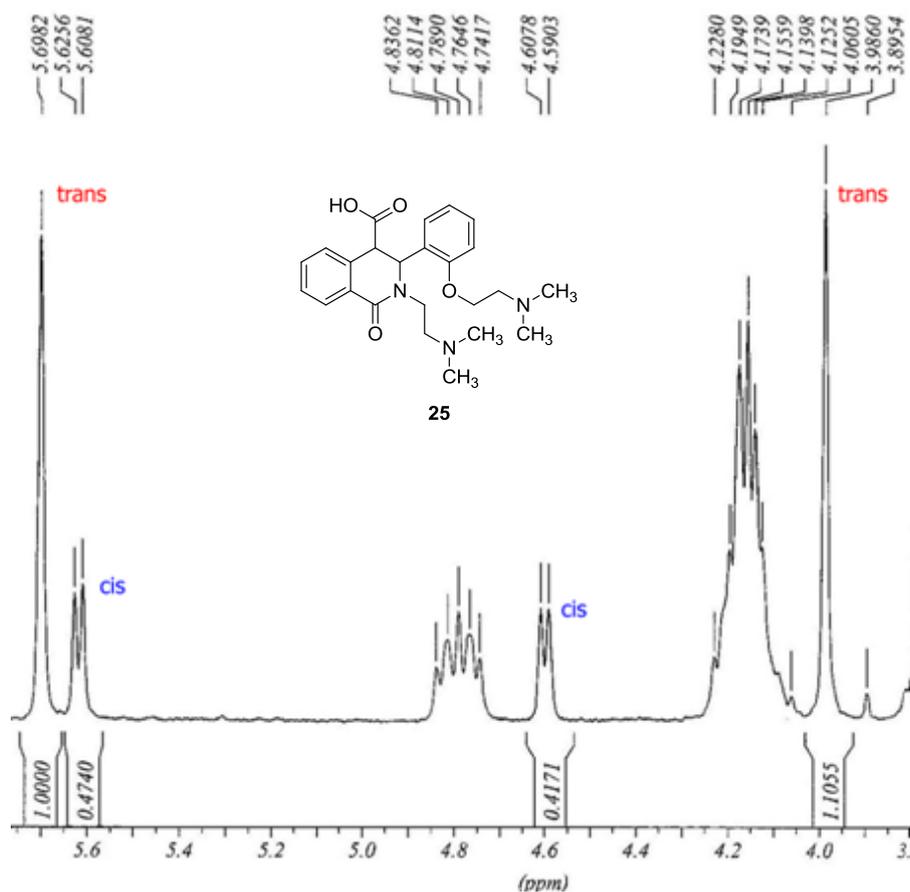


Figure 36. Spectre RMN de l'isoquinolinone **25** comportant les pics caractéristiques des isomères *cis* et *trans*

En effet, les protons H3 et H4 affichent des déplacements chimiques et surtout une multiplicité distincte. Dans l'isomère de configuration *trans*, la constante de couplage J_{H3-H4} est nulle, tandis que les isomères *cis* présentent une constante de couplage J_{H3-H4} comprise entre 5.2 Hz et 5.3 Hz. C'est cette différence, également observée par Cushman *et coll.*,¹⁵ qui nous a permis de déterminer le ratio *cis/trans* des isomères par comparaison des intégrations de ces signaux. Seul le spectre du composé **38**, où une superposition des signaux H3 et H4 est observée, n'offre pas la possibilité d'évaluer la distribution précise en isomères.

¹⁵ M. Cushman, P. Mohan, *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 1031.

2.3.2. Considérations mécanistiques

Si la stratégie que nous avons adoptée, inspirée de Cushman *et coll.*, offre une grande flexibilité pour l'introduction de substituants sur les cycles aromatiques A et D, elle exploite exclusivement les isomères *cis* sortis du mélange diastéréoisomérique. Pour ce qui nous concerne, nous avons tenté de rationaliser nos résultats acquis sur des modèles structurellement différents de ceux de Cushman afin de pouvoir optimiser ultérieurement les conditions opératoires et provoquer l'enrichissement de nos mélanges en isomère *cis*.

La séparation des isomères ayant été impossible, les deux diastéréoisomères ont donc été engagés pour la réaction suivante. En conséquence, les isomères *trans* n'ont pu être récupérés pour les tentatives de conversion en des INDOs suivant la méthode de Xiao et Cushman précédemment évoquée.³

A ce jour, seuls deux mécanismes sont rapportés dans la littérature pour cette réaction. Le premier, proposé par Kaneti *et coll.*,¹⁶ repose sur l'addition d'une imine sur la forme monoénol de l'anhydride homophthalique et le départ concerté du groupement carboxylate (**Schéma 15**). Il s'agit, toutefois, d'une étude très théorique, en phase gazeuse, et l'approche calculatoire des auteurs peine à refléter avec exactitude certains résultats expérimentaux.

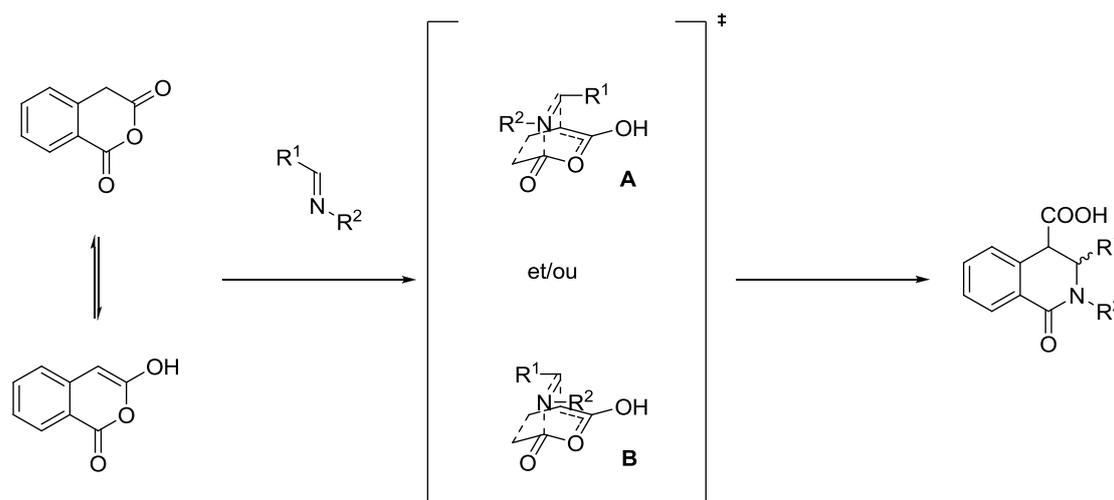


Schéma 15. Mécanisme de cyclocondensation proposée par Kaneti *et coll.*

¹⁶ J. Kaneti, S. M. Bakalova, I. G. Pojarlieff, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6824.

Dans notre cas, les substituants R^1 de l'aldimine étant des aromatiques, l'état de transition **B** pourrait expliquer la formation majoritaire des isomères *trans*, à la faveur d'un recouvrement orbitalaire maximal entre les deux cycles aromatiques. Pour autant, cette approche justifie difficilement la dépendance du ratio *cis/trans* vis-à-vis de la nature du solvant ou encore de la nature des substituants R^1 et R^2 .

A cet égard, le deuxième mécanisme, établi par Cushman et Madaj, offre plus d'éléments de réponse^{17,18} (**Schéma 16**).

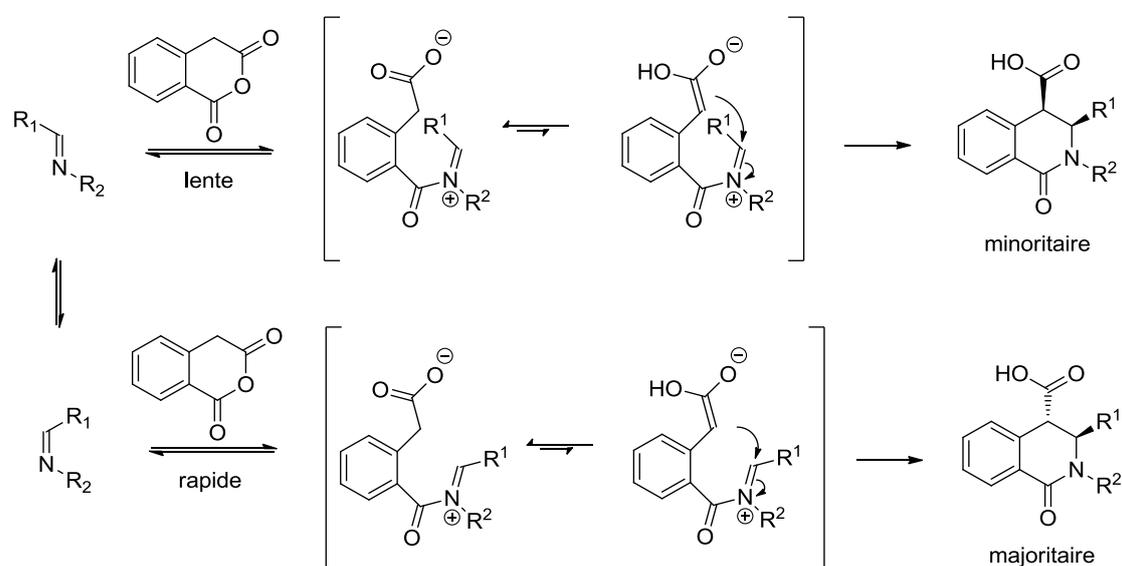


Schéma 16. Mécanisme de cyclocondensation proposé par Cushman et Madaj

Le mécanisme proposé se déroule comme suit :

- iminolyse de l'anhydride homophthalique pour former une espèce zwitterionique
- réaction de cyclisation intramoléculaire pour former les arylisoquinolones

Selon Cushman, les deux diastéréoisomères C3-C4 *cis* et *trans* proviennent respectivement de la réaction de condensation avec l'aldimine de configuration *E* ou *Z*. Dans notre cas, les substituants R^1 et R^2 de l'aldimine étant volumineux, l'obtention majoritaire du composé *cis* issu de l'aldimine *E*, thermodynamiquement plus stable, pourrait être attendue. Toutefois, la congestion stérique engendrée par de gros groupements lors de la formation de l'iminium

¹⁷ M. Cushman, E. J. Madaj, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 907.

¹⁸ M. González-López, J. T. Shaw, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 164.

intermédiaire semble défavoriser la formation de l'isomère *cis* au profit du *trans*. Ces résultats sont tout à fait en accord avec les observations réalisées par Cushman *et coll.* sur une série de substrats structurellement très proches des nôtres.¹⁷

Au cours de cette même étude, les auteurs ont étudié l'influence de la densité électronique du groupement aryle en position C3 sur la distribution des isomères, en corrélant les constantes de Hammett σ^+ avec le ratio *cis/trans* observé. Ils ont notamment établi que plus le cycle aromatique R¹ possédait une forte densité électronique, plus le mélange final était enrichi en isomère *cis*. Deux séries de nos isoquinolones (**27**, **30**, **33**) et (**28**, **31**, **34**) en offrent l'illustration. En effet, toutes comportent un substituant donneur mésomère sur le cycle aromatique, en position *ortho* ou *para* pour les composés **27**, **33**, **28** et **34**, en position *meta* pour les composés **30** et **31**. On vérifie bien, dans ces cas, que le ratio d'isomère *cis* formé est plus important pour les composés *ortho/para* substitués que pour les *meta* substitués (**27** et **33** vs **30** et **28**, **34** vs **31**).

Enfin, Cushman et Madaj ont étudié l'influence du solvant de réaction sur le ratio *cis/trans*. Le passage du chloroforme au méthanol, solvant protique polaire qui stabiliserait l'intermédiaire zwitterionique, semble favoriser l'obtention de l'isomère *cis*. Nous avons observé un effet tout à fait similaire uniquement pour les composés **29**, **30** et **32**. Dans les autres cas, nos résultats ont été conformes aux observations de Ryckebusch *et coll.* où les *ratio* les plus favorables sont obtenus dans le THF.¹⁹

Néanmoins, le mécanisme de Cushman et Madaj¹⁷ ne semble pas pouvoir expliquer l'influence de la longueur des chaînes latérales dans le rapport *cis/trans*. En effet, d'après le **Tableau 6**, l'augmentation de la longueur de la chaîne aminoalkoxyde d'un groupement méthylène a conduit à une diminution notable de la proportion en isoquinolone *cis* (**26** vs **28**). De la même façon, l'augmentation de la longueur de la chaîne aminoalkyle d'un groupement méthylène au niveau de l'azote lactamique a engendré une diminution prononcée de la proportion en isoquinolone *cis* (**27** vs **28**, **30** vs **31**, **33** vs **34**), ce qui est contraire aux observations de Cushman.

¹⁹ A. Ryckebusch, D. Garcin, A. Lansiaux, J. F. Goossens, B. Baldeyrou; R. Houssin, C. Bailly, J. P. Hénichart, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3617.

Il est généralement admis que, dans un substituant alkyle linéaire, l'encombrement stérique est confiné sur les deux premiers carbones. Une variation si prononcée du ratio *cis/trans* pour nos composés est donc plutôt surprenante et inattendue.

En conclusion, si le mécanisme actuellement consensuel de Cushman et de Madaj permet d'expliquer certains de nos résultats expérimentaux, il ne suffit toutefois pas pour pouvoir interpréter l'intégralité de nos données. La plupart des études réalisées à ce jour l'ont été sur des modèles dépouillés et ne possèdent pas, à l'image nos molécules, de chaînes fonctionnalisées (et notamment aminées) pouvant jouer un rôle dans les sélectivités observées.

2.4. Synthèse des INDOs (55-68)

Les isoquinolones **25-34** issues des condensations précédentes ont été engagées dans une réaction « *one-pot* » d'oxydation de la liaison carbone-carbone C3-C4 suivie de l'acylation de Friedel et Crafts intramoléculaire (**Schéma 17**). Comme cela avait été mentionné précédemment, cette procédure a été légèrement modifiée en regard de celle de Cushman *et coll.*, au niveau de la durée et la température de la réaction d'oxydation et au niveau de la quantité d'acide de Lewis AlCl_3 introduite.²⁰

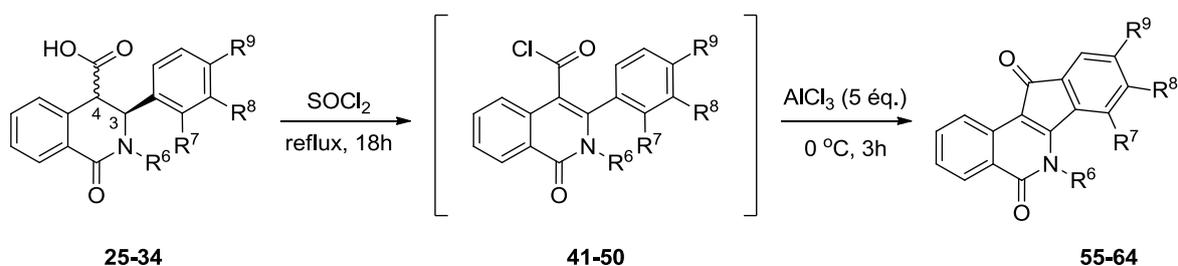


Schéma 17. Réaction d'oxydation et de cyclisation intramoléculaire aboutissant aux composés **55-64**

²⁰ A. Morrell, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3659.

Composé	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹	Rendement à partir du <i>cis</i>
55	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	H	< 5 %
56	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	H	14 %
57	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	H	24 %
58	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	H	17 %
59	(CH ₂) ₄ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	12 %
60	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	< 5 %
61	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	36 %
62	(CH ₂) ₄ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	8 %
63	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	5 %
64	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	16 %

Tableau 7. Tableau récapitulatif de la synthèse des produits 55-64.

En ce qui concerne les dérivés **69-72**, une étape supplémentaire d'hydrolyse a été nécessaire pour déprotéger le groupement benzoate à partir des INDOs **65-68** (Schéma 18).

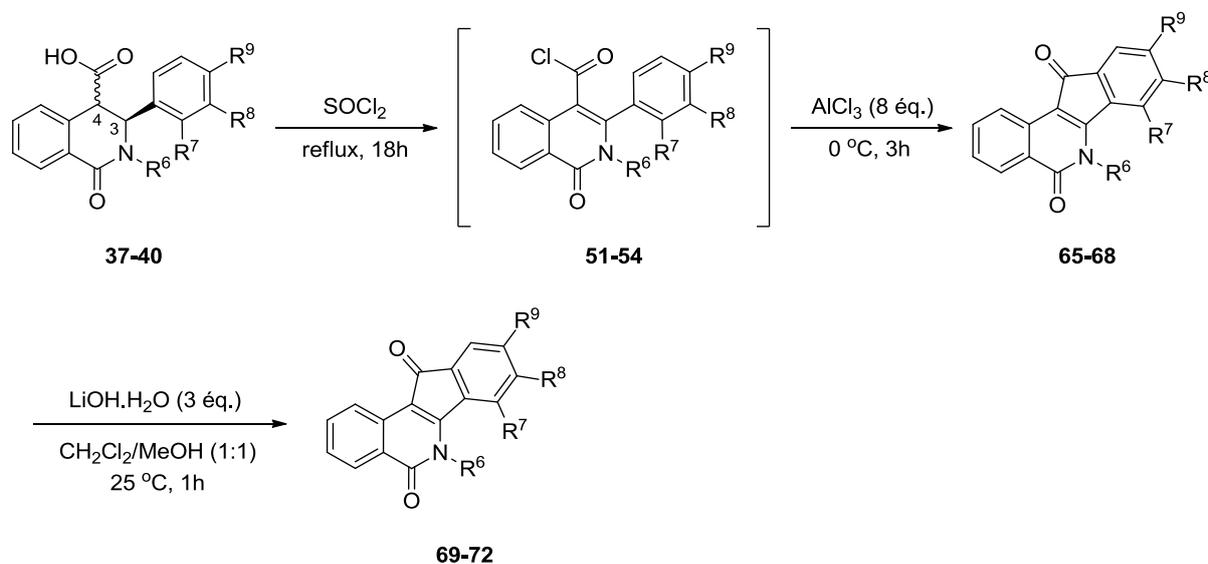


Schéma 18. Réactions aboutissant aux composés 69-72

Composé	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹	Rendement
65	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	O-C(O)-Ph	H	H	8 % ^a
66	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	O-C(O)-Ph	H	H	6 % ^b
67	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	O-C(O)-Ph	H	41 % ^a
68	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	O-C(O)-Ph	H	47 % ^a
69	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	OH	H	H	-
70	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	OH	H	H	32 %
71	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	OH	H	26 %
72	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	OH	H	38 %

Tableau 8. Tableau récapitulatif sur la synthèse des produits **65-72**. **a.** Rendement à partir du *cis*. **b.** Du fait de l'impossibilité d'interpréter le ratio *cis/trans* du précurseur **38**, le rendement du composé **66** donné dans ce tableau est un rendement à partir du mélange *cis/trans*.

Il est à noter que pour la synthèse des composés **65-68**, la quantité d'AlCl₃ utilisée pour la cyclisation intramoléculaire a été beaucoup plus importante que dans la réaction aboutissant à l'obtention des composés **55-64**.

Mis à part le composé **69**, les composés ciblés ont donc pu être obtenus avec succès mais les rendements des réactions ont été, pour certaines cyclisations, extrêmement faibles avec notamment des rendements inférieurs à 5 % (**55**, **60**, **63**) (**Tableau 7**, **Tableau 8**). L'ensemble de ces deux réactions a fourni une multitude de produits secondaires visibles en chromatographie sur couche mince.

De même, la séparation sur colonne de gel de silice de chaque INDO été extrêmement délicate à effectuer, avec pas moins de deux, voire trois passages sur colonne, ce qui pourrait expliquer les faibles rendements observés.

Néanmoins, les produits ayant été obtenus avec une quantité suffisante pour les tests biologiques, des efforts d'optimisation n'ont pas été effectués sur ces réactions. Ce sont les résultats de ces tests qui conditionneront l'opportunité de cette étude.

2.5. Bilan des synthèses des molécules de la série I

La synthèse des composés finaux de la série I a été effectuée selon une séquence de quatre à cinq étapes (*Schéma 19*).

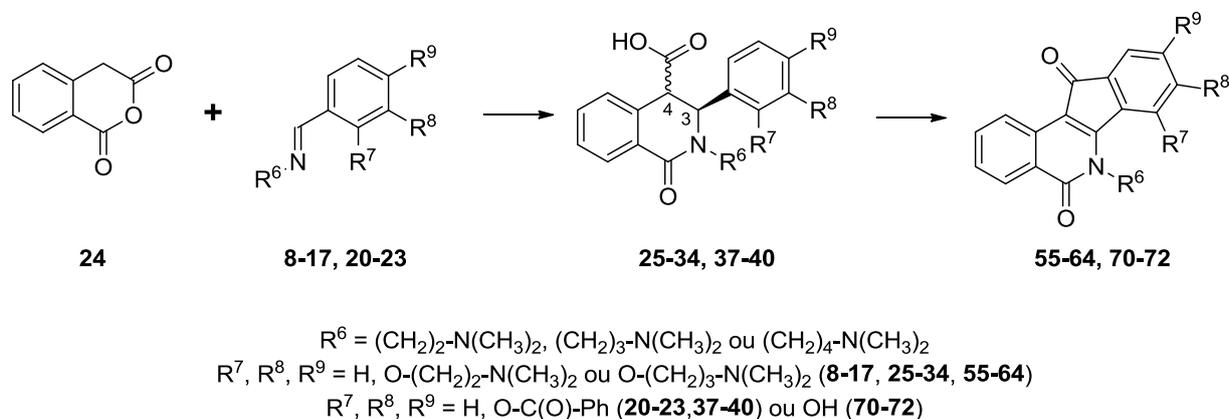


Schéma 19. Schéma de la synthèse des produits 55-68

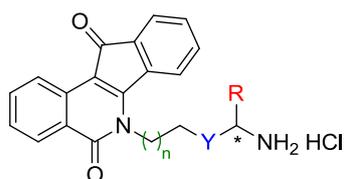
Hormis la dernière étape, la cyclisation intramoléculaire et, à un degré moindre, la première qui a consisté en une substitution nucléophile des chlorures de diméthylalkyle, les rendements des différentes étapes ont été quasi-quantitatifs. Au niveau des arylisoquinolones **25-34, 37-40**, si le ratio *cis/trans* peut être un élément perturbateur, ceci a pu être compensé par la facilité liée à un accès aux imines **8-17, 20-23** et à l'anhydride **24**.

Par cette approche, à l'exception du produit **69**, les INDOs désirées ont pu être obtenues avec en quantité suffisante pour permettre les analyses biologiques.

3. Synthèse des dérivés conjugués aux acides aminés

3.1. Stratégie de synthèse des molécules de la série II

Cette fois-ci, les modifications portent uniquement sur l'azote lactamique *N6* (*Figure 37*).



XL

R = résidu Gly, Lys, His ou Arg

Y = ester, amide, amine

n = 1, 2

Figure 37. Molécules de la série II

La méthode de Cushman *et coll.* réalisable en théorie mais problématique en termes d'efficacité et de rendement, apparaît peu séduisante pour assurer l'assemblage des molécules de cette série II. La méthode développée par Cho *et coll.*, quant à elle, a été également écartée car nécessitant l'utilisation d'une base forte pour la substitution au niveau de l'azote lactamique et imposant l'élaboration d'un agent alkylant porteur de groupes fonctionnels sensibles.

En conséquence, pour ce qui concerne les molécules de la deuxième série, nous avons adopté la voie synthétique reposant sur la synthèse préalable de la 2-arylidanedione suivie par la formation de l'indénopyrane (**Schéma 20**).

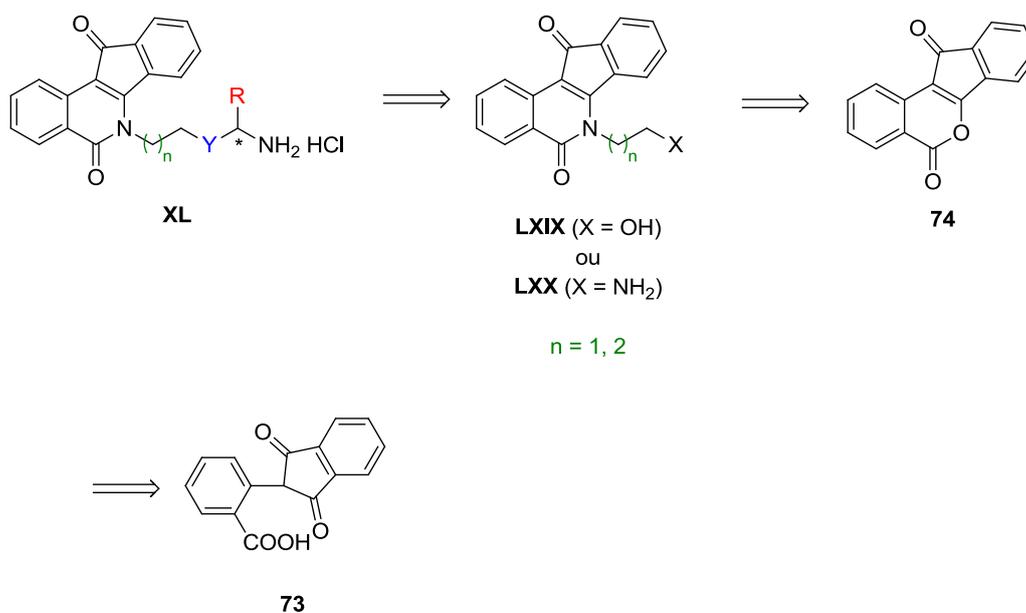


Schéma 20. Schéma rétrosynthétique des molécules de la série II

Les composés ciblés **XL** pourraient être obtenus, après déprotection, par couplage des INDOs hydroxylalkylées **LXIX** ou aminonoalkylées **LXX** avec les acides aminés *N*-protégés appropriés. Les composés **LXIX** et **LXX** proviendraient de l'ammonolyse de l'indénopyrane **74** avec respectivement un aminoalcool ou une diamine monoprotégée adéquate.

3.2. Synthèse de la benz[*d*]indéno[1,2-*b*]pyran-5,11-dione

La réaction de condensation entre le 2-carboxybenzaldéhyde et le phtalide a conduit, après acidification du milieu aqueux avec de l'HCl 6M, à la précipitation du dérivé 2-arylindanedione **73** (*Schéma 21*).

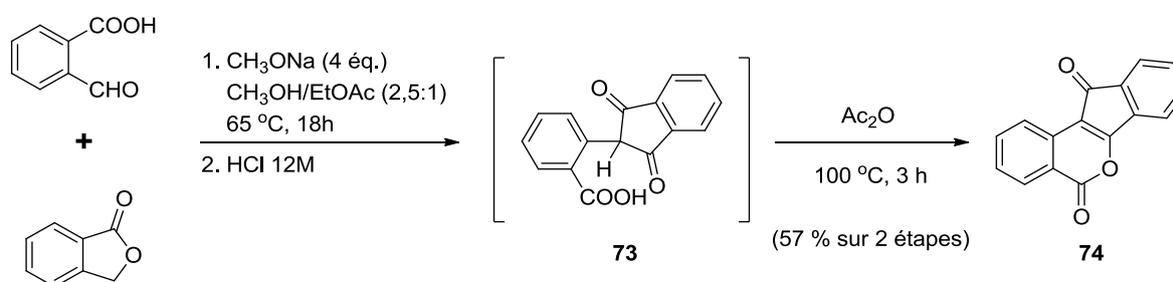


Schéma 21. Synthèse de l'indénopyrane 74

Le composé **73** a été ensuite engagé, sans étape de purification, dans une réaction de cyclisation intramoléculaire à haute température, en présence d'anhydride acétique utilisé en tant qu'agent déshydratant mais aussi comme solvant, pour aboutir à la formation de l'indénopyrane **74**. Ce composé est obtenu sous forme d'aiguilles de couleur orange après recristallisation dans le toluène.

Il est à noter que le rendement de l'ensemble de ces deux étapes est moyen (57 %). La première étape constitue vraisemblablement le facteur limitant. En effet, Shapiro *et coll.*²¹ ont démontré que la formation de l'eau au cours du déroulement de la formation de l'arylindanedione **73** était responsable de la baisse du rendement. Pour y remédier, Shapiro *et coll.* ont proposé l'addition d'un ester non encombré (tel que l'acétate d'éthyle anhydre) en tant que solvant couplé à l'addition supplémentaire d'un équivalent de méthanolate de

²¹ S. L. Shapiro, K. Geiger, J. Youlus, L. Freedman, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 3580.

sodium (portant le total à 3 équ.) qui permet d'éliminer une partie de l'eau formée, l'acétate d'éthyle étant alors saponifié dans le milieu.²¹

Néanmoins, dans notre cas, nous n'avons pu réussir à isoler l'arylindanedione **73** souhaitée avec 3 équ. de méthanolate. Par conséquent, nous sommes intervenus sur deux paramètres : la quantité de méthanolate de sodium et le temps de réaction de la condensation afin d'obtenir le produit désiré (*Tableau 9*).

Méthode	Quantité de CH ₃ ONa	Durée de réaction	Résultats
A	3 équ.	1h	-
B	4 équ.	1h	-
C	4 équ.	18h	Rendement global moyen 57 %
D (Dean-Stark)	4 équ.	3h	Rendement global moyen 75 %

Tableau 9. Optimisation de la réaction de formation de l'indénopyrane 74

Nous avons constaté que l'ajout d'un équivalent supplémentaire de méthanolate de sodium (portant ainsi à 4 équ. la quantité totale de la base forte) et l'allongement de la durée de la réaction de cyclisation intramoléculaire à 18h conduisaient à la formation du produit avec un rendement global acceptable (*Tableau 9*, entrée C). Il est à noter qu'ultérieurement, nous avons pu encore améliorer ce rendement (de l'ordre de 75 %, *Tableau 9*, entrée D) en utilisant un montage de type Dean-Stark, tout en réduisant la durée de la réaction de la formation du composé **73**.

La voie de synthèse « one pot » décrite plus récemment par Morrell *et coll.*⁹ a été également mise en œuvre au laboratoire (*Schéma 7*). Malheureusement, après plusieurs tentatives, il s'est avéré que l'indénopyrane **74** obtenu par la méthode « one-pot » était beaucoup moins pur (analyse RMN) que celui obtenu en deux étapes. Après purification par recristallisation, nous avons constaté une chute considérable du rendement global de la réaction qui devient inférieur à celui en deux étapes, ce qui a nous a convaincus de conserver la méthode de synthèse de l'indénopyrane **74** en deux étapes distinctes.

3.3. Greffe des bras espaceurs

Comme précisé précédemment (*Schéma 20*), la greffe des bras espaceurs dans le motif INDO repose sur la conversion de la fonction lactone insérée dans le pyrane en une fonction lactame. Deux types d'INDOs, selon la nature du groupement fonctionnel à connecter à l'extrémité des bras espaceurs, ont été préparées : les INDOs hydroxyalkylées **LXIX** et les INDOs aminoalkylées **LXX** rappelées par le *Schéma 22*.

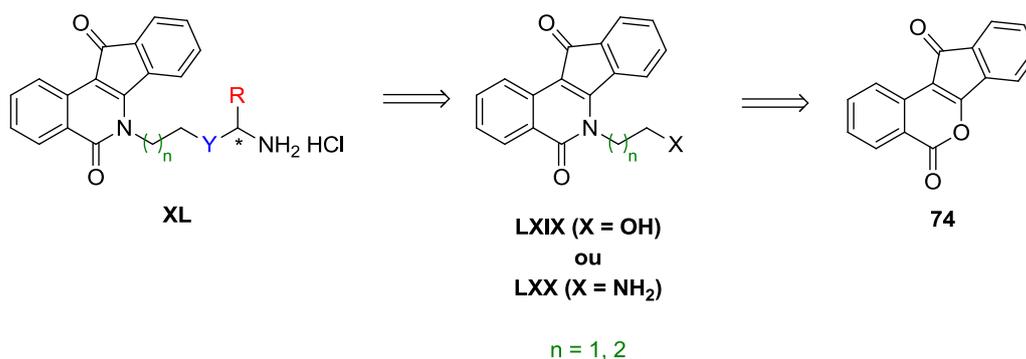


Schéma 22. Schéma rétrosynthétique à partir de l'indénopyrane 74

3.3.1. Synthèse des INDOs hydroxyalkylées

L'indénopyrane **74** obtenu précédemment a été mis en réaction soit avec le 2-aminoéthanol, soit avec le 3-aminopropanol en très large excès (*Schéma 23*).

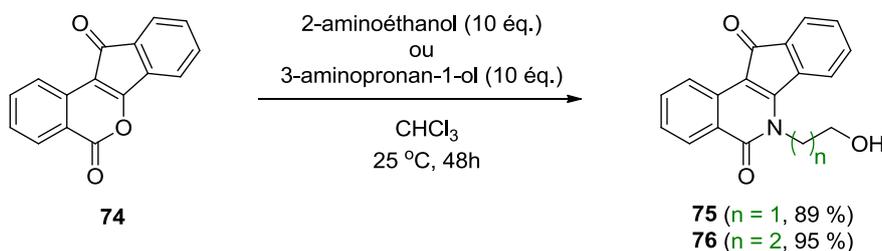


Schéma 23. Formation des composés 75 et 76

Composé	Aminoalcool utilisé	n	Rendement brut moyen
75	2-aminoéthanol	1	89 %
76	3-aminopropan-1-ol	2	95 %

Tableau 10. Tableau récapitulatif de la synthèse des composés 75 et 76

Les INDOs synthétisées **75** et **76**, obtenues par ammonolyse et addition nucléophile intramoléculaire, ont affiché une insolubilité dans la plupart des solvants organiques usuels. Des méthodes de purification par recristallisation, notamment dans le 2-propanol pour le composé **76** sont rapportées dans la littérature.²² Néanmoins, les spectres RMN ont démontré un très bon degré de pureté du produit brut isolé. Nous avons donc décidé d'utiliser ces INDOs sans étape de purification particulière.

3.3.2. Synthèse des INDOs aminoalkylées

La synthèse des INDOs aminoalkylées **LXX** a nécessité, au préalable, une protection d'une des deux fonctions amine primaire de la diamine utilisée, afin d'éviter la formation des bis-indénoisoquinoléinediones (bisINDOs) qui résulterait d'une double attaque nucléophile.^{6b}

Dans cette optique, une réaction de monoprotection de l'amine par un groupement *tert*-butoxycarbonyle a été effectuée selon les conditions expérimentales établies dans la littérature (*Schéma 24*).²³ Les deux produits obtenus **77** et **78** ont été utilisés sans purification pour les étapes suivantes.

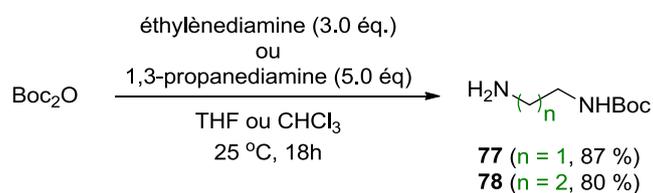
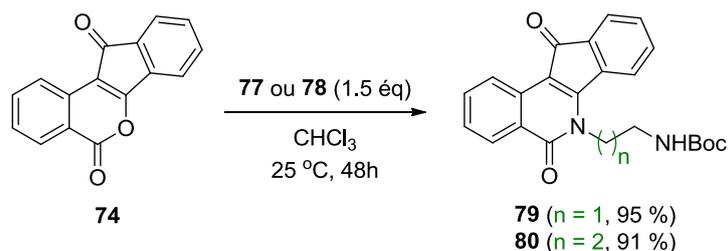


Schéma 24. Synthèse des composés 77 et 78

Dans l'étape suivante, les diamines protégées **77** et **78** utilisées en excès dans le milieu réactionnel ont été mises en réaction avec l'indénopyrane **74** (*Schéma 25*). Les INDOs **79** et **80**, intégrant une chaîne aminoalkyle protégée, ont été obtenues avec de très bons rendements.

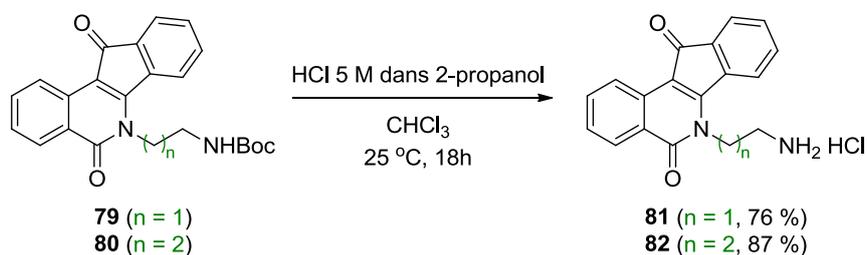
²² D. Strumberg, Y. Pommier, K. Paull, M. Jayaraman, P. Nagafuji, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 446.

²³ Protocoles expérimentaux utilisés : (a) W. S. Saari, J. E. Schwering, P. A. Lyle, S. J. Smith, E. L. Engelhardt, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 97. (b) C. Dardonville, C. Fernandez-Fernandez, S. L. Gibbons, G. J. Ryan, N. Jagerovic, A. M. Gabilondo, J. J. Meanab, L. F. Calladob, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6570.

*Schéma 25. Synthèse des composés 79 et 80*

Une fois de plus, en raison de la forte insolubilité des produits cyclocondensés obtenus, ceux-ci ont été utilisés directement sans purification, d'autant plus que l'analyse RMN du produit brut obtenu a fait état d'une pureté satisfaisante des échantillons.

La dernière étape de cette séquence réactionnelle a consisté en la déprotection par une acidolyse de l'amine primaire au bout du bras espaceur. Celle-ci a été réalisée en faisant réagir pendant une nuit le produit obtenu dissous dans le chloroforme avec une solution d'acide chlorhydrique 5 M dans le 2-propanol (*Schéma 26*).

*Schéma 26. Synthèse des composés 81 et 82*

Composé	Diamine de départ	n	Rendement brut moyen
81	Ethylènediamine	1	76 %
82	1,3-propanediamine	2	87 %

Tableau 11. Tableau récapitulatif de la synthèse des composés 81 et 82

Les chlorures **81** et **82** des produits désirés ont été obtenus purs après précipitation, avec de bons rendements mais une solubilité particulièrement faible, surtout pour le composé **81**, aussi bien dans un milieu aqueux que dans un milieu organique.

3.4. Greffe des acides aminés *N*-protégés sur les INDOs

Ces premières étapes de synthèse ayant permis l'élaboration de la partie « ouest » correspondant au motif intercalant munie d'un bras espaceur fonctionnalisé, nous nous sommes intéressés par la suite à l'introduction du motif acide aminé au bout de la chaîne alkyle. Notre objectif consiste à avoir trois types de connexions différentes – les fonctions ester, amide et amine secondaire – assurant la jonction entre le motif acide aminé et la partie intercalante et ce, tout en préservant la stéréochimie du carbone asymétrique porté par l'acide aminé.

3.4.1. Protection de la fonction amine des acides aminés

Dans un premier temps, les acides aminés commerciaux, partenaires choisis pour notre « cahier de charges », ont tous été protégés avec le groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc). D'autres méthodes de protection telles que les carbamates de benzoyle (Z) qui requièrent une déprotection par hydrogénation catalytique n'ont pu être mises en œuvre suite à la sensibilité de la fonction carbonyle en position C11 vis-à-vis de ces réactifs. (**Figure 38**).

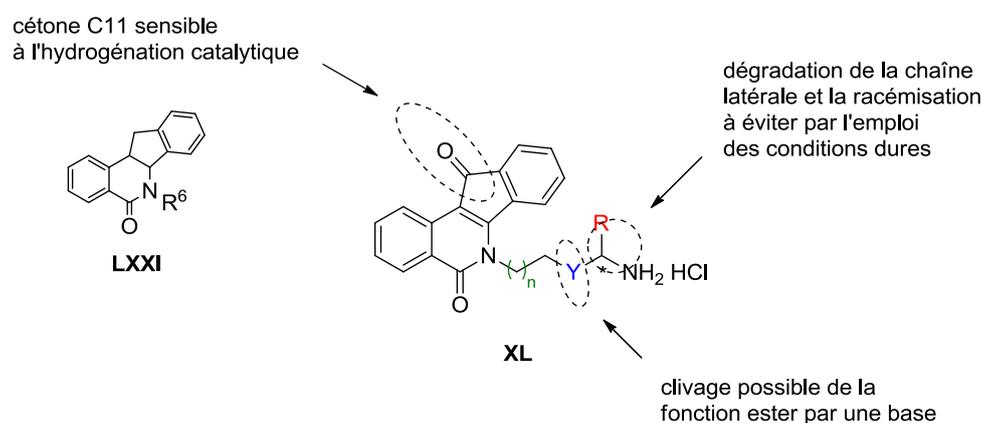


Figure 38. Les INDOs et les déprotections des groupements protecteurs d'acides aminés

De même, les groupements protecteurs clivables dans le milieu basique comme le Fmoc ont été également écartés pour éviter notamment une réaction de clivage au niveau des INDOs équipées d'une fonction ester comme fonction de connexion.

La protection des acides aminés, la glycine plus les acides aminés basiques comprenant la lysine et l'histidine, a été effectuée *via* la formation d'un ou deux groupements carbamate, pour aboutir à la formation des acides aminés *N*-protégés **83-85** (*Schéma 27*),²⁴ qui ont été utilisés à l'étape suivante sans purification particulière.

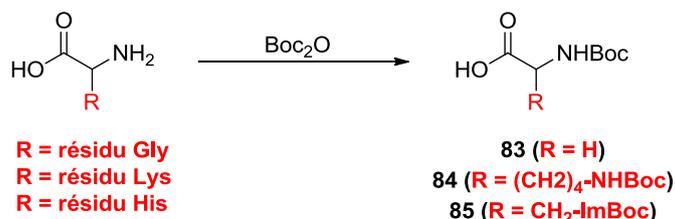


Schéma 27. Synthèse des acides aminés N-protégés 83-85

Composé	Acide aminé	Rendement brut moyen
83	Glycine	61 %
84	Lysine	77 %
85	Histidine	60 %

Tableau 12. Tableau récapitulatif de la protection des acides aminés 83-85

En ce qui concerne l'arginine, le dernier acide aminé basique, les diverses tentatives de protection des groupes azotés de la chaîne latérale (ω et ω') afin d'obtenir la $N^\alpha, N^{\omega}, N^{\omega'}$ -tri-L-Boc-arginine (**L**)-**86** se sont toutes soldées par des échecs (*Schéma 28*).

²⁴ Protocoles expérimentaux utilisés, pour la glycine : J. I. Venäläinen, E. A. A. Wallén, A. Poso, J. A. Garca-Horsman, P. T. Männistö, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7093. Pour la lysine : H. Xu, G. R. Kinsel, J. Zhang, M. Li, D. M. Rudkevich, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5837. Pour l'histidine : M. Falorni, G. Giacomelli, A. Porcheddu, G. Dettori, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3217.

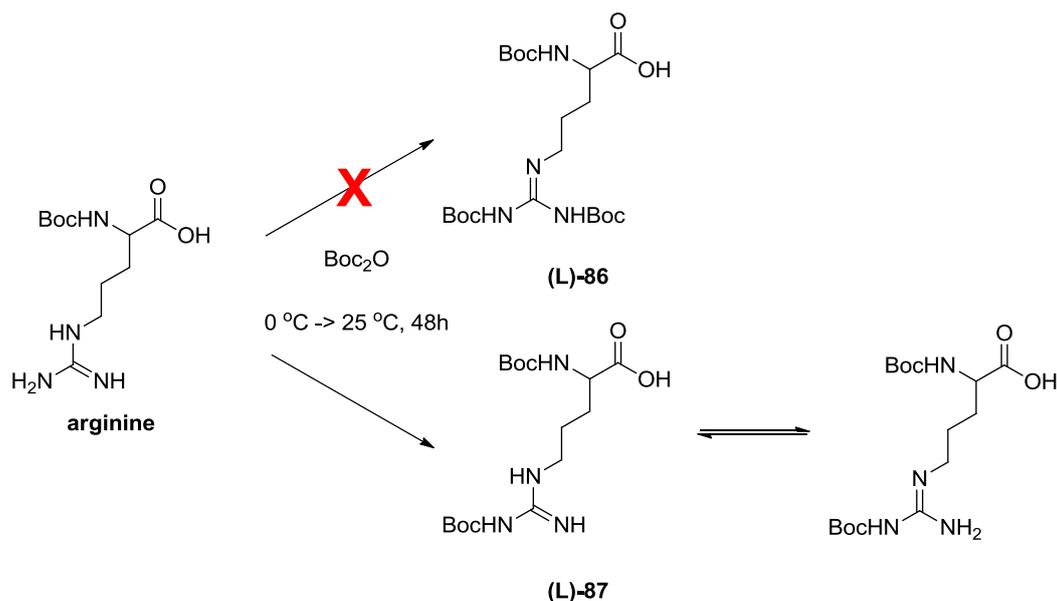


Schéma 28. Tentatives de synthèse de la $N^{\alpha}, N^{\omega}, N^{\omega'}$ -tri-L-Boc-arginine (**(L)-86**)

L'ajout d'un excès de Boc_2O dans le milieu réactionnel avec allongement de la durée de la réaction soit à partir de l'arginine non protégée, soit à partir de l'arginine protégée en α de l'acide aminé²⁵ ont conduit non pas à l'obtention du composé **(L)-86** mais à la synthèse de N^{α}, N^{ω} -di-Boc-L-arginine **(L)-87**, formation probablement attribuable à un encombrement stérique au niveau de la fonction guanidine par le premier groupement. Nous nous sommes donc résolus à utiliser de la $N^{\alpha}, N^{\omega}, N^{\omega'}$ -tri-Boc-L-arginine **(L)-86** commerciale pour les étapes ultérieures.

3.4.2. Couplage avec les INDOs : ester en tant que fonction de connexion

Les INDOs N -hydroxyalkylées **75** et **76** ont été couplées aux différents acides aminés protégés **83-86** selon la réaction d'estérification établie par Dhaon *et coll* (**Schéma 29**).²⁶

²⁵ H. Konno, K. Kubo, H. Makabe, E. Toshiro, N. Hinoda, K. Nosaka, K. Akaji, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9502.

²⁶ M. K. Dhaon, R. K. Olsen, K. Ramasamy, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 1962.

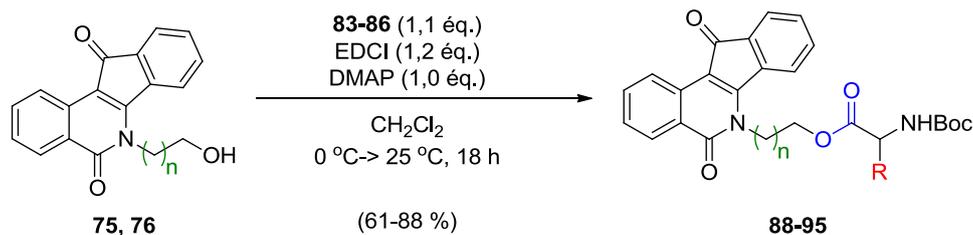


Schéma 29. Synthèse des produits 88-95

Composé	n	Acide aminé	Rendement moyen des produits purifiés
88	1	Gly	61 %
89	2	Gly	58 %
(L)-90	1	(L)-Lys	
(DL)-90	1	(DL)-Lys	62 %
(D)-90	1	(D)-Lys	
(L)-91	2	(L)-Lys	
(DL)-91	2	(DL)-Lys	52 %
(D)-91	2	(D)-Lys	
(L)-92	1	(L)-His	
(DL)-92	1	(DL)-His	75 %
(D)-92	1	(D)-His	
(L)-93	2	(L)-His	
(DL)-93	2	(DL)-His	48 %
(D)-93	2	(D)-His	
(L)-94	1	(L)-Arg	88 %
(L)-95	2	(L)-Arg	82 %

Tableau 13. Tableau récapitulatif de la synthèse des composés 88-95

Cette opération a conduit à l'obtention des composés souhaités **88-95** solubles dans des solvants chlorés après purification sur colonne de gel de silice, avec une gamme de rendement de 61 à 88 % (*Tableau 13*).

Les conditions expérimentales décrites permettent de préserver la stéréochimie du carbone asymétrique porté par l'acide aminé. Il est à noter que dans le protocole que nous avons utilisé, la DMAP a servi non seulement en tant qu'agent catalytique mais aussi en tant que base servant à capturer les protons issus de la réaction d'estérification, ce qui justifie la nécessité d'en utiliser à hauteur de un équivalent molaire.

3.4.3. Couplage avec les INDOs : amide en tant que fonction de connexion

L'association entre les INDOs aminoalkylées et les acides aminés *N*-protégés a été réalisée par un couplage peptidique classique. Parmi les nombreux agents de couplage disponibles actuellement et qui ont la faculté de limiter au maximum la racémisation du centre asymétrique des acides aminés (*L*) et (*D*),²⁷ deux types de conditions opératoires ont été adoptés dans la réalisation de notre travail :

- le couple EDCI/HOBt accompagné de TEA en tant que base (Méthode A)
- et le couple HBTU/HOBt en présence de DIPEA en tant que base. (Méthode B)

Ces réactions de couplage ont été effectuées dans des conditions opératoires classiques (*Schéma 30*).²⁸

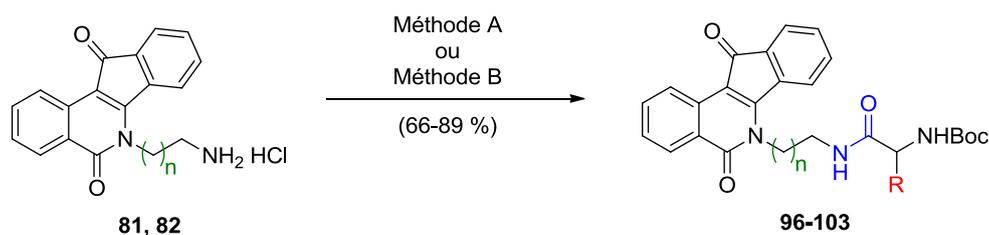


Schéma 30. Synthèse de **96-103**. Méthode A : **83-86** (2 éq.), EDCI (2 éq.), HOBt (2 éq.), TEA (4 éq), THF, 0 °C → 25 °C, 18h. Méthode B : **83-86** (1,5 éq.), HBTU (2 éq.), HOBt (2 éq.), DIPEA (4 éq.), DCM, 25 °C, 4h.

Les résultats sur cette étape sont rassemblés dans le *Tableau 14*.

²⁷ S. Y. Han, Y. A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, 60, 2447.

²⁸ Protocoles expérimentaux utilisés: (a) E. M. F. Muri, M. Gomes Jr., M. G. Albuquerque, E. F. F. da Cunha, R. B. de Alencastro, J. S. Williamson, O. A. C. Antunes, *Amino Acids* **2005**, 28, 413. (b) A. Ryckebusch, R. Deprez-Poulain, L. Maes, M. A. Debrey-Fontaine, E. Mouray, P. Grellier, C. Sergheraert, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 542

Composé	n	Acide aminé	Méthode	Rendement moyen des produits purifiés
96	1	Gly	A	67%
97	2	Gly	A	81%
(L)-98	1	(L)-Lys	A	
(DL)-98	1	(DL)-Lys	A	66%
(D)-98	1	(D)-Lys	A	
(L)-99	2	(L)-Lys	A	
(DL)-99	2	(DL)-Lys	A	59%
(D)-99	2	(D)-Lys	A	
(L)-100	1	(L)-His	A	83%
(DL)-100	1	(DL)-His	B	75%
(D)-100	1	(D)-His	B	
(L)-101	2	(L)-His	A	68%
(DL)-101	2	(DL)-His	A	
(D)-101	2	(D)-His	B	87%
(L)-102	1	(L)-Arg	A	69%
(L)-103	2	(L)-Arg	A	89%

Tableau 14. Tableau récapitulatif de la synthèse des composés 96-103

Les couplages peptidiques des acides aminés *N*-protégés **83-86** avec les INDOs aminoalkylées **81** et **82** ont donc été effectués pour donner les produits désirés **96-103** avec des rendements compris entre 66 et 89 %. Aucune différence notable, en termes de rendement, n'a pu être constatée entre la méthode A et la méthode B (*Tableau 14*).

3.4.4. Amine en tant que fonction de connexion

L'obtention de dérivés INDOs comportant un centre asymétrique sur la chaîne latérale mais intégrant cette fois une amine secondaire en tant que fonction de connexion a nécessité une autre approche que celle adoptée pour former les INDOs décrites précédemment.

Une voie alternative à notre stratégie initiale a en effet été adoptée et est rétrosynthétiquement décrite par le *Schéma 31*. Il est à noter qu'à ce stade de notre travail, hormis la (*L*)-**83**, nous nous sommes limités à la greffe d'acides aminés racémiques sur le motif INDO.

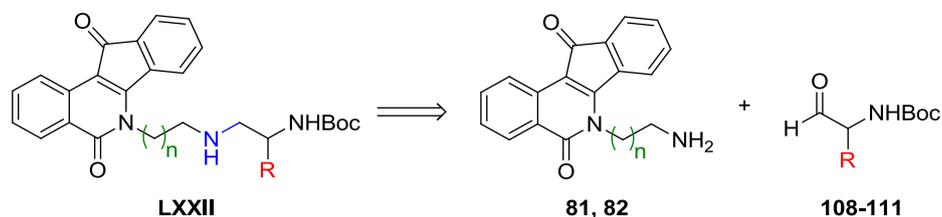


Schéma 31. Schéma rétrosynthétique de la synthèse des INDOs avec comme fonction de connexion une amine

L'approche synthétique adoptée ici permettrait d'obtenir les intermédiaires INDOs **LXXII** *via* une amination réductrice à partir des intermédiaires *N*-alkylaminés **81** et **82** et d' α -aminoaldéhydes *N*-protégés **108-111**, ces derniers étant préparés au préalable à partir des amides de Weinreb correspondants. L'étape de déprotection finale serait la même que pour les INDOs esters et amides précédemment évoqués.

- **Synthèse de des amides de Weinreb**

La première étape de la stratégie employée a donc consisté à obtenir l'amide de Weinreb de l'acide aminé *N*-protégé par un groupement de type Boc (*Schéma 32*). Cette réaction d'amidation a fourni des produits de haute pureté avec des rendements quasi-quantitatifs²⁹ (*Tableau 15*), excepté pour les dérivés histidines (*DL*)-**106** dont la synthèse n'est, à notre connaissance, pas décrite à ce jour.

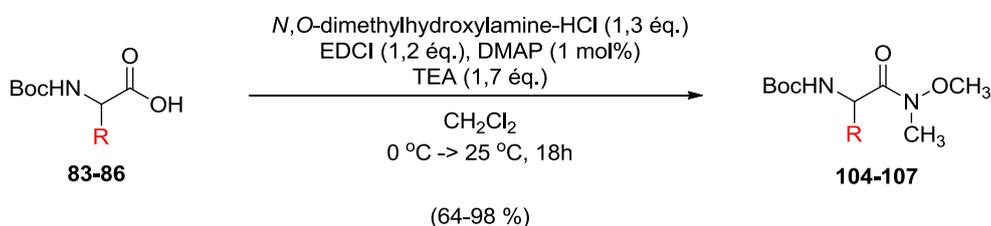


Schéma 32. Synthèse des amides de Weinreb des aminoacides *N*-protégés **104-107**

Composé	Acide aminé	Rendement moyen des produits
---------	-------------	------------------------------

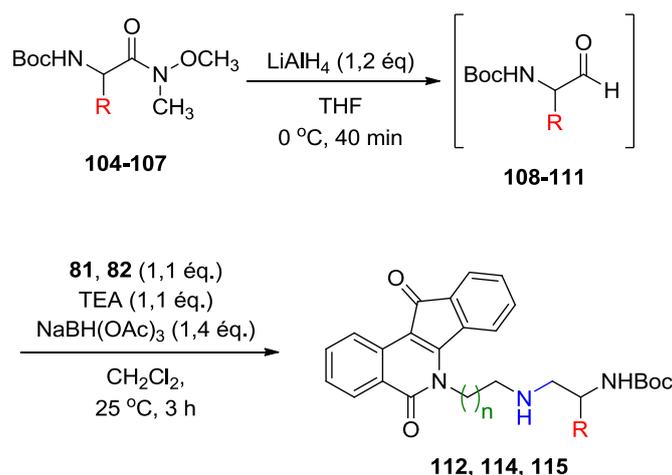
²⁹ Protocole expérimental utilisé : E. A. Englund, Q. Xu, M. A. Witschi, D. H. Appella, *J. Chem. Am. Soc.* **2006**, 128, 16456.

104	Gly	89%
(DL)-105	(DL)-Lys	91%
(DL)-106	(DL)-His	64%
(L)-107	(L)-Arg	98%

Tableau 15. Tableau récapitulatif de la synthèse des composés **104-107**

- Synthèse des α -aminoaldéhydes et élaboration des INDOs ciblées protégées

L'étape suivante a consisté en la réduction, à l'aide de LiAlH_4 , des amides de Weinreb synthétisés précédemment pour conduire à l'obtention d' α -aminoaldéhydes suivant un mécanisme décrit par *Nahm* et *Weinreb*.³⁰ Du fait de leur relative instabilité à l'air ambiant, ces aldéhydes n'ont ni été isolés ni purifiés mais directement engagés dans la réaction d'amination réductrice assistée par le triacétoxyborohydrure de sodium³¹ et impliquant les INDOs **81** et **82** (*Schéma 33*).

Schéma 33. Synthèse des dérivés INDOs **112**, **114** et **115**

Composé	n	Acide aminé	Rendement moyen des produits
112	1	Gly	37%
(DL)-114	1	(DL)-Lys	29%
(DL)-115	2	(DL)-Lys	52%

Tableau 16. Tableau récapitulatif de la synthèse des composés **112**, **114** et **115**

Malheureusement, l'expérience a montré que seules les INDOs possédant le motif glycine et lysine ont pu être obtenues par cette technique. Les raisons de l'échec de synthèse des INDOs

³⁰ S. Nahm, M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 3815.

³¹ G. W. Gribble, D. C. Ferguso, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1975**, 535.

équipées de motif histidine et arginine ne sont pas encore totalement élucidées, mais quelques pistes d'explication existent. En ce qui concerne les histidinals, à notre connaissance aucune synthèse n'a été décrite jusqu'à présent dans la littérature, ce qui pourrait témoigner de la difficulté à synthétiser un tel composé. Quant aux argininals, bien que les spectres RMN du milieu réactionnel brut aient montré la présence de l'aldéhyde, il nous a été impossible d'obtenir l'INDO correspondante par amination réductrice : beaucoup de produits secondaires ont été obtenus et les études sont en cours pour affiner cette synthèse.

Concernant l'INDO **109**, une autre voie synthétique, plus courte et plus simple, a été envisagée. Elle apparaît sur le schéma rétrosynthétique *Schéma 34*.

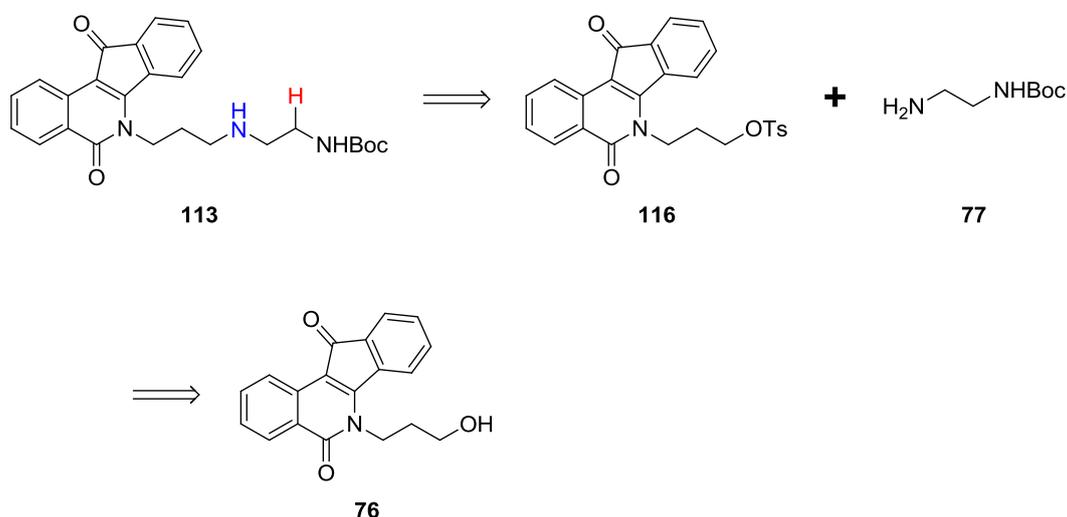
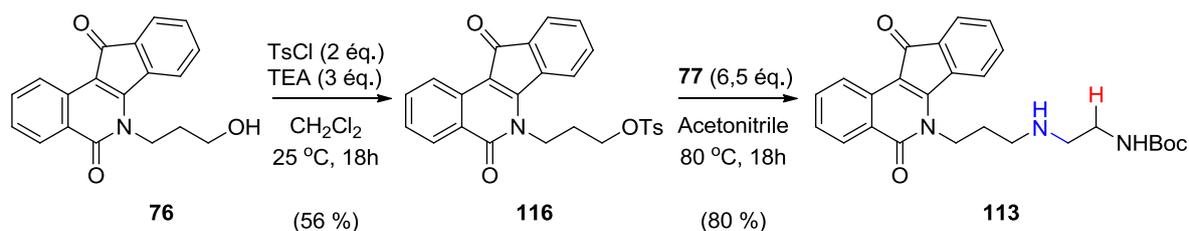


Schéma 34. Schéma rétrosynthétique de la synthèse du composé 113

L'INDO intégrant un motif glycine **113** serait cette fois issue de la réaction entre le précurseur IND0 **116** comportant un groupement tosylé à l'extrémité de la chaîne propyle lactamique et l'éthylènediamine monoprotégée **77**. L'INDO tosylée **116**, qui servirait en fait d'agent alkylant, proviendrait de la tosylation de l'INDO hydroxyalkylée **76**.

Dans cette approche synthétique, le produit **76** a été tout initialement tosylé par TsCl pour fournir le composé **116** (*Schéma 35*).

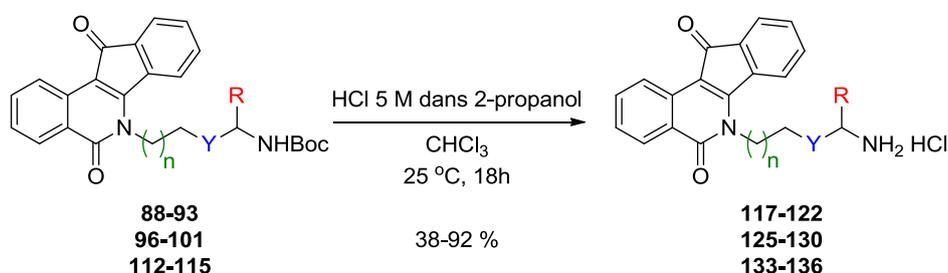
Schéma 35. Synthèse du composé **113**

Cette réaction a constitué l'étape limitante de cette stratégie de synthèse, le rendement restant relativement modeste (56 %), puisque le réactif de départ n'a pas été consommé intégralement, même après une nuit de temps de réaction.

Par la suite, une attaque nucléophile de la diamine monoprotégée **77**, qui mime la glycine N -protégée, a permis l'obtention du composé désiré **113**, la réaction de substitution nucléophile ayant été effectuée cette fois-ci avec un excellent rendement (80 %). Il est à signaler que cette méthode s'est révélée inopérante pour la formation de l'INDO **112**.

3.5. La déprotection. Obtention des INDOs ciblés

L'étape finale consiste en la déprotection du groupement Boc et la libération des amines en α de l'acide aminé et sur la chaîne latérale. Cette étape a été assurée selon le même protocole pour tous les composés, et ceci quelle que soit la nature des fonctions de connexion **Y**. Elle a été réalisée par un traitement à l'HCl dissous dans le 2-propanol de façon à provoquer une acidolyse du groupement Boc, permettant ainsi l'obtention des produits déprotégés sous forme de chlorhydrate (Schéma 36).

Schéma 36. Synthèse des composés finaux **117-122**, **125-130** et **133-136**

L'ensemble des résultats de ces réactions d'acidolyse sont rassemblés dans le **Tableau 17** (page 109). Les composés ciblés ont été obtenus avec des rendements variables.

En revanche, concernant les INDOs greffées d'un motif arginine *N*-protégée (**L**)-**102** et (**L**)-**103**, plusieurs tentatives basées sur la technique de déprotection évoquée ci-dessus se sont toutes soldées par des échecs. Il s'est avéré que l'acidolyse réalisée de cette façon ne parvenait pas à assurer le clivage total des deux groupements Boc au niveau de la guanidine. Cette difficulté, déjà évoquée dans la littérature,³² a été résolue en substituant l'acide chlorhydrique par le SnCl₄ (**Schéma 37**).

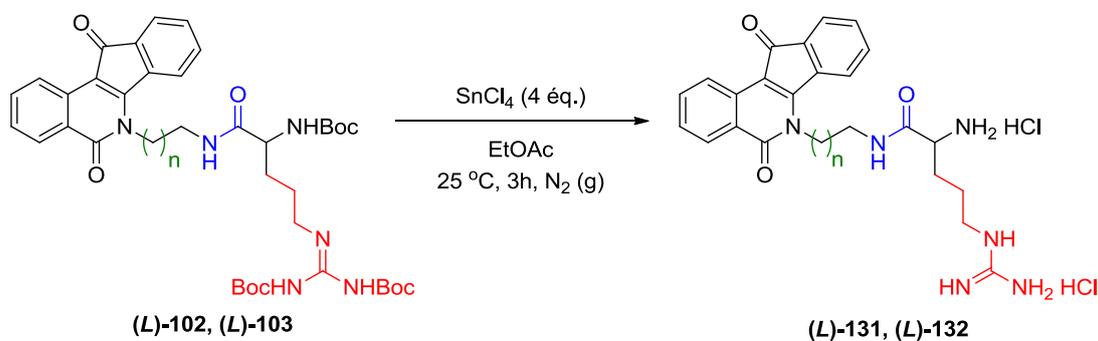


Schéma 37. Synthèse des composés (**L**)-**131** et (**L**)-**132**

Les résultats sur cette réaction sont rassemblés dans le **Tableau 17** (page 110). Mais il faut noter que la déprotection des groupements Boc des dérivés arginine (**L**)-**94** et (**L**)-**95** par cette dernière technique n'a pas permis l'obtention des INDOs équipées d'arginine (**L**)-**123** et (**L**)-**124** et connectés au motif intercalant par un groupement ester (**Schéma 38**).

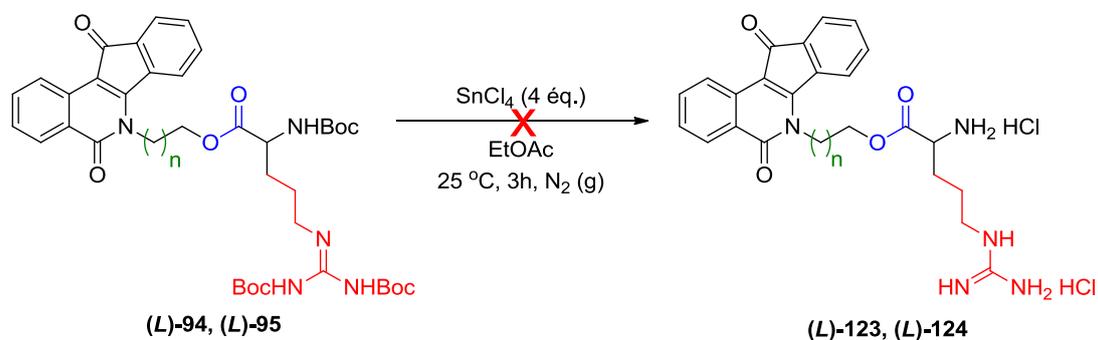


Schéma 38. Tentative de la synthèse des composés (**L**)-**123** et (**L**)-**124**

³² H. Miel, S. Rault, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7856.

En effet, les analyses par RMN ont démontré que l'usage du SnCl₄ suivie de la dilution du milieu dans le méthanol – comme le protocole expérimental l'impose – provoque la rupture de la liaison ester dans le milieu acide, fournissant alors les alcools **75** et **76**. D'autres stratégies de synthèse, radicalement différentes de celle que nous proposons s'avèrent être nécessaires pour la synthèse des dérivés arginines (**L**)-**123** et (**L**)-**124** avec comme fonction de connexion ester. Ce travail est actuellement en cours d'élaboration dans notre laboratoire.

Composé	n	Fonction de connexion	Acide aminé	Rendement acidolyse moyen
117	1	Ester	Gly	62 %
118	2	Ester	Gly	52 %
(L)- 119	1	Ester	(L)-Lys	
(DL)- 119	1	Ester	(DL)-Lys	64 %
(D)- 119	1	Ester	(D)-Lys	
(L)- 120	2	Ester	(L)-Lys	
(DL)- 120	2	Ester	(DL)-Lys	79 %
(D)- 120	2	Ester	(D)-Lys	
(L)- 121	1	Ester	(L)-His	
(DL)- 121	1	Ester	(DL)-His	77 %
(D)- 121	1	Ester	(D)-His	
(L)- 122	2	Ester	(L)-His	
(DL)- 122	2	Ester	(DL)-His	64 %
(D)- 122	2	Ester	(D)-His	
(L)- 123	1	Ester	(L)-Arg	-
(L)- 124	2	Ester	(L)-Arg	-
<hr/>				
125	1	Amide	Gly	38 %
126	2	Amide	Gly	54 %
(L)- 127	1	Amide	(L)-Lys	
(DL)- 127	1	Amide	(DL)-Lys	78 %
(D)- 127	1	Amide	(D)-Lys	
(L)- 128	2	Amide	(L)-Lys	
(DL)- 128	2	Amide	(DL)-Lys	66 %
(D)- 128	2	Amide	(D)-Lys	
(L)- 129	1	Amide	(L)-His	
(DL)- 129	1	Amide	(DL)-His	55 %
(D)- 129	1	Amide	(D)-His	
(L)- 130	2	Amide	(L)-His	
(DL)- 130	2	Amide	(DL)-His	76 %
(D)- 130	2	Amide	(D)-His	

(L)-131	1	Amide	(L)-Arg	40 %
(L)-132	2	Amide	(L)-Arg	15 %
133	1	Amine	Gly	68 %
134	2	Amine	Gly	92 %
(DL)-135	1	Amine	(DL)-Lys	57 %
(DL)-136	2	Amine	(DL)-Lys	55 %

Tableau 17. Tableau récapitulatif de la synthèse des composés finaux 117-136.

3.6. Bilan des synthèses des molécules de la série II

Grâce à notre stratégie de synthèse, un ensemble de 36 nouveaux dérivés INDOs ont pu être synthétisés (*Schéma 39*).

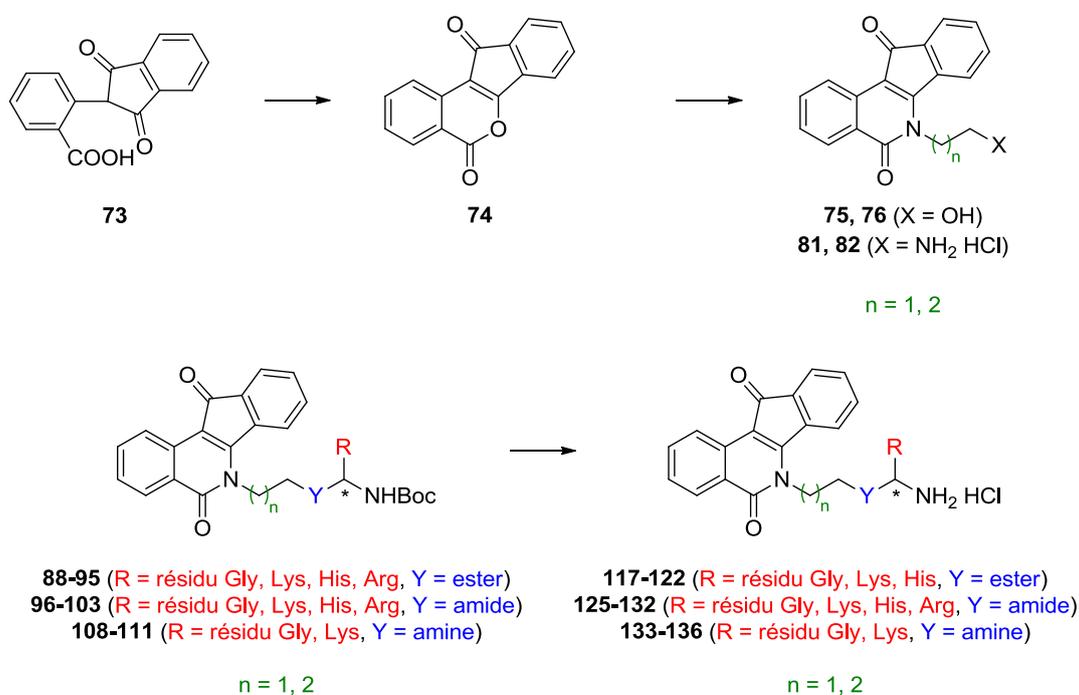


Schéma 39. Schéma des molécules 113-118, 121-132

Si l'on s'en tient à un bilan quantitatif, le rendement global pour les composés de la série II, de l'ordre de 15 à 30 % en cinq ou six étapes, apparaît moyen. Comme l'on pouvait s'y attendre, les dérivés amines sont élaborés avec des rendements globaux moins bons, parfois même en-dessous de 10 %.

Néanmoins, nous avons pu établir que notre stratégie de synthèse permettait l'accès à presque toutes les INDOs souhaitées en quantité suffisante pour effectuer des tests pharmacologiques.

S'ils ont été difficiles à obtenir, nos composés ont tous présenté une excellente solubilité en milieu aqueux, propriété qui constitue incontestablement un atout majeur dans le cadre de l'évaluation du potentiel pharmacologique de ces composés.

4. Conclusion générale du chapitre

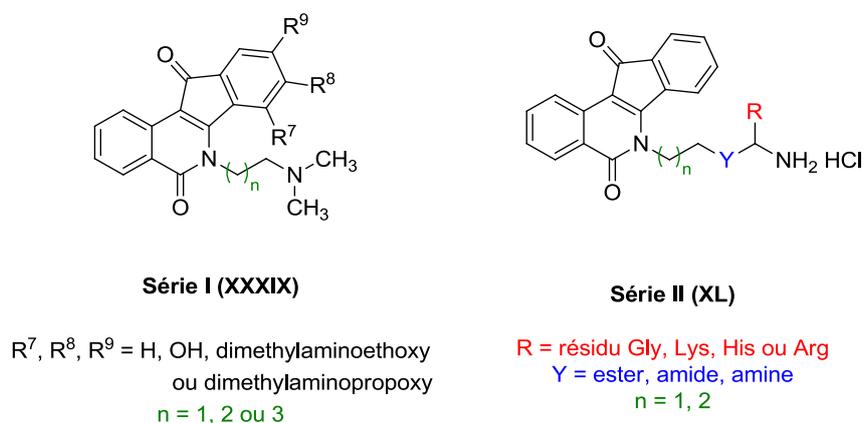


Figure 39. Molécules ciblées

La synthèse des composés de la série I et II nous a permis d'obtenir 50 composés finaux présentant tous une excellente solubilité en milieu aqueux. Ces molécules ont été soumises aux différents tests biologiques et ce travail fait l'objet du chapitre suivant.

Même si la stratégie mise en œuvre a conduit à l'obtention de la plupart des composés souhaités, certaines molécules, dont nous avons planifiée la synthèse, n'ont pu être obtenues du fait de plusieurs contraintes d'ordre synthétique. D'autres voies de synthèse sont actuellement en cours de développement pour pouvoir accéder aux quelques molécules qui manquent à notre panel. Il est à noter que l'insolubilité de certains composés intermédiaires et finaux dans la plupart des solvants organiques ont rendu les tâches difficiles, notamment pour ce qui concerne leur purification.

Une compréhension plus exacte des mécanismes semble être un préalable à l'amélioration du rendement global pour la séquence conduisant aux composés de série I. En effet, le mécanisme de la formation de l'isoquinolone, sans doute l'étape clé de toute la synthèse,

n'est pas encore tout à fait élucidé. Toutefois, à l'heure actuelle, nous ne pensons pas qu'il existe d'autres voies synthétiques disponibles dans la littérature permettant à l'accès de nos dérivés INDOs avec des rendements permettant les tests pharmacologiques. Des études sont actuellement en cours pour optimiser le rendement global de la réaction.

La stratégie élaborée pour la synthèse des composés de série II a permis l'obtention d'un grand nombre d'INDOs fonctionnalisées à l'extrémité du bras espaceur, même si quelques composés n'ont pu être obtenus et que le rendement global est plutôt moyen. Cette méthode pourrait néanmoins être appliquée avec succès à l'élaboration d'autres dérivés comportant un motif polyamine, avec comme modèle-clé initial, l'indénopyrane **74** en tant que réactif de départ.

Références bibliographiques et notes relatives au Chapitre III

1. M. Cushman, L. Cheng, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3781.
2. A. Morrell, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7740.
3. X. Xiao, M. Cushman, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6496.
4. S. Wawzonek, J. K. Stowell, R. E. Karll, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1004.
5. M. Pailer, H. Wörther, A. Meller, *Monatsh. Chem.* **1961**, *92*, 1037.
6. Pour exemples: (a) M. Nagarajan, A. Morrell, B. C. Fort, M. R. Meckley, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5651. (b) M. Nagarajan, A. Morrell, S. Antony, G. Kohlhagen, K. Agama, Y. Pommier, P. A. Ragazzon, N. C. Garbett, J. B. Chaires, M. Hollingshead, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5129.
7. (a) J. Michalsky, J. Hrbata, J. Krepelka, M. Melka, M. Miko, M. Hruby, M. Ferenc, E. Skacelova, I. Kejhova, R. Reichlova, A. Kargerova, J. Sediva, A. Kolonicny, J. Urbanec, US Patent 5 597 831, **1997**. (b) J. Hrbata, J. Krepelka, M. Melka, M. Miko, M. Hruby, M. Ferenc, E. Skacelova, I. Kejhova, R. Reichlova, A. Kargerova, J. Sediva, A. Kolonicny, J. Urbanec, J. Michalsky, European Patent 0 643 699, **1996**.
8. S. Wawzonek, J. K. Stowell, *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 896.
9. A. Morrell, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1846.
10. W. J. Cho, Q. M. Le, H. T. M. Van, K. Y. Lee, B. Y. Kang, E. S. Lee, S. K. Lee, Y. Kwon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3531.
11. (a) W. J. Cho, I. J. Kim, S. J. Park, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2000**, *21*, 1035. (b) T. N. Le, S. G. Gang, W. J. Cho, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2763. (c) T. N. Le, H. T. M. Van, S. H. Lee, H. J. Choi, K. Y. Lee, B. Y. Kang, W. J. Cho, *Arch. Pharm. Res.* **2008**, *31*, 6.
12. G. S. Poindexter, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3787.
13. T. N. Le, S. G. Gang, W. J. Cho, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2768.
14. M. Cushman, J. Gentry, F. W. Dekow, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1111.

15. M. Cushman, P. Mohan, *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 1031.
16. J. Kaneti, S. M. Bakalova, I. G. Pojarlieff, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6824.
17. M. Cushman, E. J. Madaj, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 907.
18. M. González-López, J. T. Shaw, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 164.
19. A. Ryckebusch, D. Garcin, A. Lansiaux, J. F. Goossens, B. Baldeyrou; R. Houssin, C. Bailly, J. P. Hénichart, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 3617.
20. A. Morrell, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3659.
21. S. L. Shapiro, K. Geiger, J. Youlus, L. Freedman, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 3580.
22. D. Strumberg, Y. Pommier, K. Paull, M. Jayaraman, P. Nagafuji, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 446.
23. Protocoles expérimentaux utilisés : (a) W. S. Saari, J. E. Schwering, P. A. Lyle, S. J. Smith, E. L. Engelhardt, *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 97. (b) C. Dardonville, C. Fernandez-Fernandez, S. L. Gibbons, G. J. Ryan, N. Jagerovic, A. M. Gabilondo, J. J. Meanab, L. F. Calladob, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 6570.
24. Protocoles expérimentaux utilisés, pour la glycine : J. I. Venäläinen, E. A. A. Wallén, A. Poso, J. A. Garca-Horsman, P. T. Männistö, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 7093. Pour la lysine : H. Xu, G. R. Kinsel, J. Zhang, M. Li, D. M. Rudkevich, *Tetrahedron* **2003**, 59, 5837. Pour l'histidine : M. Falorni, G. Giacomelli, A. Porcheddu, G. Dettori, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3217.
25. H. Konno, K. Kubo, H. Makabe, E. Toshiro, N. Hinoda, K. Nosaka, K. Akaji, *Tetrahedron* **2007**, 63, 9502.
26. M. K. Dhaon, R. K. Olsen, K. Ramasamy, *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 1962.
27. S. Y. Han, Y. A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, 60, 2447.
28. Protocoles expérimentaux utilisés: (a) E. M. F. Muri, M. Gomes Jr., M. G. Albuquerque, E. F. F. da Cunha, R. B. de Alencastro, J. S. Williamson, O. A. C. Antunes, *Amino Acids* **2005**, 28, 413. (b) A. Ryckebusch, R. Deprez-Poulain, L. Maes, M. A. Debreu-Fontaine, E. Mouray, P. Grellier, C. Sergheraert, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 542
29. Protocole expérimental utilisé : E. A. Englund, Q. Xu, M. A. Witschi, D. H. Appella, *J. Chem. Am. Soc.* **2006**, 128, 16456.
30. S. Nahm, M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 3815.
31. G. W. Gribble, D. C. Ferguso, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1975**, 535.
32. H. Miel, S. Rault, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7856.

Chapitre IV. Evaluations biologiques

1. Introduction

Dans ce dernier chapitre seront abordés les résultats des analyses pharmacologiques *in vitro* réalisées sur les composés finaux des deux séries. Ces différentes analyses ont été conduites au sein de deux laboratoires, que nous tenons à remercier pour tout le travail effectué :

- l'équipe du Dr. Amélie Lansiaux, comprenant, entre autres, Mme Brigitte Baldeyrou, de l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille.
- l'équipe du Pr. Jean-François Goossens, en particulier le Dr. Nadège Schifano-Faux, de l'EA 4481 – Groupe de Recherche Interdisciplinaire « Innovation et Optimisation » Thérapeutique de l'Université Lille 2.

Les tests biologiques effectués sur nos composés cibles ont concerné les objectifs suivants :

- **Etude du potentiel de liaison à l'ADN**, *via* des mesures de températures de dénaturation thermique et de constantes apparentes d'affinité obtenues à partir d'expériences en UV/visible et en fluorescence,
- **Etude du mode de liaison à l'ADN** par des mesures du dichroïsme circulaire (série I uniquement),
- **Etude de l'inhibition de la topoisomérase I et II humaine** par l'exploitation de l'électrophorèse en gel d'agarose,
- **Etude du potentiel cytotoxique** par la détermination des concentrations inhibitrices à 50 % (IC₅₀)

En ce qui concerne les molécules de la série I, les molécules **XXXVIII (AL85)**, **LXXIII (AL93)**, **LXXIV (AL52)** et **LXXV (AL68)** provenant des travaux de Ryckebusch et *coll.*¹ ont été incluses dans les évaluations biologiques, afin de définir les relations structure-activité les plus complètes possibles sur l'aromatique D. Par ailleurs, deux molécules **LXXVI (POM02)** et **LXXVII (POM03)**, ont été également introduites dans certains tests biologiques (*Figure 40*).

¹ A. Ryckebusch, D. Garcin, A. Lansiaux, J. F. Goossens, B. Baldeyrou; R. Houssin, C. Bailly, J. P. Hénichart, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3617.

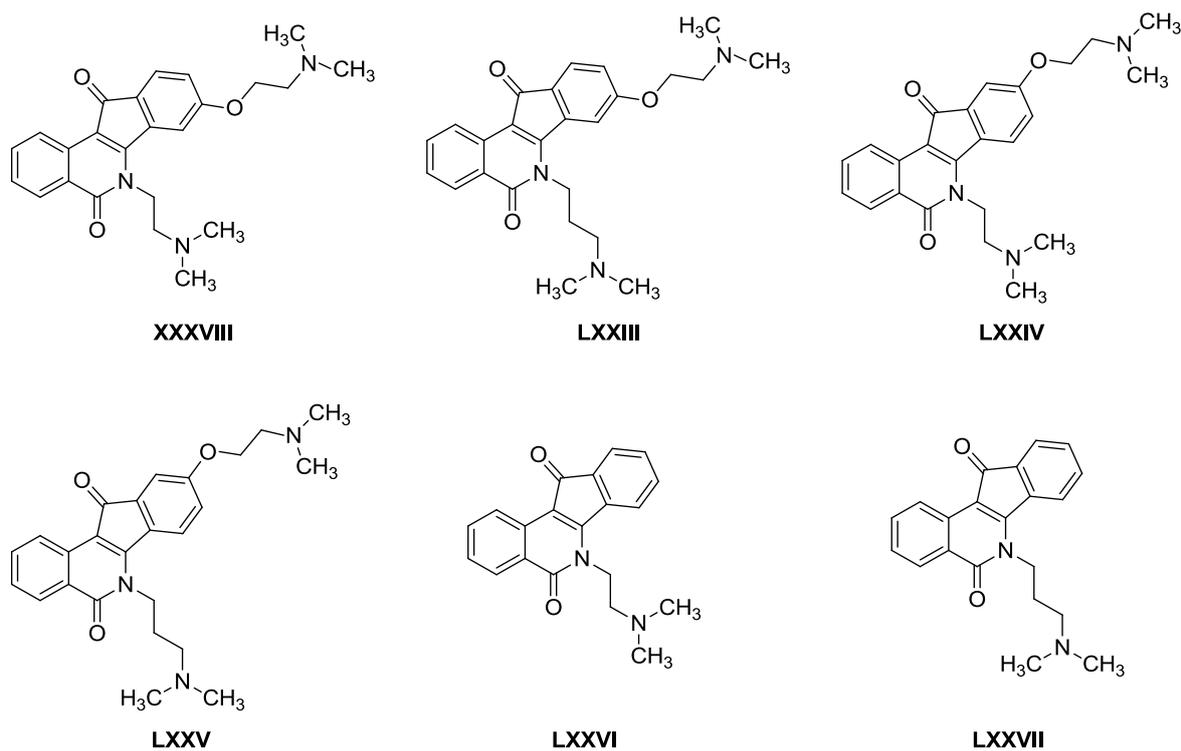


Figure 40. Molécules supplémentaires évaluées lors des tests biologiques : **XXXVIII** (AL85), **LXXIII** (AL93), **LXXIV** (AL52), **LXXV** (AL68), **LXXVI** (POM02) et **LXXVII** (POM03)

2. Etude du potentiel de liaison à l'ADN

2.1. Mesure de T_m par UV-visible

L'ADN possède une température dite de dénaturation (T_m) pour laquelle 50 % des liaisons hydrogène liant les paires de bases de la double hélice se trouvent rompues (**Figure 41**).

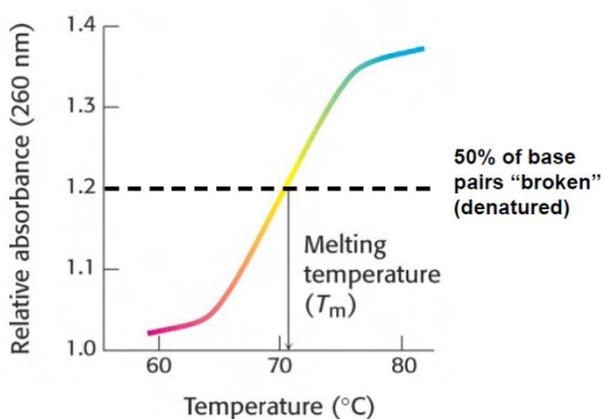


Figure 41. Courbe de température de dénaturation

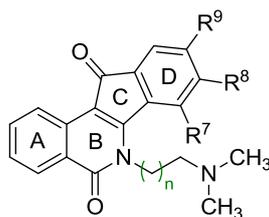
En pratique, cette température de dénaturation est déterminée grâce à la mesure de variation d'absorbance à 260 nm. On utilise la propriété de la molécule dont le coefficient d'absorption molaire ϵ varie selon le pourcentage d'ouverture des deux brins de l'ADN. Le passage de la forme double hélice vers la forme linéaire est relié à une augmentation de la valeur de ϵ (effet hyperchromique).

Ce T_m est utilisé non seulement pour estimer le pourcentage de G-C (coefficient de Chargaff) dans un échantillon d'ADN, mais aussi pour déterminer l'affinité d'une molécule vis-à-vis de celui-ci ainsi que la capacité de stabilisation de la double hélice. Mais il peut être aussi utilisé pour qualifier une probable interaction vis-à-vis de celui-ci. En effet, lorsqu'un ligand forme un complexe avec la double hélice, la température de dénaturation est supérieure à celle de l'ADN mesurée en absence de ligand, ce qui caractérise la stabilisation de la double hélice. Par conséquent, en mesurant pour un composé donné la différence de température de dénaturation ΔT_m , égale à la différence entre le T_m du complexe ADN-ligand et le T_m de l'ADN seul, on définit une interaction avec la double hélice. Plus l'interaction du composé pour l'ADN est importante, plus la différence de température est élevée.

Dans le cadre de notre étude, nous avons disposé de deux types d'ADN : le CTDNA provenant du thymus de veau, caractérisé par 42 % de paires de bases G-C (guanine-cytidine), de température de dénaturation thermique égale à 65.5 °C et le poly(dAT)₂, oligonucléotide composé uniquement de paires de bases adénine (A) et thymidine (T) de T_m égal à 39.7 °C. Pour certaines molécules, seules quelques les mesures de ΔT_m sur du poly(dAT)₂ ont été effectuées, du fait des valeurs ΔT_m trop élevées.

2.1.1. Mesures de ΔT_m sur les molécules de série I

Les résultats pour les molécules de série I (*Figure 42*) sont présentées dans le *Tableau 18*.



Série I (XXXIX)

R⁷, R⁸, R⁹ = H, OH, dimethylaminoethoxy
ou dimethylaminopropoxy
n = 1, 2 ou 3

Figure 42. Structure des molécules de série I

Composé	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹	ΔT_m poly(dAT) ₂	ΔT_m CTDNA
55	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	H	30.5	-
56	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	H	42.7	-
57	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	H	44.7	-
58	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	H	41.3	-
AL85	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	-	15
AL93	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	-	17
59	(CH ₂) ₄ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	33.9	-
60	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	31.4	-
61	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	40.6	-
62	(CH ₂) ₄ -N(CH ₃) ₂	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	37.1	-
AL52	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	H	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	-	17
AL68	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	H	O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	-	24
63	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	36	-
64	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	H	O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	46.9	-
70	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	OH	H	H	17.1	-
71	(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	H	OH	H	7.7	-
72	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	H	OH	H	16.6	-

Tableau 18. Tableau récapitulatif des ΔT_m des composés 55-64, 70-72. ΔT_m en °C. Ratio ligand/ADN R = 0.25.

Une première observation du tableau ci-dessus fait ressortir que les composés dotés de deux chaînes latérales aminées 55-64 possèdent des températures de fusion supérieures aux composés 70-72 monoaminés. Ceci est un phénomène tout à fait attendu dans la mesure où, en milieu physiologique, la présence de deux centres cationiques signifie l'existence de deux sites d'interaction avec le groupement phosphate de l'ADN.

- **Influence de la position des substituants sur l'aromatique D**

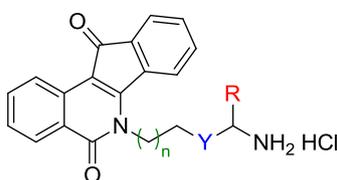
Si on observe l'influence de la position des substituants sur l'aromatique D, on constate, en comparant notamment les composés **57**, **60** et **63**, que les INDOs substituées en position C8 possèdent les ΔT_m sur poly(dAT)₂ les plus faibles. Cette tendance est également observable, à moindre degré, pour les composés **58**, **61** et **64**. Ceci serait une indication sur la position C8 (R⁸) qui serait la moins favorable parmi les trois positions C7 (R⁷), C8 (R⁸) et C9 (R⁹) dans le potentiel d'interaction avec l'ADN. Les tests, notamment sur l'**AL85** et l'**AL93** avec l'ADN poly(dAT)₂ sont en cours pour savoir si cette tendance est confirmée pour toutes les molécules.

- **Influence d'addition d'un groupement CH₂**

D'après le **Tableau 18**, nous pouvons voir que l'incrémentation d'un groupement CH₂ sur l'une des deux chaînes latérales conduit, à quelques exceptions près, à une augmentation du potentiel d'interaction avec l'ADN. L'amplitude des variations des ΔT_m est variable et aucune tendance générale ne semble pouvoir être dégagée à l'heure actuelle. Des tests supplémentaires sont en cours.

2.1.2. Mesures de ΔT_m sur les molécules de série II

Les résultats pour les molécules de série II (**Figure 43**) sont reportés sur le **Tableau 19**.



Série II (XL)

R = résidu Gly, Lys, His, Arg
 Y = ester, amide, amine
 n = 1, 2

Figure 43. Structure des molécules de série II

Composé	n	Fonction de connexion	Acide aminé	ΔT_m (°C) CTDNA
117	1	Ester	Gly	3
118	2	Ester	Gly	5.5
(L)-119	1	Ester	(L)-Lys	9.1
(DL)-119	1	Ester	(DL)-Lys	9
(D)-119	1	Ester	(D)-Lys	10.4
(L)-120	2	Ester	(L)-Lys	15.2
(DL)-120	2	Ester	(DL)-Lys	12.6
(D)-120	2	Ester	(D)-Lys	15.2
(L)-121	1	Ester	(L)-His	3.0
(DL)-121	1	Ester	(DL)-His	2.1
(D)-121	1	Ester	(D)-His	2.2
(L)-122	2	Ester	(L)-His	2.3
(DL)-122	2	Ester	(DL)-His	3.5
(D)-122	2	Ester	(D)-His	4.7
125	1	Amide	Gly	5
126	2	Amide	Gly	9.8
(L)-127	1	Amide	(L)-Lys	13.2
(DL)-127	1	Amide	(DL)-Lys	13.1
(D)-127	1	Amide	(D)-Lys	12.6
(L)-128	2	Amide	(L)-Lys	23.8
(DL)-128	2	Amide	(DL)-Lys	20.9
(D)-128	2	Amide	(D)-Lys	18.4
(L)-129	1	Amide	(L)-His	3.4
(DL)-129	1	Amide	(DL)-His	4.5
(D)-129	1	Amide	(D)-His	7.3
(L)-130	2	Amide	(L)-His	7.9
(DL)-130	2	Amide	(DL)-His	4.9
(D)-130	2	Amide	(D)-His	5.5
(L)-131	1	Amide	(L)-Arg	13.6
(L)-132	2	Amide	(L)-Arg	21.0
133	1	Amine	Gly	11.4
134	2	Amine	Gly	14.9
(DL)-135	1	Amine	(DL)-Lys	23.8
(DL)-136	2	Amine	(DL)-Lys	26.7

Tableau 19. Tableau récapitulatif des ΔT_m des composés **117-122**, **125-136**. Ratio ligand/ADN $R = 0.25$.

- **Influence de la nature de la fonction de connexion**

Les dérivés INDOs **133-136** équipés d'amine secondaire en tant que fonction de connexion affichent des ΔT_m qui sont 1,3 à 2,3 fois supérieurs à ceux des analogues **125**, **126**, **(DL)-127** et **(DL)-128** munis d'une fonction amide, tandis que les INDOs dotées d'une fonction amide en tant que fonction de connexion possèdent quant à elles des ΔT_m 1,5 à 1,8 fois supérieurs aux analogues munies d'une fonction ester (**125** vs **117** ; **126** vs **118**, **(DL)-127** vs **(DL)-119** et **(DL)-128** vs **(DL)-120**). Des augmentations de ΔT_m ont été également constatées lorsque, pour les INDOs **121** et **122**, équipées d'un motif histidine, la fonction ester a été substituée par la fonction amide (cas des composés **129** et **130**).

Ainsi, la nature de la fonction de connexion joue clairement un rôle concernant l'affinité de nos produits à l'ADN. Nous pensons que les INDOs **133-136** équipées d'une amine sont plus favorisées dans l'interaction ADN-ligand, en raison de leur caractère basique en milieu physiologique, peut-être par une interaction de type π -cation avec les bases nucléiques.

- **Influence de la nature du motif acide aminé**

Lorsque l'on regarde le groupe des INDOs équipées du motif amide, on constate que les ΔT_m **(L)-131** et **(L)-132** comportant le motif *(L)*-arginine sont plus ou moins égaux à ceux affichés par les INDOs **(L)-127** et **(L)-128** équipées quant à eux de *(L)*-lysine. Ces derniers composés présentent des valeurs de ΔT_m 2,1 fois et 2,7 fois supérieures aux INDOs **125** et **126** comportant un motif glycine. Les dérivés *(L)*-histidine **(L)-129** et **(L)-130** sont les composés les moins affins, avec des ΔT_m 1,2 à 1,5 fois inférieurs à ceux des INDOs munies de glycine. Cet ordre décroissant en terme d'affinité : lysine \approx arginine > glycine \geq histidine se retrouve également dans la série ester, indiquant que les dérivés histidine sont les moins favorables à une interaction avec l'ADN. Deux hypothèses peuvent être émises. Premièrement, la faible acidité de l'imidazole du fait du phénomène de résonance engendrerait de moins bonnes interactions avec les charges négatives du groupement phosphate. La deuxième hypothèse serait que si le motif imidazole interagissait avec les groupes de bases nucléiques *via* les interactions de type π -cation, celles-ci ne seraient pas aussi favorables que les interactions avec le groupement phosphate dans la protection du duplex contre la dénaturation thermique.

- **Influence de la longueur de la chaîne latérale**

Tout comme cela a été le cas pour les composés de la série I, l'incrémentation d'un groupement CH₂ sur la chaîne latérale se traduit par une augmentation de l'affinité de nos composés vis-à-vis de l'ADN. Les amplitudes varient cependant selon la nature de la fonction de connexion et du motif acide aminé. Ainsi, nous constatons une augmentation d'un facteur 1,6 pour les composés *(DL)*-119 et *(DL)*-120 tandis que cette augmentation n'est « que » d'un facteur 1,1 pour leurs homologues en série amide *(L)*-135 et *(L)*-136. Concernant les composés *(DL)*-129 et *(DL)*-130 avec un motif histidine, les variations de ΔT_m sont très minimes.

- **Influence de la stéréochimie du carbone asymétrique**

Même si de « légères » variations existent entre les différents isomères dans le groupe de motifs lysine et histidine, aucun lien ne semble exister entre la stéréochimie du centre asymétrique du carbone de l'acide aminé et l'affinité de la molécule à l'ADN.

2.2. Mesures des constantes d'affinité K_{app} par fluorimétrie

2.2.1. Eléments théoriques

En complément des évaluations des températures de fusion de l'ADN, des mesures de fluorescence ont été effectuées. Il s'agit ici de quantifier l'affinité à l'ADN de nos composés *via* la constante de liaison apparente K_{app} , déterminée par une méthode appelée déplacement compétitif du bromure d'éthidium (*competitive ethidium displacement*).²

Cette technique exploite une propriété du bromure d'éthidium (BET) dont le rendement quantique de fluorescence, c'est-à-dire le rapport entre le nombre de molécules fluorescentes et le nombre total de molécules excitées, varie selon le milieu dans lequel se trouve cette molécule. En effet, ce rendement est faible lorsque le BET est « libre », plus précisément lorsque ce composé est en présence d'O₂ dissous dans le milieu. Lorsque la molécule de BET

² A. R. Morgan, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, N. L. Murray, D. H. Evans, *Nucleic Acids Res.* **1979**, 7, 547.

s'intercale dans l'ADN, l'environnement hydrophobique généré par l'ADN conduit à une augmentation considérable (environ 25 fois) du rendement quantique.² L'ajout au complexe ADN-BET des ligands à l'ADN conduit à une diminution de la fluorescence du milieu étudié car la BET est « chassée » du duplex par les ligands. Il est à noter que ce test n'est valable que si les ligands étudiés sont caractérisés par une faible émission de fluorescence aux longueurs d'onde d'excitation du BET.³

Les valeurs d'IC₅₀, représentant un déplacement de 50 % du BET initialement lié à l'ADN par les ligands, sont obtenues *via* cette méthode. Ces valeurs sont proportionnelles aux constantes d'affinités à l'ADN.² En effet, la relation mathématique entre l'IC₅₀ et le K_{app} est la suivante :

$$K_{app} = \left(\frac{1.26}{IC_{50}} \right) K_{BET}$$

avec $K_{BET} = 10^7 \text{ M}^{-1}$, 1,26 représentant le ratio [BET]/[ADN]. Ainsi, l'affinité à l'ADN de nos ligands peut être quantifiée : plus les valeurs de K_{app} sont grandes, meilleures sont les affinités des ligands vis-à-vis de l'ADN.

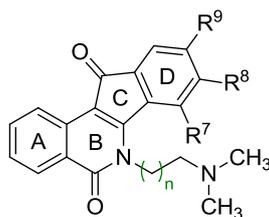
Concernant nos molécules, les mesures des K_{app} ont été réalisées suivant le protocole décrit par Pavlov *et coll.*,⁴ avec la molécule de BET présente en excès par rapport à l'ADN (ratio [BET]/[ADN] = 1.26). Ces tests ont été effectués sur du CT DNA caractérisé par 42 % de paires de bases G-C.

2.2.2. Résultats de K_{app} pour les molécules de la série I

Les résultats des constantes apparentes d'affinités K_{app} pour les molécules de série I (**Figure 44**) sont affichés sur le **Tableau 20**.

³ T. C. Jenkins, *Methods Mol. Biol.* **1998**, 90, 195.

⁴ V. Pavlov, P. K. T. Lin, V. Rodilla, *Chem. Biol. Interact.* **2001**, 137, 15.



Série I (XXXIX)

$R^7, R^8, R^9 = H, OH, \text{diméthylaminoéthoxy}$
 ou $\text{diméthylaminopropoxy}$
 $n = 1, 2 \text{ ou } 3$

Figure 44. Structure des molécules de série I

Composé	R^6	R^7	R^8	R^9	K_{app} (10^6 M^{-1})
55	$(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	$\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	H	55.79
56	$(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	$\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	H	52.67
57	$(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	$\text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	H	130.28
58	$(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	$\text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	H	107.67
AL85	$(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	$\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	-
AL93	$(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	$\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	-
59	$(\text{CH}_2)_4\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	$\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	25.69
60	$(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	$\text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	28.71
61	$(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	$\text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	33.38
62	$(\text{CH}_2)_4\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	$\text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	41.63
AL52	$(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	H	$\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	-
AL68	$(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	H	$\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	-
63	$(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	H	$\text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	71.99
64	$(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	H	$\text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	89.31
70	$(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	OH	H	H	-
71	$(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	OH	H	-
72	$(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	H	OH	H	-

Tableau 20. Tableau récapitulatif des K_{app} des composés 55-64, 70-72. Les valeurs d'écart type sur les K_{app} n'ont pas été incluses dans ce tableau car ces valeurs résultent d'une moyenne des deux ou trois mesures.

Concernant les composés 70-72, les valeurs de K_{app} n'ont pu être déterminées à cause de leur solubilité extrêmement faible dans les conditions opératoires mises en œuvre.

- **Influence de la position des substituants sur l'aromatique D**

Lorsque l'on compare les K_{app} des composés **57**, **58**, **60**, **61**, **63** et **64**, nous pouvons constater que la valeur du K_{app} du produit **57** est 1,8 fois supérieure à celle de l'INDO **63**, elle-même 2,5 fois plus grande que celle de l'INDO **60**. La molécule **58**, quant à elle, présente un K_{app} 1,2 fois supérieur à celui du composé **64**, lui-même 2,7 fois plus important que celui du produit **61**. Il apparaît donc, même si les valeurs de K_{app} pour toutes les molécules n'ont pu être déterminées, que la tendance générale serait que les molécules substituées en position C7 (R^7) possèdent les meilleures affinités vis-à-vis de l'ADN, tandis que les INDOs substitués en position C8 (R^8) seraient les produits les moins affins à l'ADN de cette série.

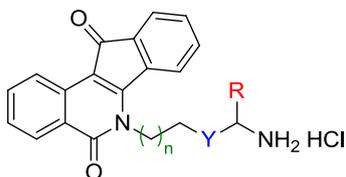
- **Incrémentation d'addition d'un groupement CH_2**

Observons l'influence de l'addition d'un groupement CH_2 sur l'une des deux chaînes aminoalkyles. Cette modification structurale sur la chaîne de l'azote lactamique N6 n'a quasiment pas d'influence sur les valeurs de K_{app} (**55** vs **56**, **57** vs **58**, **60** vs **61** et **62**).

Par contre, concernant les INDOs substituées en position C7, l'addition d'un groupement CH_2 sur la chaîne de l'aromatique D s'accompagne de variations significatives des valeurs de K_{app} . Ainsi, le « passage » du composé **55** au composé **57** s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 2,3 de K_{app} . Concernant les molécules **56** et **58**, l'incrémentaire d'un groupement CH_2 résulte en une augmentation d'un facteur 2 de la valeur de K_{app} . De même, le K_{app} du produit **62** substitué en position C8 est 1,6 fois supérieur à celui de son homologue **59**. Des tests sont actuellement en cours pour déterminer si cette tendance s'observe également pour les INDOs substituées en position C8 et en C9.

2.2.3. Mesures de K_{app} pour les molécules de la série II

Les constantes K_{app} des molécules de la série II (**Figure 45**) ont été mesurées de la même manière que pour les molécules de la série I. Ces valeurs sont répertoriées dans le **Tableau 21**.



Série II (XL)

R = résidu Gly, Lys, His ou Arg

Y = ester, amide, amine

n = 1, 2

Figure 45. Structure des molécules de série II

Composé	n	Fonction de connexion	Acide aminé	K_{app} ($10^6 M^{-1}$)
117	1	Ester	Gly	0.68 ± 0.05
118	2	Ester	Gly	0.66 ± 0.04
(L)-119	1	Ester	(L)-Lys	0.89 ± 0.07
(DL)-119	1	Ester	(DL)-Lys	0.87 ± 0.06
(D)-119	1	Ester	(D)-Lys	0.90 ± 0.09
(L)-120	2	Ester	(L)-Lys	8.36 ± 0.49
(DL)-120	2	Ester	(DL)-Lys	8.09 ± 0.39
(D)-120	2	Ester	(D)-Lys	8.27 ± 0.52
(L)-121	1	Ester	(L)-His	0.58 ± 0.07
(DL)-121	1	Ester	(DL)-His	0.25 ± 0.03
(D)-121	1	Ester	(D)-His	0.22 ± 0.03
(L)-122	2	Ester	(L)-His	0.60 ± 0.09
(DL)-122	2	Ester	(DL)-His	0.69 ± 0.07
(D)-122	2	Ester	(D)-His	0.72 ± 0.06
125	1	Amide	Gly	0.71 ± 0.05
126	2	Amide	Gly	0.95 ± 0.08
(L)-127	1	Amide	(L)-Lys	5.86 ± 0.18
(DL)-127	1	Amide	(DL)-Lys	6.03 ± 0.29
(D)-127	1	Amide	(D)-Lys	5.98 ± 0.22
(L)-128	2	Amide	(L)-Lys	10.24 ± 0.32
(DL)-128	2	Amide	(DL)-Lys	10.59 ± 0.41
(D)-128	2	Amide	(D)-Lys	11.09 ± 0.45
(L)-129	1	Amide	(L)-His	0.65 ± 0.06
(DL)-129	1	Amide	(DL)-His	0.62 ± 0.03
(D)-129	1	Amide	(D)-His	0.67 ± 0.05
(L)-130	2	Amide	(L)-His	0.72 ± 0.08
(DL)-130	2	Amide	(DL)-His	0.73 ± 0.05
(D)-130	2	Amide	(D)-His	0.69 ± 0.08
(L)-131	1	Amide	(L)-Arg	7.29 ± 0.44
(L)-132	2	Amide	(L)-Arg	10.23 ± 0.55
133	1	Amine	Gly	6.99 ± 0.38
134	2	Amine	Gly	12.35 ± 0.58
(DL)-135	1	Amine	(DL)-Lys	13.88 ± 0.59
(DL)-136	2	Amine	(DL)-Lys	16.97 ± 0.74

Tableau 21. Tableau récapitulatif des K_{app} des composés 117-122, 125-136

- **Influence de la nature de la fonction de connexion**

Concernant la fonction de connexion, les dérivés INDOs **133-136** équipées d'une amine secondaire en tant que fonction de connexion possèdent des K_{app} qui sont 1,6 à 13 fois supérieurs à ceux des analogues **125**, **126**, **(DL)-127** et **(DL)-128** munis d'une fonction amide. Les augmentations sont plus marquées pour les molécules portant un motif glycine (facteur allant de 10 à 13) (**133** vs **125** et **134** vs **126**) que pour celles portant un motif **(DL)**-lysine (facteur allant de 1,6 à 2,3) (**(DL)-135** vs **(DL)-127** et **(DL)-136** vs **(DL)-128**). Les INDOs dotées de fonction amide en tant que fonction de connexion possèdent quant à elles des K_{app} sensiblement équivalents à ceux des INDOs munies d'une fonction ester (**125** vs **117**, **126** vs **118** et **(DL)-128** vs **(DL)-120**) à l'exception notable des composés **(DL)-119** et **(DL)-127** où l'amplitude de variation est beaucoup plus importante (facteur 6,9). Des variations ont été également constatées lorsque, pour les INDOs équipées de motif histidine, la fonction ester a été substituée par la fonction amide (**121** vs **129**).

- **Influence de la nature du motif acide aminé**

Lorsque l'on examine le groupe des INDOs équipées du motif amide, on constate que les constantes d'affinité K_{app} des molécules **(L)-131** et **(L)-132** comportant le motif **(L)**-arginine sont plus ou moins égales à celles affichées par les INDOs **(L)-127** et **(L)-128** équipées de **(L)**-lysine. Ces derniers composés présentent des valeurs de K_{app} respectivement 8,3 fois et 10,8 fois supérieures à celles des analogues « glycine » **125** et **126**. Les dérivés **(L)**-histidines **(L)-129** et **(L)-130** sont les composés les moins affins, avec des K_{app} légèrement inférieurs à ceux des INDOs munies de glycine. Cet ordre décroissant en terme d'affinité : lysine \approx arginine $>$ glycine \geq histidine se retrouve également dans la série ester avec tout de même, dans certains cas, des variations d'amplitudes de K_{app} différentes de celles observées pour la série « amide ». Il est à noter que l'on retrouve le même ordre décroissant que pour les mesures de ΔT_m .

- **Influence de la longueur de la chaîne latérale**

Tout comme cela a pu être observé pour les températures de dénaturation, l'incrémentation d'un groupement CH_2 sur la chaîne latérale se traduit par une augmentation de l'affinité de

nos composés vis-à-vis de l'ADN. Les amplitudes varient cependant selon la nature de la fonction de connexion et du motif acide aminé. Ainsi, nous constatons une augmentation d'un facteur 9,4 pour les composés (*L*)-119 et (*L*)-120 tandis que cette augmentation « n'est que » de 1,7 pour leurs homologues en série amide (*L*)-127 et (*L*)-128 et quasi nulle pour les composés (*L*)-129 et (*L*)-130 concernant les dérivés histidine avec amide comme fonction de connexion.

- **Influence de la stéréochimie du carbone asymétrique**

Ici encore, parallèlement à ce qui a été écrit à propos des ΔT_m , même si de « légères » variations existent entre les différents isomères dans le groupe des motifs lysine et histidine, aucun lien ne semble exister entre la stéréochimie du centre asymétrique du carbone de l'acide aminé et l'affinité de la molécule à l'ADN.

2.3. Conclusion sur les interactions ADN-molécules

Les tests sur les deux séries de molécules ont permis de démontrer l'importance de la longueur du bras espaceur greffé sur l'azote lactamique des dérivés INDOs. En effet, le groupement amine basique séparé de trois groupements CH₂ du motif intercalant procure les meilleurs résultats. Concernant les dérivés à quatre groupements CH₂ au niveau de la chaîne aminoalkyle de l'azote lactamique, alors que l'affinité de la molécule semble être plus importante que celle des homologues avec des chaînes plus courtes, la faculté de la stabilisation du duplex semble par contre diminuée, indiquant que, pour le dernier paramètre, une longueur de chaîne aminoalkyle de trois groupements CH₂ semble constituer un maximum. Les études sur les dérivés INDOs II ont également confirmé l'influence significative de la longueur de la chaîne latérale.

D'après nos résultats, l'interaction de l'ADN dépend également de la position de la chaîne latérale au niveau du cycle aromatique D. Elle est influencée aussi par la nature des groupements à l'extrémité de la chaîne de l'azote lactamique. En effet, la présence des groupements amines primaires à cet endroit semble conduire à des molécules présentant de plus fortes interactions avec l'ADN. Par contre, comme le montrent les INDOs de série II

équipées d'un motif histidine, la présence des hétérocycles ne semble pas favoriser l'interaction ADN-ligand.

Enfin, nous n'avons constaté aucune relation entre la stéréochimie du centre asymétrique du carbone de l'acide aminé et l'affinité de la molécule à l'ADN, ce qui montre que l'interaction de nos molécules avec l'ADN n'est pas conditionnée par la stéréochimie du ligand.

3. Etude des modes de liaison à l'ADN

3.1. Eléments théoriques

Le dichroïsme circulaire fournit des informations sur l'asymétrie d'un système.⁵ C'est une technique d'analyse fréquemment utilisée en biologie pour la détermination de structures secondaires des protéines ou des sucres. Elle est également employée pour l'analyse des interactions entre l'ADN et un ligand, plus précisément pour la détermination du mode de liaison de ce dernier à la double hélice.

En effet, même si les bases purines et pyrimidiques composant la structure de l'ADN sont achirales, la présence de la colonne de sucre-groupement phosphate confère la chiralité à la double hélice. Les deux composantes de l'onde électrique E polarisée rectilignement, E_D et E_G tournant en sens inverses l'un de l'autre, présentent alors des angles inégaux par rapport à la composante électrique de l'onde lumineuse rectiligne incidente (biréfringence circulaire). Les deux vibrations circulaires émergentes se recomposent en donnant la vibration rectiligne OE' dont le plan de polarisation fait un angle α avec l'axe de vibration initial.

⁵ N. C. Garbett, P. A. Ragazzon, J. B. Chaires, *Nature Protoc.* **2007**, 2, 3166.

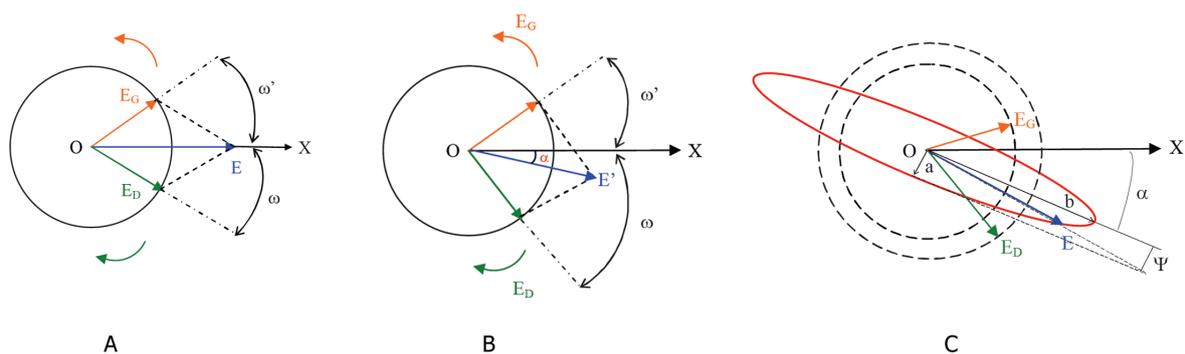


Figure 46. Représentation des composantes E_D et E_G de l'onde électrique E . A. Le champ électrique E résulte de deux vibrations équidistantes E_G et E_D . Images modifiées de la version originale.⁶

Par ailleurs, lorsque l'échantillon qui interagit avec l'ADN possède un chromophore, les deux vibrations circulaires E_G et E_D affichent non seulement la biréfringence circulaire, mais parallèlement une différence d'absorption de la lumière polarisée. La longueur de la vibration circulaire E_D ne correspond plus à celle de E_G , et ces deux vibrations circulaires d'amplitude inégales n'ont plus pour résultante un cercle mais une vibration elliptique. C'est le phénomène de dichroïsme circulaire.⁷

Dans les études d'interaction avec l'ADN, ces signaux observés dans la zone d'absorption du chromophore (dichroïsme circulaire induit) permettent de déterminer le mode de liaison à l'ADN. Toute variation du signal est significative d'une liaison soit avec le petit sillon soit avec le grand sillon de l'ADN. Un signal négatif observé indique généralement une interaction dans le grand sillon de l'ADN (*via* intercalation), tandis qu'un signal positif est considéré comme un signe d'interaction avec le petit sillon.

3.2. Résultats pour les molécules de série I

Les expériences ont été réalisées en augmentant les concentrations en ADN de 10 à 200 μM , avec une concentration en ligands fixe de 50 μM (**Figure 47**).

⁶ M. Lecoœur Lorin, *Intérêt du détecteur à dichroïsme circulaire en chromatographie liquide et du détecteur conductimétrique à couplage capacitif en électrophorèse capillaire pour l'analyse de molécules chirales : applications aux composés pharmaceutiques et aux pesticides*, Thèse de Doctorat à l'Université d'Orléans, soutenue le 3 décembre 2008.

⁷ F. Ciardelli, P. Savadori, *Fundamental Aspects and recent Developments in Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism*, Heyden & Son LTD, London, 1973.

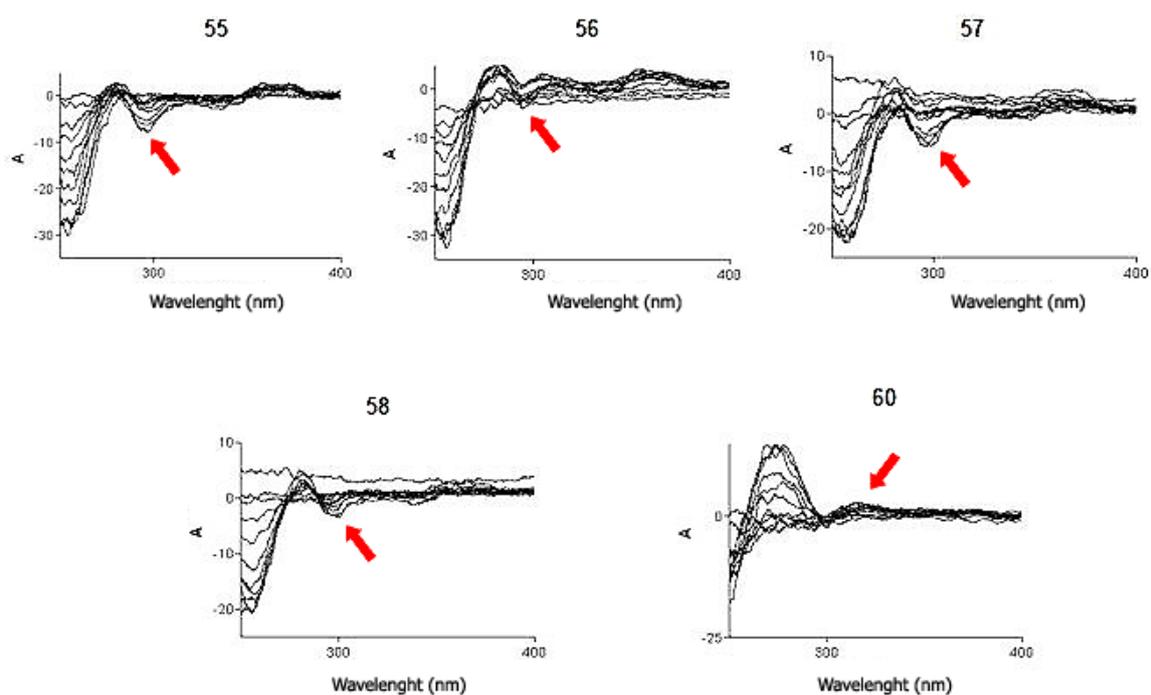


Figure 47. Spectres de dichroïsme circulaire des produits **55-58** et **60**. Les zones à regarder sont indiquées par des flèches rouges.

Les mesures de l'ellipticité du composé **60** présentent un léger dichroïsme induit positif, ce qui signifie que le produit pourrait se lier vers le petit sillon de l'ADN. Concernant les molécules **55-58** substituées en position C7 ainsi que d'autres molécules, elles ont toutes affichées des ellipticités négatives pour le dichroïsme circulaire induit, ce qui semble indiquer que le produit interagirait avec la double hélice au niveau du grand sillon *via* intercalation. Nous pensons que si le mode d'interaction de nos produits avec l'ADN est majoritairement de type intercalation, dans le cas du composé **60**, de légères interactions avec le petit sillon existeraient.

Ce résultat pour le composé **60** est intéressant et mériterait des études supplémentaires. En effet, certains agents anticancéreux se liant dans le petit sillon de l'ADN sont connus pour présenter une très haute sélectivité vis-à-vis des séquences d'ADN et des protéines spécifiques – notamment la Topo II, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour une meilleure sélectivité vis-à-vis des ADN des cellules tumorales.⁸

⁸ X. Cai, P. J. Gray Jr., D. D. Von Hoff, *Cancer Treat. Rev.* **2009**, 35, 437.

4. Inhibition de la relaxation de l'ADN par les Topo I et Topo II

4.1. Inhibition de la relaxation de l'ADN par les Topo I

L'effet inhibiteur de nos composés sur la Topo I a été mesuré par une méthode standard décrite au préalable.⁹ Le test est basé sur les changements de conformation de l'ADN induit par la Topo I. Le plasmide, initialement sous forme négativement surenroulé (*supercoiled*, Sc), est converti par l'enzyme en forme relâchée (*relaxed*, Rel). Une électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les différentes formes d'ADN. Le caractère poison ou non des molécules est visualisé par amplification de la bande d'ADN correspondant à des cassures simples brins (*Nicked DNA*, Nck). Une migration différentielle permet de visualiser les différentes formes.

En ce qui nous concerne, un plasmide bactérien (pUC19) a été soumis à l'action de Topo I en présence de nos molécules. Les tests ont été réalisés pour des concentrations égales à 10 et 20 μM . Un inhibiteur de référence, la CPT, permet de valider l'expérimentation. Les résultats des tests de relaxation réalisés sur les composés de la série I sont indiqués sur la **Figure 48**.

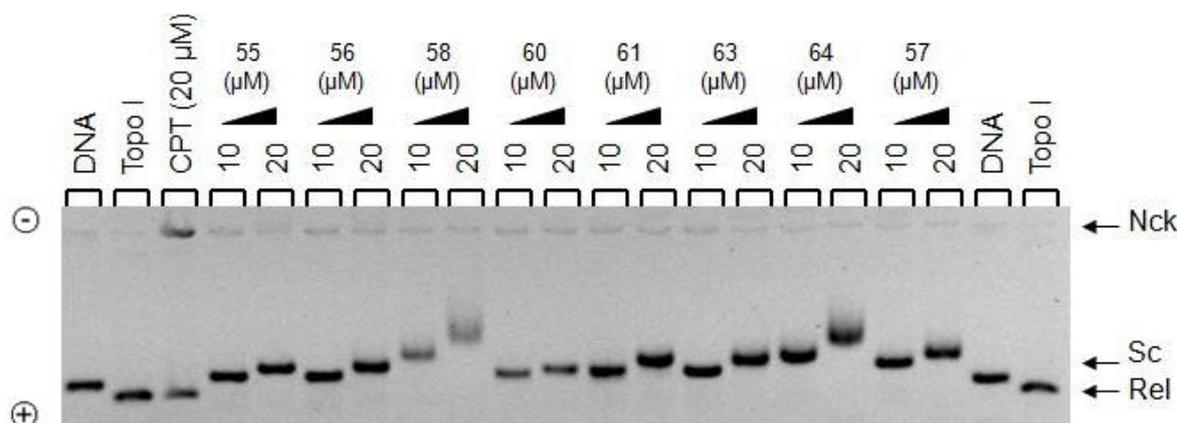


Figure 48. Evaluation par électrophorèse sur gel d'agarose de l'inhibition par les composés **55-61**, **63** et **64** de la relaxation de l'ADN par la Topo I. Le gel contient du BET à hauteur de 1 $\mu\text{g/mL}$, soit 3×10^{-6} nM.

Nous constatons que les plasmides relâchés migrent plus vite que les plasmides négativement surenroulés (**Figure 48**). Ce phénomène est le résultat de l'intercalation des molécules de

⁹ C. Bailly, *Methods Enzymol.* **2001**, 340, 610.

BET, présentes dans le gel, sur l'ADN relaxé par la Topo I, conduisant à l'introduction des surenroulements positifs au niveau de la double hélice et rendant ainsi l'ADN plus compact.

Tandis que la CPT affiche clairement une bande Nck correspondant à l'inhibition de Topo I, d'après le test sur le gel, aucune de nos molécules de série I n'a montré un effet de type poison sur l'enzyme, même pour une concentration élevée du ligand.

En revanche, nos composés exercent un effet sur l'activité de la relaxation de l'ADN à des degrés différents, et ceci constitue une preuve d'intercalation de nos molécules sur l'ADN, certes non-spécifique. Les composés **58**, **61**, **63** et **64** ont été testés plus en détail, sur un gel d'agarose qui ne contient pas, cette fois-ci, du BET (*Figure 49*).

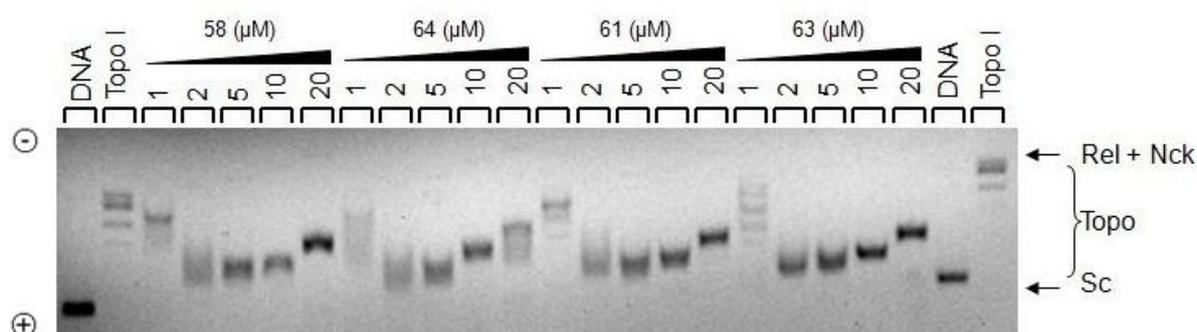


Figure 49. Evaluation par électrophorèse sur gel d'agarose de l'inhibition par les composés **58**, **61**, **63** et **64** de la relaxation de l'ADN par la Topo I. Le gel, cette fois-ci, ne contient pas du BET.

Le gel de la *Figure 49* montre les différents degrés de relaxation du plasmide par nos composés **58**, **61**, **63** et **64**. La relaxation est en effet perturbée par la forte interaction de nos composés sur l'ADN. En rassemblant ces résultats, nous pouvons affirmer que nos molécules de série I interagissent avec l'ADN par intercalation. Les résultats sur les interactions avec l'ADN (ΔT_m , K_{app}) se retrouvent : c'est ainsi que les dérivés INDOs comportant les chaînes latérales aminopropoxylées au niveau de l'aromatique D et/ou aminopropylées sur l'azote lactamique N6 (**58**, **61**, **63** et **64**) présentent les interactions les plus fortes avec l'ADN.

Le même test a été effectué sur les composés de la série II (*Figure 50*).

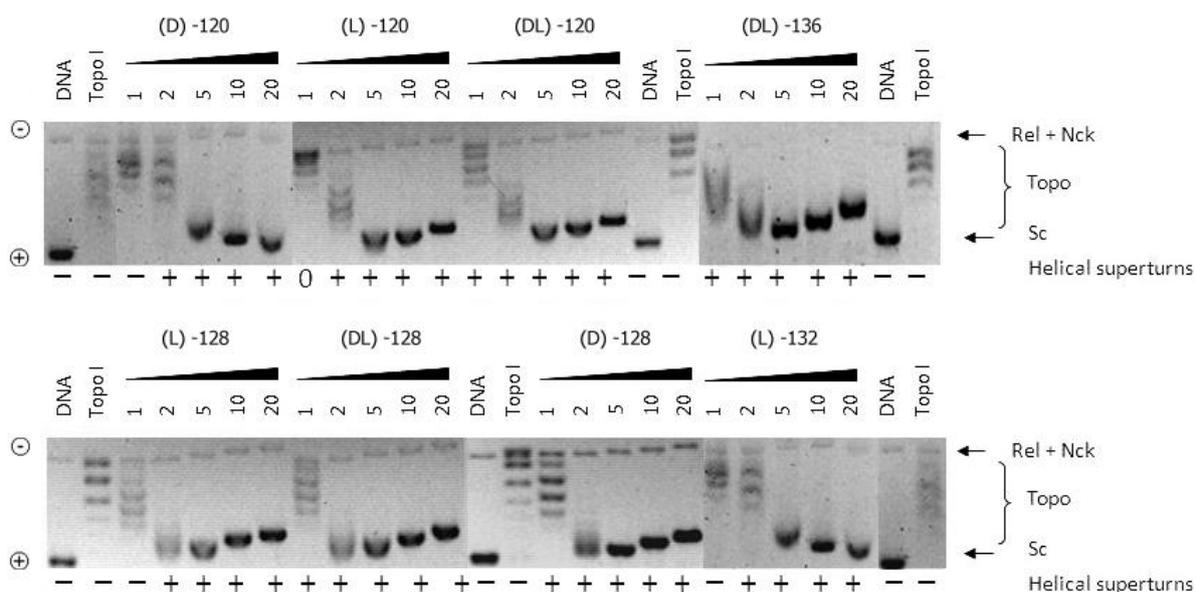


Figure 50. Evaluation par électrophorèse sur gel d'agarose de l'inhibition de la relaxation de l'ADN par la Topo I. Le gel, cette fois-ci, ne contient pas du BET.

Une fois de plus, le test nous montre que nos INDOs équipées de motif aminoacide interagissent avec l'ADN par intercalation avec les degrés d'affinité constatés dans le paragraphe précédent. Les molécules comportant un bras espaceur constitué de trois groupements CH₂ sont de meilleurs intercalants à l'ADN que les dérivés INDOs munis du bras espaceur de longueur égale à deux groupements CH₂. Par ailleurs, nous retrouvons également le fait que les dérivés glycine et histidine interagissent moins bien avec l'ADN que les dérivés lysine et arginine.

4.2. Inhibition de la relaxation de l'ADN par les Topo II

Le test d'inhibition de la Topo II a été effectué selon le même protocole opératoire que pour celui du Topo I, hormis l'enzyme remplacée par Topo II. Le caractère poison des molécules peut être visualisé par amplification de la bande d'ADN correspondant à des cassures double-brin (*Linear DNA*, Lin). La molécule de référence est ici l'étoposide (Eto). Dans nos tests, les concentrations de cette molécule de référence ont été fixées à 20 et à 50 μM.

4.2.1. Tests sur les molécules de série I

Les tests ont été réalisés avec une gamme de concentrations allant de 10 à 100 μM . En plus de l'étoposide (Eto), **POM02** et **POM03** ont été ajoutés en tant que molécules de référence. Concernant cette série, seules les zones de gels présentant un intérêt particulier ont été rapportées sur la *Figure 51*.

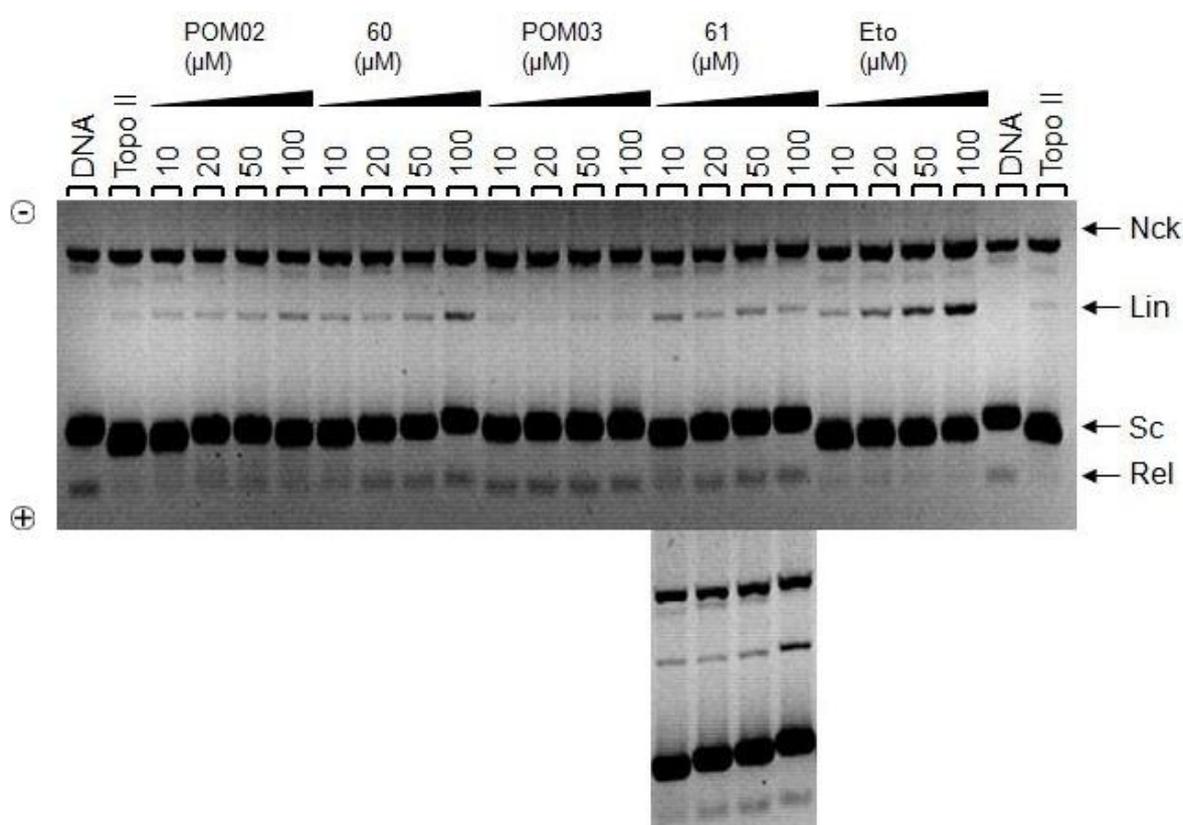


Figure 51. Evaluation par électrophorèse sur gel d'agarose de l'inhibition par les composés **55-61**, **63** et **64** de la relaxation de l'ADN par la Topo II. Le gel contient du BET à hauteur de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Hormis les composés **60** et **61**, et à un degré moindre, les composés **71** et **72** (non rapportés sur le gel de la *Figure 51*), aucun autre composé n'a présenté des bandes caractéristiques de poison de Topo II. Ainsi, seules les INDOs équipées des chaînes aminoéthoxy et aminopropoxy en position C8 (R^8) avec les chaînes aminoéthyle et aminopropyle sur l'azote lactamique N6 possèdent des activités inhibitrices souhaitées (**AL85**,¹ **60** et **61**, **AL931** étant exclus). Nous pouvons observer que les intensités des bandes des produits **60** et **61** sont supérieures à celles des **POM02** et **POM03**. L'INDO **61**, en particulier, a affiché des bandes d'intensité se rapprochant de l'étoposide. Il est intéressant de noter que dans la série I, les

INDOs possédant une chaîne aminoalkoxy en position C8 sont celles qui ont affiché les interactions avec l'ADN les plus « faibles ». Ainsi, le pouvoir inhibiteur de la Topo II de nos molécules ne semble pas avoir de lien avec la capacité de la molécule à interagir avec l'ADN.

4.2.2. Tests sur les molécules de série II

En ce qui concerne les molécules de la série II, les mêmes tests ont été réalisés que pour celles de la série I, avec cette fois-ci deux concentrations différentes pour chacun des composés testés (20 μM et 50 μM).

Les résultats concernant les molécules ayant un ester comme fonction de connexion sont présentés sur la **Figure 52**.

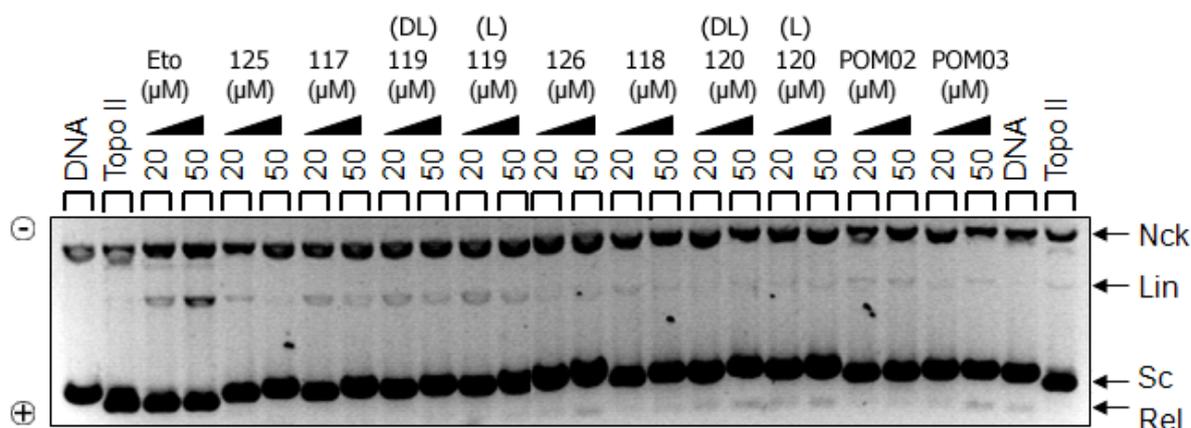


Figure 52. Evaluation par électrophorèse sur gel d'agarose de l'inhibition par les composés **55-61**, **63** et **64** de la relaxation de l'ADN par la Topo II. Le gel contient du BET à hauteur de 1 $\mu\text{g/mL}$.

Dans la série des INDOs disposant comme fonction de connexion d'un groupement ester, le dérivé **119** comportant le motif lysine, avec un bras espaceur de longueur égale à deux unités de méthylène a affiché une certaine inhibition de la Topo II. Néanmoins, cette inhibition ne semble pas être due à la stabilisation du complexe de clivage mais à une inhibition de type non-spécifique résultant de la forte interaction avec l'ADN avec la Topo I, empêchant ainsi l'enzyme de relaxer correctement l'ADN. En effet, les bandes Lin montrent que l'inhibition tend à diminuer lorsque la concentration du médicament augmente, contrairement aux activités affichées par le contrôle Eto. Les dérivés **121** et **122** comportant un motif histidine n'ont fait preuve d'aucune inhibition de la Topo II.

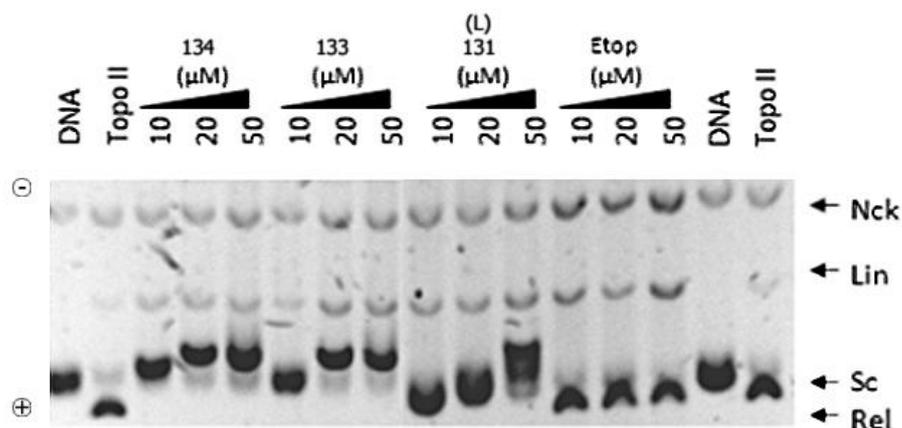


Figure 53. Evaluation par électrophorèse sur gel d'agarose de l'inhibition par les composés **131**, **133** et **134** de la relaxation de l'ADN par la Topo II. Le gel contient du BET à hauteur de 1 $\mu\text{g/mL}$.

Dans les séries amide et amine (**Figure 53**), le composé (**L**)-**131** muni du motif arginine et d'un bras espaceur de deux unités de méthylène semble aussi puissant que l'étoposide pour l'inhibition de la Topo II. Dans la série amine, les dérivés de glycine **133** et **134** ont tous exhibé de bonnes capacités inhibitrices de l'enzyme. Les autres composés n'ont, par contre, affiché aucune inhibition de la Topo II. Dans ce cas-ci, les composés **131**, **133** et **134** possèdent d'ailleurs une excellente affinité à l'ADN. Les raisons pour lesquelles ces dernières molécules présentent de telles activités inhibitrices sont en cours d'étude.

4.2.3. Conclusion sur les tests d'inhibition des Topo I et Topo II

En conclusion, nous avons obtenu deux composés dans la série I (**60**, **61**) et trois composés dans la série II (**131**, **133** et **134**) présentant un effet poison sur la Topo II avec une activité inhibitrice très proche de celle de l'étoposide. Aucun de nos composés n'a, en revanche, affiché une inhibition de la Topo I par stabilisation du complexe de clivage. Néanmoins, les tests de l'inhibition de relaxation par Topo I ont permis de démontrer que nos composés interagissaient avec l'ADN *via* intercalation.

Au sortir de l'étude de Ryckebusch *et coll.*,¹ nous pensions que l'allongement de la longueur de la chaîne latérale au niveau de l'azote lactamique *N6* à trois groupements CH_2 serait plutôt défavorable à une inhibition de Topo II. Nos études montrent ici que la combinaison chaîne aminopropyle en *N6*/chaîne aminopropoxy en position *C8* pour les molécules de la série I (produit **61**) affiche également une forte inhibition de la Topo II par stabilisation du complexe de clivage. Concernant la série II, l'association fonction de connexion amide-motif arginine

(produit **131**) et fonction de connexion amine secondaire-motif glycine (produit **133** et **134**) ont été favorables à l'inhibition de la Topo II.

Lorsque nous mettons en relation les résultats obtenus sur la température de dénaturation et les mesures d'affinité de nos molécules à l'ADN, nous pouvons percevoir que dans la série I, les molécules qui présentent une bonne inhibition de Topo II sont celles qui affichent les capacités de stabilisation de duplex ADN-ligand et les affinités vis-à-vis de l'ADN les plus faibles de la série. Par contre, parmi les composés de la série II, les dérivés **131**, **133** et **134** qui ont fait preuve de la faculté de stabiliser le complexe de clivage possèdent également de bonnes affinités vis-à-vis de la double hélice.

A l'heure actuelle, il est délicat de fournir d'autres d'explications sur les raisons de l'activité inhibitrice de certains de nos composés sur la Topo II. L'absence des structures cristallographiques des complexes ternaires ADN-Topo II-INDO¹⁰ s'avère être un handicap sérieux dans la compréhension du mécanisme d'action réel conduisant à l'inhibition de la Topo II par nos molécules.

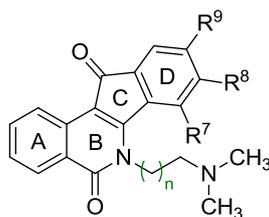
5. Cytotoxicité

La capacité antiproliférative de nos composés a été mesurée sur deux lignées de cellules cancéreuses : la lignée de la leucémie humaine HL60 et la lignée de la leucémie humaine HL60/MX2 rendue résistante à la mitoxantrone, un inhibiteur connu de la Topo II.

5.1. Résultats pour les molécules de la série I

Les résultats concernant les agents de la série I (*Figure 54*) sont indiqués dans le *Tableau 22*.

¹⁰ J. L. Nitiss, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9, 338.



Série I (XXXIX)

$R^7, R^8, R^9 = H, OH, \text{diméthylaminoéthoxy}$
ou $\text{diméthylaminopropoxy}$
 $n = 1, 2 \text{ ou } 3$

Figure 54. Structures des molécules de la série I

Composé	R^1	R^2	R^3	R^4	IC_{50} (μM)		RRI ^a
					HL60	HL60/MX2	
Etoposide	-	-	-	-	1.4 ± 0.0	15.75 ± 1.85	11.25
POM02	$(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	H	H	H	1.05 ± 0.01	7.35 ± 0.49	7.0
POM03	$(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	H	H	H	0.63 ± 0.07	4.92 ± 0.61	7.8
55	$(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	$O-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	H	H	-	-	-
56	$(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	$O-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	H	H	-	-	-
57	$(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	$O-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	H	H	2.6 ± 0.0	2.3 ± 0.2	0.9
58	$(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	$O-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	H	H	-	-	-
AL85	$(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	H	$O-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	H	0.66 ± 0.02	1.5 ± 0.3	2.3
AL93	$(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	H	$O-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	H	1.1 ± 0.0	1.15 ± 0.05	1.0
59	$(CH_2)_4-N(CH_3)_2$	H	$O-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	H	3.7 ± 0.2	6.85 ± 0.25	1.85
60	$(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	H	$O-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	H	1.1 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.3
61	$(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	H	$O-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	H	1.00 ± 0.14	3.6 ± 1.0	3.6
62	$(CH_2)_4-N(CH_3)_2$	H	$O-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	H	2.2 ± 0.3	2.65 ± 0.05	1.2
AL52	$(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	H	H	$O-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	-	-	-
AL68	$(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	H	H	$O-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	-	-	-
63	$(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	H	H	$O-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	-	-	-
64	$(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	H	H	$O-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	5.05 ± 0.05	3.5 ± 0.2	0.6
70	$(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	OH	H	H	-	-	-
71	$(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	H	OH	H	1.4 ± 0.0	4.15 ± 0.35	2.9
72	$(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	H	OH	H	0.625 ± 0.050	1.55 ± 0.35	2.4

Tableau 22. Tableau récapitulatif des cytotoxicités des composés de série I. ^aRRI = index de résistance relative

Les cytotoxicités affichées par les molécules de série I sont globalement de l'ordre du micromolaire. Certains composés tels que **AL85**, **68** et **72** ont, en revanche, présenté des IC_{50}

voisins de 500 nM. Quant aux composés **60** et **61** qui ont affiché des capacités d'inhibition proches de l'étoposide, leurs cytotoxicités sont un peu plus faibles que celles du premier groupe de composés, mais semblables tout de même à celle de l'étoposide. Globalement, il ne semble pas y avoir de corrélation entre le pouvoir inhibiteur de Topo II et la cytotoxicité.

Les composés **59** et **62** possédant un groupement aminobutyle affichent une cytotoxicité deux à trois fois plus faible que pour les autres composés. De même, l'INDO **64**, qui fait preuve d'une excellente interaction vis-à-vis de l'ADN présente l'une des plus faibles cytotoxicités de la série. Ainsi, l'affinité à l'ADN et la cytotoxicité ne semblent pas liées entre elles.

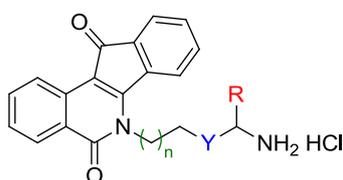
Les valeurs des index de résistance relative (RRI), sont représentées par le quotient suivant :

$$\text{RRI} = \frac{\text{IC}_{50}(\text{HL60/MX2})}{\text{IC}_{50}(\text{HL60})}$$

Dans le **Tableau 22**, les valeurs de RRI sont faibles pour tous les composés, et ne permettent de tirer aucune conclusion sur le mécanisme d'action de nos dérivés INDOs. Une valeur de RRI élevée aurait signifié un mécanisme d'action de la molécule incriminée différente de celui de la mitoxantrone, avec notamment une augmentation significative de la contribution de l'inhibition de la Topo II dans l'activité biologique de cette dernière.

5.2. Résultats pour les molécules de série II

Les résultats sur les molécules de série II (**Figure 55**) sont reportés dans le **Tableau 23**.



Série II (XL)

R = résidu Gly, Lys, His ou Arg
 Y = ester, amide, amine
 n = 1, 2

Figure 55. Structure des molécules de série II

Composé	n	Fonction de connexion	Acide aminé	cLog D	IC ₅₀ (μM)		RRI
					HL60	HL60/MX2	
117	2	Ester	Gly	1.6	4.95 ± 0.05	27.5 ± 0.85	5.56
118	3	Ester	Gly	1.6	-	-	-
(L)-119	2	Ester	(L)-Lys	-1.2	12.3 ± 0.2	32 ± 3	2.60
(DL)-119	2	Ester	(DL)-Lys	-1.2	14.0 ± 0.5	28 ± 0.01	2.00
(D)-119	2	Ester	(D)-Lys	-1.2	-	-	-
(L)-120	3	Ester	(L)-Lys	-1.1	14.6 ± 0.5	24.5 ± 1.05	1.68
(DL)-120	3	Ester	(DL)-Lys	-1.1	21.3 ± 0.4	22.5 ± 0.5	1.06
(D)-120	3	Ester	(D)-Lys	-1.1	-	-	-
(L)-121	2	Ester	(L)-His	1.2	7.8 ± 0.2	23 ± 2	2.95
(DL)-121	2	Ester	(DL)-His	1.2	9.2 ± 0.4	21.0 ± 1	2.28
(D)-121	2	Ester	(D)-His	1.2	9.20 ± 0.75	16.5 ± 0.95	1.79
(L)-122	3	Ester	(L)-His	1.4	15.7 ± 0.2	22.6 ± 1.05	1.44
(DL)-122	3	Ester	(DL)-His	1.4	8.90 ± 0.85	16.0 ± 0.95	1.80
(D)-122	3	Ester	(D)-His	1.4	10.50 ± 0.85	15.25 ± 1.05	1.45
125	2	Amide	Gly	0.0	2.5 ± 0.3	3.0 ± 0.4	1.2
126	3	Amide	Gly	0.1	1.20 ± 0.15	1.6 ± 0.25	1.3
(L)-127	2	Amide	(L)-Lys	-2.7	1.85 ± 0.05	2.55 ± 0.15	1.38
(DL)-127	2	Amide	(DL)-Lys	-2.7	3.0 ± 0.1	3.8 ± 0.2	1.27
(D)-127	2	Amide	(D)-Lys	-2.7	-	-	-
(L)-128	3	Amide	(L)-Lys	-2.6	3.2 ± 0.2	4.95 ± 0.15	1.55
(DL)-128	3	Amide	(DL)-Lys	-2.6	5.25 ± 0.35	7.25 ± 0.55	1.38
(D)-128	3	Amide	(D)-Lys	-2.6	-	-	-
(L)-129	2	Amide	(L)-His	-0.05	3.6 ± 0.4	4.0 ± 0.5	1.11
(DL)-129	2	Amide	(DL)-His	-0.05	5.80 ± 0.15	14.7 ± 0.7	2.53
(D)-129	2	Amide	(D)-His	-0.05	4.60 ± 0.05	17.5 ± 0.75	3.80
(L)-130	3	Amide	(L)-His	0.07	3.00 ± 0.15	2.8 ± 0.05	0.93
(DL)-130	3	Amide	(DL)-His	0.07	2.45 ± 0.35	4.65 ± 0.55	1.90
(D)-130	3	Amide	(D)-His	0.07	2.80 ± 0.05	4.9 ± 0.15	2.10
(L)-131	2	Amide	(L)-Arg	-2.7	2.00 ± 0.15	3.1 ± 0.3	1.55
(D)-132	3	Amide	(L)-Arg	-2.6	1.30 ± 0.15	2.3 ± 0.25	1.77
133	2	Amine	Gly	-1.0	1.2 ± 0.1	2 ± 0.01	1.67
134	3	Amine	Gly	-1.0	2.95 ± 0.15	4.85 ± 0.25	1.64
(DL)-135	2	Amine	(DL)-Lys	-2.5	7.6 ± 0.4	5.5 ± 0.35	0.72
(DL)-136	3	Amine	(DL)-Lys	-2.4	2.4 ± 0.1	2.8 ± 0.3	1.17

Tableau 23. Tableau récapitulatif des cytotoxicités des composés de série II.

En ce qui concerne les molécules de la série II, en plus des valeurs d'IC₅₀, des valeurs de *c*Log D théoriques ont été ajoutées (**Tableau 23**). On observe que nos dérivés INDOs avec le groupement ester en tant que fonction de connexion affichent des valeurs de cytotoxicité moyennes, allant de 4.95 ± 0.05 μM à 21.3 ± 0.4 μM. Nous pouvons constater que les composés **119** et **120**, dont il est établi qu'ils sont des intercalants à l'ADN, affichent des valeurs d'IC₅₀ élevées, ce qui justifie le fait que la capacité d'intercalation et la faculté d'inhibition de la prolifération de la cellule ne vont pas de pair encore une fois. Une des explications que l'on pourrait fournir à l'« inefficacité » de ces composés serait le clivage du groupement ester qui donnerait naissance aux composés **75** et **76** dans le milieu. Ces derniers avaient été démontrés par Nagarajan *et coll.* comme étant des inhibiteurs très modérés de Topo I possédant de faibles cytotoxicités vis-à-vis de nombreuses cellules cancéreuses (en moyenne entre 10 et 15 μM).¹¹

Les dérivés INDOs avec le groupement amide comme fonction de connexion ont affiché des cytotoxicités beaucoup plus intéressantes que le groupe précédent avec les valeurs d'IC₅₀ allant de 1,20 ± 0,15 μM à 5,80 ± 0,15 μM. Le composé **132**, qui est aussi un très bon ligand à l'ADN mais qui n'est pas inhibiteur de Topo II, possède une des meilleures valeurs d'IC₅₀. On peut affirmer que le comportement remarquable du composé **132** est dû à un mécanisme tout autre que l'inhibition de la Topo II suivie du clivage double-brin de l'ADN, tout comme le composé **126** qui, lui, n'affiche pas d'affinité à l'ADN mais possède un coefficient de distribution élevé (*c* Log D = 0.1) favorisant la pénétration des membranes cellulaires. Il est à noter que le composé **131** qui a présenté une inhibition de Topo II la plus proche de l'étoposide, possède une affinité à l'ADN moins élevée et une cytotoxicité inférieure à son homologue **132**.

Enfin, en ce qui concerne le groupe des INDOs avec amine comme fonction de connexion, on constate une fois de plus que l'affinité à l'ADN, la capacité d'inhibition et la cytotoxicité ne sont pas forcément liées entre elles. En effet, le composé **133**, qui est un des composés les plus cytotoxiques de toute la série II et un de nos meilleurs inhibiteurs de Topo II, n'est pas la molécule la plus affine à l'ADN. Son homologue, la molécule **134**, possède une bonne affinité à l'ADN et une très bonne inhibition de l'enzyme, mais est trois fois moins

¹¹ M. Nagarajan, A. Morrell, B. C. Fort, M. R. Meckly, S. Antony G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5651.

cytotoxique que l'agent précédent. Les molécules **135** et **136** équipées du motif lysine, qui ont manifesté une excellente affinité à l'ADN, ne possèdent ni une capacité d'inhibition de l'enzyme cible, ni une cytotoxicité notable. Il est à noter que nous ne pouvons dégager une tendance globale concernant la longueur du bras espaceur car l'augmentation du nombre de carbone peut à la fois résulter en une augmentation de la cytotoxicité mais aussi en une baisse.

6. Conclusion du chapitre

Les différents tests *in vitro* menés sur ces nouveaux dérivés INDOs ont permis d'établir de nouvelles relations structure-activité (**Figure 56**).

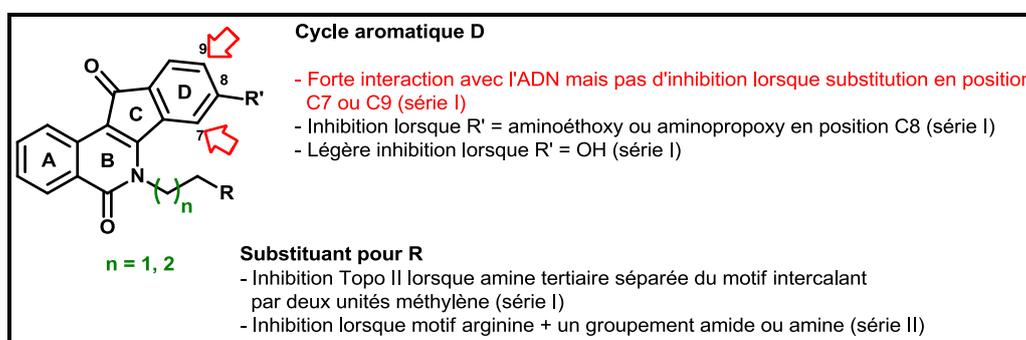


Figure 56. Schéma récapitulatif des évaluations biologiques

Tout d'abord, la synthèse et les évaluations biologiques des composés de la série I nous ont permis de confirmer l'importance de la position C8 de l'INDO pour l'inhibition de la Topo II. Un groupement aminoéthoxy ou aminopropoxy et, à un degré moindre, un groupement hydroxy greffé à cet endroit et couplé à un substituant basique au niveau de l'azote lactamique séparé du motif intercalant par un bras espaceur à deux ou à trois unités de méthylène a conduit à des INDOs présentant un pouvoir d'inhibition de Topo II équivalent à celui de l'étoposide. La longueur du bras espaceur au niveau de l'azote lactamique s'est révélée être cruciale pour l'activité d'inhibition de l'enzyme, aussi bien dans la première que dans la deuxième série de molécules, avec les bras espaceurs les plus courts affichant les meilleurs résultats. Il est à noter que les études du dichroïsme circulaire ont montré que le composé **61** possédait la particularité d'avoir une tendance de liaison au niveau du petit sillon de l'ADN, ce qui est une première parmi les INDOs.

Parmi les molécules de série II, conjuguées aux acides aminés basiques, la greffe de l'arginine au niveau de l'azote lactamique et séparé du motif intercalant par deux chaînons méthyléniques confère aussi à la molécule (composé **(L)-131**) un grand pouvoir d'inhibition de la Topo II. Par contre, la cytotoxicité est restée assez modérée, aux alentours de 1 μM . Les composés **133** et **134** munis du motif glycine avec comme fonction de connexion de type amine ont aussi présenté d'excellentes capacités inhibitrices de la Topo II.

En ce qui concerne la cytotoxicité, il est à remarquer que Nagarajan *et coll.* avait constaté que le groupement amine primaire à l'extrémité d'une chaîne d'aminoalkyle au niveau de l'azote lactamique rendait la molécule très cytotoxique et que toute modification au niveau de la substitution de cette amine primaire rendait les molécules moins cytotoxiques.¹¹ Ceci pourrait en partie expliquer les raisons pour lesquelles la grande majorité de nos molécules présentant une très bonne inhibition de Topo II affichent finalement des cytotoxicités « modérées », aux alentours de 1 μM . Des tests supplémentaires sont en cours pour élucider les causes de la très bonne performance de l'**AL85** et du **72**. Dans la série II, même si nous avons en effet une amine primaire à l'extrémité du bras espaceur provenant de l'acide aminé, l'existence de la chaîne latérale pourrait contribuer à la diminution de la cytotoxicité de la molécule.

Enfin, nous pouvons affirmer que les composés les plus cytotoxiques ne sont pas ceux qui ont un pouvoir d'inhibition de la Topo II le plus grand, ni une grande affinité à l'ADN. En effet, aucune relation notable n'a été observée entre ces trois paramètres. On peut supposer que ceci résulte de différents facteurs, incluant la pénétration membranaire de nos composés et/ou l'existence d'autres cibles inconnues à ce jour que nos molécules viseraient. Des études pharmacologiques supplémentaires sont actuellement en cours. Il est à noter que cette absence de relation entre le pouvoir d'inhibition de la topoisomérase et la cytotoxicité a été également constatée par Ryckebusch *et coll.*¹ ainsi que par l'équipe de recherche de Cushman au cours de leur travail de l'inhibition de Topo I par les dérivés de l'INDO.¹² On peut également observer que pour le moment, aucune assertion ou hypothèse ne sera considérée comme pertinente tant qu'il n'y aura pas eu de structure cristallographique du complexe ternaire ADN-Topo II-INDO. D'autres tests biologiques sont actuellement en cours.

¹² Pour un exemple : A. Morrell, M. Placzek, S. Parmley, S. Antony, T. S. Dexheimer, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4419.

Références et notes relatives au Chapitre IV

1. A. Ryckebusch, D. Garcin, A. Lansiaux, J. F. Goossens, B. Baldeyrou; R. Houssin, C. Bailly, J. P. Hénichart, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3617.
2. A. R. Morgan, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, N. L. Murray, D. H. Evans, *Nucleic Acids Res.* **1979**, *7*, 547.
3. T. C. Jenkins, *Methods Mol. Biol.* **1998**, *90*, 195.
4. V. Pavlov, P. K. T. Lin, V. Rodilla, *Chem. Biol. Interact.* **2001**, *137*, 15.
5. N. C. Garbett, P. A. Ragazzon, J. B. Chaires, *Nature Protoc.* **2007**, *2*, 3166.
6. M. Lecoœur Lorin, *Intérêt du détecteur à dichroïsme circulaire en chromatographie liquide et du détecteur conductimétrique à couplage capacitif en électrophorèse capillaire pour l'analyse de molécules chirales : applications aux composés pharmaceutiques et aux pesticides*, Thèse de Doctorat à l'Université d'Orléans, soutenue le **3 décembre 2008**.
7. F. Ciardelli, P. Savadori, *Fundamental Aspects and recent Develoments in Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism*, Heyden & Son LTD, London, 1973.
8. X. Cai, P. J. Gray Jr., D. D. Von Hoff, *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35*, 437.
9. C. Bailly, *Methods Enzymol.* **2001**, *340*, 610.
10. J. L. Nitiss, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 338.
11. M. Nagarajan, A. Morrell, B. C. Fort, M. R. Meckly, S. Antony G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5651.
12. Pour un exemple : A. Morrell, M. Placzek, S. Parmley, S. Antony, T. S. Dexheimer, Y. Pommier, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4419.

Conclusion générale

Conclusion générale

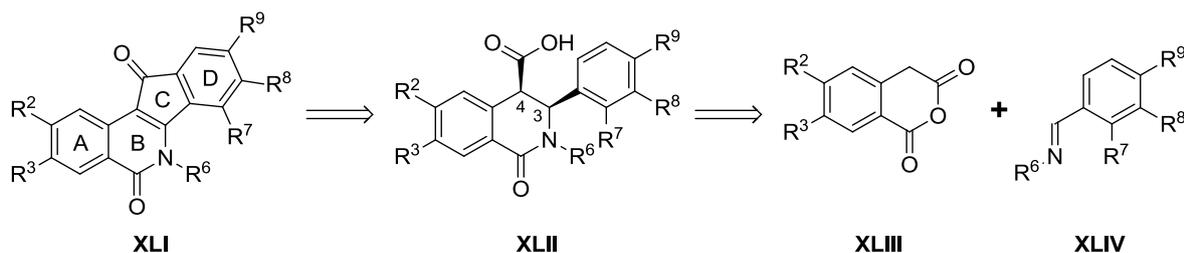


Schéma 40. Schéma rétrosynthétique établie par Cushman et coll.

Les évaluations biologiques sur ces composés ont permis de découvrir que seule la substitution en R⁸ confère aux dérivés INDOs la faculté d'inhibition des Topo II par stabilisation du complexe de clivage. La longueur de la chaîne diméthylaminoalkyle en position N6 et C8 joue aussi un rôle considérable dans l'inhibition de la Topo II, avec l'**AL85** possédant les chaînes diméthylaminoéthyle et diméthylaminoéthoxy en N6 et C8 respectivement, et conférant à la molécule la meilleure activité inhibitrice, quasi égale à celle de l'étoposide.

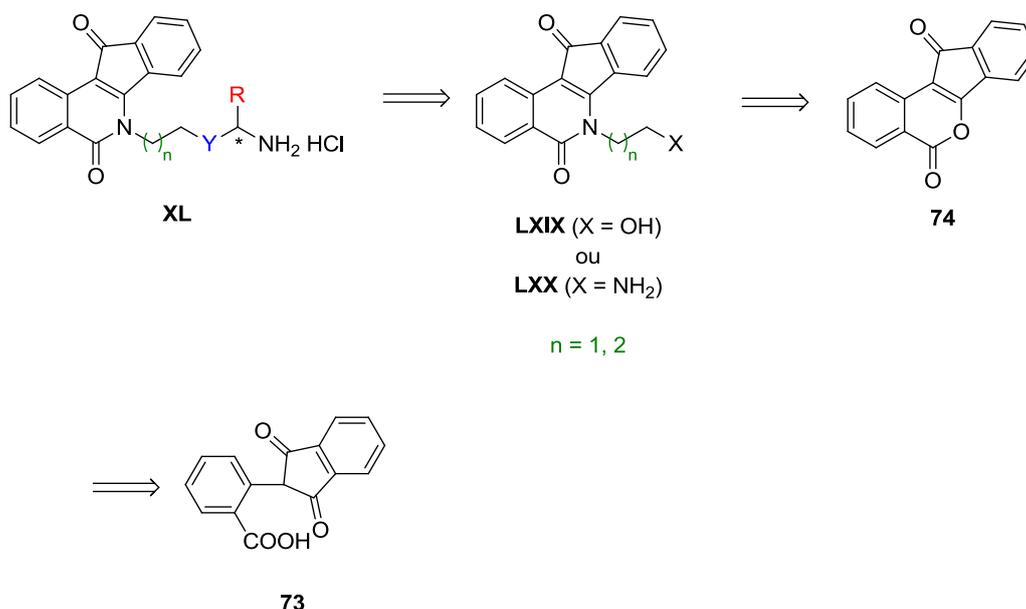


Schéma 41. Voie rétrosynthétique des molécules de série II

Concernant les 34 molécules de série II (**XL**), la méthode de synthèse choisie nous a permis de connecter divers acides aminés basiques. D'autres acides aminés pourraient être connectés *via* cette méthode, notamment les motifs permettant de capturer les cofacteurs de la Topo II, en particulier les cations divalents tels que le magnésium etc...

Conclusion générale

En ce qui concerne les activités pharmacologiques des molécules de la série II, nous avons pu voir que l'introduction de l'arginine au niveau de l'azote lactamique *N6* conférait à la molécule une très bonne activité inhibitrice de la Topo II.

Les trois paramètres étudiés en tests biologiques, l'interaction avec l'ADN, l'inhibition de la Topo II et les cytotoxicités n'ont semblé avoir aucun lien entre eux, indiquant que, même si la Topo II est sans doute la cible principale de nos INDOs, d'autres mécanismes pourraient intervenir dans l'effet thérapeutique de nos molécules. Des recherches sont actuellement en cours pour améliorer encore la sélectivité de nos composés vis-à-vis des Topo II α et des cellules cancéreuses.

Partie expérimentale

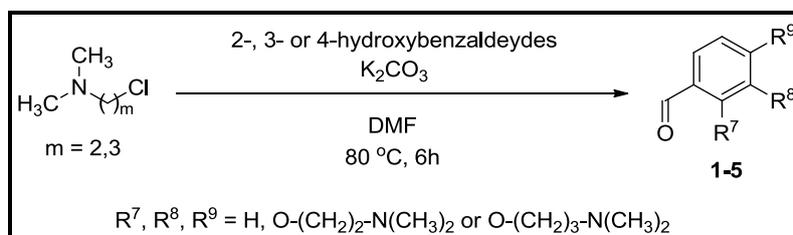
1. Chemistry, General

All starting materials were purchased from Acros Organics, Alfa Aesar, Sigma-Aldrich and Bachem. Common organic solvents such as petroleum spirit, ethyl acetate, dichloromethane, chloroform, acetone and toluene were purchased from VWR. Tetrahydrofuran (THF) and diethyl ether (Et₂O) were pre-dried with anhydrous Na₂SO₄, then distilled over sodium benzophenone ketyl under Ar and stored over sodium wire before use. When required, an inert atmosphere was obtained by using dry Ar. ¹H NMR spectra were recorded at 300 MHz and ¹³C NMR spectra at 75 MHz on a BRUKER AM300WB spectrometer. Chemical shifts (ppm) were reported with tetramethylsilane (SiMe₄) as internal reference. Analytical thin layer chromatography (TLC) was carried out on aluminum plates pre-coated with Merck Kieselgel 60 GF₂₅₄ and products visualized by UV light. For flash column chromatography, Merck silica gel 60 (40-63 μm) was used. Melting points were determined by using an electrothermal REICHERT THERMOPAN and are uncorrected. Optical rotation values were given by Perkin Elmer Model 343 Polarimeter emitting lights with a Na/HaI lamp at a wavelength of 589 nm, at 20.0 °C. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained on an Orbitrap Exactive Thermo Scientific mass spectrometer by positive mode electrospray ionization.

2. Series I

2.1. Synthesis of substituted benzaldehydes

2.1.1. General procedure for the synthesis of (aminoalkoxy)benzaldehydes 1-5

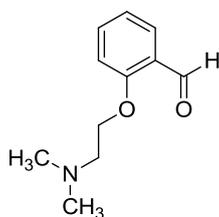


A suspension of the appropriate hydroxybenzaldehyde (4.64 g, 38.0 mmol, 2.0 equiv) and potassium carbonate (76.0 mmol, 4.0 equiv) in DMF (20 mL) was stirred at reflux

temperature for 30min. The appropriate alkyl chloride hydrochloride (19.0 mmol, 1.0 equiv) was added, and the reaction mixture was heated and maintained at 80 °C for 5h. After cooling, distilled water (100 mL) was added to the reaction mixture and the resulting mixture was extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The organic layer was separated, washed with brine (3 × 100 mL), dried over Na₂SO₄, and the solvent evaporated to afford the desired product as brown oil, which was used in the next step without further purification.

- **2-(2-Dimethylaminoethoxy)benzaldehyde (1)**

Aldehyde **1** was prepared from 2-hydroxybenzaldehyde and 2-dimethylaminoethyl chloride hydrochloride (2.74 g).



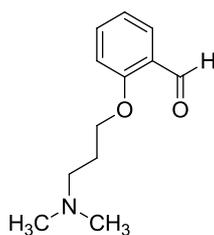
MW: 193.24 g.mol⁻¹.

Yield: 1.31 g, 36 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 10.49 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.03-6.96 (m, 2H), 4.18 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.34 (s, 6H).

- **2-(3-Dimethylaminopropoxy)benzaldehyde (2)**

Aldehyde **2** was prepared from 2-hydroxybenzaldehyde and 3-dimethylaminopropyl chloride hydrochloride (3.00 g).



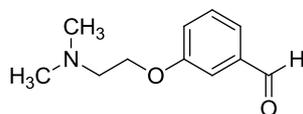
MW: 207.26 g.mol⁻¹.

Yield: 2.45 g, 62 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 10.47 (s, 1H), 7.78 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.48 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.97-6.94 (m, 2H), 4.10 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.44 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.02-1.93 (m, 2H).

- **3-(2-Diméthylaminoéthoxy)benzaldehyde (3)**

Aldehyde **3** was prepared from 3-hydroxybenzaldehyde and 2-dimethylaminoethyl chloride hydrochloride (2.74 g).



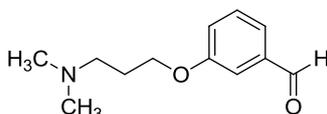
MW: 193.24 g.mol⁻¹.

Yield: 1.15 g, 31 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 9.98 (s, 1H), 7.47–7.24 (m, 3H), 7.16–7.13 (m, 1H), 4.14 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.77 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.36 (s, 6H).

- **3-(3-Diméthylaminopropoxy)benzaldehyde (4)**

Aldehyde **4** was prepared from 3-hydroxybenzaldehyde and 3-dimethylaminopropyl chloride hydrochloride (3.00 g).



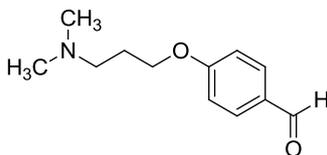
MW: 207.27 g.mol⁻¹.

Yield: 1.93 g, 49 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 9.97 (s, 1H), 7.45 (br s, 1H), 7.43 (br d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.40 (br s, 1H), 7.21-7.14 (m, 1H), 4.08 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.46 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.03-1.91 (m, 2H).

- **4-(3-Dimethylaminopropoxy)benzaldehyde (5)**

Aldehyde **5** prepared from 4-hydroxybenzaldehyde and 3-dimethylaminopropyl chloride hydrochloride (3.00 g).

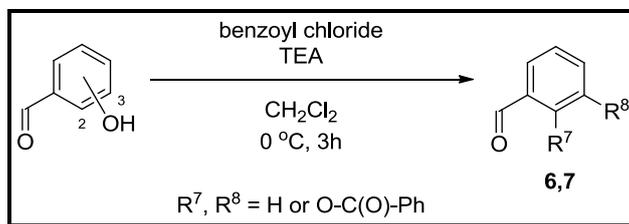


MW: 207.27 g.mol⁻¹.

Yield: 1.69 g, 43 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 9.84 (s, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.07 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.99-1.91 (m, 2H), 2.42 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.22 (s, 6H).

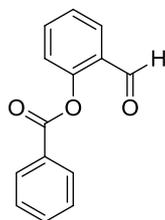
2.1.2. General procedure for the synthesis of benzoates **6** and **7**



A solution of appropriate benzaldehyde (8.0 g, 65.5 mmol, 1 equiv) and triethylamine (13.7 mL, 98.3 mmol, 1.5 equiv) in CH₂Cl₂ (80 mL) was cooled to 0 °C. Benzoyl chloride (11.4 mL, 98.3 mmol, 1.5 equiv) was then added dropwise, and the reaction mixture was stirred for 3h at 0 °C. The reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ (50 mL) and washed with a saturated NaHCO₃ solution (2 × 50 mL). The organic layer was separated and dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography on silica gel yielded the desired products as colorless oil.

- **2-Formylphenyl benzoate (6)**

Aldehyde **6** was purified by flash column chromatography on silica gel (EtOAc/hexane, 15:85, as eluent).



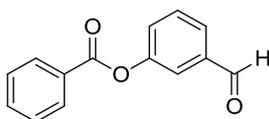
MW: 226.23 g.mol⁻¹.

Yield: 6.65 g, 45 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 10.22 (s, 1H), 8.24 (br s, 2H), 7.97 (br s, 1H), 7.68-7.26 (m, 6H).

- **3-Formylphenyl benzoate (7)**

Aldehyde **7** was purified by flash column chromatography on silica gel (EtOAc/hexane, 5:95, as eluent).



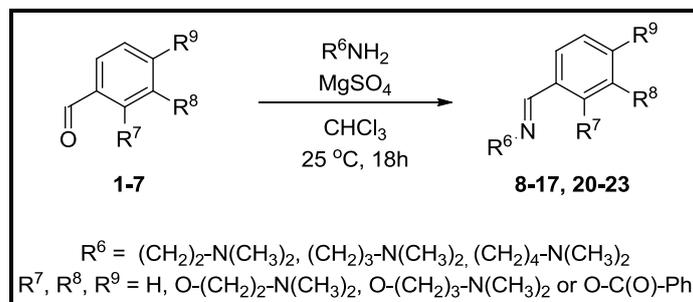
MW: 226.23 g.mol⁻¹.

Yield: 6.79 g, 46 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 10.03 (s, 1H), 8.21 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.81-7.76 (m, 1H), 7.68-7.47 (m, 6H).

2.2. Synthesis of the imines

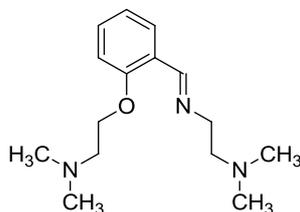
2.2.1. General procedure for the synthesis of *N*-(aminoalkoxybenzylidene)-*N',N'*-dimethylalkane diamines **8-17**, **20-23**.



Freshly distilled, appropriate *N,N*-dimethylalkanediamine (10.3 mmol, 1.2 equiv) and Na_2SO_4 (3.08 g) were added into a solution of benzaldehyde derivatives **1-7** (8.6 mmol, 1.0 equiv) in CHCl_3 (16 mL). For the synthesis of compounds **12** and **15**, TEA (1.4 mL, 10.3 mmol, 1.2 equiv) was also added. The reaction mixture was stirred overnight, filtered and the filtrate was washed with saturated NaHCO_3 solution (2×25 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to give the desired product as brown oil.

- *N*-[2-(2-Dimethylaminoethoxy)benzylidene]-*N',N'*-dimethylethane-1,2-diamine (**8**)

Imine **8** was prepared from **1** (1.66 g) and *N,N*-dimethylethylenediamine (1.1 mL).



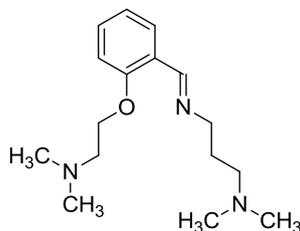
MW: 263.38 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Yield: 1.83 g, 81 %.

^1H NMR (CDCl_3 , δ ppm, *J* Hz): 8.75 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.34 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.98-6.88 (m, 2H), 4.12 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.74 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.77 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.63 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.35 (s, 6H), 2.30 (s, 6H).

- ***N*-[2-(2-Dimethylaminoethoxy)benzylidene]-*N,N'*-dimethylpropane-1,3-diamine (9)**

Imine **9** was prepared from **1** (1.66 g) and *N,N*-dimethylpropane-1,3-diamine (1.3 mL).



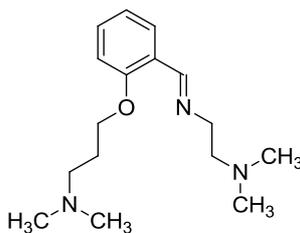
MW: 277.41 g.mol⁻¹.

Yield: 2.12 g, 89 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.73 (s, 1H), 7.94 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.01-6.90 (m, 2H), 4.14 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.65 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.36 (m, 8H), 2.24 (s, 6H), 1.92-1.83 (m, 2H).

- ***N*-[2-(3-Dimethylaminopropoxy)benzylidene]-*N,N'*-dimethylethane-1,2-diamine (10)**

Imine **10** was prepared from **2** (1.78 g) and *N,N*-dimethylethylenediamine (1.1 mL).



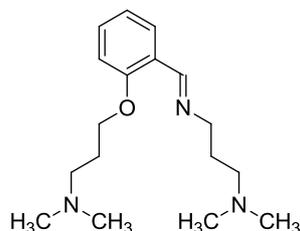
MW: 277.41 g.mol⁻¹.

Yield: 2.24 g, 94 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.75 (s, 1H), 7.93 (dd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.36-7.30 (m, 1H), 7.02-6.88 (m, 2H), 4.06 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.75 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.64 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.45 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.31 (s, 6H), 2.25 (s, 6H), 2.03-1.94 (m, 2H).

- ***N*-[2-(3-Dimethylaminopropoxy)benzylidene]-*N,N'*-dimethylpropane-1,3-diamine (11)**

Imine **11** was prepared from **2** (1.78 g) and *N,N*-dimethylpropane-1,3-diamine (1.3 mL).



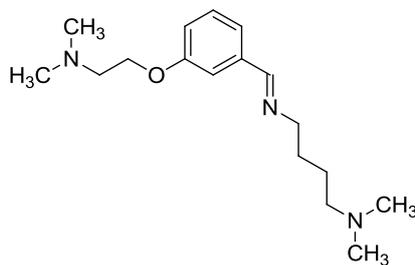
MW: 291.43 g.mol⁻¹.

Yield: 2.48 g, 99 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.70 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.34-7.28 (m, 1H), 6.96-6.86 (m, 2H), 4.04 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.62 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.23 (s, 6H), 2.21 (s, 6H), 2.01-1.92 (m, 2H), 1.90-1.80 (m, 2H).

- ***N*-[3-(2-Dimethylaminoethoxy)benzylidene]-*N,N'*-dimethylbutane-1,4-diamine (12)**

Imine **12** was prepared from **3** (1.66 g), *N,N*-dimethylbutane-1,4-diamine dihydrochloride (1.95 g) and TEA (1.4 mL).



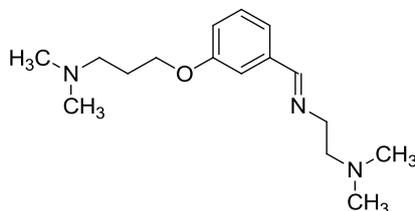
MW: 291.43 g.mol⁻¹.

Yield: 1.95 g, 78 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.24 (s, 1H), 7.33-7.21 (m, 3H), 7.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.11 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.63 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.74 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.37-2.28 (m, 8H), 2.22 (s, 6H), 1.76-1.67 (m, 2H), 1.59-1.49 (m, 2H).

- ***N*-[3-(3-Dimethylaminopropoxy)benzylidene]-*N,N'*-dimethylethane-1,2-diamine (13)**

Imine **13** was prepared from **4** (1.78 g) and *N,N*-dimethylethylenediamine (1.1 mL).



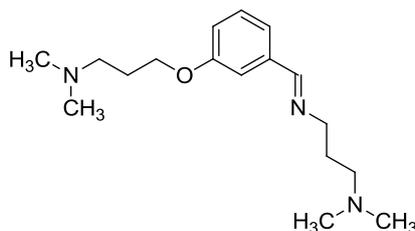
MW: 277.41 g.mol⁻¹.

Yield: 2.17 g, 91 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.26 (s, 1H), 7.32-7.21 (m, 3H), 6.96 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.05 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.73 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.64 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.45 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.25 (s, 6H), 1.91-2.02 (m, 2H).

- ***N*-[3-(3-Dimethylaminopropoxy)benzylidene]-*N,N'*-dimethylpropane-1,3-diamine (14)**

Imine **14** was prepared from **4** (1.78 g) and *N,N*-dimethylpropane-1,3-diamine (1.3 mL).



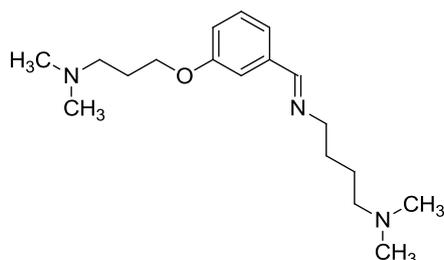
MW: 291.43 g.mol⁻¹.

Yield: 2.27 g, 90 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.26 (s, 1H), 7.46-7.23 (m, 3H), 6.98 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.07 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.65 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.46 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.26 (s, 6H), 2.25 (s, 6H), 2.02-1.83 (m, 4H).

- ***N*-[3-(3-Dimethylaminopropoxy)benzylidene]-*N,N'*-dimethylbutane-1,4-diamine (15)**

Imine **15** was prepared from **4** (1.78 g), *N,N*-dimethylbutane-1,4-diamine dihydrochloride (1.95 g) and TEA (1.4 mL).



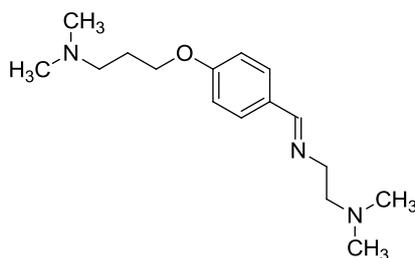
MW: 305.46 g.mol⁻¹.

Yield: 2.07 g, 79 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.23 (s, 1H), 7.32-7.20 (m, 3H), 6.96 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.05 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.62 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.45 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.30 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.25 (s, 6H), 2.22 (s, 6H), 2.03-1.91 (m, 2H) 1.76-1.67 (m, 2H), 1.59-1.49 (m, 2H).

- ***N*-[4-(3-Dimethylaminopropoxy)benzylidene]-*N,N'*-dimethylethane-1,2-diamine (16)**

Imine **16** was prepared from **5** (1.78 g) and *N,N*-dimethylethylenediamine (1.1 mL).



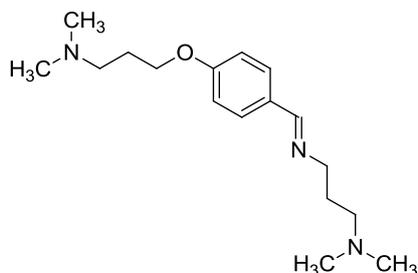
MW: 277.41 g.mol⁻¹.

Yield: 2.15 g, 90 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.22 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.03 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.69 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.61 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.44 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.24 (s, 6H), 1.99-1.90 (m, 2H).

- ***N*-[4-(3-Dimethylaminopropoxy)benzylidene]-*N,N'*-dimethylpropane-1,3-diamine (17)**

Imine **17** was prepared from **5** (1.78 g) and *N,N*-dimethylpropane-1,3-diamine (1.3 mL).



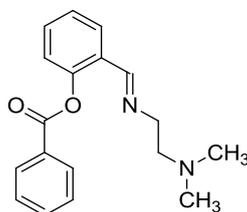
MW: 291.43 g.mol⁻¹.

Yield: 2.46 g, 98 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.18 (s, 1 H), 7.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H), 6.89 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H), 4.02 (t, *J* = 6.3 Hz, 2 H), 3.58 (t, *J* = 6.9 Hz, 2 H), 2.42 (t, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 2.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 2.23 (s, 6 H), 2.21 (s, 6 H), 2.00-1.78 (m, 4 H).

- **2-[2-(Dimethylaminoethylimino)methyl]phenyl benzoate (20)**

Imine **20** was prepared from **6** (1.95 g) and *N,N*-dimethylethylenediamine (1.1 mL). The ¹H NMR spectrum displayed all peaks split in two lines that might indicate the presence of both *E* and *Z* isomers of imines in the sample.



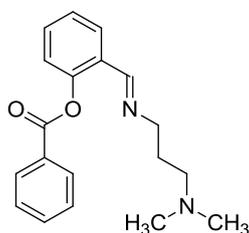
MW: 296.36 g mol⁻¹.

Yield: 1.94 g, 76 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.45 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.23 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 8.02 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.67 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.56-7.42 (m, 6H), 7.40-7.20 (m, 5H), 6.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 3.73-3.64 (m, 3H), 3.53-3.50 (m, 1H), 2.64 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.56-2.51 (m, 2H), 2.30-2.24 (m, 12H).

- **2-[3-(Dimethylaminopropylimino)methyl]phenyl benzoate (21)**

Imine **21** was prepared from **6** (1.95 g) and *N,N*-dimethylpropane-1,3-diamine (1.3 mL). The ¹H NMR spectrum displayed all peaks split in two lines that might indicate the presence of both *E* and *Z* isomers of imines in the sample.



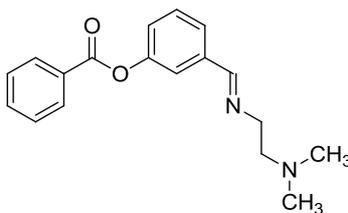
MW: 310.38 g mol⁻¹.

Yield: 1.84 g, 69 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.36 (s, 2H), 7.79 (d, *J* = 7.7 Hz, 4H), 7.57-7.42 (m, 6H), 7.40-7.20 (m, 6H), 6.96 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.87 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.66-3.54 (m, 4H), 2.51 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.24 (s, 6H), 1.92-1.73 (m, 4H).

- **3-[2-(Dimethylaminoethylimino)methyl]phenyl benzoate (22)**

Imine **22** was prepared from **7** (1.95 g) and *N,N*-dimethylethylenediamine (1.1 mL).



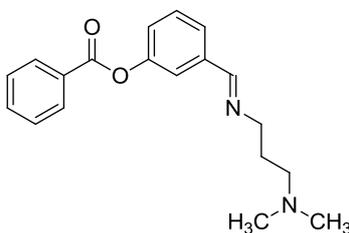
MW: 296.36 g mol⁻¹.

Yield: 1.95 g, 77 %

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.34 (s, 1H), 8.21 (J = 7.6 Hz, 2H), 7.68-7.60 (m, 3H), 7.57-7.42 (m, 3H), 7.30 (s, 1H), 3.82 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.79 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.42 (s, 6H).

- **3-[3-(Dimethylaminopropylimino)methyl]phenyl benzoate (23)**

Imine **23** was prepared from **7** (1.95 g) and *N,N*-dimethylpropane-1,3-diamine (1.3 mL).



MW: 310.38 g mol⁻¹.

Yield: 2.59 g, 97 %.

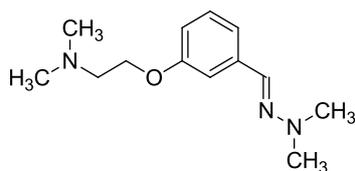
¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.30 (s, 1H), 8.20 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.67-7.59 (m, 3H), 7.54-7.41 (m, 3H), 7.30 (s, 1H), 3.66 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.46 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.31 (s, 6H), 1.97-1.88 (m, 2H).

2.2.2. General procedure for the synthesis of hydrazones 19-20

N,N-dimethylhydrazine (*unsym*, 0.8 mL, 10.3 mmol, 1.2 equiv) and Na₂SO₄ (3.08 g) were added to a solution of **3** or **4** (8.6 mmol, 1.0 equiv) in CHCl₃ (16 mL). The reaction mixture was stirred overnight, filtered and the filtrate was washed with saturated NaHCO₃ solution (2 × 25 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to give the desired product as brown oil.

- **3-[(2,2-Dimethylhydrazono)methyl]phenoxy-*N,N*-dimethylethanamine (18)**

Hydrazone **18** was prepared from **3** (1.66 g)



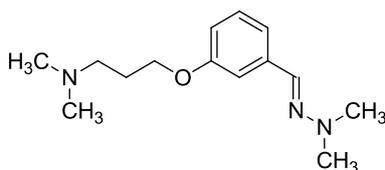
MW: 235.33 g mol⁻¹.

Yield: 1.71 g, 85 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.23 (br s, 3H), 7.11 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 4.12 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.98 (s, 6H), 2.76 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.36 (s, 6H).

- 3-[(2,2-Dimethylhydrazono)methyl]phenoxy-N,N-dimethylpropan-1-amine (19)

Hydrazone **19** was prepared from **4** (1.78 g)



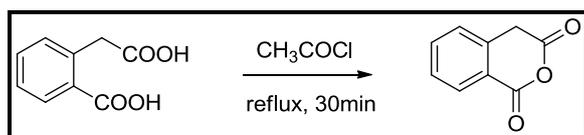
MW: 249.35 g mol⁻¹.

Yield: 1.97 g, 92 %.

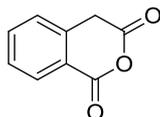
¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.21 (br s, 3H), 7.10 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 6.79 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 4.06 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.97 (s, 6H), 2.48 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.28 (s, 6H), 2.03-1.93 (m, 2H).

2.3. Synthesis of 3-aryl-4-carboxy-isoquinolones 25-34, 37-40

2.3.1. Procedure for the synthesis of homophthalic anhydride (24)



A suspension of homophthalic acid (5 g, 55.5 mmol) in acetyl chloride (55 mL) was heated at reflux temperature for 30 min. The reaction mixture was cooled to room temperature, and the solvent evaporated *in vacuo*. The solid residue was dispersed in Et₂O, filtered washed with Et₂O and dried *in vacuo* to afford the desired product as yellow solids.

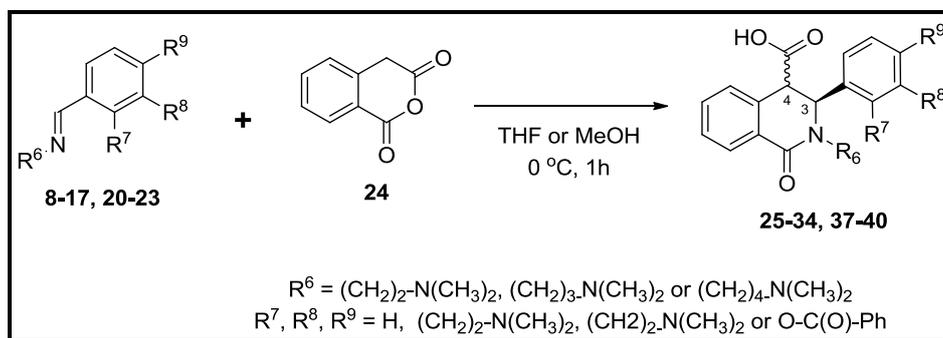


MW: 162.18 g.mol⁻¹.

Yield: 3.56 g, 79 %

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.22 (dd, J = 7.9 Hz, J = 0.9 Hz, 1H), 7.72 (td, J = 7.6 Hz, J = 1.4 Hz, 1H), 7.53 (t, J = 7.4 Hz, 1H), (d, J = 7.7 Hz, 1H), 4.17 (s, 2H).

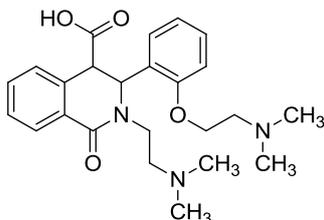
2.3.2. General procedure for the synthesis arylisoquinolones 25-34 and 37-40



Homophthalic anhydride (1.23 g, 7.6 mmol, 1 equiv) was added to a solution of imines **8-11**, **14**, **16-21** (7.6 mmol, 1 equiv) in THF (14.5 mL) or a solution of imines **12**, **13**, **15**, **22**, **23** MeOH (14.5 mL). The mixture was stirred at 0 °C for 1h then concentrated under reduced pressure to yield a yellow solid containing a mixture of *cis*- and *trans*-isomers of acids **25-34**, **37-40**. Only the characteristic signals were characterized. The *cis/trans* ratio was evaluated from ¹H NMR spectra based on the characteristic peaks of each isomer every time it was possible. The crude mixture of diastereoisomers was used in the next step without purification.

- **4-Carboxy-3-[2-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-(2-dimethylaminoethyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolone (25).**

Isoquinolone **25** was obtained from **8** (2.00 g).



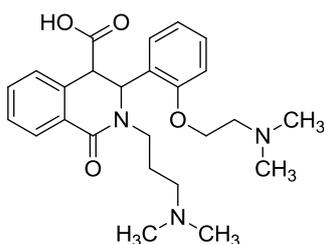
MW: 425.52 g.mol⁻¹.

Yield (crude, *cis* + *trans*): 3.23 g, 100 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz) characteristic signals: 5.70 (s, H_{trans}), 5.62 (d, J = 5.3 Hz, H_{cis}), 4.60 (d, J = 5.3 Hz, H_{cis}), (s, H_{trans}). *cis/trans* ratio = 1.0:2.0.

- **4-Carboxy-3-[2-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-(3-dimethylaminopropyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolone (26)**

Isoquinolone **26** was obtained from **9** (2.11 g).



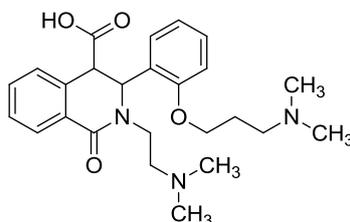
MW: 439.55 g.mol⁻¹.

Yield (crude, *cis* + *trans*): 3.24 g, 97 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz) characteristic signals: 5.82 (s, H_{trans}), 5.62 (d, J = 5.3 Hz, H_{cis}), 4.60 (d, J = 5.3 Hz, H_{cis}), 3.97 (s, H_{trans}). *cis/trans* ratio = 1.0:2.0.

- **4-Carboxy-3-[2-(3-dimethylaminopropoxy)phenyl]-2-(2-dimethylaminoethyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolone (27)**

Isoquinolone **27** was obtained from **10** (2.11 g).



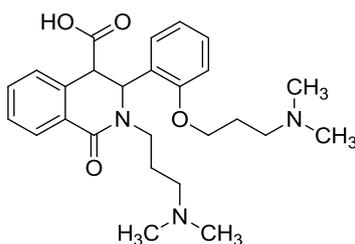
MW: 439.55 g.mol⁻¹.

Yield (crude, *cis* + *trans*): 3.11 g, 93 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz) characteristic signals: 5.67 (s, H_{trans}), 4.55 (d, J = 5.3 Hz, H_{cis}), 3.89 (s, H_{trans}). *cis/trans* ratio = 1.0:1.9.

- **4-Carboxy-3-[2-(3-dimethylaminopropoxy)phenyl]-2-(3-dimethylaminopropyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolone (28)**

Isoquinolone **28** was obtained from **11** (2.21 g).



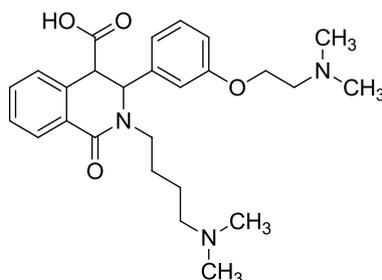
MW: 453.57 g.mol⁻¹.

Yield (crude, *cis* + *trans*): 94 %, 3.24 g.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz) characteristic signals: 5.80 (s, H_{trans}), 5.66 (d, J = 6.4 Hz, H_{cis}), 4.60 (d, J = 6.4 Hz, H_{cis}), 3.85 (s, H_{trans}). *cis/trans* ratio = 1.0:3.8.

- **4-Carboxy-3-[3-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-(4-dimethylaminobutyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolone (29).**

Isoquinolone **29** was obtained from **12** (2.21 g).



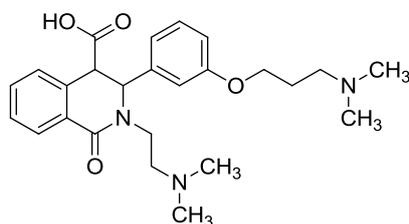
MW: 453.57 g.mol⁻¹.

Yield (crude, *cis* + *trans*): 3.45 g, 100 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz) characteristic signals: 5.42 (s, H_{*trans*}), 5.10 (d, *J* = 6.0 Hz, H_{*cis*}), 4.57 (d, *J* = 6.0 Hz, H_{*cis*}), 3.80 (s, H_{*trans*}). *cis/trans* ratio = 1.0:2.3 in MeOH, 1.0:4.6 in THF.

- **4-Carboxy-3-[3-(3-dimethylaminopropoxy)phenyl]-2-(2-dimethylaminoethyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolone (30).**

Isoquinolone **30** was obtained from **13** (2.11 g).



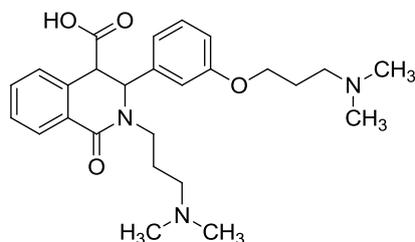
MW: 439.55 g.mol⁻¹.

Yield (crude, *cis* + *trans*): 3.34 g, 100 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz) characteristic signals: 5.49 (s, H_{*trans*}), 5.20 (d, *J* = 6.5 Hz, H_{*cis*}), 4.62 (d, *J* = 6.5 Hz, H_{*cis*}), 3.85 (s, H_{*trans*}). *cis/trans* ratio = 1.0:2.2 in MeOH, 1.0:2.8 in THF.

- **4-Carboxy-3-[3-(3-dimethylaminopropoxy)phenyl]-2-(3-dimethylaminopropyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolone (31).**

Isoquinolone **31** was obtained from **14** (2.21 g).



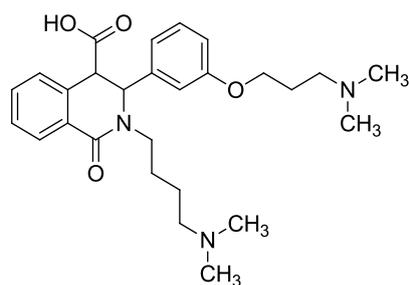
MW: 453.57 g.mol⁻¹.

Yield (crude, *cis* + *trans*): 3.45 g, 100 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz) characteristic signals: 5.46 (s, H_{trans}), 5.18 (d, J = 6.5 Hz, H_{cis}), 4.59 (d, J = 6.5 Hz, H_{cis}), 3.82 (s, H_{trans}). *cis/trans* ratio = 1.0:6.6.

- **4-Carboxy-3-[3-(3-dimethylaminopropoxy)phenyl]-2-(4-dimethylaminobutyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolone (32).**

Isoquinolone **32** was obtained from **15** (2.32 g).



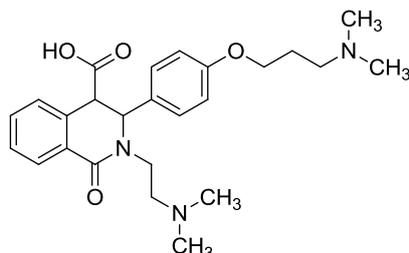
MW: 467.60 g.mol⁻¹.

Yield (crude, *cis* + *trans*): 3.55 g, 100 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz) characteristic signals: 5.41 (s, H_{trans}), 5.10 (d, J = 6.4 Hz, H_{cis}), 4.52 (d, J = 6.4 Hz, H_{cis}), 3.78 (s, H_{trans}). *cis/trans* ratio = 1.0:2.1 in MeOH, 1.0:3.8 in THF.

- **4-Carboxy-3-[4-(3-dimethylaminopropoxy)phenyl]-2-(2-dimethylaminoethyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolone (33)**

Isoquinolone **33** was obtained from **16** (2.11 g).



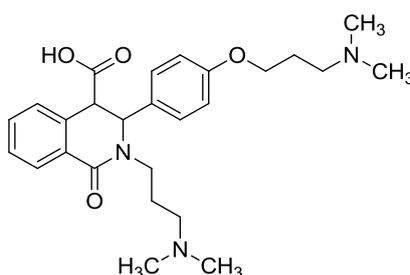
MW: 439.55 g.mol⁻¹.

Yield (crude, *cis* + *trans*): 3.21 g, 96 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz) characteristic signals: 5.27 (s, H_{*trans*}), 5.10 (d, *J* = 6.7 Hz, H_{*cis*}), 4.56 (d, *J* = 6.7 Hz, H_{*cis*}). *cis/trans* ratio = 1.0:1.4.

- **4-Carboxy-3-[4-(3-dimethylaminopropoxy)phenyl]-2-(3-(dimethylamino)propyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolone (34)**

Isoquinolone **34** was obtained **17** (2.21 g).



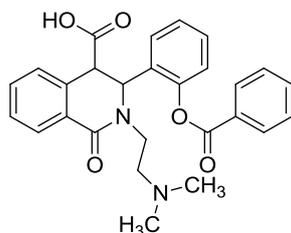
MW: 453.57 g.mol⁻¹.

Yield (crude, *cis* + *trans*): 3.31 g, 96 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz) characteristic signals: 5.37 (s, H_{*trans*}), 5.10 (d, *J* = 6.4 Hz, H_{*cis*}), 4.58 (d, *J* = 6.4 Hz, H_{*cis*}). *cis/trans* ratio = 1.0:3.3.

- **4-Carboxy-3-[2-(benzoyloxy)phenyl]-2-(2-dimethylaminoethyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolone (37).**

Isoquinolone **37** was obtained from **20** (2.25 g).



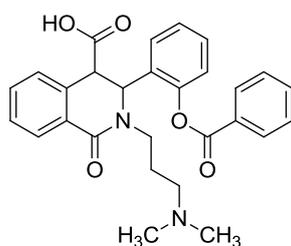
MW: 458.51 g.mol⁻¹.

Yield (crude, *cis* + *trans*): 3.48 g, 100 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz) characteristic signals: 5.87 (d, J = 5.4 Hz, H_{*cis*}), 5.43 (s, H_{*trans*}), 4.64 (d, J = 5.4 Hz, H_{*cis*}). *cis/trans* ratio = 1.0:0.9.

- **4-Carboxy-3-[2-(benzoyloxy)phenyl]-2-(2-dimethylaminoethyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolone (38).**

Isoquinolone **38** was obtained from **21** (2.36 g). The product was insoluble in CDCl₃ and in CD₃OD and required heating to obtain a suitable ¹H NMR sample. The experiment revealed a mixture of *cis*- and *trans*-isomers, with the *trans*-isomer as the major product. However, the ¹H NMR spectrum displayed the superposition of the characteristic peaks of *cis* and *trans* isomers, that did not allowed an evaluation of the *cis/trans* ratio. As a result, the material was used in the next step of reaction without further characterization.

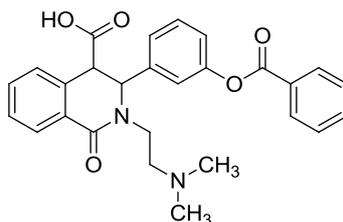


MW: 472.53 g.mol⁻¹.

Yield (crude, *cis* + *trans*): 3.59 g, 100 %.

- **4-Carboxy-3-[3-(benzoyloxy)phenyl]-2-(2-dimethylaminoethyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolone (39).**

Isoquinolone **39** was obtained from **22** (2.25 g).



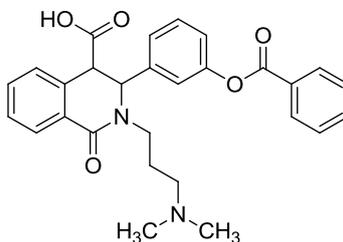
MW: 458.51 g.mol⁻¹.

Yield (crude, *cis* + *trans*): 3.45 g, 99 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz) characteristic signals: 5.48 (s, H_{trans}), 4.68 (d, J = 6.0 Hz, H_{cis}), 3.90 (s, H_{trans}). *cis/trans* ratio = 1.0:2.1 in MeOH.

- **4-Carboxy-3-[3-(benzoyloxy)phenyl]-2-(3-(dimethylamino)propyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolone (40).**

Isoquinolone **40** was obtained from **23** (2.36 g).



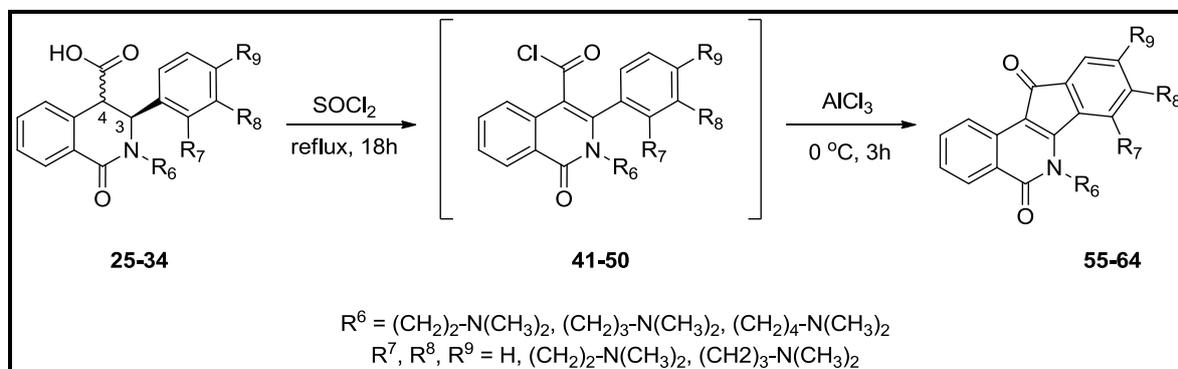
MW: 472.53 g.mol⁻¹.

Yield (crude, *cis* + *trans*): 3.48 g, 97 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz) characteristic signals: 5.49 (s, H_{trans}), 5.41 (br. s, H_{cis}), 4.86 (br. s, H_{cis}), 3.98 (s, H_{trans}). *cis:trans* ratio = 1.0:3.0 in MeOH.

2.4. Synthesis of indenoisoquinolines (INDOs)

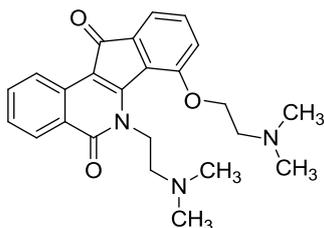
2.4.1. General procedure for the synthesis of INDOs 55-64



Thionyl chloride (18 mL) was added to the isoquinolones **25-34** (7.0 mmol, 1 equiv) under stirring, and the reaction mixture was refluxed at 80 °C for 18h. After cooling, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue (**41-50**) was dissolved in CH_2Cl_2 (50 mL), and cooled to 0 °C. Aluminum chloride (5.00 g, 37.5 mmol, 5 equiv) was added slowly, and the reaction mixture was stirred for 3h at 0 °C. A 1 M HCl solution (200 mL) was then added dropwise, and the aqueous layer was separated and washed with CH_2Cl_2 (3 × 100 mL). The aqueous layer was made alkaline with 10 % NaOH solution until pH = 10 and subsequently extracted with EtOAc (3 × 200 mL). The organic layer was washed with brine (3 × 200 mL), dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure to give the crude product, which was purified by flash column chromatography on silica gel.

- **7-(2-Dimethylaminoethoxy)-6-(2-dimethylaminoethyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione (55)**

INDO **55** was obtained from **25** (2.98 g) as red amorphous solid after three purifications by flash column chromatography on silica gel (1st: EtOAc/MeOH/TEA, 90:10:5, as eluent; 2nd: EtOAc/MeOH/TEA, 85:15:5, as eluent; 3rd: acetone/MeOH/TEA, 95:5:2.5, as eluent).



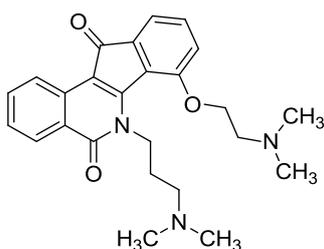
MW: 405.49 g.mol⁻¹.

Yield: 9 mg, 1 % from the *cis*-isomer.

¹H NMR (CD₃OD, δ ppm, *J* Hz): 8.42 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.55 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.33-7.23 (m, 2H), 7.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.86 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.31 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.94 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.64 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.46 (s, 6H), 2.34 (s, 6H).

- **7-(2-Dimethylaminoethoxy)-6-(3-dimethylaminopropyl)-6H-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione (56)**

INDO **56** was obtained from **26** (3.08 g) as red amorphous solid after three purifications by flash column chromatography on silica gel (1st: acetone/NH₃, 95:5, as eluent; 2nd: acetone/TEA, 99:1, as eluent; 3rd: acetone/TEA, 98:2, as eluent).



MW: 419.52 g.mol⁻¹.

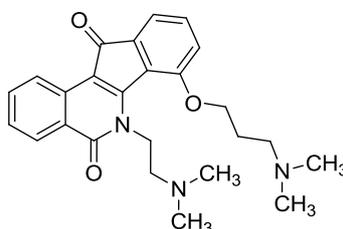
Yield: 136 mg, 14 % from the *cis*-isomer.

¹H NMR (CD₃OD, δ ppm, *J* Hz): 8.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.25-7.12 (m, 2H), 7.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.62 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.21 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.78 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.37 (s, 6H), 2.25 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.13 (s, 6H), 1.82-1.72 (m, 6H).

^{13}C NMR (CD_3OD , δ ppm): 187.7, 162.2, 156.7, 150.1, 134.9, 131.6, 131.4, 130.3, 125.9, 124.8, 121.1, 120.9, 120.5, 118.4, 114.0, 106.5, 65.3, 55.7, 54.7, 44.1, 43.3, 42.5, 25.8.

- **7-(3-Dimethylaminopropoxy)-6-(2-dimethylaminoethyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione (57)**

INDO **57** was obtained from **27** (3.08 g) as red amorphous solid after three purifications by flash column chromatography on silica gel (1st: acetone/ NH_3 , 95:5, as eluent; 2nd: acetone/TEA, 99:1, as eluent; 3rd: acetone/TEA, 98:2, as eluent).



MW: 419.52 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

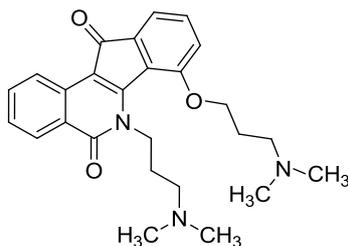
Yield: 245 mg, 24 % from the *cis*-isomer.

^1H NMR (CD_3OD , δ ppm, J Hz): 8.47 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.58 (td, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.35-7.26 (m, 2H), 7.14 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.04 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.88 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 4.26 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.73 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.59 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.46 (s, 6H), 2.27 (s, 6H), 2.20-2.15 (m, 2H).

^{13}C NMR (CD_3OD , δ ppm): 191.0, 165.5, 159.8, 138.0, 135.2, 134.8, 134.6, 133.5, 129.0, 127.9, 124.1, 124.0, 123.6, 121.5, 117.1, 110.1, 69.0, 60.0, 56.9, 46.3, 45.8, 45.2, 27.4.

- **7-(3-Dimethylaminopropoxy)-6-(3-dimethylaminopropyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione (58)**

INDO **58** was obtained from **28** (3.17 g) as red amorphous solid after two purifications by flash column chromatography on silica gel (1st: acetone/MeOH/TEA, 9:1:1, as eluent; 2nd: acetone/MeOH/TEA, 95:5:5, as eluent).



MW: 433.53 g.mol⁻¹.

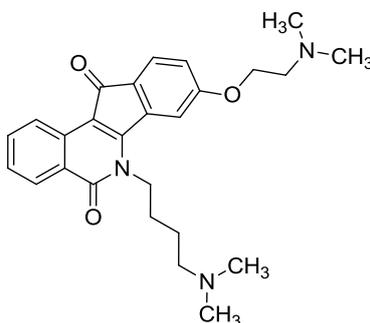
Yield: 109 mg, 17 % from the *cis*-isomer.

¹H NMR (CD₃OD, δ ppm, J Hz): 8.32-8.24 (m, 1 H), 7.95-7.88 (m, 1 H), 7.51-7.42 (m, 1 H), 7.27-7.00 (m, 3 H), 6.90 (d, *J* = 6.6 Hz, 1 H), 4.70-4.56 (m, 2 H), 4.32-4.22 (m, 2 H), 2.89 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 2.80 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 2.61 (s, 6 H), 2.60 (s, 6 H), 2.25-2.16 (m, 2 H), 2.06-1.98 (m, 2 H).

¹³C NMR (CD₃OD, δ ppm): 189.5, 164.0, 158.1, 151.7, 136.3, 133.4, 133.2, 131.8, 127.5, 126.5, 122.6, 122.3, 121.7, 120.2, 115.6, 108.1, 67.3, 55.8, 55.2, 45.2, 43.6, 43.2, 26.7, 25.8.

- **8-(2-Dimethylaminoethoxy)-6-(4-dimethylaminobutyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione (59)**

INDO **59** was obtained from **29** (3.17 g) as red solid after two purifications by flash column chromatography on silica gel (1st: DCM/MeOH/TEA. 97:3:3, as eluent; 2nd: acetone/MeOH/TEA, 95:5:5, as eluent) followed by crystallization from ethanol.



MW: 433.53 g.mol⁻¹.

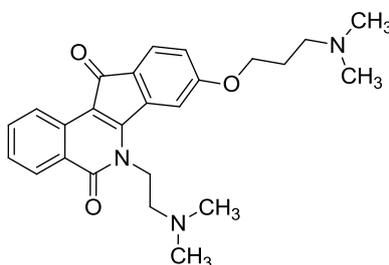
Yield: 13 mg, 1 % from the *cis*-isomer.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.72 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.47 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.76 (d, *J* = 7.9

Hz, 1H), 4.53 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 4.14 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.79 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 2.42-2.37 (m, 8H), 2.28 (s, 6H), 1.96-1.89 (m, 2H), 1.78-1.67 (m, 2H).

- **8-(3-Dimethylaminopropoxy)-6-(2-dimethylaminoethyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione (60)**

INDO **60** was obtained from **30** (3.08 g) as orange solid after two purifications by flash column chromatography on silica gel (1st: DCM/MeOH/TEA. 97:3:3, as eluent; 2nd: acetone/MeOH/TEA, 95:5:5, as eluent) followed by crystallization from ethanol.



MW: 419.52 g.mol⁻¹.

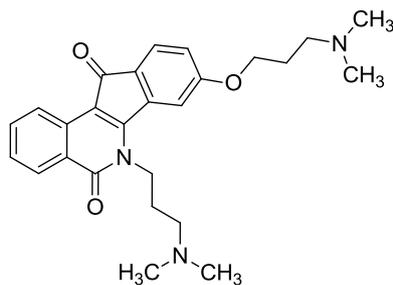
Yield: 10 mg, 1 % from the *cis*-isomer.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.36, (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.74 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.48 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.80 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.65 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 4.14 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 2.49 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.43 (s, 1H), 2.29 (s, 1H), 2.10-1.97 (m, 2H).

Anal. Calcd for C₂₅H₂₉N₃O₃: C, 71.57; H, 6.97; N, 10.02; Found: C, 71.20; H, 6.83, N, 9.73.

- **8-(3-Dimethylaminopropoxy)-6-(3-dimethylaminopropyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione (61)**

INDO **61** was obtained from **31** (3.17 g) as orange solid after two purifications by flash column chromatography on silica gel (1st: DCM/MeOH/TEA. 97:3:3, as eluent; 2nd: acetone/MeOH/TEA, 95:5:5, as eluent) followed by crystallization from ethanol.



MW: 433.53 g.mol⁻¹.

Yield: 145 mg, 36 % from the *cis*-isomer.

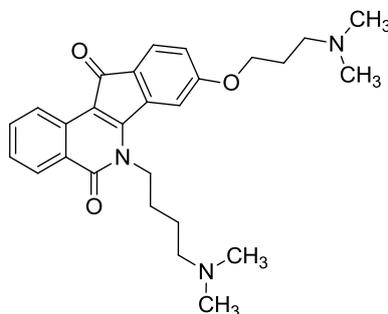
¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.72 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.33 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 0.7 Hz, 1H), 7.71 (td, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.46 (*J* = 7.6 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.73 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.9 Hz, 1H), 4.55 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.09 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.54-2.47 (m, 4H), 2.32 (s, 6H), 2.29 (s, 6H), 2.06-1.99 (m, 4H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 190.0, 163.5, 163.4, 153.9, 139.1, 133.7, 132.4, 128.3, 127.4, 127.1, 124.7, 123.6, 123.5, 113.9, 111.5, 109.0, 66.9, 57.7, 56.9, 45.8, 45.5, 27.4, 27.3.

Anal. Calcd for C₂₆H₃₁N₃O₃: C, 72.03; H, 7.21; N, 9.69; Found: C, 71.98; H: 7.27, N: 9.51.

- **8-(3-Dimethylaminopropoxy)-6-(4-dimethylaminopropyl)-6*H*-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione (62)**

INDO **62** was obtained from **32** (3.27 g) as red solid after two purifications by flash column chromatography on silica gel (1st: DCM/MeOH/TEA. 97:3:3, as eluent; 2nd: acetone/MeOH/TEA, 95:5:5, as eluent) followed by crystallization from ethanol.



MW: 447.57 g.mol⁻¹.

Yield: 88 mg, 6 % from the *cis*-isomer.

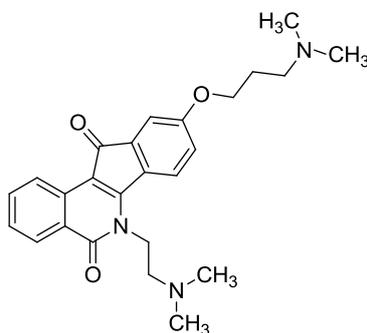
¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.70 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.72 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.51 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 4.07 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.46 (t, *J* = 2.46 Hz, 2H), 2.39 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.27 (s, 6H), 2.26 (s, 6H), 2.04-1.92 (m, 4H), 1.75-1.69 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 189.9, 163.5, 163.3, 153.8, 139.1, 133.6, 132.3, 128.4, 127.4, 127.1, 124.7, 123.6, 123.5, 113.6, 111.4, 109.6, 67.0, 58.8, 56.2, 45.6, 45.4, 44.4, 27.4, 27.0, 24.8.

Anal. Calcd for C₂₇H₃₃N₃O₃: C, 72.46; H, 7.43; N, 9.39; Found: C, 72.21, H, 7.42; N, 9.28;

• **9-(3-Dimethylaminopropoxy)-6-(2-dimethylaminoethyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione (63)**

INDO **63** was obtained from **33** (3.08 g) as red amorphous solid after two purifications by flash column chromatography on silica gel (1st: acetone/NH₃ 97:3, as eluent; 2nd: acetone/TEA, 80:20, as eluent).



MW: 419.52 g.mol⁻¹.

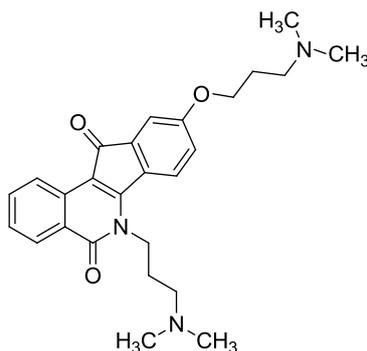
Yield: 59 mg, 5 % from the *cis*-isomer.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.56 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.24 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (td, *J* = 7.6 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.37 (td, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H), 4.45 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 4.05 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.69 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 2.48 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.38 (s, 6H), 2.28 (s, 6H), 1.94-2.03 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 189.7, 163.2, 161.8, 156.8, 137.9, 133.8, 132.5, 128.3, 127.9, 126.5, 123.9, 123.1, 122.5, 116.4, 111.3, 107.9, 66.8, 57.1, 56.1, 45.9, 45.4, 43.2, 27.2.

- **9-(3-Dimethylaminopropoxy)-6-(3-dimethylaminopropyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione (64)**

INDO **64** was obtained from isoquinolone **34** (3.17 g) as red amorphous solid after two purifications by flash column chromatography on silica gel (1st: acetone/NH₃ 97:3, as eluent; 2nd: acetone/TEA, 80:20, as eluent).



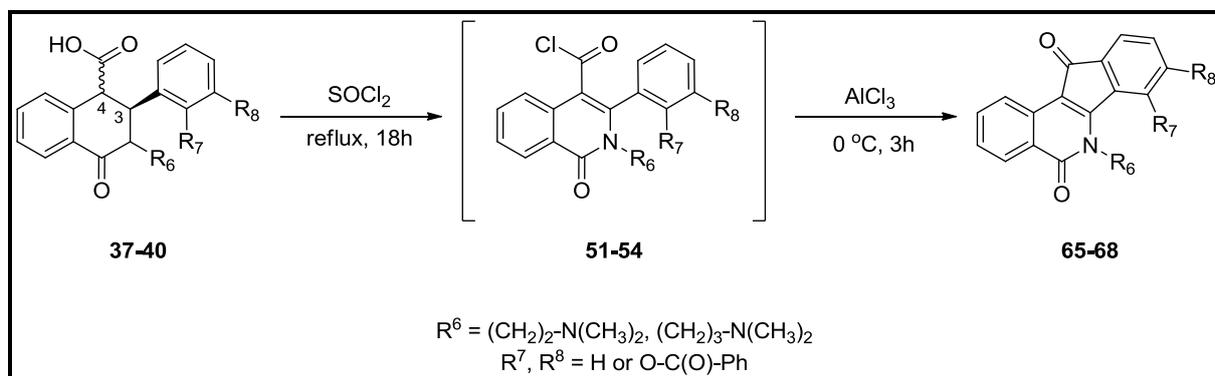
MW: 433.53 g.mol⁻¹.

Yield: 113 mg, 16 % from the *cis*-isomer.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.65 (td, *J* = 7.3 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.37 (td, *J* = 7.3 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.76 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H), 4.48 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 4.05 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.51-2.45 (m, 2H), 2.29 (s, 6H), 2.27 (s, 6H), 2.02-1.84 (m, 4H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 189.9, 163.5, 161.8, 156.9, 138.1, 133.8, 132.7, 128.4, 128.2, 126.5, 124.4, 123.2, 122.7, 116.4, 111.3, 107.9, 66.8, 57.0, 56.2, 45.9, 45.6, 43.7, 27.4, 27.3.

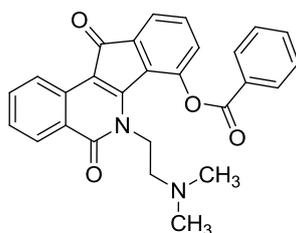
2.4.2. General procedure for the synthesis of INDOs 65-68



INDOs **65-68** were obtained by following the procedure described for INDOs **55-64** and using 8 equiv of aluminium chloride (7.47 g, 56 mmol) instead of 5 equiv.

- **6-(2-Dimethylaminoethyl)-5,11-dioxo-6,11-dihydro-5H-indeno[1,2-c]isoquinolin-7-yl benzoate (65)**

INDO **65** was obtained from **37** (3.21 g) as red amorphous solid after purification by flash column chromatography on silica gel (DCM/MeOH/TEA, 95:5:1, as eluent).



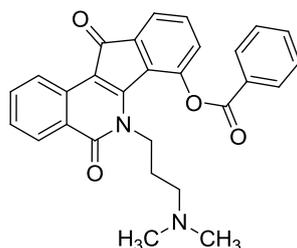
MW: 438.47 g.mol⁻¹.

Yield: 129 mg, 8 % from the *cis*-isomer.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.71 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.68 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.52-7.36 (m, 3H), 7.19-7.05 (m, 3H), 4.92 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.51 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.72 (s, 6H).

- **6-(3-Dimethylaminopropyl)-5,11-dioxo-6,11-dihydro-5H-indeno[1,2-c]isoquinolin-7-yl benzoate (66)**

INDO **66** was obtained from **38** (3.31 g) as red amorphous solid after purification by flash column chromatography on silica gel (DCM/MeOH/TEA, 95:5:1, as eluent). The evaluation of the yield from the *cis*-isomer was not possible due to the lack of information concerning the *cis/trans* ratio.



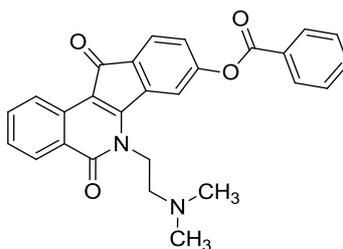
MW: 452.50 g.mol⁻¹.

Yield: 0.19 g.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.31 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.78-7.71 (m, 1H), 7.65-7.58 (m, 3H), 7.52-7.44 (m, 3H), 7.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.67 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.23 (br s, 2H), 2.13 (s, 6H), 1.93-1.84 (m, 2H).

- **6-(2-Dimethylaminoethyl)-5,11-dioxo-6,11-dihydro-5H-indeno[1,2-c]isoquinolin-8-yl benzoate (67)**

INDO **67** was obtained from **39** (3.21 g) as red amorphous solid after purification by flash column chromatography on silica gel (DCM/MeOH/TEA, 95:5:1, as eluent).



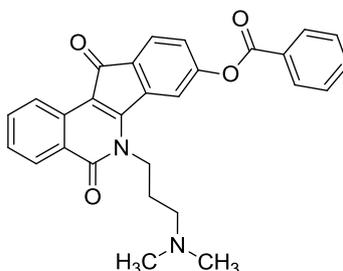
MW: 438.47 g.mol⁻¹.

Yield: 0.39 g, 41 % from *cis*-isomer.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.72 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.78-7.67 (m, 4H), 7.57-7.47 (m, 3H), 7.24 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.65 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.82 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.42 (s, 6H).

• **6-(3-Dimethylaminopropyl)-5,11-dioxo-6,11-dihydro-5*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-8-yl benzoate (68)**

INDO **68** was obtained from **40** (3.21 g) as red amorphous solid after purification by flash column chromatography on silica gel (DCM/MeOH/TEA, 95:5:1, as eluent).

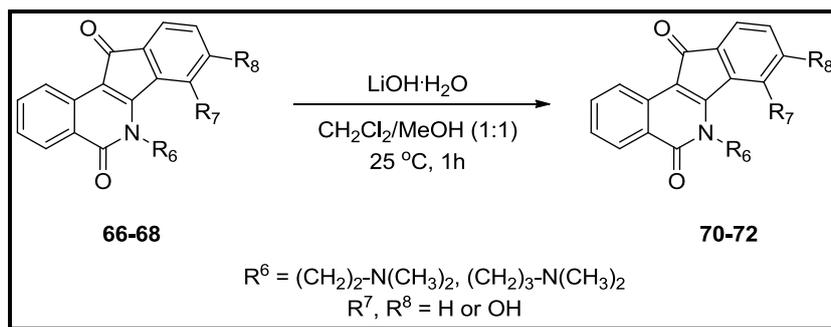


MW: 452.50 g.mol⁻¹.

Yield: 372 mg, 47 % from *cis*-isomer.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.72 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.77-7.68 (m, 3H), 7.60-7.46 (m, 3H), 7.24 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.56 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.46 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.17 (s, 6H), 2.05-1.99 (m, 2H).

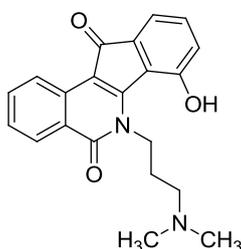
2.4.3. General procedure for the synthesis of INDOs 69-72



LiOH·H₂O (101 mg, 2.4 mmol, 3 equiv) was added to a mixture of **66-68** (0.8 mmol, 1 equiv) in CH₂Cl₂/MeOH (20 mL, 1:1). The reaction mixture was stirred for 1 h at 25 °C, acidified to pH = 1. The aqueous layer was washed with CH₂Cl₂ (3 × 20 mL), then made alkaline with NH₄OH until pH = 8, and extracted with ethyl acetate (3 × 40 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure.

- **7-Hydroxy-6-(3-dimethylaminopropyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione (70)**

INDO **70** was obtained from **66** (0.36 g) as red solid after recrystallization from methanol.



MW: 348.40 g.mol⁻¹.

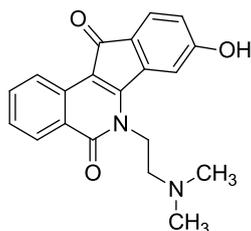
Yield: 90 mg, 32 %

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 8.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 7.75 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.43 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.22 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 6.96 (t, *J* = 6.6 Hz, 1 H), 4.98 (m, 2 H), 2.56 (t, *J* = 6.2 Hz, 2 H), 2.03-1.91 (m, 2 H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 190.2, 169.6, 161.1, 152.0, 137.5, 134.2, 133.1, 133.0, 128.5, 128.2, 126.5, 122.7, 122.3, 118.8, 113.6, 109.0, 56.0, 46.1, 44.5, 26.7.

- **8-Hydroxy-6-(2-dimethylaminoethyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione (71)**

INDO **71** was from **67** (0.36 g) as red solid after recrystallization from ethanol. Due to the very low solubility of the INDO **71** even in the DMSO, only ¹H NMR peaks could be characterized.



MW: 334.37 g.mol⁻¹.

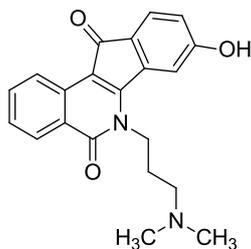
Yield: 71 mg, 26 %.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.80 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 6.78 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.60-4.52 (br s, 2H), 2.67-2.57 (br s, 2H), 2.27 (s, 6H).

Anal. Calcd for C₂₀H₁₈N₂O₃: C, 71.84; H, 5.43; N, 8.38; **Found:** C, 71.54, H, 5.48, N, 8.15.

• **8-Hydroxy-6-(3-dimethylaminopropyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione (72)**

INDO **72** was obtained from **68** (0.36 g) as red solid after recrystallization from ethanol. Due to the high insolubility of the INDO **72** even in the DMSO, only ¹H NMR peaks could be characterized.



MW: 348.40 g.mol⁻¹.

Yield: 105 mg, 36 %.

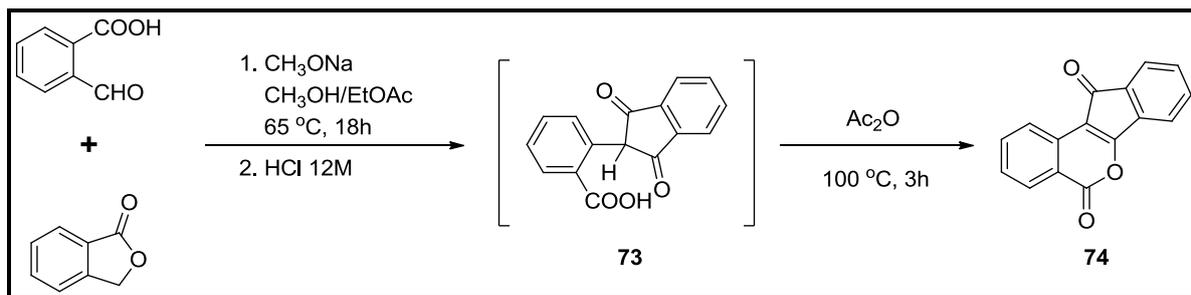
¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.79 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.50 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.44 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.44 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.20 (s, 6H), 1.93-1.84 (m, 2H).

Anal. Calcd for C₂₁H₂₀N₂O₃: C, 72.40; H, 5.79; N, 8.04; **Found:** C, 72.15; H, 5.70; N, 8.01

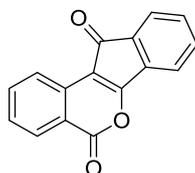
3. Series II

3.1. Synthesis of benz[*d*]indeno[1,2-*b*]pyran-5,11-dione

Procedure to the synthesis of benz[*d*]indeno[1,2-*b*]pyran-5,11-dione (**74**)



To a suspension of 2-carboxybenzaldehyde (3.00 g, 20.0 mmol, 1.0 equiv) and phthalide (2.68 g, 20.0 mmol, 1.0 equiv) in EtOAc (10 mL) a solution of sodium methoxide (25 mL of 3.2 M methanolic solution) was added at 65 °C. The resulting mixture was maintained at 65 °C for 18 h under stirring. The mixture was subsequently diluted at 0 °C with distilled water (50 mL), washed with Et₂O (3 × 50 mL) and acidified with 12 M HCl until pH = 1. The resulting yellow precipitate **73** was filtered, dried *in vacuo*. Then a mixture of **73** and acetic anhydride (60 mL) was stirred at 100 °C for 3h and cooled to room temperature. The resulting solid was filtrated and washed with Et₂O to give the desired product as bright orange solid.



MW: 248.23 g.mol⁻¹.

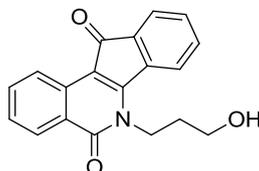
Yield: 2.75 g, 57 %.

mp: 257-259 °C.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.40 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.83 (dd, *J* = 8.9 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.57-7.49 (m, 4H).

- **6-(3-Hydroxypropyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione (76)**

Compound **76** was prepared from **74** and 3-aminopropan-1-ol (3.0 mL).



MW: 305.33 g.mol⁻¹.

Yield: 1.16 g, 95 %.

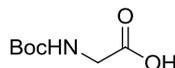
mp: 191-192 °C.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.47 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.79-7.65 (m, 2H), 7.54-7.42 (m, 4H), 4.75 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.72 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.26 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 2.19-2.15 (m, 2H).

3.3. Synthesis of *N*-protected amino acids 83-85

- ***N*^α-Boc-glycine (83)**

A solution of Boc₂O (4.80 g, 22 mmol, 1.1 equiv) in Et₂O (50 ml) was added to a solution of glycine (1.50 g, 20 mmol, 1.0 equiv) in 1.6 M NaOH (50 ml). The mixture was stirred vigorously at room temperature for 18h. The layers were separated and the aqueous phase was made acid (pH = 2) with 6 M HCl and extracted with Et₂O (4 x 100 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ filtrated and the solvent evaporated to give the targeted product as white crystals.



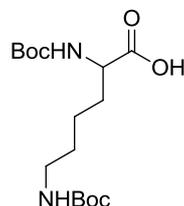
MW: 175.18 g.mol⁻¹.

Yield: 2.14 g, 61 %

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 5.21 (br s, 1H), 3.95 (s, 2H), 1.46 (s, 9H).

- **(L)-, (D)- or (DL)- N^α, N^ϵ -Di-Boc-lysine (84)**

To a solution of appropriate (*L*)-, (*D*)- or (*DL*)-lysine hydrochloride (913 mg, 5 mmol, 1.0 equiv) in 2 M NaOH/1,4-dioxane solution (20 mL, 1:1) was added Boc_2O (2.73 g, 12.5 mmol, 2.5 equiv). The reaction mixture was stirred for 18h at room temperature and subsequently concentrated *in vacuo* to remove as much 1,4-dioxane as possible. 20 % (w/v) aqueous KHSO_4 solution was added until $\text{pH} = 2$ and the product was extracted with EtOAc (2 x 20 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and the solvent evaporated to give the desired product as colorless oil.



MW: 346.42 g.mol⁻¹.

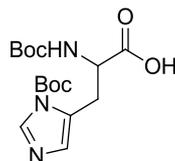
Yield: 1.30 g, 75 %

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 6.99 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.76 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 3.85-3.78 (m, 1H), 2.88 (m, 2 H), 1.69-1.21 (m, 24 H).

$[\alpha]_D^{20}$: (*L*): + 14.2 (*c* 0.4, CHCl₃), (*D*): -14.1 (*c* 0.4, CHCl₃)

- **(L)-, (D)- or (DL)- N^α, N^π -Di-Boc-histidine (85)**

Boc_2O (1.41 g, 6.5 mmol, 2.5 equiv) and TEA (1.1 mL, 8.0 mmol, 3.1 equiv) were added to a suspension of appropriate (*L*)-, (*D*)- or (*DL*)-histidine hydrochloride (541 mg, 2.6 mmol, 1.0 equiv) in MeOH. The resulting mixture was stirred at room temperature for 18h and concentrated *in vacuo*. The residue was taken up in Et₂O and in distilled H₂O mixture (50 mL, 2:1). The aqueous layer was separated, acidified to $\text{pH} = 3$ with 20 % (w/v) KHSO_4 solution and extracted with EtOAc (3 x 15 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 . The solution was filtered and the solvent was evaporated *in vacuo* to afford the pure product as colorless crystals.



MW: 355.39 g.mol⁻¹.

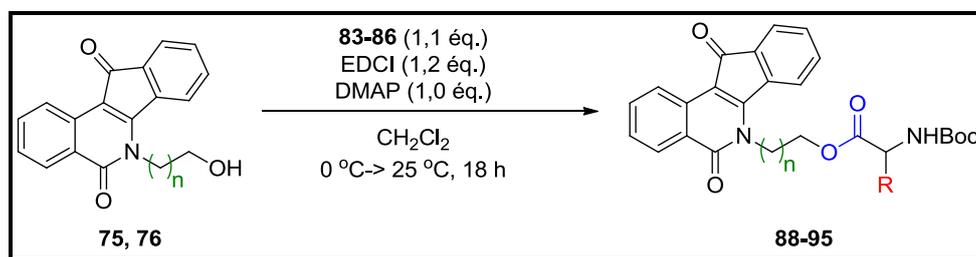
Yield: 550 mg, 60 %

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.18 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 5.51 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.51-4.46 (m, 1H), 3.33-3.16 (m, 2H), 1.62 (s, 9H), 1.49 (s, 9H).

[α]²⁰_D: (*L*): +83.3 (*c* 0.4, CHCl₃), (*D*): -83.2 (*c* 0.4, CHCl₃)

3.4. Synthesis of INDOs 117-122

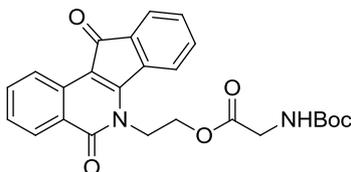
3.4.1. General procedure for the synthesis of 6-(*N*-Boc-aminoacyl-oxyalkyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-diones 84-91



To a suspension of **75** or **76** (1.1 mmol, 1.0 equiv) in DCM (8 mL), DMAP (134 mg, 1.1 mmol, 1.0 equiv) and the *N*-Boc-protected amino acid **83-86** (1.2 mmol, 1.1 equiv) were added. The resulting mixture was cooled to 0 °C and EDCI (211 mg, 1.3 mmol, 1.2 equiv) was subsequently added. The mixture was stirred at 0 °C for 2 h, then at room temperature for 18 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was taken up in EtOAc-distilled H₂O mixture (60 mL, 2:1). The organic layer was separated, washed with saturated NaHCO₃ (2 × 15 mL) and distilled H₂O (2 × 15 mL), dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/EtOAc, 8:2, as eluent) provided the desired products.

- **6-(*N*-Boc-glycyl-oxyethyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione (88)**

INDO **88** was obtained as a red amorphous solid from **75** (320 mg) and *N*^α-Boc-glycine **83** (212 mg).



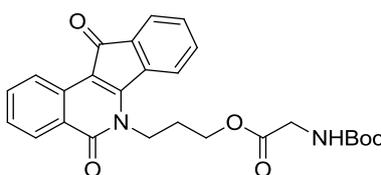
MW: 448.47 g.mol⁻¹.

Yield: 301 mg, 61 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.76 (dd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.69-7.66 (m, 2H), 7.53-7.40 (m, 3H), 4.93 (s, 1H), 4.85 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.65 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.81 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H).

- **6-(*N*-Boc-glycyl-oxypropyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione (89)**

INDO **89** was obtained as red amorphous solid from **76** (336 mg) and *N*^α-Boc-glycine **83** (212 mg).



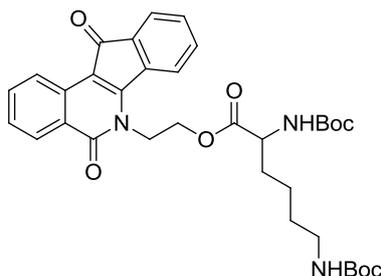
MW: 462.49 g.mol⁻¹.

Yield: 295 mg, 58 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.75 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.67-7.61 (m, 2H), 7.52-7.35 (m, 3H), 5.01 (s, 1H), 4.66 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.41 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.00 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.36-2.19 (m, 2H), 1.43 (s, 9H).

- **(L)-, (D)-, (DL)-6-(N^α, N^ϵ -Di-Boc-lysyl-oxyethyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-diones (90)**

(L)-, (D)-, (DL)-90 were obtained from **75** (320 mg) and appropriate **(L)-, (D)** or **(DL)- N^α, N^ϵ -di-Boc-lysine 84** (419 mg) as bright red amorphous solid.



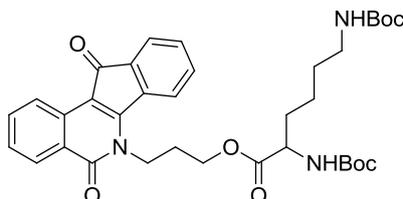
MW: 619.70 g.mol⁻¹.

Yield (average): 423 mg, 62 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.74 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.35 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.79-7.72 (m, 2H), 7.66 (dd, J = 7.0 Hz, J = 1.3 Hz, 1H), 7.53-7.41 (m, 3H), 5.01 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.92-4.85 (m, 2H), 4.64-4.58 (m, 3H), 4.14 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 3.00 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 1.65-1.58 (m, 2H), 1.35-1.21 (m, 4H), 1.51 (s, 9H), 1.41 (s, 9H).

- **(L)-, (D)-, (DL)-6-(N^α, N^ϵ -Di-Boc-lysyl-oxypropyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-diones (91)**

(L)-, (D)-, (DL)-91 was obtained from **76** (336 mg) and appropriate **(L)-, (D)** or **(DL)- N^α, N^ϵ -di-Boc-lysine 84** (419 mg) as bright red amorphous solid.



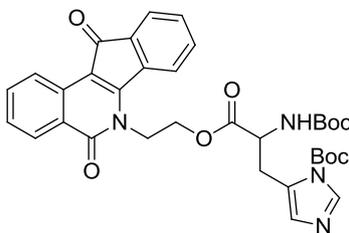
MW: 633.73 g.mol⁻¹.

Yield (average): 362 mg, 52 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.73 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.76 (td, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.68-7.62 (m, 2H), 7.56-7.41 (m, 3H), 5.19 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.76-4.58 (m, 3H), 4.47-4.32 (m, 3H), 3.17-3.11 (m, 2H), 2.36-2.27 (m, 2H), 1.91-1.73 (m, 2H), 1.56-1.50 (m, 2H), 1.48-1.43 (m, 20H).

- **(L)-, (D)-, (DL)-6-(*N*^α,*N*^π-Di-Boc-histidyl-oxyethyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-diones (92)**

(L)-, (D)-, (DL)-**92** was obtained from **75** (320 mg) and appropriate (L)-, (D) or (DL)-*N*^α,*N*^π-di-Boc-histidine **85** (430 mg) as bright red amorphous solid.



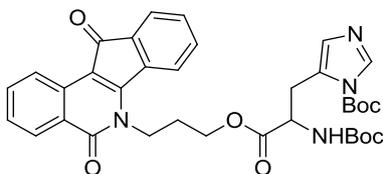
MW: 628.67 g.mol⁻¹.

Yield (average): 520 mg, 75 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.34 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.74 (td, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.64 (dd, *J* = 6.5 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.50-7.38 (m, 3H), 7.04 (s, 1H), 5.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.85 (t, *J* = 4.2 Hz, 2H), 4.77-4.45 (m, 3H), 2.99-2.90 (m, 2H), 1.60 (s, 9H), 1.42 (s, 9H).

- **6-(*N*^α,*N*^π-Di-Boc-histidyl-oxypropyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-diones (93)**

(L)-, (D)-, (DL)-**93** was obtained from **76** (336 mg) and appropriate (L)-, (D) or (DL)-*N*^α,*N*^π-di-Boc-histidine **85** (430 mg) as bright red amorphous solids.



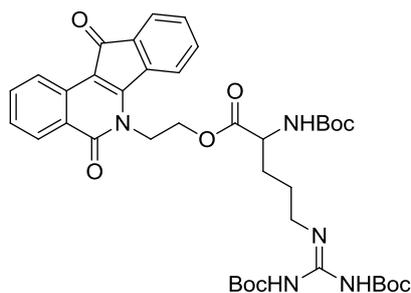
MW: 642.70 g.mol⁻¹.

Yield (average): 339 mg, 48 %

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.71 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.33 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.73 (td, J = 7.1 Hz, J = 1.3 Hz, 1H), 7.67-7.61 (m, 2H), 7.55-7.38 (m, 3H), 7.19 (s, 1H), 5.87 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 4.68-4.58 (m, 3H), 4.45-4.30 (m, 2H), 3.18-3.05 (m, 2H), 2.33-2.24 (m, 2H), 1.56 (s, 9H), 1.42 (s, 9H).

- **(L)-6-(N^α,N^ω,N^{ω'}-Tri-Boc-argininyl-oxyethyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione ((L)-94)**

INDO (L)-94 was obtained as a red amorphous solid from **75** (320 mg) and (L)-N^α,N^ω,N^{ω'}-Tri-Boc-arginine (L)-86 (574 mg).



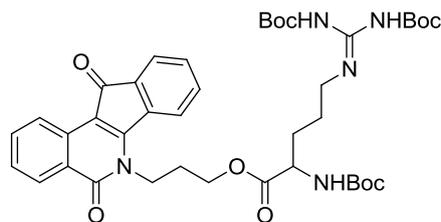
MW: 747.83 g.mol⁻¹.

Yield: 0.72 g, 88 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 9.34 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 8.68 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.30 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.74-7.69 (m, 2H), 7.60 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.52-7.36 (m, 3H), 5.50 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.80 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 4.66-4.49 (m, 2H), 4.16 (br s, 1H), 3.85-3.74 (m, 2H), 1.71-1.52 (m, 4H), 1.49 (s, 18H), 1.40 (s, 9H).

- **(L)-6-(N^α,N^ω,N^{ω'}-Tri-Boc-argininyl-oxypropyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione ((L)-95)**

INDO (L)-95 was obtained as a red amorphous solid from **76** (336 mg) and (L)-N^α,N^ω,N^{ω'}-tri-Boc-arginine (L)-86 (574 mg).



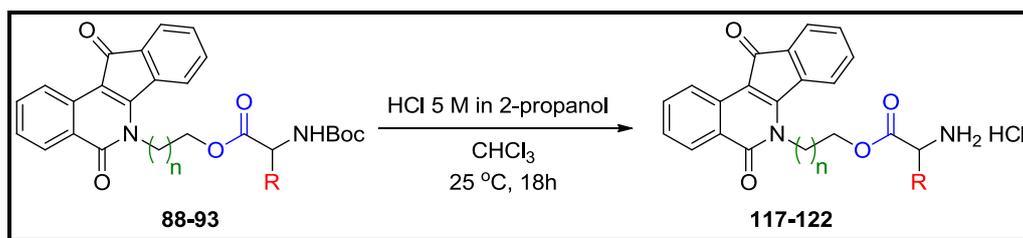
MW: 761.86 g.mol⁻¹.

Yield: 0.69 g, 82 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 9.28 (br s, 1H), 9.15 (br s, 1H), 8.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.59 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.50-7.24 (m, 5H), 5.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.49 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 4.41-4.23 (m, 3H), 3.96-3.79 (m, 2H), 2.21 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.89-1.60 (m, 6H), 1.46 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.39 (s, 9H).

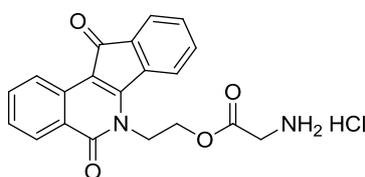
3.4.2. General procedure for the synthesis of compounds 117-122

To a solution of **88-93** (0.2 mmol) in CHCl₃ (5 mL), HCl 5 M in 2-propanol (1 mL) was slowly added at 0 °C. The resulting mixture was stirred at room temperature for 18 h. The precipitated product was filtered, washed with CHCl₃ and Et₂O and dried *in vacuo* to afford the desired products.



- **6-(Glycyl-oxyethyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione hydrochloride (117)**

INDO **117** was obtained from **88** (90 mg) as a red amorphous solid.



MW: 384.81 g.mol⁻¹.

Yield: 48 mg, 62 %.

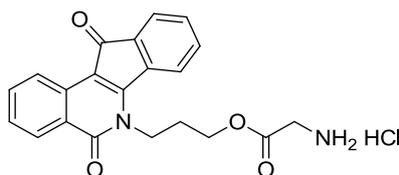
¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.61-8.58 (m, 1H), 8.37 (br s, 2H), 8.24-8.22 (m, 1H), 8.13 (br s, 1H), 7.91-7.83 (m, 2H), 7.61-7.52 (m, 4H), 4.81 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 4.63 (br s, 2H), 3.59 (br s, 2H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 190.3, 168.0, 163.0, 156.6, 136.8, 134.6, 134.5, 134.2, 132.1, 131.7, 128.4, 127.5, 124.1, 123.0, 122.9 (br, 2C), 107.7, 63.1, 43.2, 40.3.

HRMS calcd for C₂₀H₁₇N₂O₄ [M+H]⁺ 349.1183, found 349.1180.

- **6-(Glycyl-oxypropyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione hydrochloride (118)**

INDO **118** was obtained from compound **89** (92 mg) as a red amorphous solid.



MW: 398.84 g.mol⁻¹.

Yield: 41 mg, 52 %.

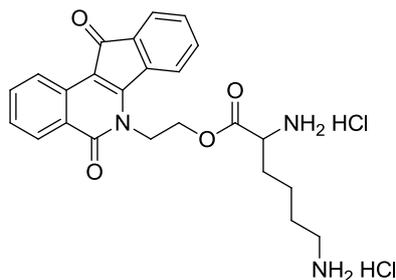
¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.54 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.45 (br s, 2H), 8.19 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.83-7.79 (m, 2H), 7.63-7.47 (m, 4H), 4.59 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.35 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.81 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 2.19 (m, 2H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 189.9, 167.6, 162.5, 156.1, 136.3, 134.3, 134.1, 134.0, 131.8, 131.3, 128.0, 127.1, 123.7, 122.7, 122.7, 122.6, 107.1, 63.3, 41.2, 39.7, 28.0.

HRMS calcd for C₂₁H₁₉N₂O₄ [M+H]⁺ 363.1339, found 363.1337.

- **(L)-, (D)-, (DL)-6-(Lysyl-oxyethyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione dihydrochlorides (119).**

(L)-, (D)- or (DL)-**119** were obtained from (L)-, (D)- or (DL)-**90** (124 mg) as red amorphous solids.



MW: 492.39 g.mol⁻¹.

Yield (average): 63 mg, 64 %

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.57 (br d, *J* = 8.0 Hz, 4H), 8.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.00 (br s, 3H), 7.95 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.83 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.62-7.50 (m, 4H), 4.85 (br s, 2H), 4.70-4.54 (m, 2H), 3.77 (br s, 1H), 2.62 (br s, 2H), 1.59-1.05 (m, 6H).

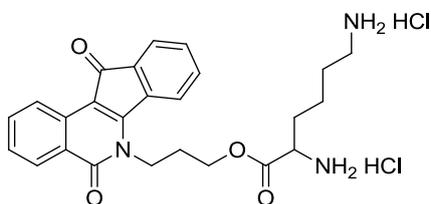
¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 190.4, 169.8, 163.0, 156.7, 136.9, 134.6, 134.5, 134.3, 132.1, 131.8, 128.5, 127.7, 124.5 (br, 2C), 123.1, 123.0, 107.7, 63.6, 52.2, 43.1, 38.5, 29.3, 26.6, 21.7.

[α]²⁰_D: (*L*): +10.1 (*c* 0.2, MeOH), (*D*): -6.7 (*c* 0.2, MeOH).

HRMS calcd for C₂₄H₂₆N₃O₄ [M+H]⁺ 420.1918, found 420.1917.

- (*L*)-, (*D*)-, (*DL*)-6-(Lysyl-oxypropyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione dihydrochlorides (**120**)

(*L*)-, (*D*)- or (*DL*)-**120** were obtained from (*L*)-, (*D*)- or (*DL*)-**91** (127 mg) as red amorphous solids.



MW: 506.42 g.mol⁻¹.

Yield (average): 81 mg, 79 %.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.69 (br s, 3H), 8.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.19-8.13 (m, 4H), 7.82-7.77 (m, 2H), 7.62-7.47 (m, 4H), 4.59 (br s, 2H), 4.38-4.32 (m, 2H), 4.00 (br s, 1H), 2.76 (br s, 2H), 2.19 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.88 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.60-1.50 (m, 4H).

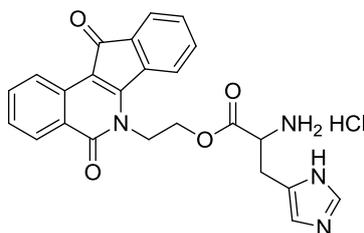
¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 190.3, 169.9, 163.0, 156.0, 136.2, 134.2, 134.00 (br, 2C), 131.7, 131.3, 128.1, 127.1, 123.7, 122.7, 122.6, 122.5, 107.0, 63.5, 51.6, 41.2, 38.1, 29.2, 28.0, 26.3, 21.2.

[α]²⁰_D: (*L*): +11.1 (*c* 0.2, MeOH), (*D*): -8.1 (*c* 0.2, MeOH).

HRMS calcd for C₂₅H₂₈N₃O₄ [M+H]⁺ 433.2074, found 433.2070.

- (*L*)-, (*D*)-, (*DL*)-6-(Histidyl-oxyethyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione hydrochlorides (**121**)

(*L*)-, (*D*)- or (*DL*)-**121** were obtained from (*L*)-, (*D*)- or (*DL*)-**92** (126 mg) as dark red amorphous solids.



MW: 464.90 g.mol⁻¹.

Yield (average): 72 mg, 77 %

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.06 (s, 1H), 8.73 (br s, 2H), 8.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.83 (td, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.60-7.47 (m, 5H), 7.43 (s, 1H), 4.83 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.72-4.57 (m, 2H), 4.34 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.25-3.07 (m, 2H).

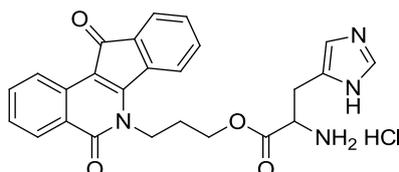
¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 190.5, 168.5, 163.2, 156.8, 137.0, 134.8, 134.7, 134.5, 134.4, 132.3, 131.8, 128.6, 127.7, 126.9, 124.3, 123.2, 123.2, 123.1, 118.6, 107.8, 63.8, 51.4, 43.0, 24.6.

[α]²⁰_D: (*L*): -1.1 (*c* 0.2, MeOH), (*D*): +7.6 (*c* 0.2, MeOH).

HRMS calcd for C₂₄H₂₁N₄O₄ [M+H]⁺ 429.1557, found 429.1551.

- (L)-, (D)-, (DL)-6-(Histidyl-oxypropyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione hydrochlorides (**122**).

(L)-, (D)- or (DL)-**122** were obtained from (L)-, (D)- or (DL)-**93** (129 mg) as red amorphous solids.



MW: 478.93 g.mol⁻¹.

Yield (average): 61 mg, 64 %

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.09 (s, 1H), 8.92 (br s, 2H), 8.50 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.76 (m, 2H), 7.57-7.48 (m, 4H), 4.60-4.48 (m, 3H), 4.34 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.50-3.36 (m, 2H), 2.19-2.10 (br t, *J* = 6.1 Hz, 2H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 189.7, 168.1, 162.4, 155.9, 136.1, 134.1, 134.1, 134.0, 133.9, 131.6, 131.2, 128.0, 127.0, 126.6, 123.6, 122.6, 122.5, 122.4, 118.2, 107.0, 64.3, 51.6, 41.6, 28.4, 25.6.

[α]²⁰_D: (L): +8.7 (*c* 0.2, MeOH), (D): -4.0 (*c* 0.2, MeOH).

HRMS calcd for C₂₅H₂₃N₄O₄ [M+H]⁺ 443.1714, found 443.1701.

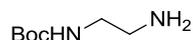
3.5. Synthesis of INDO intermediates **81** and **82**

3.5.1. Monoprotection of diamines

- 2-(Boc-amino)-ethylamine (**77**)

A solution of Boc₂O (7.27 g, 33.3 mmol, 1.0 equiv) in THF (30 mL) was added dropwise at 0 °C, over 30min to a stirred solution of ethylenediamine (6.7 mL, 100 mmol, 3.0 equiv) dissolved in THF at room temperature for 18h. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue taken up in EtOAc-brine mixture (1:1, 100 mL). The organic phase was washed with brine (2 × 15 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo* to

afford a colorless oil. The crude desired product was used in the next step without further purification.



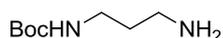
MW: 160.21 g.mol⁻¹.

Yield: 4.62 g, 87 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 5.01 (br s, 1H), 3.20-3.12 (m, 2H), 2.78 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.31 (s, 2H).

- **3-(Boc-amino)-propylamine (78)**

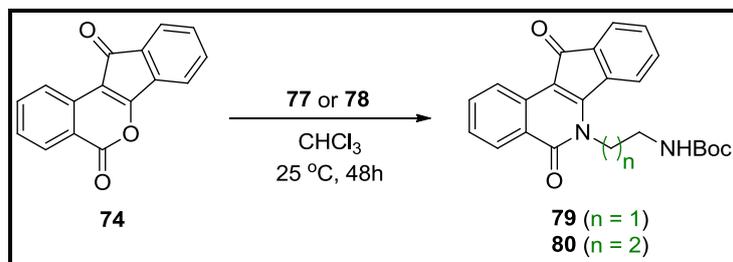
A solution of Boc₂O (2.18 g, 10.0 mmol, 1.0 equiv) in CHCl₃ (20 mL) was added dropwise over 3 h to a stirred solution of 1,3-diaminepropane (4.1 mL, 50.0 mmol, 5.0 equiv) dissolved in CHCl₃ (200 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 18h and filtered. The filtrate was subsequently concentrated *in vacuo* and the resulting oil was dissolved in EtOAc (100 mL), washed with brine (3 × 30 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to afford a colorless oil. The crude product was used in the next step without further purification.



MW: 174.24 g.mol⁻¹.

Yield: 1.39 g, 80 %.

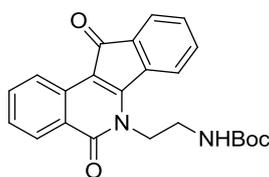
¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 4.96 (br s, 1H), 3.29-3.18 (m, 2H), 2.78-2.74 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.65-1.56 (m, 2H), 1.44 (s, 9H).

3.5.2. Synthesis of intermediates **79** and **80**General procedure for the synthesis of 6-(Boc-aminoalkyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-diones **79**, **80**

Appropriate Boc-aminoalkylamine **79** or **80** (8.4 mmol, 1.5 equiv) was added To a suspension of **74** (5.6 mmol, 1.0 equiv, 1.39 g) in CHCl_3 (28 mL). After stirring at room temperature for 72h, the reaction mixture was diluted with CHCl_3 (125 mL), washed with distilled H_2O (3×50 mL) and brine (1×50 mL), dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to afford the desired product as an orange-red solid. The crude product was used in the next step without further purification.

- **6-(2-Boc-aminoethyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione (**79**).**

INDO **79** was prepared from **74** and **77** (1.35 g).



MW: 390.43 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

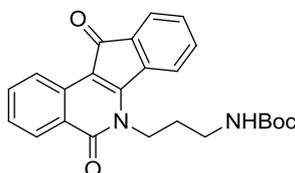
Yield: 2.07 g, 95 %.

mp: 243-245 $^\circ\text{C}$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 8.75 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.76 (td, $J = 7.0$ Hz, $J = 1.3$ Hz, 1H), 7.67-7.63 (m, 1H), 7.54-7.35 (m, 3H), 5.05 (br. s, 1H), 4.69 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.67 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.41 (s, 9H).

- **6-(3-Boc-aminopropyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione (80).**

INDO **80** was prepared from **74** and **78** (1.46 g).



MW: 404.46 g.mol⁻¹.

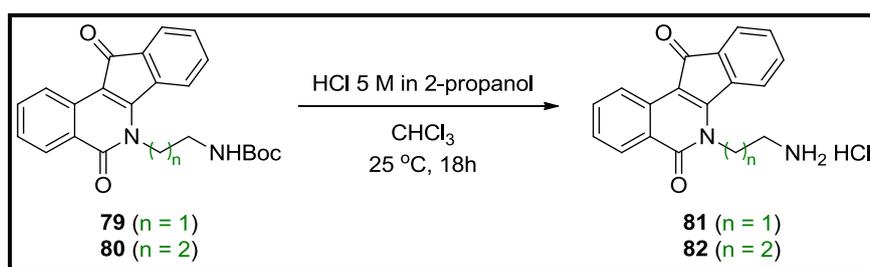
Yield: 2.06 g, 91 %.

mp: 269-270 °C.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.69 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.74 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.57-7.38 (m, 4H), 5.39 (s, 1H), 4.63 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.28 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.10 (m, 2H), 1.46 (s, 9H).

3.5.3. Synthesis of intermediates **81** and **82**

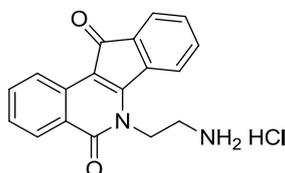
General procedure for the synthesis of 6-aminoalkyl-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione hydrochlorides **81 and **82****



A solution of HCl 5 M in 2-propanol (10 mL) was added dropwise. The resulting mixture was stirred at room temperature for 18h to a solution of compound **79** or **80** (2.5 mmol) in CHCl₃ (125 mL). The precipitated product was filtered, washed with CHCl₃ and Et₂O and dried *in vacuo* to afford the desired product as an orange-red solid. The crude product was used in the next step without further purification.

- **6-(2-Aminoethyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione hydrochloride (81)**

INDO **81** was prepared from **79** (0.98 g).



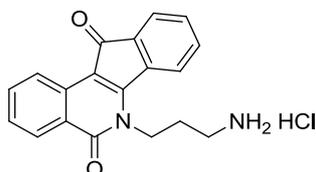
MW: 326.78 g.mol⁻¹.

Yield: 0.62 g, 76 %.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.53 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.44 (br s, 3H), 8.19 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.81 (td, *J* = 7.0 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.57-7.47 (m, 4H), 4.75 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.24 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H).

- **6-(3-Aminopropyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione hydrochloride (82)**

INDO **82** was prepared from **80** (1.00 g).



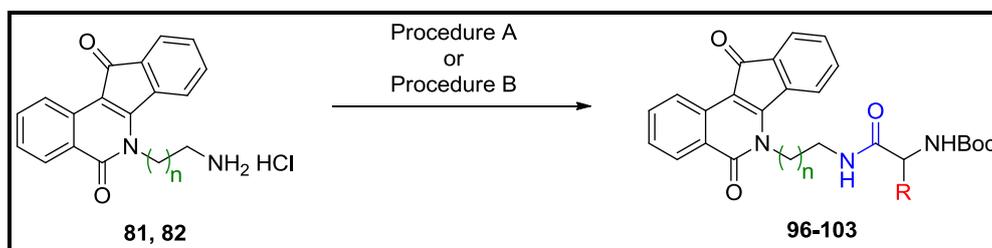
MW: 340.80 g.mol⁻¹.

Yield: 0.74 g, 87 %.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.08 (br s, 3H), 7.83-7.78 (m, 2H), 7.60-7.47 (m, 4H), 4.54 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.01-2.86 (m, 2H), 2.13 (m, 2H).

3.6. Synthesis of INDOs 125-132

3.6.1. General procedures A or B for the synthesis of 6-(*N*-Boc-aminoacyl-aminoalkyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-diones 96-103

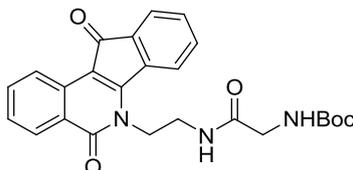


Procedure A: EDCI (0.86 mmol, 2.0 equiv), HOBt (0.86 mmol, 2.0 equiv) and triethylamine (1.1 mmol, 2.5 equiv) were added successively to a solution of the appropriate *N*-Boc-protected amino acid (0.86 mmol, 2.0 equiv) in dry THF (5 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 15 min, then a solution **81** or **82** (0.43 mmol, 1.0 equiv) and TEA (0.64 mmol, 1.5 equiv) in dry THF (6 mL) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 18h. The solvent was evaporated and the residue was diluted with CHCl₃ (50 mL). The organic layer was washed with 0.1 M HCl (2 × 15 mL), distilled H₂O (2 × 15 mL), 0.5 M NaHCO₃ (2 × 15 mL), brine (2 × 15 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography on silica gel (DCM/EtOAc, 8:2, as eluent) furnished the desired products.

Procedure B: appropriate (*L*-), (*D*-), (*DL*-)*N*-Boc-protected amino acid (0.64 mmol, 1.5 equiv), HBTU (0.86 mmol, 2.0 equiv), HOBt (0.86 mmol, 2.0 equiv), and *N,N*-diisopropylethylamine (2.15 mmol, 5.0 equiv) was added successively to a solution of compound **81** or **82** (0.43 mmol, 1.0 equiv) in DCM (3 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 4h, diluted with DCM (50 mL) and washed with 1.0 M NaHCO₃ solution (2 × 15 mL). The organic layer was separated and dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/EtOAc, 8:2, as eluent) yielded the desired products.

- **6-(*N*-Boc-glycyl-aminoethyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione (96)**

INDO **96** was obtained from **81** (141 mg) and *N*^α-Boc-glycine **83** (151 mg) according to procedure A as a red amorphous solid.



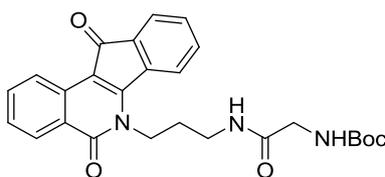
MW: 447.48 g.mol⁻¹.

Yield: 129 mg, 67 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.74 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.77 (td, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.67-7.63 (m, 1H), 7.57-7.40 (m, 3H), 6.91 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.71 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.83-3.78 (m, 4H), 1.47 (s, 9H).

- **6-(*N*-Boc-glycyl-aminopropyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione (97)**

INDO **97** was obtained from **82** (147 mg) and *N*^α-Boc-glycine **83** (151 mg) according to procedure A as a bright red amorphous solid.



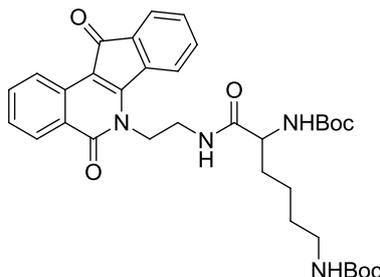
MW: 461.51 g.mol⁻¹.

Yield: 161 mg, 81 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.68 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.47-7.32 (m, 5H), 5.43 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.54 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.89 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.39 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.09 (m, 2H), 1.44 (s, 9H).

- **(L)-, (D)-, (DL)-6-(N^α, N^ϵ -Di-Boc-lysyl-aminoethyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-diones (98)**

(L)-, (D)-, (DL)-98 was obtained from **81** (141 mg) and appropriate **(L)-, (D)-, (DL)- N^α, N^ϵ -di-Boc-lysine 84** (298 mg) according to procedure A as red amorphous solids.



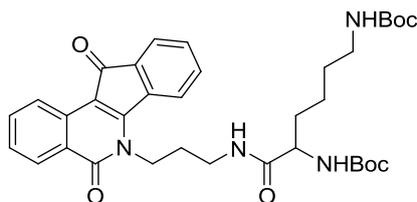
MW: 618.72 g.mol⁻¹.

Yield (average): 176 mg, 66 %

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.72 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.33 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.75 (td, J = 7.7 Hz, J = 1.3 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.53-7.24 (m, 3H), 6.97 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 5.12 (br s, 1H), 4.69 (td, J = 6.1 Hz, J = 2.2 Hz, 2H), 4.61 (br s, 1H), 4.07 (br s, 1H), 3.78 (m, 2H), 3.05 (q, J = 6.1 Hz, 2H), 1.86-1.80 (m, 1H), 1.61-1.57 (m, 1H), 1.45 (br s, 18H), 1.44-1.27 (m, 4H).

- **(L)-, (D)-, (DL)-6-(N^α, N^ϵ -Di-Boc-lysyl-aminopropyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-diones (99)**

(L)-, (D)-, (DL)-99 was obtained from **82** (147 mg) and appropriate **(L)-, (D)-, (DL)- N^α, N^ϵ -di-Boc-lysine 84** (298 mg) according to procedure A as bright red amorphous solids.



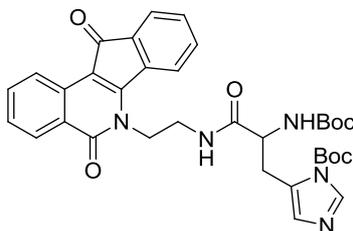
MW: 632.75 g.mol⁻¹.

Yield (average): 161 mg, 59 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.76 (td, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.65 (dd, *J* = 6.7 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.55-7.40 (m, 4H), 7.21 (s, 1H), 5.25 (s, 1H), 4.72-4.53 (m, 3H), 4.17-4.10 (m, 1H), 3.49-3.21 (m, 2H), 3.14 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.17-2.10 (m, 2H), 1.76-1.65 (m, 2H), 1.57-1.50 (m, 2H), 1.47-1.44 (m, 20H).

- (*L*)-, (*D*)-, (*DL*)-6-(*N*^α,*N*^π-Di-Boc-histidyl-aminoethyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-diones (**100**)

(*L*)-**100** was obtained from compound **81** (141 mg) and (*L*)-*N*^α,*N*^π-di-Boc-histidine (*L*)-**85** (306 mg) according to procedure A as red amorphous solids. INDOs (*DL*)-**100** and (*D*)-**100** were obtained from compounds **81** (141 mg) and appropriate (*DL*)- or (*D*)-*N*^α,*N*^π-di-Boc-histidine **85** (229 mg) according to procedure B.



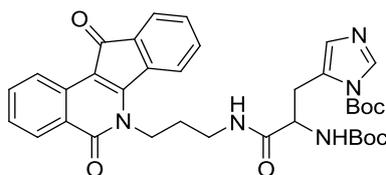
MW: 627.69 g.mol⁻¹.

Yields: 224 mg, 83 % (procedure A), 202 mg, 75 % (procedure B, average).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.76 (td, *J* = 7.6 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 7.0 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H), 7.57-7.39 (m, 4H), 7.15 (s, 1H), 6.16 (m, 1H), 4.70-4.50 (m, 2H), 4.46-4.38 (m, 1H), 3.72 (td, *J* = 6.9 Hz, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.13-2.86 (m, 2H), 1.58 (s, 9H), 1.47 (s, 9H).

- **(L)-, (D)-, (DL)-6-(N^α, N^π -Di-Boc-histidyl-aminopropyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-diones (101)**

(L)-101 and **(DL)-101** were obtained from **82** (147 mg) and appropriate (*L*)- or (*DL*)- N^α, N^π -di-Boc-histidine **85** (306 mg) according to procedure A. **(D)-101** was obtained from **82** and (*D*)- N^α, N^π -di-Boc-histidine **(D)-85** (229 mg) according to procedure B.



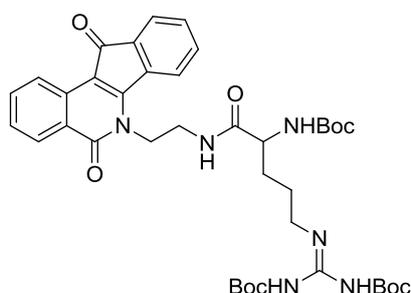
MW: 641.71 g.mol⁻¹.

Yields: 188 mg, 68 % (procedure A, average), 240 mg, 87 % (procedure B).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.72 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.75 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.53-7.39 (m, 4H), 7.21 (s, 1H), 6.22 (br s, 1H), 4.68-4.44 (m, 2H), 3.49-3.47 (m, 2H), 3.19-2.99 (m, 2H), 2.10-2.01 (m, 2H), 1.57 (s, 9H), 1.48 (s, 9H).

- **6-($N^\alpha, N^\omega, N^{\omega'}$ -Tri-Boc-(*L*)-arginyl-aminoethyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione ((*L*)-102).**

(L)-102 was prepared from **81** (141 mg) and (*L*)- $N^\alpha, N^\omega, N^{\omega'}$ -tri-Boc-arginine **(L)-86** (408 mg) according to procedure A. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CHCl₃/acetone, 8:2, as eluent).



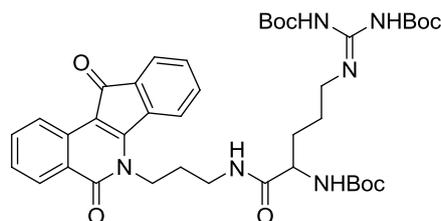
MW: 746.85 g.mol⁻¹.

Yield: 222 mg, 69 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 9.14 (br s, 2H), 8.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.29 (*J* = 8.0 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.70 (td, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.59-7.34 (m, 5H), 6.05 (br s, 1H), 4.73-4.58 (m, 2H), 4.21 (br s, 1H), 3.90-3.52 (m, 6H), 3.20 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.43-1.41 (m, 27H).

- **6-(*N*^α,*N*^ω,*N*^{ω'}-Tri-Boc-(*L*)-arginyl-aminopropyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione ((*L*)-103).**

(*L*)-103 was prepared from **82** (147 mg) and (*L*)-*N*^α,*N*^ω,*N*^{ω'}-tri-Boc-arginine (**L**)-86 (408 mg) according to procedure A. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CHCl₃/acetone, 8:2, as eluent).

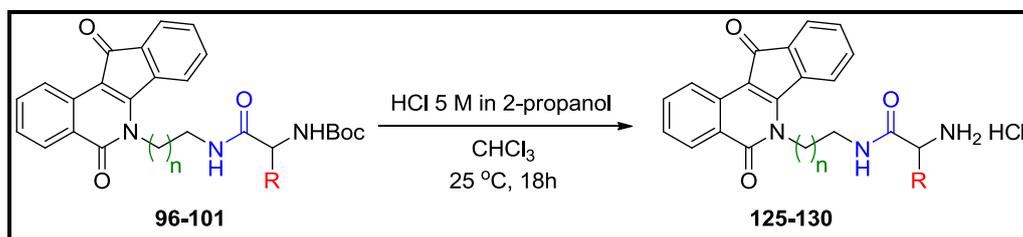


MW: 760.88 g.mol⁻¹.

Yield: 291 mg, 89 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 9.31 (br s, 2H), 8.65 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.70 (td, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.51-7.41 (m, 4H), 7.36 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.54 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.36-4.28 (m, 1H), 3.98-3.73 (m, 2H), 3.51-3.31 (m, 2H), 2.13-2.01 (m, 2H), 1.85-1.81 (m, 2H), 1.75-1.61 (m, 2H), 1.51 (s, 9H), 1.46 (s, 9H), 1.45 (s, 9H).

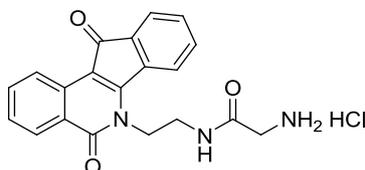
3.6.2. General procedure for the synthesis of compounds 125-130



To a solution of **96-101** (0.2 mmol) in CHCl_3 (5 mL), a solution of 5 M HCl in 2-propanol (1 mL) was slowly added at 0 °C. The resulting mixture was stirred at room temperature for 18h. The precipitated product was filtered, washed with CHCl_3 and Et_2O and dried *in vacuo* to provide the desired product.

- **6-(Glycyl-aminoethyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione hydrochloride (125)**

125 was obtained as an orange amorphous solid from **96** (89 mg).



MW: 383.83 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Yield: 29 mg, 38 %.

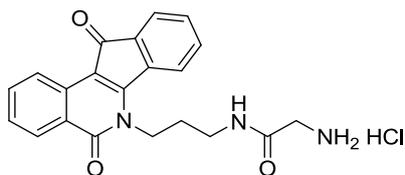
^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.93 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.16 (br. s, 3H), 8.09 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.83 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.60-7.49 (m, 4H), 4.56 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.60-3.54 (m, 2H), 3.46 (br s, 2H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 190.4, 167.2, 163.0, 156.8, 137.0, 134.8, 134.5, 134.3, 132.3, 131.8, 128.5, 127.6, 124.2, 123.3, 122.0, 107.6, 43.7, 40.1, 37.7.

HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 348.1343, found 348.1342.

- **6-(Glycyl-aminopropyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione hydrochloride (126)**

126 was obtained as an orange amorphous solid from **97** (92 mg).



MW: 397.85 g.mol⁻¹.

Yield: 43 mg, 54 %.

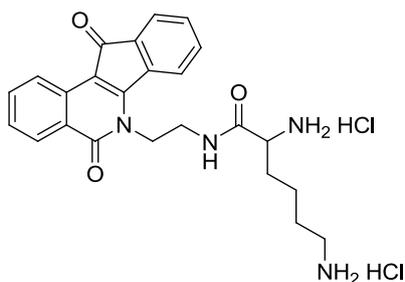
¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.70 (br s, 1H), 8.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.15 (br s, 3H), 7.83-7.74 (m, 2H), 7.63-7.47 (m, 4H), 4.51 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.57 (br s, 2H), 3.37-3.31 (m, 2H), 1.97 (br t, *J* = 7.0 Hz, 2H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 189.8, 166.0, 162.4, 156.0, 136.2, 134.3, 134.0 (br, 2C), 131.7, 131.2, 128.0, 127.1, 123.7, 122.7, 122.6, 122.5, 107.0, 42.1, 40.1, 36.3, 29.0.

HRMS calcd for C₂₁H₂₀N₃O₃ [M+H]⁺ 362.1499, found 362.1498

- (*L*)-, (*D*)-, (*DL*)-6-(Lysyl-aminoethyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione dihydrochlorides (**127**)

(*L*)-, (*D*)-, or (*DL*)-**127** were obtained from (*L*)-, (*D*)-, or (*DL*)-**98** (124 mg) as orange amorphous solids.



MW: 491.41 g.mol⁻¹.

Yield (average): 77 mg, 78 %.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.14 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.56 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 3.6 Hz, 1H), 8.30 (br s, 3H), 8.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.19-8.08 (m, 4H), 7.83 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.57-7.49 (m, 4H), 4.56 (br s, 2H), 3.70 (br s, 2H), 3.51-3.45 (m, 1H), 2.70 (br s, 2H), 1.62-1.52 (m, 4H), 1.31 (br d, *J* = 7.0 Hz, 2H).

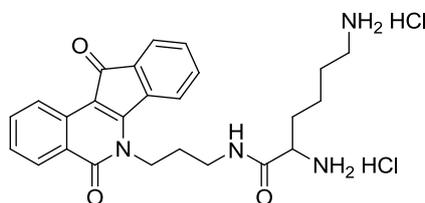
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 190.3, 169.8, 162.9, 156.7, 136.8, 134.6, 134.4, 134.3, 132.2, 131.8, 128.4, 127.6, 124.4, 123.1, 123.0, 122.9, 107.4, 52.4, 43.7, 38.6, 37.7, 30.4, 26.7, 21.7.

$[\alpha]^{20}_{\text{D}}$: (L): +26.6 (c 0.2, MeOH), (D): -23.3 (c 0.2, MeOH).

HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 419.2078, found 419.2073.

- (L)-, (D)-, (DL)-6-(Lysyl-aminopropyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione dihydrochlorides (128)

(L)-, (D)-, or (DL)-128 was obtained from **99** (127 mg) as red amorphous solids.



MW: 505.44 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Yield (average): 67 mg, 66 %.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.94 (br s, 1H), 8.56 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.33 (br s, 3H), 8.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.04 (br s, 3H), 7.85-7.78 (m, 2H), 7.63-7.49 (m, 4H), 4.51 (m, 2H), 3.79 (br s, 1H), 3.44-3.25 (m, 2H), 2.76 (br s, 2H), 1.95 (br t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 1.77 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.45-1.38 (m, 2H).

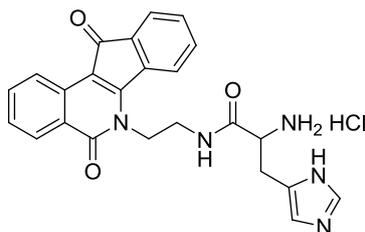
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 189.7, 168.6, 162.3, 155.9, 136.1, 134.2, 134.0, 133.9, 131.6, 131.2, 128.0, 127.0, 123.6, 122.6, 122.5, 122.4, 106.9, 51.9, 42.2, 38.1, 36.3, 30.0, 28.9, 26.3, 21.2.

$[\alpha]^{20}_{\text{D}}$: (L): +19.2 (c 0.2, MeOH), (D): -15.5 (c 0.2, MeOH).

HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 433.2234, found 433.2232.

- (L)-, (D)-, (DL)-6-(Histidyl-aminoethyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione hydrochlorides (129)

(L)-, (D)-, or (DL)-129 was obtained as red amorphous solids from **100** (126 mg).



MW: 463.92 g.mol⁻¹.

Yield (average): 51 mg, 55 %.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.29 (br s, 1H), 8.99 (br s, 1H), 8.57 (br d, *J* = 7.9 Hz, 3H), 8.20 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.83 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.60-7.47 (m, 5H), 4.55 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 4.21-4.15 (m, 1H), 3.68-3.44 (m, 2H), 3.25-3.07 (m, 2H).

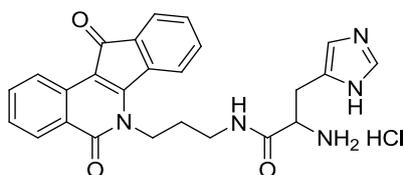
¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 189.8, 167.9, 162.4, 156.1, 136.2, 134.1, 133.9 (br, 2C), 131.7, 131.2, 127.9, 127.0, 126.8, 123.8, 122.7, 122.4 (br, 3C), 117.7, 107.0, 51.3, 43.1, 37.3, 26.0.

[α]²⁰_D: (*L*): +13.1 (*c* 0.2, MeOH), (*D*): -7.1 (*c* 0.2, MeOH).

HRMS calcd for C₂₄H₂₃N₅O₃ [M+H]⁺ 428.1717, found 428.1714.

- (*L*)-, (*D*)-, (*DL*)-6-(Histidyl-aminopropyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione hydrochloride (**130**)

(*L*)-, (*D*)-, or (*DL*)-**130** was obtained as red amorphous solids from **101** (128 mg).



MW: 477.94 g.mol⁻¹.

Yield: 72 mg, 76 %.

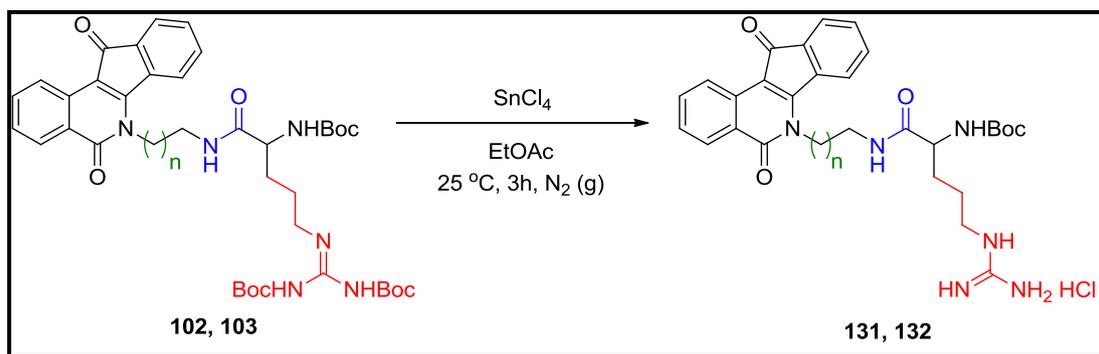
¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.04 (s, 1H), 8.97 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.54 (br s, 2H), 8.22 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.86-7.77 (m, 2H), 7.65-7.49 (m, 5H), 4.65-4.44 (m, 2H), 4.29-4.23 (br s, 1H), 3.74-3.17 (m, 4 H), 1.96 (m, 2 H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 189.6, 167.3, 162.2, 155.7, 136.0, 134.1, 134.0, 133.8, 131.5, 131.1, 127.9, 127.0, 126.9, 123.6, 122.5, 122.4, 122.4, 122.4, 117.7, 106.9, 51.4, 42.1, 36.6, 28.7, 26.3.

$[\alpha]_D^{20}$: (L): +27.3 (*c* 0.2, MeOH), (D): -18.6 (*c* 0.2, MeOH).

HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 442.1874, found 442.1865.

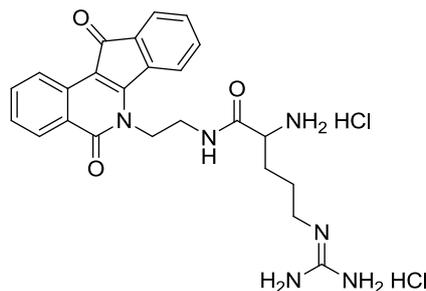
3.6.3. General procedure for synthesis of compounds (L)-131 and (L)-132



SnCl_4 (0.2 mL, 1.3 mmol, 4 equiv) was added to a stirred solution of **102** or **103** (0.3 mmol) in EtOAc (4 mL) under Ar atmosphere. The resulting mixture was stirred at room temperature for 4h under Ar atmosphere. The solvent and the excess of SnCl_4 were evaporated *in vacuo*. The residue was subsequently dissolved in MeOH (10 mL) and Et_2O was then added until an orange precipitate was formed. The precipitate was filtered, washed with Et_2O and dried *in vacuo* to afford the desired product as orange amorphous solids.

- (L)-6-(Arginyl-aminoethyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione dihydrochloride ((L)-131)

((L)-131 was obtained from (L)-102 (149 mg).



MW: 519.42 g.mol⁻¹.

Yield: 42 mg, 40 %.

¹H NMR (CD₃OD, δ ppm, J Hz): 8.46 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.64 (td, *J* = 7.6 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.52-7.36 (m, 5H), 4.71-4.57 (m, 2H), 3.94-3.82 (m, 2H), 3.67-3.58 (m, 1H), 3.20 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.92-1.65 (m, 4H).

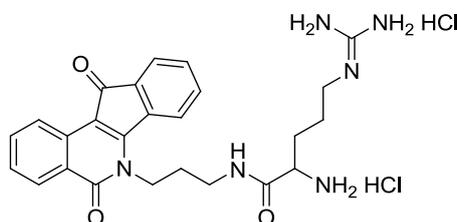
¹³C NMR (CD₃OD, δ ppm): 190.4, 169.0, 163.6, 157.2, 155.7, 136.6, 134.5, 133.7, 133.6, 132.1, 130.9, 127.7, 126.9, 123.4, 123.0, 122.9, 122.5, 108.2, 52.7, 43.3, 40.5, 38.1, 28.1, 24.0.

[α]_D²⁰: +18.6 (*c* 0.4, MeOH).

HRMS calcd for C₂₄H₂₇N₆O₃ [M+H]⁺ 447.2139, found 447.2137.

- (L)-6-(Arginyl-aminopropyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione dihydrochloride ((L)-132).

((L)-132 was obtained from (L)-103 (152 mg).



MW: 533.45 g.mol⁻¹.

Yield: 16 mg, 15 %.

¹H NMR (CD₃OD, δ ppm, J Hz): 8.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.72-7.65 (m, 2H), 7.57-7.39 (m, 5H), 4.56 (br s, 2H), 4.01 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.66-3.40 (m, 2H), 3.36-3.31 (m, 2H), 2.15-1.97 (m, 4H), 1.85-1.77 (m, 2H).

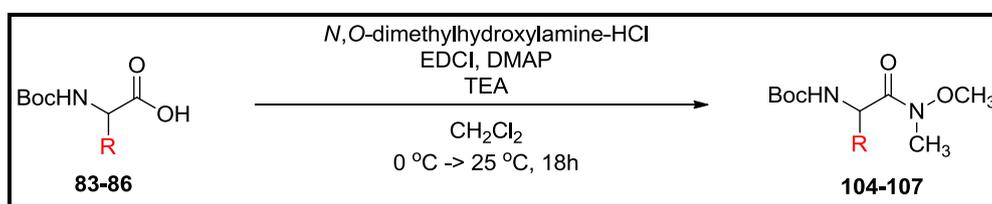
^{13}C NMR (CD_3OD , δ ppm): 189.9, 168.6, 163.5, 155.6, 136.5, 134.3, 133.7, 133.6, 132.1, 130.9, 127.8, 126.9, 123.1, 123.0, 122.9, 122.6, 108.8, 52.8, 42.2, 40.5, 36.6, 33.5, 29.0, 28.4, 24.1.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +18.1 (c 0.4, MeOH).

HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 461.2296, found 461.2294.

3.7. Synthesis of derivatives 133, 135 and 136

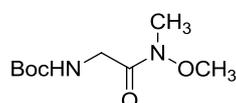
3.7.1. General procedure for the synthesis of Weinreb amides of *N*-Boc-protected α -amino acids 104-107.



N,O-Dimethylhydroxylamine-HCl (371 mg, 3.8 mmol, 1.3 equiv), and DMAP (35 mg, 1 mol%) were added to a solution of the appropriate *N*-Boc-protected amino acid **83-86** (2.9 mmol, 1.0 equiv) in CH_2Cl_2 (14.5 mL). The resulting mixture was cooled to 0 °C and triethylamine (0.7 mL, 4.9 mmol, 1.7 equiv) was added slowly over 5min then EDCI (657 mg, 3.4 mmol, 1.2 equiv). The solution was stirred for 1h at 0 °C and for 18h at room temperature. The reaction mixture was subsequently diluted with 50 mL of CH_2Cl_2 (50 mL) and washed with 1 M HCl (2 \times 20 mL), saturated NaHCO_3 (2 \times 20 mL) and brine (2 \times 20 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , concentrated, and dried *in vacuo* to provide the crude desired product which was used in the next step without further purification.

- *N*^α-Boc-glycyl-*N*-methoxy-*N*-methylamine (**104**)

Amide **104** was obtained from *N*^α-Boc-glycine **84** (508 mg) as a yellow amorphous solid.



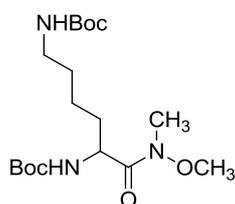
MW: 218.25 g.mol⁻¹.

Yield: 563 mg, 89 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 5.29 (br s, 1H), 4.10 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.22 (s, 3H), 1.47 (s, 9H).

- **(DL)-N^α,N^ε-Di-Boc-lysyl-N-methoxy-N-methylamine (105)**

Amide **105** was obtained from (DL)-N^α,N^ε-di-Boc-lysine (**DL**)-**84** (1.00 g) as a yellow oil.



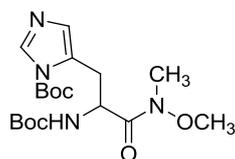
MW: 389.49 g.mol⁻¹.

Yield: 1.03 g, 91 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 5.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.66 (br s, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.22 (s, 3H), 3.15-3.06 (m, 2H), 1.58-1.50 (m, 6H), 1.45 (s, 18H).

- **N^α,N^π-Di-Boc-histidyl-N-methoxy-N-methylamine (106)**

Amide **106** was obtained from (DL)-N^α,N^π-di-Boc-histidine (**DL**)-**85** (1.03 g) as a yellow oil.



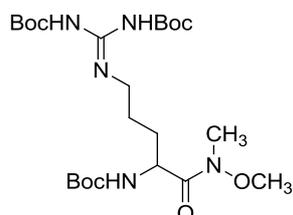
MW: 398.45 g.mol⁻¹

Yield: 740 mg, 64 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.16 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 5.50 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.50 (br s, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.28-3.14 (m, 2H), 1.65 (s, 9H), 1.48 (s, 9H), 1.46 (s, 9H)

- **(L)-N^α,N^ω,N^{ω'}-Tri-Boc-argininyl-N-methoxy-N-methylamine (107)**

Amide **107** was obtained from (L)-N^α,N^ω,N^{ω'}-tri-Boc-arginine (**L**)-**86** (1.38 g) as a colorless oil.

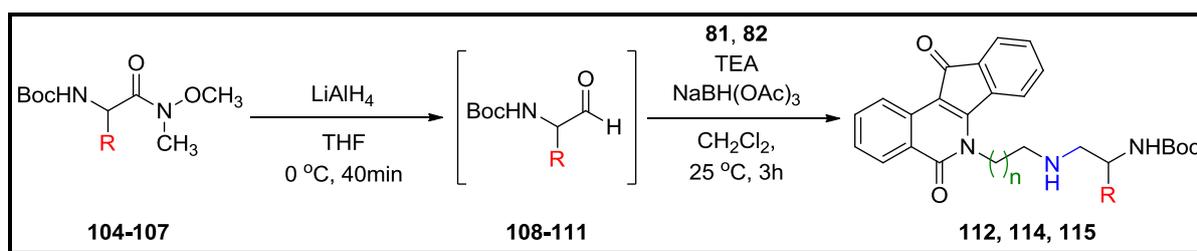


MW: 517.62 g.mol⁻¹

Yield: 1.47 g, 98 %

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 9.39 (s, 1H), 9.23 (s, 1H), 5.29 (br s, 1H), 4.68 (br s, 1H), 3.91 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.22 (s, 3H), 1.76-1.64 (m, 4H), 1.53 (s, 9H), 1.51 (s, 9H), 1.45 (s, 9H).

3.7.2. General procedure for the synthesis of 6-(2-Boc-aminoalkylamino)alkyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-diones **112**, **114** and **115**

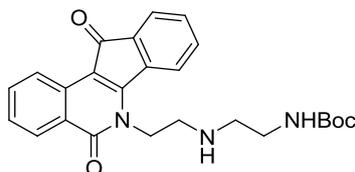


Appropriate Weinreb amide **104** or **105** (2.4 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry THF (20 mL) and the solution was cooled to 0 °C. LiAlH₄ (110 mg, 2.9 mmol, 1.2 equiv) was added in small portions and the resulting mixture was stirred for 40min at 0 °C. The reaction mixture was quenched at 0 °C by a slow addition of a 0 °C precooled 0.4 M KHSO₄ solution (10 mL). The resulting mixture was stirred for 12min at room temperature. Distilled H₂O (20 mL) was added to the mixture and the aqueous layer was extracted with EtOAc (4 × 25 mL). The combined organic layers were washed with 2 M HCl (3 × 25 mL), saturated NaHCO₃ (2 × 25

mL), and brine (2 × 25 mL), dried over Na₂SO₄, concentrated on a rotary evaporator, and dried under vacuum (30min).

The resulting clear oil **108** or **109** was immediately dissolved in CH₂Cl₂ (15 mL) then **81** or **82** (2.4 mmol, 1.0 equiv) and TEA (0.34 mL, 2.4 mmol, 1.1 equiv) were carefully added. The mixture was stirred for 5min and NaHB(OAc)₃ (615 mg, 2.9 mmol, 1.3 equiv) was subsequently added. The resulting mixture was stirred for 90min. The resulting solution was diluted with a mixture of saturated NaHCO₃ (17 mL) and saturated K₂CO₃ (25 mL) and stirred for 10min. The resulting mixture was extracted with DCM (4 × 15 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, concentrated and dried *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 95:5, as eluent) to give the desired product.

- **6-(2-(2-Boc-aminoethylamino)ethyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione (112)**



INDO **112** was obtained from **104** (524 mg) and **81** (784 mg) as a dark red amorphous solid.

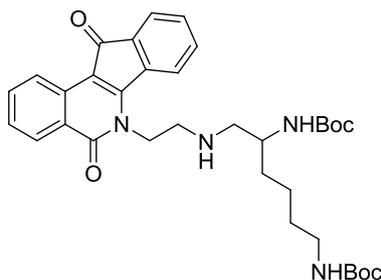
MW: 433.50 g.mol⁻¹.

Yield: 385 mg, 37 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.73 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.37 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.76 (td, J = 7.7 Hz, J = 1.3 Hz, 1H), 7.64 (dd, J = 7.2 Hz, J = 7.0 Hz, 2H), 7.52-7.40 (m, 3H), 5.00 (br s, 1H), 4.67 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.25 (td, J = 6.0 Hz, J = 5.6 Hz, 2H), 3.15 (t, J = 7.02 Hz, 2H), 2.86 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H).

- **6-(2-(2,6-Di-Boc-diaminohexylamino)ethyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione (114)**

INDO **115** was obtained from **105** (934 mg) and **81** (784 mg) as a dark red amorphous solid.



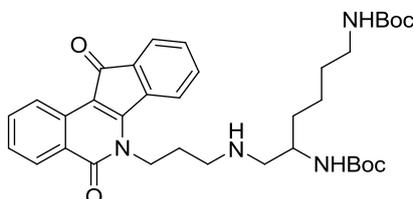
MW: 604.74 g.mol⁻¹

Yield: 421 mg, 29 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.75 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.64 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.51-7.39 (m, 3H), 4.66 (br t, *J* = 6.8 Hz, 5H), 3.66 (br s, 1H), 3.17-3.10 (m, 5H), 2.74 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.56-1.45 (m, 26H).

- **6-(3-(2,6-Di-Boc-diaminohexylamino)propyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione (115)**

INDO **115** was obtained from **105** (934 mg) and **82** (818 mg) as a dark red amorphous solid.

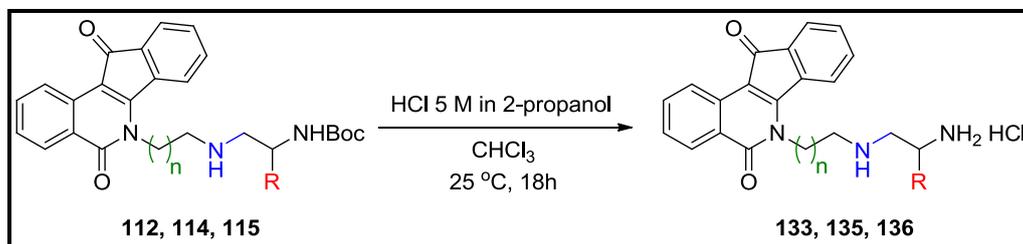


MW: 618.76 g.mol⁻¹.

Yield: 772 mg, 52 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.74 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.54-7.36 (m, 3H), 4.77-4.66 (m, 4H), 3.74-3.67 (m, 1H), 3.14 (br d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 2.83 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.69 (br d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 2.13-1.98 (m, 2H), 1.55-1.41 (m, 26H).

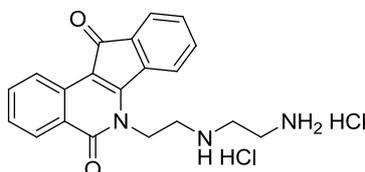
3.7.3. General procedures for the syntheses of 6-(aminoalkylamino)alkyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione hydrochlorides (**133**, **135**, **136**).



A solution of 5 M HCl in 2-propanol (2 mL) was added to a solution of **112**, **114** or **115** (0.4 mmol) in CHCl_3 (10 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 18h. The polyhydrochloride was filtered, washed with CHCl_3 and Et_2O then dried *in vacuo*.

- **(DL)-6-(2-(2-Aminoethylamino)ethyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione dihydrochloride (**133**)**

(DL)-133 was obtained from **112** (173 mg) as an orange amorphous solid.



MW: 406.31 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Yield: 111 mg, 68 %.

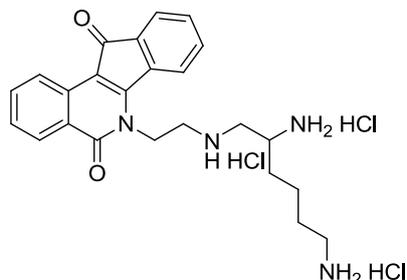
^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 10.01 (br s, 2H), 8.54 (br s, 3H), 8.43 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.74 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.52-7.38 (m, 4H), 4.76 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.46 (br s, 2H), 3.33 (br s, 2H), 3.24 (br s, 2H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 189.9, 162.9, 155.9, 135.9, 134.1, 134.0, 133.9, 131.6, 131.3, 128.0, 127.1, 123.9, 122.8, 122.6, 122.4, 107.3, 45.1, 44.4, 40.4, 35.0.

HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 334.1550, found 334.1543.

- **(DL)-6-(2-(2,6-Diaminohexylamino)ethyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione trihydrochloride (135)**

(DL)-135 was obtained from **114** (242 mg) as a red amorphous solid.



MW: 513.89 g.mol⁻¹.

Yield: 117 mg, 57 %.

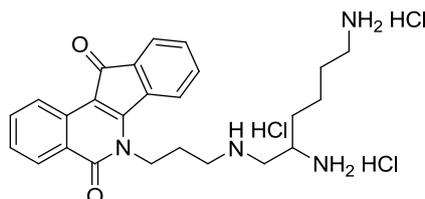
¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 10.14 (br s, 2H), 8.76 (br s, 3H), 8.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.17 (br s, 3H), 8.10 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.72 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.51-7.42 (m, 4H), 4.78 (br s, 2H), 3.60 (br s, 2H), 3.45-3.33 (m, 3H), 2.77 (br s, 2H), 1.73-1.48 (m, 6H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 189.9, 162.7, 155.9, 135.8, 134.0 (br, 2C), 133.8, 131.6, 131.2, 128.0, 127.1, 123.9, 122.8, 122.6, 122.4, 107.3, 48.7, 47.7, 45.3, 40.2, 38.2, 29.6, 26.2, 21.2.

HRMS calcd for C₂₄H₂₉N₄O₂ [M+H]⁺ 405.2285, found 405.2283.

- **(DL)-6-(3-(2,6-Diaminohexylamino)propyl)-6H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-dione trihydrochloride (136)**

(DL)-136 was prepared from **115** (248 mg) as a red amorphous solid.



MW: 527.91 g.mol⁻¹.

Yield: 116 mg, 55 %.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 9.80 (br s, 2H), 8.75 (br s, 3H), 8.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.17 (br s, 3H), 8.02 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.70-7.60 (m, 2H), 7.49 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.43-7.33 (m, 3H), 4.40 (br s, 2H), 3.57 (br s, 1H), 3.39-2.98 (m, 4H), 2.75 (br s, 2H), 2.21 (br s, 2H), 1.87-1.31 (m, 6H).

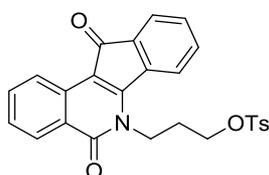
¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 189.6, 162.4, 155.6, 135.8, 134.0, 133.9, 133.8, 131.5, 131.1, 127.8, 126.9, 123.7, 122.5, 122.4, 122.3, 107.0, 48.3, 47.8, 44.9, 41.6, 38.1, 29.5, 26.1, 25.6, 21.2.

HRMS calcd for C₂₅H₃₁N₄O₂ [M+H]⁺ 419.2441, found 419.2438.

3.7.4. Synthesis of INDO 134

- **3-(5,11-Diketo-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-6-yl)propyl-4-methylbenzenesulfonate (116).**

TsCl (159 mg, 0.8 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of **82** (212 mg, 0.7 mmol, 1.0 equiv) in DCM (8 mL). TEA (0.3 mL, 2.1 mmol, 3.0 equiv) was added and the mixture was stirred at room temperature for 18h. The resulting mixture was diluted with CH₂Cl₂ (50 mL) and washed with distilled H₂O (2 × 20 mL) and then brine (20 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated. Purification by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 99:1, as eluent) afforded the desired product as a dark red solid.



MW: 459.51 g.mol⁻¹.

Yield: 180 mg, 56 %.

mp: 180-182 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.64 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.27 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.91 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 3H), 7.66-7.51 (m, 4H), 7.50 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.60 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.35 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.23 (m, 2H).

- **6-(3-(2-Boc-aminoethylamino)propyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione (113)**

Compound **77** (370 mg, 2.3 mmol, 6.5 equiv) was added to a solution of compound **113** (106 mg, 0.2 mmol) in acetonitrile (10 mL). The resulting mixture was heated at 80 °C for 18h. The solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was taken up in CH₂Cl₂ (50 mL), washed with brine (2 × 25 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/EtOAc, 7:3, as eluent) to yield the desired product as a red amorphous solid.

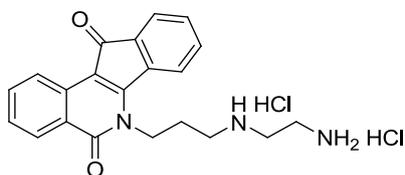


Yield: 83 mg, 80 %.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.76 (td, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.67 (td, *J* = 7.6 Hz, *J* = 1.0 Hz, 2H), 7.52-7.39 (m, 3H), 5.25 (br s, 1H), 4.67 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.35 (q, *J* = 5.2 Hz, 4H), 2.88-2.84 (m, 4H), 2.18 (m, 2H), 1.48 (s, 9H).

- **6-(3-(2-Aminoethylamino)propyl)-6*H*-indeno[1,2-*c*]isoquinolin-5,11-dione dihydrochloride (134).**

Compound **134** was prepared from **113** (179 mg) as an orange amorphous solid according to the procedure used to yield **133**, **135** and **136**.



MW: 420.33 g.mol⁻¹.

Yield: 155 mg, 92 %.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 9.43 (br s, 2H), 8.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.30 (br s, 3H), 8.23 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.87-7.82 (m, 2H), 7.63-7.50 (m, 4H), 4.59 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.18 (br s, 6H), 2.22 (m, 2H).

HRMS calcd for C₂₁H₂₂N₃O₂ [M+H]⁺ 348.1706, found 348.1703.

4. Biological evaluations

4.1. DNA and Drugs Solutions.

Calf thymus DNA (CT DNA, Pharmacia) and poly(dAT)₂ were deproteinized with sodium dodecyl sulfate (SDS, protein content < 0.2%) and extensively dialyzed against the required experimental buffer. An extinction coefficient of 6600 M⁻¹ cm⁻¹ was used to measure the nucleotide-concentration of DNA solutions. All synthesized compounds, as well as camptothecin and etoposide (Sigma), were dissolved as 10 mM solutions in DMSO. Further dilutions were made in the appropriate aqueous buffer.

4.2. Melting Temperature Studies.

Melting curves were obtained using an Uvikon 943 spectrophotometer coupled to a Neslab RTE111 cryostat. Typically, 20 μM of the various drugs were prepared in 1 mL of BPE buffer (6 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7.1) in the presence or absence of 20 μM of CT DNA and transferred into a quartz cuvette of 10 mm path length. The spectra were recorded from 230 nm to 500 nm and are referenced against a cuvette containing the same DNA concentration in the same buffer. For the absorption titration, CT DNA was added gradually from 1 to 20 μM with a spectrum recorded after each addition. To perform the melting temperature measurement, CT DNA (20 μM) was incubated alone (control *T*_m) or with increasing concentrations of the tested compound in 1 mL of BPE buffer, thus resulting in a drug/base pair ratio of 0.05, 0.1, 0.25, 0.5. The sample was transferred into a quartz cell and the absorbance at 260 nm was measured every min over the range of 20 to 100 °C with an increment of 1 °C per min. The *T*_m values were obtained from first-derived plots.

4.3. Fluorescence Measurements.

Since indeno[1,2-*c*]isoquinoline-5,11-dione derivatives show weak fluorescence variation with DNA titration, the binding studies were carried out through a competitive displacement fluorometry assay using DNA-bound ethidium bromide. Excitation was set at 546 nm and the fluorescence emission was monitored over the range 560–700 nm. Experiments were performed with an ethidium bromide/DNA molar ratio of 12.6:10 and a drug concentration range of 0.01–100 μM in a BPE buffer, pH 7.1. C_{50} values for ethidium bromide displacement were calculated using a fitting function incorporated into Prism 3.0 and the apparent binding constant was calculated as follows: $K_{\text{app}} = (1.26/C_{50})K_{\text{BET}}$, with $K_{\text{BET}} = 10^7 \text{ M}^{-1}$.

4.4. Topoisomerase Inhibition.

The experimental procedure has been previously detailed. Supercoiled pUC19 plasmid DNA (130 ng) was incubated with 8 units of human topoisomerase I or II (TopoGen) at 37 °C for 45 min in 20 μL of relaxation buffer (50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane, pH 7.8, 50 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA and 1 mM ATP) in the presence of graded concentrations (from 1.0 to 50 μM) of the tested compound. Reactions were terminated by adding of SDS to 0.25 % and proteinase K to 250 $\mu\text{g/mL}$ and incubating at 50 °C for a further 30 min. 3 μL of the electrophoresis dye mixture was then added to DNA samples which were then separated by electrophoresis in a 1% agarose gel containing ethidium bromide (1 $\mu\text{g/mL}$; topoisomerase DNA cleavage gel) or not (inhibition of the relaxation of DNA) at room temperature for 2 h at 120 V. Gels run without ethidium bromide were then stained using a bath containing ethidium bromide. Both gels were finally washed and photographed under UV light.

4.5. Cell Cultures and Antiproliferative Assay.

Human HL60 and HL60/MX2 leukemia cells were obtained from the American Tissue Culture Collection. Cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO_2 in RPMI 1640 medium, supplemented with 10 % fetal bovine serum, 2 mM (*L*)-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose, 10 mM HEPES, 1 mM sodium

pyruvate, penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/mL). The cytotoxicity of the tested compounds was assessed using a cell proliferation assay developed by Promega (CellTiter 96 AQueous one solution cell proliferation assay). Briefly, 2×10^4 exponentially growing cells were seeded in 96-well microculture plates with various drug concentrations in a volume of 100 µL. After 72h incubation at 37 °C, 20 µL of the tetrazolium dye was added to each well and the samples were incubated for a further 2 h at 37 °C. Plates were analyzed on a Labsystems Multiskan MS (type 352) reader at 492 nm.

Conception, synthèse et évaluation du potentiel antitumoral d'indénoisoquinoléine-5,11-diones polyfonctionnalisées

Les topoisomérases de type I et II (Topo I et Topo II) sont des enzymes dont l'activité majeure repose sur le contrôle de la topologie de l'ADN. Enzymes essentielles lors des processus de réplication, elles constituent, de fait, une cible de choix dans le traitement du cancer. Récemment, les indénoisoquinoléines (INDOs) ont fait preuve de très bonnes qualités en tant qu'inhibiteurs de nouvelle génération des Topo I/Topo II. Ainsi, deux séries de dérivés, série I et série II, intégrant des entités ammoniums et permettant ainsi une augmentation de la solubilité comme des interactions électrostatiques avec l'ADN ont été élaborées. Pour ce qui concerne les molécules de la série I, deux chaînes aminoalkyles ont été connectés sur les positions N6 et sur les centres carbonés C7, C8 ou C9, tandis que les composés de la série II ont été équipés de motif acide aminé basique (Gly, Lys, His, Arg) en appendice sur la position N6. En Série I, les INDOs substituées en position C8 ont affiché de très bonnes activités biologiques. En Série II, les dérivés comportant le motif Arg et un amide assurant une fonction de connexion, ainsi que ceux pourvus du motif Gly lié ici par une amine ont présenté des facultés d'inhibition de Topo II remarquables.

Mots-Clés : Composés aromatiques polycycliques, Anticancéreux, Inhibiteurs de la topoisomérase II, Interaction ADN-ligand.

Design, synthesis and anticancer properties of novel polyfunctionalized indenoisoquinolin-5,11-diones

Type I and type II topoisomerases (Topo I and Topo II) are enzymes modulating the topological state of DNA. They are essential proteins involved in DNA replication and consequently are valuable targets in cancer. The indenoisoquinolines (INDOs) have emerged as new generation Topo I/Topo II inhibitors. In this regard two series (series I and series II) of derivatives bearing ammonium entities with the aim of increasing solubility and developing electrostatic interactions with DNA were designed. Two aminoalkyl chains at N6 and at C7, C8 or C9 positions were grafted on series I compounds, while series II molecules were equipped with basic amino acid moieties (Gly, Lys, His, Arg) at N6 position. In series I, C8-substituted INDOs showed potent biological activities whereas in Series II, molecules bearing Arg moiety with amide as a connecting group and Gly moiety linked through amine, displayed prominent Topo II inhibition abilities.

Keywords: Polycyclic aromatic compounds, Anticancer agents, Topoisomerase II inhibitors, DNA-ligand interaction