

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Thèse de Doctorat

Présentée à l'Université 8 Mai 1945 - Guelma
Faculté des Sciences et de l'Ingénierie

Département de : **Génie des Procédés**
Spécialité : **Chimie Industrielle**

Par : **STITI Maâmar**

**Thème : GREFFAGE DES ARYLSULFONAMIDES ET DES CENS) SUR
DES SACCHARIDES ET DES NANOPARTICULES D'OR
POUR LE CIBLAGE DE L'ANHYDRASE CARBONIQUE**

JURY

Président :	A.M. AFFOUNE	Pr. Université de Guelma
Encadreur :	M. ABDAOUI	Pr. Université de Guelma
Examineurs :	M. LIACHA	Pr. Université d'Annaba
	Z. REGAINIA	Pr. Université d'Annaba
	J.Y. WINUM	M.C (HDR) IBMM de MONTPELLIER
	A.G. BOUDJEHEM	M.C Université de Guelma

2009

ملخص :

نقدم في هذا العمل التصميم، التخليق و كذا التقييم البيولوجي لسلسلة جديدة من مثبطات أنزيم الإنهيدراز الفحمي. تمت الدراسة حسب مقاربتين مختلفتين و هدفها تحميل سلسلة من السلفوناميدات العطرية بواسطة β - حلقي الديكسترين و جسيمات نانومترية من الذهب.

كمرحلة أولى، قمنا بتثبيت هذه السلسلة المعروفة بفعاليتها لتثبيط إنزيمات الأنهيدراز الفحمي على β - حلقي الديكسترين مما سمح لنا الحصول على سلسلة جديدة من مشتقات β - حلقي الديكسترين الثيوأوريدو أريل سيلفوناميدية.

و من جهة ثانية، تم الحصول على جسيمات نانومترية من الذهب من خلال خطوة واحدة وفي طور واحد بطريقة بروسن المحسنة و ذلك باستخدام متصلات جديدة تحصلنا عليها بتفاعل حمض الليبوثيك مع مجموعة من السلفوناميدات العطرية.

و لقد أظهرت الدراسة الأولية أن لهذه الجسيمات النانومترية من الذهب نشاط تثبيط إنتقائي خاص بالأنهيدراز الفحمي IX المرتبط بعدة أنواع من السرطان.

Abstract

In this work we present the conception, the synthesis and the biological evaluation of two new series of carbonic anhydrase (CA) inhibitors.

The study was carried out according to two different approaches aiming the delivery of a series of arylsulfonamides potent candidates for (CA) inhibition by β -cyclodextrine and gold nanoparticules.

Firstly, we focused on grafting these carbonic anhydrase inhibitors on β -cyclodextrine, a well-known oligosaccharide, allowing us to get a new series of thiouréidoarylsulfonamide- β -cyclodextrines conjugates.

On the other hand, a series of gold nanoparticles with an average size of 3.5 nm has been elaborated in a single step by one phase modified Brust method, using original ligands obtained by coupling of lipoic acid with arylsulfonamides.

A preliminary study shows that these gold nanoparticules present a very selective inhibitory activity against carbonic anhydrase (IX), a transmembrane isoenzyme involved in several types of cancer.

Key-words

Cancer, carbonic anhydrase inhibitors, Sulfamides, Arylsulfonamides, carbonic Anhydrase (CAIX), β -cyclodextrine, thiourea, lipoic acid, gold nanoparticles.

Résumé

Dans ce travail nous décrivons la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de deux nouvelles séries d'inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (CA).

L'étude a été conduite selon deux approches différentes visant la vectorisation d'une série d'arylsulfonamides par les cyclodextrines et les nanoparticules d'or.

Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur le greffage de cette série d'arylsulfonamides candidats potentiels pour l'inhibition de l'CA sur la β -cyclodextrine: un oligosaccharide très réputé, ce qui nous a permis d'obtenir une nouvelle série de conjugués thiouréidoarylsulfonamide- β -cyclodextrines.

Par ailleurs, une autre série de nanoparticules d'or de taille moyenne égale à 3.5 nm a été élaborée en une seule étape et dans une même phase par la méthode de Brust modifiée, utilisant des ligands originaux obtenus par couplage de l'acide lipoïque avec des arylsulfonamides.

Une étude préliminaire montre que ces nanoparticules d'or présentent une activité inhibitrice très sélective pour l'anhydrase carbonique IX, une isoenzyme transmembranaire impliquée dans plusieurs types de cancer.

Mots-clés

Cancer, Inhibiteurs de l'anhydrase carbonique, Sulfamides, Arylsulfonamides, Anhydrase carbonique IX, β - cyclodextrine, thiourée, Acide lipoïque, Nanoparticules d'or.

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de chimie Appliquée, à l'université de Guelma Algérie et au laboratoire de Chimie Biomoléculaire, à l'Ecole Nationale de Chimie de Montpellier. France.

Je tiens à exprimer ma très sincère reconnaissance à Monsieur le professeur Mohamed ABDAOUI et Monsieur le Docteur Jean-Yves WINUM qui m'ont fait l'honneur de diriger ce travail, aussi pour leur disponibilité, leur patience et toute l'attention qu'ils m'ont accordée le long de la réalisation de ce travail. Qu'ils trouvent dans l'aboutissement de ce travail le témoignage de ma profonde gratitude.

Que le professeur Jean Louis MONTERO, Chef du labo et Madame Véronique BARRAGAN-MONTERO ; trouvent ici l'expression de ma respectueuse considération et de ma sincère gratitude pour l'intérêt qu'ils ont accordé à mon travail ainsi que le soutien et l'aide qu'ils m'ont apporté durant mon stage.

Je tiens également à remercier Monsieur le professeur A.M. AFFOUNE de l'université de Guelma, qui a bien voulu me faire l'honneur de présider le jury.

Je suis très honorée par la présence de Monsieur Messaoud LIACHA et Monsieur Zine REGAINIA Professeurs à l'Université de Annaba, qui ont bien voulu consacrer leur temps pour juger ce travail, je leur prie de croire à toute ma considération et mon respectueux dévouement..

Je tiens à exprimer également ma reconnaissance à Monsieur Abd-Elgani BOUDJEHEM, Maître de conférence à l'université de Guelma, je lui adresse également mes remerciements pour l'honneur qu'il me fait d'être examinateur de mon travail.

J'attache une importance particulière à ma femme H.BOUZIT qui m'a prodigué soutien et encouragements constants.

Mes vifs remerciements s'adressent également aux personnels de la faculté des sciences et de l'ingénierie et du département de chimie industrielle pour leur aide.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous les étudiants du laboratoire (Katalina, Khaled, Khalid, Erik, Stéphanie, Mamoun, Marouan, Zohra, François, Fredo, Antoine, Marie-Rose ...), pour leur gentillesse inoubliable, leur soutien et leur compréhension,. De part leur attention et l'ambiance sympathique qu'ils ont su créer, ils ont largement contribué au bon déroulement de ces travaux de recherche.

Liste des abréviations

Symbole	Signification
APT	Attached Proton Test
AOT	Tétraoctylammonium(bis (2-éthylhexyl) sulfosuccinate de Na)
Ar	groupement aryle
AuNPs	gold nanoparticles
AZA	acetazolamide
βCD	β-cyclodextrine ou simplement Cyd
β-CD-NH ₂	monon-6-amino-6-déoxy β -cyclodextrine
BOC	Butyloxycarbonyle
CA	anhydrase carbonique
CAIX	anhydrase carbonique 9
CENS	2-chloroethylnitrosulfamides
CENU	Chloroéthylnitrosourées
CVD	dépôt de vapeur chimique
DCC	1,3-dicyclohexylcarbodiimide
DMAP	4-diméthylamoniopyridine
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DCM	Dichlorométhane
D ₂ O	l'eau lourde
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDX	Energy-Disperse X-ray
EDCI	1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide
MS-ESI	electrospray ionisation mass spectroscopy
Gal-GlcNAc	Galactose-glycose Nacétylé
hCA	human carbonic anhydras
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance.
ICS	isocyanate de chlorosulfonyle
K _i ou KI	constante d'inhibition
MEB	microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie Electronique à Transmission
mM	millimolaire
nM	nanomolaire
Pd/C	Du palladium sur charbon
Ph	groupement ou reste Phényle
Rdt	Rendement
Rf	Rapport frontal
RMN ¹ H	Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ¹³ C	Résonance magnétique nucléaire du carbone-13
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldiméthylsilyle
Tf	Température de fusion
THF	Tétrahydrofurane
Tos	groupement tosyle
XRD	x ray diffraction
Xc =3a	N-[(4-Sulfonamidophenyl)-ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide
Xd =3b	N-[(4-(Thiazol-2-yl)sulfonamidophenyl)]5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide
XIc =GNP-1	Nanoparticules d'or obtenues par greffage des ligands Xc
XId =GNP-2	Nanoparticules d'or obtenues par greffage des ligands Xd
XIa = Au@	Nanoparticules d'or non enrobées par des ligands (nues= GNP-a)
ZBF	zinc bond fonction

Liste des schémas

N°	Titre	Page
1	-Réaction réversible d'hydratation du CO ₂	7
2	-Comparaisons des modes de fixation de l'anhydride carbonique (A), de l'arylsulfonamide (B) et du bicarbonate (C) au site actif de l'enzyme.....	10
3	-Accès au per-6-amino-β-Cyclodextrine à partir du dérivé tosylé.....	28
4	-Accès au mono-6-amino-β-cyclodextrine via le dérivé tosylate.....	30
5	-Structure détaillée d'une coupe transversale de la membrane plasmique d'une cellule animale.....	31
6	-Utilisation de la β-CD pour la vectorisation des principes actifs :a) par formation de complexe d'inclusion, b) par formation d'un conjugué β-CD-principe actif.....	32
7	-Impact économique des nanotechnologies en 2010.....	35
8	-Synthèse de nanoparticules d'or par la voie NaBH ₄	48
9	-Synthèse de nanoparticules d'or par la voie citrate/acide tannique.....	49
10	-Différentes structures de sulfamides.....	54
11	-Méthode d'accès au dérivé sulfamoylé phénolique (I).....	56
12	-Obtention du dérivé sulfamoylé oxazolidinonique (II).....	57
13	-Méthode d'obtention de la mono-6-amino-6-déoxy (β-CD-NH ₂) (IIIc).....	59
14	-Mécanisme proposé pour la réaction de monotosylation de la β-CD (IIIa)...	61
15	-stabilisation de l'ion tosylate.....	61
16	-Voies proposées pour l'obtention des conjugués β Cyclodextrine-CENS.....	68
17	-Réaction de trans-sulfamoylation sur la mono-amino-6-β-CD.....	69
18	-Préparation de la première série d'arylsulfonamide iothyocyanates (VII) utilisant le CS ₂ en présence du DCC.....	75
19	-Mécanisme de formation de l'isothiocyanate par CS ₂ en présence de DCC ou du TosCl.....	76
20	-Préparation de la deuxième série d'arylsulfonamide iothyocyanates (VIII) utilisant le thiophosgène en présence d'HCl concentré.....	77
21	-Mécanisme de formation de l'isothiocyanate par le di-2-pyridyl thiono carbonate.....	77
22	-Mécanisme de formation de la fonction thiourée par la réaction d'une amine avec un isothiocyanate.....	81
23	-Accès aux conjugués: thiouréido-arylsulfonamide -β cyclodextrines (VIII)...	81
24	-Accès aux conjugués:arylsulfonamides -acide lipoïque.....	97
25	-Mécanisme du couplage peptidique faisant intervenir des réactions parasites.....	98
26	-Mécanisme du couplage des arylsulfonamides avec l'acide lipoïque en présence de la triade : EDCI, DMA et DMAP.....	99
27	-Synthèse par voie NaBH ₄ de nanoparticules d'or enrobées par des ligands inhibiteurs potentiels de l'CA.....	103
28	-Principe de la méthode <i>Stopped-Flow</i>	111

Liste des tableaux

N^o	Titre	Page
1	-Liste de médicaments dirigés contre certaines enzymes humaines.....	6
2	-Produits pharmaceutiques commercialisés et contenant des CDs.	33
3	-Rendements et certaines caractéristiques physico-chimiques des conjugués thiouréido-arylsulfonamide- β -cyclodextrines préparés.....	88
4	-Rendements et caractéristiques physico-chimiques des conjugués arylsulfonamides-acide lipoïque (X) préparés.....	102
5	-Résultats trouvés sur l'inhibition des CAs :CAI, II et IX avec l'acetazolamide AZA et les nouveaux Sulfonamides 3a,b, et les nanoparticules GNP-1/2a.....	112
6	-Résultats de pénétrabilité à travers les membranes cellulaires.....	114

Liste des figures

N ^o	Titre	Page
1	-Principe de l'inhibition compétitive.....	5
2	-Modèles de fixation des ligands a) et b) au site actif de l'anhydrase carbonique humain hCAII selon des études cristallographiques.....	10
3	-Modèle général d'un inhibiteur complexé dans le site actif de l'anhydrase carbonique.....	11
4	-Exemples de sulfonamides utilisés en clinique.....	13
5	-Structures générales de certains sulfonamides halogénés.....	14
6	-Structure générale d'un sulfonamide tetrafluoré inhibiteur subnanomolaire contre le hCA IX.....	14
7	-Sulfonamides incorporant une partie hydrazine en leur structures.....	16
8	-Benzenesulfonamides aromatiques incorporant des parties triazinyle en leurs structures.....	16
9	-Sulfamates et sulfamides constituent une autre classe d'inhibiteurs de l'hCA....	18
10	-Structure de la β -D-glucosylamine.....	22
11	-Structure générale de l'AZT.....	22
12	-Structure générales des glycosides cardiotoniques.....	23
13	-Structures et constantes d'inhibition contre l'hCAIX du topiramate 1 et son analogue 2 en série sulfamide.....	24
14	-Exemple d'un conjugué benzenesulfonamides- hydrates de carbone préparé par l'approche dite « click chemistry ».....	25
15	-structures tridimensionnelles des cyclodextrines naturelles (α , β , γ , CD).....	26
16	-Différentes représentations pour la β cyclodextrine.....	26
17	-représentation d'une unité glucose dans la β CD.....	
18	-Proportion d'atomes de surface pour une particule sphérique constituée de N_V atomes dont N_S sont en surface.....	37
19	-Représentation des différents types d'émulsions.....	41
20	-Représentation d'une micelle formée par des tensioactifs.....	41
21	-stabilisation des nanoparticules :.....	42
22	-Structure d'un colloïde d'or composé d'un noyau d'or pur entouré d'ions $AuCl_2^-$ adsorbés en surface.....	45
23	-Utilisation des nanoparticules fonctionnalisées pour l'imagerie cellulaire.....	51
24	-Structures générales des CENU et CENS.....	55
25	-Structure attendue des conjugués β -Cyclodextrine-CENS.....	55
26	-Structures des sulfamoyles activés dérivés de phénols ou d' oxazolidinone..	56
27	-Spectrogrammes (ESI- MS) en mode positif du monotosylate β -CD (IIIa)...	63
28	-Spectre RMN du proton du monotosylate β -CD (IIIa) dans le DMSO-d ₆	63
29	-Spectres IR du monoazido-6- BCD (IIIb).....	64
30	-Spectrogramme (ESI-MS) en mode positif du monoazido -6- β -CD (IIIb)....	64
31	-Spectre RMN du proton du Monoazido-6- β -CD (IIIb) dans D ₂ O	65
32	-Spectrogramme en mode négatif du Chlorhydrate du mono-amino-6-BCD (IIIc)...	66
33	-Spectre RMN ¹ H du chlorhydrate du mono-amino-6- β -CD (IIIc) dans le DMSO-d ₆	66
34	-Spectre RMN ¹ H du chlorhydrate du mono-amino-6- β -CD (IIIc) dans le D ₂ O.....	67
35	-Exemples de CENS biologiquement actifs rapportés dans la littérature.....	68
36	-Structures des sulfonamides aromatiques ou hétéroaromatiques incorporant des motifs de thiouréido-sulfanilyle ou thiouréido-benzolamide.....	72

37	-Exemple d'inhibiteurs liés à des sucres via une fonction thiourée qui se sont montrés très efficaces contre l'hCAIX.....	73
38	-Formule générale des conjugués : thiouréidoarylsulfonamide- β -cyclodextrines synthétisés.....	74
39	-Structures générales des arylsulfonamide-isothiocyanates préparés.....	74
40	-Spectrogramme (MS-ESI) du composé (VIIb).....	78
41	-Spectre RMN du proton du composé (VIIb) dans le DMSO-d ₆	78
42	-Liaisons hydrogène induites par la fonction thiourée.....	79
43	-Spectre de masse MS ESI ⁺ du composé (IXb).....	82
44	-Spectre RMN du ¹³ C séquence APT du composé (IXb) dans le DMSO-d ₆ ...	83
45	-Spectre RMN ¹ H du composé (IXb) dans le DMSO-d-6.....	84
46	-Spectre RMN ¹ H du composé (IXb) dans le D ₂ O.....	84
47	-Spectre cosy ¹ H- ¹³ C du composé (IXc) dans le DMSO-d-6.....	86
48	-Spectre cosy ¹ H- ¹ H du composé (IXc) dans le DMSO-d-6.....	86
49	-Spectre cosy ¹ H- ¹ H du composé (IXc) dans le D ₂ O.....	87
50	-Structure générale d'une classe de sulfanilamides positivement chargés dérivés de la pyridine, utilisée pour le ciblage de l'hCAIX.	91
51	-Les bases de Schiff dérivés des sulfonamides sont également des inhibiteurs efficaces de l'CA.....	91
52	-Formation d'un complexe de zinc avec les bases de Schiff.....	92
53	-Inhibiteurs de l'CA incorporant l'élément Bore	92
54	-Structure générale de l'acide lipoïque.....	94
55	-Structure générale des conjugués : arylsulfonamides-acide lipoïque obtenus.....	96
56	-Spectre de masse MS-ES ⁻ du composé (Xb).....	100
57	-Spectre RMN ¹ H du composé (Xb) dans le DMSO-d ₆	101
58	-Spectre RMN ¹³ C du composé (Xc) dans le DMSO-d ₆	101
59	-Micrographies de microscopie électronique en transmission (MET) de nanoparticules d'or obtenues.....	106
60	-Histogrammes de distribution de taille (c') et (d') correspondants respectivement aux images(c) et (d) représentées sur la figure 56.....	106
61	-Phénomène de diffraction électronique observé lors de la prise des images TEM.....	107
62	-Spectre UV-visible de nanoparticules Xb sous forme de poudre.....	107
63	-Spectre de diffraction des rayons-X aux angles 2 θ (20°-140°) de l'échantillon (XIc) sous forme de poudre.....	108
64	-Spectre (EDX) de l'échantillon (XIc).....	109

SOMMAIRE

Introduction générale	1
PREMIERE PARTIE	
<u>Etude Bibliographique</u>	
<u>CHAPITRE 1: les anhydrases Carboniques</u>	
I.1.1. Introduction.....	4
I.1.2. Principe de l'inhibition enzymatique dans le domaine pharmaceutique.....	4
I.1.3. Les différents types d' anhydrases carboniques (CAs) et leurs rôles dans l'organisme.....	7
I.1.4. Applications des anhydrases carboniques (CAs) en thérapeutique.....	8
I.1.5. Mécanismes de l'inhibition des anhydrases carboniques.....	9
I.1.6. Design des inhibiteurs de l'CA.....	11
I.1.7. Inhibiteurs de CA IX dans la série de sulfonamides.....	12
I.1.8. Conclusion.....	17
<u>CHAPITRE 2: Les saccharides</u>	
I.2.1. Introduction.....	18
I.2.2. Les sucres issus de sources naturelles.....	18
I.2.3. Les sucres synthétiques ou biosynthétiques.....	19
I.2.4. Les glucides en biologie.....	20
I.2.4.1. Les glycoconjugués biologiques.....	20
I.2.4.1.1. Les glycoprotéines.....	21
I.2.4.1.2 Les glycolipides.....	21
I.2.5. Couplage des sucres aux agents thérapeutiques.....	21
I.2.6. Les cyclodextrines.....	24
I.2.6.1. Structure et propriétés des cyclodextrines.....	24
I.2.6.2. Fonctionnalisation de la β -cyclodextrine.....	27
I.2.6.3. Modification de la face primaire.....	28
I.2.6.4. La monosubstitution sur la position 6.....	29
I.2.6.5. Les Cyclodextrines en tant que vecteurs biologiques.....	31
I.2.7. Conclusion.....	34
<u>CHAPITRE 3: Nanoscience et nanobiotechnologies</u>	
I.3.1. Introduction.....	35
I.3.2. Propriétés des nanomatériaux.....	36
I.3.3. méthodes de production des nanomatériaux.....	38

I.3.3.1. Approches « bottom up » et « top down ».....	38
I.3.3.2. Méthodes de préparation des nanoparticules minérales fonctionnalisées.....	39
I.3.3.2.1. Synthèse par réduction d'un sel métallique.....	39
I.3.3.2.2. Synthèse en microémulsion.....	40
I.3.4. Nanoparticules d'or.....	43
I.3.4.1 généralités.....	43
I.3.4.2. Propriétés physiques et chimiques de l'or métal.....	43
I.3.4.3. Propriétés optiques des solutions colloïdales d'or.....	44
I.3.4.4. Elaboration de nanoparticules d'or.....	45
I.3.4.4.1. Synthèses par méthodes chimiques.....	45
I.3.4.4.1.a. Généralités.....	45
I.3.4.4.b. Synthèse de Brust et stabilisation par des thiols.....	46
I.3.4.4.c. Synthèse par la voie citrate.....	49
I.3.4.4.d. Synthèse par d'autres ligands.....	50
I.3.5. Nanoparticules et Applications Biomédicales.....	50
I.3.5.1. Marquage biologique par des colloïdes métalliques.....	50
I.3.5.2. Nanoparticules Magnétiques et Applications Biomédicales.....	52
I.3.5.3. Nanoparticules Magnétiques, Agents de Contraste en Imagerie par Résonance Magnétique....	52
I.3.5.4. Nanoparticules Magnétiques et Traitement des Tumeurs.....	53
I.3.6. Conclusion.....	53
<u>DEUXIEME PARTIE</u>	
Synthèse, Résultats & discussion	
<u>CHAPITRE 1: Essai de greffage des 2-chloroethylnitrososulfamides (CENS)</u>	
sur la β-cyclodextrine	
II.1.1. Introduction.....	54
II.1.2. Synthèse des sulfamoyles activés.....	56
II.1.2.1. Caractérisation des produits obtenus.....	58
II.1.3 Fonctionnalisation de la β -Cyclodextrine.....	59
II.1.3.1. Tosylation.....	60
II.1.3 2. Azidation.....;	61
II.1.3.3. Amination.....	62
II.1.3.4. Caractérisation des produits obtenus.....	62
II.1.4. Synthèse des conjugués β -Cyclodextrine-CENS.....	67
II.1.5. Conclusion.....	70
<u>CHAPITRE 2: Greffage d'Arylsulfonamides sur la β- Cyclodextrine</u>	
II.2.1 Introduction.....	71

II.2.2 Mise au point de nouveaux sulfonamides pour l'inhibition de CAIX.....	71
II.2.3 Synthèse des Arylsulfonamides Isothiocyanates.....	74
II. 2. 4. Caractérisation des produits obtenus.....	78
II.2.5. Synthèse des conjugués thiouréido-arylsulfonamide- β -cyclodextrines.....	79
II.2.5.1. Caractéristiques des Conjugués : thiouréido-arylsulfonamides- β CD obtenus:.....	81
II.2.5.2. Spectrométrie RMN ^{13}C	82
II.2.5.3. Spectrométrie RMN ^1H	83
II.2.6. Conclusions.....	89
<u>CHAPITRE 3: Greffage des arylsulfonamides sur des nanoparticules d'or</u>	
II.3.1. Introduction.....	90
II.3.2. Développement d'inhibiteurs de CAIX imperméables aux membranes cellulaires.....;	90
II.3.3. Recherche d'une Nouvelle Approche : L'approche Nano pour le Design d'Inhibiteurs plus sélectifs.....	93
II.3.3.1. Elaboration de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des arylsulfonamides pour le ciblage de l'CA.....	94
II.3.3.2. Synthèse des conjugués arylsulfonamides -acide lipoïque.....	96
II.3.3.3. Caractérisations des ligands obtenus.....	99
II.3.4. Greffage des conjugués : arylsulfonamides-acide lipoïque sur des nanoparticules d'or.....	102
II.3.4.1. Optimisation des conditions opératoires.....	104
II.3.4.2. Caractérisations des nanoparticules obtenues.....	105
II.3.4.2.1. Microscopie électronique à transmission (MET).....	105
II.3.4.2.2. Spectroscopie UV-Visible.....	107
II.3.4.2.3. Diffraction des rayons X.....	108
II.3.4.2.4. Analyse X par dispersion d'énergie (EDX).....	109
II.3.5. Conclusion.....	110
<u>CHAPITRE 4: Evaluation de l'activité biologique</u>	
II.4.1. Introduction.....	111
II.4.2. Tests Biologiques.....	111
II.4.2.a. Tests d'inhibition sur l'anhydrase carbonique.....	111
II.4.2.b. Pénétrabilité à travers les membranes cellulaires.....	113
II.4.3. Discussion.....	115
II.4.4. Conclusion.....	116
Conclusion générale.....	117

<u>TROISIEME PARTIE</u>	
Protocoles Expérimentaux	
III.1. Conditions générales.....	120
III.2. Synthèse des sulfamoyles activés.....	122
III.2.1. N-t -butyloxycarbonyl, p-nitrophénoxyulfamate (I).....	122
III.2.2. N-(N'-2'-chloroéthylsulfamoyl Oxazolidin -2-one (II).....	123
III.3. Synthèse des dérivés monosubstitués de la β -cyclodextrine.....	124
III.3.1. mono [6-O-(p-toluenesulfonyl)]- β -cyclodextrin. (IIIa).....	124
III.3.2. 6-monoazido-6-monodeoxy- cyclomaltoheptaose(β CD) (IIIb).....	125
III.3.3. 6-monoamino-6-monodeoxy cyclomaltoheptaose(β CD) (IIIc).....	125
III.3.4. Mono (6-cyclohexylamino-6-deoxy)- β -cyclodextrin (IVa).....	127
III.3.5. Mono (6-anilino-6-deoxy)- β -cyclodextrin (IVb).....	128
III.3.6. Mono (6-benzylamino-6-deoxy) - β -cyclodextrin (IVc).....	128
III.4. Synthèse des arylsulfonamides isothiocyanates.....	129
III.4.1. (Isothiocyanatomethyl) benzenesulfonamide (VIIa).....	129
III.4.2. 4-(Isothiocyanatoethyl)benzenesulfonamide (VIIb).....	130
III.4.3. 4-(Isothiocyanate)benzenesulfonamide (VIIIa).....	130
III.4.4. 3-(Isothiocyanate)benzenesulfonamide (VIIIb).....	131
III.5. Synthèse des conjugués thiouréido-arylsulfonamides- β -cyclodextrin.....	132
III.5.1. 6-Deoxy-6-[(4- sulfamoylphényl)-thioureido]-cylomaltoheptaose (IXa).....	132
III.5.2. 6-Deoxy-6-[(3- sulfamoylphényl)-thioureido]-cylomaltoheptaose (IXb).....	133
III.5.3. 6-Deoxy-6-[(4- sulfamoybenzyl)-thioureido]-cyclomaltoheptaose (IXc).....	133
III.5.4. 6-Deoxy-6-[4-(4-(ethy sulfamoylphényl)-thioureido)-cyclomaltoheptaose (IXd).....	134
III.5.5. N-(4-Sulfonamidophenyl) -5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide (Xa).....	134
III.5.6. N-[(4-Sulfonamidophenyl)-methyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide (Xb).....	135
III.5.7. N-[(4-Sulfonamidophenyl)-ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide (Xc).....	136
III.5.8 N-[(4-(Thiazol-2-yl)-sulfonamidophenyl)]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide (Xd).....	137
III.6. Synthèse des nanoparticules d'or.....	138
III.6.1. Nanoparticules d'or (XIa).....	139
III.6.2. Nanoparticules d'or (XIb).....	139
III.6.3. Nanoparticules d'or (XIc).....	140
III.6.4. Nanoparticules d'or (XIId).....	140
Annexes	

Introduction Générale

INTRODUCTION GENERALE

Le cancer, du grec « karkinos » existe depuis la nuit des temps. La dénomination de cancer inclut plus de 200 maladies différentes, toutes caractérisées par la prolifération et la diffusion incontrôlée de cellules de l'organisme devenues anormales.

Trois étapes peuvent être distinguées dans le schéma général de genèse d'un cancer dont:

L'initiation: lésion rapide et irréversible de l'ADN après exposition à un carcinogène (physique, chimique, viral,...).

La promotion: exposition prolongée, répétée ou continue, à une substance qui entraîne et stabilise la lésion initiée. La cellule modifiée et ses cellules filles gardent un aspect normal, mais se reproduisent trop vite : c'est la phase d'hyperplasie.

La progression: acquisition des propriétés de multiplication non contrôlée, acquisition de l'indépendance, de la perte de la différenciation, de l'invasion locale et métastatique c'est la phase de dysplasie.

Du point de vue biologique, le cancer est donc la conséquence d'une accumulation d'altérations du génome cellulaire, ou de sa transcription cytoplasmique, certaines permettant l'autonomie de la division, d'autres l'invasion locale, l'angiogenèse ou la diffusion métastatique, puis éventuellement la résistance aux drogues. Au fur et à mesure du développement du cancer, les cellules tumorales acquièrent une instabilité génétique de plus en plus marquée, aboutissant à des mutations de plus en plus nombreuses.

Le traitement des cancers est multidisciplinaire: La stratégie anticancéreuse inclut les traitements locaux, la chirurgie, la radiothérapie et des traitements généraux comme la chimiothérapie, l'hormonothérapie et l'immunothérapie. Dans la plupart des cas, une combinaison de deux ou trois approches thérapeutiques est nécessaire.

Les différents traitements sont le plus souvent associés et réalisés de manière successive dans le temps.

La chimiothérapie constitue une arme thérapeutique supplémentaire à disposition pour lutter contre le cancer et fait appel à des produits chimiques, des médicaments extraits de végétaux ou produits de synthèse.

Dès le début de son évolution, un cancer peut donner des métastases à distance. Ainsi, il échappe aux traitements locaux (chirurgie, radiothérapie). Les traitements médicaux des cancers, et notamment la chimiothérapie anticancéreuse, ont pour but principal d'enrayer une telle évolution.

Les différents médicaments utilisés aujourd'hui pour lutter contre le cancer sont classés selon leur mode d'action thérapeutique et leurs cibles cellulaires.

Les cibles pharmacologiques les plus importantes sont bien connues l'ADN, les enzymes et les microtubules. D'autres cibles étaient établies, notamment depuis que le mécanisme de la division cellulaire à commencer à être mieux connu.

Comme exemple de nouvelles cibles récemment découvertes, on se doit de citer les **anhydrases carboniques (CAs)**. Il s'agit d'une famille d'enzymes qui catalysent la réaction réversible d'hydratation du CO₂ et d'autres réactions dans une variété de processus biologiques. C'est ainsi que l'isoforme IX de l'anhydrase carbonique (CA IX) qui est une métalloenzyme extracellulaire transmembranaire à zinc, joue un rôle très important dans l'acidification du microenvironnement tumoral contribuant à la propagation et la progression des tumeurs. Elle est surexprimée dans plusieurs types de cancers tout en étant présente dans très peu de tissus normaux. L'inhibition sélective de CAIX pourrait constituer une nouvelle approche pour le management des tumeurs hypoxiques.

Les inhibiteurs des CAs disponibles actuellement en thérapeutique en particulier les aryles et les hétéroarylsulfonamides sont loin d'être parfaits car ils présentent d'innombrables effets indésirables, principalement dus à leur manque de sélectivité.

Donc le développement d'inhibiteurs plus sélectifs constitue un grand challenge pour l'obtention de nouveaux types d'inhibiteurs.

Pour que la thérapie soit bénéfique au patient, une concentration optimale en molécules actives doit être délivrée sur le site d'action désiré.

La vectorisation de principes actifs est par conséquent devenue un aspect essentiel dans le domaine thérapeutique. La pharmacie galénique moderne développe donc des systèmes d'administration susceptibles de promouvoir le passage transmembranaire et/ou intracellulaire vers la cible souhaitée tout en protégeant le principe actif de la dégradation par les enzymes. De nombreux systèmes de délivrance de molécules actives, possédant des propriétés spécifiques avantageuses pour des applications dans le domaine de la vectorisation, ont été élaborés depuis une vingtaine d'années.

Notre objectif dans ce travail consiste donc à appliquer le principe de la vectorisation à un certain nombre de sulfamides à activité anti-tumorale potentielle, et ce dans le but d'augmenter leur sélectivité vis-à-vis de certaines enzymes telle que l'isoforme IX de l'anhydrase carbonique impliquée dans une large variété de cancers.

L'étude sera conduite selon deux approches différentes: L'approche **sucre** et l'approche **nano**. De par leurs propriétés particulières (pour la vectorisation et le diagnostic), notre choix portera sur la β - cyclodextrine et les nanoparticules d'or comme systèmes de délivrance très utilisées actuellement dans les milieux pharmaceutiques.

Ce manuscrit se décompose en trois parties distinctes:

La première partie, divisée en trois chapitres, ne présente pas de résultats nouveaux à proprement parler, mais situe le sujet par rapport aux connaissances actuelles et expose les notions qu'il est nécessaire de connaître pour bien comprendre la suite du manuscrit.

Le premier chapitre présente un aperçu général sur les anhydrases carboniques, leurs mécanismes d'action et leur importance comme nouvelle cible dans le domaine thérapeutique.

Le deuxième chapitre est réservé aux glucides, y compris les cyclodextrines, vue leur importance en tant que vecteurs biologiques.

Le troisième chapitre est consacré aux nanoparticules, en particulier les nanoparticules d'or, leur élaboration par voie liquide et leurs applications dans le biomédical.

La deuxième partie de cette thèse est consacrée aux travaux personnels et se divise en quatre chapitres décrivant les résultats et discussion sur la préparation, la caractérisations des composés synthétisés ainsi que l'évaluation biologiques dans la série des nano particules d'or obtenus.

La troisième partie est réservée à la description des protocoles expérimentaux et des essais que nous avons conduits au cours de ce travail, ainsi que les caractéristiques des produits obtenus.

Nous achevons ce travail par une conclusion générale.

PREMIERE PARTIE
Etude Bibliographique

CHAPITRE 1

Les Anhydrases Carboniques

(CA)

I.1.1. Introduction

Les enzymes sont des catalyseurs des réactions chimiques qui se produisent chez les êtres vivants. Ces catalyseurs sont fabriqués, au moins en ce qui concerne leur partie protéique, par la cellule qui les utilise, selon les phénomènes de synthèse protéique.

L'importance des enzymes est évidente, toutes les molécules des êtres vivants sont formées et dégradées en permanence par des réactions chimiques dont elles sont presque toutes catalysées par des enzymes (les réactions spontanées, se produisant sans intervention d'une enzyme chez un être vivant sont rares).

Il y a au moins une enzyme différente par réaction catalysée et chaque enzyme ne transforme spécifiquement qu'une seule structure chimique, qu'un seul type de molécule. Ce qui représente des milliers d'enzymes pour chaque organisme ⁽¹⁾.

I.1.2. Principe de l'inhibition enzymatique dans le domaine pharmaceutique

Les progrès réalisés en génétique moléculaire et les divers « projets génome », qui visent à décrypter l'ADN des micro-organismes et de l'homme laissent entrevoir l'existence d'un nombre encore plus grand d'enzymes à identifier, lesquels seront des cibles potentielles pour des médicaments du futur.

Le défi actuel consiste donc à trouver un produit chimique qui serait capable d'interagir avec ces cibles en vue de comprendre quel est leur rôle et si on pourrait les mettre à profit comme cibles de médicaments.

En principe, toutes les enzymes sont contrôlées par des interactions allostériques qui peuvent soit exalter soit freiner leur activité catalytique. Un tel contrôle dépend des conditions locales régnant dans les cellules. L'activité de nombreuses variétés d'enzymes peut être également régulée par voie externe aux moyens d'activateurs ou d'inhibiteurs d'enzymes. En effet, on peut concevoir une molécule qui ressemble fort au substrat naturel et qui est capable de s'emboîter dans le site actif de l'enzyme, mais en s'y attachant plus fortement. Cette molécule serait en outre conçue de manière à ce qu'elle ne puisse subir aucune réaction dans le site actif. Mais tant qu'elle y réside, elle empêche au substrat naturel d'y accéder, de sorte que la réaction enzymatique est arrêtée. On parle d'inhibition compétitive puisque la molécule médicament est réellement en compétition avec le substrat naturel pour occuper le site actif (figure 1).

⁽¹⁾ Borel, Maquart, LePeuch, Randoux, Gillery, Bellon, Monboisse ; Biochimie Dynamique, De Boeck Université, Paris, Bruxelles, (1997).

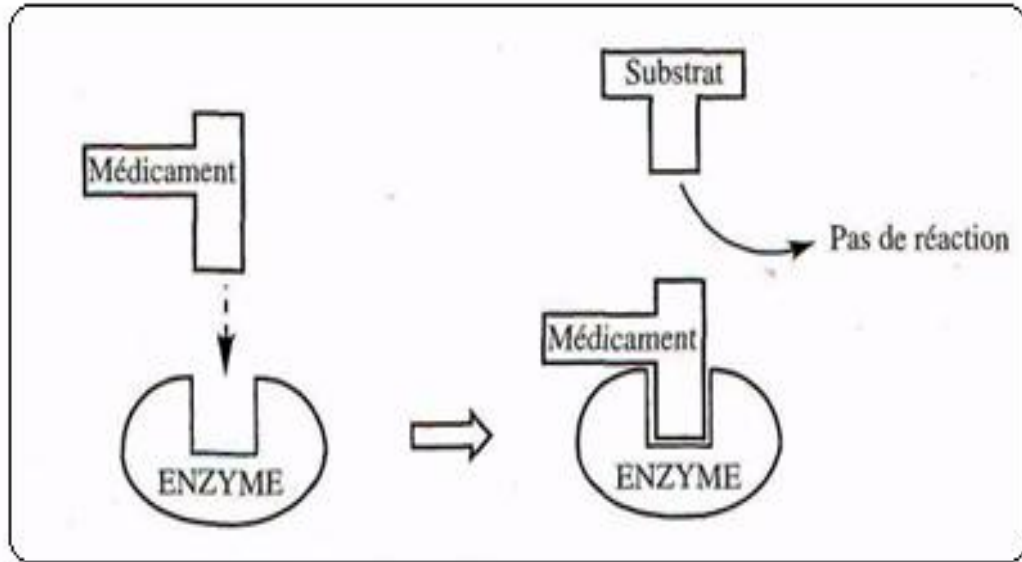


Figure 1 : Principe de l'inhibition compétitive ⁽²⁾.

On peut citer de nombreux exemples de médicaments efficaces qui fonctionnent en tant qu'inhibiteurs compétitifs. Ainsi, les sulfonamides inhibent les enzymes des bactéries, tandis que les anticholinestérasés inhibent une enzyme de mammifères qui s'appelle l'acétylcholinestérase. Une bonne part des diurétiques servant à régulariser la tension sanguine, sont des inhibiteurs compétitifs et il en va de même pour certains médicaments anti-dépresseurs ⁽²⁾.

En médecine, un grand nombre d'enzymes propres aux malades peuvent être inhibées par des médicaments en vue de modifier les réactions chimiques intervenant au cours des processus métaboliques. Ainsi, les inhibiteurs enzymatiques se sont révélés extrêmement efficaces dans la lutte contre plusieurs maladies ; Quelques exemples sont présentés dans le tableau 1 ⁽³⁾.

⁽²⁾ Graham L.P, Chimie pharmaceutique, Traduction de la 2eme édition anglaise par Paul Depovere, édition De Boeck université, Paris, Bruxelles, (2003).

⁽³⁾ Adenot, M., Initiation à la chimie médicinale, Ellipses Edition Marketing S.A.,(2000).

Tableau 1 : Liste de médicaments dirigés contre certaines enzymes humaines.

Médicament	Enzyme ciblée	Effet thérapeutique
pirine	Cyclo-oxygénase	Anti-inflammatoire
Captopril et énalapril	Enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)	Antihypertenseur
Simvastatine	HMG-CoA-réductase	Hypocholestérolémiant
Désipramine	Monoamine-oxydase	Antidépresseur
Clorgyline	Monoamine-oxydase A	Antidépresseur
Sélégiline	Monoamine-oxydase B	Traitement de la maladie de Parkinson
Méthotrexate	Dihydrofolate-réductase	Anticancéreux
5-Fluorouracile	Thymidylate-synthétase	Anticancéreux
Allopurinol	Xanthine-oxydase	Traitement de la goutte
U-75875	Protéase du VIH	Thérapie du SIDA
Ro-41-0960	Catéchol-0-méthyltransférase	Traitement de la maladie de Parkinson
Oméprazole	ATPase de la pompe à protons H ⁺ /K ⁺	Traitement de l'ulcère gastroduodéal
Organophosphorés	Acétylcholinestérase	Traitement de la myasthénie gravis, du glaucome et de la maladie d'Alzheimer
Zileutine	5-Lipo-oxygénase	Antiasthmatique
Methotrexate	Dihydrofolate-réductase	Cytostatiques
Tritoqualine	Histidine-Décarboxylase	Anti-allergique
Vigabatrin	GABA-Transaminase	Anti-convulsivants
Acide mycophénolique	IMP-Deshydrogénase	Immunosuppresseur
Acétazolamide	Anhydrase arbonique (CA)	Diurétique

I.1.3. Les différents types d' anhydrases carboniques (CAs) et leurs rôles dans l'organisme

L'anhydrase carbonique (CA) l'exemple qui nous intéresse dans cette étude, est une métalloenzyme ubiquitaire (enzyme à zinc), elle est présente chez les procaryotes et les eucaryotes et codée par trois familles de gènes distinctes et indépendantes d'un point de vue évolution : les α -CAs (présentes chez les vertébrés, les bactéries, les algues, et les plantes vertes), les β -CAs (qui sont prédominantes chez les bactéries, les algues, et les chloroplastes), et les γ -CAs (principalement rencontrées dans les archéobactéries «*Archaea*» et quelques autres bactéries)⁽⁴⁾.

Chez les mammifères, seize différentes isoformes d' CAs ont été décrites jusqu'à présent, Elles diffèrent surtout par leur localisation intracellulaire, leur activité catalytique, et leur distribution tissulaire. Ainsi on peut distinguer plusieurs formes cytosoliques (CAI, CAII, CAIII, CAVII, CAXIII)), des isoenzymes liées à la membrane (CAIV, CAIX, CAXII, CAXIV et CAXV), deux formes mitochondriales (CAVa et CAVb), une forme sécrétée dans le lait et les salives (CAVI) et trois isoformes ne présentant pas d'activités catalytiques (CARPVIII, X, et XI) sont aussi connues⁽⁵⁾.

Les CAs catalysent avec un pouvoir catalytique exceptionnel la réaction réversible d'hydratation du CO₂ en bicarbonate avec libération d'un proton. (Schéma 1).

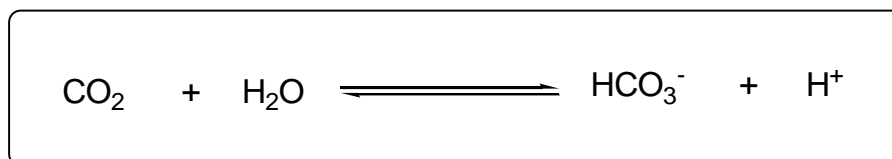


Schéma 1 : Réaction réversible d'hydratation du CO₂.

Cette famille d'enzymes catalyse également d'autres réactions, telles que : l'hydratation des cyanates en acide carbamique ou des cyanamides en urée , l'hydratation

⁽⁴⁾ Supuran, C.T.; Scozzafava, A.; Casini, A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med. Res. Rev* (2003), 23, 146-18.

⁽⁵⁾ Supuran, C.T.; Scozzafava, A., Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (2007), 15, 4336–4350.

d'aldéhyde en diols, l'hydrolyse d'esters carboxyliques ou d'esters d'acides sulfoniques.. etc⁽⁵⁾.

Ces réactions sont importantes à une variété de processus biologiques, y compris les suivants⁽⁶⁾:

- (I) régulation de la respiration et des échanges gazeux.
- (II) régulation des équilibres acido-basiques.
- (III) vision.
- (IV) développement et fonction des os.
- (V) calcification.
- (VI) métabolisme.
- (VII) reconnaissance et mémoire.
- (VIII) gustation.
- (IX) production des salives.
- (X) production de suc pancréatique.
- (XI) transport intestinal d'ions.
- (XII) fonction musculaire et du system nerveux.
- (XIII) régulation du fluide séminal.
- (XIV) adaptation au stress cellulaires.
- (XV) la gluconéogenèse, l'acidification rénale, la formation du fluide cérébro-spinal et l'acide gastrique et plusieurs autres voies biosynthétiques.
- (XVI) acidification de l'environnement extracellulaire autour des cellules des tumeurs hypoxiques.

I.1.4. Applications des anhydrases carboniques (CA_S) en thérapeutique

Les CAs jouent plusieurs fonctions physiologiques et physio-pathologiques importantes dans les êtres vivants. Ces remarquables enzymes sont particulièrement bien adaptées pour servir de modèles attractifs et très riches dans beaucoup d'études biophysiques et biomédicaux.

Actuellement, l'inhibition de l'anhydrase carbonique constitue l'une des approches physiologiques les plus utilisées pour le développement de nouvelles drogues, nouveaux outils de diagnostic, ou pour mieux comprendre les processus biologiques intervenant au sein des êtres vivants⁽⁶⁾.

⁽⁶⁾ Krishnamurthy, V. M.; Kaufman, G. K.; Urbach, A. R.; Gitlin, I.; Gudiksen, K. L.; Weibel, D. B.; Whitesides, G. M. ,*Chem. Rev.*(2008), 108,946–1051.

Et compte tenu du nombre élevé d'isoenzymes, chacune d'elle représente une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de pathologies impliquant leur surexpression⁽⁴⁾. En fait, beaucoup de recherches sont consacrées pour l'instant sur au moins cinq axes dans le *drug design* d'agents pharmacologiques liés à cette classe d'enzymes⁽⁵⁾:

- (I) Médicaments anti-glaucome, en cherchant d'autres composés plus efficaces que le dorzolamide et le brinzolamide déjà introduits en thérapeutique. Les isoenzymes cibles de tels composés sont le CA II et le CA XII.
- (II) Médicaments anti-cancéreux, ciblant en premier lieu et d'une manière prédominante les isoenzymes CA IX et/ou CA XII, surexprimés dans les cellules tumorales.
- (III) Agents anti-obésité, en se basant sur les résultats encourageants rapportés par le topiramate et le zonisamide, qui ont probablement comme cible les isoformes mitochondriales CA VA et/ou CA VB.
- (IV) Agents anti-convulsivants : visant les CA II, VII, XII, et XIV).
- (V) Agents antibactériens, antifongiques et autres types d'agents qui visent plusieurs CAs d'organismes pathogènes tel que les bactéries *H pylori*, tuberculose *Mycobacterium*, etc., les protozoaires *P. falciparum* ou les moisissures *C. albicans*, et *Cr. Neoformans* etc.

I.1.5. Mécanismes de l'inhibition des anhydrases carboniques

Le mécanisme catalytique et le mécanisme d'inhibition de l'CA sont connus en détail, et cela est d'une grande importance pour le développement de nouveaux inhibiteurs. En effet, l'atome de Zn (II) est essentiel pour la catalyse. Des études cristallographiques ont montré que l'ion métallique est situé au fond d'une cavité du site actif profonde de 15Å et coordiné par trois groupes imidazoles des résidus histidines (His 94, His 96 et His119) et une molécule d'eau / ion hydroxyle (figure 2, schéma 2). Ces derniers sont des espèces agissant comme des nucléophiles potentiels⁽⁴⁾.

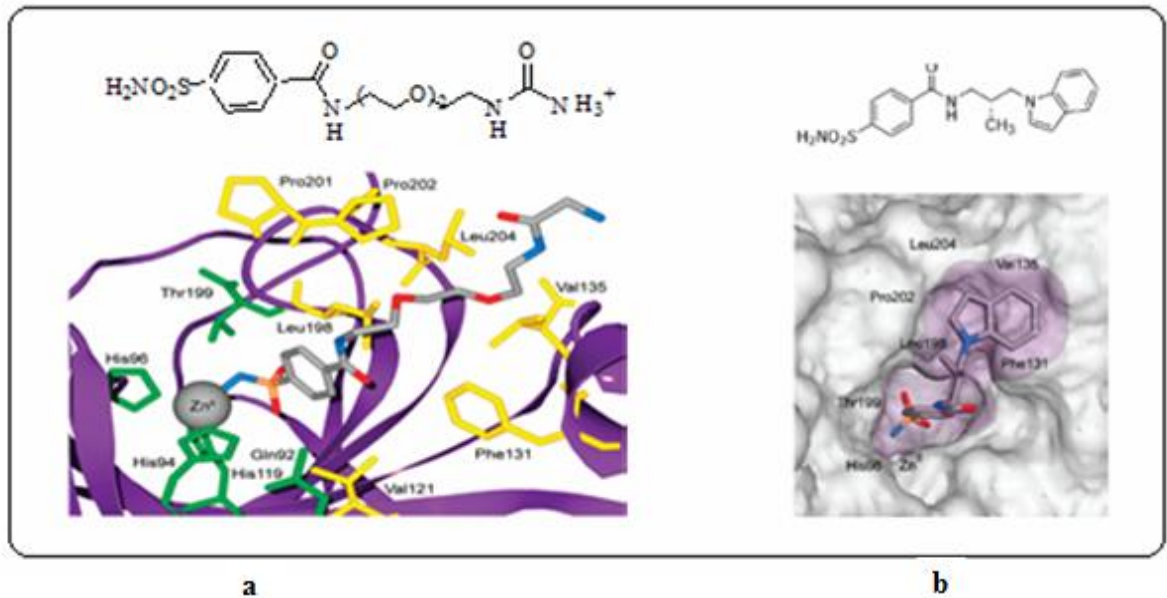


Figure 2 : Modèles de fixation des ligands au site actif de l'anhydrase carbonique humain hCA II : a) ⁽⁷⁾ et b) ⁽⁸⁾ selon des études cristallographiques.

On donne sur le schéma (2) une représentation de la fixation de l'anhydride carbonique CO₂ (A), de l'arylsulfonamide sous sa forme déprotonée (B) et des bicarbonates HCO₃⁻ (C) au sein du site actif de l'enzyme.

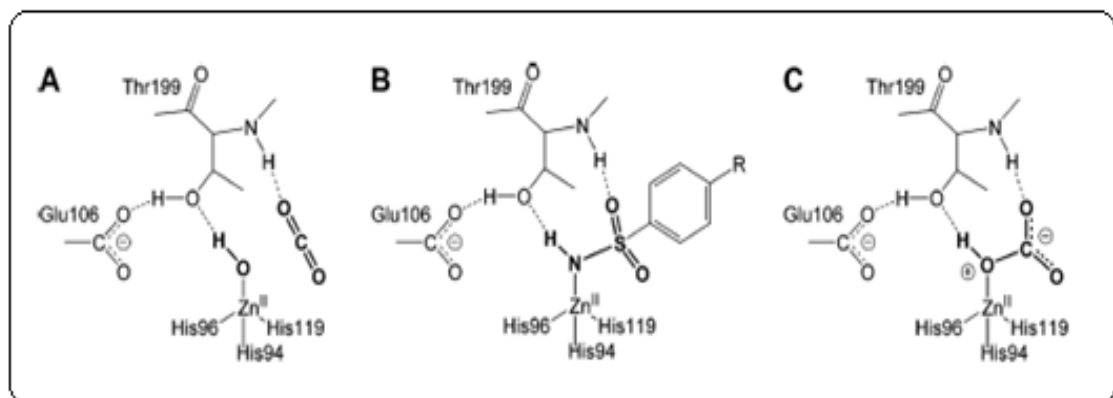


Schéma 2: Comparaisons des modes de fixation de l'anhydride carbonique (A), de l'arylsulfonamide (B) et du bicarbonate (C) au site actif de l'enzyme ⁽⁶⁾.

En comparant ces modes d'interactions avec le site actif de l'enzyme, l'arylsulfonamide inhibiteur par excellence des CAs est peut être regardé comme analogue de l'état de transition dans la réaction d'hydratation du CO₂ en bicarbonate.

⁽⁷⁾ Boriack, P. A.; Christianson, D. W.; Kingery-Wood, J.; Whiteside, M., J. Med. Chem. (1995), 38, 2286.

⁽⁸⁾ Grzybowski, B. A.; Ishchenko, A. V.; Kim, C.-Y.; Topalov, G.; Chapman, R.; Christianson, D. W.; Whitesides, G. M.; hakhnovich, E. I. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (2002), 99, 1270.

Cependant on peut constater que pour une interaction optimale avec le site actif, des interactions électrostatique de type liaisons hydrogènes ou liaisons de Van der Waals complémentaires avec les sites hydrophiles et hydrophobes du site actif de l'enzyme semblent être un atout pour une bonne inhibition de l'CA.

I.1.6. Design des inhibiteurs de l'CA

Le meilleur moyen de concevoir un inhibiteur enzymatique est d'élaborer un analogue du substrat naturel de l'enzyme ou de son état de transition qui présente une affinité plus importante pour cette enzyme.

Selon les données rapportées dans la littérature, les CAs peuvent être inhibés essentiellement par deux classes de composés:

- La première classe renferme des anions susceptibles de former des complexes métalliques comme les halides, les azides, et les thiocyanates.
- La deuxième classe comprend les sulfonamides / sulfamates/sulfamides répondant à la formule générale suivante : RXSO_2NH_2 , avec : (R = aryle; hétéroaryle; perhaloalkyl; X = rien, O ou NH).

Des performances dignes d'intérêt dans le domaine pharmaceutique ont permis d'établir un modèle hypothétique (figure 3) quant à la structure générale des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique.

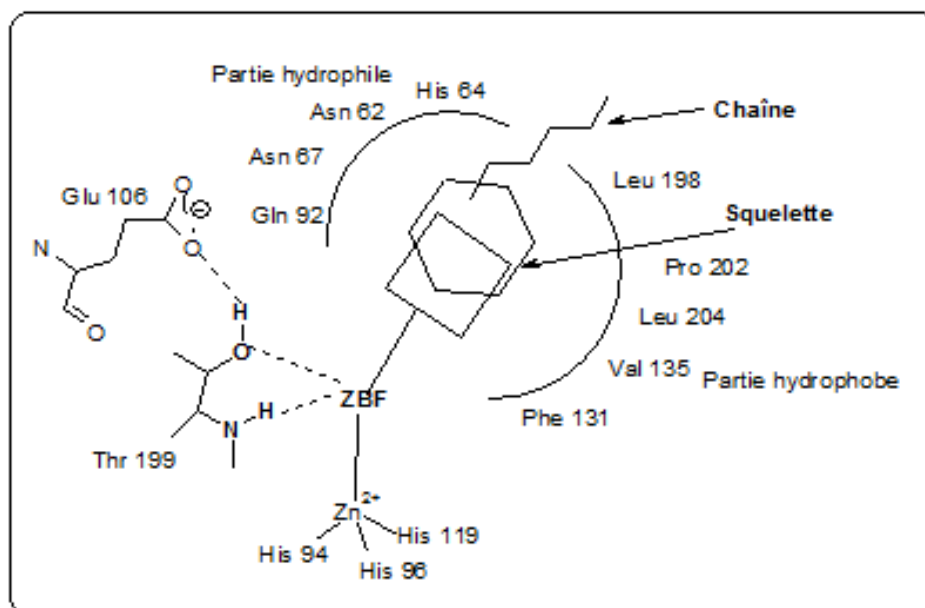


Figure 3 : Modèle général d'un inhibiteur complexé dans le site actif de l'anhydrase carbonique⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾..

⁽⁹⁾ Winum, J-Y.; Scozzafava, A.; Montero, J-L.; Supuran, C.T. New Zinc Binding Motifs in the Design of Selective Carbonic Anhydrase Inhibitors Mini Rev. Med. Chem,(2006).

En effet, pour optimiser des caractéristiques requises pour des applications in vivo, telles que la solubilité, la biodisponibilité, et la biocompatibilité, ces inhibiteurs doivent posséder :

- 1- une fonction (ZBF) liant l'atome de zinc (ZBF =Zinc bond fonction), qui va interagir avec l'ion métallique de l'enzyme et les résidus Thr199 et Glu106.
- 2- La coordination du métal conduit à l'inhibition de l'enzyme et peut apporter une énergie de liaison significative *via* des interactions supplémentaires entre ZBF dont le choix est très important et les résidus acides aminés du site actif. La ZBF utilisée par excellence est la fonction sulfonamide, mais nombreuses études réalisées au sein de notre laboratoire ont montré que les fonctions sulfamide, sulfamate, hydroxysulfamide, etc. constituent également de très bonnes fonctions liant le zinc et ont permis d'élaborer d'excellents inhibiteurs sélectifs.
- 3- Un squelette organique soit de nature aromatique ou hétérocyclique.
- 4- Une longue chaîne attachée au squelette (absente dans les premières et deuxièmes générations d'inhibiteurs). Ces deux derniers éléments doivent s'adopter à des poches hydrophiles et hydrophobes du site actif.

I.1.7. Inhibiteurs de CAIX dans la série de sulfonamides

Récemment, de nombreux inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (CAIs) appartenant à la série des aryles et des hétéro-arylsulfonamides (ArSO_2NH_2) ont été décrits dans la littérature comme étant aussi des inhibiteurs contre la croissance in vitro et in vivo de plusieurs variétés de tumeurs, ceci est dû essentiellement à l'inhibition de certaines isozymes de CA telles que le CA IX et le CA XII surexprimées dans ces tumeurs.

L'inhibition de l'isozyme transmembranaire IX associé aux tumeurs a été d'abord étudiée avec une série de sulfonamides aromatiques et hétérocycliques, y compris les six dérivés utilisés en clinique : l'acetazolamide (AZA) **1**, le methazolamide **3**, l'ethoxzolamide **4**, le dichlorophenamide **5**, et le dorzolamide **6** (figure 4) ⁽¹¹⁾.

⁽¹⁰⁾ Winum, J-Y.; Scozzafava, A.; Montero, J-L.; Supuran, C.T., Sulfamates and their therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* (2005), 25, 186-228.

⁽¹¹⁾ Vullo D., Franchi M., Gallori E., Pastorek J., Scozzafava A., Pastorekova S., Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of the tumor-associated isozyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioorg Med Chem Lett*, (2003);13:1005-1009.

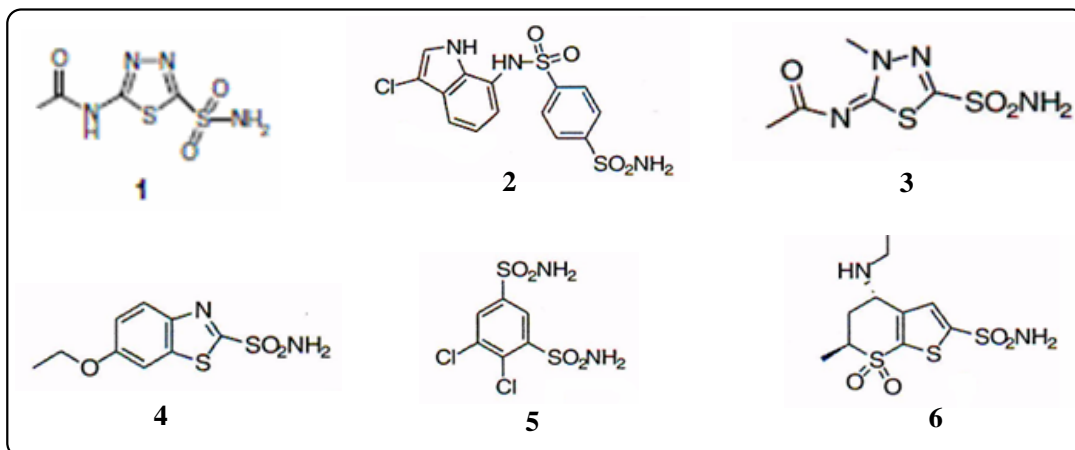


Figure 4 : Exemples de sulfonamides utilisés en clinique.

Ces composés phares manifestent un profil pharmacologique très intéressant pour l'inhibition du CAIX avec des constantes d'inhibition, KI situées dans la gamme de 14-50 nM. Ils peuvent être considérés comme des chefs de file intéressants pour le développement de nouveaux dérivés anticancéreux.

Ainsi, l'Indisulam **2**, (E7070), qui est parmi les sulfonamides anticancéreux les plus efficaces, avec une constante d'inhibition KI de l'ordre de 24 nM contre le CA IX, a été déjà développé jusqu'au stades des essais cliniques en Europe et au États-Unis⁽¹²⁾.

Parmi les nombreuses possibilités de développement offertes par ces composés biologiquement actifs, un accent particulier a été apporté pour la synthèse de deux séries de sulfonamides halogénés⁽¹³⁾.

La première série renferme des sulfanilamides mono/dihalogéné du type **7**, tandis que la seconde se compose d'aminobenzolamides mono/dihalogénés du type **8**, incorporant divers halogènes (F, Cl, Br, et I ;)(Figure 5).

Ces sulfonamides ont été synthétisés à partir des anilines correspondantes par l'acétylation (protection du groupe aminé), chlorosulfonylation, suivi soit d'amidation, ou de réaction avec le 5-amino-1, 3,4-thiadiazole-2-sulfonamide (et éventuellement une déacétylation).

⁽¹²⁾ Supuran CT., Indisulam: An anticancer sulfonamide in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs* (2003);12:283-287.

⁽¹³⁾ Hies MA, Vullo D, Pastorek J, Scozzafava A, Hies M, Caproiu MT, Pastorekova S, Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of tumor-associated isozyme IX by halogenosulfanilamide and halogenophenylaminobenzolamide derivatives. *J Med Chem* (2003);46:2187-2196.

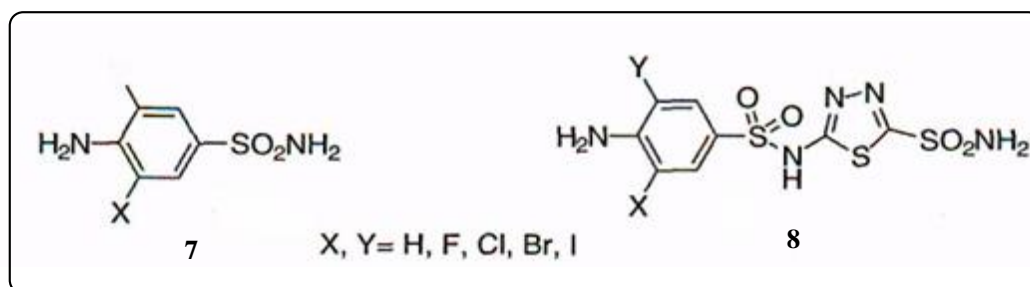


Figure 5 : Structures générales de certains sulfonamides halogénés.

L'évaluation biologique de ces composés a déjà permis d'obtenir des propriétés inhibitrices sélectives intéressantes vis-à-vis des isozymes CA I, II, IV et IX, ce qui va permettre le design et la conception de nouveaux inhibiteurs plus efficace et plus sélectifs.

Une autre contribution par l'équipe du Professeur C T. Supuran et qui consistait à introduire des atomes de fluor dans des structures dérivées de sulfonamides aromatique/hétérocyclique a été rapportée. Parmi les composés obtenus, il faut citer le 2,3,5,6-tétrafluorobenzoyle (Figure 6), dérivé du méthanilamide qui est considéré comme l'inhibiteur subnanomolaire le plus sélectif avec une constante d'inhibition de 0.8 nM contre le hCA IX, et un rapport de sélectivité de 26 par rapport au CA II ⁽¹⁴⁾.

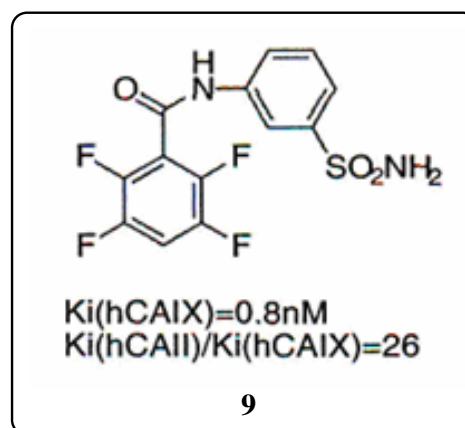


Figure 6 : Structure générale d'un sulfonamide tétrafluoré inhibiteur subnanomolaire contre le hCAIX.

⁽¹⁴⁾ Vullo D, Scozzafava A, Pastorekova S, Pastorek J, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of the tumor-associated isozyme IX with fluorine-containing sulfonamides. The first subnanomolar CAIX inhibitor discovered. *Bioorg Med Chem Lett* (2004); 14:2351-2356.

Pour rester toujours dans la pharmacomodulation des sulfonamides récemment rapportée, on se doit de citer une série de dérivés de sulfonamides incorporant une partie hydrazine en leur structure (figure 7)⁽¹⁵⁾. Tous les composés de cette série se sont révélés posséder une activité inhibitrice contre le hCA IX meilleure ou égale à celle de l'indisulam qui se trouve actuellement au stade des essais cliniques. Trois composés de cette série possédant des constantes d'inhibition situées dans la gamme de 3.2-5.4 nM, étant considérés parmi les inhibiteurs du hCA IX les plus efficaces et leur pouvoir d'inhibition comparé à celui de l'indisulam qui est de cinq à sept fois plus élevé.

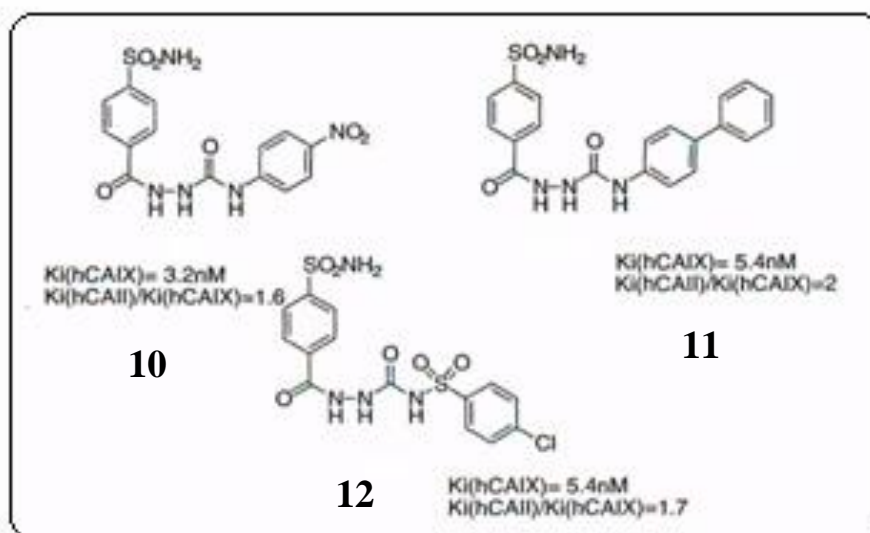


Figure 7 : Sulfonamides incorporant une partie hydrazine en leur structures.

Presque tous les exemples des sulfonamides renfermant le pharmacophore urée rapporté dans cette étude étaient en faveur des propriétés inhibitrices du hCA IX, et contrairement aux dérivés utilisés actuellement en thérapeutique (y compris indisulam), tous ces composés présentent une forte activité vis-à-vis de l'isoforme transmembranaire hCA IX tout en montrant une bonne sélectivité par rapport à l'isoenzyme cytosolique hCA II.

Récemment, l'affinité exceptionnelle de divers benzenesulfonamides aromatiques incorporant des parties triazinyle a été indiquée dans les travaux rapportés par Garaj et al⁽¹⁶⁾.⁽¹⁷⁾.

⁽¹⁵⁾ Winum JY., Dogne JM., Casini A., de Leval X., Montero JL., Scozzafava A., Vullo D., Innocenti A., Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of cytosolic membrane-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides incorporating hydrazino moieties. *J Med Chem* (2005); 48:2121-2125.

⁽¹⁶⁾ Garaj V., Pucetti L., Fasolis G., Winum J-Y., Montero J-L., Scozzafava A., Vullo D., Innocenti A., Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides incorporating 1,2,4-triazine moieties. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14:5427-5433.

Trois composés têtes de séries : Le chlorotriazinyl-sulfanilamide **9** aussi bien que les dérivés bis-éthoxytriazinyle du sulfanilamide **10** et l'homosulfanilamide **11** (figure 8) étaient parmi les inhibiteurs du hCA les plus efficaces et les plus sélectifs pour le CAIX jamais obtenus jusqu' à présent avec des *K_i* dans la gamme subnanomolaire de 0.12-0.34 nM.

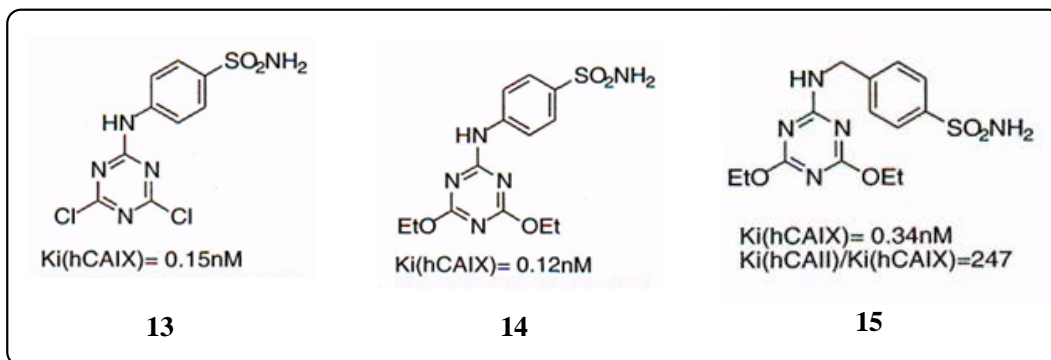


Figure 8 : Benzenesulfonamides aromatiques incorporant des parties triazinyle en leurs structures.

Beaucoup d'autres classes d'inhibiteurs de CA IX en particulier des dérivés sulfamates et sulfamides (Figure 9) ont été étudiées^{(18) (19) (20)}

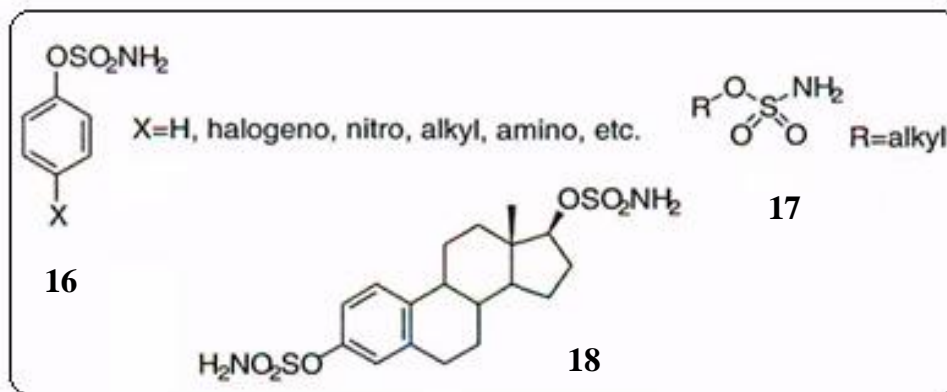


Figure 9 : Sulfamates et sulfamides inhibiteurs de l'hCA.

- ⁽¹⁷⁾ Garaj V., Pucetti L., Fasolis G., Winum J-Y., Montero J-L., Scozzafava A., Vullo D., Innocenti A., Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors: Novel sulfonamides incorporating 1,3,5-triazine moieties as inhibitors of the cytosolic and tumour-associated carbonic anhydrase isozymes I, II and IX. *Bioorg Med Chem Lett*; (2005);15:3102-3108.
- ⁽¹⁸⁾ Winum JY., Vullo D., Casini A., Montero JL., Scozzafava A., Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic isozymes I and II and transmembrane, tumour-associated isozyme IX with sulfamates including EMATE also acting as steroid sulfatase inhibitors. *J Med Chem* (2003); 46:2197-2204.
- ⁽¹⁹⁾ Nussbaumer P., Billich A. Steroid sulfatase inhibitors: Their potential in the therapy of breast cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* (2005); 5:507-528.
- ⁽²⁰⁾ Winum JY., Pastorekova S., Jakubickova L., Montero JL., Scozzafava A., Pastorek J., Vullo D., Innocenti A., Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of cytosolic/tumour-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with bis-sulfamates. *Bioorg Med Chem Lett* (2005); 15:579-584.

Cependant, une recherche plus poussée doit être faite dans le domaine des CAIX, étant donné que l'inhibition de ces isoenzymes est gouvernée par des mécanismes d'action complexes et que dans certains cas, l'activité antitumorale peut être exaltée par la combinaison de plusieurs agents inhibiteurs de CA IX ou en association avec d'autres thérapies.

I.1.8. Conclusion

Les CAs constituent actuellement une nouvelle approche dans le domaine thérapeutique pour le ciblage de plusieurs pathologies impliquant leur surexpression.

Le mécanisme catalytique et le mécanisme d'inhibition des CAs sont connus en détail et beaucoup de données biochimique, physiologique et pharmacologique sont maintenant suffisantes pour justifier la possibilité d'utiliser l'isozyme transmembranaire CA IX comme cible dans le management des tumeurs hypoxiques qui ne répondent pas, ou répondent mal à la chimio- et à la radiothérapie classique.

De nombreux exemples de composés appartenant à une variété de classes chimiques et présentant des constantes d'inhibition dans la gamme de 50-500 nM sont actuellement disponibles pour l'inhibition de CAIX. Mais le problème majeur de ces inhibiteurs est leur manque de sélectivité surtout par rapport aux isoenzymes CA I et II omniprésents dans l'organisme ; Ce qui nécessite la mise au point de nouveaux inhibiteurs du CAIX plus efficaces et plus sélectifs.

CHAPITRE 2

Les saccharides.

I.2.1. Introduction

Les sucres, également appelés hydrates de carbone ou saccharides sont composés d'atomes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène; ils sont nommés monosaccharides, disaccharides, etc., selon le nombre d'unités de sucre qu'ils contiennent.

Les oligosaccharides sont constitués de chaînes plus longues, les molécules les plus longues étant des polysaccharides.

Les hexoses importants, isomères de la série D sont le glucose, deux de ses épimères, le galactose et le mannose, ainsi qu'un cétose, le fructose et de dérivés aminés comme la β -D-glucosylamine (figure 10)⁽²¹⁾.

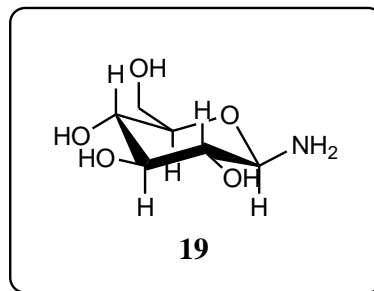


Figure 10 : Structure de la β -D-glucosylamine

I.2.2. Les sucres issus de sources naturelles

Les oligosaccharides peuvent être isolés à partir d'extraits humains (sérum, cellules), du lait animal ou de l'urine. Les fragments d'oligosaccharides peuvent être issus de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes par digestion de lyases⁽²²⁾ ou par dégradation à l'acide nitrique.

De nombreuses méthodes chimiques sont aussi utilisées pour obtenir des fragments oligosaccharidiques à partir de polysaccharides bactériens ou végétaux, telles que les oxydations par le périodate (NaIO_4).

De multiples étapes en chromatographie sont souvent nécessaires pour isoler / purifier les oligosaccharides ; sont inclus la filtration sur gel, les chromatographies échangeuses d'ions ou encore la chromatographie HPLC en phase normale ou inverse. Ces produits, possédant une terminaison réductrice se révèlent être bien adaptés à une modification ou à une fixation sur support.

⁽²¹⁾ David, S., Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres, introduction chimique aux glycosciences, InterEdition / CNRS Edition, Paris, (1995).

⁽²²⁾ Chai W.; Luo J.; Lim C.K.; Lawson A.M.; Characterization of heparin oligosaccharide mixtures as ammonium salts using electrospray mass spectroscopy ; Anal. Chem.; (1998); 70: 2060-2066.

I.2.3. Les sucres synthétiques ou biosynthétiques

Contrairement aux oligonucléotides et aux protéines, les oligosaccharides sont difficiles à obtenir par des synthèses chimiques. Cette difficulté est liée à leur structure complexe d'une part, les chaînes peuvent être linéaires ou ramifiées, et d'autre part, les blocs monosaccharides ont des configurations anomériques α ou β et les monosaccharides adjacents peuvent se lier par différents atomes.

Pour ces raisons, de multiples étapes de protection et déprotection sélectives sont nécessaires sur les groupes hydroxyles des monosaccharides pendant la synthèse chimique; la synthèse manuelle d'oligosaccharides reste la technique la plus pratiquée.

Néanmoins, malgré les difficultés rencontrées, les synthèses d'un nombre considérable d'oligosaccharides complexes ont été réalisées, les produits obtenus ont été extrêmement utiles dans les études sur la spécificité de reconnaissance avec des anticorps et d'autres protéines interagissant avec les sucres.⁽²³⁾

L'application de la chimie combinatoire à la synthèse des collections de composés sucres a reçu beaucoup d'attention depuis quelques années. Cette approche est en fait dérivée de la synthèse automatisée d'ADN mais aussi de peptides^{(24) (25) (26)}.

Une méthode automatisée en phase solide qui inclut les étapes de protection et de protections sélectives a été développée et appliquée à la synthèse d'oligosaccharides contenant du glucose et du mannose^{(27) (28)}.

L'approche de synthèse en phase solide a l'avantage d'éviter l'isolement des produits intermédiaires et les différentes étapes de purification.

Parallèlement à ces synthèses chimiques, les oligosaccharides peuvent être préparés par des réactions catalysées par des enzymes⁽²⁹⁾.

Dans la nature, il existe deux classes d'enzymes pouvant être étroitement liées à la

⁽²³⁾ Nicolaou K.C.; Mitchell H.J.; Adventures in carbohydrate chemistry: new synthetic technologies, chemical synthesis, molecular design and chemical biology ; Angew. Chem. Int. Ed. Engl.(2001) ; 40 : 1576-1624.

⁽²⁴⁾ Fodor S.P.; Read J.L.; Pirrung M.C.; Stryer L.; Lu A.T.; Solas D.; Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science,(1991); 251 : 767-776.

⁽²⁵⁾ Marcaurelle L.A.; Seeberger P.H.; combinatorial carbohydrate chemistry ; Curr. Op. Chem. Biol. (2002) ; 6 : 289-296.

⁽²⁶⁾ Sears P.; Wong C.-H.; Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins ; Science (2001); 291: 2344-2350.

⁽²⁷⁾ Plante O.J.; Palmacci E.R.; Seeberger P.H.; Automated solid-phase synthesis of oligosaccharides ; Science;(2001) ; 291 : 1523-1527.

⁽²⁸⁾ Zhang Z.Y.; Ollmann I.R. ; Ye X.-S. ; Wischnat R.; Baasov T.; Wong C.-H.; Programmable onepot oligosaccharide synthesis ; J. Am. Chem. Soc.; (1999) ; 121 : 734-753.

⁽²⁹⁾ Koeller K.M.; Wong C.H.; Enzymes for chemical synthesis; Nature ,(2001); 409: 232-240.

construction d'oligosaccharides : les glycosyltransférases et les glycosidases.

Les premiers catalysent la formation de chaînes glycosidiques et les secondes les hydrolysent.

Le plus grand avantage de la synthèse enzymatique de sucres est que les substrats sont utilisés dans leur forme naturelle. Aucun groupement protecteur n'est requis pour former des liaisons glycosidiques de manière régio et stéréospécifique.

I.2.4. Les glucides en biologie

La fonction biologique des glucides est très variée. On les trouve impliqués dans le stockage de l'énergie (glycogène, ATP, amidon), la structure des acides nucléiques (ribose et désoxyribose), dans la structure des parois des végétaux (cellulose) et bactéries (peptidoglycane) et, enfin, dans la reconnaissance cellulaire (liés aux protéines ou aux lipides).

Il a été montré que les sucres, outre leurs fonctions classiques structurales ou énergétiques sont très impliqués dans des phénomènes de reconnaissances biologiques très fines ; on peut citer par exemple leurs rôles dans les modifications post-traductionnelles des protéines (glycosylation) qui leur apportent de nouvelles propriétés dans le domaine de l'immunologie ou, plus généralement, dans les processus de reconnaissance, d'adhésion ou de transfert d'informations entre des cellules ; ils sont impliqués par exemple dans la reconnaissance de chimiokines lors de la réponse inflammatoire ou dans le mécanisme d'entrée de certains virus dans la cellule (comme le HIV ou l'Herpes simplex)⁽³⁰⁾.

La communication intercellulaire s'établit à l'aide de molécules "messages" qui sont reconnues par d'autres molécules localisées sur la membrane cellulaire : les récepteurs membranaires.

I.2.4.1. Les glycoconjugués biologiques

Les glucides biologiques se composent généralement de plusieurs unités monosaccharidiques liées de façon covalente et sont appelés oligosaccharides ou glycanes.

Ces oligosaccharides sont dans la plupart des cas, associés à d'autres biomolécules comme des lipides ou des protéines et ces entités, connus sous le nom de glycoconjugués, peuvent être classés comme glycolipides et glycoprotéines⁽³¹⁾.

⁽³⁰⁾ Williams S.J.; Davies G.J.; Protein-carbohydrate interactions: learning lessons from nature; Trends in Biotechnol.; (2001); 19(9): 356-362.

⁽³¹⁾ Hirabayashi J.; Oligosaccharide microarrays for glycomics; Trends in Biotechnol.; (2003); 21(4): 141-143.

I.2.4.1.1. Les glycoprotéines

La plupart de ce type de protéines se trouve dans les récepteurs membranaires, les molécules d'adhérence à d'autres cellules ou à leur matrice, les immunoglobulines.

Les glycoprotéines sont impliquées dans des fonctions essentielles comme par exemple la détermination du groupe sanguin qui est différencié par des changements de la structure oligosaccharidique.

On les trouve aussi dans les mucines, sécrétions de muqueuse (salivaire, bronchiale, intestinale), les globulines plasmatiques et les glycoprotéines des groupes sanguins.

Elles ont comme partie glycosidique un tronc commun de cinq oses : soit un bras de mannose, soit un bras de Gal-GlcNAc terminé par un acide sialique.

I.2.4.1.2 Les glycolipides

Sont composés d'un oligosaccharide lié de façon covalente à un acide gras. Ces composés ainsi formés deviennent plus hydrosolubles que le lipide seul. L'association de la fonction lipide non polaire avec les membranes cellulaires permet l'ancrage de ces molécules à la surface extracellulaire. Ces composés peuvent se comporter comme des détergents, formant des micelles à des concentrations élevées.

En effet, les glycolipides représentent une classe importante d'amphiphiles naturels, impliqués dans de nombreux événements biologiques.

Les glycolipides, exposés à la surface des cellules jouent un rôle clé dans les processus de reconnaissance ligands-récepteurs cellulaires, incluant également l'infection de cellules par les virus et les bactéries⁽²⁾.

I.2.5. Couplage des sucres aux agents thérapeutiques

Une meilleure connaissance de la fonction des glucides a conduit à les employer comme vecteurs pour le ciblage actif des médicaments. Ils sont des candidats prometteurs en raison de leur faible masse moléculaire et de leur diversité structurale qui leur permet d'interagir de manière très spécifique et très sélective.

La conception de médicaments aptes à se lier à des glucides pourrait vraisemblablement empêcher les bactéries et les virus d'envahir les cellules hôtes. Ou encore, on pourrait mettre au point des vaccins inspirés de la structure des glucides propres aux diverses cellules pathogènes⁽²⁾.

Il a également été démontré que les maladies auto-immunes et les cancers impliquent des modifications de structure au niveau des molécules glucidiques situées à la surface des cellules.

Dans le domaine pharmaceutique, une grande diversité chimique est accessible et la nature du sucre utilisé peut être modulée en fonction du site d'action où le principe actif doit être délivré⁽³²⁾.

Il existe divers exemples de médicaments qui sont des glucides ou dont la molécule présente une structure constituée d'une portion glucidique.

La formule de certains antibiotiques importants, comme la streptomycine, renferment des entités glucidiques qui jouent un rôle déterminant dans l'activité de ces composés.

L'AZT (un médicament anti-VIH) (Figure 11), contient une entité glucidique hors du commun, laquelle est cruciale dans le cadre du mécanisme d'action de cette substance.

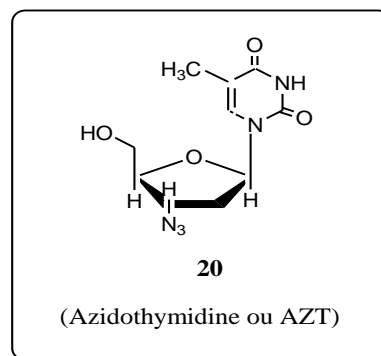


Figure 11 : Structure générale de l'AZT.

Les glycosides cardiotoniques d'origine naturelle (également dénommés digitaliques) : La digoxine et la digitoxine (Figure 12) sont des médicaments couramment prescrits en médecine cardio-vasculaire.

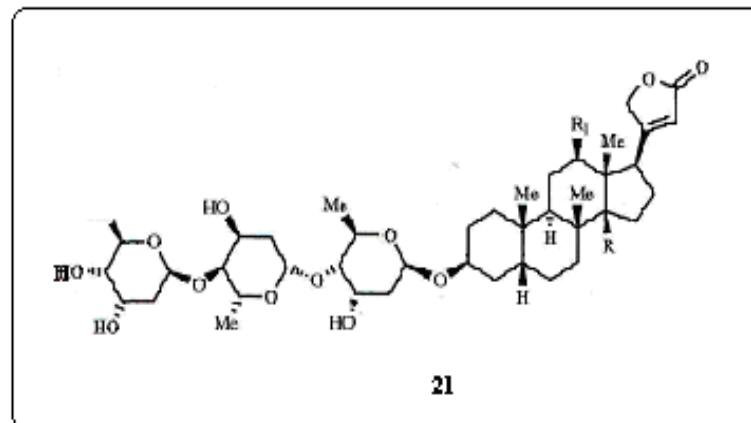


Figure 12 : Structure générale des glycosides cardiotoniques,
Digoxine : R = OH, R₁ = OH; Digitoxine : R = OH, R₁ = H.

⁽³²⁾ Maeder T.; De nouveaux médicaments: les sucres; Pour la Science;(2002); 299: 70-77.

Ces molécules contiennent trois cycles de type glucidique rattachés à un noyau stéroïde.

Une étude récente a montré que la topiramate (TPM) **22** (Figure 13), qui est un dérivé sulfamate du D-fructose dans sa configuration pyranose : Le 2,3:4,5-di-O-isopropylidene-β-D-fructopyranose sulfamate peut agir en tant qu'inhibiteur efficace contre plusieurs isozymes de l'anhydrase carbonique en particulier l'CA IX⁽³³⁾.

Ce composé est actuellement utilisé dans le traitement de l'épilepsie et des crises migraineuses (Topamax ®, Johnson & Johnson ; Epitomax ®, Janssen-Cilag SA). Son mécanisme d'action n'est pas très bien connu, et son activité via l'inhibition de l'anhydrase carbonique demeure un vaste sujet de controverse.

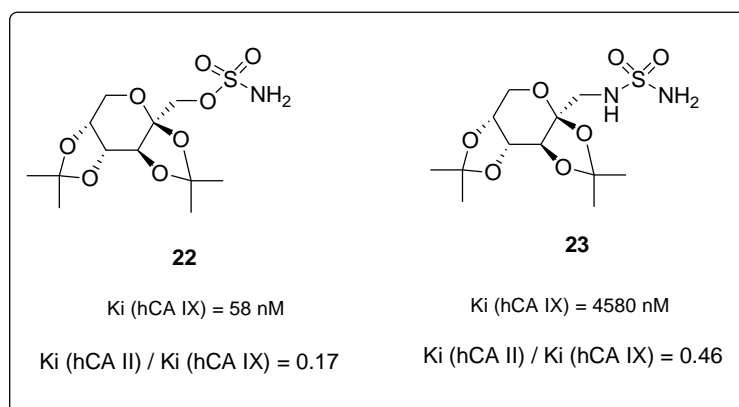


Figure 13 : Structures et constantes d'inhibition contre l'hCAIX du topiramate **22** et son analogue **23** en série sulfamide.

Son analogue **23** en série sulfamide, a montré une inhibition sélective de l'isozyme CAIX par rapport à l'isoenzyme CAII très abondant dans l'organisme⁽³⁴⁾.

Ces résultats mettent bien en évidence que le simple remplacement de la fonction sulfamate (-OSO₂NH₂) par une fonction sulfamide (-NHSO₂NH₂) permet de modifier de façon significative l'activité inhibitrice et la sélectivité de l'inhibiteur vis-à-vis des différentes isoenzymes.

⁽³³⁾ Guerrini, R. ; Parmeggiani, L., Topiramate and its clinical applications in epilepsy. Expert Opin. Pharmacother. (2006), 7, 811-823.

⁽³⁴⁾ Winum JY, Temperini C, El Cheikh K, Innocent! A, Vullo D, Ciattini S, Montero JL, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: Clash with Ala65 as a means for designing inhibitors with low affinity for the ubiquitous isozyme II, exemplified by the crystal structure of the topiramate sulfamate analogue. J Med Chem (2006); 49:7024-7031.

Une famille de benzenesulfonamides liées à divers sucres via un cycle triazole, préparée par l'approche dite « click chemistry » a été décrite par Wilkinson et coll⁽³⁵⁾ (36). Des propriétés inhibitrices intéressantes contre le CAIX ont été observées avec ces composés en particulier le composé ci-dessous (Figure 14) qui présente une inhibition au nanomolaire.

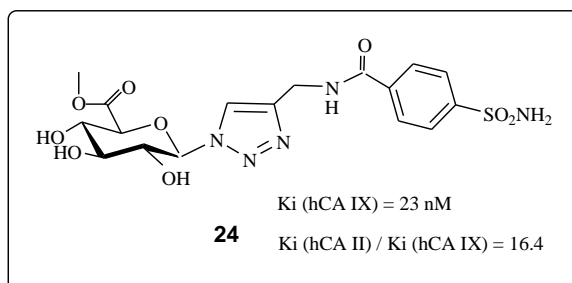


Figure 14 : Exemple d'un conjugué benzenesulfonamides- hydrates de carbone préparé par l'approche dite « click chemistry ».

Le couplage d'un agent thérapeutique à un motif glucidique joue sur la balance hydrophile-lipophile qui permet de modifier les propriétés de cette molécule vis-à-vis du passage des membranes cellulaires et nucléaires.

Cela pourrait permettre d'améliorer ses paramètres pharmacocinétiques (absorption, distribution, élimination), de diminuer la dose utilisée et par conséquent réduire ses effets secondaires indésirables.

I.2.6. Les cyclodextrines

I.2.6.1. Structure et propriétés des cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs) ou cyclomaltooligosaccharides sont des composés d'origine naturelle, obtenus industriellement par dégradation enzymatique de l'amylose (forme linéaire de l'amidon) à l'aide d'une enzyme : la cyclodextrine glucosyltransférase (CGTase).

⁽³⁵⁾ Wilkinson BL, Bornaghi LF, Houston TA, Innocenti A, Vullo D, Supuran CT, Poulsen SA. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of isozymes I, II, and IX with triazole-linked O-glycosides of benzene sulfonamides. *J Med Chem* (2007); 50:1651-1657.

⁽³⁶⁾ Wilkinson BL, Bornaghi LF, Houston TA, Innocenti A, Supuran CT, Poulsen SA. A novel class of carbonic anhydrase inhibitors: Glycoconjugate benzene sulfonamides prepared by "click-tailing". *J Med Chem* (2006);49:6539-6548.

Les trois types de CD les plus couramment rencontrés sont l' α , le β , et le γ CD, qui sont constitués respectivement de 6, 7 et 8 unités D-glucopyranosiques, liées en α -1,4. (figure 15) ⁽³⁷⁾.

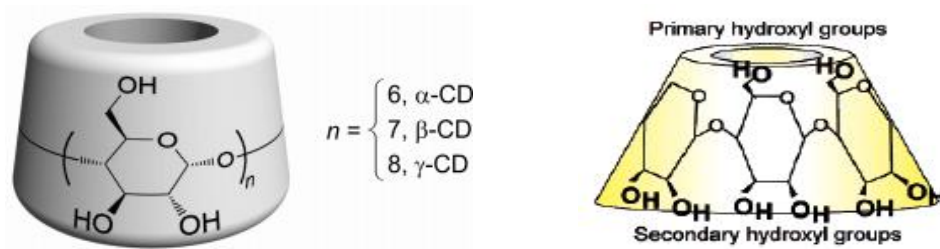


Figure 15 : A gauche, structures tridimensionnelles des cyclodextrines naturelles (α , β , γ -CD). A droite: structure tronconique des cyclodextrines, avec une vue des hydroxyles primaires (petit côté) et des hydroxyles secondaires (grand côté).

Grâce à la structure tronconique et de la position particulière des hydroxyles, les cyclodextrines sont amphiphiles et possèdent donc deux zones de polarités distinctes. L'extérieur de la cavité et les extrémités sont polaires : ceci est dû essentiellement aux hydroxyles et favorise ainsi la solubilisation dans des solvants très polaires.

En revanche l'intérieur de la cavité où se trouve uniquement les oxygènes interglucosidiques, est moins polaire et cette zone est plus hydrophobe.

C'est ce caractère amphiphile lié à leur structures tridimensionnelles qui donne aux cyclodextrines sa propriété la plus intéressante, celle de former des complexes supramoléculaires en solution aqueuse avec une (des) molécule(s) invitée(s).

De nombreux travaux ont montré que ces cyclodextrines pouvaient donc former des complexes d'inclusion avec des molécules hydrophobes et permettre ainsi la solubilisation de ces molécules dans des milieux aqueux. De nombreuses applications ont été proposées pour tirer profit de ce phénomène, en particulier dans le domaine pharmaceutique ^{(38) (39)}.

Parmi les cyclodextrines utilisables, la β -cyclodextrine (β -CD) qui comporte 7 unités glucose, (Figure 16) est la plus adaptée au niveau de la taille de sa cavité et elle est la moins coûteuse des trois ⁽⁴⁰⁾.

⁽³⁷⁾ Ueno, A.; Breslow, R. *Tetrahedron Lett.* (1982), 23, 3451.

⁽³⁸⁾ Duchêne, D., *New Trends in Cyclodextrins and Derivatives*; Editions de Santé : Paris, (1991).

⁽³⁹⁾ Brewster M E., Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 645–666.

⁽⁴⁰⁾ Szejtli, J. *Cyclodextrin Technology*; Kluwer: Dordrecht, The Netherlands, (1988).

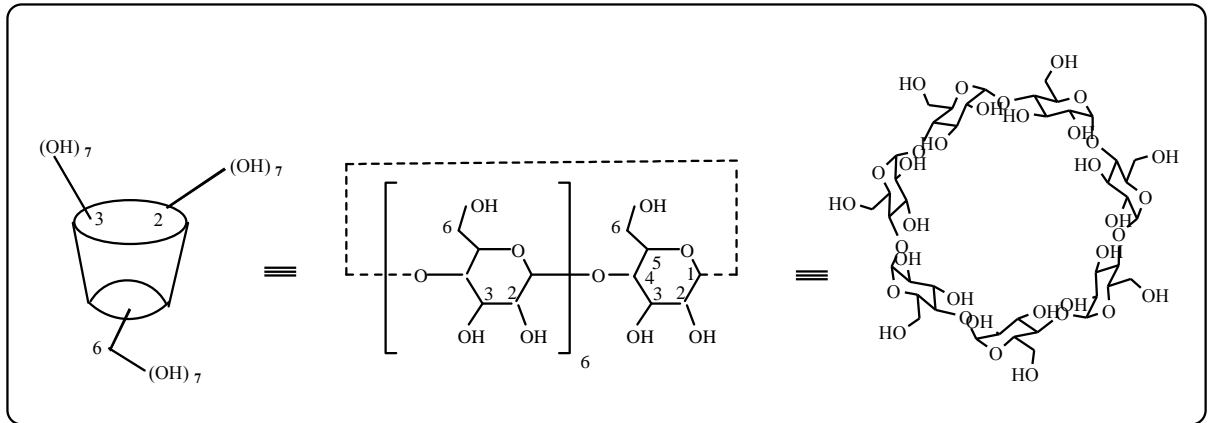


Figure 16 : Différentes représentations pour la β -cyclodextrine.

Il est à remarquer la faible solubilité de la β CD en comparaison de celles de l' α et de la γ CD. Cette perte de solubilité, dont les causes n'ont pas été totalement éclaircies, semble due au réseau de liaisons hydrogène particulièrement fort dans le cas de CD à 7 unités. Dans les β CD mono- ou poly-modifiées, les solubilités obtenues sont alors très largement augmentées par rapport à la β CD naturelle, y compris après greffage de groupements relativement hydrophobes, renforçant l'hypothèse du réseau stabilisant. Dans le cas de l' α CD cette ceinture de liaisons H est incomplète, l'une des unités étant dans une position distordue, il n'y a donc que 4 liaisons formées (au lieu des 6 prévues)⁽⁴¹⁾.

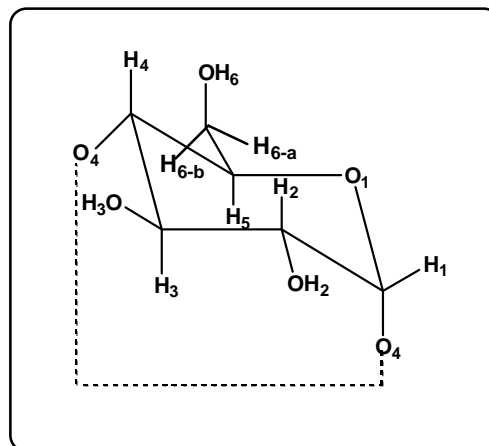


Figure 17 : Représentation d'une unité glucose dans la β -CD.

I.2.6.2. Fonctionnalisation de la β - cyclodextrine

⁽⁴¹⁾ Saenger W., Jacob J., Gessler K., Steiner T., Hoffmann D., Sanbe H., Koizumi K, Smith S M., T.Takaha, Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues Beyond the Doughnut, Chem. Rev. (1998), 98, 1787-1802.

Dans le but de développer des vecteurs de haute affinité pour une molécule particulière, il est en effet envisageable de faire des modifications (substitutions) sur la cyclodextrine.

La préparation des cyclodextrines, sélectivement modifiées est un enjeu crucial. Plusieurs méthodes et stratégies pour les modifications sélectives des cyclodextrines ont été utilisées.

Deux facteurs essentiels sont nécessaires pour maîtriser la chimie des cyclodextrines: la nucléophilie des groupements OH vis à vis de certains réactifs et la capacité des cyclodextrines à former des complexes d'inclusion avec ces réactifs⁽⁴²⁾.

Toutes les modifications des cyclodextrines portent sur les hydroxyyles ; ces derniers sont connus par leur caractère nucléophile.

La première réaction qui gouverne la régiosélectivité lors des modifications (mono, di, tri etc.) est une attaque électrophile de ces positions.

Parmi les trois types des groupements OH des cyclodextrines, ceux de la position 6 sont les plus basiques et souvent les plus nucléophiles, ceux de la position 2 sont les plus acides et ceux de la position 3 sont les moins accessibles(Figure 16)⁽⁴³⁾.

En effet, dans les situations normales, un réactif électrophile attaque préférentiellement la position 6.

Comme il est important de noter que le réactif le plus actif attaquera d'une manière moins sélective les groupements OH de la première et deuxième face des cyclodextrines ; alors qu'un réactif moins actif attaquera plus sélectivement les groupements OH en position 6.

Si les groupements OH de la position 2 sont les plus acides, ce sont eux les premiers qui seront déprotonés⁽⁴⁴⁾.

Un autre facteur fondamental, affectant la chimie et les propriétés des groupements OH est la capacité des cyclodextrines à former des complexes d'inclusion⁽⁴⁵⁾.

En effet, si le réactif électrophile forme un complexe avec les cyclodextrines, l'orientation du réactif dans le complexe fait intervenir un facteur additionnel pour la détermination de la nature du produit.

Il est également important de souligner que la nature du solvant joue un rôle non négligeable sur la formation de ces complexes d'inclusion⁽⁴⁶⁾.

⁽⁴²⁾ Hybl, A.; Rundle, R. E.; William, D. E. J. Am. Chem. Soc. (1965),87, 2779.

⁽⁴³⁾ Saenger, W.; Noltemeyer, M.; Manor, P. C.; Hingerty, B.; Klar, B. Bioorg. Chem. (1976), 5, 187.

⁽⁴⁴⁾ Rong, D.; D'Souza, V. T. Tetrahedron Lett. (1990), 31, 4275.

⁽⁴⁵⁾ Singh.M. , Sharma.R., Banerjee.U.C., Biotechnological applications of cyclodextrins ; Biotechnology Advances 20 (2002) 341–359

En plus de l'effet de solvant et de complexation sur la nature du produit final obtenu, une stratégie très utilisée pour éviter les complications dues aux interactions des réactifs avec les hydroxyles non ciblés, consiste à protéger ces groupements OH et faire diriger les réactifs électrophiles exclusivement vers les positions souhaitées^{(47) (48)}.

I.2.6.3. Modification de la face primaire

Les OH primaires sont plus nucléophiles que les OH secondaires, ils sont donc facilement modifiés et transformés en d'autres groupements fonctionnels.

La permodification sélective de ces OH primaires (schéma3) est relativement facile comparativement aux mono, di ou tri-substitution, si cette substitution est réalisée lentement en utilisant des quantités de réactifs bien appropriées.

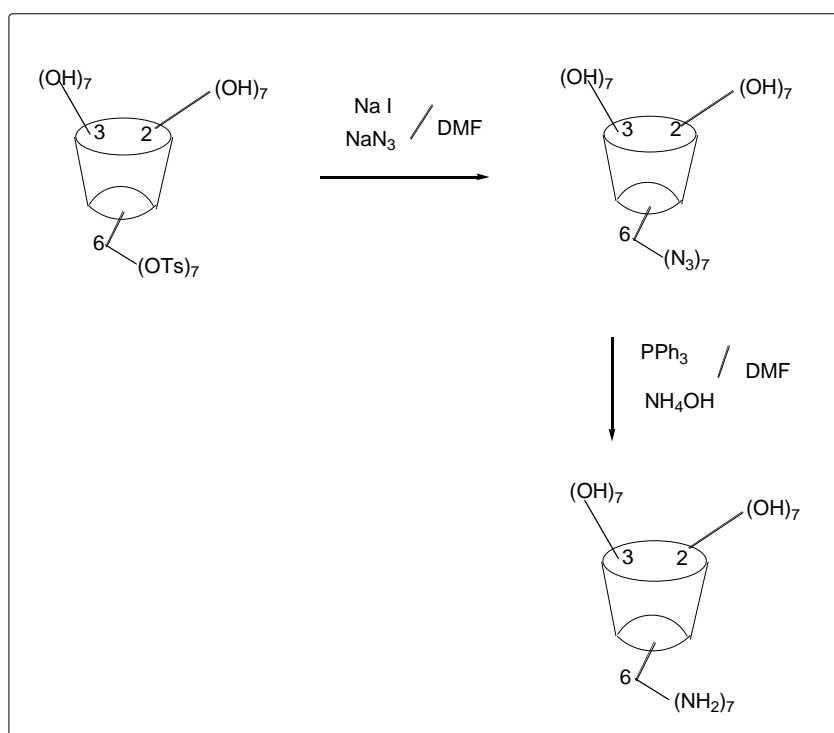


Schéma 3 : Accès au per-6-amino-β-Cyclodextrine à partir du dérivé tosylé.

⁽⁴⁶⁾ Fujita, K.; Nagamura, S.; Imoto, T. *Tetrahedron Lett.* (1984), 25,5673.

⁽⁴⁷⁾ Coleman, A. W.; Zhang, P.; Parrot-Lopez, H.; Ling, C. C.; Miocque, M.; Mascrier, L. *Tetrahedron Lett.* (1991), 32, 3997.

⁽⁴⁸⁾ Takeo, K.; Uemura, K.; Mitoh, H. J. *Carbohydr. Chem.* (1988), 7,293.

Les électrophiles forts tels que les alkyles⁽⁴⁹⁾, les phosphoryles⁽⁵⁰⁾, les silyles⁽⁴⁸⁾, les sulfonyles⁽⁴⁵⁾ ⁽⁴⁶⁾ ou les chlorures d'acides carboxyliques⁽⁵¹⁾, donnent les produits correspondants avec libération d'un acide, qui est rapidement neutralisé en présence d'un solvant basique ou une base faible.

En effet, les cyclodextrines sont stables sous des conditions basiques (PH < 14) et se décomposent en revanche en présence d'acides forts (PH < 3)⁽⁵²⁾ ⁽⁵³⁾.

Tous ces réactifs mentionnés sont très actifs et attaquent les groupements OH sans discrimination, produisant ainsi des produits mono, di et trisubstitués, qui nécessitent des séparations chromatographiques ultérieures⁽⁵⁴⁾.

Le réactif le plus utilisé, produisant des modifications sur la face primaires des cyclodextrines est le TBDMSCl (Chlorure de TertioButylDimethylSilyle). Il donne dans des conditions optimales jusqu'à 90% de produit prépondérant séparé par simple chromatographie ou recristallisation⁽⁵⁵⁾.

I.2.6.4. La monosubstitution sur la position 6

Parmi tout les substituants électrophiles, le groupement sulfonyle agit comme un groupement facilement partant et peut être aisément déplacé par des nucléophiles pour conduire à des dérivés très intéressants⁽⁵⁶⁾.

Un grand nombre de nucléophiles attaquent le carbone 6 de ces dérivés sulfonylés pour accéder aux produits modifiés correspondants.

La méthode de choix⁽⁵⁷⁾ pour la synthèse de mono-6-tosyl- β - cyclodextrine, est de faire réagir la cyclodextrine avec le chlorure de tosylo(TosCl) dans un rapport (1 / 1 équivalent) dans un milieu aqueux basique pour une petite durée pour conduire au mono-6-tosylate avec un rendement acceptable. La formation de complexe d'inclusion avec le chlorure de tosylo favorise l'orientation vers la face primaire.

⁽⁴⁹⁾ Coates, J. H.; Easton, C. J.; Lincoln, S. F.; Van Eyk, S. J.; May, B. L.; William, M. L.; Brown, S. E.; Lepore, A.; Liao, M. L.; Luo, Y.; Macolino, V. Schiesser, D. S.; Whalland, C. B.; McKenzie, I. S. C. PCT Int. Apl., WO 9113100, 1991 (*Chem. Abstr.* (1992), 117,29142).

⁽⁵⁰⁾ Siegel, B.; Pinter, A.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* (1977), 99,2309.

⁽⁵¹⁾ Cramer F.; Mackensen G.; Kense K. *Chem. Ber.* (1969), 102,494.

⁽⁵²⁾ Alm, R. S., *Acta Chem. Scand.* (1952), 6, 1186.

⁽⁵³⁾ French D.; Knapp D. W.; Pazur J. H. *J. Am. Chem. Soc.* (1950), 72, 5150.

⁽⁵⁴⁾ Cottaz S.; Driguez H. *Synthesis* (1989), 755.

⁽⁵⁵⁾ Zhang P.; Ling C. C.; Coleman A. W.; Parrot-Lopez H.; Galons H. *Tetrahedron Lett.* (1991), 32, 2769.

⁽⁵⁶⁾ Petter R. C.; Salek J. S.; Sikorsky C. T.; Kumaravel G.; Lin F.-T. *J. Am. Chem. Soc.* (1990), 112, 3860.

⁽⁵⁷⁾ Martin K. A.; Czarnik A. W., *Tetrahedron Lett.* (1994), 35, 6781.

Le déplacement du groupement tosylo par des réactifs nucléophiles spécifiques tels que: L'iode, l'azide, les thioacétate, l'ammoniaque, l'hydroxylamine, les alkylamines, donnent respectivement⁽⁵⁸⁾ des mono-iodo, azido, thio, amino (schéma 4), hydroxylamino ou alkylamino- β -cyclodextrines.

Les mono-amino-cyclodextrines sont obtenues aussi à partir des monoazido-cyclodextrines par réduction avec le PPh_3 en présence d'ammoniaque⁽⁵⁹⁾.

Le précurseur monoazido-cyclodextrine est indirectement obtenu par chauffage du monotosyle avec le sel d'azide de lithium ou de sodium dans le DMF⁽⁶⁰⁾.

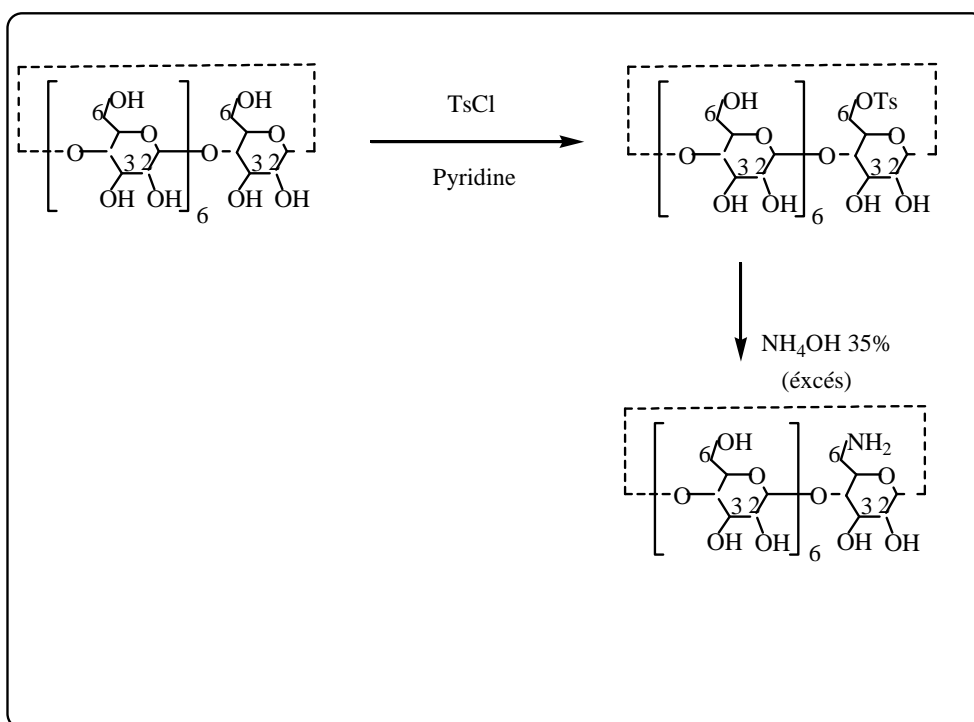


Schéma 4 : Accès au mono-6- amino- β -cyclodextrine via le dérivé tosylate.

Les éthers alkyles des cyclodextrines sont obtenus par une stratégie de protection et déprotection des faces primaires et secondaires avec des réactifs tels que TosCl et le TBDMSCl⁽⁶¹⁾.

⁽⁵⁸⁾ Murakami Y.; Kikuchi J.; Hisaeda Y.; Yayashida O. *Chem.Rev.*(1996), 96, 721.

⁽⁵⁹⁾ Hanessian S.; Benalil A.; Laferriere C. *J. Org. Chem.* (1995), 60, 4786.

⁽⁶⁰⁾ Melton L. D.; Slessor K. N. *Carbohydr. Res.* (1971), 18, 29.

⁽⁶¹⁾ Bradshaw Yi G.; Rossiter J. S.; Malik B. E.; Li, A.; Lee, W... *J. Org. Chem.* (1993), 58, 4844.

I.2.6.5. Les Cyclodextrines en tant que vecteurs biologiques

Les membranes biologiques (schéma 5) forment une barrière lipophile vis à vis de la pénétration de principes actifs. Les principes actifs relativement lipophiles sont capables de passer à travers ces membranes par diffusion passive.

La possibilité de passage des CDs à travers les membranes biologiques a longtemps été considérée comme très improbable du fait de leur hydrophilie et de leur haut poids moléculaire. Mais cette supposition a ensuite été démentie par des preuves à l'appui⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾. Toutefois, de nombreuses zones d'ombres existent dans la compréhension du mécanisme de pénétration membranaire des cyclodextrines, en particulier en l'absence de méthodes de dosages très fines.

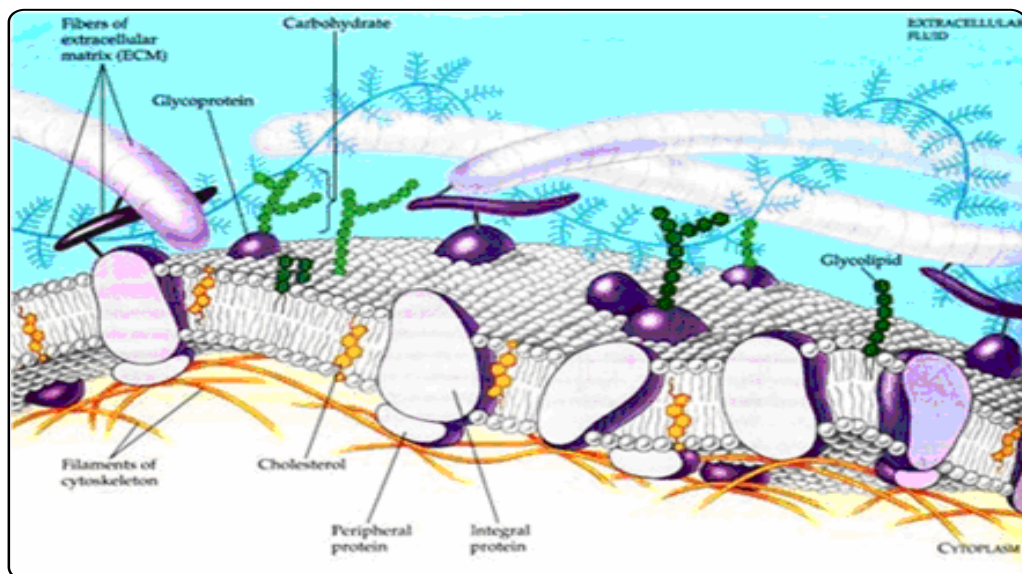


Schéma 5 : Structure détaillée d'une coupe transversale de la membrane plasmique d'une cellule animale.

Les cyclodextrines sont décrites depuis longtemps en tant que vecteurs de composés chimiques de toutes sortes⁽⁶⁴⁾. Ce qui consiste à combiner ces composés avec un dérivé de cyclodextrine pour former avec celui-ci un complexe d'inclusion ou un dérivé conjugué (Schéma 6).

⁽⁶²⁾ Vollmer, U., Müller, B. W., Peeters, J., Mesens, J., Wilfert, B. & Peters, T. A study of the percutaneous absorption-enhancing effects of cyclodextrin derivatives in rats. *J.Pharm. Pharmacol.* (1994). 46, 19-22.

⁽⁶³⁾ Loftsson, T., Masson, M., Sigurdsson, H. H., Magnusson, P. & Goffic, F. L, Cyclodextrins as co-enhancers in dermal and transdermal drug delivery. *Pharmazie* (1998a). 53, 137.

⁽⁶⁴⁾ Uekama K. , Hirayama F, Irie T., Cyclodextrin Drug Carrier Systems, *Chem. Rev.* (1998), 98, 2045-2076.

Cette vectorisation présente l'avantage d'améliorer la solubilité, la stabilité et la biodisponibilité, sous diverses formes d'administration du composé hydrophobe, en particulier lorsqu'il s'agit de molécules biologiquement actives.

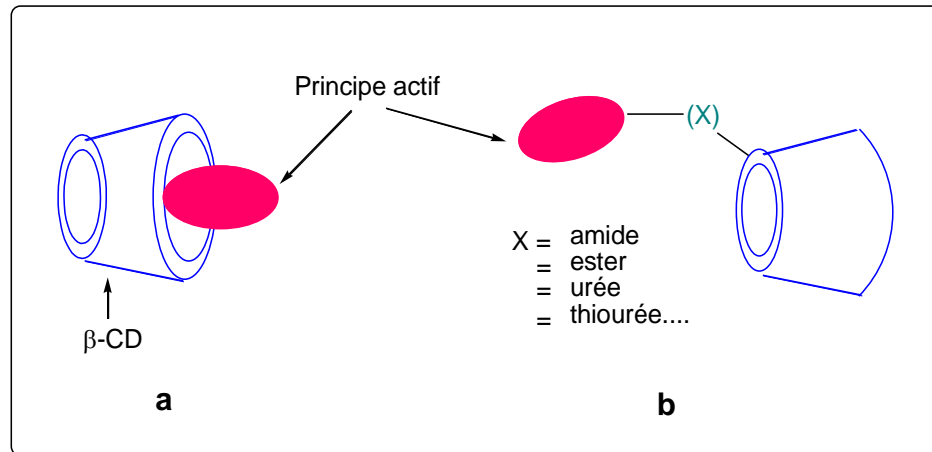


Schéma 6 : Utilisation de la β -CD pour la vectorisation des principes actifs :
a) par formation de complexe d'inclusion, b) par formation d'un conjugué β -CD -principe actif.

Des compositions pharmaceutiques utilisant ces cyclodextrines ont été déjà commercialisées dans plusieurs pays (Tableau 2)⁽³⁹⁾.

Afin d'améliorer les propriétés de la β -cyclodextrine et la rendre plus adaptée, plusieurs modifications chimiques ont été envisagées et ont conduit notamment à l'utilisation de dérivés méthylés ou de dérivés hydroxyalkylés⁽⁶⁵⁾. De tels dérivés sont alors susceptibles de s'insérer dans des systèmes lipidiques tels que des bi-couches de liposomes ou de s'auto-associer en laissant à l'extérieur les cavités disponibles pour l'inclusion de molécules actives.

Les dérivés méthylés sont beaucoup plus solubles que la cyclodextrine d'origine et ils possèdent de bonnes propriétés de solubilisation de composés organiques hydrophobes, en particulier dans le cas de la 2,6-diméthyl- β -cyclodextrine. Néanmoins, ces dérivés méthylés, outre qu'ils sont difficiles à obtenir à l'état pur, sont inutilisables pour des applications pharmaceutiques, notamment pour les formes injectables, en raison de leur très fort caractère hémolytique.

⁽⁶⁵⁾ Hirayama F., Uekama K., Cyclodextrin-based controlled drug release system, *Advanced Drug Delivery Reviews* 36 (1999) 125–141

Les dérivés hydroxyalkylés, en particulier les hydroxypropyl-cyclodextrines, présentent une très forte solubilité dans l'eau et sont peu hémolytiques. Toutefois, leur utilisation reste difficile en raison de leur extrême hétérogénéité chimique ; de plus, les substitutions peuvent limiter la formation de complexes d'inclusion par effet de gêne stérique.

On a envisagé plus récemment d'utiliser d'autres dérivés de cyclodextrines. Parmi ces dérivés, on trouve des dérivés substitués par des amines, et les résultats obtenus avec ces dérivés sont entièrement satisfaisant pour des applications pharmaceutiques⁽⁶⁶⁾.

Tableau 2 : Produits pharmaceutiques commercialisés et contenant des CDs.

Médicament \ CD	Nom commercial	Formulation	Compagnie (pays)
<u>β-CD*</u>			
Cephalosporin	Meiact	Comprimé	Meiji Seika (Japan)
Chlorodiazepoxide	Transiluim	Comprimé	Gador (Argentine)
Dexamethasone	Glymesason	Pommade	Fujinaga (Japan)
Nitroglycerin	Nitropen	Comprimé	Nihon Kayaka (Japon)
Omeprazole	Omebeta	Comprimé	Betafarm (Europe)
Piroxicam	Boexine	Comprimé, Suppositoire	Aché (Brésil)
<u>HP β-CD*</u>			
Hydrocortisone	Dexocort	Solution	Actavis (Europe)
Indomethacin	Indocid	Solution	Chauvin (Europe)
Intraconazole	Sporanox	Solutions orales et i.v.	Janssen (USA)
Mitomycin	Mitoextra	Infusion i.v	Novartis (Europe)
<u>M β-CD*</u>			
17 β -Estradiol	Acrodiol	Vaporisateur Nasal	Servier (Europe)
Cloramphicol	Clorocil	Solution	Oftalder (Europe)
Insuline	Insuline	Vaporisateur Nasal	Espagne

* CD : Cyclodextrine, β -CD : β -Cyclodextrine, M β CD : β -Cyclodextrine méthylée, HP β CD : 2-hydroxypropyl- β - Cyclodextrine.

⁽⁶⁶⁾ Wang H., Chen Y., Li X-Y., and Liu Y., Synthesis of Oligo(ethylenediamino)- α -Cyclodextrin Modified Gold Nanoparticle as a DNA Concentrator, *J. molecular pharmaceutics*, vol. XXXX, N°: XXXX, (2006).

I.2.7. Conclusion

De façon générale, les sucres sont caractérisés par leur très grande diversité structurale. Ils contiennent une "flopée" de groupes hydroxyle et de centres asymétriques. Ce qui leurs confère plusieurs rôles dans les processus de reconnaissance, et de transfert d'informations entre les cellules.

Les structures des glucides offrent des possibilités gigantesques de développement de médicaments dans le futur

Parmi les différentes méthodes proposées pour l'augmentation de l'efficacité et la sélectivité des médicaments, tout en réduisant leurs effets secondaires indésirables, la vectorisation est probablement la plus connue.

La notion de vectorisation implique l'utilisation d'un véhicule, dont le rôle est de transporter la molécule vers la cible, tout en la protégeant et en masquant ou en améliorant ses propriétés physico-chimiques afin qu'elle puisse passer outre les barrières physiologiques.

Beaucoup d'études et de tentatives d'emploi des glucides comme les cyclodextrines dans un but de vectorisation soit par inclusion soit par greffage de principes actifs ont été réalisées.

CHAPITRE 3

Nanoscience & Nanobiotechnologies

I.3.1. Introduction

Depuis le discours visionnaire de Feynman ⁽⁶⁷⁾, l'attrait de la communauté scientifique dans son ensemble envers ce qu'on appelle aujourd'hui les nanotechnologies va grandissant.

Le développement de nouveaux instruments (microscopie électronique en transmission, microscopie à force atomique par exemple), permettant de sonder la matière à des distances de l'ordre du nanomètre a entraîné des découvertes laissant présager de l'impact futur que pourrait avoir un contrôle fin des atomes et molécules à ces échelles.

Une définition plus satisfaisante des nanosciences serait l'étude des principes fondamentaux des molécules et des structures dont la taille est comprise entre 1 et 100 nm. La nanotechnologie est donc basée sur les propriétés intrinsèques d'objets de taille nanométrique et sur la possibilité de les utiliser ou de les assembler de façon à obtenir des propriétés spécifiques⁽⁶⁸⁾.

Ce qui est à l'échelle nanométrique n'est pas simplement tout petit, c'est aussi et surtout quelque chose de différent dans la manière d'être tout petit. Ainsi, l'or à l'état massif possède des propriétés physiques différentes de ses nanoparticules.

La nanotechnologie est actuellement communément considérée comme l'une des technologies clés du XXI^e siècle. On lui attribue un potentiel énorme, non seulement du point de vue scientifique, mais aussi économique (Schéma 7); elle est néanmoins encore assez peu connue du grand public.

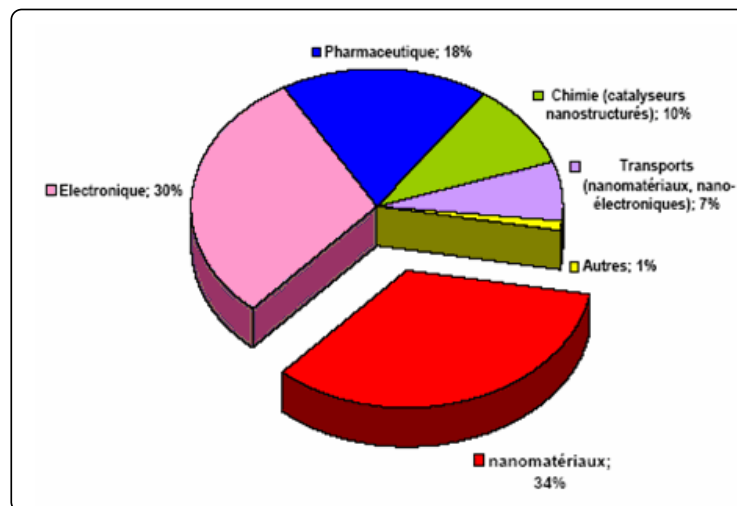


Schéma 7. Impact économique des nanotechnologies en 2010 ⁽⁶⁹⁾

⁽⁶⁷⁾ http://en.wikipedia.org/wiki/There's_Plenty_of_Room_at_the_Bottom.

⁽⁶⁸⁾ Ratner, D. *Nanotechnologies : la révolution de demain* (Nanotechnology : a gentle introduction to a big idea), (2003), Campus press, Upper Saddle River, NJ :prentice Hall.

⁽⁶⁹⁾ Développement et Conseil (2004). Etude prospective sur les nanomatériaux. Etude réalisée par Développement et Conseil pour le compte du MINEFI / DIGITIP / SIMAP.

La synthèse de particules de petites dimensions remonte pourtant à très longtemps. L'or colloïdal était par exemple préparé dans l'antiquité par les alchimistes pour servir de colorant. Au moyen âge, la coloration des vitraux était obtenue par la dispersion de petites particules de zinc ou de sulfure de cadmium dans la matrice vitreuse.

Aujourd'hui, de nombreux matériaux peuvent être obtenus à l'état nanométrique par différentes voies de synthèse (coprecipitation en solution, méthode sol-gel, synthèse en microémulsions inverses etc...).

Actuellement, les nanobiotechnologies, spécialement consacrées à la biologie, à la médecine et à la pharmacie connaissent un essor important. Les progrès se situent dans trois domaines : le diagnostic (mieux identifier *in vivo* et *in vitro*), les soins (notamment la vectorisation de médicaments) et la compensation des déficits (neuroprothèse, ingénierie tissulaire...)⁽⁷⁰⁾.

Dès le début du siècle, le savant Paul Ehrlich rêvait déjà du « magic bullet » susceptible d'acheminer un médicament de manière spécifique vers son site d'action.

Ce rêve est aujourd'hui plus proche de la réalité grâce au développement des nanotechnologies qui ont permis de proposer le concept de vectorisation des médicaments. Les nanomatériaux peuvent donc permettre d'améliorer les médicaments actuels, de délivrer des médicaments sur-mesure uniquement à des organes précis, d'obtenir des surfaces biocompatibles pour implants et des vaccins oraux à partir de nanoparticules, de produire des nanoparticules magnétiques à partir de supports biologiques ainsi que des matériaux biocompatibles.

I.3.2. Propriétés des nanomatériaux

L'étude et l'utilisation de matériaux nanostructurés connaissent un essor considérable en raison de leurs propriétés particulières par rapport aux matériaux massifs. Toutes les grandes familles de matériaux sont concernées : métaux, céramiques, diélectriques, oxydes magnétiques, charpentes silicatées, carbones, polymères, etc.

Les nanomatériaux constituent un champ de recherche et de développement impliquant l'utilisation de procédés permettant la structuration de la matière au niveau atomique, moléculaire ou supramoléculaire à des échelles nanométriques. On peut alors observer de nouveaux comportements de la matière dus à la prépondérance des lois de la physique quantique s'exprimant essentiellement à cette échelle.

⁽⁷⁰⁾ El-Sayed H., Huang X., El-Sayed A, *NanoLett*, (2005), 829.

En effet, lorsque la taille d'une particule diminue, le nombre de particules par gramme croît considérablement : ce nombre est multiplié par 1.000.000 lorsque le diamètre d'une particule évolue de 100 nm à 1 nm⁽⁷¹⁾.

D'autre part, la diminution du diamètre des particules conduit à une augmentation de la proportion d'atomes présents en surface (5 % des atomes d'une particule de 30 nm sont en surface, contre 20 % pour une particule de 10 nm et 50 % pour une particule de 3 nm).

On peut donner une estimation approchée de la proportion d'atomes de surface pour les métaux de transition par la relation suivante:

$$N_S/N_V \approx 1/2R \quad \dots (\alpha)$$

R est le rayon exprimé en nm. Cette loi empirique donne une proportion d'atomes de surface de 100 % pour une taille de 1 nm (bien entendu, en dessous, la relation (α) n'est plus valide) (Figure 18).

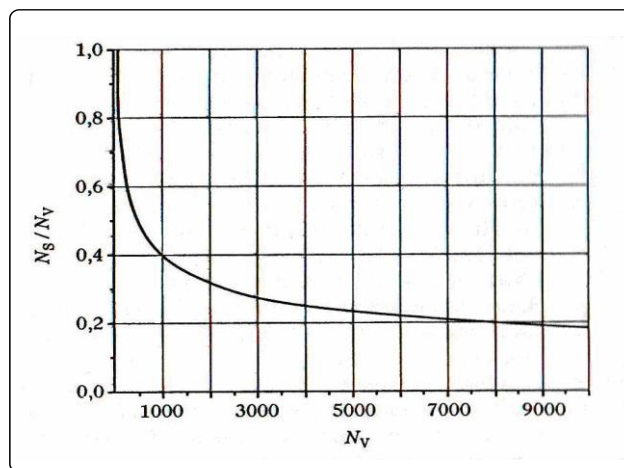


Figure 18. Proportion d'atomes de surface pour une particule sphérique constituée de N_V atomes dont N_S sont en surface⁽⁷²⁾.

Une masse donnée de nanomatériaux sous forme de nanoparticules sera donc plus réactive que la même masse constituée de particules de plus grande dimension.

Les structures nanométriques permettent alors d'obtenir de nouveaux matériaux présentant des propriétés mécaniques, électriques, magnétiques, optiques et catalytiques particulières ou des combinaisons de propriétés originales, différant parfois des propriétés du même matériau à une échelle différente.

⁽⁷¹⁾ Gaffet E., Le Caër G. (2004). Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, Eds. H.S. Nalwa - American Scientific Publishers, 5.

⁽⁷²⁾ Lahmani M., Bréchignac C., Houdy P., Les nanosciences, 2. Nanomatériau et nanochimie, Edition Belin, (2006).

I.3.3. méthodes de production des nanomatériaux

I.3.3.1. Approches « bottom up » et « top down »

De nombreuses techniques permettent de fabriquer des nanomatériaux. A cette fin, plusieurs paramètres doivent être maîtrisés : la taille, la forme, la composition et le degré d'agglomération etc. On distingue donc deux types d'approches : l'approche « bottom up » ou (de bas en haut) et l'approche « top down » ou (de haut en bas).

Dans ces deux approches, des méthodes sont fondées sur des transformations de la matière à partir d'un état gazeux, d'un liquide supercritique ou d'un état solide⁽⁷³⁾.

On trouve dans ces transformations des principes chimiques et/ou physiques : réaction chimique, transformation de phase, phénomènes diffusionnels, sollicitation mécanique, force d'adhésion et phénomène d'encombrement stérique (auto-organisation) et le couplage de plusieurs phénomènes comme les transformations chimiques et l'auto-arrangement (matériaux hybrides organique-inorganique)⁽⁷⁴⁾.

La fabrication de nanomatériaux selon l'approche « bottom up » consiste en la construction de structures atome par atome ou molécule par molécule. Cela concerne les métaux, céramiques, semi-conducteurs, polymères, fullerènes et nanotubes.

Ces structures sont ensuite utilisées directement (ex : catalyse) ou servent de briques élémentaires pour la construction d'architectures nanostructurées de complexité variable.

Ces architectures se forment « naturellement » en s'auto-organisant dans des milieux liquides, polymères (matériaux hybrides) ou sont contrôlées par des ensembles d'opérations de transformation : mélange de nanopoudres, ou avec d'autres systèmes (ex : polymères, nanotubes), compaction, traitements thermiques.

Les briques élémentaires métalliques, les céramiques, les systèmes hybrides et auto-organisés sont obtenues par des transformations chimiques dites de chimie douce ou de procédés sol-gel. Les nanopoudres métalliques, les céramiques, les nanotubes et les fullerènes sont aussi obtenus par des procédés physiques de condensation gazeuse.

L'état gazeux peut néanmoins provenir de transformations ou de dégradations thermo-chimiques par exemple dans les procédés de pyrolyse laser ou de dépôt de vapeur chimique (CVD).

⁽⁷³⁾ Les nanomatériaux Avis de l'Afset Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement, Rapport du groupe d'experts, Juillet (2006).

⁽⁷⁴⁾ Lahmani M., Dupas C., Houdy P., Les nanosciences, I. Nanotechnologies et nanophysique, Edition Belin, (2006).

L'approche « top down » vise à produire des nanomatériaux à partir de fractionnements successifs d'un matériau « classique » microstructuré. Ces méthodes « top down » sont essentiellement fondées sur l'application de sollicitations mécaniques dites « sévères » : chocs violents, fortes déformations. Les deux approches tendent à converger en termes de dimension des domaines nanométriques.

L'approche « top down » permet d'obtenir des quantités de matières plus importantes mais le contrôle de l'état nanométrique est plus délicat (dispersion de taille, défauts structuraux, phases hors équilibres).

L'approche « bottom up » paraît plus riche en termes de type de matière, de diversité d'architectures et de contrôle de l'état nanométrique (taille, dispersion de taille, positionnement des molécules, des phases), Cette approche semble la stratégie la plus prometteuse pour exploiter la science et la technologie à un niveau nanométrique⁽⁷²⁾.

I.3.3.2. Méthodes de préparation des nanoparticules minérales fonctionnalisées

Il est illusoire de présenter toutes les méthodes de préparation des agrégats. On se limitera ici à présenter quelques méthodes chimiques en phase liquide.

Le point commun à toutes les méthodes de préparation de nanoparticules en phase liquide est de faire précipiter un composé peu soluble dans un solvant donné. Par une ou plusieurs réactions chimiques, un composé peu soluble dans le solvant de la réaction est synthétisé créant une sursaturation et entraînant la nucléation-croissance du composé solide. Les moyens d'obtenir cette sursaturation peuvent être divers et variés.

I.3.3.2.1. Synthèse par réduction d'un sel métallique

La synthèse par réduction chimique de l'ion métallique correspondant est applicable pour toutes les espèces métalliques ayant un potentiel standard de réduction suffisamment élevé, de telle sorte que l'espèce réduite soit stable et non pas rapidement ré-oxydée⁽⁷⁴⁾. Cette réaction, du type:



Met en jeu un ion métallique M^{Z+} qui sera réduit en sa forme M^0 et un agent réducteur R. Cette réaction est favorisée du point de vue thermodynamique si :

$$E^{\circ} (M^{Z+}/M) - E^{\circ} (R^{Z+}/R) > 0 \dots \dots \dots (b)$$

Où $E^\circ (M^{Z+}/M)$ et $E^\circ \{R^{Z+}/R\}$ sont les potentiels standard de réduction des couples M^{Z+}/M et R^{Z+}/R . Ainsi, on retrouve essentiellement les métaux nobles comme l'or, l'argent et le platine. En revanche, des métaux comme le nickel, le zinc ou les métaux alcalins ne peuvent pas être obtenus sous forme colloïdale par cette voie car la réaction inverse est souvent la plus favorable d'un point de vue thermodynamique en raison des espèces présentes dans la solution, notamment en phase aqueuse.

On peut alors avoir recours à des solvants organiques pour éviter cette situation ou utiliser la voie physique en phase gazeuse, par exemple la vaporisation laser.

La source d'électrons peut être un réducteur solubilisé comme le borohydrure de sodium (NaBH_4) ou l'hydrazine (N_2H_4), du dihydrogène gazeux ou un réducteur solide tel que le sodium.

En solution aqueuse, la synthèse de **Turkevich** permet de produire des solutions colloïdales d'or en faisant bouillir un mélange d'acide chloroaurique (HAuCl_4) et de citrate de sodium. Elle est encore très utilisée du en partie à sa relative simplicité. Il est également possible de faire varier la taille des nanoparticules en agissant sur le rapport des concentrations en or et en réducteur.

La synthèse de **Brust** fait intervenir un système bi-phasique. Une phase aqueuse contenant l'acide chloroaurique et un agent de transfert de phase (bromure de tétraalkylammonium) est mise en contact avec du toluène contenant un alcanethiol à chaîne longue. Le sel d'or est ensuite réduit par du borohydrure de sodium.

Les nanoparticules d'or finalement obtenues sont recouvertes d'une monocouche de thiol à chaîne longue et sont solubles dans la plupart des solvants apolaires. Elles peuvent être précipitées puis redispersées à l'envie. Le fait que l'on puisse finement agir sur la taille des nanoparticules (entre 1,5 et 5,3 nm) ainsi que la possibilité de procéder à des échanges de ligands font que cette synthèse est très utilisée.

I.3.3.2.2. Synthèse en microémulsion

Une microémulsion est un mélange translucide d'eau, d'huile et de tensioactif. Contrairement aux émulsions classiques et aux émulsions multiples, seules les microémulsions sont des systèmes thermodynamiquement stables et transparents⁽⁷⁵⁾.

La présence d'une molécule tensioactive permet la miscibilité des deux solvants de polarité différente. La structure de la microémulsion dépend de la proportion entre les différents constituants.

⁽⁷⁵⁾ Malmsten. M., Surfactants and Polymers in Drug Delivery (Eds.: Marcel Dekker), (2002).

Lorsque l'huile est en majorité, des gouttes d'eau entourées de tensioactifs forment des micelles inverses⁽⁷⁶⁾.

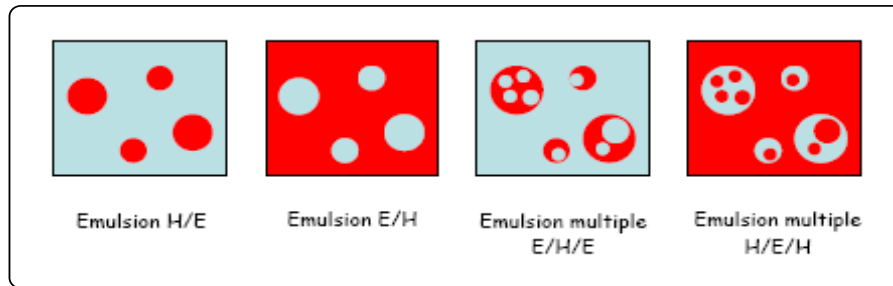


Figure 19 : Représentation des différents types d'émulsions (en bleu : phase aqueuse E ; en rouge : phase huileuse H).

Ces gouttes peuvent avoir différentes formes en fonction de la proportion entre eau et tensioactif, la structure chimique du tensioactif, la nature de l'huile. Le rapport eau sur tensioactif souvent appelé R_w est proportionnel à la taille des micelles inverses qui varie en général de 1 à 100 nm.

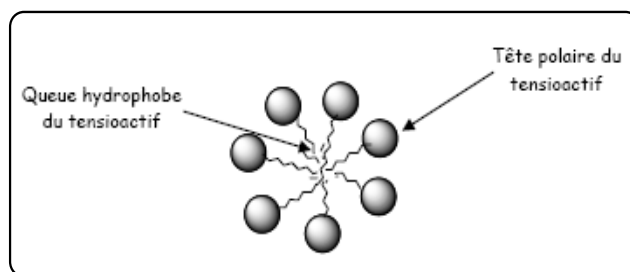


Figure 20 : Représentation d'une micelle formée par des tensioactifs.

Le tensioactif le plus communément utilisé pour ces synthèses est l'AOT (bis (2-éthylhexyl) sulfosuccinate de sodium) dont la structure chimique permet de faire varier le rapport eau sur tensioactif dans une large gamme en ayant toujours des micelles inverses sphériques. Ces fluides structurés sont utilisés pour synthétiser des nanoparticules selon deux modes opératoires. Le premier consiste à solubiliser deux sels différents dans l'eau contenue dans deux microémulsions. Lorsqu'elles sont mélangées, leur contenu respectif s'échange et la réaction de précipitation impliquant les deux sels a lieu.

La stabilisation est assurée par une espèce «adsorbée à la surface de l'agrégat obtenu, espèce neutre ou bien ionisée. Dans ce dernier cas, la stabilisation est

⁽⁷⁶⁾ Tamilvanan .S., Prog. Lipid Res. (2004), 43, 489.

électrostatique, sinon c'est l'encombrement stérique⁽⁷⁷⁾ des composés adsorbés qui prévient l'agrégation des particules (Figure 21).

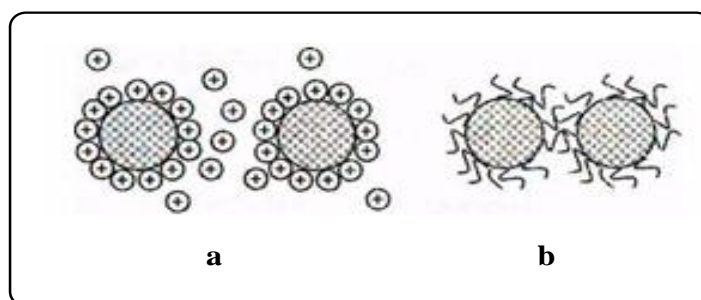


Figure 21 : Stabilisation des nanoparticules : a) par Répulsions électrostatiques, b) par Encombrement stérique.

Les exemples de ce type sont très nombreux dans la littérature. On peut par exemple citer la synthèse de sulfure de cadmium (CdS) en micelles inverses d'AOT qui est une des premières du genre⁽⁷⁸⁾.

Le contrôle de la taille des nanoparticules se fait en faisant varier les différents paramètres de la synthèse, comme le ratio entre les différents réactifs, le rapport eau sur tensioactif.

Il est généralement constaté une augmentation du rayon des nanoparticules lorsque la taille des micelles inverses (proportionnelle au rapport eau sur tensioactif) augmente.

Un contrôle de la forme est également possible puisqu'on observe une grande variété de morphologies en fonction des conditions expérimentales utilisées⁽⁷⁹⁾. La forme des micelles initiales est souvent avancée pour expliquer les différentes formes obtenues.

Les micelles serviraient ainsi de moules ou nanoréacteurs pour la croissance des nanoparticules.

Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'augmentation de la taille des micelles induit souvent une augmentation de la taille des particules. Changer la forme ou la taille du moule permettrait ainsi de changer la forme des nanoparticules finales.

⁽⁷⁷⁾ Lahmani .M. ,Boisseau P.,Houdy P.,Les nanosciences,3 :Nanobiotechnologies et nanobiologie,Edition Belin, (2007)

⁽⁷⁸⁾ Petit, C., Lixon, P. & Pileni, M. In-situ synthesis of silver nanocluster in aot reverse micelles. J. Phys. Chem. 97, 12974–12983 ,(1993).

⁽⁷⁹⁾ Shi, H. T., Qi, L. M., Ma, J. M. & Cheng, H. M. Synthesis of single crystal bawo4 nanowires in catanionic reverse micelles. Chem. Commun. , (2002).1704–1705.

I.3.4. Nanoparticules d'or

I.3.4.1 généralités

Les nombreuses méthodes de synthèses développées pour l'élaboration de nanoparticules d'or permettent tout d'abord l'accès à des particules stables et de taille adaptable en fonction de l'application sur une gamme de 2 à 200 nm.

La stabilité et la taille de ces nanoparticules en solution aqueuse (pour des applications biologiques) sont essentiellement fonction du ou des différents ligands soufrés greffés en surface des nanoparticules qui possèdent des caractères hydrophiles.

I.3.4.2. Propriétés physiques et chimiques de l'or métal

L'or est un solide jaune, son éclat est hautement métallique. L'or est le plus électronégatif des métaux et légèrement plus électropositif que le soufre et l'iode⁽⁸⁰⁾.

La valeur élevée du potentiel du couple Au^+/Au^0 (+1,691 V) est la conséquence de l'affinité électronique plus grande que celle de l'oxygène. La stabilité des ions Au^- dans l'ammoniaque ou dans certains sels comme Cs^+Au^- montre son électronégativité.

Du point de vue chimique, l'or est considéré comme peu réactif (métal noble), ces états d'oxydation sont +1 et +3 et permettent l'obtention de complexes où il est tétra coordonné⁽⁸¹⁾. Les dérivés de l'or sont instables à la chaleur. Bien peu peuvent supporter une température de 200°C.

Ils sont très facilement réductibles même par le papier filtre en donnant de l'or métallique de couleur variée, le plus souvent colloïdal⁽⁸²⁾.

Les composés d'or les plus stables sont ses chlorures. Il existe deux chlorures d'or, le chlorure aureux (AuCl) et le chlorure aurique (AuCl_3). Le chlorure aureux se décompose en chauffant ou en présence de la lumière en chlorure aurique et en or métallique.



Le chlorure aurique (AuCl_3) se forme par dissolution de l'or dans l'eau régale. Il a une très faible tendance à cristalliser, mais il donne avec l'acide chlorhydrique l'acide tétrachloraurique (HAuCl_4) qui cristallise avec au moins trois molécules d'eau.

⁽⁸⁰⁾ Grisel. R.J.H., Nieuwenhuys. B.E., Catalysis Today, (2001), 64, 69.

⁽⁸¹⁾ Costello. C.K., Kung. M.C., Oh. H.-S., Wang. Y., Kung. H.H., Applied Catalysis A: General, (2002), 232, 159.

⁽⁸²⁾ Yao, Y.F. Yu, Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., (1980), 19, 293.

L'acide tétrachloraurique est le précurseur d'or le plus utilisé. Il fond en chauffant et perd de l'acide chlorhydrique et du chlore, laissant un résidu de chlorures aurique et aureux, ou d'or métallique si la température est trop élevée.

L'or forme avec l'oxygène au moins deux combinaisons : l'oxyde aureux (Au_2O), et l'oxyde aurique (Au_2O_3).

L'oxyde aureux forme une poudre bleue - violette, il se décompose à 250°C en or et oxygène. L'oxyde aurique est à peine connu à l'état anhydre, mais ses hydrates sont bien étudiés⁽⁸³⁾.

I.3.4.3. Propriétés optiques des solutions colloïdales d'or

La propriété la plus frappante des solutions colloïdales d'or est leur couleur intense qui varie entre le rouge et le jaune.

L'or étant un métal conducteur, les électrons sont libres de mouvement au sein des particules mais ils y sont confinés. Ce confinement donne lieu à des propriétés optiques qu'on ne retrouve pas dans le cas des métaux massifs.

La théorie de Mie ⁽⁸⁴⁾ qui consiste en la résolution des équations de Maxwell en géométrie sphérique permet de montrer que la section efficace d'absorption d'une sphère métallique donne une résonance dite de plasmon de surface située dans le domaine des ultraviolets-visibles dans le cas des métaux nobles. Pour des diamètres compris entre 5 et 50 nm, la bande d'absorption correspondant à la résonance se situe entre 520 et 530 nm. Une augmentation de la taille des particules induit généralement un déplacement de la fréquence de résonance vers des longueurs d'onde plus grandes. Il n'est cependant pas possible d'avoir accès au rayon moyen des particules à partir du spectre d'absorption seul. En effet, l'environnement immédiat de la surface des particules affecte également de façon critique la longueur d'onde de la résonance.

La constante diélectrique du solvant est par exemple particulièrement importante : plus le solvant est polaire, plus la longueur d'onde de la résonance est élevée. La nature du ligand et son interaction chimique avec le métal en surface va également jouer sur la fréquence de résonance.

Enfin le spectre d'absorption va être fonction de la forme et de la polydispersité de l'échantillon de nanoparticules. Une inhomogénéité en taille ou en forme va entraîner un élargissement de la bande d'absorption.

⁽⁸³⁾ Schubert M. M., Hackenberg S., van Veen A. C., Muhler M., Plzak V., Behm R. J., *Journal of Catalysis*, (2001), 197, 113.

⁽⁸⁴⁾ Kreibig, U. , Vollmer, M. *Optical properties of metal clusters* ,Springer, (1995).

I.3.4.4. Elaboration de nanoparticules d'or

I.3.4.4.1. Synthèses par méthodes chimiques

I.3.4.4.1.a. Généralités

Michael Faraday fut le premier à étudier la formation de colloïdes d'or⁽⁸⁵⁾. La méthode qu'il utilisa était basée sur la réduction d'ions AuCl_4^- par un agent phosphoré. Depuis ces travaux, nombreuses furent les méthodes de synthèse des nanoparticules d'or (AuNPs) décrites utilisant différents types de réducteurs et conduisant à des tailles et des morphologies différentes.

Les méthodes utilisées ont permis d'obtenir des particules d'ors monodispersées de 3 à 160 nm. Ces méthodes utilisent généralement l'acide tétrachloroaurique (HAuCl_4) mais varient considérablement selon la nature du réducteur, l'ordre de l'addition des réactifs, les paramètres physiques (concentration, température et vitesse d'agitation).

Les colloïdes d'or sont composés d'un noyau d'or pur entouré d'ions AuCl_2^- adsorbés en surface (figure 22). Ce sont ces ions qui confèrent la charge négative aux colloïdes et protègent de l'agrégation par répulsion électrostatique.

La déstabilisation du système aboutit à une agrégation qui s'accompagne d'un changement de couleur de la solution et éventuellement d'une sédimentation de l'or⁽⁸⁶⁾.

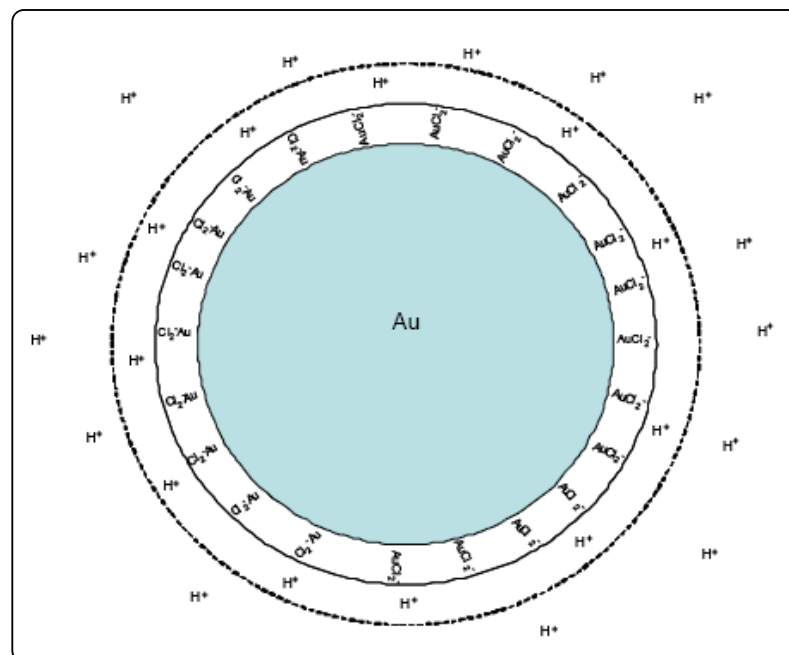


Figure 22: Structure d'un colloïde d'or composé d'un noyau d'or pur entouré d'ions AuCl_2^- adsorbés en surface.

⁽⁸⁵⁾ Faraday M., Philos. Trans., (1857), 147, 145.

⁽⁸⁶⁾ Hayat M.A., Colloidal Gold, Principles, Methods and Applications ;(1989), Academic Press: New York.

De nombreuses méthodes de synthèse ont été élaborées en faisant varier la nature de sel d'or (HAuCl_4 , $\text{AuPC}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$)⁽⁸⁷⁾ et surtout celle du réducteur employé ($\text{NaSCN}+\text{K}_2\text{CO}_3$)⁽⁸⁸⁾, phosphore blanc⁽⁸⁹⁾, acide ascorbique + K_2CO_3 ⁽⁹⁰⁾, PPh_3 ⁽⁹¹⁾, NaBH_4 , citrate de sodium). Parmi ces méthodes, nombreuses sont celles qui ont mené à des nanoparticules instables ou des protocoles complexes qui ont limité leur développement et leurs applications.

I.3.4.4.b. Synthèse de Brust et stabilisation par des thiols

Les thiols restent le type de stabilisant le plus employé pour les nanoparticules d'or et n'importe quelle taille du fait de la plus grande force de la liaison Au-S. La stabilisation de AuNPs par des thiols fut pour la première fois publiée en 1993 par **Mulvaney et Giersig**⁽⁹²⁾ démontrant la possibilité d'utiliser des thiols de chaînes carbonées de différentes longueurs.

Les thiols sont liés de façon covalente par réaction avec la surface métallique. Deux mécanismes différents sont proposés pour la formation de cette monocouche thiolée à la surface des nanoparticules⁽⁹³⁾, comme décrit dans les équations 1 et 2 ci-dessous.

Si on considère une couche supérieure d'oxyde à la surface des particules, la réduction par les thiols entraîne alors la formation d'eau.

En l'absence d'oxydes, on suit l'équation 2 avec formation d'hydrogène.

La formation d'une liaison or-thiolate en présence de disulfures est un procédé d'oxydoréduction où la surface d'or est oxydée et la liaison S-S est rompue (Équation 3).



Trois facteurs doivent être pris en considération pour la réalisation d'une monocouche d'alcane-thiol stable (R= Alkyle): l'adsorption du groupement soufré à la surface de la particule, les interactions entre les chaînes alkylées et l'interaction entre le groupement de la fonction terminale et le milieu.

⁽⁸⁷⁾ Bartlett P.A., Bauer B., Singer S.J., J. Am. Chem. Soc., (1978), 100, 5085.

⁽⁸⁸⁾ Baschong W., Lucocq J.M., Roth J., Histochemistry, (1985), 83, 409.

⁽⁸⁹⁾ Roth J., Histochemistry J., (1982), 14, 791.

⁽⁹⁰⁾ a) Faulk W.P., Taylor G.M., Immunochemistry, (1971), 8, 1081, b) Horisberger M., Rosset J., HistochemistryCytochem., (1977), 25, 295.

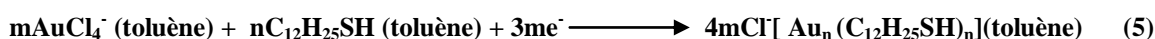
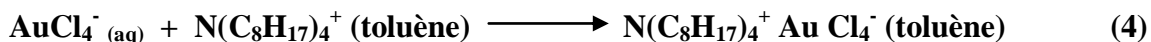
⁽⁹¹⁾ Horisberger M., Tacchini-Volanthen M., Histochemistry, (1983), 77, 37.

⁽⁹²⁾ Giersig M., Mulvaney P., Langmuir, (1993), 9, 3408.

⁽⁹³⁾ Liz-Marzàn L.M., Kamat P.V., Nanoscale Materials, (2003), Kluwer academic publishers, Dordrecht.

En 1994, **Schiffrin et Brust** publièrent une méthode de synthèse de AuNPs en présence d'alcanethiols qui révolutionna le monde des nanotechnologies⁽⁹⁴⁾.

La technique utilisée se rapproche de la synthèse en deux phases de **Faraday** et utilise des thiols fortement liés à l'or. HAuCl₄ est dissous dans le toluène en présence de bromure de tétraoctylammonium (agent de transfert de phase) et réduit par NaBH₄ en présence de dodécane-thiol (Schéma 8).



En effet, les AuNPs obtenus par cette méthode simple étaient stables thermiquement et par rapport à l'air mais aussi d'une taille jamais obtenue jusque là (1,5 à 5,2 nm) ce qui permettait leur isolement et leur redispersion dans de nombreux solvants organiques sans agrégation irréversible ou décomposition.

Cette stabilité donnait donc une grande facilité de manipulation et une grande variété d'application avec une grande flexibilité de caractérisation. Brust étendit cette technique de synthèse avec la réalisation de nanoparticules stabilisées par le mercaptophénol en une seule étape (Schéma 8), ce qui ouvrit la voie vers la synthèse de nanoparticules stabilisées par une grande variété de ligands thiolés⁽⁹⁵⁾. Le rapport thiol/AuCl₄⁻ contrôle la taille des particules, pour un rapport maximal de 1/6, on obtient des nanoparticules de l'ordre de 5,2 nm avec une dispersité de l'ordre de 10 %.

Les ligands thiolés à la surface des nanoparticules synthétisées par la méthode de Brust possèdent la particularité de pouvoir subir une réaction d'échange avec d'autres ligands thiolés mis en solution. La cinétique de cet échange dépend de la concentration en ligands entrants et sortants. Le taux d'échange à la surface des nanoparticules décroît avec l'augmentation de la taille du ligand entrant et la longueur de la chaîne carbonée greffée à la surface des nanoparticules.

⁽⁹⁴⁾ Brust M.; Walker M., Bethell D., Schiffrin D.J.; Whyman R.J, Chem. Commun., (1994), 801.

⁽⁹⁵⁾ Brust M.; Fink J., Bethell D., Schiffrin D.J, Kiely C. J., Chem. Commun., (1995), 1655, b) Chen S., Langmuir, (1999), 15, 7551, c) S. Chen, R.W. Murray, Langmuir, (1999), 15, 682.

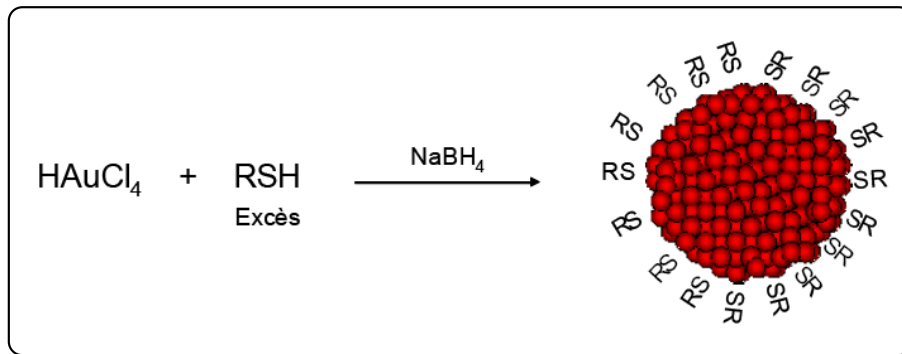
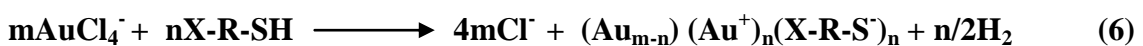


Schéma 8: Synthèse de nanoparticules d'or par la voie NaBH_4 .

Le greffage de nanoparticules à longue chaîne carbonée est ainsi préférable pour la stabilisation des AuNPs⁽⁹⁶⁾. Cet échange permet notamment de greffer en surface des molécules thiolées fonctionnalisées. En contre partie, l'équilibre et la répartition de ces ligands à la surface des particules sont donc sensibles au milieu environnant.

Des réactions d'échange avec des molécules thiolées porteuses d'une fonction hydrophile ont permis de rendre ces nanoparticules solubles en milieu aqueux et de ce fait, ont permis d'accéder à des applications biologiques⁽⁹⁷⁾.

Des nanoparticules solubles en milieu aqueux peuvent aussi être obtenues par réaction directe avec une molécule thiolée porteuse d'une fonction hydrophile X (X = hydroxyle, acide carboxylique, amine, acide sulfonique, acide boronique, acide phosphonique, thioetherocycle)^{(98) (99) (100)} permettant sa solubilité en solution. On a alors une équation de la forme :



La charge à la surface des particules qui est dépendante du pH est fonction de ce groupement, permettant ainsi un contrôle de la solubilité. Par exemple, les AuNPs fonctionnalisées par des molécules porteuses de groupements amines sont solubles en solution acide, tandis qu'avec une fonction acide carboxylique, elles sont solubles en milieu basique.

⁽⁹⁶⁾ Hostetler M.J., Templeton A.C., Murray R.W., *Langmuir*, (1999), 15, 3782.

⁽⁹⁷⁾ Daniel M.-C., Astruc D., *Chem. Rev.*, (2004), 104, 293.

⁽⁹⁸⁾ Weisbecker C.S., Merritt M.V., Whitesides G.M., *Langmuir*, (1996), 12, 3763.

⁽⁹⁹⁾ Kumar A., Mandale A.B., Sastry M., *Langmuir*, (2000), 16, 6921.

⁽¹⁰⁰⁾ Shon Y.-S., Wuelfing W.P., Murray R.W., *Langmuir*, (2001), 17, 1255.

Quand le pH change, il y a neutralisation de la charge de surface (potentiel), perte de solubilité et agrégation des particules⁽¹⁰¹⁾.

La liaison covalente établie par réaction entre une seconde molécule et un groupement de la première molécule greffée à la surface de l'or est une technique efficace pour fonctionnaliser une nanoparticule et obtenir des structures complexes.

I.3.4.4.c. Synthèse par la voie citrate

Parmi les méthodes conventionnelles de synthèse, si l'on excepte la réduction en présence de NaBH_4 , la plus répandue est la réduction d'un dérivé d'or au degré d'oxydation III (HAuCl_4) par le citrate de sodium dans l'eau. Ce procédé, mis au point par **Turkevitch**⁽¹⁰²⁾ en 1951, permet l'obtention de AuNPs d'environ 20 nm. Le citrate et le produit de son oxydation (le dicarboxylate d'acétone) agissent comme des agents protecteurs, cette méthode ne demande donc recours à aucun autre stabilisant comme c'est souvent le cas.

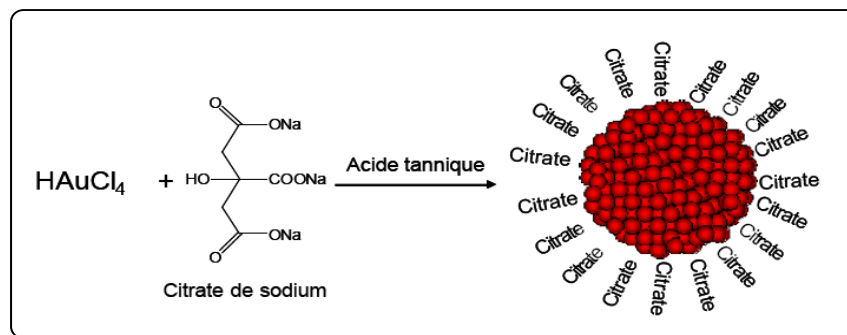


Schéma 9 : Synthèse de nanoparticules d'or par la voie citrate/acide tannique.

Frens⁽¹⁰³⁾ reprendra en 1973 ce procédé et fera varier la taille de 16 à 147 nm en modifiant le rapport or/citrate de sodium. Ce procédé est aujourd'hui très souvent utilisé pour la préparation de matériaux AuNP-ligand exigeant une quantité contrôlée de ligands en surface.

De plus récentes recherches dirigées par **J.W. Slot**⁽¹⁰⁴⁾ ont permis l'accès à des AuNPs de taille inférieure à 10 nm en mettant en présence de l'acide tannique (macromolécule) lors de la synthèse des AuNPs (Schéma 9). Le diamètre final de la particule est inversement proportionnel à la quantité d'acide tannique utilisée. Cette méthode permet donc la préparation de solutions monodispersées de nanoparticules de taille très variable par simple modification du rapport acide tannique (réducteur

⁽¹⁰¹⁾ Simard J., Briggs C., Boal A.K., Rotello V.M., *Chem. Commun.*,(2000), 1943.

⁽¹⁰²⁾ Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J.A., *Discuss. Faraday Soc.*, (1951), 11, 55.

⁽¹⁰³⁾ Frens G., *Nature Phys. Sci.*, (1973), 241, 20.

⁽¹⁰⁴⁾ Slot J.W., Gueuze H.J., *Eur. J. Cell Biol.*,(1981), 90, 533.

rapide)/citrate de sodium (réducteur lent). Cependant, les ions citrates possèdent des liaisons trop faibles avec l'or pour permettre l'isolement des AuNPs en tant que matériau solide. L'addition de phosphanes et de thiols, qui possèdent des liaisons plus fortes avec l'or, a permis l'accès à des AuNPs isolables sous forme solide et redispersables dans les solvants appropriés.

I.3.4.4.d. Synthèse par d'autres ligands

D'autres ligands contenant du soufre, tels que des xanthates⁽¹⁰⁵⁾ et des disulfures⁽¹⁰⁶⁾, des di-, tri- et tétrathiols⁽¹⁰⁷⁾ ont été utilisés pour stabiliser des AuNPs.

Les films minces d'isocyanates d'aryle présentent un potentiel d'application intéressant en tant que fils moléculaires, et des nanoparticules d'or recouvertes de 1,4-diisocyanates ont été formées en de larges agrégats qui examinés par spectroscopie IR et Raman montrent des liaisons carbone – or par la paire d'électrons libres⁽¹⁰⁸⁾⁽¹⁰⁹⁾.

I.3.5. Nanoparticules et Applications Biomédicales

L'association de nanoparticules à des molécules biologiques permet d'aboutir à de véritables édifices supramoléculaires à l'échelle nanométrique ou à des agrégats à structures contrôlées dont les unités de base ne sont pas des atomes mais des nanostructures⁽¹¹⁰⁾.

I.3.5.1. Marquage biologique par des colloïdes métalliques

Les nanoparticules métalliques, essentiellement à base d'or et plus récemment d'argent, constituent une autre génération de marqueurs biologiques⁽⁷⁷⁾.

Par comparaison aux structures organiques et aux nanocristaux semi-conducteurs, elles sont non toxiques, très résistantes à la corrosion et possèdent une réponse optique qui ne présente pas de fluctuations dans le temps. En outre, elles présentent une excellente stabilité et de multiples possibilités de fonctionnalisation chimique de leur surface. Comme les nanocristaux semi-conducteurs, elles sont essentiellement utilisées à des fins de marquage de biomolécules. Initialement repérées par microscopie électronique, elles ont par la suite été détectées optiquement, ce qui a permis l'étude de systèmes vivants.

⁽¹⁰⁵⁾ Tzhayik O., Sawant P., Efrima S., Kovalev E., Klug J.T., *Langmuir*, (2002), 18, 3364.

⁽¹⁰⁶⁾ Jr Porter L.A., Ji D., Westcott S.L., Graupe M., Czernuszewicz R.S., Halas N.J., Lee T.R., *Langmuir*, (1998).

⁽¹⁰⁷⁾ Balasubramanian R., Kim B., Tripp S.L., Wang X, Lieberman M., Wei A., *Langmuir*, (2002), 18, 3676.

⁽¹⁰⁸⁾ Chen J., Calvet L.C., Reed M.A., Grushiba D.S., Bennett D.W., *Chem. Phys. Lett.*, (1999), 313, 741.

⁽¹⁰⁹⁾ Cheng W., Dong S., Wang E., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2003), 42, 449.

⁽¹¹⁰⁾ Franzen, D.L. Feldheim, *Bioconjugate Chem.* (2004), 15, 482.

Dès les années 1970, des nanoparticules d'or ont été utilisées en immunocytochimie pour localiser *in situ* des macromolécules marquées. Pourvus de groupements externes, qui permettent leur conjugaison avec les biomolécules choisies, des nanoparticules d'or (0,8 nm ou 1,4 nm de diamètre, contenant respectivement 11 atomes ou 67 atomes) ont été utilisées et détectées par microscopie électronique.

Compte tenu de leur faible dimension, ces objets peuvent pénétrer jusqu'à une profondeur de 40 nm dans les tissus biologiques.

Dans l'objectif d'études *in vivo*, des efforts importants ont été consacrés à la recherche de méthodes de détection plus souples, notamment « tout optique ».

L'avantage d'une détection optique de biomolécules est d'éviter le contact mécanique pour les étudier « à distance ». Ce sont des techniques apparues dans les années 1980. Elles sont basées sur l'exploitation des propriétés optiques singulières des nanoparticules métalliques.

Ces propriétés spécifiques sont une conséquence de l'apparition d'une résonance dans leur spectre d'absorption : la résonance plasmon de surface. Celle-ci correspond à une oscillation cohérente des électrons de conduction, engendrée par leur interaction avec un champ électromagnétique extérieur.

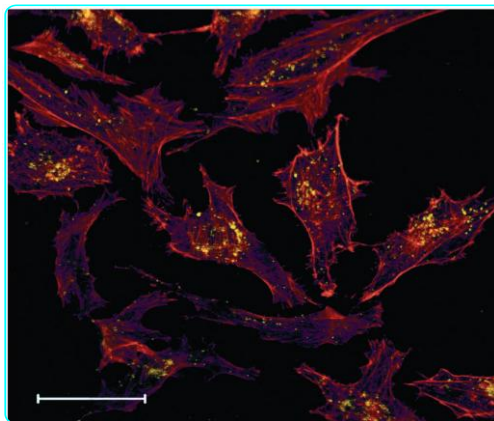


Figure 23 : Utilisation des nanoparticules fonctionnalisées pour l'imagerie cellulaire⁽¹¹¹⁾.

Aussi l'usage de l'imagerie optique *in vivo* est limité à l'exploration des tissus accessibles en surface et au petit animal. Une avancée plus récente et prometteuse pour visualiser les systèmes vivants est la détection par effet photothermique.

Suite à une absorption d'énergie, les nanoparticules métalliques deviennent des sources de chaleur et induisent une élévation locale de la température du milieu environnant, et par conséquent une modification d'indice du milieu.

⁽¹¹¹⁾ Bartlett D. W., M. E. Davis, Physicochemical and Biological Characterization of Targeted, Nucleic Acid-Containing Nanoparticles, *Bioconjugate Chem.*(2007), 18, 456-468.

Outre leur utilisation à des fins de marquage, les nanoparticules métalliques peuvent également être utilisées pour établir la composition génétique d'échantillons biologiques.

Avec ces nouvelles techniques, les chercheurs espèrent avant tout réaliser des avancées en médecine : des diagnostics plus rapides afin de pouvoir dépister les maladies à un stade plus précoce, par exemple le cancer, les affections cardiovasculaires ou les infections virales, ainsi que de nouveaux traitements à l'aide de biomolécules.

I.3.5.2. Nanoparticules Magnétiques et Applications Biomédicales

Les nanoparticules magnétiques ont des applications diverses dans les domaines de la biologie et de la médecine. Les premières de ces applications sont celles choisies par la nature elle-même. Plusieurs organismes vivants utilisent des nanoparticules comme moyen d'orientation dans le champ magnétique terrestre.

I.3.5.3. Nanoparticules Magnétiques, Agents de Contraste en Imagerie par Résonance Magnétique

L'imagerie par résonance magnétique exploite le principe de la résonance magnétique nucléaire, propriété observée lorsque le noyau d'un atome porte un moment magnétique, dit nucléaire.

Les éléments constitutifs du corps humain, en particulier les graisses et l'eau, contiennent une très forte proportion d'hydrogène⁽⁷⁴⁾, et l'imagerie médicale par résonance magnétique met en jeu les spins nucléaires de ces protons.

D'un élément constitutif du corps à l'autre, l'environnement des atomes n'est pas le même. On peut ainsi déduire à quel tissu, masse musculaire ou graisse, appartient le proton qui résonne. En particulier, la résonance magnétique peut localiser des tumeurs cancéreuses, dont les caractéristiques diffèrent de celles du tissu sain environnant.

Dans certains cas, le contraste de l'image est insuffisant pour en retirer les informations désirées. Il est difficile par exemple de détecter une tumeur du foie. On peut dans ce cas injecter par voie intraveineuse des nanoparticules magnétiques en tant qu'agents de contraste.

Dans le cas du foie, les régions saines absorbent les nanoparticules ; elles apparaissent sombres sur l'image de résonance car le temps de relaxation, proportionnel au champ magnétique vu par les protons, est augmenté. Au contraire, les nanoparticules ne pénètrent pas les tumeurs, qui apparaissent donc en clair.

I.3.5.4. Nanoparticules Magnétiques et Traitement des Tumeurs

Au cours des deux dernières décennies, des progrès considérables ont été faits dans la compréhension des mécanismes génétiques et moléculaires responsables du développement des cancers. Cependant, le bénéfice des études réalisées demeure décevant pour les patients. En particulier, certains cancers résistent aux traitements traditionnels.

La technique d'hyperthermie consiste à chauffer localement une tumeur, à une température de l'ordre de 42 °C à 46 °C, et à la rendre ainsi plus sensible à la radiothérapie ou à la chimiothérapie⁽⁷²⁾.

Les nanoparticules sont greffées à un « ligand », de l'acide folique. Il joue le rôle d'un vecteur qui reconnaît une tumeur et s'y attache. Et lors de l'application d'un champ magnétique celui-ci entraîne un échauffement local et conduit à la destruction thermique des cellules avoisinantes indésirables (cancéreuses par exemple).

I.3.6. Conclusion

Les nanotechnologies recouvrent un grand nombre de domaines technologiques ayant pour dénominateur commun la taille nanométrique des structures obtenues.

L'aspect du développement des nanotechnologies vers la médecine est certainement l'un des plus beaux exemples où chimistes, physiciens, biologistes, pharmaciens et médecins travaillent ensemble dans un intérêt commun.

Les nanoparticules d'or fonctionnalisées constituent une classe d'édifices présentant des propriétés physiques et chimiques originales. Des travaux récents ont permis de développer des méthodes de synthèse préparatives (les synthèses dérivées de celles de Brust en est un bon exemple) ouvrant la voie à de nombreuses études des propriétés et applications pouvant résulter de ces édifices.

C'est là qu'interviennent les nanoparticules qui de part leurs tailles et leurs capacités de polyfonctionnalisation sont des vecteurs idéaux.

Les méthodes nanométriques rendent le processus de recherche thérapeutique moins hasardeux et moins empirique et de ce fait plus fiable. La lutte contre le cancer en est l'exemple le plus parlant. Le diagnostic et la prise en charge de la maladie à un stade précoce limiteraient ainsi considérablement les traitements nécessaires à la guérison.

DEUXIEME PARTIE

Résultats & Discussions

CHAPITRE 1

***Essai de greffage de 2-ChloroEthyl
NitrosoSulfamides (CENS) sur la β -
cyclodextrine***

II.1.1. Introduction

Plus d'un demi siècle après leur découverte, les sulfamides occupent toujours une place importante dans la chimiothérapie de plusieurs maladies (antibactériens, anti-diabétiques, anti-glaucome, diurétiques.. etc.)

D'autres applications dans le traitement du cancer et de l'obésité font actuellement l'objet de recherches avancées.

Le plus simple des sulfamides répondant à la formule **25** (Schéma 10) et comportant le pharmacophore sulfonamide (SO_2NH_2) couramment utilisé en chimie médicammenteuse est considéré comme la molécule mère d'une grande classe de composés biologiquement actifs, avec au moins cinq principaux types de dérivés obtenus en substituant les divers atomes d'hydrogène dans la molécule de base.

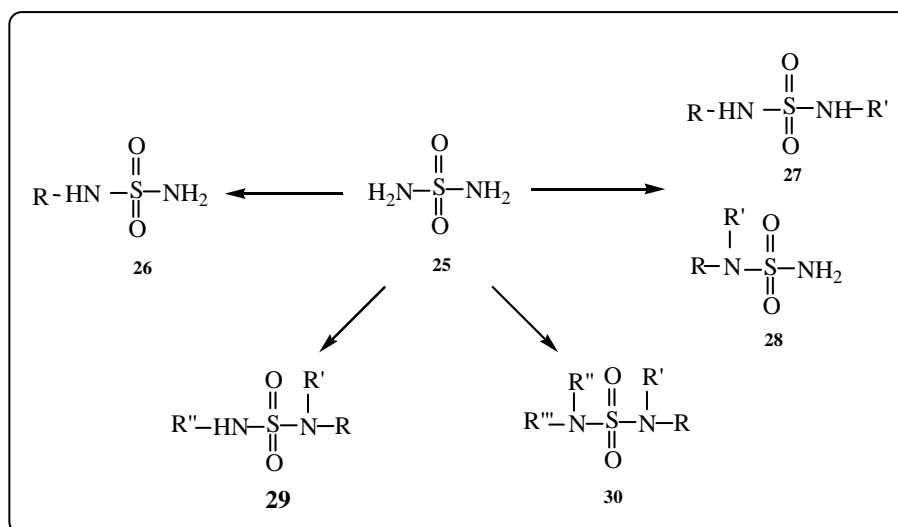


Schéma 10 : Différentes structures de sulfamides.

Les substituants (R , R' , R'' et R''') qui peuvent être identiques ou différents entre eux et de nature chimique très variée, fournissent d'excellents exemples de médicaments très connus et qui sont largement utilisés actuellement en thérapeutique⁽¹¹²⁾.

Les 2-chloroethylnitrososulfamides (CENS) constituent une nouvelle famille de sulfamides oncostatiques potentiels, conçus sur le modèle des chloroéthylnitrosourées (CENU) dans lesquels le groupement carbonyle est remplacé par le groupement sulfonyle (figure 24). L'intérêt présenté par de telle structure est la suppression lors de la

⁽¹¹²⁾ Winum JY, Scozzafava A, Montero JL, Supuran CT. Therapeutic potential of sulfamides as enzyme inhibitors. *Med Res Rev* (2006); 26:767-792.

décomposition in vivo de la formation d'espèces carbamoylantes, à savoir les isocyanates responsables des effets secondaires observés en chimiothérapie avec les CENU.

Les essais pharmacologiques réalisés sur les CENS ont été tout à fait encourageants, ils indiquent qu'ils sont doués d'activité cytostatique comparable ou supérieure à celle des CENU. Cependant, on a constaté que la majorité des CENS sont des huiles instables et non hydrosolubles, ce qui peut limiter leur utilisation⁽¹¹³⁾.

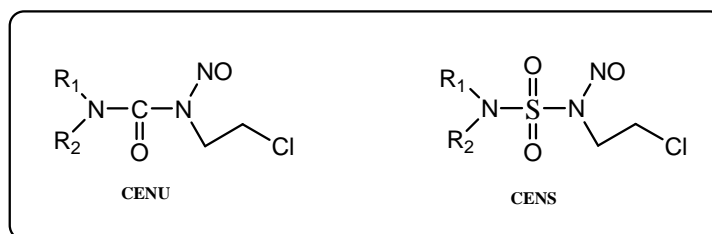


Figure 24 : Structures générales des CENU et CENS.

Considérant l'intérêt présenté par les CENS en tant que candidats potentiels en cancérologie, il nous a semblé intéressant de greffer ces CENS sur la β -Cyclodextrine, un oligosaccharide connu comme vecteur biologique, et ce dans le but d'améliorer leur stabilité, leur hydrosolubilité, ainsi que leur biodisponibilité et de réduire enfin leurs effets secondaires indésirables.

Les dérivés que nous avons essayé de synthétiser ont pour structure générale suivante (Figure 25) :

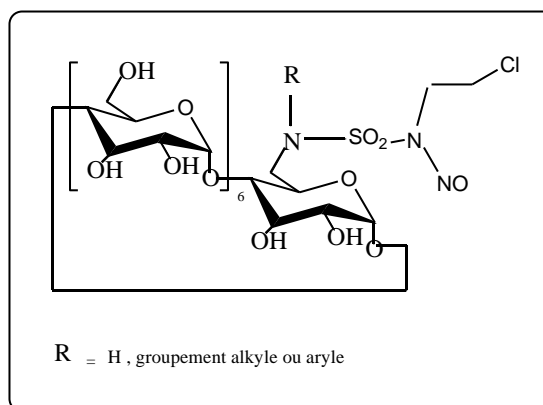


Figure 25: Structure attendue des conjugués β -Cyclodextrine-CENS

⁽¹¹³⁾] Abdaoui, M.; Dewynter, G.; Aouf, N.; Favre, G.; More`re, A.; Montero, J.-L. Bioorg. Med. Chem. (1996), 4, 1227

II.1.2. Synthèse des sulfamoyles actifs

La stratégie utilisée pour accéder aux conjugués β -Cyclodextrine-CENS a consisté tout d'abord à la synthèse d'espèces de types « sulfamoyles actifs » dérivés de phénols ou d'hétérocycles « oxazolidinone » présentés ci-dessous (Figure 26).

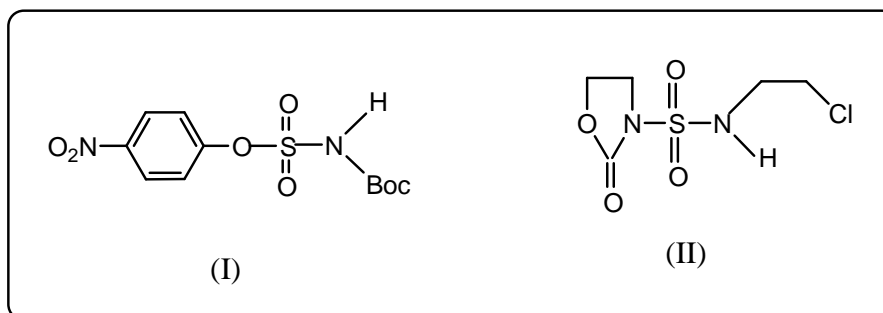


Figure 26 : Structure des sulfamoyles actifs dérivés de phénols ou d'oxazolidinone.

En effet, ces dérivés actifs O et N sulfamoylés obtenus à partir de l'isocyanate de chlorosulfonyl (ICS) (Schémas 11 et 12)⁽¹¹⁴⁾, vont permettre l'introduction du groupement sulfamoyle substitué directement par une réaction de trans-sulfamoylation.

Le sulfamoyle activé de formule (I), le (N-Boc-sulfamate) (Figure 26) est obtenu par l'addition du tertibutanol sur l'ICS suivie d'une sulfamoylation par le para-nitrophénol dans la pyridine (Schéma 11).

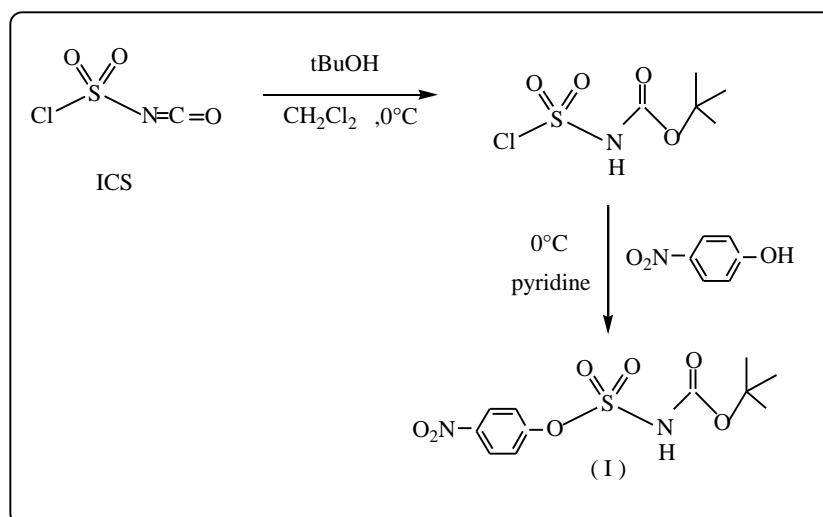


Schéma 11 : Méthode d'accès au dérivé sulfamoylé phénolique (I).

⁽¹¹⁴⁾ Abdaoui, M.; Dewynter, G.; Montero, J.-L. *Tetrahedron Lett.* (1996), 37, 5695

Les dérivés activés o-sulfamoylés se distinguent par leur grande réactivité. Celle-ci augmente de façon importante quand le noyau aromatique comporte des substituants électroattracteurs. Ces derniers stabilisent, par résonance, l'ion phénate formé dans le cas des phénols.

Concernant le dérivé activé oxazolidinonique de formule (**II**), il est obtenu directement à partir de l'ICS en une seule étape (réaction one pot) par réactions de carbamoylation-sulfamoylation-cyclisation interne (Schéma 12)⁽¹¹⁵⁾.

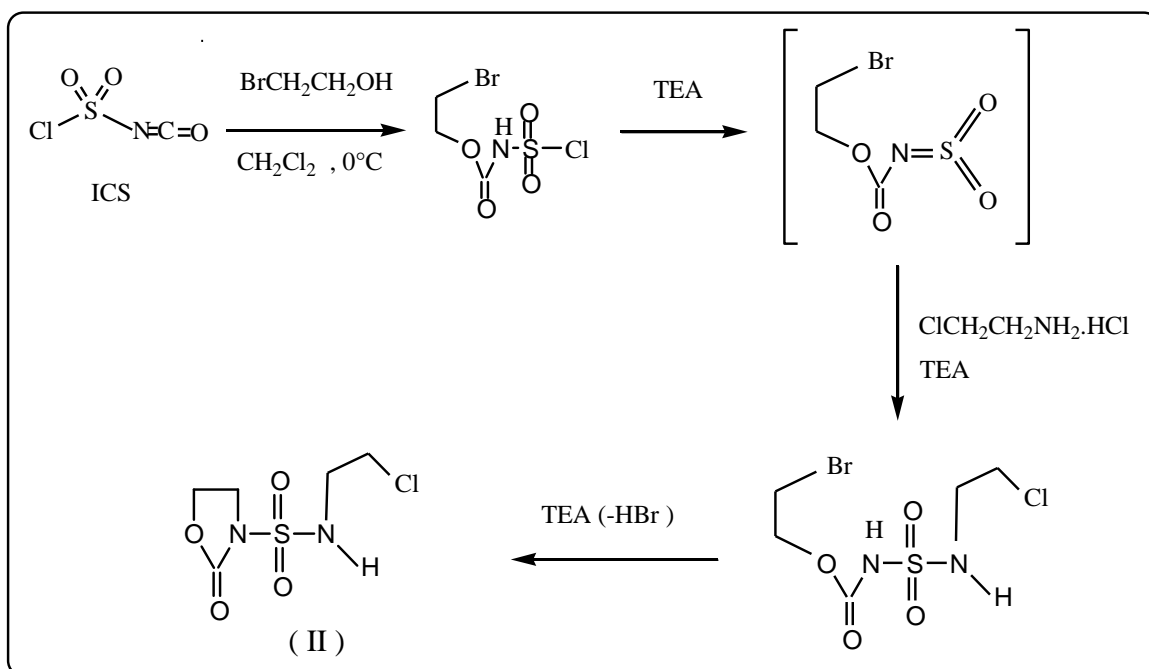


Schéma 12:Obtention du dérivé sulfamoylé oxazolidinonique (**II**).

La réaction doit s'effectuer dans des conditions strictement anhydres pour éviter ou limiter la formation de carbamates de bromo-2 éthyle.

La cyclisation du carboxylsulfamide se fait entre l'azote carbamique et le groupement bromo-2 éthyle, en présence de la triéthylamine.

La première étape est la formation de l'anion carbamique le plus stable par arrachement du proton par la base. L'hétérocyclisation en oxazolidinone est ensuite favorisée par l'encombrement stérique et le caractère nucléofuge du brome.

⁽¹¹⁵⁾ Dewynter, G.; Abdaoui, M.; Regainia, Z.; Montero, J.-L. Tetrahedron (1996), 52, 14217.

II.1.2.1. Caractérisation des produits obtenus

Le sulfamoyle phénolique (**I**) se caractérise en spectrométrie infrarouge (**IR**) par l'apparition d'une bande vers 3270 cm^{-1} correspondant à la vibration N-H, une bande vers 1715 cm^{-1} correspondant au groupement C=O carbamate, une bande vers 1605 cm^{-1} attribuée au groupement nitro NO_2 et deux bandes d'absorption vers 1360 cm^{-1} et 1160 cm^{-1} correspondant aux élongations symétriques et antisymétriques du groupement SO_2 .

En spectrométrie de masse, on obtient des spectrogrammes avec les résultats suivants:

MS ESI⁺ 30 Volt, m/z: 356.29, [M + K]⁺ (100%).

MS ESI 30 Volts, m/z: 317.20 [M - H]⁻ (100%).

En spectrométrie RMN du proton, ce dérivé est caractérisé par l'apparition de deux signaux allure de doublet à 8.35 et 7.55 ppm correspondant aux protons aromatiques et par le singulet des protons tertiobutyls à 1.55 ppm.

Pour le sulfamoyle oxazolidinonique (**II**), il est caractérisé en spectrométrie infrarouge (**IR**) par les absorptions: 3300 cm^{-1} , 1750 cm^{-1} attribuées successivement aux élongations des groupements NH et C=O et deux autres absorptions vers 1360 et 1140 cm^{-1} dues aux vibrations du groupement SO_2 .

En RMN du proton dans le DMSO-d₆, la cyclisation est mise en évidence par la disparition du signal du proton carbamique. Le NH éthylénique apparaît sous forme d'un triplet élargi à 8.71 ppm.

La spectroscopie de masse utilisée pour la détermination de la structure du dérivé oxazolidinone a été réalisée par la méthode de pulvérisation ionique (electrospray ionisation mass spectroscopy : MS ESI) en mode négatif, ce composé présente un spectrogramme de pic moléculaire à 20 volts, avec les résultats suivants:

MS ESI 20 Volts, m/z: 226.86, [M - H]⁻ (85%).

II.1.3 Fonctionnalisation de la β - Cyclodextrine

Un challenge important en chimie supramoléculaire des cyclodextrines est l'obtention de synthons sélectivement modifiés en grande quantités servant de base pour la construction d'édifices plus sophistiqués permettant une meilleure exploitation de leurs propriétés chimiques. Les méthodes existantes ont encore pour la plupart l'inconvénient de nécessiter un nombre trop important d'étapes de synthèse conduisant soit à des rendements trop faibles ou bien même dans certains cas précis montrant une reproductibilité aléatoire. Il est donc important de mettre au point des stratégies de contournement de ces deux principaux écueils qui nuisent considérablement au développement rapide de la chimie des cyclodextrines sélectivement fonctionnalisées⁽¹¹⁶⁾.

Dans notre travail, un accent particulier a été apporté à la synthèse de la mono-6-amino-6-déoxy β -cyclodextrine (β -CDNH₂).

La (β -CDNH₂) est un produit de départ très important dans la chimie des cyclodextrines, Sa préparation est bien décrite dans la littérature⁽¹¹⁷⁾, la méthode couramment utilisée se résume en trois étapes suivantes: tosylation, azidation, et réduction du groupement azide obtenu en amine correspondant (Schéma 13).

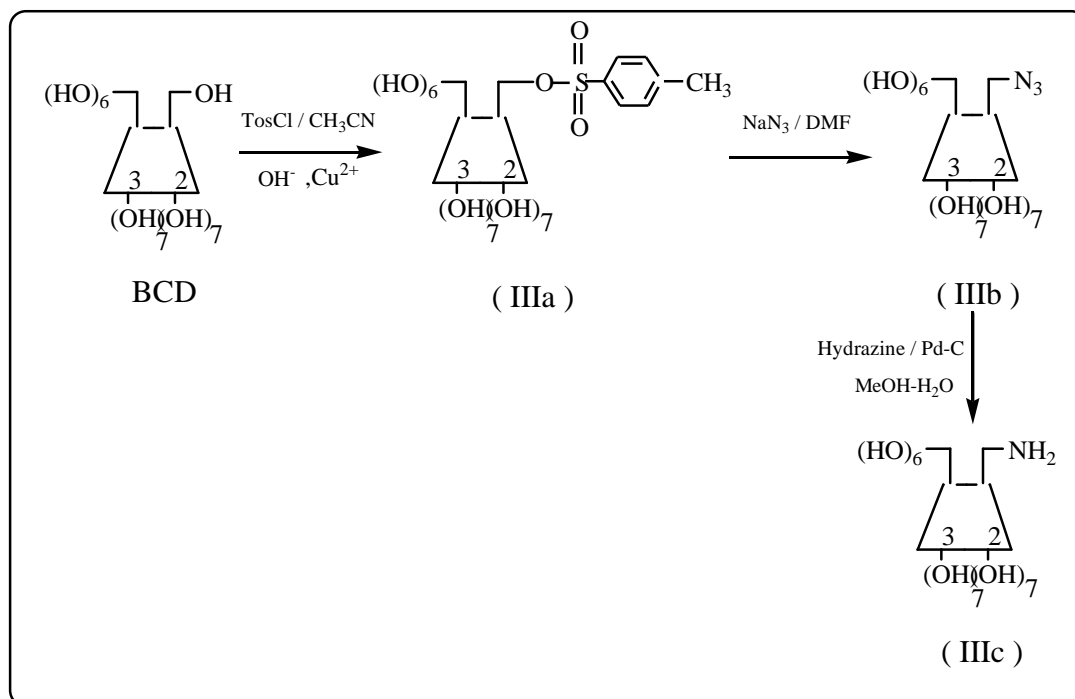


Schéma 13 : Méthode d'obtention de la mono-6-amino-6-déoxy β -cyclodextrine (β -CDNH₂) (IIIc).

⁽¹¹⁶⁾ Khan A. R., Forgo P., Stine K. J., D'Souza V.T., Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins, Chem. Rev. (1998), 98, 1977-1996.

⁽¹¹⁷⁾ Hanessian, S.; Benalil, A.; Laferriere, C. J. Org. Chem. (1995), 60, 4786.

II.1.3.1. Tosylation:

Le monotosylate (**IIIa**), qui est le précurseur universel pour accéder aux dérivés – monosubstitués sur le C-6 de la β -CDNH₂, est obtenu par l'action du chlorure de p-toluène sulfonyle (chlorure de tosyle) sur la β -CD dans la pyridine. Cette préparation renferme des proportions variables de (10 à 15 %) de cyclodextrine non modifiée ainsi que des produits de tosylation sur le C-2, ce qui diminue considérablement le rendement de la réaction.

Des méthodes de séparations onéreuses sont donc nécessaires pour parvenir au monotosylate pur, d'où la nécessité de la mise au point de nouvelles conditions opératoires pour accéder à une monotosylation régio-sélective de la β -CD.

La méthode de choix pour la synthèse du monotosylcyclodextrine est de faire réagir un complexe: cyclodextrine/toluène avec le chlorure de tosyle dans une solution aqueuse de NaOH (Méthode de Pitter–salek modifiée)⁽⁵⁶⁾.

Les complexes cyclodextrine / toluène utilisé et cyclodextrine / chlorure de tosyle formé au cours de la réaction, vont favoriser l'orientation de la tosylation vers la face primaire, en offrant le produit désiré avec un rendement acceptable.

Plus récemment, une contribution permettant l'amélioration du rendement et la reproductibilité de cette réaction a été rapportée⁽¹¹⁸⁾, Il s'agit en fait d'employer un complexe de type sandwich avec le cuivre (II). La présence d'un cation métallique au sein de ce complexe organométallique conduit au blocage des hydroxyles de la face secondaire évitant ainsi la tosylation sur la position C-2, qui est le problème principal rencontré avec les autres méthodes.

C'est donc cette méthode que nous avons appliquée dans notre travail.

On peut proposer le mécanisme suivant (Schéma 14) pour la formation du monotosylate- β -CD. C'est une réaction d'addition nucléophile qui s'achève avec élimination d'une molécule d' HCl.

A cause de l'encombrement stérique du chlorure de tosyle, Cette réaction est plus facile avec les OH primaires qu'avec les OH secondaires.

⁽¹¹⁸⁾ Defaye, J., Crouzy, S., Evrard, N., Law, H., Patent WO 9961483; Chem. Abstr., (2000), 132:24077.

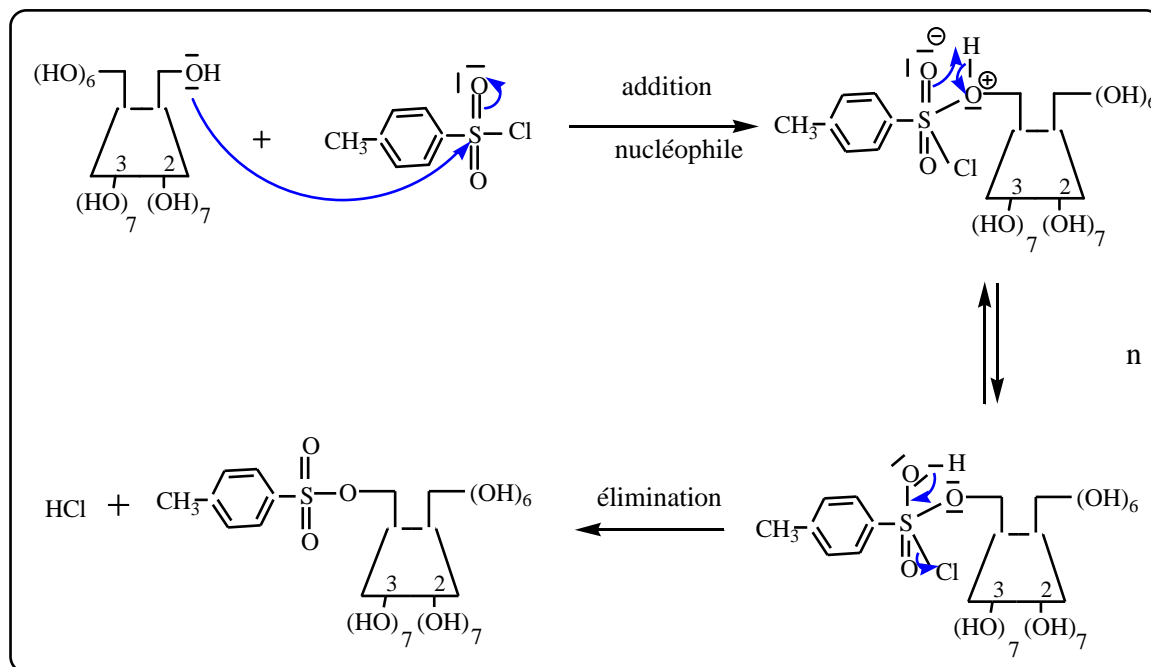


Schéma 14 : Mécanisme proposé pour la réaction de monotosylation de la β -CD (**IIIa**).

II.1.3 2. Azidation

La délocalisation du doublet de l'oxygène dans le tosylate (Schéma 15), lui confère une grande stabilité par rapport à l'ion OH^- , et sa formation facile lui donne le rôle d'un meilleur groupement partant.

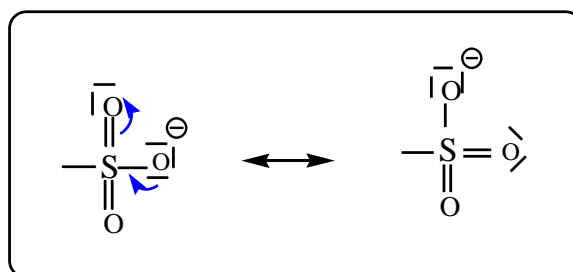


Schéma 15 : Stabilisation de l'ion tosylate.

En effet l'action de NaN_3 sur le monotosylate (**IIIa**) dans le DMF (Schéma 13), conduit presque quantitativement (99%) au mono-azide (**IIIb**) selon une réaction de substitution nucléophile bimoléculaire rendue possible par l'activation de la fonction alcool primaire.

II.1.3.3. Amination

La réduction du groupement azide du monoazido-6- β -CD (**IIIb**) en amine primaire s'est réalisée par hydrogénation catalytique avec l'hydrazine hydrate en présence de Pd/c comme catalyseur dans un mélange méthanol/eau⁽¹¹⁹⁾ pour conduire au monoamino-6- β -CD de formule (**IIIc**) (Schéma 13).

Il est à noter que la réduction dans le méthanol absolu s'est montrée une opération lente et non complète.

Une étude sur l'optimisation des conditions opératoires de cette réaction a montré que l'ajout d'une portion de 15% d'eau par rapport au méthanol est nécessaire pour le bon déroulement de cette réaction⁽¹¹⁹⁾.

Par ailleurs, ce même composé peut être aussi obtenu par une autre voie de synthèse décrite dans la littérature et qui consiste à convertir le groupement azide en amine primaire à l'aide de triphénylphosphine et d'ammoniaque dans le DMF, cependant, cette deuxième méthode s'est révélée moins commode et moins rentable par rapport à la première méthode⁽¹²⁰⁾.

La monoamino-6- β -CD obtenue est ensuite purifiée par chromatographie sur échangeur d'ions. Cette étape permet de disposer d'un produit de très haute pureté. Des méthodes plus courantes telles la recristallisation, même répétée, ne parviennent pas à ce but. Le caractère isomorphe des mailles cristallines de la cyclodextrine et de certains dérivés simples comme la mono-amine permet d'obtenir de très beaux cristaux à partir de préparations impures. Dans ce domaine, la cristallinité des composés n'est pas un critère fiable de pureté.

II.1.3.4. Caractérisation des produits obtenus

En spectrométrie de masse, le dérivé tosylé de formule (**IIIa**) utilisé comme produit de départ dans notre travail, présente des spectrogrammes en mode positif et négatif à 20 et 30 Volts successivement avec les résultats suivants:

MS ESI⁺ 20 Volt, m/z: 1288.9, [M + H]⁺ (85 %), (Figure 27).

MS ESI, 30 volt, m/z: 1287.69, [M - H]⁻, (15 %).

Sur le spectre RMN ¹³C découplé du proton, séquence APT (Attached Proton Test) (Voir Annexes), enregistré à température ambiante dans le DMSO-d₆, ce même dérivé est caractérisé par l'apparition d'un signal à 163.98 ppm correspondant au carbone C[≡]O lié au groupement sulfamate. Dans cette zone des champs faibles, apparaissent également les carbones aromatiques (127.32 -144.72 ppm). Dans la zone des champs forts, on constate l'apparition d'un signal vers 21.11 ppm attribué au carbone du groupement CH₃.

⁽¹¹⁹⁾ Jicsinszky L., Ivaányi R., Catalytic transfer hydrogenation of sugar derivatives, Carbohydrate Polymers 45 (2001) 139-145.

⁽¹²⁰⁾ Djedaini F., Lin S Z., Perly B., Wouessidjewe D., J.Pharm.Sci, 79, (1990), 643-646,

Les signaux des carbones de la partie cyclodextrine de la molécule apparaissent juste au milieu du spectre (59.66-101.91ppm).

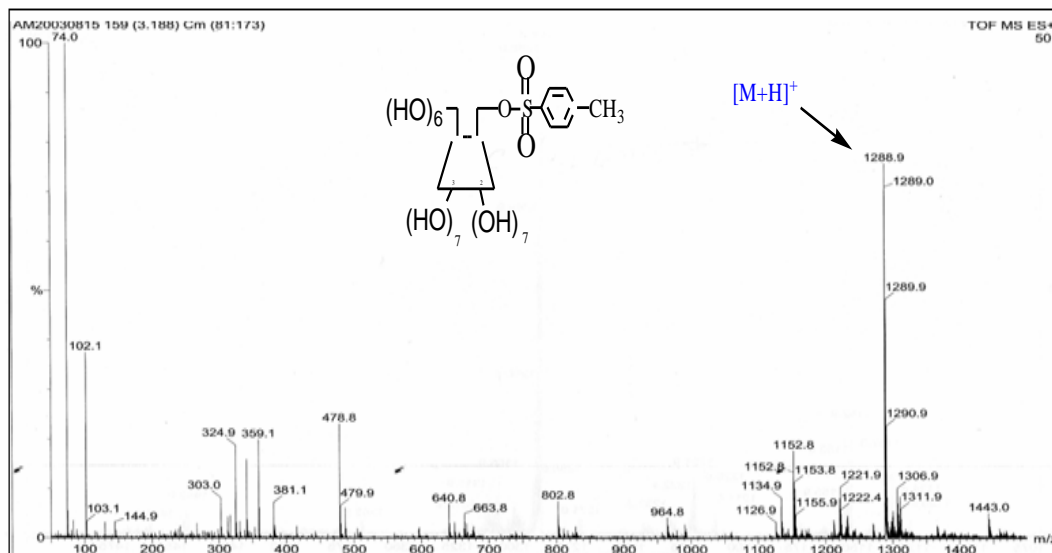


Figure 27 : Spectrogrammes (ESI- MS) en mode positif du monotosylate β -CD (**IIIa**).

Ce produit a été caractérisé aussi par RMN du proton dans le DMSO-d₆ (Figure 28). L'intégration des signaux apparaissant sur le spectre montre bien la présence d'un seul groupement tosylo en position primaire de la β -CD.

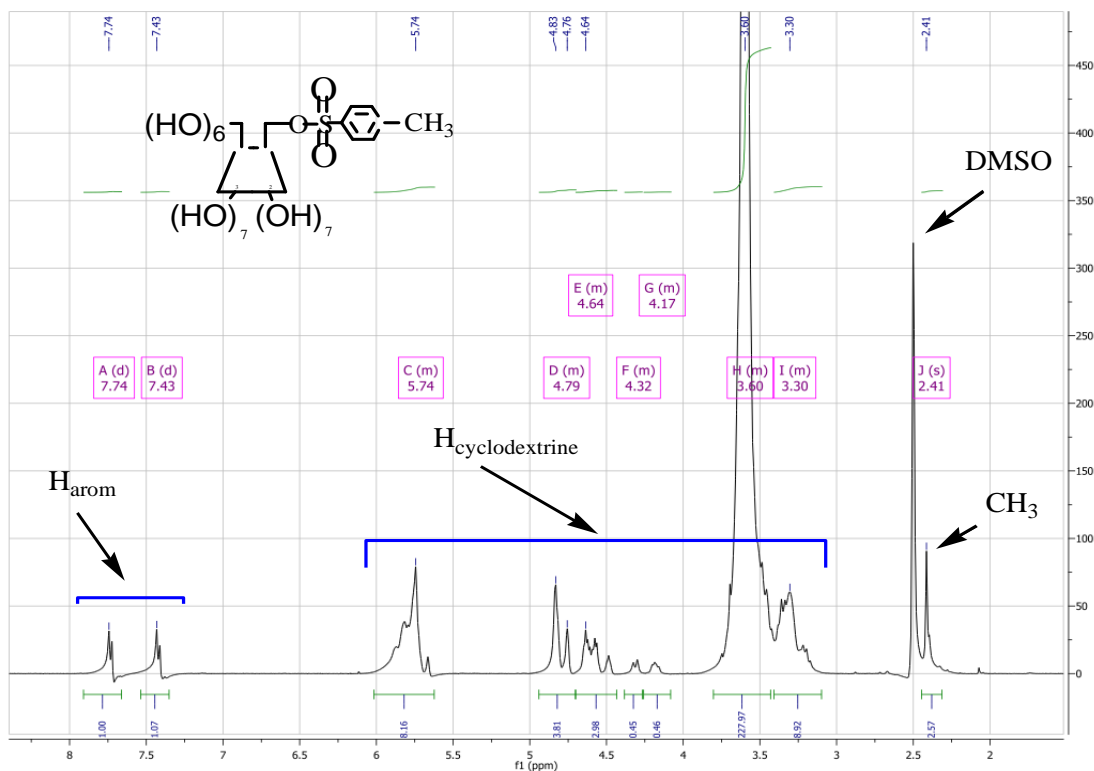


Figure 28 : Spectre RMN du proton du monotosylate β -CD (**IIIa**) dans le DMSO-d₆.

Le dérivé (**IIIb**): le monoazide-6- β -CD est caractérisé tout d'abord par spectrométrie infrarouge (IR) qui montre l'apparition d'une forte bande d'élongation vers 2113 cm^{-1} attribuée au groupement azide (Figure 29).

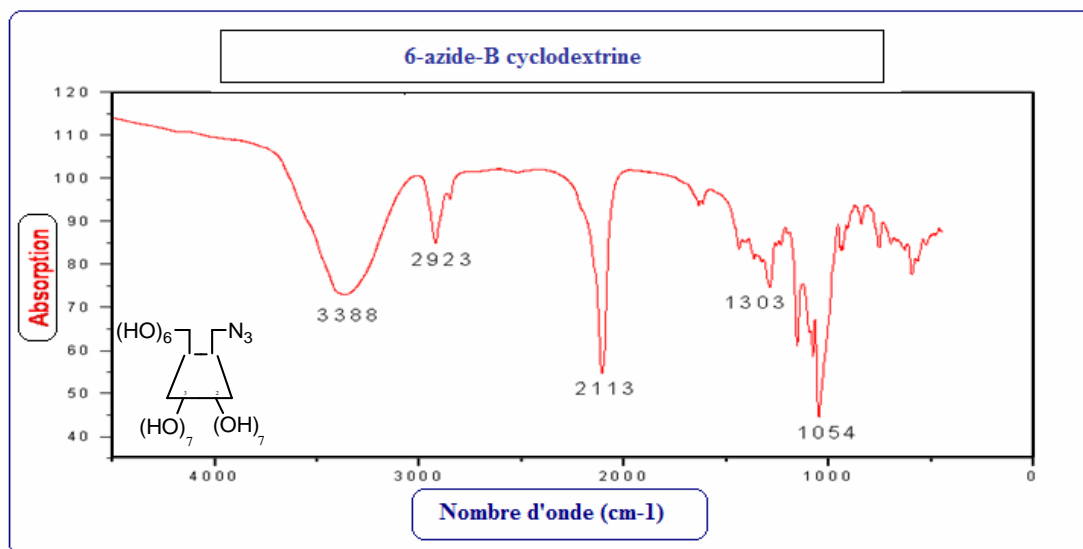


Figure 29 : Spectres IR du monoazido-6- BCD (**IIIb**).

En plus de son identification par spectrométrie (IR), ce dérivé est caractérisé également par spectrométrie de masse, qui donne deux spectrogrammes en modes positif et négatif avec les résultats suivants:

MS ESI⁺ 20 Volt, m/z: 1182.53, [M + Na]⁺ (100 %), (Figure 30).

MS ESI, 20volt, m/z: 1158.34, [M - H]⁻, (100 %).

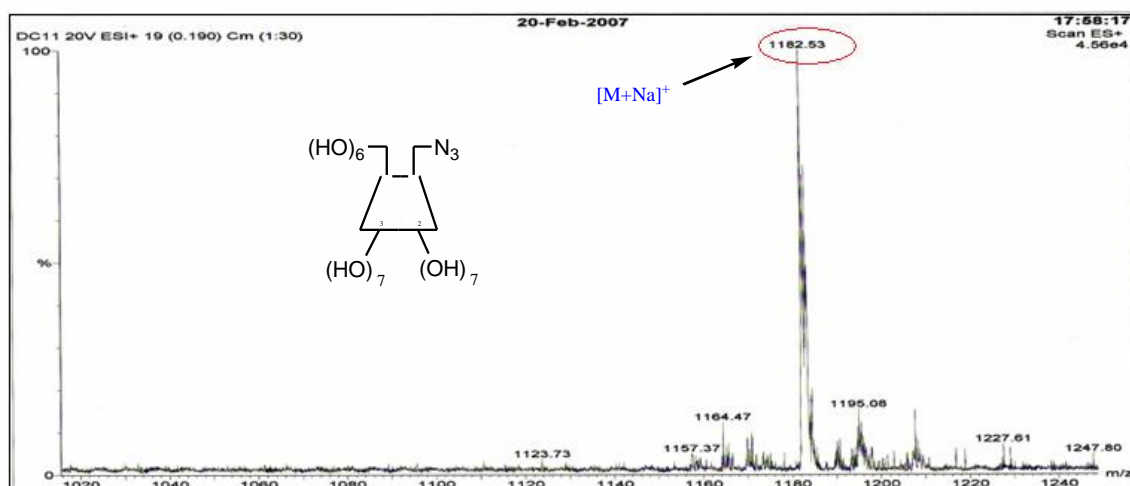


Figure 30 : Spectrogramme (ESI-MS) en mode positif du monoazido -6- β -CD (**IIIb**).

En RMN du proton dans le D₂O, le spectre du monoazide-6- β -CD met en évidence l'absence de signaux aromatiques provenant du groupement tosyle (Figure 31).

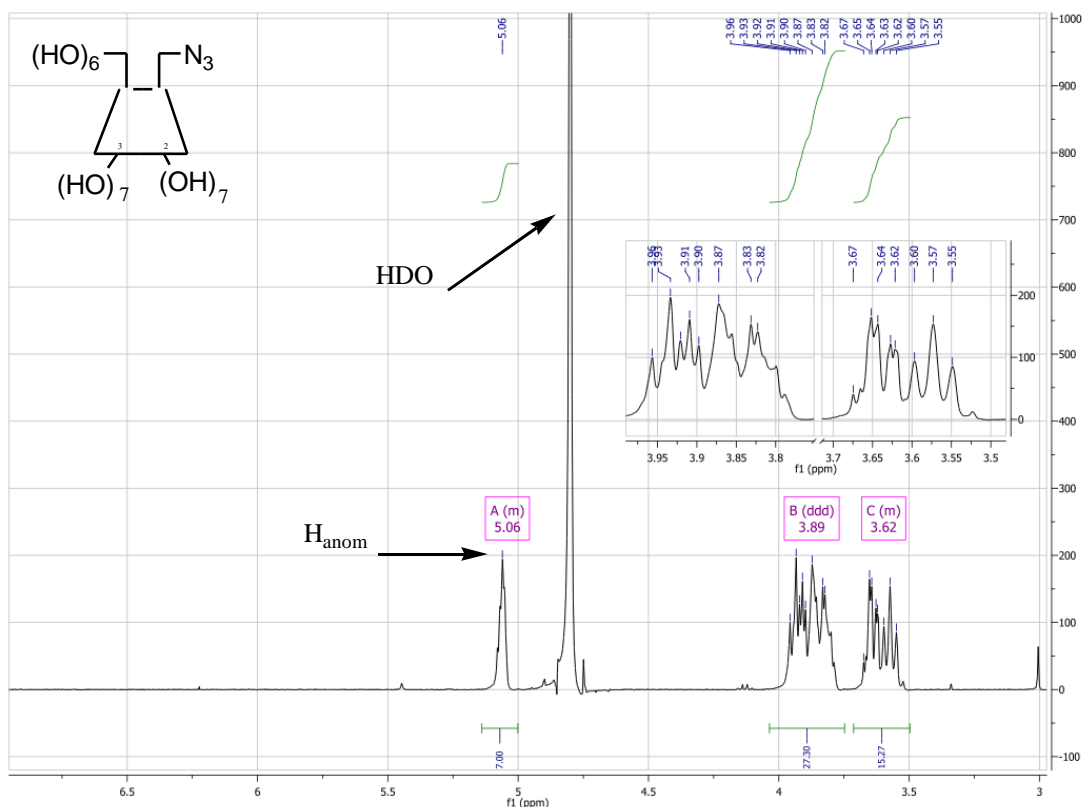


Figure 31 : Spectre RMN du proton du Monoazido-6- β -CD (**IIIb**) dans D₂O.

Enfin le dérivé (**IIIc**): la monoamino-6- β -CD est caractérisée par spectrométrie de masse avec laquelle nous avons obtenus deux spectrogrammes dont les résultats sont les suivants

MS ESI⁺ 50 Volt, m/z: 1134.83, [M + H]⁺ (100 %),

MS ESI⁻, 20volt, m/z: 1169.46, [M +Cl]⁻, (100 %), (Figure 32).

En RMN ¹³C découplé du proton, séquence APT, enregistré à température ambiante dans le D₂O, le spetre de ce dérivé est presque identique à celui de la β -CD native enregistré dans les mêmes conditions (Voir annexes).

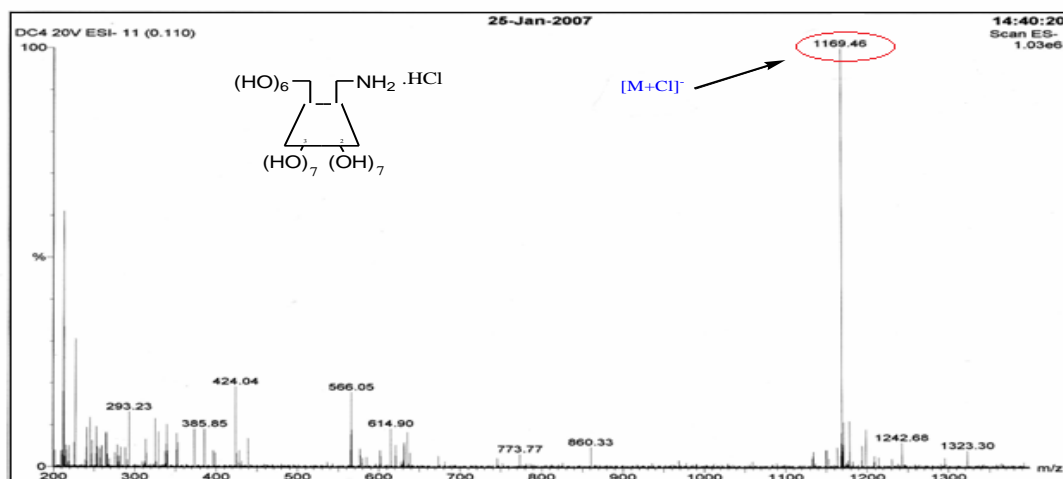


Figure 32 : Spectrogramme (ESI-MS) en mode négatif du Chlorhydrate du mono-amino-6-BCD (**IIIc**).

L'étude par RMN du proton de ce composé en solution dans le DMSO et dans l'eau lourde a donné les spectres suivants (Figure 33 et 34).

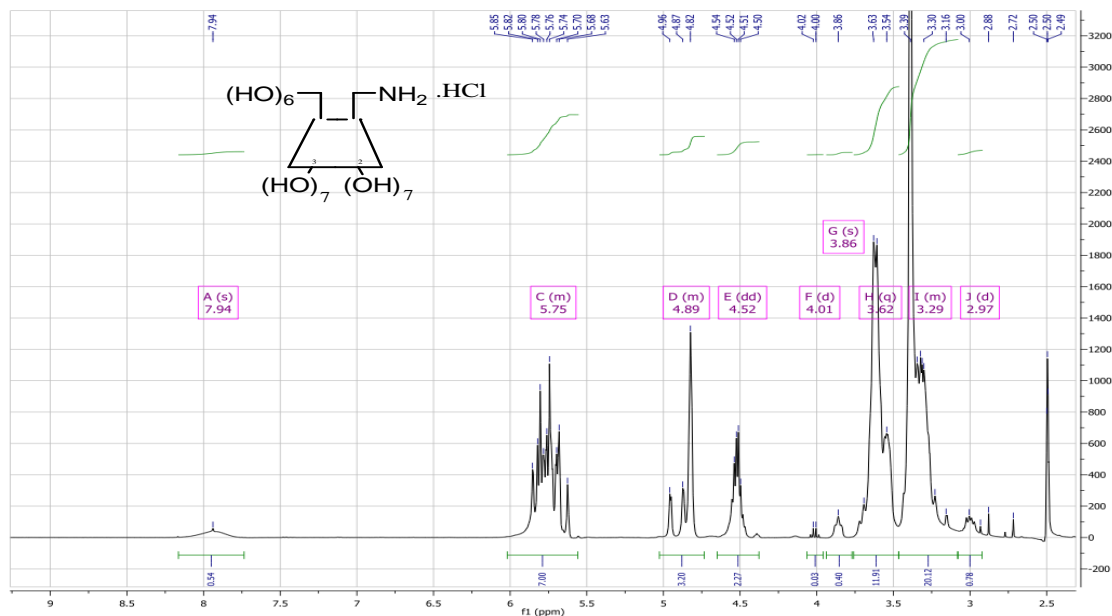


Figure 33 : Spectre RMN ^1H du chlorhydrate du mono-amino-6- β -CD (**IIIc**) dans le DMSO- d_6 .

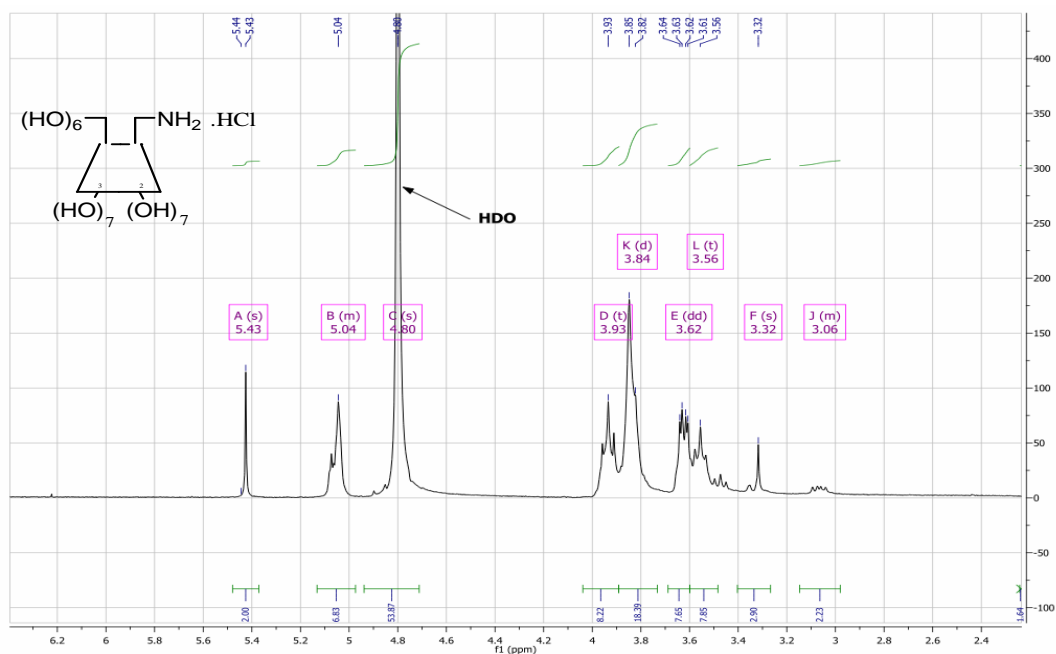


Figure 34 : Spectre RMN ^1H du chlorhydrate du mono-amino-6- β -CD (**IIIc**) dans le D_2O .

Lorsque l'on compare les spectres de ce composé dans l'eau lourde et dans le DMSO, on constate que la nature du solvant a une influence profonde sur l'allure des spectres RMN du proton. En effet, le changement de solvant induit des modifications spectrales considérables dues essentiellement au phénomène d'échange très rapide des protons des OH dans le cas de D_2O .

II.1.4. Synthèse des conjugués β -Cyclodextrine-CENS

Guidés par les données de la littérature, nous avons orienté notre travail dans une direction permettant en premier temps, d'introduire les groupements cyclohexyle, phényle et benzyle sur le motif sulfamide afin d'accentuer l'analogie structurale de nos composés avec les exemples de CENS rapportés dans la littérature et qui ce sont montrés biologiquement les plus actifs (Figure 35)⁽¹²¹⁾.

⁽¹²¹⁾ Kadri M. , Dhaoui N. , Abdaoui M. , Winum J-Y., Jean-Louis Montero, Inclusion complexes of 2-chloroethylnitrososulfamides (CENS) with β -cyclodextrin , European Journal of Medicinal Chemistry (2003) .

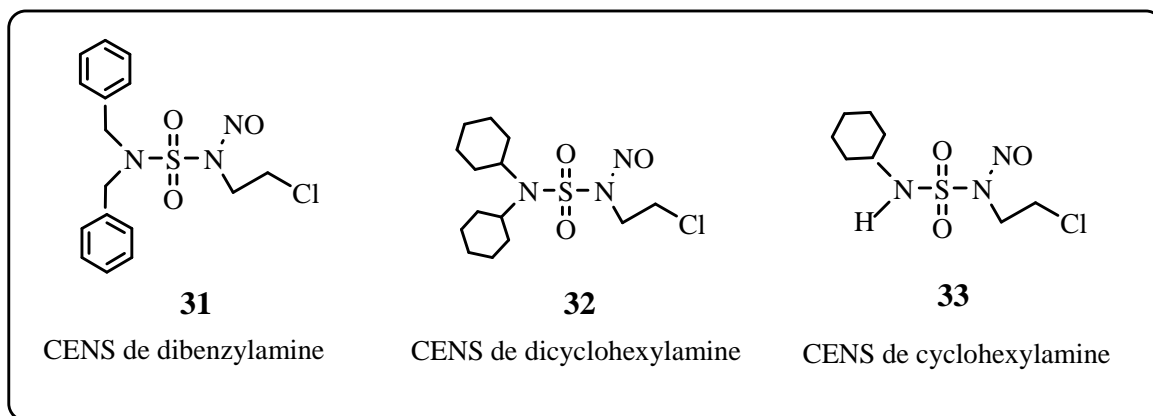


Figure 35 : Exemples de CENS biologiquement actifs rapportés dans la littérature.

En effet, le déplacement du groupement tosylole du dérivé (**IIIa**) par des amines primaires de types cyclohexylamine, benzylamine et aniline à une température de 70°C a conduit aux amines secondaires correspondants (**IV**) dérivés de cyclodextrine (Schéma 16).

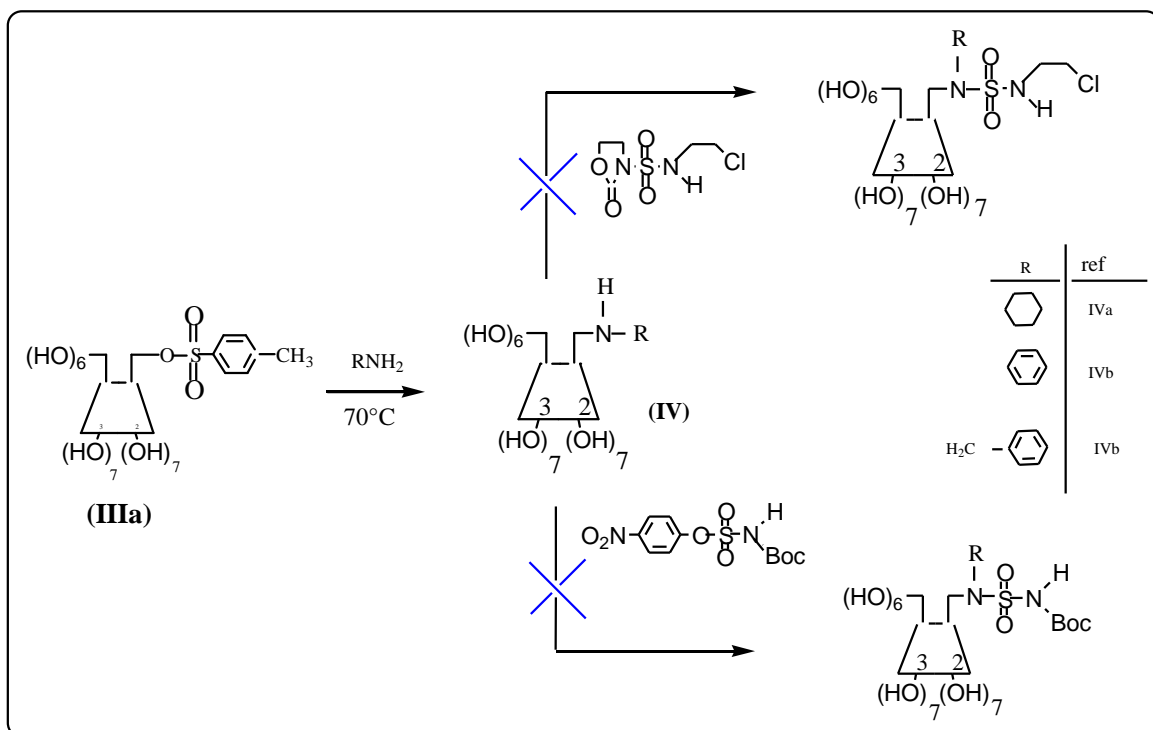


Schéma 16 : Voies proposées pour l'obtention des conjugués β -Cyclodextrine-CENS.

Notre travail s'est concentré ensuite sur la réaction de transfert du groupement sulfamoylole sur l'amine secondaire de ces produits intermédiaires (**IV**) (Schéma 16), dans le but d'obtenir des conjugués β -cyclodextrine-CENS.

Etant soumis à l'action des dérivés sulfamoylés phénolique et oxazolidinonique activés, et à différentes conditions opératoires, ces amines secondaires dérivés de cyclodextrine n'ont pas abouti aux produits attendus. L'encombrement stérique du groupement R lié directement à l'azote de la fonction amine secondaire semble être la cause de l'échec de cette réaction de trans-sulfamoylation.

Nous nous sommes donc tournés vers une nouvelle voie de synthèse dans laquelle nous avons fait intervenir directement la mono-amino- β -CD dans la réaction de trans-sulfamoylation avec les mêmes dérivés sulfamoylés précédents (Schéma 17).

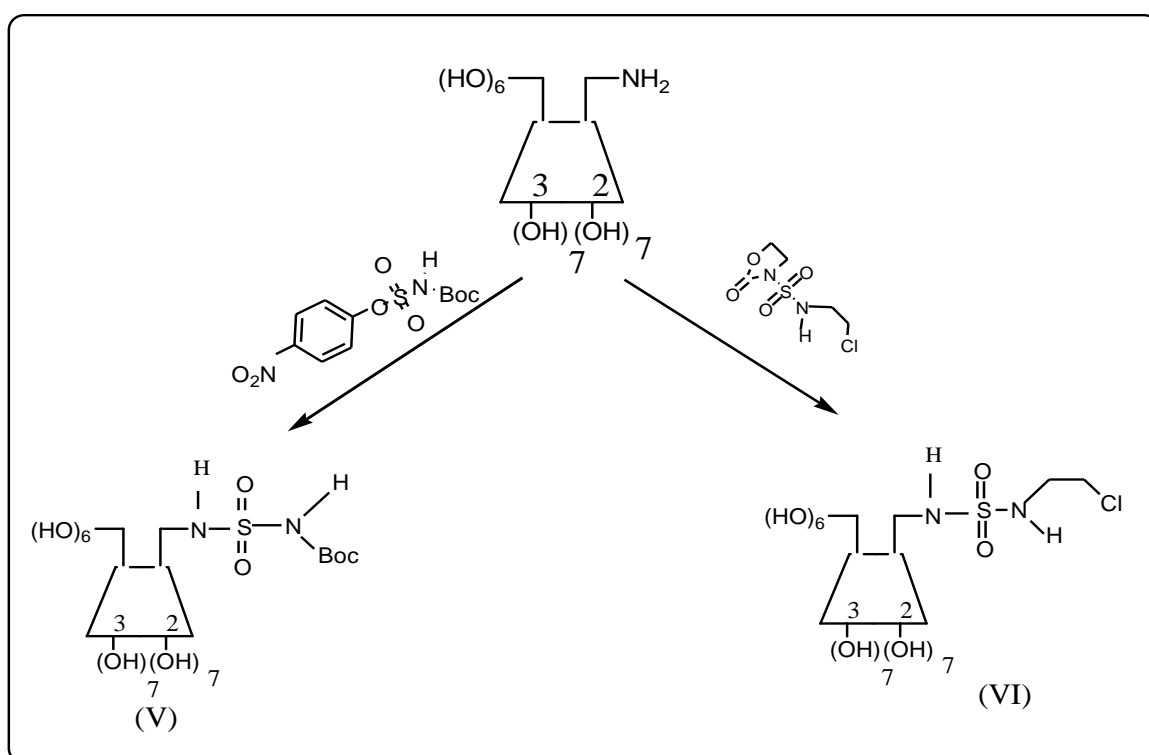


Schéma 17 : Réaction de trans-sulfamoylation sur la mono-amino-6- β -CD.

Dans les deux cas, que ce soit avec le sulfamoylé phénolique ou oxazolidinonique (Schéma 17), la réaction s'accompagne de quantités importantes de produits secondaires qui nécessitent des purifications laborieuses et expliquent en partie le rendement très médiocre de cette réaction ; et malgré de nombreuses tentatives faisant varier les conditions expérimentales (température, durée de réaction) et les proportions des réactifs, nous n'avons jamais pu isoler les produits attendus (V) et (VI).

II.1.5. Conclusion

Dans ce chapitre, notre travail s'est porté dans un premier temps à la synthèse d'espèces de types « sulfamoyles activés » dérivés de phénols et d'hétérocycles (oxazolidinones).

Dans un deuxième temps, un accent particulier a été porté sur la synthèse d'un précurseur clef, la mono-6- amino- β -cyclodextrine. Ce dernier a été obtenu selon une suite de trois étapes principales utilisant l'hydrazine hydrate en présence du Pd/c comme réducteur dans la dernière étape en passant par le tosylate et l'azide- β - cyclodextrine comme produits intermédiaires.

Ensuite; une réaction de trans-sulfamoylation conduite selon deux voies différentes a été mise en œuvre dans le but d'accéder à une série de conjugués β -cyclodextrine-CENS.

La formation d'un mélange complexe de plusieurs produits (que nous n'avons pas pu isoler et identifier) a été observée lors de cette réaction.

L'étude de cette réaction pourrait se poursuivre par la modulation des conditions réactionnelles pour aboutir aux conjugués β -cyclodextrine-CENS avec des rendements satisfaisants.

Néanmoins, nous avons obtenu des produits intéressants, en particulier ceux issus de la fonctionnalisation de la β - cyclodextrine, qui vont nous servir dans le même esprit de greffage des composés porteurs de chromophores sulfamides sur la β - Cyclodextrines afin d'obtenir des conjugués thiouréidoarylsulfonamides β - Cyclodextrines que nous présenterons dans le chapitre qui suit.

CHAPITRE 2

Greffage des Arylsulfonamides sur la β -Cyclodextrine

II.2.1 Introduction

Après la découverte d'une corrélation entre le CA et le cancer par l'identification de deux isoenzymes membranaux (CAIX et CAXII) liées aux tumeurs, de grands efforts ont été consacrés à ces isozymes particulièrement en tant que nouvelles cibles pour le développement d'agents anti-cancéreux⁽¹²²⁾.

Chez les mammifères, l'isozyme CAIX est fortement surexprimée dans beaucoup de types de cancer, elle constitue un marqueur endogène de l'hypoxie cellulaire, car son expression est fortement induite par l'hypoxie présente dans beaucoup de tumeurs appartenant à divers organes comprenant l'œsophage, les poumon, le rein, le rectum, le sein, la tête, le cou, et autres organes.

Il a été montré aussi que le CAIX contribue à l'acidification de l'environnement des tumeurs⁽¹²³⁾, en catalysant efficacement l'hydratation de l'anhydride carbonique avec son site actif extracellulaire, menant à l'acquisition des phénotypes métastatique et au chimiorésistance envers les drogues anticancéreuses de nature faiblement basiques.

Outre son rôle dans le contrôle du pH des tumeurs, il est aussi évident que le CAIX peut influencer d'autres processus dans le microenvironnement des cellules tumorales provoquant ainsi la prolifération, l'invasion, et la métastase de ces cellules.

Le développement d'inhibiteurs efficaces et plus sélectifs pour le CAIX appartenant aux classes chimiques diverses, pour l'utilisation dans le management (diagnostique et traitement) des tumeurs hypoxique⁽¹²⁴⁾, représente actuellement un grand déficit clinique.

II.2.2 Mise au point de nouveaux sulfonamides pour l'inhibition de CAIX

De nombreux travaux ont montré qu'une grande famille de sulfonamides s'avèrent présenter une activité inhibitrice accrue vis-à-vis de l'CA. Cependant un nombre important d'inhibiteurs appartenant à cette classe chimique disponibles actuellement en thérapeutique, présentent beaucoup d'effets secondaires principalement dus à leur manque de sélectivité. Etant donné que cette inhibition touche plusieurs enzymes en même temps,

⁽¹²²⁾ Pastorekova S, Kopacek J, Pastorek J. Carbonic anhydrase inhibitors and the management of cancer. *Curr Top Med Chem* (2007);7:865-878.

⁽¹²³⁾ Svastova E, Hulikova A, Rafajova M, Zatovicova M, Gibadulinova A, Casini A, Cecchi A, Scozzafava A, Supuran CT, Pastorek J, Pastorekova S. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett* (2004);577:439-445.

⁽¹²⁴⁾ Cecchi A, Hulikova A, Pastorek J, Pastorekova S, Scozzafava A, Winum JY, Montero JL, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Design of fluorescent sulfonamides as probes of tumor-associated carbonic anhydrase IX that inhibit isozyme IX-mediated acidification of hypoxic tumors. *J Med Chem* (2005);48:4834-4841

ce qui représente un inconvénient majeur pour ces composés.

L'incorporation d'une fonction thiourée dans le squelette des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique a déjà permis d'obtenir des composés possédant des propriétés inhibitrices sélectives intéressantes.

C'est ainsi que plusieurs séries de sulfonamides aromatiques ou hétéroaromatiques incorporant des motifs de thiouréido-sulfanilyle⁽¹²⁵⁾ ou thiouréido- benzolamide⁽¹²⁶⁾ ont été étudiées pour leur interaction avec l'enzyme humain hCAIX aussi bien qu'avec les isozymes cytosoliques I et II omniprésentes dans l'organisme.

Certains de ces composés, comme les dérivés **34** et **35** présentés ci-dessous, ont déjà montré d'excellentes propriétés inhibitrices contre les isozymes CAIX avec des constantes d'inhibition K_i inférieures à 10 nM (Figure 36)⁽¹²⁷⁾.

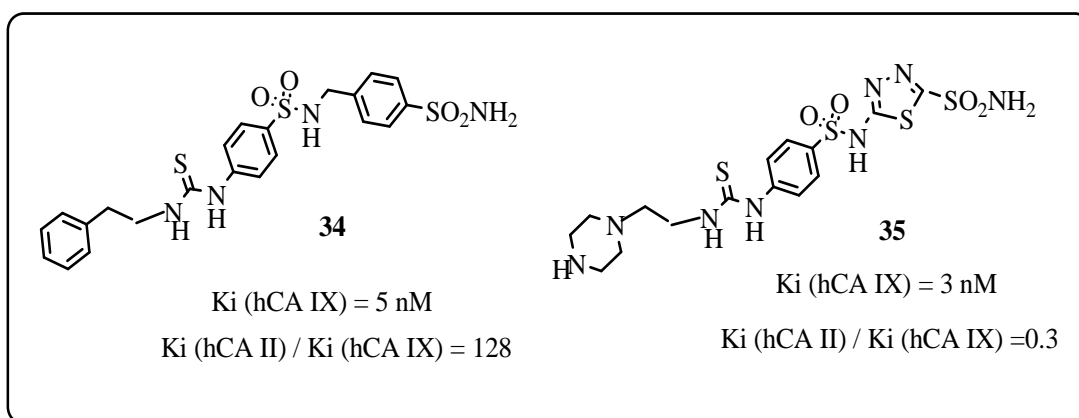


Figure 36 : Structures des sulfonamides aromatiques ou hétéroaromatiques incorporant des motifs de thiouréido-sulfanilyle ou thiouréido-benzolamide avec leurs constantes d'inhibition et leurs rapports de sélectivité envers hCAII et hCAIX.

Par ailleurs, une approche **sucre** très prometteuse qui s'est développée récemment dans le but de cibler sélectivement les différentes isoformes de l'CA, consiste à greffer des parties osidiques aux sulfonamides / sulfamides / sulfamates aromatiques ou hétérocycliques ;

⁽¹²⁵⁾ Ozensoy O, Puccetti L, Fasolis G, Arslan O, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of the tumor-associated isozymes IX and XII with a library of aromatic and heteroaromatic sulfonamides. *Bioorg Med Chem Lett* (2005);15:4862-4866.

⁽¹²⁶⁾ Cecchi A, Winum J-Y, Innocenti A, Vullo D, Montero J-L, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides derived from 4-isothiocyano-benzolamide. *Bioorg Med Chem Lett* (2004); 14: 5775-5780.

⁽¹²⁷⁾ Puccetti L, Fasolis G, Cecchi A, Winum J-Y, Gamberi A, Montero J-L, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides incorporating thioureido-sulfanilyl scaffolds. *Bioorg Med Chem Lett* (2005); 15:2359-2364.

Ce qui a conduit au développement d'inhibiteurs glycoconjugués très efficaces ciblant les **16** isozymes des CAs (l'EC 4.2.1.1).

Etant donné l'intérêt attaché à ces glycoconjugués avec les caractéristiques avantageuses de leurs parties sucres, susceptibles d'interférer sur les processus biologiques ou pathologiques, de nombreuses études récentes leurs ont été consacrées.

En effet, la synthèse d'une série de dérivés incorporant une partie protégée de fructopyranose présente dans le topiramate (Figure 13) et étant liée aux arylsulfonamides via une fonction thiourée, a été rapportée⁽¹²⁸⁾. La même étude montre que cette pharmacomodulation conduit à des inhibiteurs efficaces de l'CA (K_i =10-4.500 nM) parmi lesquels on peut citer les composés **36** et **37** (Figure 37) intervenant comme inhibiteurs potentiels efficaces contre l'isoforme transmembranaire hCAIX.

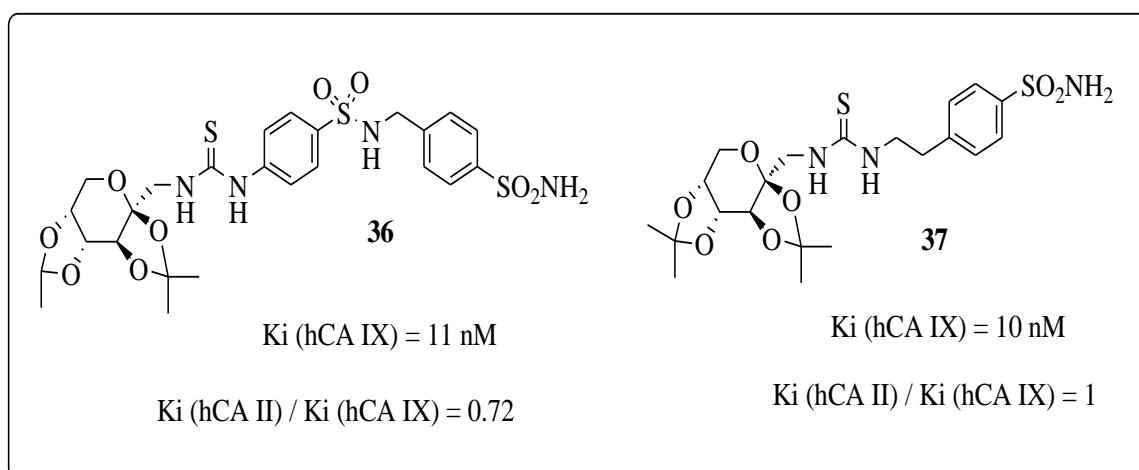


Figure 37 : Exemple d'inhibiteurs liés à des sucres via une fonction thiourée qui se sont montrés très efficaces contre l'hCAIX.

Motivation

Compte tenu de cet ensemble de résultats non exhaustifs, nous nous sommes tout naturellement tournés vers cette approche sucre et nous l'avons mis à profit pour greffer une série d'arylsulfonamides inhibiteurs de l'CA sur la β -Cyclodextrine : un oligosaccharide très réputé comme vecteur biologique, en cherchant un ciblage spécifique du CAIX. La série des conjugués que nous avons préparée répond à la formule générale

⁽¹²⁸⁾ Winum JY, Thiry A, Cheikh KE, Dogne JM, Montero JL, Vullo D, Scozzafava A, Masereel B, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of isoforms I, II, IV, VA, VU, IX, and XIV with sulfonamides incorporating fructopyranose-thioureido tails. *Bioorg Med Chem Lett* (2007);17:2685-2691.

donnée ci-dessous (Figure 38).

Il s'agit d'une série de quatre thiouréido-arylsulfonamide- β -cyclodextrines obtenue par couplage de quatre arylsulfonamide isothiocyanates correspondants avec le chlorhydrate de la mono-6-amino- β -cyclodextrine (β -CDNH₂) préalablement préparée.

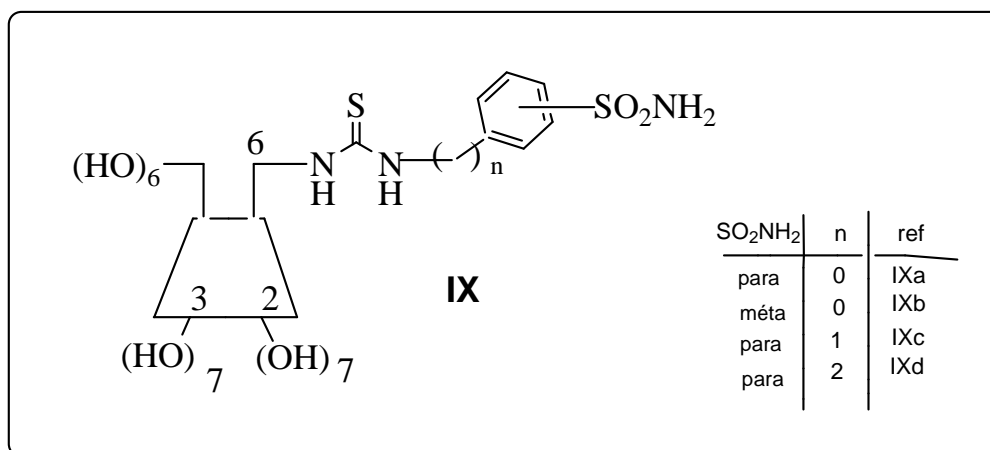


Figure 38 : Formule générale des conjugués thiouréidoarylsulfonamide- β -cyclodextrines synthétisés.

II.2.3 Synthèse des Arylsulfonamides Isothiocyanates.

Le premier volet de notre travail, a consisté tout d'abord à la synthèse d'une série de quatre arylsulfonamides isothiocyanates (Figure 39) connus par leurs activités chimiques et pharmacochimiques particulières.

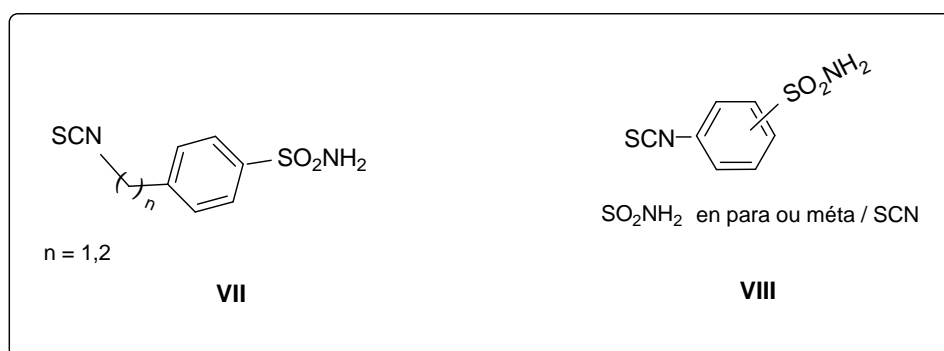


Figure 39: Structures générales des arylsulfonamide isothiocyanates préparés.

En effet, le fait de convertir un groupement amine hydrophile et donneur d'électron en groupement isothiocyanate hydrophobe et attracteur d'électron a une grande incidence sur la nature de l'inhibition de l'CA.

Cette hypothèse se trouve conforter par une publication récente⁽¹²⁹⁾ décrivant ces arylsulfonamides isothiocyanates comme ayant une activité inhibitrice beaucoup plus élevée que leurs précurseurs les arylsulfonamides correspondants. Cependant, ces dérivés isothiocyanates se sont montrés comme sources d'innombrables effets indésirables, principalement dus à une haute réactivité du groupement (NCS) avec les acides aminés en milieux physiologiques.

Au cours de nos synthèses, et selon la nature et la structure chimique de l'arylsulfonamide à transformer, nous avons principalement utilisé le disulfure de carbone en présence du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ou le thiophosgène en présence d'HCl concentré pour aboutir aux isothiocyanates de structures (VII) et (VIII).correspondantes.

➤ **Par l'utilisation du disulfure de carbone et d'un agent de couplage.**

L'agent de couplage peut être le chloroformate d'éthyle, le DCC (1,3-dicyclohexylcarbodiimide) ou le chlorure de tosylo (TosCl), en présence d'une base organique comme la DIPEA (di-isopropyléthylamine) ou la triéthylamine.

Les deux premiers arylsulfonamides isothicyanates correspondants aux structures (VII) et possédant une chaîne aliphatique plus ou moins allongée (n=1,2) sont préparés par l'action d'une solution de disulfure de carbone (CS₂) sur le chlorhydrate du 4-aminométhylbenzensulfonamide en présence du triéthylamine (TEA), ou sur le 4-aminoéthylbenzensulfonamide en présence du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dissout dans le tetrahydrofurane (THF) anhydre (Schéma 18).

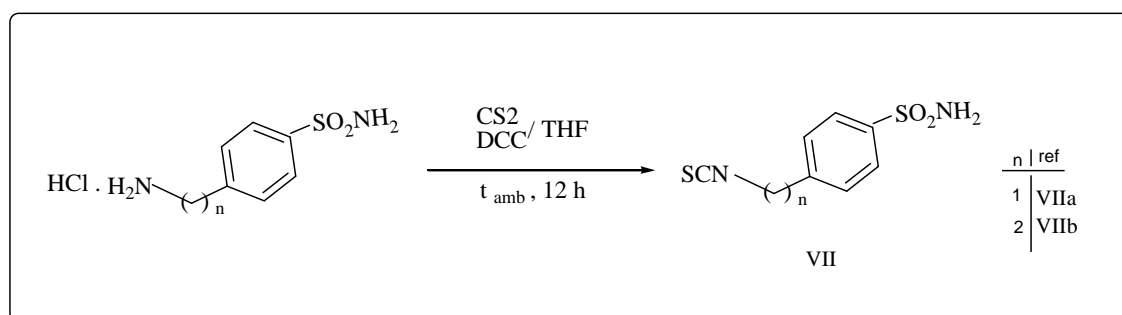


Schéma 18 : Préparation de la première série d'arylsulfonamide isothiocyanates (VII) utilisant le CS₂ en présence du DCC.

⁽¹²⁹⁾ Khobzaoui M., Viranga Tillekeratne L. M. Hudson R.A., Potent isothiocyanate inhibitors of carbonic anhydrase :Synthesis and evaluation. Biochemical and Biophysical Research Communications 318(2004)1-3.

En revanche, on a constaté que cette voie de synthèse n'est pas applicable à la sulfanilamide et son isomère méta. En effet, ces sulfonamides dont la fonction amine est directement liée au noyau aromatique se sont révélés moins réactifs que leurs analogues dans la même série.

Le mécanisme réactionnel est presque le même, que ce soit avec le DCC ou le chlorure de tosylo, qui agissent comme agents désulfurizants (Schéma 19).

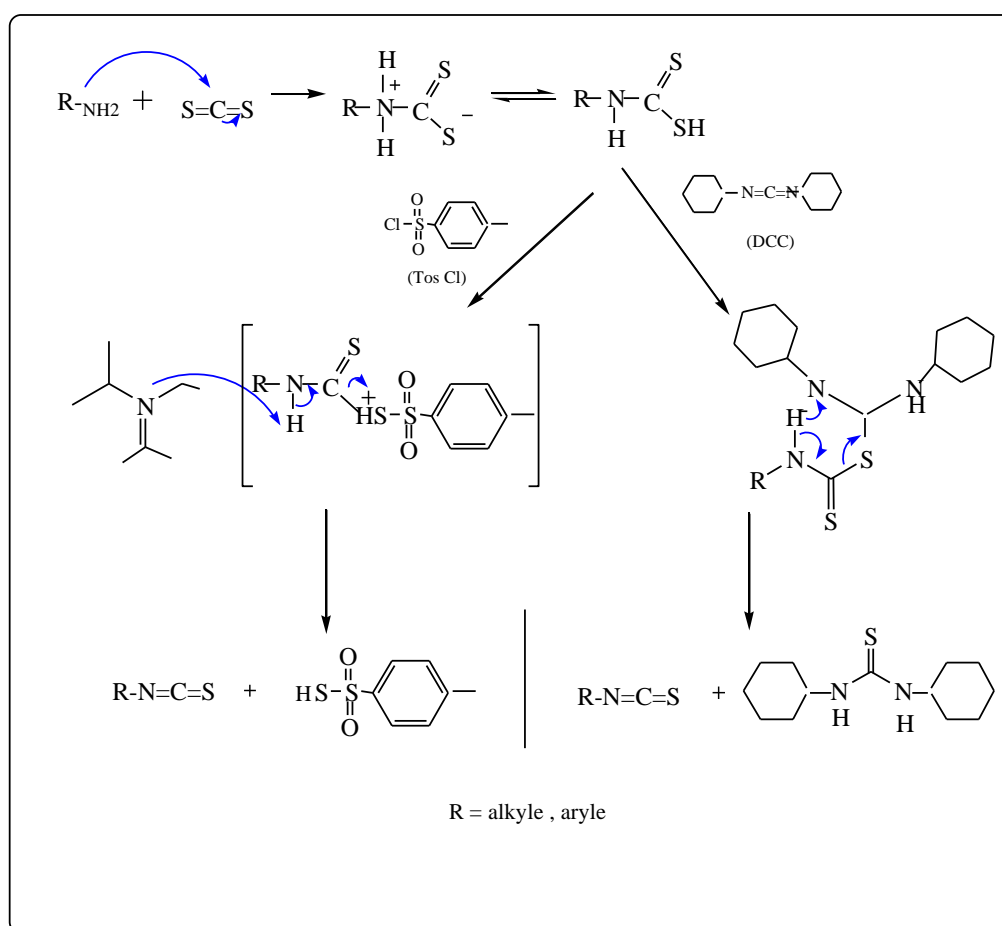


Schéma19 : Mécanisme de formation de l'isothiocyanate par CS₂ en présence de DCC ou du TosCl.

La purification sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 0→10%) donne les deux composés attendus (**VII**) sous forme de poudres blanches cristallines avec des rendements supérieurs à 90%.

➤ **Par l'utilisation du thiophosgène en présence d'HCl concentré.**

Les isothiocyanates de structure (**VIII**) sont obtenus par l'action du thiophosgène (produit malodorant et très toxique) sur la sulfanilamide ou son isomère méta en milieu aqueux en présence d'HCl concentré (Schéma 20) pour conduire après traitements aux isothiocyanates correspondants sous forme de poudre jaunâtre.

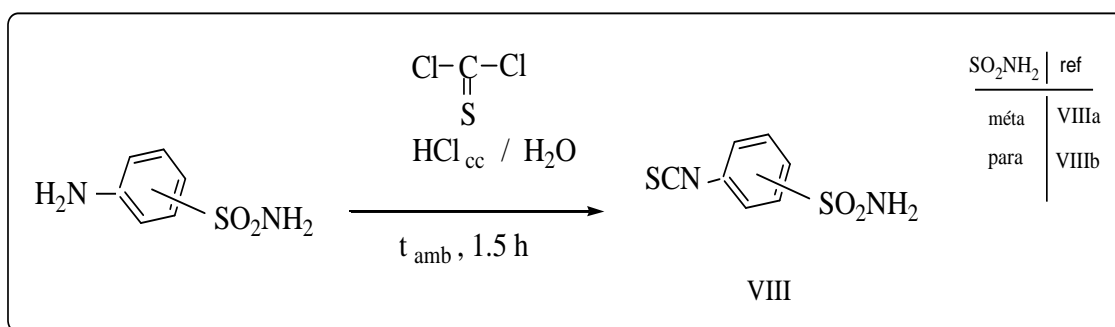


Schéma 20 : Préparation de la deuxième série d'arylsulfonamide isothiocyanates (**VIII**) utilisant le thiophosgène en présence d'HCl concentré.

D'après ces réactions on a pu constater que les isothiocyanates (**VII**) sont plus faciles à obtenir que leurs analogues (**VIII**).

D'autres agents de couplage du type 1,1'-thiocarbonyldi-2(1H)-pyridone, ou le 1,1'-thiocarbonyldiimidazole peuvent être utilisés pour accéder à ces isothiocyanates.

Le mécanisme suivant (Schéma 21), peut être envisagé.

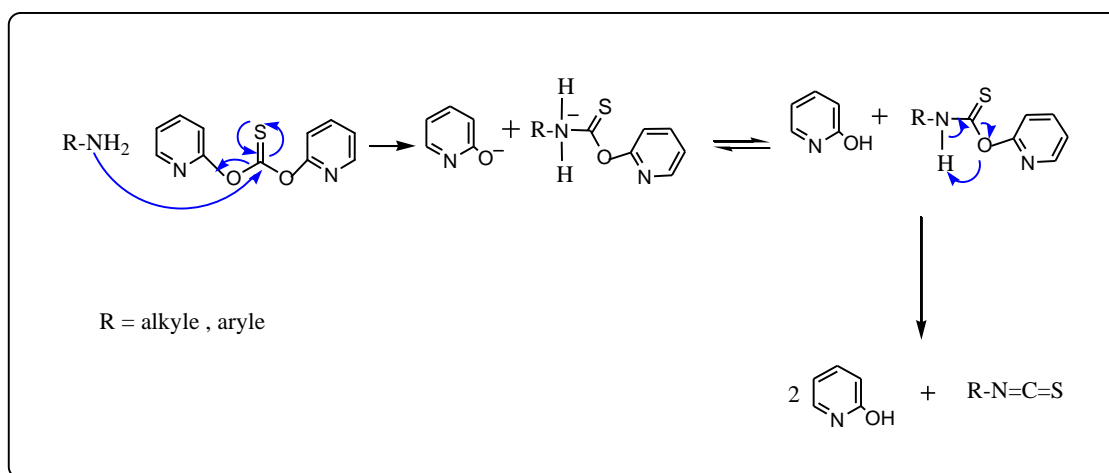


Schéma 21 : Mécanisme de formation de l'isothiocyanate par le di-2-pyridylthionocarbonate.

Cependant, l'isolement des produits de la réaction s'avère plus délicat par rapport aux méthodes utilisant le disulfure de carbone ou le thiophosgène.

II. 2. 4. Caractérisation des produits obtenus

Les caractéristiques spectrales des sulfonamide isothiocyanates obtenus sont en accord avec celles décrites dans la littérature.

En spectrométrie de masse, ces composés donnent des pics moléculaires en adéquation avec leurs masses moléculaires.

Ci-dessous le spectrogramme du composé (**VIIb**) présentant un pic moléculaire avec les résultats suivants: MS ESI, 20 volt, m/z: 241.05 [M - H]⁻, (63%); 277.03 [M+Cl], (7%)

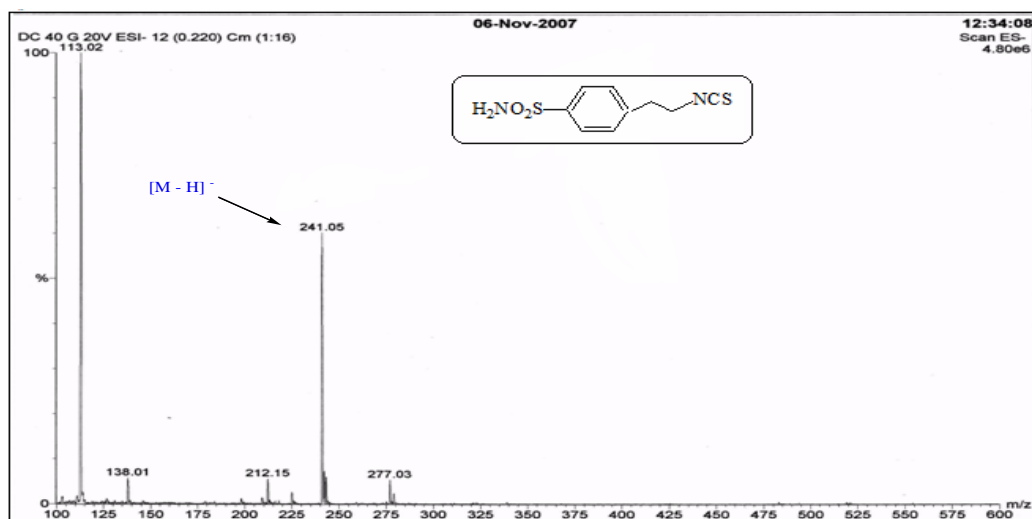


Figure 40 : Spectrogramme (MS-ESI) en mode négatif du composé (**VIIb**).

En RMN du proton, le même composé pris comme exemple, fait apparaître deux doublet à 7.78 et à 7.48 ppm correspondant aux protons aromatiques, un singulet vers 7.36 ppm attribué au groupement NH₂ et deux triplets correspondants aux deux groupements méthylène voisins.

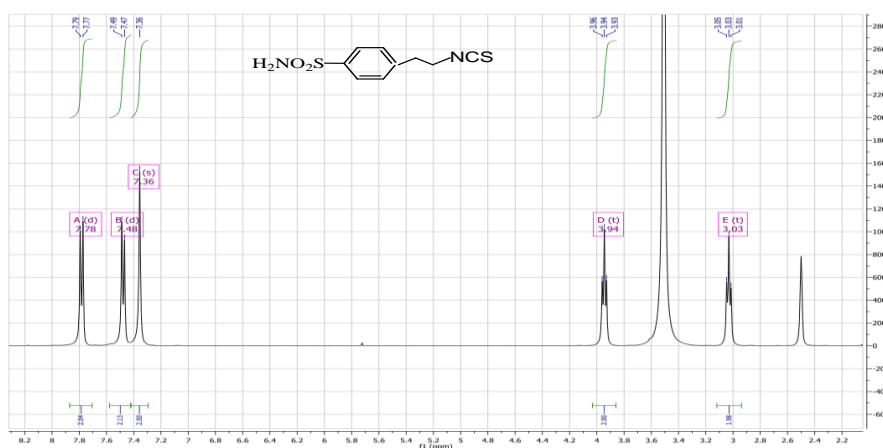


Figure 41 : Spectre RMN du proton du composé (**VIIb**) dans le DMSO-d₆.

II.2.5. Synthèse des conjugués thiouréido-arylsulfonamide- β - cyclodextrines

La présente partie a pour objet la préparation de nouveaux conjugués: les thiouréido-arylsulfonamide β -cyclodextrines à visé thérapeutique.

A notre connaissance, ce travail constitue le premier exemple de vectorisation des sulfonamides par les cyclodextrines.

L'activité inhibitrice de ces nouveaux dérivés sera largement exaltée par la présence d'un espaceur pseudoamide de type thiourée (-NH-CS-NH) entre les arylsulfonamides et la β -cyclodextrine.

Les dérivés thiourées sont des composés industriels très répandus. La thiourée est principalement utilisée comme intermédiaire en synthèse organique.

En biologie, la thiourée peut limiter les dommages causés par les radicaux hydroxyles sur les protéines⁽¹³⁰⁾.

Les thiourées sont reconnues pour leur forte capacité à former des liaisons hydrogène, (Figure 42). Seules, elles peuvent former des solides dont l'organisation dépend des liaisons hydrogène intermoléculaires^{(131) (132)}.

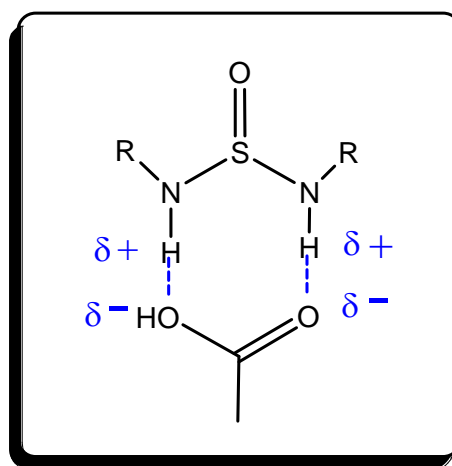


Figure 42 : Liaisons hydrogène induites par la fonction thiourée.

Par rapport à l'urée, plus répandue, la fonction thiourée présente certains avantages qui conduisent à la choisir :

⁽¹³⁰⁾ Zhu B-Z., Antholine W. E., Frei B. Thiourea protects against copper-induced oxidative damage by formation of a redox-inactive thiourea-copper complex, *Free radical Biology & Medicine*, (2002), 32, 12, 1333-1338.

⁽¹³¹⁾ Custelcean R., Gorbunova M. G., Bonnesen V. Steric control over hydrogen bonding in crystalline organic solids :a structural study of N,N-dialkylthioureas, *Chem. Eur. J.*, (2005) , 11, 1459-1466.

⁽¹³²⁾ Challa H., Bruice T. C. Incorporation of positively charged deoxynucleic S-methylthiourea linkages into oligodeoxyribonucleotides, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*,(2001)., 11, 2423-2427.

- La fonction thiourée est un meilleur donneur de liaisons hydrogène que l'urée car les protons portés par l'azote sont plus acides que ceux de l'urée (pK_A=21,1 vs 26,9 dans le DMSO).
- Les liaisons hydrogène intermoléculaires sont plus faibles que dans le cas de l'urée car le soufre est moins bon accepteur de liaisons hydrogène que l'oxygène,
- Les liaisons hydrogène formées sont plus flexibles du fait de la plus forte polarisation du soufre par rapport à l'oxygène⁽¹³³⁾.
- La thiourée a une meilleure capacité à chélater les anions que l'urée⁽¹³⁴⁾.

Ces fortes liaisons hydrogène ont suscité un grand intérêt dans le domaine de la reconnaissance moléculaire.

En effet, l'introduction du motif thiourée bioisostère du motif naturel uréé (NH₂-CO- NH₂) très répandue aussi en chimie des médicaments va renforcer la fixation des ces dérivés aux récepteurs et aux enzymes ciblées.

La formation de la fonction thiourée constitue une réaction clé pour toutes les thiourédo-arylsulfonamide –cyclodextrines que nous avons synthétisées.

De nombreuses méthodes de préparation des dérivés de thiourée sont décrites dans la littérature. Il est possible de coupler une amine avec du thiophosgène⁽¹³⁵⁾, du disulfure de carbone⁽¹³⁶⁾, ou du thiocyanate d'ammonium, pour former des thiourées symétriques.

Par ailleurs, la réaction d'une amine avec un isothiocyanate conduit à l'obtention de thiourées dissymétriques⁽¹³⁷⁾, Le mécanisme est décrit par le schéma suivant:

⁽¹³³⁾ Kato R., Nishizawa S., Hayashita T., Teramae N. A thiourea-based chromoionophore for selective binding and sensing of acetate, *Tet. Lett.*, (2001) , 42, 30, 5053-5056.

⁽¹³⁴⁾ Gomez D. E., Fabbrizzi L., Licchelli M., Monzani E. Urea vs. Thiourea in anion recognition, *Org. Biomol. Chem.*, (2005),3, 1495-1500.

⁽¹³⁵⁾ Herges R., Dikmans A., Jana U., Köhler F., Jones P. G., Dix I., Fricke T., König B. Design of a neutral macrocyclic ionophore : synthesis and binding properties for nitrate and bromide anions, *Eur. J. Org. Chem.*, (2002) , 17, 3004-3014

⁽¹³⁶⁾ Williams A., Ibrahim I. T. A new mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide EDC, *J. Am. Chem. Soc.*, (1981), 103, 7090-7095.

⁽¹³⁷⁾ Linton B. R., Carr A. C., Orner B. P., Hamilton A. D. A versatile one-pot synthesis of 1,3-substituted guanidines from carbamoyl isothiocyanates, *J. Org. Chem.*, (2000), 65, 1566-1568.

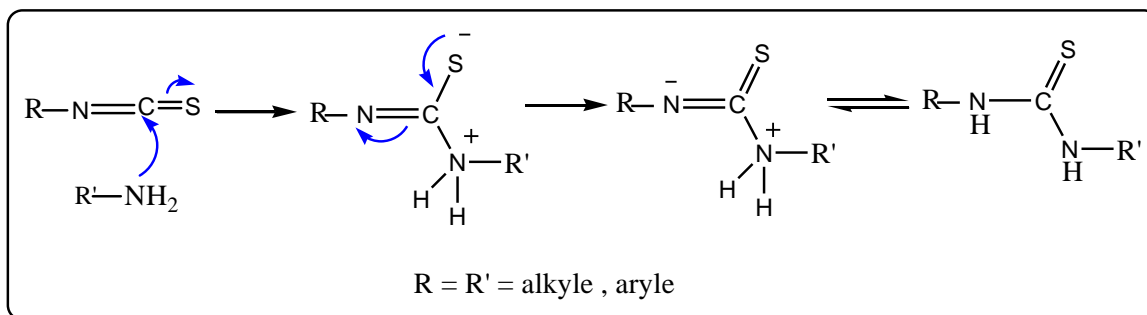


Schéma 22 : Mécanisme de formation de la fonction thiourée par la réaction d'une amine avec un isothiocyanate.

La synthèse d'une série de thiourédo-arylsulfonamide- β -cyclodextrines (**IX**) répondant à la formule générale citée précédemment (Figure 38), a été réalisée avec des rendements satisfaisants par couplage du chlorhydrate de la mono-6-amino- β -cyclodextrine (β -CDNH₂.HCl) avec l'arylsulfonamide isothiocyanate correspondant dans la pyridine et à température ambiante (Schéma 23).

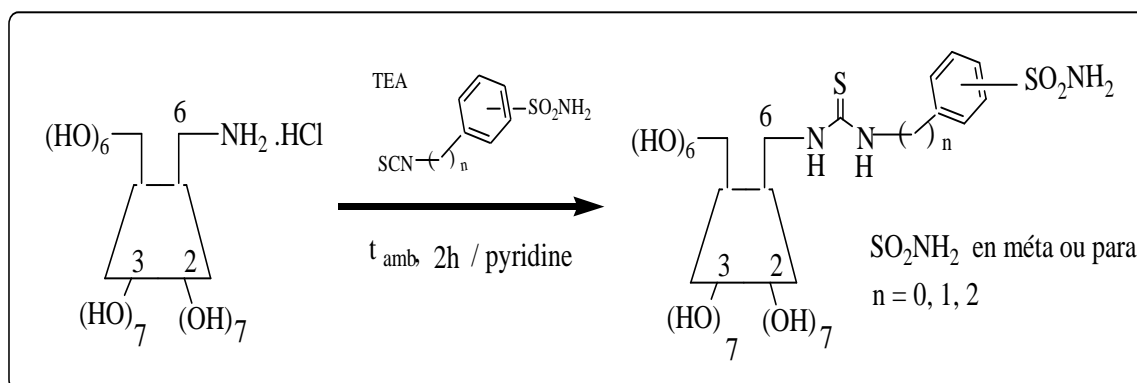


Schéma 23: Accès aux conjugués: thiourédo-arylsulfonamide- β -cyclodextrines (**VIII**).

Une simple purification sur colonne de gel de silice (dioxane/H₂O 80 / 20) donne des solides amorphes transparents rappelant l'état vitreux.

II.2.5.1. Caractéristiques des Conjugués : thiourédo-arylsulfonamides- β CD obtenus:

Les caractéristiques spectroscopiques des composés obtenus sont en accord avec les structures prévues pour ces composés.

En effet, les quatre produits obtenus ont été observés par **spectrométrie de masse** qui donne des pics moléculaires spécifiques pour chaque produit (Figure 43).

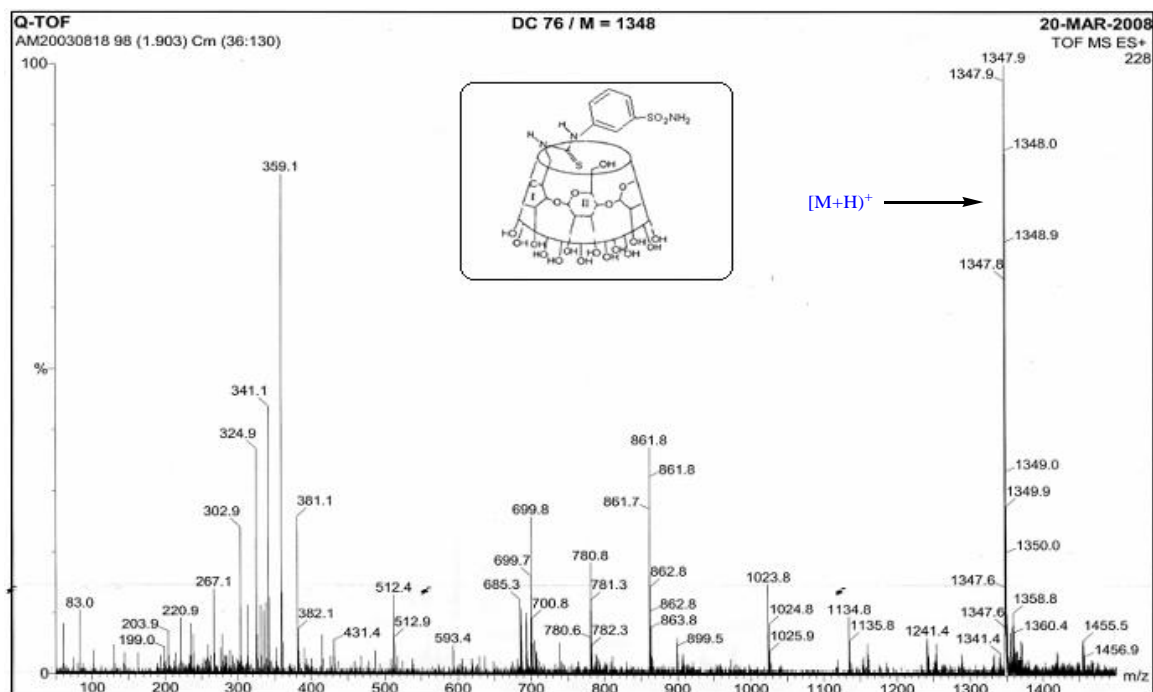


Figure 43 : Spectre de masse MS ESI⁺ du composé (IXb).

II.2.5.2. Spectrométrie RMN ¹³C

Sur le spectre ¹³C découplé du proton séquence APT (figure 44) enregistré à température ambiante dans le DMSO-d₆ (dans cette technique, les CH₃ et CH sont dirigés vers le bas tandis que les pics des CH₂ et les carbones quaternaires sont dirigés vers le haut), on constate tout d'abord que l'on observe uniquement six carbones alors que la β -Cyclodextrine en possède 42. En effet, la β -Cyclodextrine ayant une symétrie d'ordre sept, les unités glucosidiques sont magnétiquement équivalentes et nous n'observons que les déplacements chimiques des six carbones de cette unité mais avec une sensibilité sept fois supérieure à celle d'un spectre d'un composé non symétrique.

Apparemment, la monosubstitution n'a pas affecté cette symétrie des unités glucosidiques. On remarque aussi que les déplacements chimiques des carbones C1 et C₄ ont une valeur beaucoup plus élevée que ceux des autres carbones. Ceci est dû à l'électronégativité des atomes d'oxygène qui réduit fortement la densité électronique du carbone 1 acétalique, et dans une moindre mesure celle du carbone 4 portant la fonction éther, faisant apparaître les signaux de ces deux carbones à des champs plus faibles que ceux des autres noyaux.

D'autre part, il est possible de distinguer les carbones secondaires (C₆) des carbones tertiaires (C₂, C₃ et C₅) si les environnements de ces carbones sont comparables.

Ainsi le groupement méthylène présente un signal à champ plus fort que ceux des carbones C_2 , C_3 et C_5 . Ces derniers ayant des environnements très proches ont également des déplacements chimiques très voisins.

Mais le fait le plus remarquable sur ces spectres ^{13}C c'est l'apparition d'un signal entre 180 et 182 ppm caractéristique de la double liaison $C=S$ de la fonction thiourée ce qui est une confirmation de l'identité structurale des thiouréido-arylsulfonamide- β CDs obtenus.

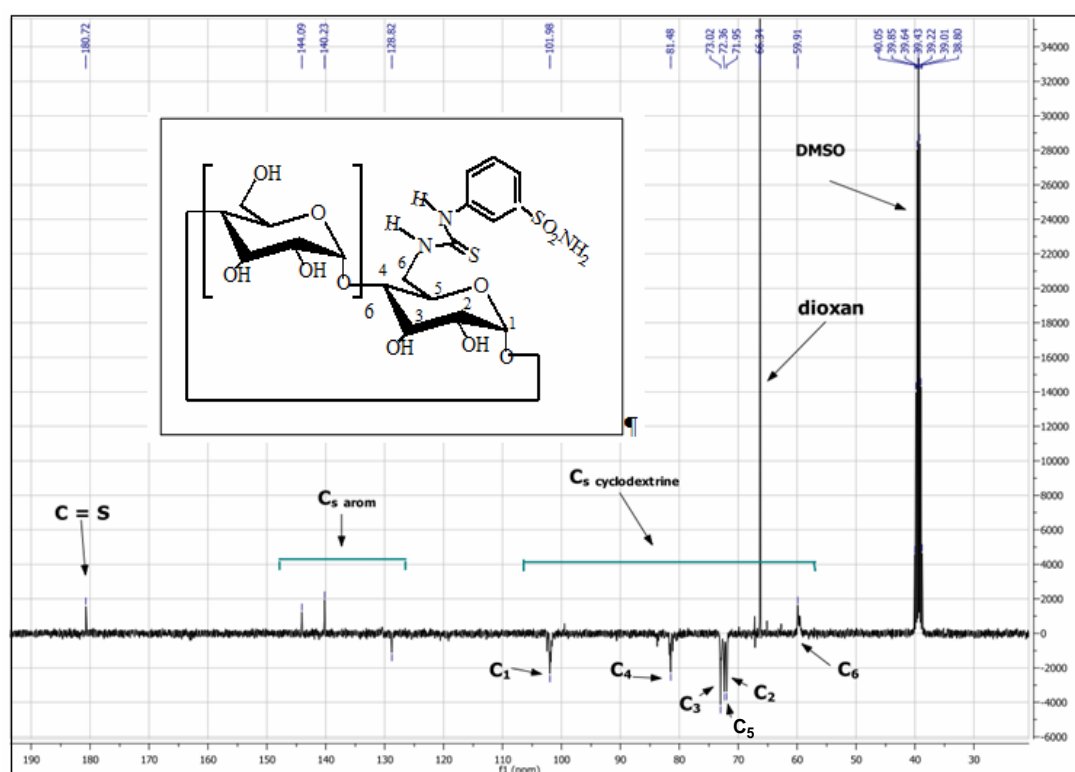


Figure 44 : Spectre RMN du ^{13}C séquence APT du composé (IXb) dans le DMSO-d₆.

II.2.5.3. Spectrométrie RMN 1H

En RMN du proton, nous ne sommes pas en mesure, avec les données dont nous disposons d'analyser avec exactitude tous les signaux apparaissant sur nos spectres des dérivés des cyclodextrines, car cela sort du cadre de notre thème, et nous nous limitons aux observations et constatations sur les protons les plus remarquables.

Dans le DMSO, les premiers signaux de protons remarquables ont été ceux au niveau de la plage des aromatiques et juste au voisinage apparaissent des signaux correspondant aux groupements NH et NH₂ des fonctions thiourée et sulfonamide respectivement (Figure 45).

Pour différencier ces signaux nous avons fait une comparaison entre les spectres protoniques dans le DMSO et l'eau lourde D_2O . (Figure 45 et Figure 46 respectivement).

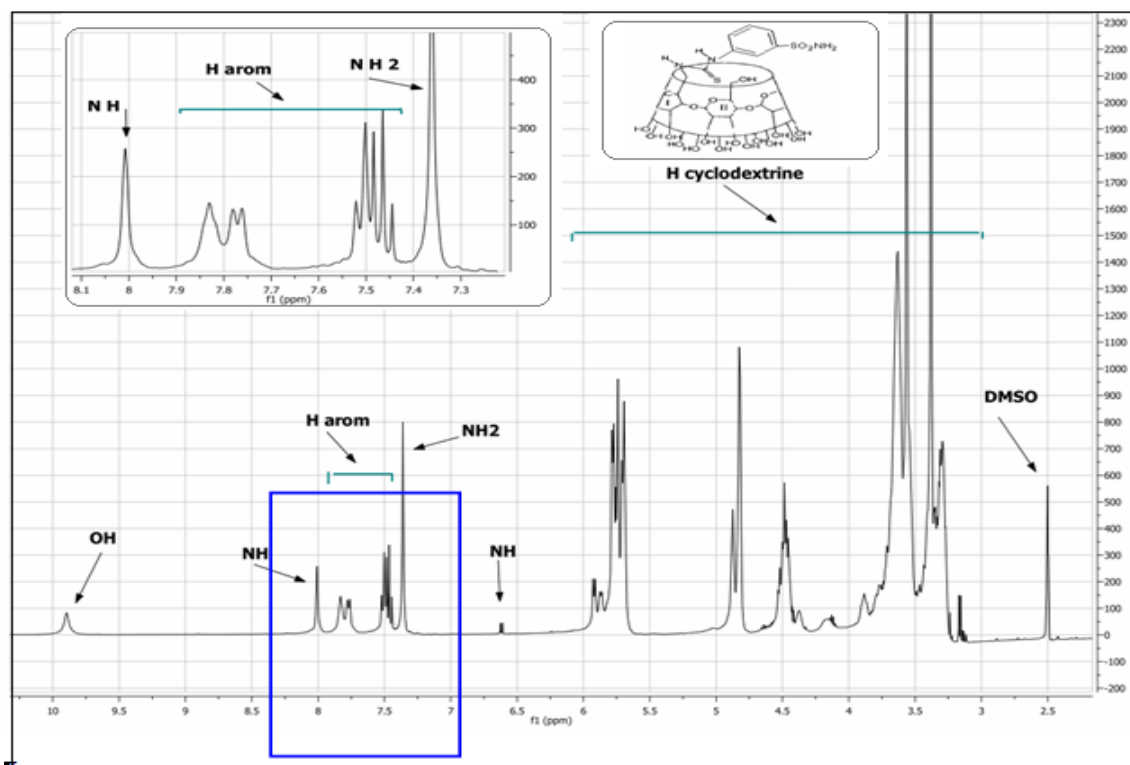


Figure 45 : Spectre RMN¹H du composé **(IXb)** dans le DMSO-d-6.

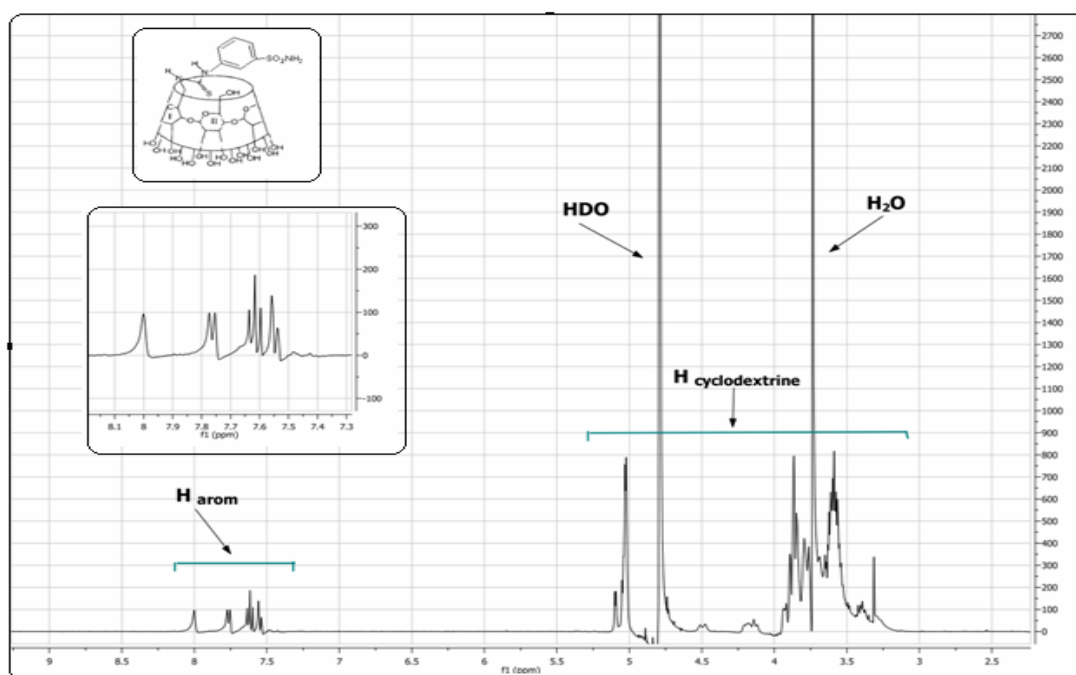


Figure 46 : Spectre RMN¹H du composé **(IXb)** dans le D_2O .

En effet, si on jette un regard sur la zone des champs faibles dans ces spectres, on constate que dans D_2O , le spectre simplifié met en évidence l'absence des signaux de tous les protons échangeables provenant des groupes NH , NH_2 et OH . (Figure 46). en conservant uniquement les signaux des protons aromatiques.

Le spectre de la partie cyclodextrine obtenu dans le DMSO présente une allure générale assez comparable à celle montrée précédemment pour les dérivés de la β -cyclodextrine présentés dans le chapitre1 de cette partie.

Ces spectres (Figure 45 et Figure 46) révèlent la présence de nombreux couplages scalaires.

D'habitude dans la β -cyclodextrines non substituée, le proton anomérique H_1 porté par le carbone acétalique apparaît à champ faible pour les mêmes raisons que celles énoncées précédemment pour le carbone. Il ne possède qu'un seul proton vicinal (H_2) et se présente donc sous la forme d'un doublet. Les protons anomériques étant les seuls isolés sur les spectres et serviront de point de départ pour toutes les attributions.

Le proton H_2 possède au contraire deux voisins vicinaux (H_1 et H_3) produisant pour des raisons géométriques des constantes de couplage très différentes et apparaît donc sous la forme d'un quadruplet. Les protons H_3 et H_4 possèdent également deux voisins vicinaux mais leurs constantes de couplage respectives étant très proches, ils apparaissent comme des triplets.

Dans ce cas le système est dit au premier ordre et permet de mesurer les couplages directement sans correction.

Pour les protons 5, 6_a et 6_b la situation est plus complexe. Les déplacements chimiques sont très proches et ces protons présentent de nombreux couplages (gémés et vicinaux).

Ces systèmes sont dits fortement couplés ou au second ordre. Ces systèmes restent au second ordre même à champ très élevé et ne sont donc pas directement analysable.

La mise en évidence et la caractérisation complète de tous les signaux appartenant aux cyclodextrines substituées, semblent une situation encore beaucoup plus complexe, Cependant, la **RMN-2D**, comme la technique de base d'un **COSY** donnant des spectres de corrélation 1H - 1H et 1H - ^{13}C vient pour contribuer efficacement à l'analyse de ces spectres. Le spectre **cosy** 1H - ^{13}C suivant : (Figure 47) en est le bon exemple, dans lequel les signaux des protons sont déduits sur la base de leur corrélations avec les carbones, ces

derniers sont facilement définis grâce à leur RMN¹³C.

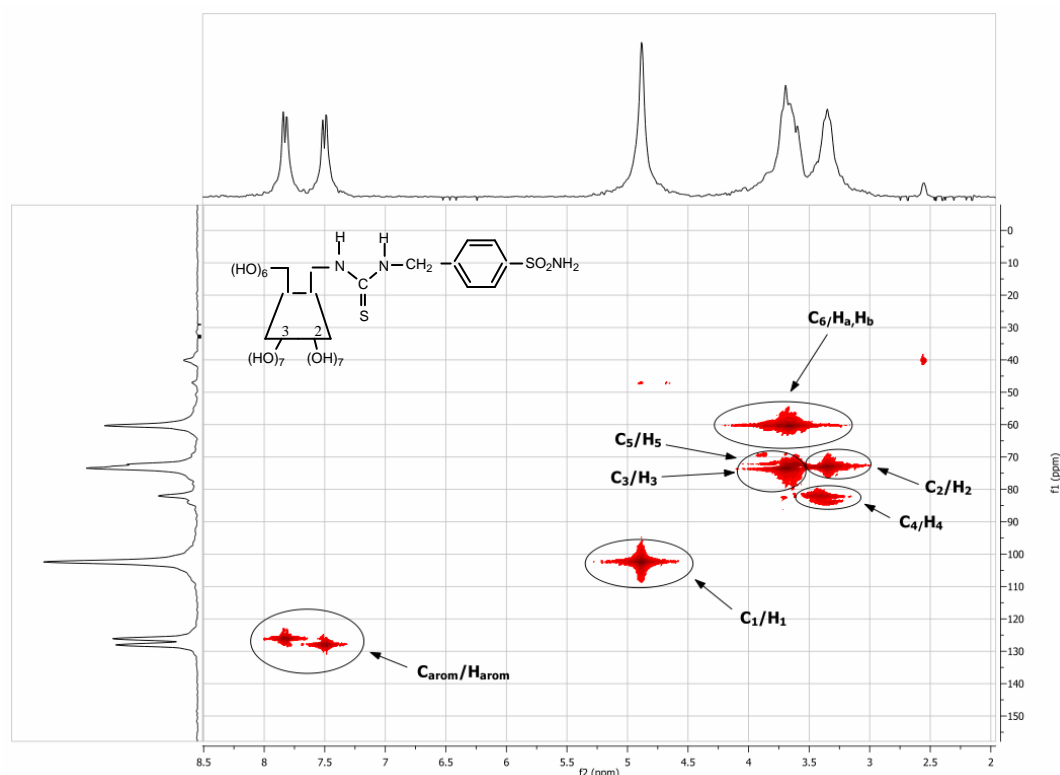


Figure 47: Spectre cosy ^1H - ^{13}C du composé (**IXc**) dans le DMSO-d-6.

Les signaux des protons des thiouréido-arylsulfonamides- β CD sont très différents dans les deux solvants D_2O et DMSO-d6 (figure 45 et 46), ce qui pourrait être expliqué en partie par les courants de cycle induits par le groupe phényle si ce dernier est inclus dans la cavité de la cyclodextrine.

On peut donc dès maintenant retenir le principe d'une éventuelle **inclusion** de la chaîne latérale de l'arylsulfonamide dans la cavité de la β -CD.

Cette constatation est mise en évidence par les spectres NOESY de ces composés qui donnent une corrélation entre les protons de la partie arylsulfonamide avec les protons H_3 et H_5 qui tapissent la cavité hydrophobe de la β -CD.

Particulièrement, on peut remarquer que seules les molécules (**IXb**) (Voir Annexe) et (**IXc**) (Figures 48) possédant des topologies générales bien adéquates et dissoutes dans le DMSO-d6, semblent être en faveur de cette inclusion. Car, le spectre du même composé précédent (**IXc**) par exemple, mais enregistré dans le D_2O (Figure 49), ne montre aucune corrélation entre les protons de la partie arylsulfonamide et ceux de la partie cyclodextrine dans la molécule, ce qui explique que l'inclusion n'a pas eu lieu dans le solvant D_2O .

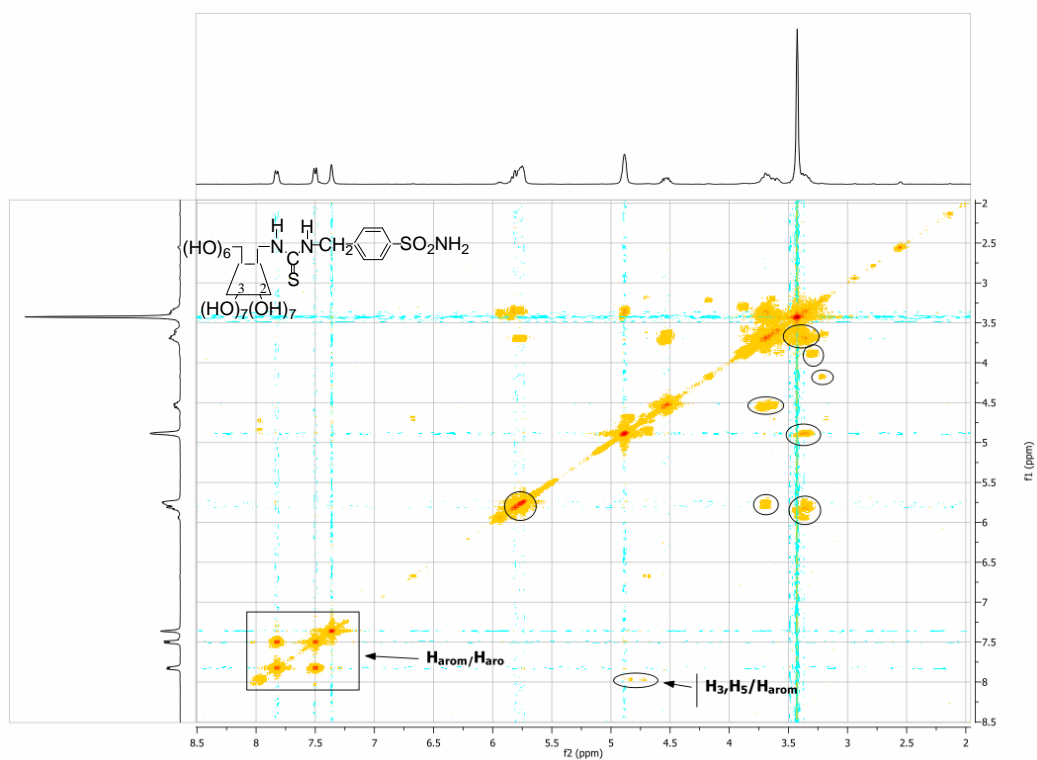


Figure 48: Spectre NOESY du composé (IXc) dans le DMSO-d-6.

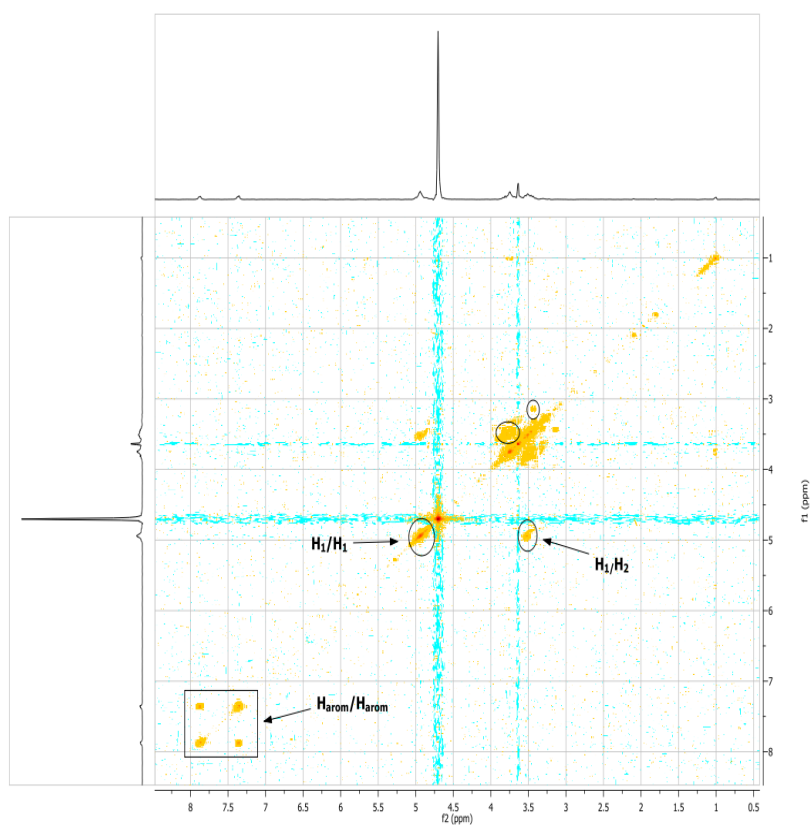


Figure 49: Spectre NOESY du composé (IXc) dans le D₂O.

Si la substitution affecte la symétrie des unités glucosidiques, ces unités glucosidiques deviennent inéquivalentes, chaque unité glucosidique doit être identifiée et analysée en détail. Il sera ensuite nécessaire de réaliser le "séquençage" de ces unités et de mettre en évidence de façon univoque celle portant la substitution. L'accomplissement de cette tâche difficile fera bien entendu appel à des expériences bidimensionnelles complémentaires.

Etant donnée la complexité des spectres de ces dérivés cyclodextrines et en particulier la faible dispersion spectrale; plusieurs techniques sont utilisées : COSY-DQF (double quantum filtration correlation spectroscopy), NOESY (nuclear *Overhauser* spectroscopy), ROESY (rotating-frame *Overhauser* spectroscopy), et TOCSY (total-correlation spectroscopy).

Tableau 3 : Rendements et certaines caractéristiques physico-chimiques des conjugués thiouréido-arylsulfonamide- β -cyclodextrines préparés.

Réf	MS ESI ⁺ ou / et ESI ⁻	Rf*	Tf (°C)	Rdt%
IXa	1348.9 1347.6	0.71	181	75
IXb	1348.9 1347.7	0.77	192	73
IXc	1362.9 1361.0	0.71	206	82
IXd	1376.9	0.65	209	86

* Eluant utilisé : dioxane /H₂O (8 : 2).

II.2.6. Conclusions

Le développement d'inhibiteurs plus sélectifs pour le ciblage des anhydrases carboniques et plus particulièrement l'isoforme CAIX située sur la membrane cellulaire et qui est impliquée dans plusieurs types de cancer, constitue actuellement un grand challenge pour les chercheurs.

Une approche **sucre** très prometteuse qui s'est développée récemment dans le but de cibler sélectivement les différentes isoformes de l'CA a été mise à profit pour greffer une série d'arylsulfonamides sur la β -Cyclodextrine via une fonction thiourée bioisostère des sulfamides utilisés dans le chapitre précédent.

En effet, l'addition nucléophile de la mono-6-amino- β -cyclodextrine sur quatre arylsulfonamides isothiocyanates préparés préalablement, nous a fournis, de manière reproductible quatre conjugués : thiouréido-arylsulfonamide- β -cyclodextrines monosubstitués avec des rendements satisfaisants.

La réaction de couplage a été réalisée dans la pyridine à température ambiante et dans un temps adéquat.

De tels dérivés incorporant un motif thiourée et associant un vecteur naturel saccharidique amphiphile, sont alors susceptibles de s'insérer dans des systèmes lipidiques tels que des bicouches de liposomes ou encore de s'auto-organiser en agrégats dans des zones bien ciblées telles que des tumeurs malignes ; comme le font les nanoparticules que nous présenterons dans le chapitre qui suit et qui ont éventuellement l'avantage d'élargir l'étendu des possibilités de vectorisation des inhibiteurs étudiés.

CHAPITRE 3

Greffage des Arylsulfonamides sur des Nanoparticules d'or

II.3.1. Introduction

La mise au point de médicaments dirigés spécifiquement vers des isoenzymes bien définies aboutit fréquemment à des médicaments qui agissent uniquement sur certains organes ou sur certaines zones très précises de notre organisme.

Dans une chimie pharmaceutique qui se veut moderne, la spécificité des cibles ainsi que la sélectivité sont des critères de recherche incontournables. Plus un médicament sera sélectif vis-à-vis de sa cible, moins il y aura de chances de le voir interagir avec des cibles différentes, c'est-à-dire d'assister à des effets indésirables.

Au cours des deux dernières décennies, des progrès considérables ont été faits dans la compréhension des mécanismes génétiques et moléculaires responsables du développement des cancers. Cependant, le bénéfice des études réalisées demeure décevant pour les patients. En particulier pour certains cancers qui résistent aux traitements traditionnels.

Récemment, une nouvelle application des inhibiteurs de CA a été apparue. Il s'agit de leur utilisation potentielle dans le management (diagnostique et traitement) des tumeurs hypoxiques.

II.3.2. Développement d'inhibiteurs de CAIX imperméables aux membranes cellulaires

Dans ce qui suit, nous nous concentrerons sur les derniers développements dans la conception et la synthèse des inhibiteurs sélectifs de CAIX touchant à notre thème de recherche.

Il est possible de concevoir des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (CAIs) imperméables à la membrane- c'est à dire des inhibiteurs spécifiques dirigés uniquement vers les CAs extracellulaires telle que le CAIX. Cette possibilité a complètement été explorée en concevant en particulier des sulfonamides porteurs de charges positives ou sous forme de complexes métalliques.

L'inhibition du CAIX a été étudiée avec une série de composés positivement chargés issus de sulfanilamide (Figure 50), d'homosulfanilamide et de 4-aminoethylbenzenesulfonamide tous dérivés de la pyridine⁽¹³⁸⁾.

⁽¹³⁸⁾ Pastorekova S, Casini A, Scozzafava A, Vullo D, Pastorek J, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: The first selective, membrane-impermeant inhibitors targeting the tumor-associated isozyme IX. *Bioorg Med Chem Lett* (2004); 14:869-873.

La majorité de ces composés a montré une activité inhibitrice d'un intérêt considérable contre le CAIX ((KI dans la gamme de 6-54 nM) avec une nette sélectivité par rapport aux isozymes CAI, CAII et CAIV omniprésents dans l'organisme, ce qui souligne l'importance de cette stratégie pour le développement d'agents anticancéreux plus efficaces et plus sélectifs.

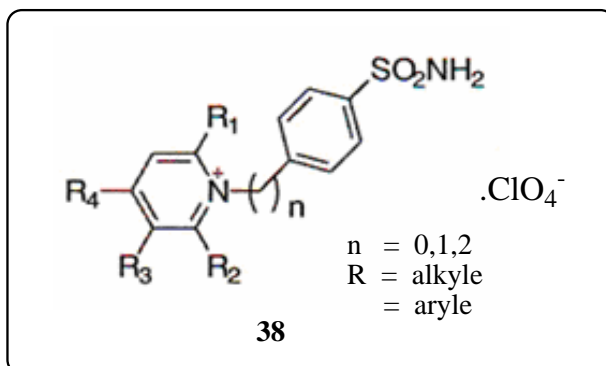


Figure 50 : Structure générale d'une classe de sulfanilamides positivement chargés dérivés de la pyridine ,utilisée pour le ciblage de l'hCAIX.

D'autre part, Il a été montré récemment que les bases de Schiff dérivés des sulfonamides⁽¹³⁹⁾ se sont révélés posséder une activité inhibitrice efficaces contre plusieurs isozymes de l'CA, telles que l'CAI, II et IV. Ces composés et en particulier ceux appartenant aux éries aromatiques (Figure 51) et leurs complexes métalliques (Figure 52) se sont montrés comme inhibiteurs contre le CAIX associées aux tumeurs, avec des KIs dans la gamme de 6.3-48 nM, faisant ainsi de ces composés des chefs de fil très intéressants pour le développement ultérieur d'autres inhibiteurs plus sélectifs pour le ciblage du CAIX.

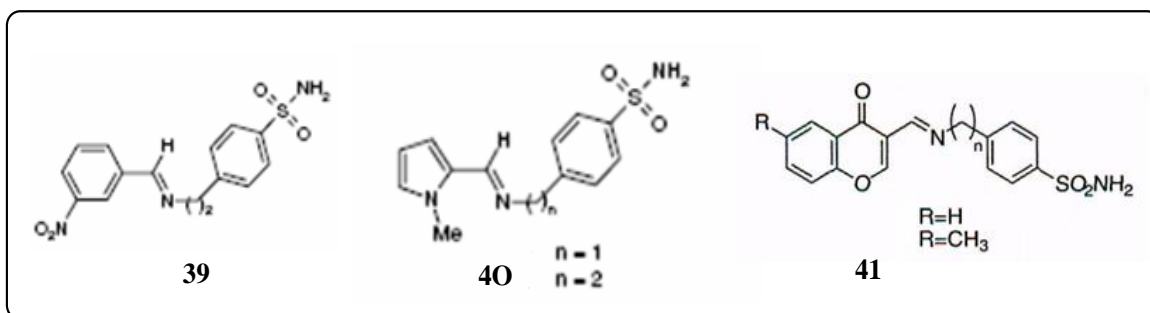


Figure 51 : Les bases de Schiff dérivés des sulfonamides sont également des inhibiteurs efficaces de l'CA.

⁽¹³⁹⁾ Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. *Expert Opin Ther Patents* (2006);16:1627-1664.

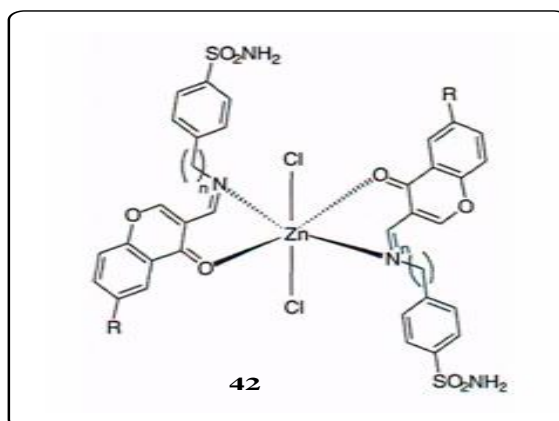


Figure 52 : Formation d'un complexe de zinc avec les bases de Schiff.

Plus récemment, la conception d'une famille d'inhibiteurs sélectifs contre le CAIX contenant l'élément bore a été proposée par l'équipe du Dr J-Y. Winum⁽¹⁴⁰⁾. L'accumulation de ces inhibiteurs (Figure 53) dans des tumeurs peut mener à la destruction sélective de la partie atteinte, sans toucher aux tissus sains (thérapie par capture boroneutronique : BNCT).

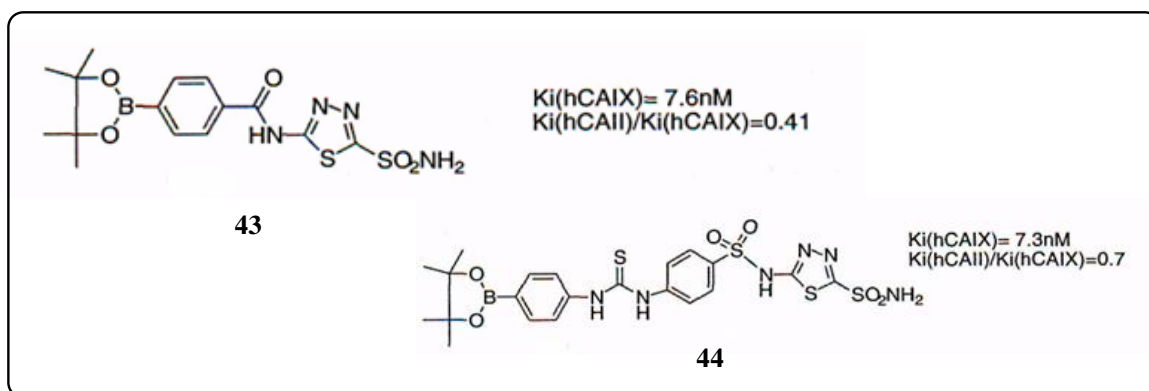


Figure 53 : Inhibiteurs de l'CA incorporant l'élément Bore, peuvent être des candidats potentiels dans la thérapie par capture boroneutronique :BNCT).

⁽¹⁴⁰⁾ Winum JY, Cecchi A, Montero JL, Innocenti A, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with boron-containing sulfonamides, sulfamides, and sulfamates: Toward agents for boron neutron capture therapy of hypoxic tumors. *Bioorg Med Chem Lett* (2005);15:3302-3306.

II.3.3. Recherche d'une Nouvelle Approche : L'approche Nano pour le Design d'Inhibiteurs plus sélectifs.

Il ressort de cet aperçu sur le développement des inhibiteurs de l'CAIX en série sulfonamides que d'importants progrès ont été déjà réalisés, cependant, l'efficacité de ces inhibiteurs déjà mis au point peut-être limitée soit par un manque de sélectivité entre cellules normales et cellules cancéreuses soit par leur toxicité due à une éventuelle inhibitions d'autres isoenzymes.

Le développement d'inhibiteurs plus sélectifs pour le ciblage des anhydrases carboniques CAIX située sur la membrane cellulaire et qui est impliquée dans plusieurs types de cancer, constitue actuellement un grand déficit clinique.

Les recherches actuelles s'orientent vers la découverte de nouvelles molécules mais aussi vers l'amélioration de l'efficacité des molécules existantes.

De nouvelles technologies en plein essor, comme les nanobiotechnologies, offrent actuellement des perspectives prometteuses dans le domaine thérapeutique.

En effet, depuis les 20 dernières années, la combinaison de nanoparticules inorganiques avec des biomolécules du même ordre de grandeur a suscité un intérêt indéniable pour la recherche. Des études ont déjà permis la réalisation de médicaments encapsulant le principe actif dans des nanosphères, ou le conjuguant à des macromolécules du type dendrimères.

Ce nouveau type de médicaments peut permettre une libération contrôlée du principe actif augmentant ainsi son efficacité et permettant de réduire la dose initiale. Le ciblage spécifique peut donc réduire la toxicité et l'encapsulation ou la conjugaison à des nanoparticules peut protéger également la molécule active du métabolisme et de l'évacuation générale (macrophages du foie). A ces fonctions de transport, la nanoparticule peut ajouter aussi une fonction physique spécifique permettant l'application d'un signal externe tel que les ultrasons la lumière proche infra-rouge ou les radio- fréquences.

Les nanoparticules d'or (AuNPs) sont historiquement les nanoparticules qui ont lancé les nanotechnologies. L'intérêt pour les nanoparticules d'or reste encore vif aujourd'hui et représente une grande partie des travaux rapportés notamment dans le domaine des applications biologiques.

II.3.3.1. Elaboration de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des arylsulfonamides pour le ciblage de l'CA.

Le deuxième volet de notre travail dans cette thèse porte essentiellement sur la synthèse d'inhibiteurs de l'anhydrase carbonique avec une nouvelle approche: L'approche *nano*, cette dernière requière d'excellentes compétences en médecine.

Dans ce domaine, les nanoparticules d'or représentent en effet des objets parfaitement adaptés non seulement par leur non-toxicité mais aussi par leur gamme de taille qui leur confère une bonne biocompatibilité et biodisponibilité. Leurs possibilités d'applications sont non seulement liées aux propriétés intrinsèques de leur coeur métallique mais aussi à leurs énormes capacités de fonctionnalisation.

Les molécules soufrées, en raison de leur forte affinité pour l'or, permettent des possibilités de fonctionnalisation quasi- illimitées des nanoparticules d'or. Ce constat a d'ores et déjà permis l'élaboration d'un grand nombre de nanoparticules fonctionnalisées pour des domaines d'application aussi diverse et variée que la catalyse, l'optique non linéaire, l'électrochimie ou la biologie.

Pour notre cas, la solution la plus simple pour le greffage des arylsulfonamides sur la surface d'une nanoparticule d'or passe donc par l'élaboration d'une série de dérivés (ligands) disulfurés obtenue par le couplage de ces arylsulfonamides avec l'acide thioctique aussi appelé acide **lipoïque**. (Figure 54). Il est à noter que d'autres alternatives sont envisageables mais semblent bien moins séduisantes.

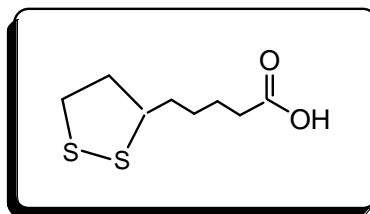


Figure 54 Structure générale de l'acide lipoïque.

Pourquoi l'acide lipoïque ?

Du point de vue chimique :

Cette molécule présente les caractéristiques uniques de posséder une fonction disulfure cyclique à une extrémité de la molécule. Elle présente aussi à l'autre extrémité, une fonction acide qui est une fonction nécessaire pour former des liaisons peptidiques,

L'acide lipoïque a déjà été étudié dans l'élaboration de nanoparticules d'or qui se sont avérées plus stables mécaniquement et thermiquement ⁽¹⁴¹⁾ que les nanoparticules formées d'alcanethiols à longue chaîne. Cette stabilité est expliquée par la coopérativité entre les deux soufres pour renforcer la liaison avec la surface métallique. De plus, le fait de posséder déjà un pont disulfure dans la molécule au départ empêche la dimérisation que l'on observe en solution avec des thiols simples.

Du point de vue biologique:

Outre ses propriétés chimiques particulières, l'acide lipoïque en tant que structure biologique, joue plusieurs rôles physiologiques ⁽¹⁴²⁾.

La validité de notre travail en choisissant l'acide lipoïque comme motif de couplage intéressant, se trouve en effet renforcée par la littérature ^{(143) (144) (145)} décrivant les dérivés de l'acide lipoïque comme étant des dérivés pouvant produire des effets bénéfiques ou favorables dans le traitement de certaines pathologies notamment :

- Les troubles cardiovasculaires et cérébrovasculaires
- les maladies prolifératives et inflammatoires
- Les maladies auto-immunes et virales.
- Le cancer.
- les maladies neurologiques associées à des intoxications
- toutes les pathologies caractérisées par une production ou un dysfonctionnement de monoxyde d'azote (NO).

A cet effet, **l'acide lipoïque est** parfaitement compatible avec notre stratégie de synthèse qui nous a permis d'obtenir une série de ligands (Figure 55) comportant une fonction disulfure terminale avec laquelle ces ligands seraient greffés sur des nanoparticules d'or.

⁽¹⁴¹⁾ Dixit V., Van den Bossche., Sherman D. M., Thompson D. H., Andres R. P., Synthesis and Grafting of Thioctic Acid-PEG-Folate Conjugates onto Au Nanoparticles for Selective Targeting of Folate Receptor-Positive Tumor Cells, *Bioconjugate Chem.* (2006), 17, 603-609

⁽¹⁴²⁾ (Fuchs J., Packer L.; Zimmer G. Eds:), Marcel Dekker Inc., *Lipoic Acid in Health and Disease* New York, (1997).

⁽¹⁴³⁾ Marangon K, Devaraj S, Tirosh O, et autres. Comparaison de l'effet de la supplémentation d'acide et d'alpha-tocophérol d'alpha-lipoïque sur des mesures d'effort oxydant. *Biol libre Med de rad.* (1999) ; 27:1114 - 1121.

⁽¹⁴⁴⁾ Kerwin et al., Nitric oxide : a new paradigm for second messengers, *J. Med. Chem.* (1995), 38 , 4343-4362,

⁽¹⁴⁵⁾ Packer et al., Alpha-lipoic acid as biological antioxidant, *Free Radical Biology & Medicine*, (1995), 19 , 227-250,

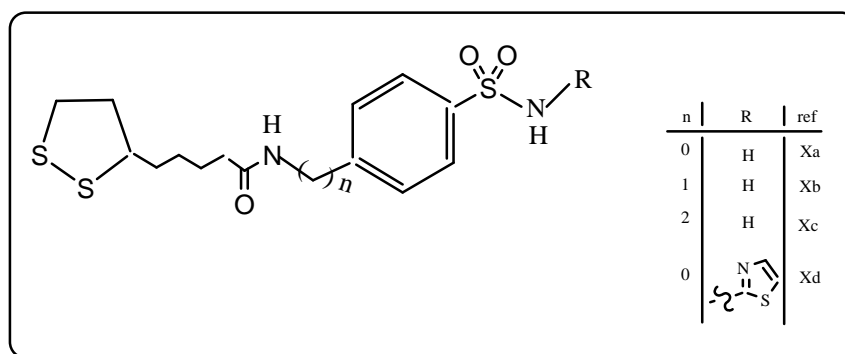


Figure 55 : Structure générale des conjugués : arylsulfonamides-acide lipoïque obtenus.

Les produits que nous avons préparés en associant l'acide lipoïque avec les arylsulfonamide en faisant intervenir des liaisons peptidiques biodégradables seront de toute évidence de bons candidats susceptibles d'induire une activité biologique intense.

A notre connaissance, aucune référence à la synthèse de ces composés n'a été relevée dans la littérature, et ces composés apparaissent donc comme une classe nouvelle qui peuvent présenter des propriétés inédites.

II.3.3.2. Synthèse des conjugués arylsulfonamides -acide lipoïque.

Les conjugués: arylsulfonamides- acide lipoïque de formule générale évoquée précédemment (Figure 55) sont obtenus avec un bon rendement par le couplage d'une série d'arylsulfonamides inhibiteurs potentiels de l'anhydrase carbonique avec l'acide lipoïque dans le DMA (diméthylacétamide) en présence de l'EDCI (1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl) carbodiimide) et du DMAP (4-diméthylamoni pyridine) à température ambiante selon le schéma réactionnel suivant :

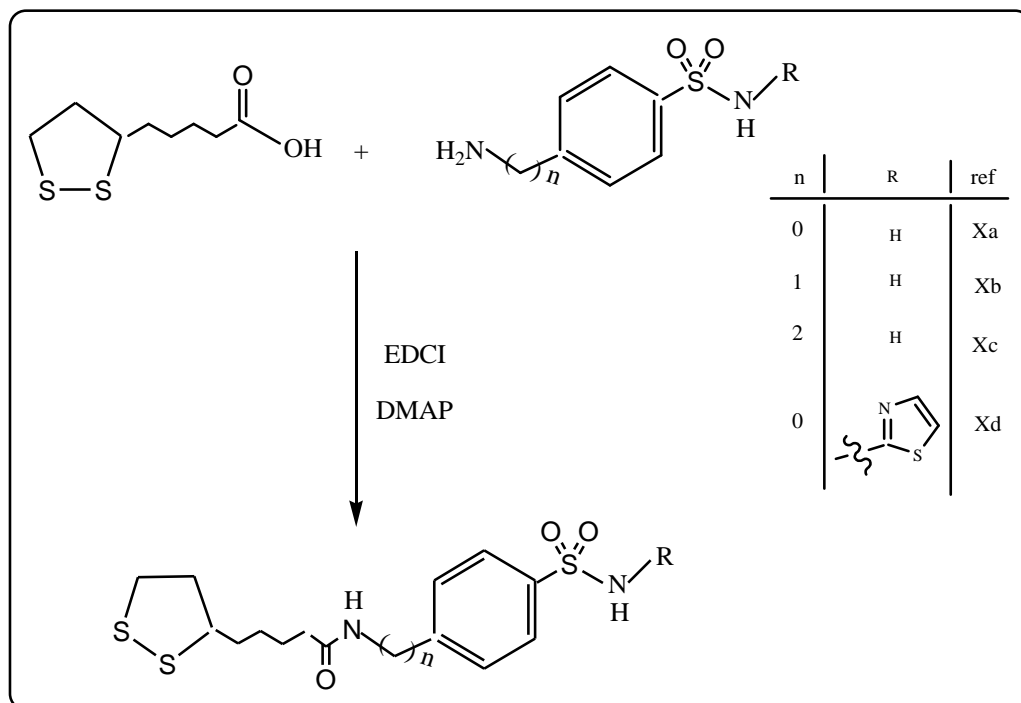


Schéma 24 : Accès aux conjugués:arylsulfonamides -acide lipéique.

L'emploi des carbodiimides tels que le DCC (1,3-dicyclohexylcarbodiimide) ou l'EDCI (1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide) pour la formation d'une fonction amide est un moyen éprouvé et très connu en synthèse peptidique⁽¹⁴⁶⁾ ⁽¹⁴⁷⁾; Cependant ce procédé s'accompagne souvent de réactions secondaires qui peuvent compliquer l'isolement des produits désirés tout en diminuant considérablement leurs rendements.

Le mécanisme général connu faisant intervenir ces réactions est présenté dans le schéma suivant :

⁽¹⁴⁶⁾ Nakajima, N; Ikada, Y; *Bioconjug Chem.*(1995), 6(1), 123-130

⁽¹⁴⁷⁾ Skotnicki, S; *Tetrahedron Lett.* (1994), 35(2), 197-200.

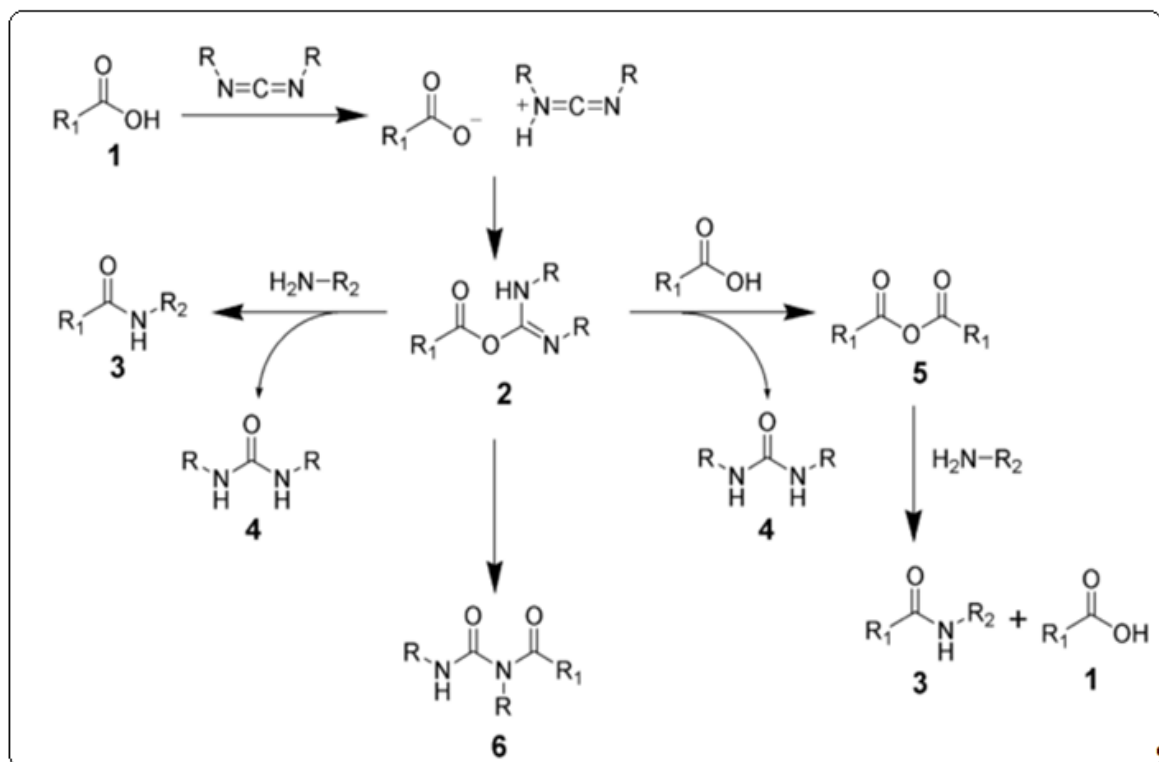


Schéma 25 : Mécanisme du couplage peptidique faisant intervenir des réactions parasites.

En effet, l'acide **1** réagit avec le carbodiimide pour conduire au produit clé: l'O-acylisourée **2** considéré comme un ester carboxylique possédant un groupement activé facilement partant ; ensuite, l'O-acylisourée obtenu réagit avec les amines pour donner l'amide désiré **3** et l'urée **4**. Cependant, le composé intermédiaire O-acylisourée peut réagir également avec un acide carboxylique additionnel **1** pour produire un anhydride d'acide **5** lequel peu réagit ultérieurement avec une amine pour donner l'amide désiré **3**. La réaction qui implique le réarrangement de l'O-acylisourée **2** au N-acylurée **6** est la réaction indésirable principale.

L'optimisation de cette réaction par la mise au point de nouvelles conditions expérimentales qui consiste à utiliser l'EDCI comme agent déshydratant en présence du DMAP en tant que catalyseur dans le DMA, nous a permis d'accéder aux produits désirés avec des rendements satisfaisants. Et dans ce cas, le mécanisme réactionnel probable est le suivant :

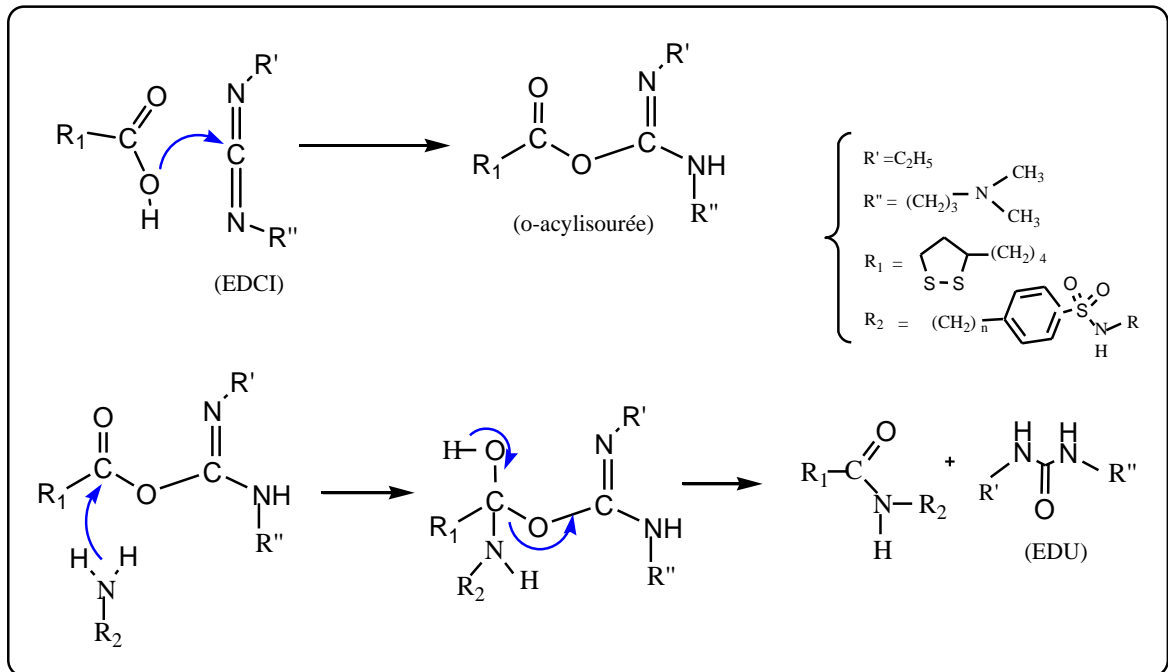


Schéma 26 : Mécanisme du couplage des arylsulfonamides avec l'acide lipoiïque en présence de la triade : EDCI, DMA et DMAP.

L'attaque nucléophile de l'acide lipoiïque sur l'EDCI conduit à une O-acylisourée intermédiaire. L'attaque de l'amine primaire sur le carbonyle activé de ce dernier suivi d'un réarrangement conduit à la formation de la liaison peptidique et à la libération du produit N, N'-éthyl-N,N'-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)uréé (EDU).

II.3.3.3. Caractérisations des ligands obtenus.

Les caractéristiques spectroscopiques des composés obtenus sont en accord avec les structures prévues pour ces composés.

En effet, la série des quatre ligands obtenus a été observée par spectrométrie de masse qui donne des pics moléculaires parfaitement en accord avec les masses des structures proposées (Figure 56).

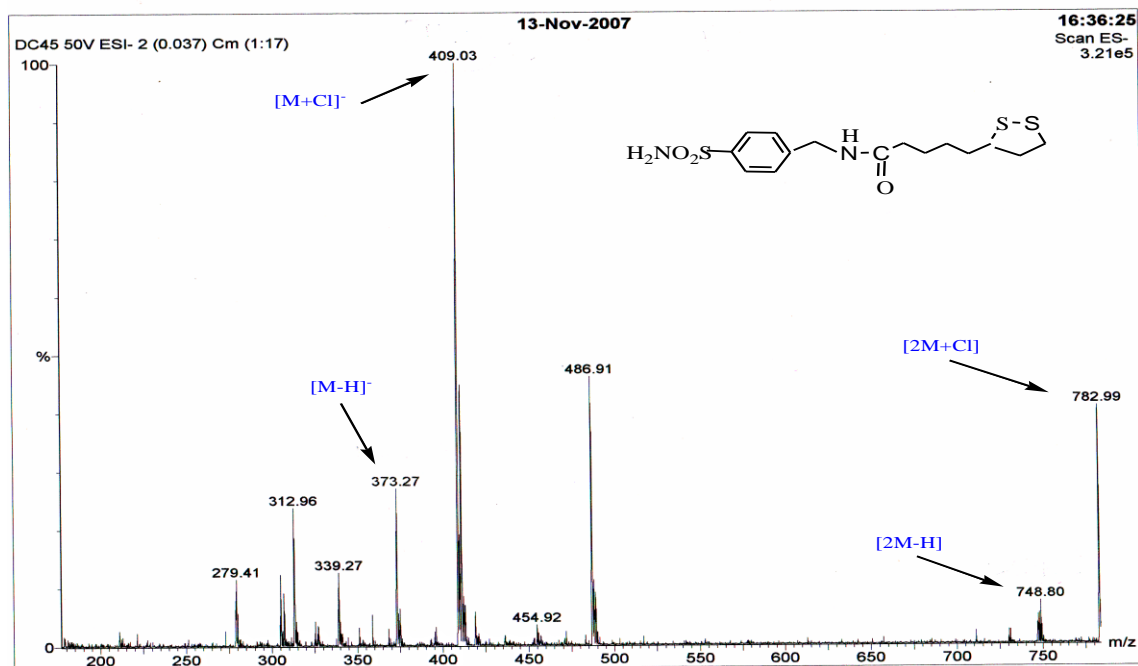


Figure 56 : Spectre de masse MS-ES⁻ du composé (Xb).

En RMN¹H obtenu dans le DMSO, les spectres de ces ligands présentent une allure générale assez comparable à celle montrée ci-dessous pour le ligand (Xb) (Figure 57).

On constate en particulier que le proton N-H de la liaison peptidique est mis en évidence par l'apparition d'un signal sous forme de triplet entre 7.35 et 10.23 ppm, par contre le signal intense allure de singulet apparaissant entre 7.24 et 7.32 ppm est attribué au protons NH₂ du groupement sulfonamide.

Les signaux des protons aromatiques sont observés entre 7.38 et 7.76 ppm.

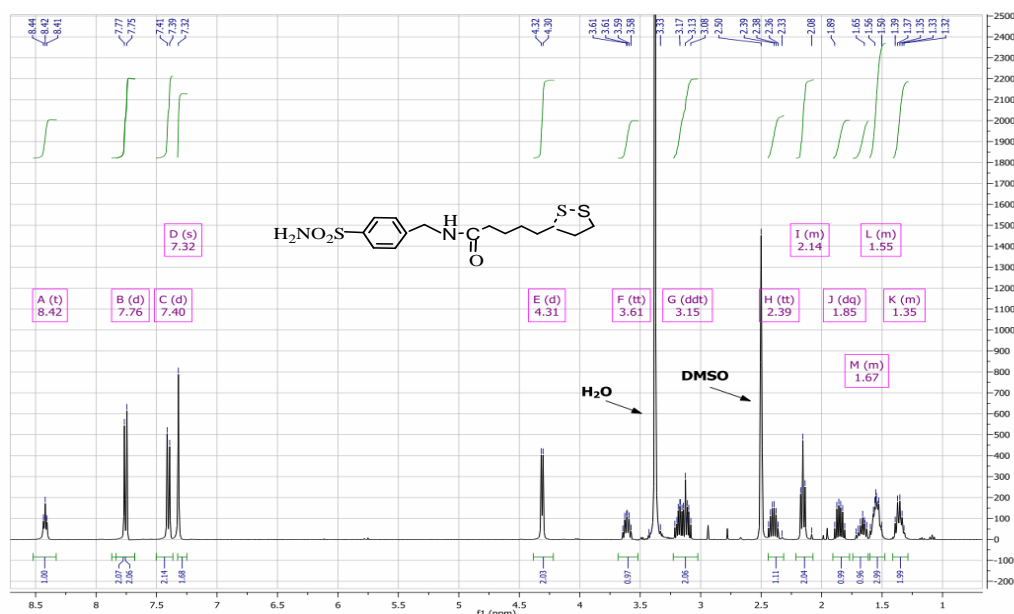


Figure 57 : Spectre RMN ^1H du composé (Xb) dans le DMSO- d_6 .

Sur les spectres RMN ^{13}C dans le DMSO- d_6 , enregistrés à température ambiante, On constate l'apparition d'un signal vers 172 ppm caractéristique du carbone C=O de la fonction amide, quatre signaux entre 143.83 et 118.47 ppm correspondant aux carbones aromatiques et trois signaux : l'un vers 56 ppm correspondant au carbone lié au groupement carbonyle et les deux autres entre 41.62 et 38.43 ppm, mal résolus sont attribués aux carbones liés au pont disulfure dans l'hétérocycle du résidu lipoïque. Les signaux situés vers la zone des champs plus forts correspondent aux carbones aliphatiques (Figure 58).

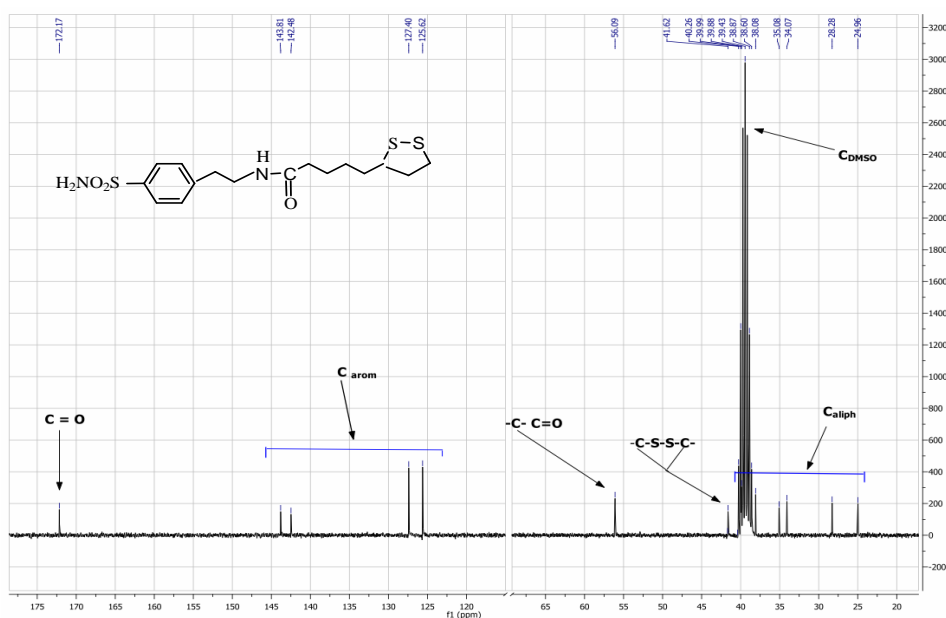


Figure 58 : Spectre RMN ^{13}C du composé (Xc) dans le DMSO- d_6 .

Le tableau 4 regroupe certaines caractéristiques physico-chimiques des conjugués obtenus.

Tableau 4 : Rendements et caractéristiques physico-chimiques des conjugués arylsulfonamides-acide lipoïque (X) préparés.

Réf	MS (ESI ⁺ et/ ou ESI)	Rf*	Tf (°C)	Rdt %
Xa	359,17 , 394,99	0,42	176	40
Xb	749,49,373,27,409,03	0,55	124	66
Xc	411,04,387,18, 423,06	0,88	131	68
Xd	466.54, 442.63	0.76	147	78

* Eluant utilisé : (CH₂Cl₂/MeOH, 7,5:1,5).

II.3.4. Greffage des conjugués : arylsulfonamides-acide lipoïque sur des nanoparticules d'or.

Le deuxième objectif de notre travail dans cette partie a été consacré au greffage des conjugués arylsulfonamides-acide lipoïque obtenus sur des nanoparticules d'or.

L'élaboration de nanoparticules d'or peut être réalisée par un large panel de méthodes qu'elles soient chimiques ou physiques.

Toutes les approches pour préparer les colloïdes d'or stables impliquent la réduction d'un sel d'or en présence d'un stabilisant.

Deux méthodes sont apparues clairement comme les plus intéressantes et les plus répandues, il s'agit de la méthode NaBH₄ (Brust) et la méthode citrate.

Ces deux méthodes (déjà développées dans le chapitre III de la partie étude bibliographique) mènent à des nanoparticules aux caractéristiques différentes, et selon les applications visées. Il nous a donc fallu choisir la méthode de Brust communément utilisée au laboratoire. La littérature présente un grand nombre de synthèses dérivées de cette méthode (Voir partie Etude Bibliographique), Par cette méthode, il est possible de synthétiser en une seule étape des nanoparticules d'or greffées par différents types de dérivés thiolés.

La synthèse se fait par réduction à l'aide de NaBH₄ en présence d'un excès de ligands se greffant directement sur la nanoparticule (voie directe).

Comme présenté sur le schéma 27, le greffage des conjugués:arylsulfonamides -acide lipoïque sur des nanoparticules d'or a été réalisé en une seule étape par l'action de ces ligands sur l'acide chloraurique en présence de NaBH_4 dans le DMSO et à température ambiante pour conduire à une série de clusters stables.

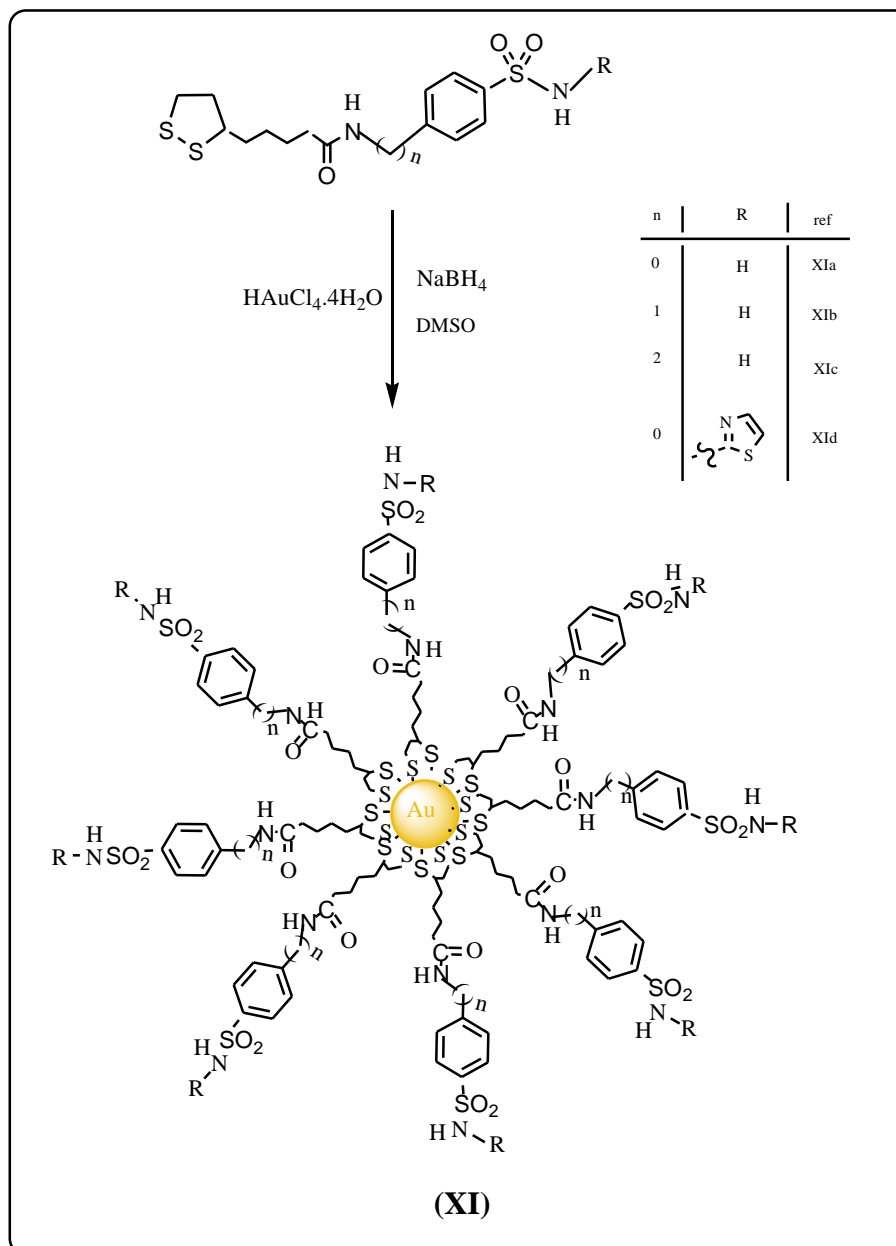


Schéma 27: Synthèse par voie NaBH_4 de nanoparticules d'or enrobées par des ligands inhibiteurs potentiels de l'CA.

Le greffage ne peut s'effectuer que par l'adsorption du pont disulfure sur l'or qui se solde par la coupure réductrice de la liaison S-S. Ce clivage aboutit enfin à la fixation du ligand par ses deux atomes de soufre sur la surface métallique d'or.

II.3.4.1. Optimisation des conditions opératoires.

Pour avoir des nanoparticules avec les caractéristiques souhaitées (stabilité, taille faible, dispersion), on a pu jouer sur plusieurs paramètres:

En effet, la taille moyenne pour la synthèse directe de ces nanoparticules peut être modifiée de diverses manières, en jouant tout d'abord :

- sur la quantité de réducteur : augmentation en réducteur pour réduire la taille.
- Sur la vitesse d'agitation durant l'étape de nucléation : augmentation de la vitesse dans le but de diminuer la vitesse de nucléation pour réduire la taille,

Une hétérogénéité en taille est souvent caractéristique d'un taux de nucléation irrégulier. Afin de réduire ces problèmes, les solutions utilisées doivent être fraîchement préparées et filtrées pour minimiser les impuretés.

Dans la plupart des synthèses, la nucléation se déroule spontanément à moins d'une seconde après l'addition du réducteur, c'est pourquoi, la solution réductrice doit être ajoutée rapidement avec une vitesse d'agitation suffisante pendant et après l'addition.

Les nanoparticules ainsi obtenues sont isolées sous forme d'une poudre noire après une série de lavages (CH_3CN , DMSO, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) afin d'éliminer le NaBH_4 et l'excès des ligands. Cette poudre noire facilement redispersable comme le sont la plupart des poudres obtenues par la méthode de Brust. On peut ainsi redisperser cette poudre dans différents solvants.

II.3.4.2. Caractérisations des nanoparticules obtenues :

II.3.4.2.1. Microscopie électronique à transmission (MET)

La microscopie électronique en transmission haute résolution (MET-HR) est utilisée pour obtenir des informations sur la morphologie des particules colloïdales obtenues.

Cette technique nous a permis de visualiser et d'analyser la forme et la taille des nanoparticules d'or préparées.

Les échantillons sont obtenus en dispersant la poudre des nanoparticules dans quelques millilitres d'éthanol et en déposant ensuite une ou deux gouttes de cette solution sur une grille de cuivre recouverte d'une très fine couche de carbone amorphe (20 à 30 nm d'épaisseur).

L'évaporation du solvant laisse un dépôt contenant les particules sur la grille. Avant l'observation, celles-ci sont séchées sous vide afin d'éliminer tous les éléments volatils.

L'analyse des images obtenues révèle la formation de nanoparticules sphériques.

Certaines images de ces nanoparticules sont présentées sur la figure 59 et dans l'annexe.

A partir des diamètres d'une centaine de particules mesurées sur les clichés de microscopie, nous avons pu établir des histogrammes de distribution de taille (Figure 60).

Et après paramétrage de ces histogrammes, nous avons obtenu des courbes gaussiennes dont les caractéristiques sont le maximum de la courbe et une déviation standard qui correspond à 20% de la courbe de Gauss.

Les résultats donnent des diamètres moyens au voisinage de la valeur 3.5 nm.

De plus, les plans réticulaires sont très nettement observés sur les clichés de MET à haute résolution (Figure 61) révélant ainsi la structure cristalline des nanoparticules obtenues.

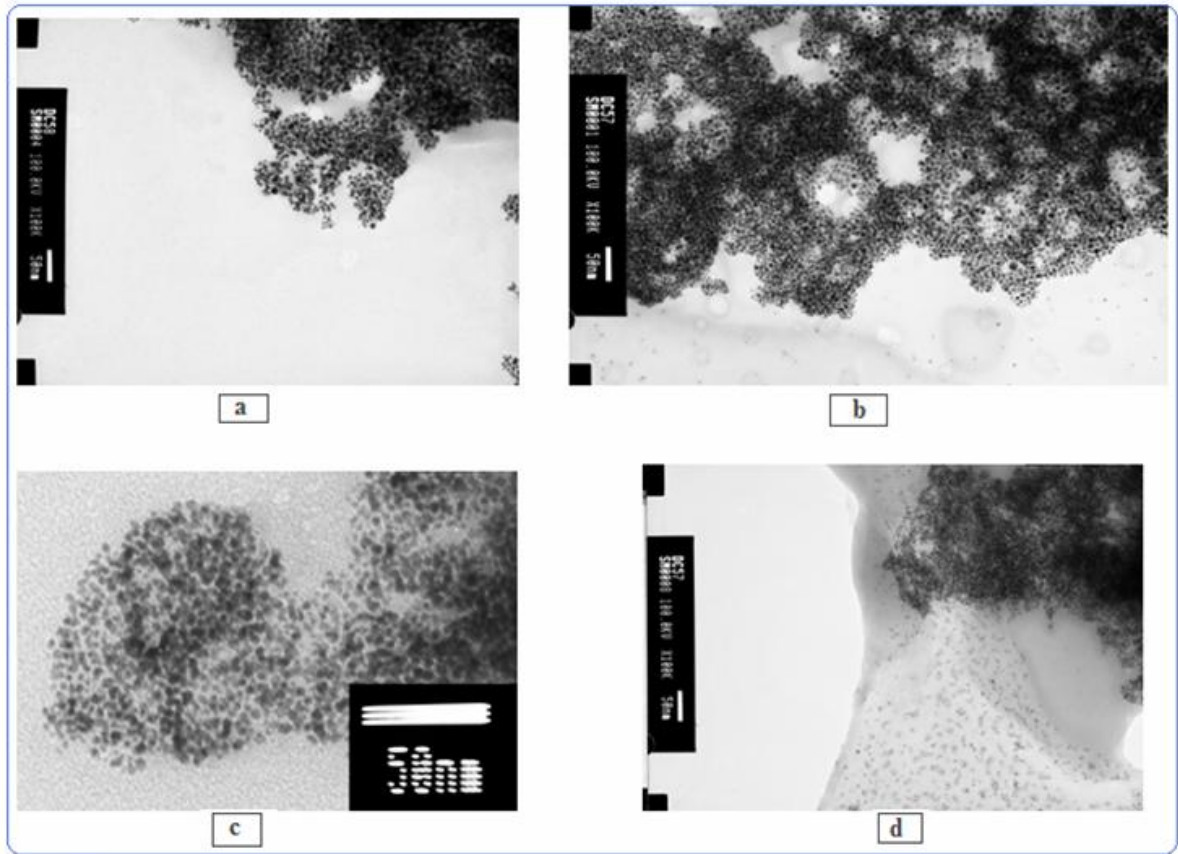


Figure 59: Micrographies de microscopie électronique en transmission (MET) de nanoparticules d'or obtenues. La barre d'échelle représente 50 nm pour toutes les images.

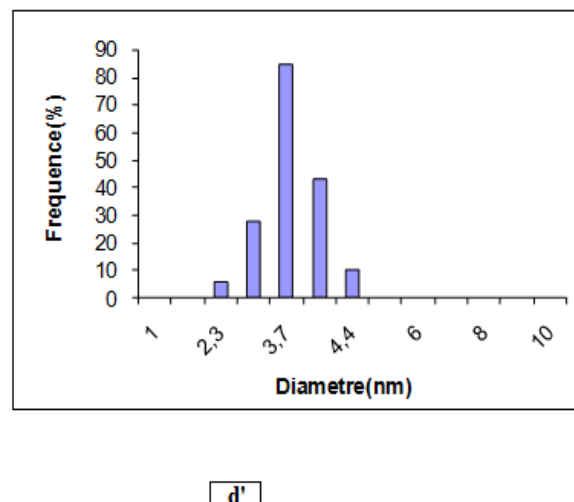
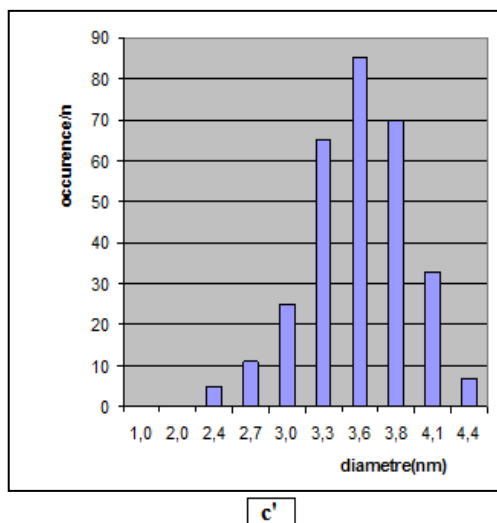


Figure.60 : Histogrammes de distribution de taille (c') et (d') correspondants respectivement aux images (c) et (d) représentées sur la figure 56.

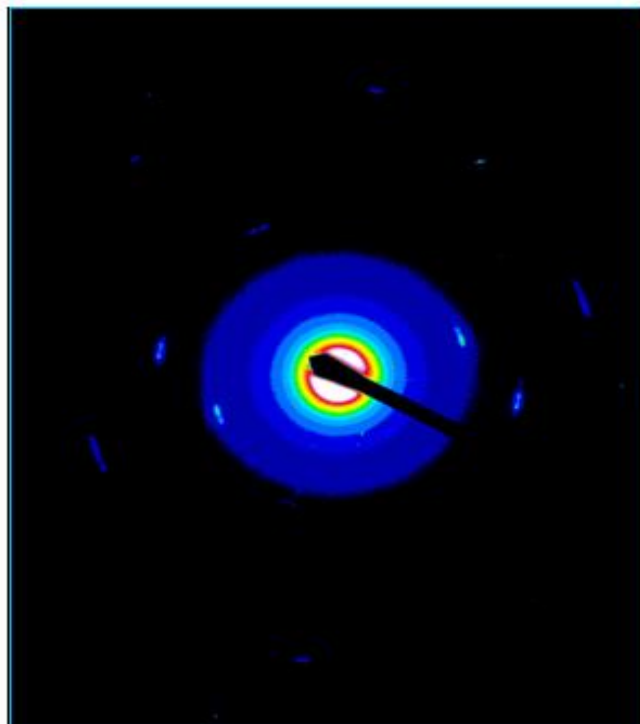


Figure. 61 : Phénomène de diffraction électronique observé lors de la prise des images TEM.

II.3.4.2.2. Spectroscopie UV-Visible

Les spectres UV-visible des nanoparticules sous forme de poudres présentent une bande d'absorption correspondant au plasmon de résonance de surface des colloïdes d'or qui est centré autour de 535 nm (Figure 62). Cette bande d'absorption, due à une oscillation collective des électrons de la bande de conduction, est caractéristique des nanoparticules d'or d'une taille supérieure à 2 nm.⁽⁷²⁾

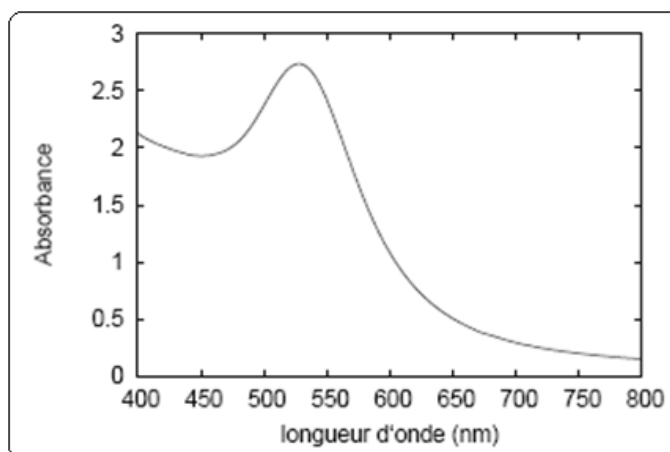


Figure. 62 : Spectre UV-visible de nanoparticules (Xb) sous forme de poudre.

II.3.4.2.3. Diffraction des rayons X

L'analyse par diffraction des rayons X aux grands angles renseigne sur la cristallinité des nanoparticules. En milieu concentré, cette technique donne des informations à la fois sur la taille et la forme des objets présents d'une part, et sur leur organisation d'autre part, en effet des pics de diffraction sont observés dans le cas de structures organisées.

La structure périodique des nanoparticules étudiées conduit à des spectres de poudre (XRD) avec une série de pics de Bragg (Figure 63).

Le spectre présente les sept principales caractéristiques de diffraction de la phase cubique de l'or.

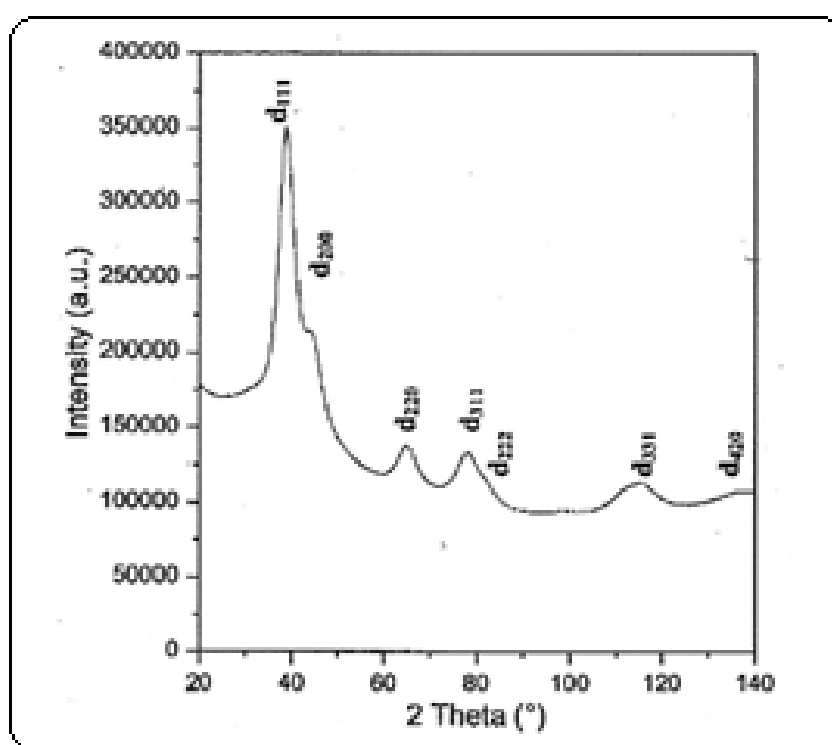


Figure. 63 : Spectre de diffraction des rayon-X aux angles 2θ (20° - 140°) de l'échantillon (XIc) sous forme de poudre.

Le domaine cristallin est calculé en se servant de la formule de Debye-Scherrer⁽¹⁴⁸⁾ qui donne une taille moyenne qui balance autour de la valeur 4.0 nm, ce qui est en accord avec les valeurs 3.5 ± 1.4 nm obtenue à partir des clichés MET haute résolution (Figure 59).

⁽¹⁴⁸⁾ Knauth.P, Schoonman.J, NANOSTRUCTURED MATERIALS, *Selected Synthesis Methods, Properties and Applications*, (2004) Kluwer Academic Publishers, New York.

La cohérence entre la taille des particules obtenues en MET et celle obtenue en diffraction X, indique que la plupart des particules sont certainement monocristallines.

II.3.4.2.4. Analyse X par dispersion d'énergie (EDX).

L'énergie des rayons X émis lors de la désexcitation des atomes dépend de leur nature chimique. En analysant le spectre des rayons X, on peut avoir une analyse élémentaire, c'est-à-dire savoir quels types d'atomes sont présents sur le substrat métallique.

Cette méthode d'analyse chimique est couplée en général à la microscopie électronique à balayage (Voir annexe II).

Les mesures effectuées en EDX sur des nanoparticules en poudre confirment en fait la présence de molécules organiques disulfurés à la surface des clusters d'or (Figure 64).

En effet, l'analyse des spectres EDX des nanoparticules préparées nous indique la présence des pics caractéristiques des éléments C, N, O et S. avec des rapports atomiques proches des valeurs théoriques.

L'impureté (Na Cl) sur le spectre, provient du traitement de la solution du ligand avec une solution de Na^+Cl^- (relargage), lors de son isolement du milieu réactionnel par extraction avec l'acétate d'éthyle.

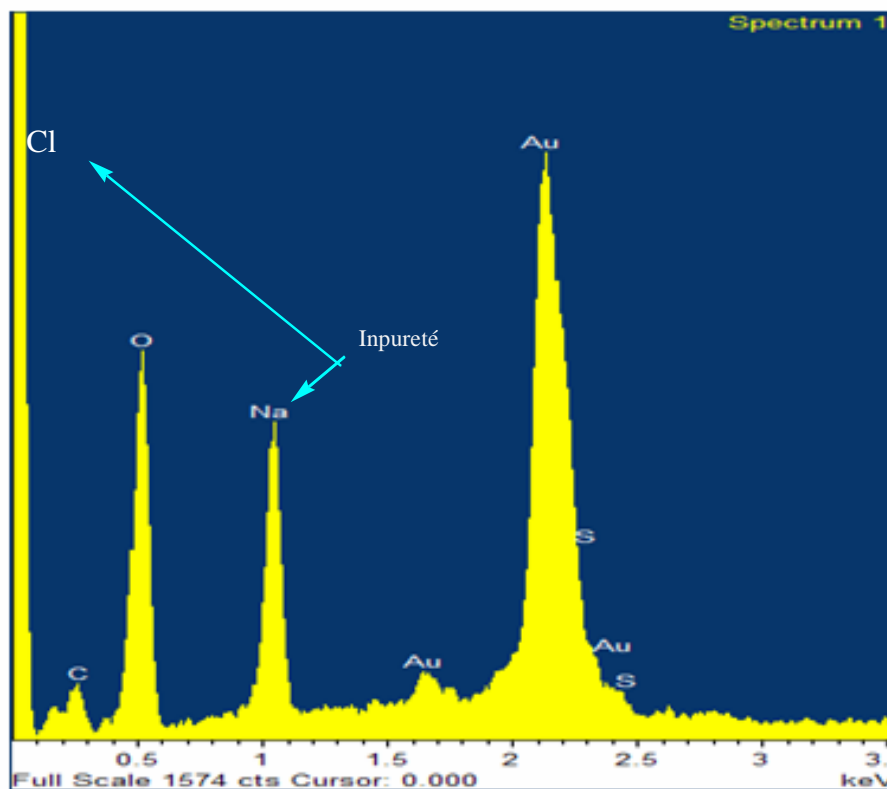


Figure 64 : Spectre (EDX) de l'échantillon (XIc).

II.3.5 Conclusion

Des nanoparticules d'or avec une taille moyenne de 3,5 nm ont été synthétisées en une seule étape par la méthode de Brust modifiée utilisant le NaBH₄ comme réducteur et le DMSO comme solvant.

L'élaboration de ces nanoparticules a été basée sur le greffage direct des ligands préalablement préparés par couplage entre une série d'arylsulfonamides avec l'acide lipoïque pour conduire de manière reproductible à des clusters de taille homogène et stables.

De part leurs tailles nanométriques, ces nanoparticules conviennent parfaitement à des applications dans le domaine thérapeutique : soit pour le diagnostic soit pour le traitement par un ciblage spécifique des systèmes biologiques.

CHAPITRE 4

***Evaluation Biologique dans la série des
Nanoparticules d'or***

II.4.1. Introduction

Bien que beaucoup de sulfonamide/sulfamate/sulfamide ont été décrits comme étant des inhibiteurs potentiels pour le CAIX impliquée dans le cancer, un nombre très limité seulement de ces dérivés montrent un niveau acceptable de sélectivité pour l'inhibition de cette isoenzyme transmembranaire.

Nous rapportons ici les résultats de l'évaluation biologique des nanoparticules d'or (XIc) que nous avons synthétisées dont le but de cibler cette isoenzyme transmembranaire surexprimés dans les cellules tumorales.

II.4.2. Tests Biologiques

II.4.2.a. Tests d'inhibition sur l'anhydrase carbonique.

Les tests d'inhibition ont été réalisés par l'équipe du Professeur C T. Supuran à l'Université de Florence (Italie), selon la méthode d'hydratation du CO₂ (Stopped Flow) sur différentes isoenzymes de l'anhydrase carbonique en l'occurrence l'hCAI, l'hCAII et l'hCAIX en comparaison avec l'acétazolamide, composé utilisé dans le traitement du glaucome (Tableau 5).

La méthode Stopped-Flow ⁽¹⁴⁹⁾ permet de mesurer les cinétiques rapides de deux (ou plus) composants injectés dans une cellule de détection par deux seringues coordonnées A et B (Schéma 28). Ces deux seringues injectent simultanément un petit volume de leur contenu (une contenant l'enzyme, l'autre une solution saturée de CO₂) dans une chambre d'observation qui est traversée par le faisceau de lumière d'un spectromètre ou d'un spectrofluorimètre). Le mélange réactionnel va ensuite dans une seringue d'arrêt qui arrête le flux.

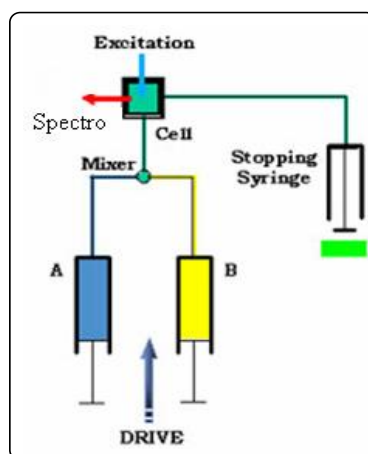


Schéma 28: Principe de la méthode *Stopped-Flow*.

⁽¹⁴⁹⁾ Khalifah, R. G. J. Biol. Chem.,(1971), 246, 2561–2573.

Les cinétiques de réactions peuvent être mesurées jusqu'au 1/1000 de seconde et suivie en absorbance UV/Vis (190 à 900 nm) ou en fluorescence.

Dans le cas de l'anhydrase carbonique l'activité enzymatique d'hydratation du CO₂ est basée sur la détermination de la vitesse de variation du pH. Le temps durant lequel le pH baisse de sa valeur initiale 7,5 à sa valeur finale 6,5 est mesuré par le spectromètre à 557 nm en utilisant le rouge de phénol à une concentration de 0.2 mM comme indicateur coloré.

Pour la détermination des paramètres cinétiques et des constants d'inhibition, les solutions suivantes ont été utilisées :

- Solution saturée de CO₂ avec des concentrations qui se situent dans la gamme:1.7 - 17 mM.
- Solutions de Stock des inhibiteurs (0.1 mM) : qui ont été préparées par dissolution dans le DMSO 5% , ensuite diluées jusqu'à 0.01 nM dans l'eau distillée et déionisée.

Tableau 5. Résultats trouvés sur l'inhibition des CAs : CAI, II et IX avec l'acetazolamide AZA et les nouveaux Sulfonamides 3a, b, et les nanoparticules GNP-1/2a

Inhibiteur	K _i (nM)		
	hCAI	hCAII	hCAIX
AZA	250± 12	12± 1	25 ± 1
3a	214 ± 9	230 ± 10	41 ± 2
GNP-1	581 ± 18(128)*	451 ± 21(116)*	32 ± 2(2.4)*
3b	> 50 000	>50 000	> 50 000
GNP-2	28 550	30 400	31 050
AU@	32 000	31 600	29 560

*Les données entre parenthèses représentent les constantes de l'inhibition quand l'enzyme et l'inhibiteur ont été incubés pendant 2 h.

Les solutions de l'inhibiteur et de l'enzyme ont été preincubées ensemble à température ambiante pendant 15 min à 2 h. Cette durée de temps peut aller dans certains cas jusqu'à, 4-6 h. La température peut être baissée à 4°C pour des périodes d'incubation

plus longues que 15 min, afin de permettre la formation du complexe Enzyme-inhibiteur (E-I).

Les constantes d'inhibition ont été obtenues par les méthodes des moindres carrés non-linéaires⁽¹⁵⁰⁾, elles représentent la moyenne d'au moins trois déterminations différentes.

II.4.2.b. Pénétrabilité à travers les membranes cellulaires.

Étant donné la localisation extracellulaire de l'isoforme IX de l'anhydrase carbonique et le fait que les nanoparticules montrent généralement une imperméabilité aux membranes cellulaires, notre but dans cette étape, est de confirmer cette constatation par les inhibiteurs nanoparticulaires que nous avons préparés.

Protocole expérimental

10 ml de cellules de globules rouges humaines (RBCs) fraîchement isolées, ont été lavées plusieurs fois avec une solution tampon Tris (pH 7.40, 5 mM) puis centrifugées pendant 10 min, enfin traitées avec 25 ml d'une solution 2mM de l'inhibiteur.

L'incubation a été faite à 37 °C avec agitation douce, pour des périodes de 30 min - 24 h. Après l'incubation, les RBCs ont été centrifugées encore pendant 10 min, le surnageant a été abandonné, et les cellules ont été lavées trois fois avec 10 ml du tampon susmentionné pour éliminer toute la quantité de l'inhibiteur non liée.

Les cellules ont été alors dissoutes dans 25 ml d'eau distillée, et centrifugées de nouveau afin d'éliminer toutes les membranes et les autres impuretés insolubles.

La solution obtenue a été chauffée à 100°C pendant 5 minutes pour dénaturer les anhydrases carboniques CAs.

La concentration des inhibiteurs qui peuvent être présents dans cette solution a été déterminée par les trois méthodes suivantes:

- Une méthode HPLC
- Une méthode spectrophotométrique
- Une méthode enzymatique.

Par la méthode HPLC

Une colonne C-18 Bondapak 5µm commercialement disponible a été utilisée pour la séparation⁽¹⁵⁰⁾, en se servant d'une phase mobile faite d'acétonitrile, méthanol et tampon

⁽¹⁵⁰⁾ Nishimori, I.; Onishi, S.; Takeuchi, H.; Supuran, C. T. *Curr. Pharm.* (2008), 14, 622–30

⁽¹⁵¹⁾ Scozzafava, A.; Briganti, F.; Ilies, M. A.; Supuran, C. T., *J. Med. Chem.*, (2000) 43, 292–300.

phosphate (pH 7.4) ,10:2:88 (v/v/v), et en travaillant avec un débit de courant de 3 ml/min en utilisant 0.3 mg/ml du sulphadiazine (Sigma) comme référence interne.

Les temps de rétention étaient: 12.69 min pour l' acetazolamide; 8.24 min pour le sulfonamide 3a; et 13.65 min pour GNP- 1.

L'éluant a été suivi de façon continue pour l'absorbance à 254 nm pour l'acétazolamide, et une longueur d'onde dans la gamme de 270- 310 nm dans le cas des autres sulfonamides.

Par la méthode spectrophotométrique

Une variante de l'analyse par spectrophotometrie à pH-induit a été utilisée⁽¹⁵¹⁾.fonctionnant par exemple à 260 et 292 nm pour l'acetazolamide et à 225 et 265 nm, respectivement pour le sulfonamide 3a et le GNP- 1...etc.

Les solutions standardisées de chaque inhibiteur ont été préparées dans le même tampon comme celui utilisé pour les expériences de la pénétrabilité membranaire.

Par la méthode Enzymatique

La teneur du sulfonamide présent dans le lysate a été évaluée en se basant sur l'inhibition de l' hCA II mesuré avec la méthode de Khalifah⁽¹⁵²⁾.

Les courbes de l'inhibition standard ont été obtenues préalablement pour chaque sulfonamide, un composé pur a été utilisé par la suite pour déterminer la teneur de l'inhibiteur présent dans le lysate.

Les résultats obtenus par les trois méthodes présentées ci-dessus (tableau 6), s'accordent bien, et ce dans les limites des erreurs expérimentales.

Tableau 6 : Résultats de pénétrabilité à travers les membranes cellulaires.

Inhibiteur	[Sulfonamide] μM^*					
	t = 30 min			t = 60 min		
	HPLC ^a	ES ^b	EI ^c	HPLC ^a	ES ^b	EI ^c
AZA	136 \pm 7	139 \pm 5	140 \pm 4	160 \pm 8	167 \pm 5	165 \pm 6
3a	158 \pm 3	159 \pm 5	161 \pm 5	168 \pm 5	164 \pm 4	167 \pm 5
GNP-1	10.6 \pm 0.02	0.7 \pm 0.04	0.5 \pm 0.05	0.7 \pm 0.06	0.8 \pm 0.03	0.7 \pm 0.02

*signifie \pm la déviation standard (de 3 déterminations) par: a) la méthode HPLC; b) spectroscopie électronique (ES); c) méthode enzymatique(EI).

⁽¹⁵²⁾ Hilvo, M.; Baranauskienė, L.; Salzano, A. M.; Scaloni, A.; Matulis, D.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Monti, S. M.; De Simone, G.; Lindfors, K.; et al. J. Biol. Chem. (2008) 283, 27799–809.

II.4.3. Discussion

Toutes les données d'inhibition concernant les composés : 3a,b, GNP-1/2, l'acetazolamide AZA (5-acetamido-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide) l'inhibiteur standard utilisé en clinique, et les Au NPs (Au @) comme agent de contrôle, contre les isoformes hCAI et II (isozymes cytosoliques) et l'isozyme transmembranaire hCAIX sont montrées dans le tableau 5.

La méthode Stopped-Flow a été utilisée pour mesurer l'activité catalytique de CA lors de l'hydratation du CO₂ utilisant le rouge du Phénol comme indicateur.

Dans les conditions standards utilisées pour la détermination des constantes de l'inhibition. Pour un temps d'incubation de 15 min, les résultats nous montrent que l'AZA présente une forte activité sur le CAII et sur le CAIX (KIs de 12-25M) alors que les nouveaux sulfonamides 3a et GNP- 1 se montrent comme des inhibiteurs faibles ou modérés contre l'isoenzyme ubiquitaire CAII (KI de 230-451 nM) mais présentent une forte activité vis-à-vis de l' CAIX (KI de 32-41 nM).

Cependant, quand les inhibiteurs et les enzymes ont été incubées pendant 2 h ou plus longtemps, seul le GNP-1 a montré une activité inhibitrice élevée contre tous les trois isozymes, avec des constantes d'inhibition de l'ordre de 128 nM contre hCAI, 116 nM contre hCAII, et 2.4 nM contre hCAIX, respectivement (Tableau 5), avec les rapports de sélectivité suivants : KI CAI / KI CAIX= 53 et KI CAII / KI CAIX= 48.

Dans les expériences du contrôle, le conjugué acide lipoïque -sulfathiazole 3b, son dérivé nanoparticulaire GNP-2, et les nanoparticules d'or nues Au@ non enrobées avec le sulfonamide ont été analysées dans les mêmes conditions.

On a pu observer que les composés 3b, GNP-2, et Au @ montrent une inhibition au micromolaire très faible ou aucune inhibition contre tout les isoformes de l' CA.

Donc, l'inhibition observée avec le composé GNP-1 est due aux interactions de sa partie sulfonamide avec le site actif de l'enzyme.

Ces résultats font apparaître aussi que les inhibiteurs 3a et GNP-1 démontrent de très bonne activité inhibitrice sur le CAIX par rapport aux isoenzymes CAI et II (Tableau 5), mettant en évidence une très bonne sélectivité. Ceci est probablement dû au fait que certains résidus (tels que Phe131 et Gly132) jouant un rôle clef pour la fixation

d'inhibiteurs se sont avérés différents dans les isozymes cytosoliques et transmembranaire, comme cela a été montré plus récemment⁽¹⁵³⁾.

Une investigation *in vivo* sur l'inhibition des isozymes transmembranaires en utilisant des inhibiteurs AZA, 3a, et GNP-1 à des concentrations millimolaires et leur pénétrabilité à travers les membranes cellulaires a été réalisée.

L'incubation avec l'AZA et le sulfonamide 3a pendant 30-60 min, conduit à une saturation avec ces inhibiteurs des deux isozymes présents dans les érythrocytes (CAI et II), (tableau 6)⁽¹⁵⁰⁾: Ceci est dû à la haute diffusivité de ces inhibiteurs à travers les membranes cellulaires.

En revanche, le GNP-1 a été détecté dans les RBCs mais uniquement avec des quantités très négligeables même après un temps d'incubation de 2-24h, prouvant ainsi que les inhibiteurs de l' CA greffés aux AuNPs sont incapables de pénétrer à travers les membranes biologiques.

II.4.4. Conclusion.

En plus de la forte activité inhibitrice observée pour le GNP-1 contre le CAIX ($K_i=2.4$ nM), Ces résultats font apparaître également que ces inhibiteurs montrent de très bonne activité inhibitrice sur le CAIX par rapport aux isoenzymes CAI et II, mettant en évidence une très bonne sélectivité (: $KI_{CAI} / KI_{CAIX}= 53$ et $KI_{CAII} / KI_{CAIX}= 48$).

Cette étude montre aussi que ces nouveaux inhibiteurs nanoparticulaires sont des composés totalement imperméables aux membranes cellulaires, ce qui représente un intérêt considérable pour le ciblage spécifique des isoenzymes transmembranaires CAIX surexprimées dans plusieurs types de cancers.

Donc, les inhibiteurs que nous avons synthétisé constituent des candidats intéressants pouvant être utilisés aussi bien dans le diagnostic que dans le traitement des tumeurs.

⁽¹⁵³⁾ Wistrand, P. J.; Lindqvist, A. In Carbonic Anhydrase-From Biochemistry and Genetics to Physiology and Clinical Medicine; Botre, F., Gros, G., Storey, B. T., Eds.; VCH: Weinheim, (1991); 352-378.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Le Cancer est l'un des problèmes de santé principaux dans le monde moderne. Bien que des avancées significatives ont été faites dans la thérapie conventionnelle, le développement de nouvelles approches thérapeutiques est un besoin urgent.

Un des impératifs en chimiothérapie anticancéreuse est de diriger sélectivement le médicament vers les cellules tumorales tout en tentant d'éviter que celui-ci agisse sur les cellules saines. Un moyen d'aboutir à un tel résultat serait de concevoir des médicaments qui doivent faire appel à des systèmes spécifiques de transport moléculaire. L'idée revient à attacher le médicament actif à une molécule servant de véhicule capables de transporter des molécules biologiquement actives au plus près de leur cible (tissulaire, cellulaire ou même moléculaire), ces avancées ont dépassé le stade de la simple curiosité de laboratoire puisqu'elles ont déjà donné lieu à la mise sur le marché de nouveaux médicaments pour le traitement de cancers et de certaines maladies infectieuses.

La première partie de cette thèse a fait le point bibliographique sur les anhydrases carboniques, les glucides, et les nanoparticules; ces deux derniers sont des vecteurs de choix que nous avons exploités pour la réalisation de notre travail.

Dans un premier temps, nous avons décrit la synthèse d'espèces de types « sulfamoyles activés » dérivés de phénols et d'hétérocycles « oxazolidinone » ; Ensuite, une réaction de trans-sulfamoylation conduite selon deux procédés différents a été mise en œuvre dans le but d'accéder à une série de conjugués: β -cyclodextrine-2-chloroethylnitrososulfamides. La formation d'un mélange complexe de plusieurs produits que nous n'avons pas pu isoler et identifier a été observée lors de cette réaction.

Néanmoins, cette partie de notre travail, nous a permis d'obtenir des produits intéressants, en particulier ceux issus de la fonctionnalisation de la β -cyclodextrine; et notamment le précurseur clef: la mono-6-amino- β -cyclodextrine qui nous a beaucoup servi par la suite.

Dans un deuxième temps, nous avons décrit la synthèse d'une nouvelle série de glycoconjugués : les thiouréido-arylsulfonamide- β -cyclodextrines. La réaction de couplage aboutissant à ces glycoconjugués s'est accomplie dans la pyridine entre la mono amino-6- β -cyclodextrine et une série d'arylsulfonamide isothiocyanates préalablement préparée. De tels dérivés incorporant un motif thiourée et associant un

vecteur naturel saccharidique amphiphile capable de moduler la balance hydrophilie–lipophilie, sont alors susceptibles de s’insérer dans des systèmes lipidiques tels que des bicouches de liposomes ou de s’auto-organiser en agrégats dans des zones bien ciblées telles que des tumeurs malignes.

Le dernier volet de notre travail a été consacré à l’obtention d’une nouvelle série de nanoparticules d’or greffées à des ligands obtenus par couplage peptidique entre des arylsulfonamides à activité potentielle pour l’inhibition des CAs et l’acide lipoïque qui est une structure biologique largement utilisée.

Ce greffage a été réalisé en une seule étape et dans une seule phase par l’action des ligands considérés sur l’acide chloraurique en présence de Na BH_4 dans le DMSO pour conduire à une série de clusters stables d’une taille moyenne égale à 3.5 nm.

L’application visée par ses séries de composés étant le ciblage spécifique de l’anhydrase carbonique IX possédant un site actif extracellulaire et surexprimée dans plusieurs types de cancers. En effet, une évaluation biologique dans la série des nanoparticules d’or que nous avons obtenues, montre leur totale imperméabilité aux membranes cellulaires et une grande sélectivité pour l’inhibition de l’ CA IX, ce qui leur permettra d’être des candidats intéressants pouvant être utilisés aussi bien dans le diagnostique que dans le traitement des tumeurs.

Une partie de ce travail a fait l’objet d’une publication internationale donnée en annexe.

Carbonic Anhydrase Inhibitor Coated Gold Nanoparticles Selectively Inhibit the Tumor-Associated Isoform IX over the Cytosolic Isozymes I and II

Maamar Stiti, Alessandro Cecchi, Marouan Rami, Mohamed Abdaoui, Véronique Barragan-Montero, Andrea Scozzafava, Yannick Guari, Jean-Yves Winum, and Claudiu T. Supuran

J. Am. Chem. Soc., **2008**, 130 (48), 16130-16131

Perspectives

- Les perspectives à ce travail consistent tout naturellement à :
 - ✓ Mesurer expérimentalement l'activité biologique des conjugués thiouréido-arylsulfonamide- β -cyclodextrines déjà obtenus.
 - ✓ Etendre le greffage d'arylsulfonamides sur la β -cyclodextrine à d'autres structures osidiques naturelles en utilisant également d'autres sulfamides ou sulfamates afin de rendre la vectorisation de ces inhibiteurs aussi spécifique que possible.

- Par ailleurs, et dans l'optique d'une utilisation *in vivo*, on envisage aussi de préparer d'autres nanoparticules d'or fonctionnalisées avec différents ligands, en particulier des nanoparticules enrobées avec des néoglycoconjugués incorporants des linkers fluorescents afin de faciliter leur détection.

TROISIEME PARTIE
Protocoles Expérimentaux

III.1. Conditions générales

Les réactifs utilisés sont fournis par Sigma-Aldrich et Flucka et sont utilisés sans purifications.

Les chromatographies sur couches minces (CCM) ont été réalisées sur plaque de silice en aluminium Merck 60 F354 (art.5554). Selon leur nature, les produits ont été révélés par différentes méthodes: à la lumière UV (254nm) pour les composés possédant un chromophore, à l'aide d'un révélateur chimique approprié; pour les aminés dans une solution de ninhydrine dans l'éthanol (0,1%) ou pour les cyclodextrines dans une solution d'acide sulfurique dans l'eau (20%), ou dans le système (dioxane / ammoniacque concentré) suivi d'un chauffage jusqu'au développement optique des tâches.

La purification des composés par chromatographie a été effectuée soit sur gel de silice avec de la silice Carlo Erba (Silica Gel 60A, et 60 F254 granulométrie: 35-70 μ m) Les points de fusion non corrigés ont été déterminés en capillaire sur un appareil Buchi 530.

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés à température ambiante sur Bruker DRX 400 (à une fréquence de 400MHz). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm, utilisant DMSO- d_6 et le D_2O comme solvants et le tétraméthylsilane (TMS comme référence interne).

La multiplicité des signaux est indiquée par une (ou plusieurs) lettre(s) minuscule(s): singulet, d : doublet, t : triplet, m : multiplet.

Les spectres UV-visible sont enregistrés à température ambiante sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 35 sur une gamme de 400 à 800 nm,

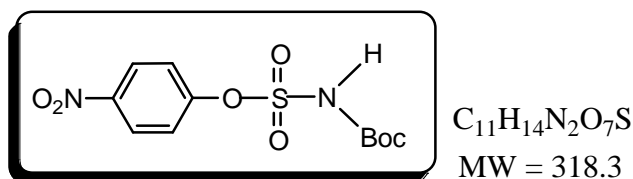
Les spectres FT-IR sont enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer spectrum one.

Les spectres de masse sont obtenus par technique electrospray sur un appareil Water Micro-Mass ZQ, en mode positif et négatif.

Les analyses en microscopie électronique à transmission (MET) ont été effectuées à une tension d'accélération de 100 kV sur un microscope (JEOL 1200 EXII)

L'estimation du rapport (Au / S) a été réalisé à l'aide d'un microscope électronique FEI Quanta 200 FEG couplé à un analyseur EDX.

La diffraction des rayons X a été effectuée à l'aide d'un diffractomètre à poudre muni d'un détecteur ultra-fast X.celerator X. pert Pro ,avec une gamme d'angles 2θ (10° à 60°) équipé d'un filtre à bas de nickel à l'encontre des radiations émises par le cuivre (1.5405 \AA). Les paramètres de mesure sont : stepsize, 0.01671; counting time, 60 sec.

III.2. Synthèse des sulfamoyles activés.**III.2.1. N-t -butyloxycarbonyl, p-nitrophénoxy sulfamate (I)**

A une solution de 1.758g (0.014mol) p-nitrophénol dans 100ml de dichlorométhane, est ajouté 1 équivalent de chlorosulfonylcarbamate de tertiohutyle préparé extemporanément par addition de 1,2 ml (0.0125 mol) de tertibutanol dissout dans 3 ml de dichlorométhane anhydre à une solution de 1ml (0.0115 mol) d'isocyanate dans le même solvant. La sulfamoylation est conduite en présence de 3 équivalents de pyridine(2.77ml, 0.034 mol) pour neutraliser l'acide chlorhydrique formé ; elle est suivie par CCM, qui montre l'apparition d'un produit révélé à la ninhydrine. La réaction est complète en 1 heure. Le milieu réactionnel est dilué au dichlorométhane, lavé par 3 fractions d'HCl 0,1 N et puis à l'eau jusqu'à pH neutre. La phase aqueuse est séchée sur sulfate de sodium, et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit obtenu est chromatographié sur colonne de gel de silice et élué au dichlorométhane .

Rdt =62%

Rf 0.90 (dichlorométhane)

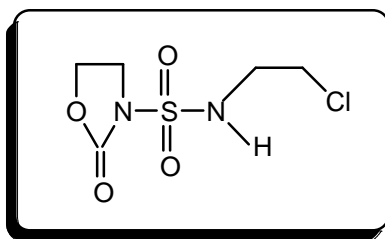
Tf: 128-130 °C.

MS ESI⁺, 10 Volt, m/z:341.23 [M + Na]⁺, 357.22[M + K]⁺,

MS ESI⁻, 40 volt, m/z: 317.20[M -H]⁻.

IR (KBr,v en Cm⁻¹): 3270 (NH), 1715 (C=O), 1605 (NO₂), 1360 et 1160 (SO₂)

RMN¹H (CDCl₃, δ en ppm): 8.35 -7.55 (2d, 4H, Ar), 1.55 (s, 9H, tBu).

III.2.2. N-(N'-2'-chloroéthylsulfamoyl Oxazolidin -2-one (II)


$C_5H_9N_2O_4ClS$
MW = 228.5

Une solution de N-(chlorosulfonyl)bromoéthylcarbamate est préparée par addition de 2.8ml(0.0382 mol) de bromoéthanol à 3.1ml(0.035mol) de CSI dans le dichloromethane anhydre. Le réactif obtenu est ensuite versé sur une quantité de 4.5g (0.039 mol) de chlorhydrate de chloroéthylamine dans le dichlorométhane. La réaction conduite à 0°C et en présence de 1.1 équivalents de triéthylamine(5.14 ml,0.0382 mol) pour neutraliser l'acide formé est achevée en 45 minutes. Ensuite 1.5 équivalents de triéthylamine sont ajoutés goutte à goutte et après 30 minutes d'agitation, le milieu réactionnel est dilué au dichlorométhane, lavé par 3 fractions d'HCl 0,1 N et puis à l'eau jusqu'à pH neutre. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut obtenu est chromatographié sur colonne de gel de silice, élué au dichlorométhane.

Rdt = 7 1.1%

Tf: 84-86 °C

Rf: 0.76 (Dichlorométhane/méthanol: 95/5).

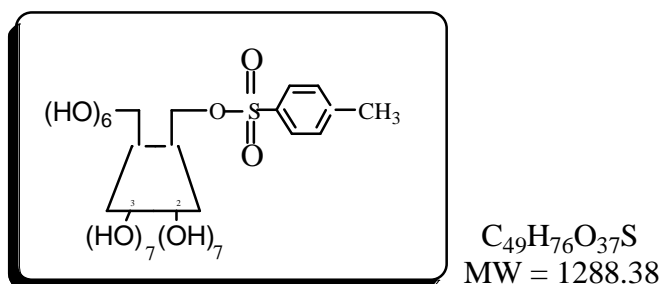
MS ESI⁺: 226.86 [M -H]⁻

IR: (KBr, ν en cm^{-1}): 3300(NH) , 1750(C=O) , 1360 et 1 140 (SO₂).

RMN¹H (DMSO-d₆, δ en ppm): 8.71 (t, 1H, NH), 4.39 (dd, 2H, CH₂O, J = 7.04, 8.63 Hz), 3.96 (dd, 2H, CH₂N, J = 7.08, 8.59 Hz.), 3.65 (t, 2H, CH₂Cl, J = 6.08, 6.08 Hz), 3.39 (m, 2H, CH₂NH).

III.3. Synthèse des dérivés monosubstitués de la β -cyclodextrine.

III.3.1. mono [6-*O*-(*p*-toluenesulfonyl)] - β -cyclodextrin. (IIIa)



A une solution de β CD (1.135g, 1mmol) dans l'eau (50 ml) sont ajoutés successivement : $CuSO_4$ (0.75g, 3 mmol) dans 75 ml d'eau, NaOH (1g, 25 mmol) dans 25 ml d'eau. Après 10 mn, du chlorure de tosylo (1.5 g, 7.9 mmol) dans l'acétonitrile (10 ml) est ajouté goutte à gouttes pendant 1heure. Le mélange est agité pendant 4.5 h puis neutralisé avec HCl (1M, 5 mmol) ; les sels sont filtrés et la solution est concentrée par lyophilisation jusqu'à 2/3 de son volume original (jusqu'à 77 ml) le solide cristallisé obtenu est lavé avec l'acétone (2 x 4 ml), l'éther (2 x 3 ml) est séché. Après deux recristallisations avec l'eau, on obtient (0.633 g, 48%) du Monotosyle- β CD pur.

Rdt= 48%

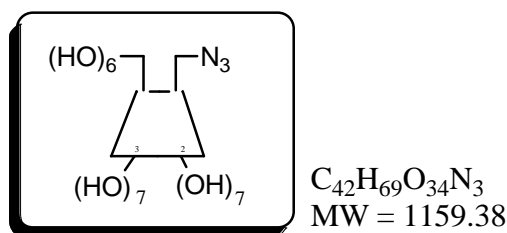
R_f =0.73 dans le système (1.4 Dioxane / NH_4OH cc : 10\7), révélé par l'UV, ou avec H_2SO_4

T_f =169-170°C

MS ESI⁺ 20 Volt, m/z: 1288.9 [M + H]⁺ (85 %), (figure 27)

MS ESI, 30 volt, m/z: 1287.69, [M -H]⁻, (15 %).

RMN¹H: (400MHz; DMSO-d₆, δ en ppm): 7.74 (d, J = 8 Hz, 2H-ph), 7.43 (d, J = 8 Hz, 2H-ph), 5.74 (m, 16H, (H1,OH)-cyd), 4.79 [m, 8H, (H3-H5)-cyd], 4.64 (m, 6H, H5-cyd), 4.17 -4.32 (m, 2H, H6-cyd), 3.60 [massif, (H2,H4-H6)-cyd, recouvrement avec H₂O], 3.30 [m, 9H, (H6, H4)-cyd], 2.41(s, 3H, CH₃).

III.3.2. 6-monoazido-6-monodeoxy- cyclomaltoheptaose(β CD) (IIIb)


Dans un ballon monocol, le mono 6 tosylate β CD (0.1g, 0.088 mmol) est dissout dans du DMF absolu (0.5ml) ensuite une quantité d'azide de sodium (0.006g 0.092 mmol) est ajoutée. Le mélange réactionnel est chauffé à 105-110⁰C en agitant pendant 1 heure sous cette température, la solution presque claire est traitée avec l'acétone à température ambiante. Un précipité blanc cristallin se forme, le produit brut est recristallisé avec (1 /10) en volume de (eau / acétone) pour donner des cristaux blancs.

Rdt =95%;

Rf=0.39 dans le système (1.4 Dioxane / NH₄OH cc : 10\7).

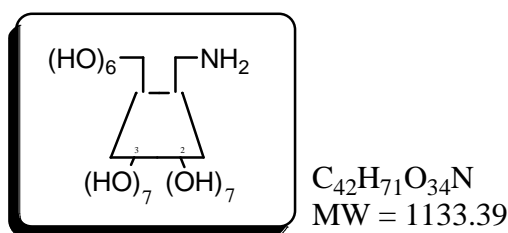
Tf=240°C

MS ESI⁺ 20 Volt, m/z: 1182.53, [M + Na¹⁺ (100 %),

MS ESI⁻, 20volt, m/z: 1158.34, [M -H]⁻, (100 %).

IR: 2113 Cm⁻¹; caractéristique du groupement azide

RMN¹H,(D₂O, δ en ppm): 5.06(m , 7H, H1-cyd), 3.82–3.96 (m, 27H,(, H3, H5, H6)-cyd),3.55- 3.77(m, 15 H, (H2, H6, H4)-cyd,).

III.3.3. 6-monoamino-6-monodeoxy cyclomaltoheptaose(β CD) (IIIc)


Le monoazide- β CD (0.25g, 0.215 mmol) est dissout dans du méthanol absolu (2.3ml) sous azote et à température ambiante ; le milieu réactionnel est refroidi jusqu'à - 25⁰C ensuite du Pd\C, (0.02542 g, 10% Pd\C) suspendu dans l'eau (0.25ml) est ajouté, et le milieu réactionnel est chauffé à température ambiante. Ensuite de l'hydrazine hydrate

(0.0533ml, 0.0011 mol) et ajouté, et le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 20mn avec agitation, ensuite le milieu est porté à 50°C, et le catalyseur est filtré et lavé deux fois avec l'eau (0.42ml) après évaporation des solvants, le produit brute est dissout dans l'eau, et son pH est baissé jusqu'à pH=2.5 avec HCl concentré, ensuite la solution est clarifiée avec le charbon actif (10%Pd) à température ambiante (30Mn), puis filtrée et lavée.

Rdt=88% ;

Rf=0.7 dans le système (1.4 Dioxane / NH₄OH cc : 10\7).

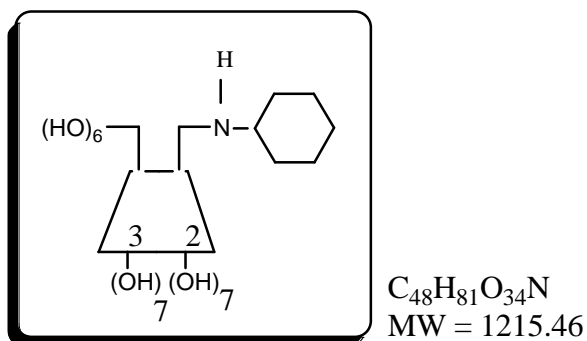
MS ESI⁺ 50 Volt, m/z: 1134.83, [M + H]⁺ (100 %),

MS ESI⁻, 20volt, m/z: 1169.46, [M +Cl]⁻, (100 %).

RMN¹H: (400MHz; D₂O, δ en ppm) : 5.43 (s, 2H, NH₃⁺), 5.01-5.07 (m, 7H, H1-cyd), 3.93 [m, 8H, (H3,OH)-cyd], 3.84 [m, 18H, (H5, H6)-cyd], 3.62 [m, 8 H, (H2,OH)-cyd], 3.06-3.56 [m, 1OH, (H4, H6)-cyd].

Purification du mono-amino-cyclodextrine

Une solution de 1.5g de mono- amino-cyclodextrine brute dans l'eau est appliquée sur une colonne contenant 140 ml de résine Lewatit SP1080, forme H*, préalablement lavée à l'eau distillée. La mono-aminée est fortement retenue sur cet échangeur de cations et la cyclodextrine non substituée est éluée par lavage à l'eau (400 ml). L'amine est libérée de la résine par élution par une solution aqueuse d'ammoniaque à 6%. 100 ml d'éluant basique sont collectés et évaporés sous vide à 30 °C. Les dernières traces d'ammoniaque sont éliminées par évaporation en présence de 30 ml d'eau apyrogène. Le résidu est précipité par addition d'acétone pure, filtré et séché sous vide à 40 °C.

III.3.4. Mono (6-cyclohexylamino-6-deoxy)- β -cyclodextrin (IVa)


Le Mono (6-cyclohexylamino-6-deoxy)- β -cyclodextrine est obtenu par la réaction du mono-tosyl- β -cyclodextrin (2 g , 0.00155 mol) avec le cyclohexylamine (30 ml) à 70 °C sous agitation magnétique pendant 3 jours sous azote. Les solvants de la réaction sont ensuite évaporés à sec sous vide. Le résidu est dissout dans une petite quantité d'eau ensuite versé dans l'acétone (300 mL) pour conduire à un précipité gris qui est collecté par filtration. Après séchage, le produit brut est recristallisé deux fois dans l'acétone et séché sous vide pour conduire à un produit pur de couleur blanche.

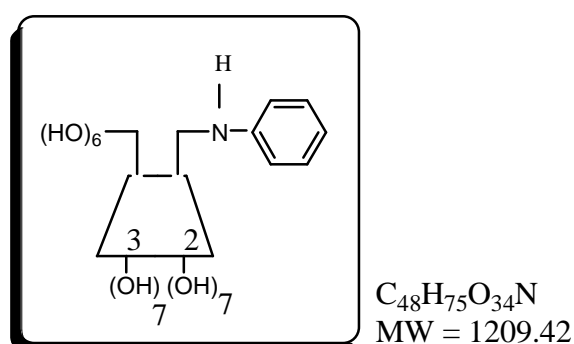
Rdt=57%).

Rf=0.26 dans le système (1.4 Dioxane / NH₄OH cc : 10\7).

Tf=247°C

MS ESI⁺, 70 Volt, m/z: 1217.10 [M + H]⁺, 1239.03 [M + Na]⁺, 1255.34 [M + K]⁺.

RMN¹H (D₂O, δ en ppm): 5.05 (m, 7 H, H1-cyd), 4.81 (m fusioné avec D₂O, 7H, (H3)-cyd), 3.84 [m, 13H, (H5-H6)-cyd], 3.62 [m, 15H, (H2-H6)-cyd], 2.8-3.4 (m, 7H, H4-cyd), 1.52-1.94 (m, 11 H, H-cyclohexyle).

III.3.5. Mono (6-anilino-6-deoxy)- β -cyclodextrin (IVb)


La mono-6-anilino- β -cyclodextrin est préparé par la réaction du mono [6-*O*-(*p*-toluenesulfonyl)]- β -cyclodextrin (2 g, 0.00155 mol) avec l'aniline (10 mL) dans le DMF (*N,N*-diméthylformamide) (20 ml) à 85°C avec agitation pendant 12 heures sous atmosphère d'azote. Ensuite ,mélange réactionnel est évaporé à sec sous une température de 40 °C.Le résidu est dissout dans l'eau, et le mélange obtenu est versé dans l'acétone pour donner un précipité gris. Celui –ci est séché et recristallisé deux fois dans l'eau pour conduire enfin à un produit solide (0.85 g) de couleur jaune.

Rdt = 45 %

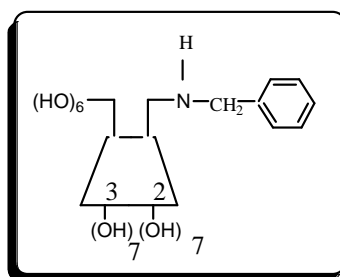
Rf=0.55 dans le système (1.4 Dioxane / NH₄OH cc : 10/7).

Tf=241°C.

MS ESI⁺ :1210.51 [M + H]⁺

RMN¹H (D₂O, δ en ppm):7.66(m, 3H,H-Ph), 7.34 (d,2H ,H-Ph , J = 7.95 Hz); 5.05 (m, 7 H,H1-cyd) , 4.81(m recouvert avec D₂O,8H, H3-cyd) , 3.84 [m, 14 H, (H6,H5)-cyd], 3.62 (m,13H, (H6, H2)-cyd), 2.6-3.4 (m,7H,H4-cyd).

III.3.6. Mono (6-benzylamino-6-deoxy) - β -cyclodextrin (IVc).



$C_{49}H_{77}O_{34}N$
MW = 1223.43

Ce composé est préparé par la réaction de 15 ml (excès) de benzylamine avec 1 g (77 mmol) du mono [6-*O*-(*p*-toluenesulfonyl)]- β -cyclodextrin en suivant le même mode opératoire que celui décrit précédemment.

Rdt =37%

Rf=0.65 dans le système (1.4 Dioxane / NH₄OH cc : 10\7).

Tf=233°C

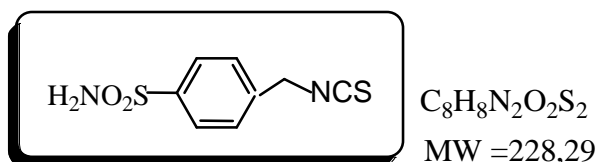
TOF MS ESI⁺ 1223.9 [M + H]⁺

RMN¹H ([DMSO -*d*₆, δ en ppm): 7.3 (m, 5H-Ph), 5.76 (m, 7 H ,H1-cyd) ,4.84(m,4H, H3_cyd) ,4.49(m, 4H ,H5-cyd), 4.13(m, 1H,H6-cyd),3.61[m, 16H ,(H6,H3,H5)-cyd],

3.38[m, 15H,(H6,H4,H2)-cyd],3.17(s, 1H , NH) 2.89 (m,2H, H4-cyd),2.08(d , 2H,CH2-aliph, J = 5.07Hz).

III.4. Synthèse des arylsulfonamides isothiocyanates

III.4.1. (Isothiocyanatométhyl) benzenesulfonamide (VIIa)



Dans un monocol de 100 ml, sont introduits 0.1g (0.486mmol, 1éq) de DCC dans 1.4 ml de THF anhydre, sont ensuite ajoutés 0.19 ml (3.159mmol, 6.5éq) de CS₂ en solution. Sous agitation, on ajoute 0.1g (0.486mmol, 1éq) du 4-aminométhylbenzenesulfonamide chlorhydrate et 0.07ml (0.494 mmol) de TEA, le milieu réactionnel devient trouble, on laisse tourner à température ambiante.

Après une nuit, le mélange réactionnel est filtré, le précipité blanc est concentré à sec, et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM / MeOH, 90/10).

Rdt= 95%

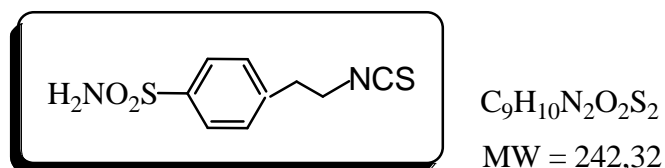
Rf: 0, 4 (CH₂Cl₂/MeOH; 9,5/0,5).

Tf= 155°C.

SM (ESI/MeOH) : m/z (exp.) 227,11 [M-H]⁻ , 455,09 [2M-H]⁻

RMN 1H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm), : 5.03(s,2H,CH₂),7.42(s,2H,NH₂),7.56(d,2H-Ph,J=8.08Hz),7.86(d,2H-Ph,J=8.08Hz).

III.4.2. 4-(Isothiocyanatoéthyl)benzenesulfonamide (VIIb)



Dans un monocol de 100 ml, sont introduits 4,12g (20mmol, 1éq) de DCC dans 50 ml de THF anhydre, sont ensuite ajoutés 7,83 ml (130 mmol, 6.5éq) de CS₂ en solution.

Sous agitation, on ajoute 4,0g (20 mmol, 1éq) du 4-aminoéthylbenzensulfonamide, le milieu réactionnel devient trouble, on laisse tourner à température ambiante. Après une nuit, le mélange réactionnel est filtré, le précipité blanc est lavé avec le THF, puis le filtrat est concentré à sec pour obtenir une poudre jaunâtre purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM/MeOH,90/10).

Rdt= 90%

Rf= 0,25(CH₂Cl₂/MeOH; 9,5/0,5).

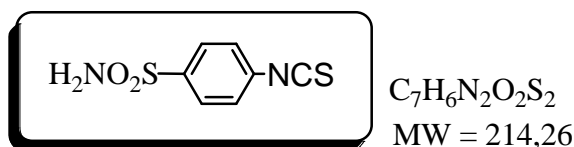
Tf= 145°C.

SM (ESI⁻/MeOH) : m/z (exp.) 241,05 [M-H]⁻

RMN 1H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) :

3.03(t,2H,CH₂,J=6.4Hz),3.94(t,2H,CH₂,J=6.4Hz),7.36(s,2H,NH₂),7.48(d,2H-Ph,J=8.08Hz),7.78(d,2H-Ph,J=8.08 Hz).

III.4.3. 4-(Isothiocyanate)benzenesulfonamide (VIIIa).



0,88g(1éq) du 4-aminobenzenesulfonamide est dissous dans 6,6 ml d' eau contenant 2,2 ml d'HCl cc, puis 1,508 ml de thiophosgène (1éq)sont ajouté sous agitation vigoureuse à 0°C. La réaction est suivie jusqu'à la disparition de la couleur rouge du thiophosgène et la formation d'un précipité blanc. Une fois la réaction est terminée, le mélange est filtré, et le produit est lavé plusieurs fois par l'eau puis séché.

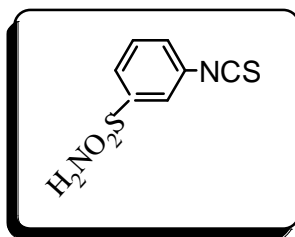
Rdt= 95%

Rf = 0,80 (CH₂Cl₂/MeOH; 9,5/0,5).

Tf =135°C.

SM (ESI⁺/MeOH) : m/z (exp.): 214.88 [M+H]⁺

RMN 1H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm),: 7.4(s,2H,NH₂), 7.61(d,2H-Ph,J=10Hz),7.86(d,2H-Ph,J=10Hz).

III.4. 4. 3-(Isothiocyanate)benzenesulfonamide (VIIIb)

$C_7H_6N_2O_2S_2$
MW = 214,26

0,88g (1éq) du 3- aminobenzenesulfonamide est dissous dans 6,6 ml d'eau contenant 2,2 ml d'HCl cc, puis 1,5 ml de thiophosgène (1éq) sont ajouté sous agitation vigoureuse. Une fois la réaction terminée, le mélange est filtré, et le produit est lavé plusieurs fois par l'eau puis séché.

Rdt = 95%

Rf = 0, 80 (CH₂Cl₂ / MeOH; 9,5/0,5).

Tf = 135°C.

SM (ESI⁺/MeOH) : m/z (exp.) 213.03 [M-H]⁻

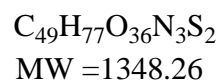
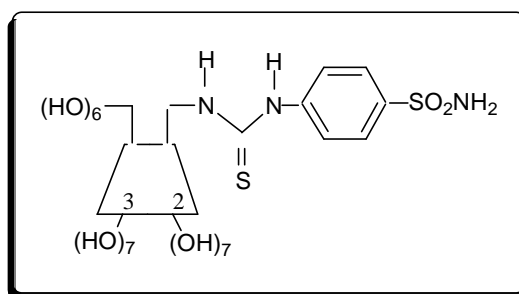
RMN 1H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm), 7.5(s,2H,NH2), 7.59-7.87(4H-Ph).

III.5. Synthèse des conjugués thiouréido-arylsulfonamides- β -CD.

Mode opératoire général.

A une solution du 6 -amino-6 -désoxycyclomaltoheptaose chlorohydrate (1 éq), dissout dans la pyridine (3 ml),on ajoute l'isothiocyanate arylsulfonamide correspondant(1.1 éqs) et (1.2 équivalents de triéthylamine(TEA),le mélange réactionnel est maintenu pendant 3heures à température ambiante, puis concentré. Le résidu obtenu est dissout dans l'acétone puis filtré. On obtient ainsi une série de quatre composés. Après purification sur colonne gel de silice (éluant: dioxane/ H₂O, 80 /20), on obtient des thiouréidoarylsulfonamides - β - CD purs.

III.5.1. 6-Deoxy-6-[(4- sulfamoylphényl)-thioureido]-cyclomaltoheptaose (IXa)



Rdt = 75%

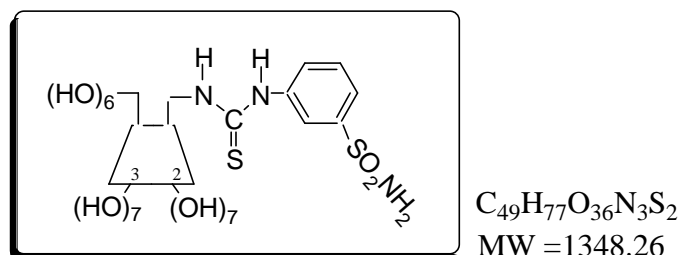
Rf = 0.71 dans le système (dioxane /H₂O, 80 /20)

Tf = 181 °C

MS ESI+ m/z 1348.9[M+H]⁺, MS ESI⁻ m/z 1347.6[M-H]⁻.

RMN ¹H (400MHz, D₂O, δ en ppm): 7.86(m, 4H- Ph), 5.04(m ,10 H , H1-cyd), 4.16(m , 1H, H3-cyd), 3.94(m , 5H ,(H3 , H5)-cyd) 3.82(m ,16H, (H6,H3 , H5)-cyd), 3.58(m , 26H, (H6,H2 , H4)-cyd) , 3.43(m ,4H , H4 -cyd),3.32(m ,1H , H6-cyd).

RMN ¹³C (DMSO_{d6}, 400 MHz, δ en ppm),: 180.15 (C=S), 142.90 (C- Ph),139.89(C- Ph), 126.07(C- Ph), 101.94(C1-C_{cyd}), 81.49(C4-C_{cyd}), 73.02(C3-C_{cyd}), 71.95(C2-C_{cyd}), 59.90(C6-C_{cyd}).

III.5.2. 6-Deoxy-6-[(3- sulfamoylphényl)-thioureido]-cyclomaltoheptaose (IXb)


Rdt = 73%

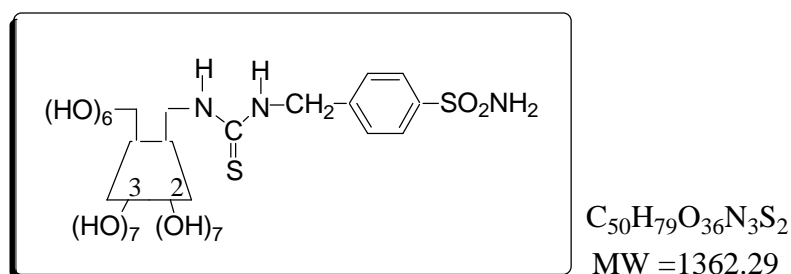
Rf = 0.77 dans le système (dioxane / H₂O, 80:20)

Tf = 192 °C

MS ESI+ m/z 1348.9[M+H]⁺, ESI- m/z 1347.7 [M-H]⁻.

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz, δ en ppm): 8.02(s,1H-Ph), 7.78 (d,1H- Ph, J = 7.70 Hz), 7.63 (t, 1H -Ph , J= 7.93 HZ), 7.56(d, 1H-Ph ,J = 8.15) , 5.07 (m,7H, H1-cyd) ,4.5(m , 1H, H3-cyd), 4.15(m , 1H, H5-cyd), 3.88(m , 12H ,(H6,H3 , H5)-cyd) 3.74(m ,22H, (H6,H3 , H5)-cyd) , 3.62(m , 17H, (H6,H2 , H4)-cyd) , 3.41(m ,2H , H6-cyd),3.33(m ,2H , H4-cyd).

RMN ¹³C (DMSO_{d6}, 400 MHz, δ en ppm): 180.72 (C=S), 144.09 (C- Ph),140.23 (C-Ph), 128.82 (C- Ph), 101.98(C1-cyd), 81.45(C4-cyd), 73.02(C3-cyd), 72.36(C5-cyd), 71.95(C2_cyd), 59.91(C6_cyd).

III.5.3. 6-Deoxy-6-[(4- sulfamoylbzyl)-thioureido]-cyclomaltoheptaose (IXc)


Rdt = 82%

Rf = 0.71 dans le système (dioxane /H₂O, 80 /20)

Tf = 206 °C

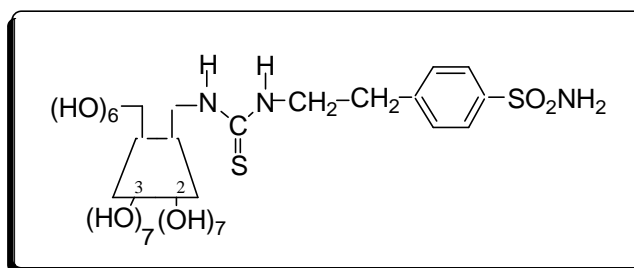
MS ESI+ m/z 1362.9 [M+H]⁺, ESI- m/z 1361.0 [M-H]⁻.

RMN ¹H (DMSO_{d6}, 400 MHz , δ en ppm) : 7.91(s,1H, NH), 7.76(d,2H-Ph, ,J=8.32Hz), 7.44(d,2H, 2H-Ph, ,J=8.38Hz), 7.38(m,1H, NH) , 7.30(s,2H, NH2), 5.75[m,14H,(

H1,OH)-cyd], 4.82(m ,7H, H3- cyd) ,4.48(dd, 5H ,H5-cyd , J = 6.18 , 11.77), 3.82(m , 1H ,H5-cyd), 3.59(m,23H,(H6,H5,H2)-cyd) ,3.30[m ,10H, (H2 , H4)-cyd),CH₂-aliph], 3.16(d,2H ,H6-cyd, J=5.19).

RMN ¹³C (DMSO_{d6}, 400 MHz , δ en ppm): 181.27 (C=S), 142.71 (C- Ph),134.20(C- Ph), 127.55 (C- Ph), 125.69, 101.99(C1-C_{cyd}), 81.56 (C4-C_{cyd}), 73.08(C3-C_{cyd}), 72.49(C5-C_{cyd}), 72.02(C2-C_{cyd}), 60.10(C6-C_{cyd}).

III.5.4. 6-Deoxy-6-[4-(4-(ethy sulfamoylphényl)-thioureido)-cyclomaltoheptaose (IXd)



C₅₁H₈₁O₃₆N₃S₂
MW =1375.4

Rdt = 86%

Rf = 0.65 dans le système (dioxane : H₂O, 80 /:20).

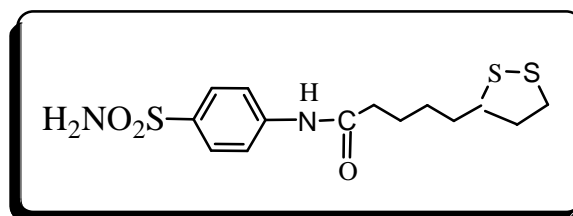
Tf = 209 °C

MS ESI+ m/z 1376.9 [M+H]⁺.

RMN ¹H (400MHz, D₂O , δ en ppm):7.90 (d, 2H, H- Ph), 7.32 (d,2H, H- Ph), 5.03 (m, 7H, H1-cyd), 3.93 (m, 7H, H3-cyd), 3.88 [m, 8H,(H5,OH)-cyd],3.74 (m, 7H, H6-cyd), 3.60 [m , 18H, (H6,H2-H4)-cyd), CH₂.aliph], 3.33-3.44(m , 3H,H4-cyd), 3.20(t , 2H , CH₂.aliph), 3.03-2.88(m ,3H, H4-cyd).

RMN ¹³C (D₂O, 400 MHz , δ en ppm): 184.99(C=S), 144.52 (C- Ph),140.39 (C- Ph), 125.98(C- Ph), 102.01(C1-C_{cyd}), 80.99(C4-C_{cyd}),80.68 , 73.12(C3-C_{cyd}), 71.76(C2-C_{cyd}), 60.00(C6-C_{cyd}).

III.5.5. N-(4-Sulfonamidophényl) -5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide (Xa).



C₁₄H₂₀O₃N₂S₃
MW =360,52

A 0,2g (1éq) de l'acide lipoïque dans 2,5ml de DMA, sont ajoutés 0,167g (1éq) de sulfonilamide et 0,15g (1éq) de DMAP. la solution obtenue est traitée avec 0,186g (1 éq) de l'EDCI Après 6h d'agitation à température ambiante, la phase organique est extraite par l'acétate d'éthyle, ensuite séchée et concentrée sous pression réduite ; le produit ainsi obtenu est purifié sur colonne à gel de silice (DCM /MeOH (85 /15).

Rdt = 40 %

Rf = 0,42 (CH₂Cl₂/MeOH: 9,5/0,5).

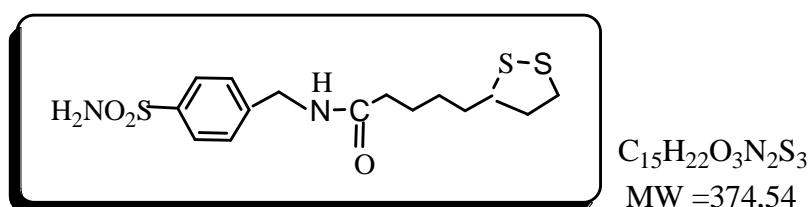
Tf = 176°C.

SM (ESI/MeOH / CH₃CN): m/z (exp.) 359,17 [M-H]⁻ ;394,99 [M+Cl]⁻

RMN 1H (DMSO_{d6}, 400 MHz, δ en ppm): 10.23 (s, 1H), 7.74 (s, 4H), 7.24 (s, 2H), 3.63 (s, 1H), 3.16 (m, 3H), 2.37(m,3H), 1.86(m, 1H), 1.61(m,3H), 1.42(d,2H,J= 7.21Hz).

RMN ¹³C (DMSO_{d6}, 400 MHz , δ en ppm) : 171.69,142.12,126.61, 118.47 , 56.06 , 39.71 , 39.43 , 38.07 , 36.21 , 34.10 , 28.25 , 24.67.

III.5.6. N-[(4-Sulfonamidophenyl)-methyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide (Xb).



A 0,2g(1éq) de l'acide lipoïque dans 2,5ml de DMA sont ajoutés 0,216g (1éq) de 4-aminomethylbenzensulfonamide hydrochloride et 0,15g (1éq) de DMAP. la solution obtenue est traitée avec 0,14ml (1éq) de TEA et 0,186g (1 éq) de l'EDCI. Après 6h d'agitation à température ambiante, la phase organique est extraite par l'acétate d'éthyle, ensuite séchée et concentrée sous pression réduite ; le produit ainsi obtenu est purifié sur colonne à gel de silice (DCM /MeOH (85/15).

Rdt= 66%

Rf = 0,55 (CH₂Cl₂/MeOH : 7,5/1,5).

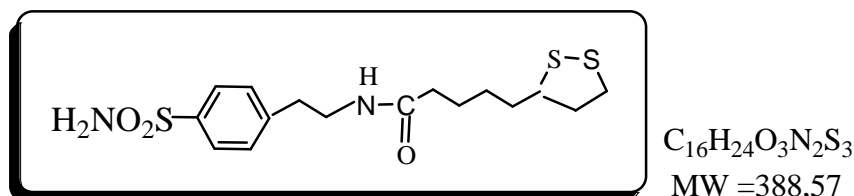
Tf = 124°C.

SM (ESI, MeOH / CH₃CN) : m/z (exp.) 373,27 [M-H]⁻ ; 409,03 [M+Cl]⁻ ;748.80[2M – H]⁻ , 782.99[2M+Cl]⁻ .

RMN 1H (DMSO_{d6}, 400 MHz, δ en ppm), : 8.42 (t, 1H, J=5.95Hz), 7.76 (d, 2H,

$J=8.32\text{Hz}$), 7.40 (d, 2H, $J = 8.32 \text{ Hz}$), 7.32 (s, 2H), 4.31 (d, 2H, $J=5.95\text{Hz}$); 3.61(m,1H), 3.15(m,2H), 2.39(m,1H), 2.14(m,2H), 1.85(m,1H), 1.67 (m, 1H), 1.55 (m, 3H), 1.35(m,2H)
RMN ^{13}C (DMSO d_6 , 400 MHz, δ en ppm,) : 172.25 ; 143.83 ; 142.56 ; 127.48 ; 125.70 ; 56.17 ; 40.34 ; 39.97 ; 38.17 ; 35.16 ; 34.15 ; 28.36 ; 25.05.

III.5.7. N-[(4-Sulfonamidophenyl)-ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide (Xc).



A 0,2g (1éq) de l'acide lipoïque dans 2,5ml de DMA sont ajoutés 0,1194g (1éq) de 4-aminoethylbenzensulfonamide et 0,15g (1éq) de DMAP. La solution obtenue est traitée avec 0,186g (1 éq) de l'EDCI. Après 3h d'agitation à température ambiante, la phase organique est extraite par l'acétate d'éthyle, ensuite séchée et concentrée sous pression réduite ; le produit ainsi obtenu est purifié sur colonne à gel de silice (DCM /MeOH (85 /15).

Rdt = 68%,

Rf = 0,88 (CH $_2$ Cl $_2$ /MeOH: 7,5/1,5).

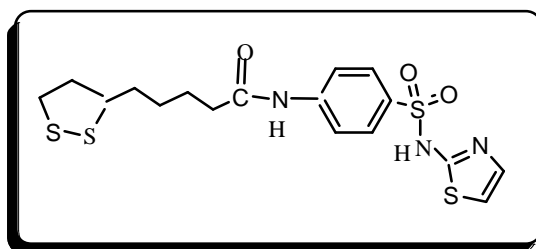
Tf = 131°C.

SM (ESI $^+$; ESI $^-$ /MeOH / CH $_3$ CN): : m/z (exp.) 411,04 [M+Na] $^+$; 387,18 [M-H] $^-$; 423,06[M+Cl] $^-$

RMN ^1H (DMSO d_6 , 400 MHz, δ en ppm), : 7.91 (t, 1H, $J=4\text{Hz}$), 7.73 (d, 2H, $J=4\text{Hz}$), 7.38 (d, 2H, $J=4\text{Hz}$), 7.30 (s, 2H), 3.6 (m, 1H), 3.28 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 2.77 (t, 2H, $J=8\text{Hz}$), 2.4 (m, 1H), 2.02 (t, 2H, $J=8\text{Hz}$), 1.85 (m, 1H), 1.63 (m, 1H), 1.52 (m, 3H), 1.32 (m, 2H).

RMN ^{13}C (DMSO d_6 , 400 MHz, δ en ppm) : 172.17 ; 143.81 , 142.48 , 127.40 ; 125.62 ; 56.09 ; 41.62 ; 40.26 ; 38.08 ; 35.08 ; 34.07 ; 28.28 ; 24.96.

III.5.8 N-[4-(Thiazol-2-yl)-sulfonamidophenyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide (Xd).



$C_{17}H_{21}O_3N_3S_4$

MW = 443.63

Préparé suivant le même mode opératoire précédent par la réaction du couplage entre le sulfathiasole(1éq) et l'acide lipoiéque(1 éq) en présence de l'EDCI(1 éq).

Rdt = 78%.

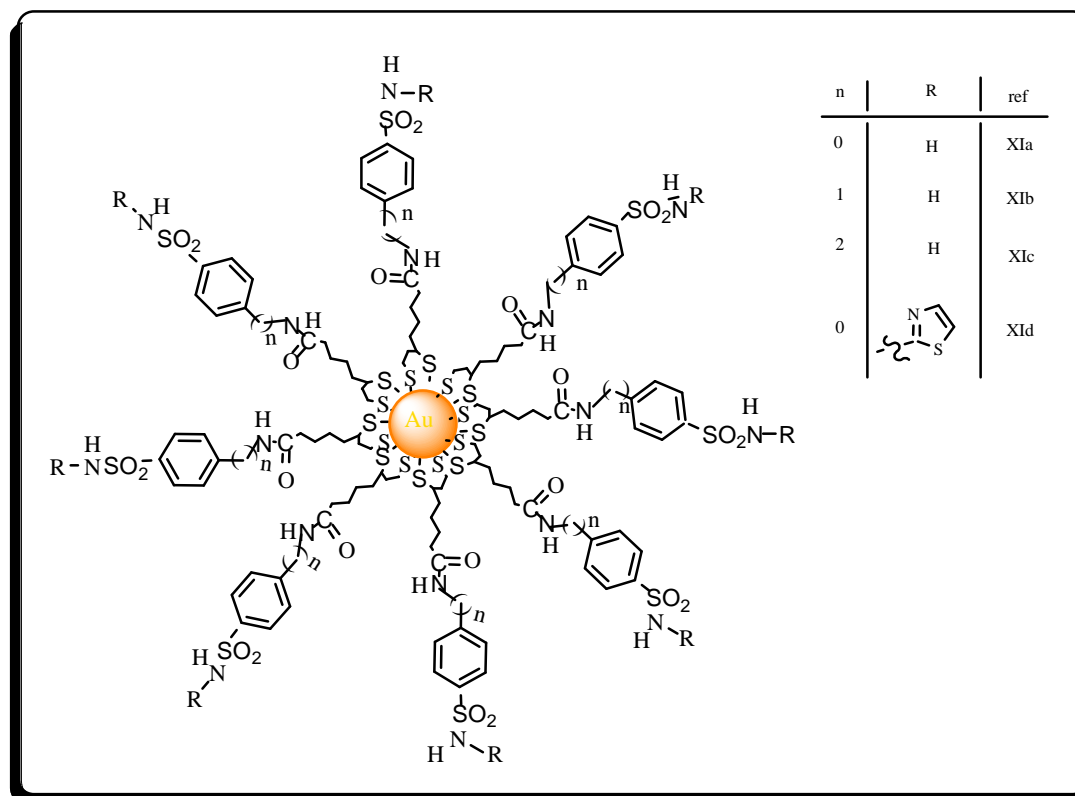
Rf: = 0,35 (CH₂Cl₂/MeOH: 7,5/1,5).

Tf = 147°C.

MS ESI+ *m/z* 466.54 [M+Na]⁺, ESI- *m/z* 442.63 [M-H]⁻.

RMN ¹H (DMSO_{d6}, 400 MHz, δ en ppm), 7.75 (d, 2H, *J*=4Hz), 7.41 (d, 2H, *J*=4Hz), 7.35 (s, 1H), 6.87 (d, 1H), 6.81 (d, 1H), 3.6 (m, 1H), 3.3 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 2.4 (m, 1H), 1.85 (m, 1H), 1.65 (m, 1H), 1.5 (m, 3H), 1.31(m, 2H).

III.6. Synthèse des nanoparticules d'or



Mode opératoire général :

50 mg de $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (8.12 éq) dissout dans 20ml DMSO est rapidement mélangé avec un même volume de DMSO (20ml) contenant 75.5 mg (133.5 éq) de NaBH_4 et (1 éq) du ligand (X_i , $i = a, b, c, d$) ; le mélange réactionnel devient rapidement brun intense. Après 24h d'agitation à température ambiante, 40ml de CH_3CN sont ajoutés pour donner un précipité noir, ce dernier est collecté par centrifugation, lavé deux fois par 60ml de CH_3CN , DMSO (V/V = 1/1) et 60ml d'EtOH puis séché sous vide pendant 12h à 80°C pour donner les nanoparticules d'or (X_i) désirées.

Caractérisations :

La caractérisation des nanoparticules formées est basée, en particulier, sur la détermination de la composition moyenne des édifices. En considérant un arrangement compact cubique à faces centrées des atomes d'or nanostructurées selon une forme sphérique, on a pu calculer le nombre moyen d'atomes d'or composant les nanoparticules préparées. Et à partir de l'analyse élémentaire qui permet d'établir un rapport massique (Au / S) et des analyses à rayons X, on a pu également déduire le nombre et l'aire de chaque ligand attachés sur une nanoparticule.

III.6. 1. Nanoparticules d'or (XIa)

Caractérisations :

Morphologie : nanoparticules homogènes de forme sphériques.

Taille : diamètre moyen 3.14 nm correspondant à 619 atomes d'or par particule.

Analyse par UV-visible :(échantillon en poudre), une bande d'absorption centrée autour de 535 nm caractéristique des nanoparticules d'or

Analyse par XRD : Apparition sur le spectre de 7 bandes caractéristiques d'un arrangement compact des atomes d'or.

Analyse par (EDX) : révèle la présence des éléments C, N, O et S constituant les ligands utilisés.

Le nombre de ligands attaché à chaque nanoparticule estimé à partir des données de l'analyse élémentaire et des analyses à rayons-X est : 117

Formule empirique $[\text{Au}_{619}(\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{N}_3\text{S}_3)_{117}]$.

L'aire occupée par chaque ligand attaché sur une nanoparticule = 0.26nm^2 / ligand

III.6.2. Nanoparticules d'or (XIb)

Caractérisations :

Morphologie : nanoparticules homogènes de forme sphériques.

Taille : diamètre moyen 3.27 nm correspondant à 699 atomes d'or par particule.

Analyse par UV-visible :(échantillon en poudre), une bande d'absorption centrée autour de 535 nm caractéristique des nanoparticules d'or.

Analyse par XRD : Apparition sur le spectre de 7 bandes caractéristiques d'un arrangement compact cubique à faces centrées des atomes d'or.

Analyse par (EDX) : révèle la présence des éléments C, N, O et S constituant les ligands utilisés.

Le nombre de ligands attaché à chaque nanoparticule estimé à partir des données de l'analyse élémentaire et des analyses à rayons-X est : 142.

Formule empirique $[\text{Au}_{699}(\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}_3)_{142}]$.

L'aire occupée par chaque ligand attaché sur une nanoparticule = 0.23nm^2 / ligand.

III.6.3. Nanoparticules d'or (XIc)

Caractérisations :

Morphologie : nanoparticules homogènes de forme sphériques.

Taille : diamètre moyen 3.33 nm correspondant à 720 atomes d'or par particule.

Analyse par UV-visible :(échantillon en poudre), une bande d'absorption centrée autour de 535 nm caractéristique des nanoparticules d'or

Analyse par XRD : Apparition sur le spectre de 7 bandes caractéristiques d'un arrangement compact des atomes d'or.

Analyse par (EDX) : révèle la présence des éléments C, N, O et S constituants les ligands utilisés.

Le nombre de ligands attaché à chaque nanoparticule estimé à partir des données de l'analyse élémentaire et des analyses à rayons-X est : 144.

Formule empirique $[\text{Au}_{720}(\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}_3)_{144}]$.

L'aire occupée par chaque ligand attaché sur une nanoparticule = $0.23\text{nm}^2 / \text{ligand}$.

III.6.4. Nanoparticules d'or (XIId)

Caractérisations :

Morphologie : nanoparticules homogènes de forme sphériques.

Taille : diamètre moyen 3.30 nm correspondant à 724 atomes d'or par particule.

Analyse par UV-visible :(échantillon en poudre), une bande d'absorption centrée autour de 535 nm caractéristique des nanoparticules d'or

Analyse par XRD : Apparition sur le spectre de 7 bandes caractéristiques d'un arrangement compact des atomes d'or.

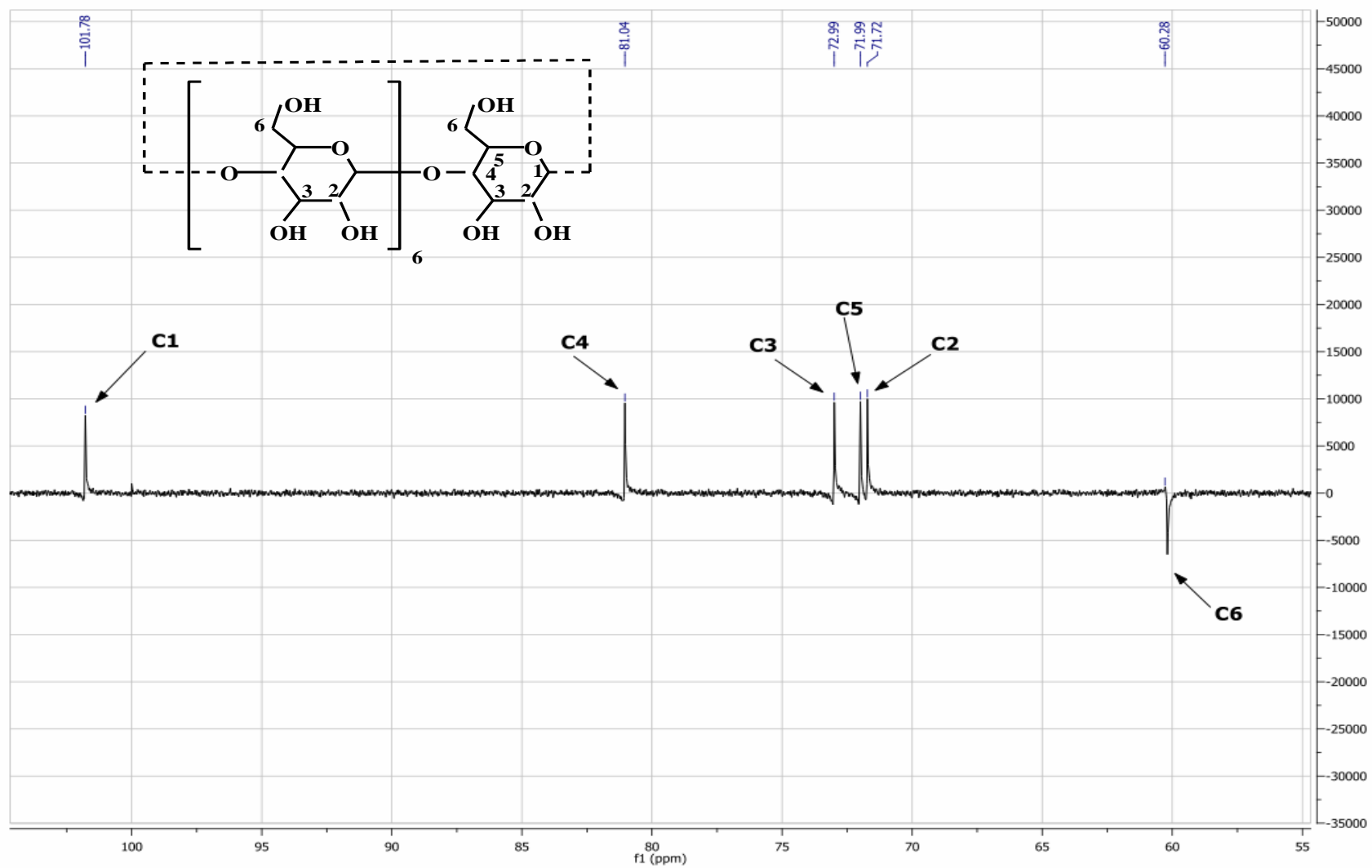
Analyse par (EDX) : révèle la présence des éléments C, N, O et S constituants les ligands utilisés.

Le nombre de ligands attachés à chaque nanoparticule estimé à partir des données de l'analyse élémentaire et des analyses à rayons-X est : 135.

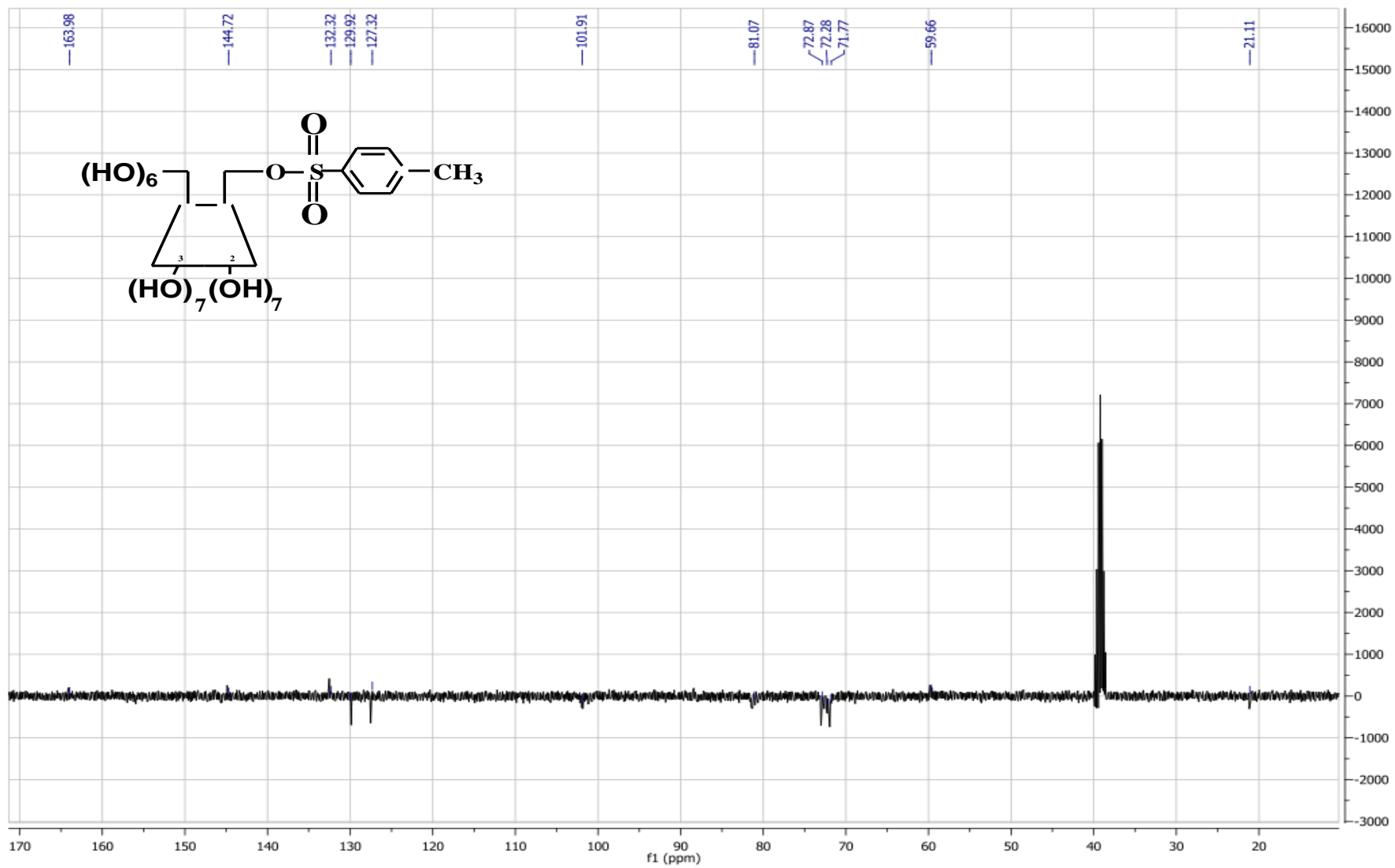
Formule empirique $[\text{Au}_{724}(\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{N}_3\text{S}_4)_{135}]$

L'aire occupée par chaque ligand attaché sur une nanoparticule = $0.25\text{nm}^2 / \text{ligand}$.

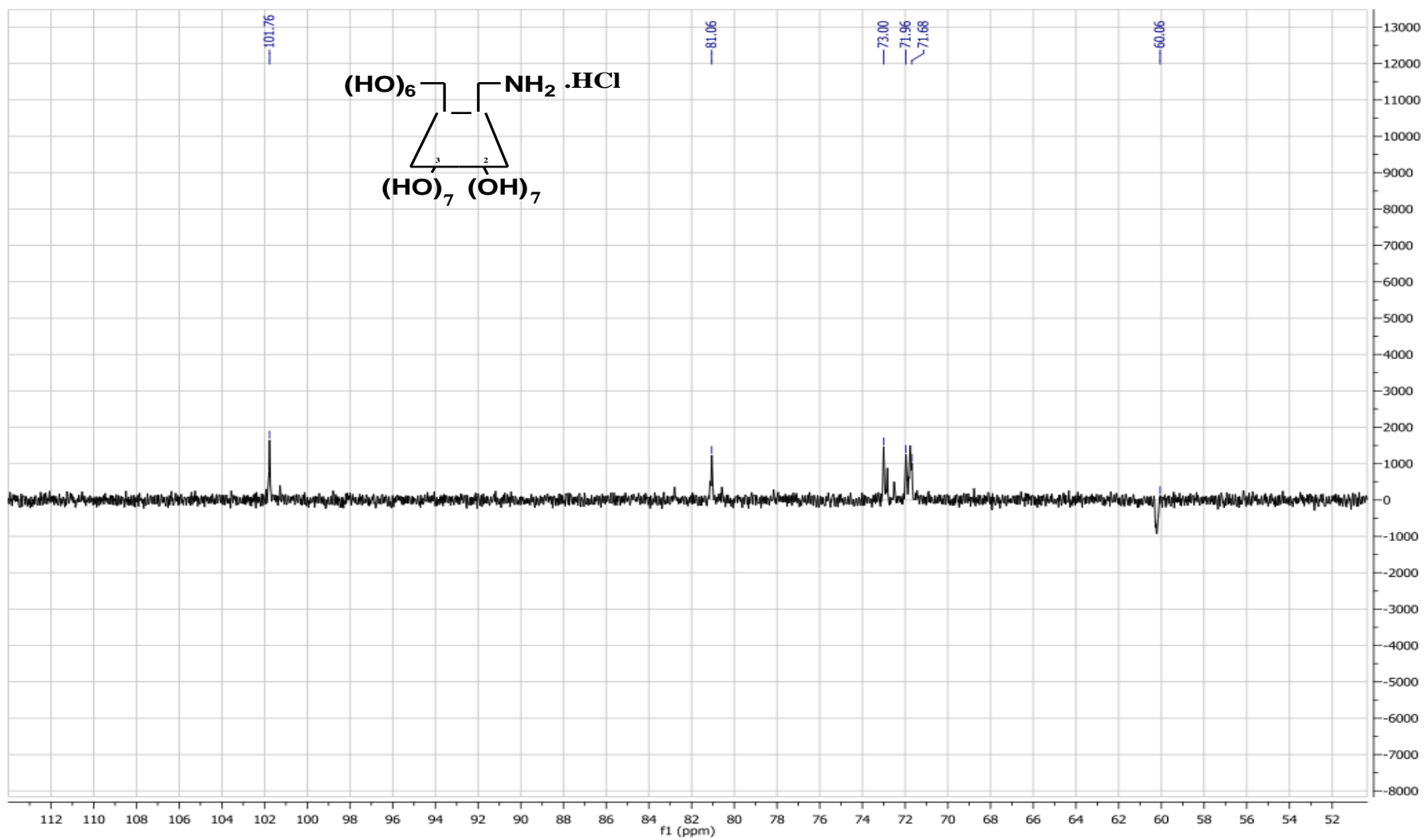
Annexes



Spectre RMN ¹³C de la β-CD dans le D₂O.



Spctre RMN ^{13}C du mono-tosylate β -CD dans le DMSO- d_6 .



Spectre RMN ¹³C du Chlorhydrate du mono-amino-6-β-CD dans le D₂O.

Q-TOF

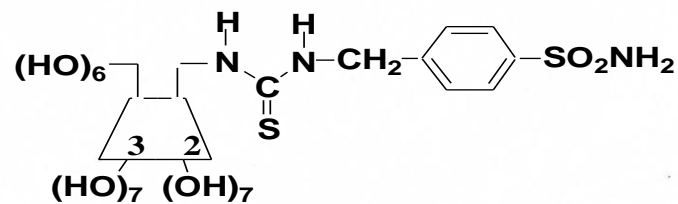
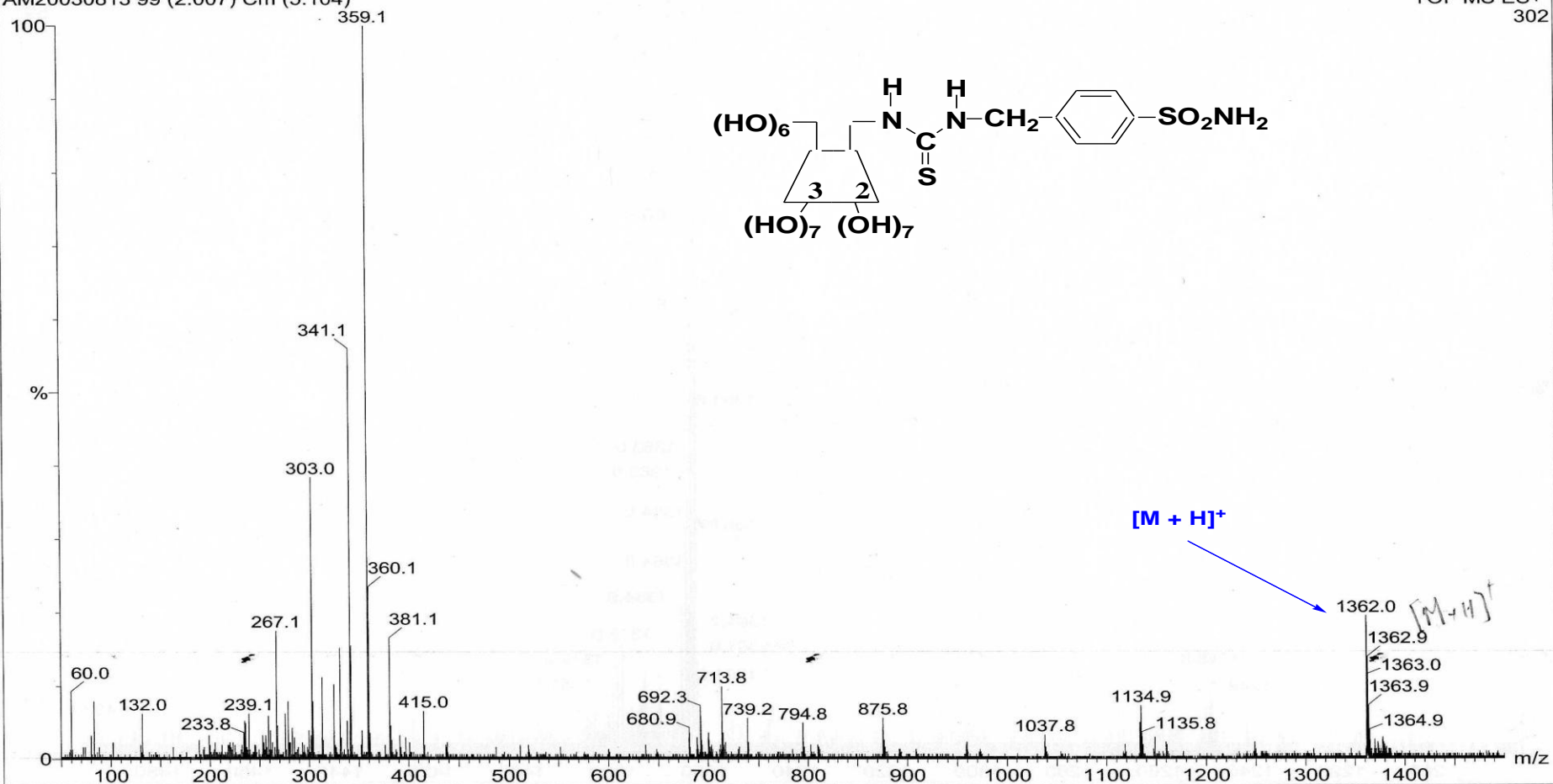
AM20030813 99 (2.007) Cm (5:104)

DC 74 / M = 1362

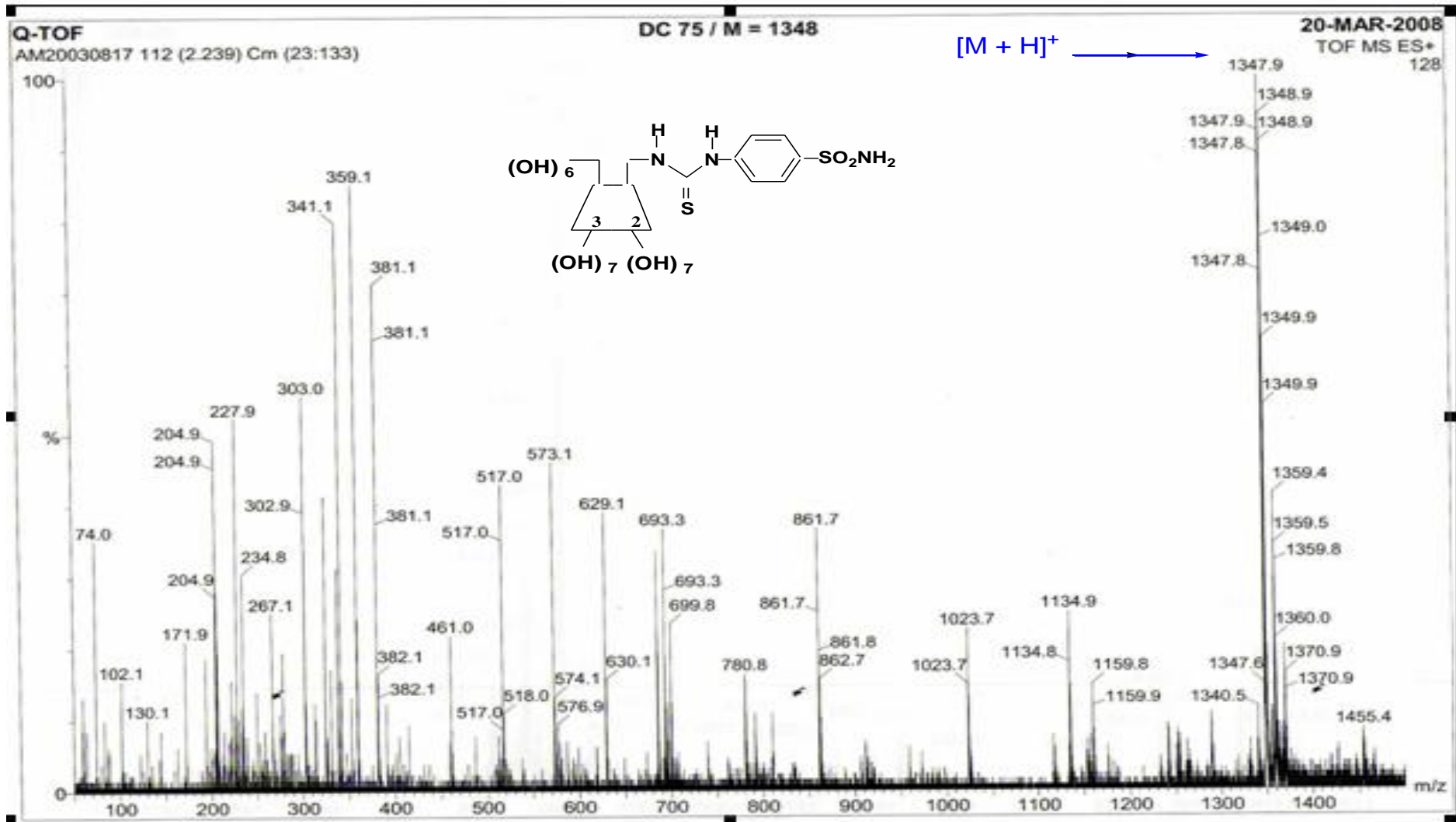
20-MAR-2008

TOF MS ES+

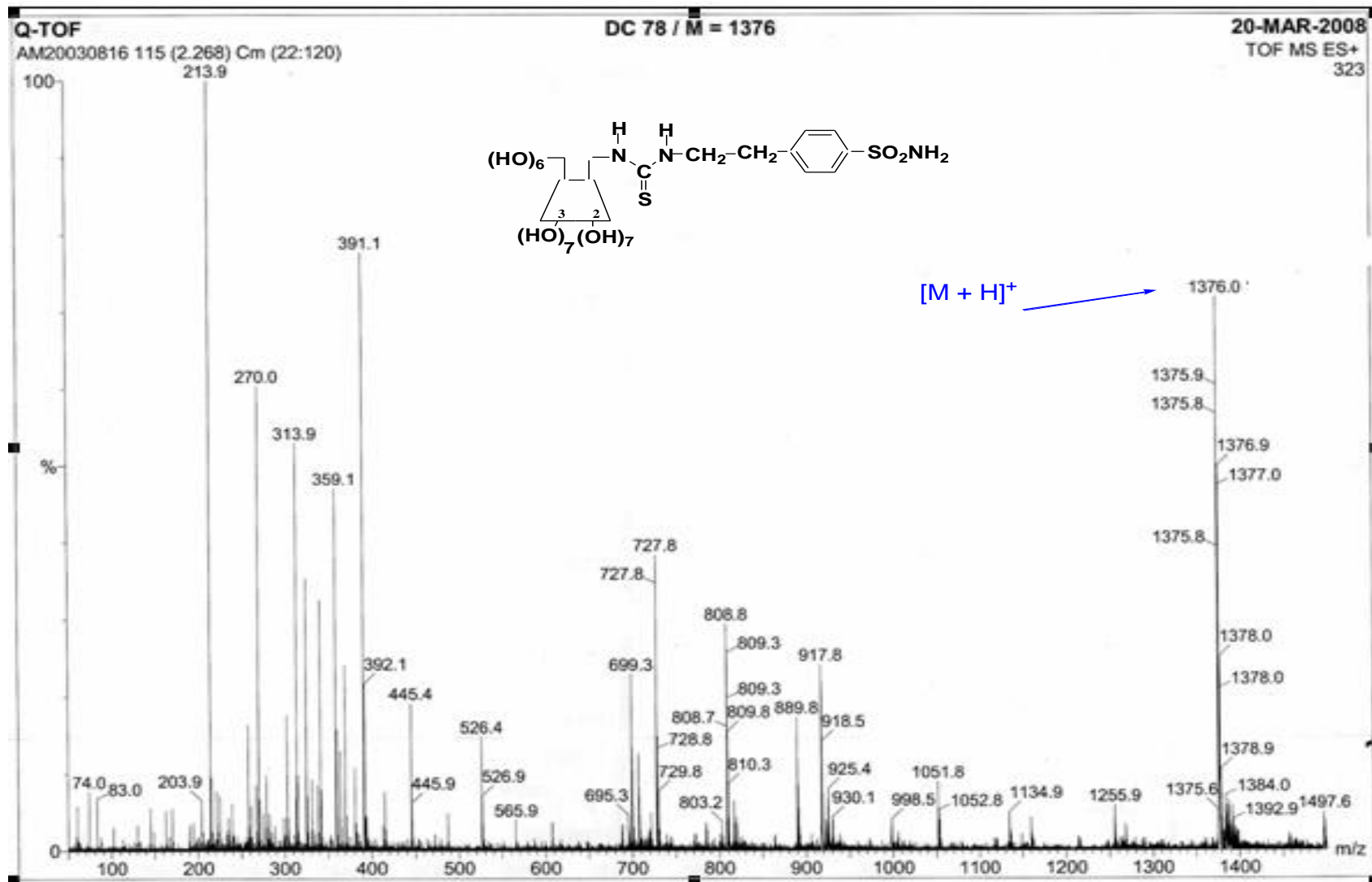
302



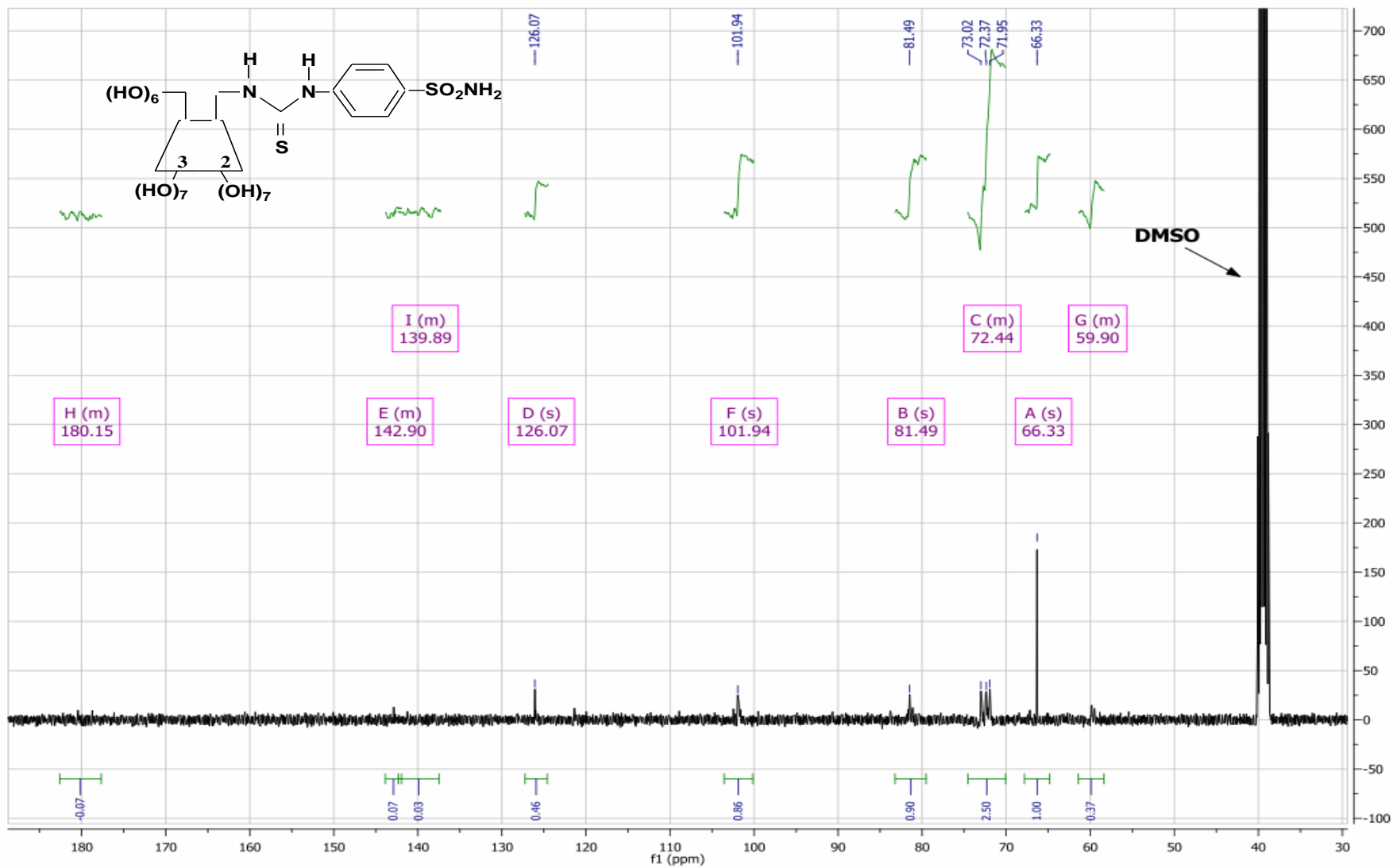
Spctre de masse MS-ES⁺ du composé (IXc)



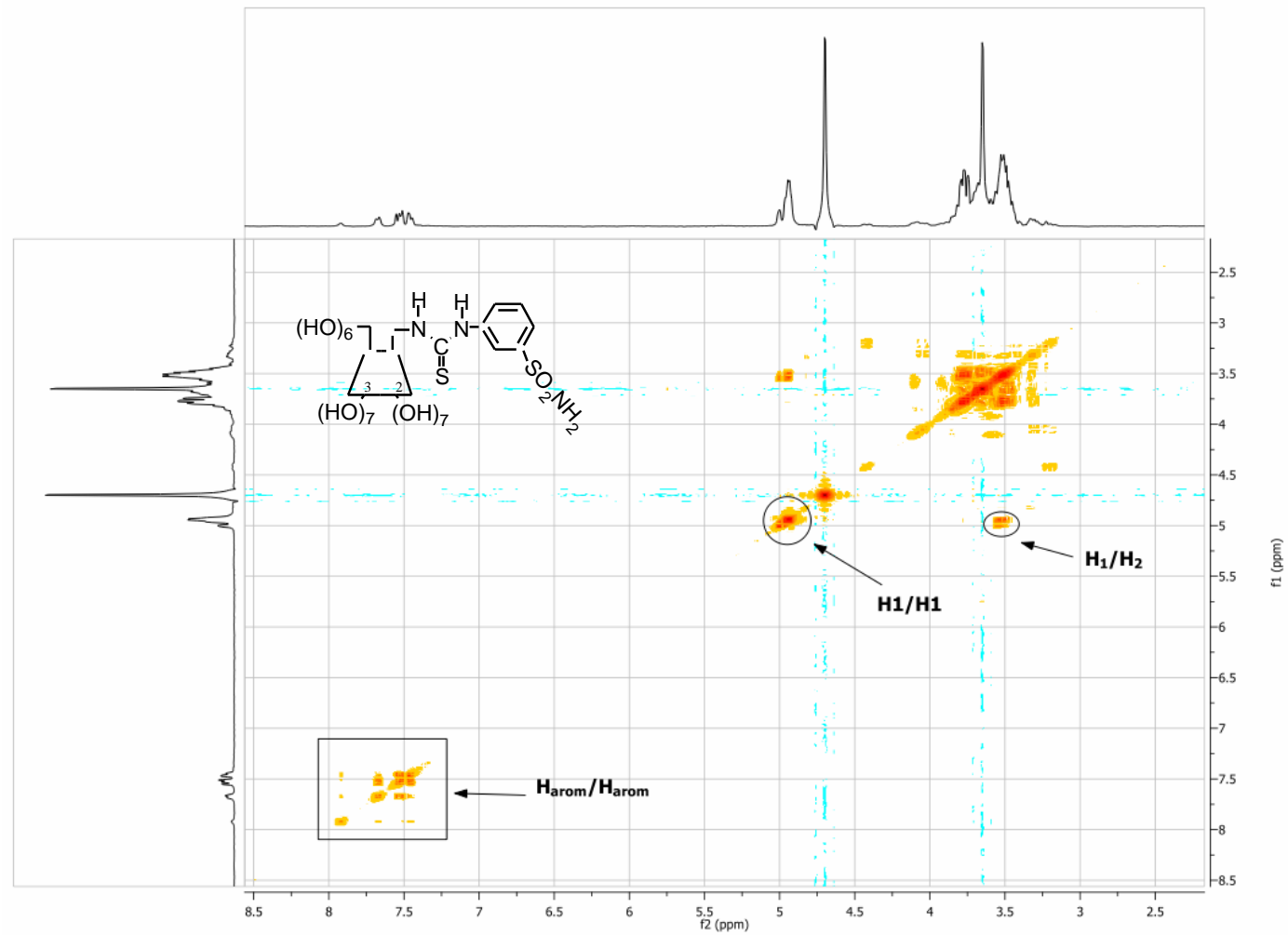
Spectre de masse MS-ES⁺ du composé (IXa).



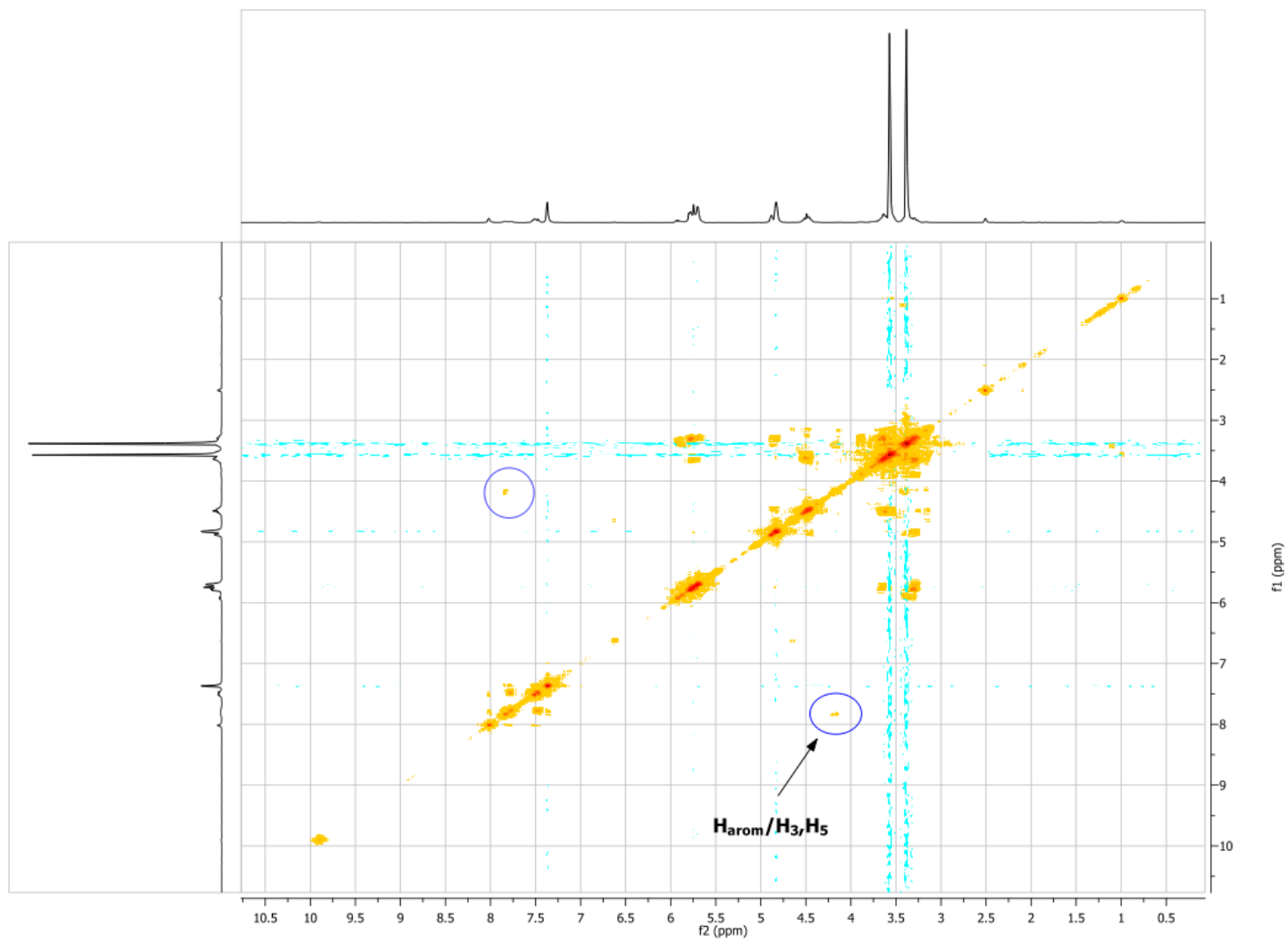
Spectre de masse MS-ES⁺ du composé (IXd).



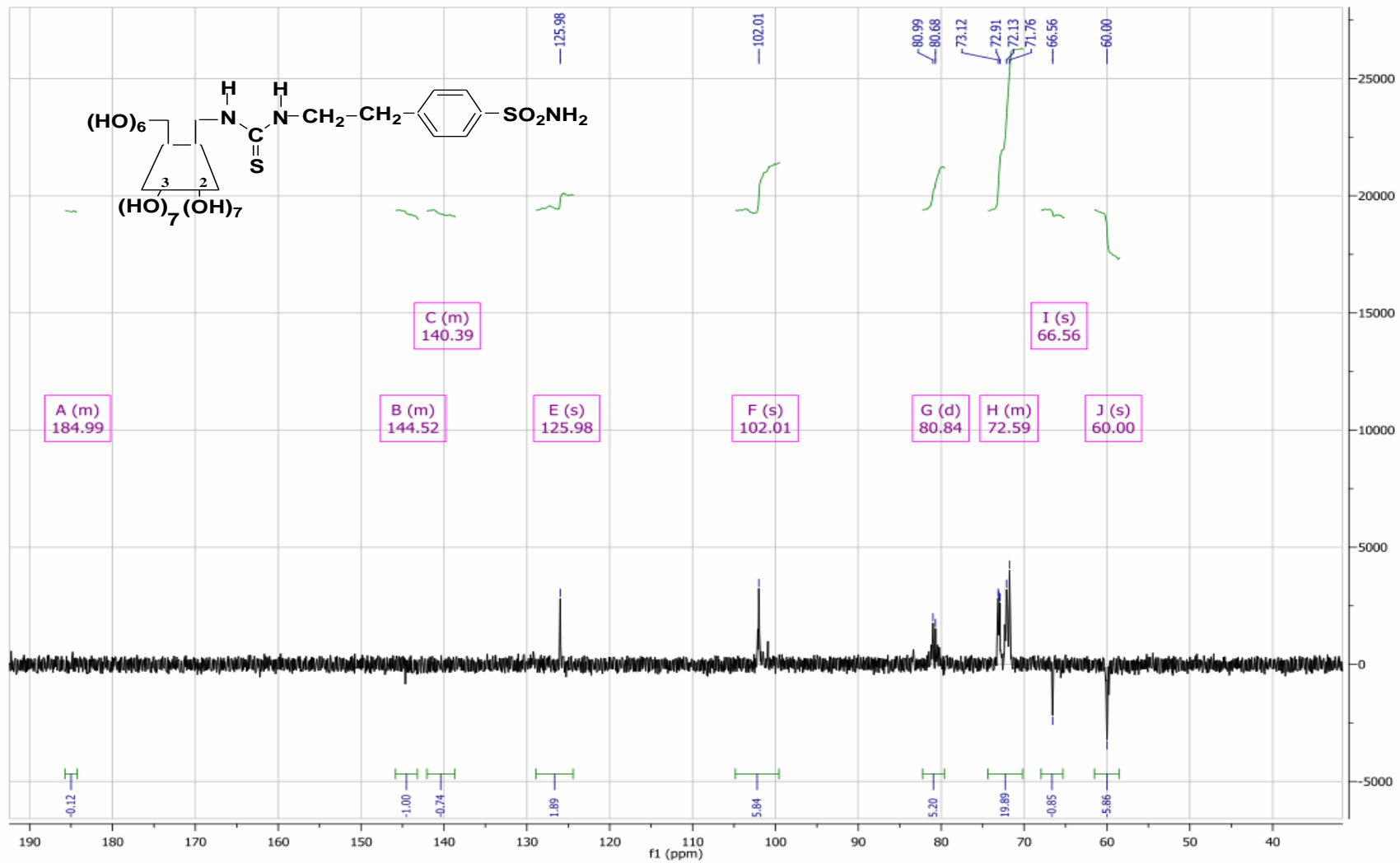
Spectre RMN ^{13}C du composé (IXa).dans le DMSO- d_6 .



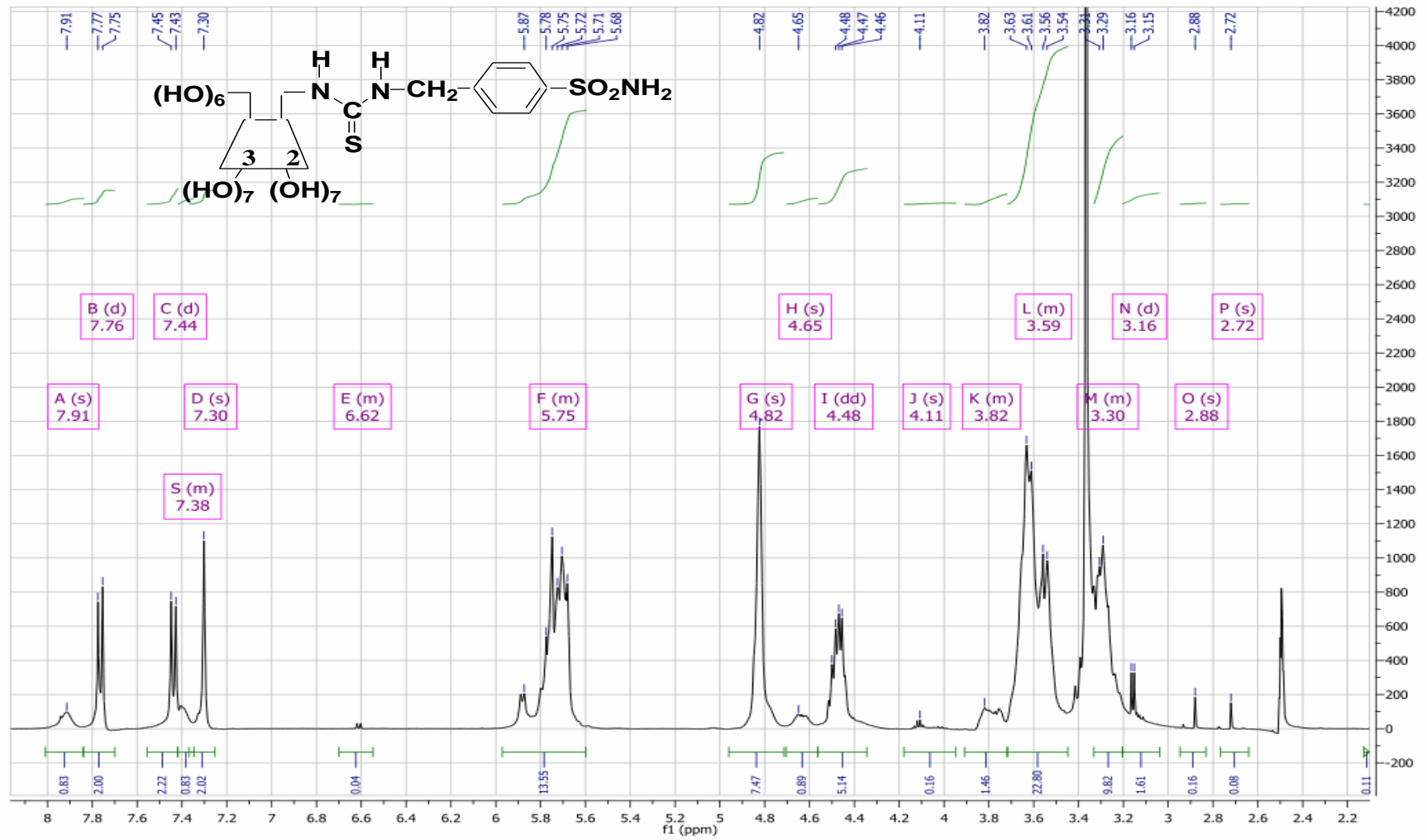
Spectre COSY ^1H - ^1H du composé (IXb) dans le D_2O



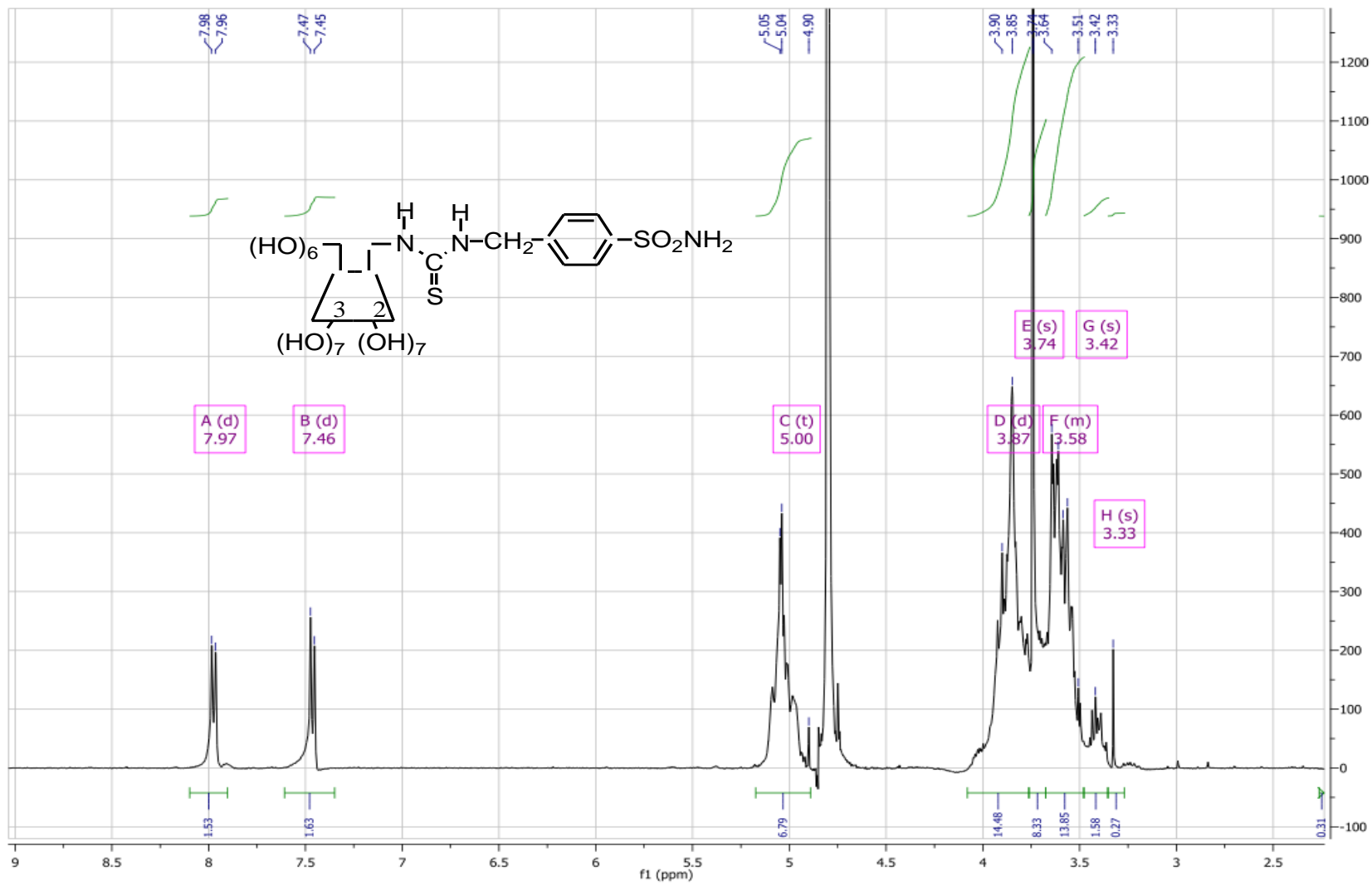
Spectre NOESY du composé (IXb) dans le D_{MSO-d₆}.



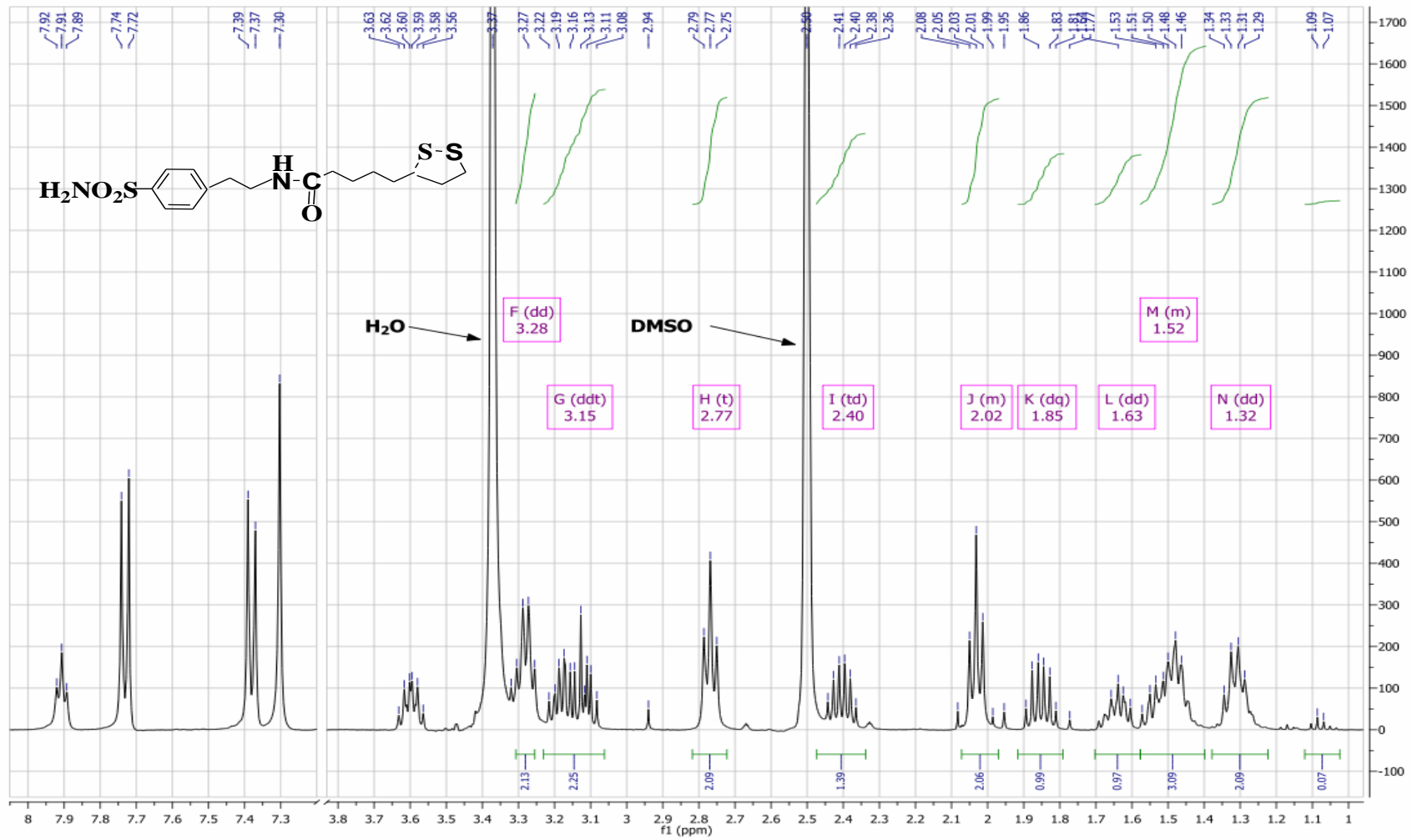
Spectre RMN ^{13}C du composé (IXd) dans le D_2O .



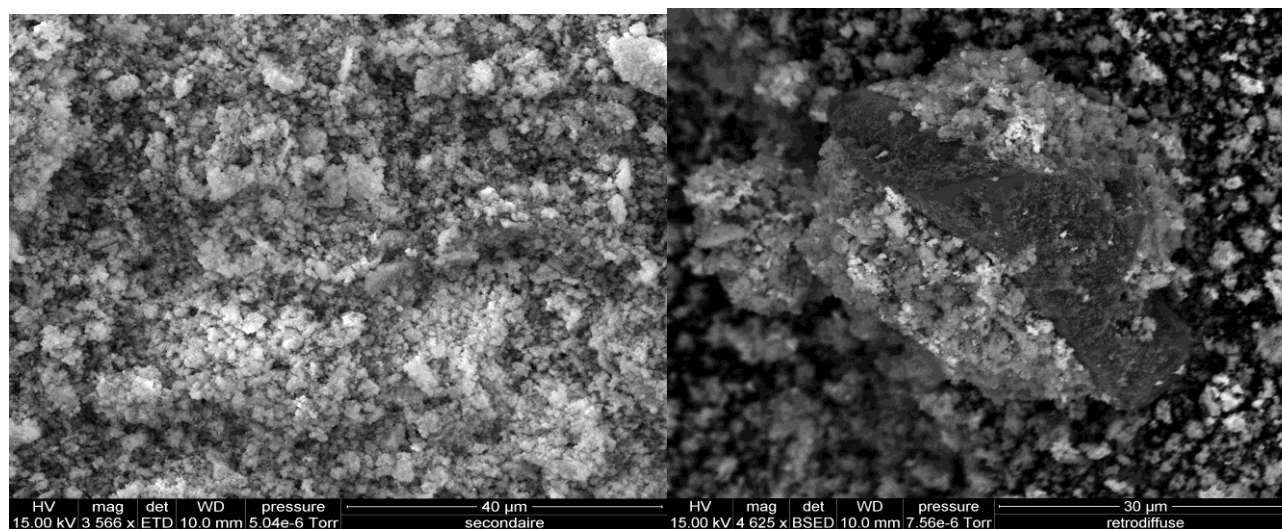
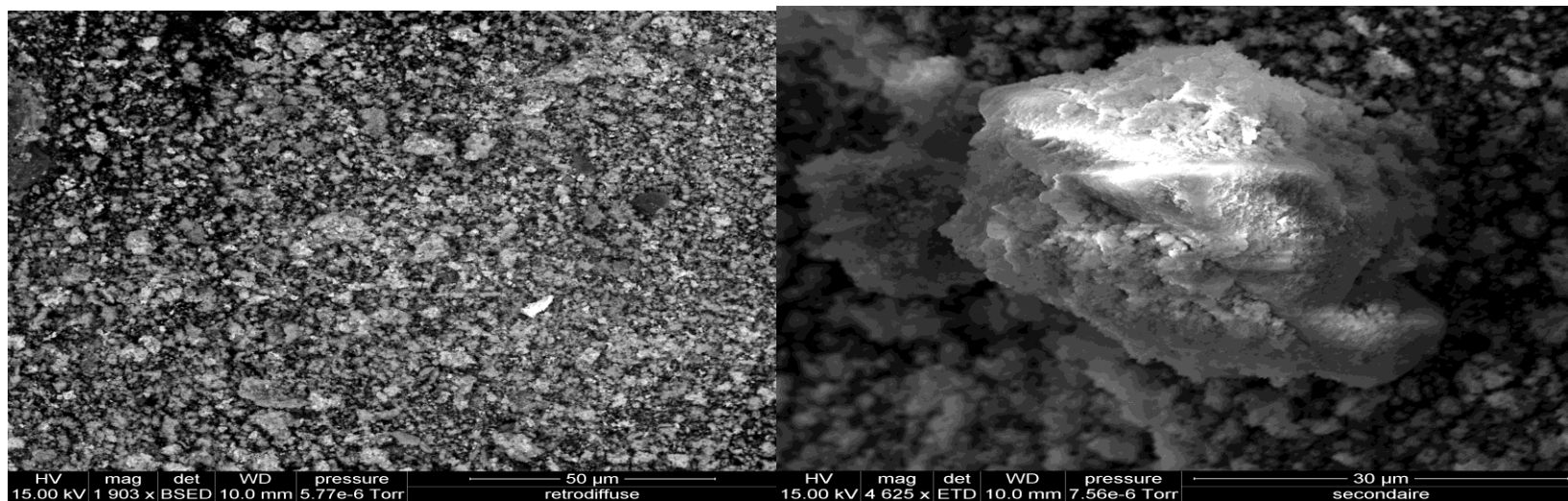
Spectre RMN¹H du composé (IXc) dans le DMSO-d₆.



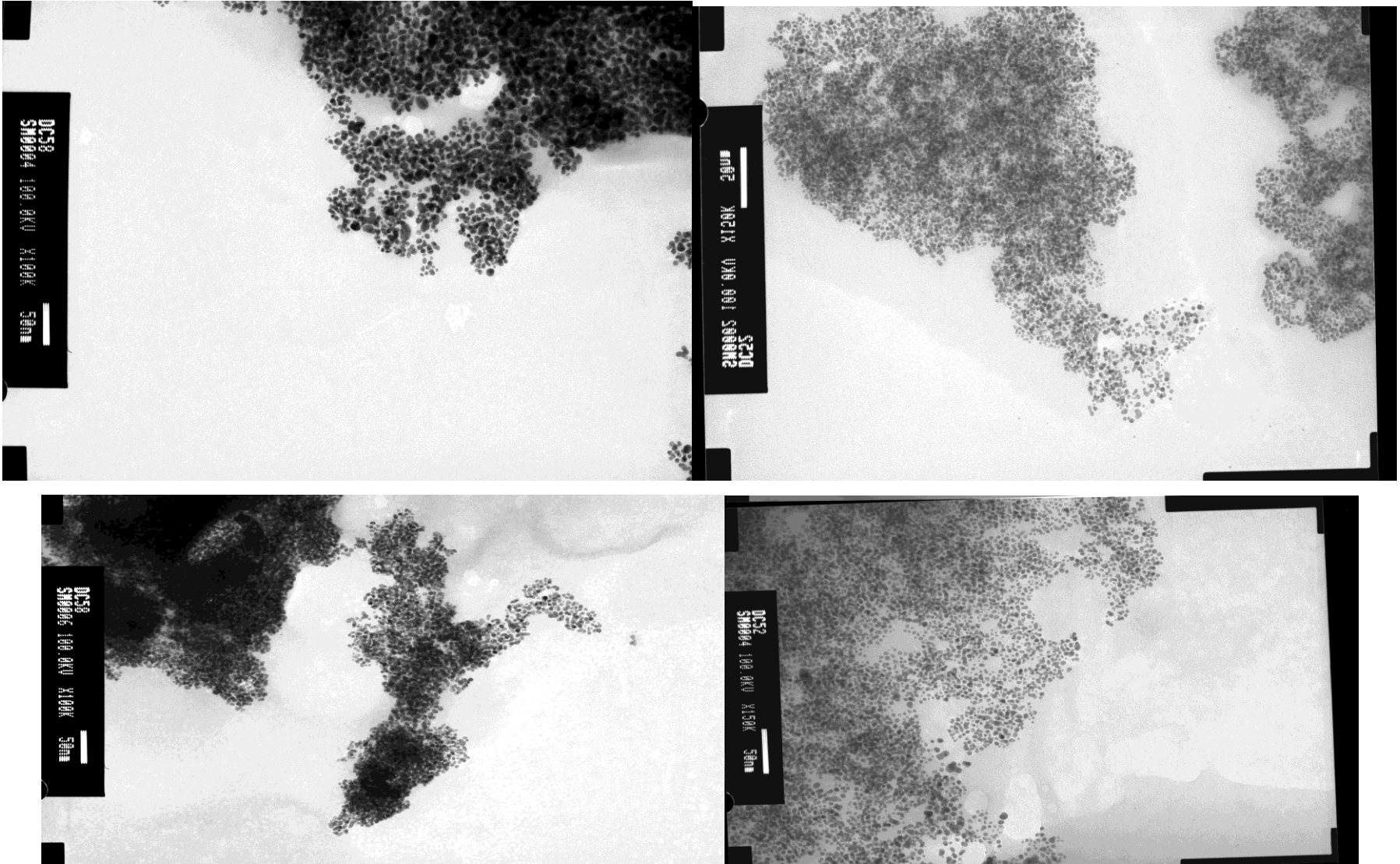
Spectre RMN¹H du composé IXc dans le D2O.



Spectre RMN¹H du composé (Xc) dans le DMSO-d₆.



Images par MEB prises pour l'échantillon (XIc)



Autres images par TEM prises pour l'échantillon (XIc)

Carbonic Anhydrase Inhibitor Coated Gold Nanoparticles Selectively Inhibit the Tumor-Associated Isoform IX over the Cytosolic Isozymes I and II

Maamar Stiti,^{†,‡} Alessandro Cecchi,[§] Marouan Rami,[†] Mohamed Abdaoui,[‡] Véronique Barragan-Montero,[†] Andrea Scozzafava,[§] Yannick Guari,^{||} Jean-Yves Winum,^{*,†} and Claudiu T. Supuran^{*,§}

Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) UMR 5247 CNRS-UM1-UM2 Bâtiment de Recherche Max Mousseron, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, Montpellier Cedex, France, Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma, Guelma, Algeria, Università degli Studi di Firenze, Polo Scientifico, Laboratorio di Chimica Bioorganica, Florence, Italy, and Institut Charles Gerhardt, UMR 5253, CMOS, Université Montpellier II, Montpellier Cedex, France

Received July 25, 2008; E-mail: winumj@univ-montp2.fr; claudiu.supuran@unifi.it

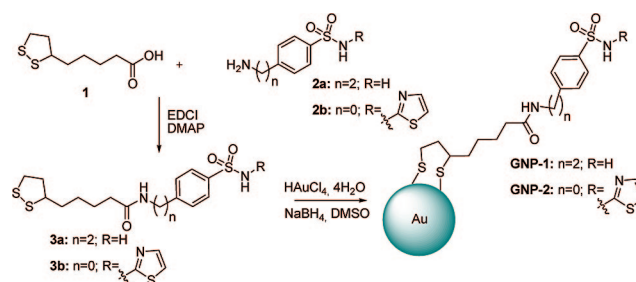
The carbonic anhydrases (CAs, EC 4.2.1.1) are ubiquitous metallo-enzymes with five independently evolved ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \zeta$) classes reported up to date.^{1–3} These enzymes catalyze the reversible hydration of carbon dioxide to bicarbonate and protons by means of a metal-hydroxide ($\text{Lig}_3\text{M}^{2+}(\text{OH})^-$) mechanism.²

In addition to the established role of the carbonic anhydrase inhibitors (CAIs) as diuretics and antiglaucoma drugs, it has recently emerged that CAIs could have potential as novel antiobesity, anticancer, and anti-infective drugs.^{1,2} A critical problem in the design of CAIs is related to the high number of isoforms in mammals (15), their diffuse localization in many tissues/organs, and the lack of isozyme selectivity of the presently available inhibitors.^{1–4}

Recently, nanoparticles received great attention for their biomedical applications both for the site-specific delivery of drugs⁷ or for imaging purposes.^{7,8} Several recent such examples include HIV inhibition with a CCR5 antagonist attached to multivalent gold nanoparticles (Au NPs), tumor targeting with NPs loaded with hydroxycamptothecin, paclitaxel, or fumagillin, and magnetic resonance imaging (MRI) techniques of tumors based on integrins targeting with Fe_3O_4 NPs, computer tomography (CT) or MRI imaging with gadolinium chelate Au NPs, etc.^{7,8}

Human CA IX (hCA IX) is an extracellular, transmembrane isoform which was recently shown to constitute a novel and interesting target for the anticancer therapy due to its overexpression in many cancer tissues and not in their normal counterparts.^{1b,9} Its expression is strongly induced by hypoxia present in many tumor tissues and correlated with a bad response to classical chemo- and radiotherapies.^{1b,9} CA IX was shown to acidify the extratumoral medium leading both to the acquisition of metastatic phenotypes and to chemoresistance with many anticancer drugs, these processes being reverted by inhibition of the enzyme catalytic activity with sulfonamide inhibitors.^{1b,9} The development of selective CA IX inhibitors might provide useful tools for highlighting the exact role of CA IX in hypoxic cancers, to control the pH imbalance of tumor cells and lead to novel diagnostic or therapeutic applications for the management of such tumors.^{1b,9} Although many sulfonamide/sulfamate/sulfamide potent CA IX inhibitors were reported, few of them show an acceptable level of selectivity for inhibiting the transmembrane-tumor associated target isoform IX over the cytosolic, ubiquitous isozymes hCA I and II.^{1b,9} Considering the extracellular localization of the target CA isoform and the fact that nanomaterials generally show membrane impermeability,¹⁰ we

Scheme 1. Synthesis of Au NPs Coated with Sulfonamide CAI, of Type **GNP-1** and **GNP-2**



report here the synthesis of CAI coated Au NPs which show excellent CA IX inhibitory properties and selectivity for the inhibition of the tumor-associated isoform over hCA I and II.

The key intermediate **3a** was synthesized by coupling lipoic acid **1** with 4-aminoethylbenzene sulfonamide **2a** in the presence of EDCI/DMAP, as outlined in Scheme 1. The CAI coated Au NPs (**GNP-1**) were then prepared in a single step by reduction of chloroaurate with NaBH_4 in the presence of the lipoic acid tailed sulfonamide **3a**.^{11,12} The same strategy has been used to prepare a sulfathiazole–lipoic acid Au NPs conjugate (**GNP-2**) which has been used as a control, since substituted sulfonamides do not act as CAIs.¹ The NPs were characterized by transmission electron microscopy (TEM) (Supporting Information, Figure 1) being observed that they are roughly spherical in shape. These particles are monodispersed with an average particle size of 3.3 nm which corresponds to ~ 720 – 724 Au atoms. Energy dispersive X-ray analysis (EDX) and elemental analysis allowed us to estimate the number of sulfonamide ligands attached to the NP as being 144 for **GNP-1** and 135 for **GNP-2**. The average surface area occupied by one ligand unit **3a** is ~ 0.24 nm². **GNP-1** has the empirical formula $[\text{Au}_{720}(\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}_3)_{144}]$, and **GNP-2** $[\text{Au}_{724}(\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{N}_3\text{S}_4)_{135}]$, which were confirmed by elemental analysis data. The powdered materials **GNP-1/2** showed an intense plasmon band absorbance at 540 nm characteristic of Au(0) NPs.¹² The powder X-ray diffraction (XRD) patterns of the Au NPs **GNP-1/2** in the range 2θ (20° – 140°) (Supporting Information Figure 2) presented seven of the main diffractions characteristic of the Au cubic phase at 38.6° , 44.9° , 64.9° , 78.1° , 82.2° , 111.2° , and 135.5° . The peak broadness may be explained by the small size of the crystalline domains. The peak of the d_{111} reflection has been deconvoluted to the Lorentzian curve for determining the full width at half-maximum (FMWH) value. The crystalline domain has been calculated from the Debye–Scherrer formula using the FMWH value of the corresponding index peaks giving an average

[†] Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier.

[‡] Université de Guelma.

[§] Università degli Studi di Firenze.

^{||} Université Montpellier II.

Table 1. CA Inhibition Data Against Isoforms CA I, II and IX With the Standard Sulfonamide in Clinical Use Acetazolamide **AZA**, the New Sulfonamides **3a,b**, and **GNP-1/2**^a

compound	K_i (nM)		
	hCA I	hCA II	hCA IX
AZA	250 ± 12	12 ± 1	25 ± 1
3a	214 ± 9	230 ± 10	41 ± 2
GNP-1	581 ± 18 (128)	451 ± 21 (116)	32 ± 2 (2.4)
3b	>50 000	>50 000	>50 000
GNP-2	28 550	30 400	31 050
Au@	32 000	31 600	29 560

^a Data in parentheses show the inhibition constants when enzyme and inhibitor were incubated for 2 h.¹⁴

value of ~4.0 nm which is concomitant with the value 3.3 ± 1.4 nm obtained from TEM images.¹²

Inhibition data of **3a,b**, **GNP-1/2**, the standard, clinically used CAI acetazolamide **AZA** (5-acetamido-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide), and Au NPs (Au@) as control, against isoforms hCA I and II (cytosolic isoforms) and the transmembrane, tumor-associated isozyme hCA IX (a construct incorporating the catalytic domain and proteoglycan regions of the enzyme),¹³ are shown in Table 1.¹⁴ A stopped-flow method has been used for assaying the CA-catalyzed CO₂ hydration activity with Phenol red as indicator, working at the absorbance maximum 557 nm, following the initial rates of the CA-catalyzed CO₂ hydration reaction for 10–100 s. For each inhibitor at least six traces of the initial 5–10% of the reaction have been used for determining the initial velocity. The uncatalyzed rates were determined in the same manner and subtracted from the total observed rates. Stock solutions of inhibitor (0.01 μM) were prepared in distilled-deionized water with 5% DMSO, and dilutions up to 0.01 nM were done thereafter with distilled-deionized water. The NPs were soluble in this solvent mixture. Inhibitor (concentration range 0.01 μM–0.01 nM) and enzyme solutions ([E] = 10 nM) were preincubated together for 15 min–2 h at room temperature prior to assay, to allow for the formation of the E–I complex. The inhibition constants were obtained by nonlinear least-squares methods using PRISM 3, and represent the mean from at least three different determinations. In the standard conditions used to determine the inhibition constants, i.e., incubation time 15 min, the sulfonamides **AZA**, **3a** and **GNP-1** were modest hCA I inhibitors (K_i 's of 214–581 nM), **AZA** was an effective CA II and IX inhibitor (K_i 's of 12–25 nM) whereas the new sulfonamides **3a** and **GNP-1** were moderate–weak CA II inhibitors (K_i 's of 230–451 nM) and effective CA IX inhibitors (K_i 's of 32–41 nM). However, when inhibitors and enzymes were incubated for 2 h (or longer) **GNP-1** (but not the other sulfonamides) showed an enhanced inhibitory activity against all three isozymes, with inhibition constants of 128 nM against hCA I, 116 nM against hCA II, and 2.4 nM against hCA IX, respectively (Table 1). In control experiments, the sulfathiazole liponic acid conjugate **3b**, its Au NPs derivative **GNP-2**, and uncoated Au NPs were assayed under the same conditions. It may be observed that **3b**, **GNP-2**, and Au@ show very weak, micromolar inhibition or no inhibition at all against all CA isoforms. Thus, the inhibition observed with **GNP-1** is due to the interactions of its sulfonamide moiety with the enzyme active site. Inhibitors **3a** and **GNP-1** also showed good selectivity for inhibiting CA IX over CA I and II (Table 1), probably due to the fact that some key residues for the binding of inhibitors^{1,2,4} (such as Phe131 and Gly132) are different in the cytosolic and transmembrane isozymes, as rationalized earlier by us.⁹

We investigated the penetrability of these CAIs through membranes using red blood cells (RBCs) as an experimental model for *in vivo* inhibition of transmembrane versus cytosolic isozymes.¹⁵ The experi-

ments were performed by incubation of RBCs with millimolar concentrations of sulfonamide inhibitors (**AZA**, **3a**, and **GNP-1**). Incubation with **AZA** and sulfonamide **3a** led to saturation with the inhibitor of the two isozymes present in erythrocytes (CA I and II), after 30–60 min (Supporting Information, Table 2).^{15,16} This is due to the high diffusibility through membranes of these inhibitors. On the contrary, **GNP-1** was only detected in negligible amounts within the RBCs (even after 2–24 h incubation time), proving that the CAI coated Au NPs are unable to penetrate through biological membranes. These experiments show that the CAI coated Au NPs are totally membrane-impermeant, which is a highly desirable feature for a compound that should inhibit selectively only CA IX which possesses and extracellular active site. Thus, **GNP-1** constitutes an interesting candidate to be investigated for both imaging and treatment purposes of tumors overexpressing CA IX.

Acknowledgment. This research was supported in part by a Franco-Algerian Intergovernmental Program and by two EU grants of the 6th Framework Programme (EUROXY and DeZnIT projects).

Supporting Information Available: The synthesis, characterization, and *in vitro/lex vivo* enzymatic studies are described in detail. This material is available free of charge *via* the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) (a) Krishnamurthy, V. M.; Kaufman, G. K.; Urbach, A. R.; Gitlin, I.; Gudiksen, K. L.; Weibel, D. B.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 946–1051. (b) Supuran, C. T. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, *7*, 168–181.
- (2) (a) Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Conway, J., Eds. *Carbonic anhydrase - Its inhibitors and activators*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2004; pp 1–376 and references cited therein. (b) Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Casini, A. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 146–189.
- (3) (a) Tripp, B. C.; Smith, K. S.; Ferry, J. G. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48615–8. (b) Klengel, T.; Liang, W. J.; Chaloupka, J.; Ruoff, C.; Schropel, K.; Naglik, J. R.; Eckert, S. E.; Morgensen, E. G.; Haynes, K.; Tuite, M. F.; Levin, L. R.; Buck, J.; Mühlischlegel, F. A. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 2021–6.
- (4) Aaron, J. A.; Chambers, J. M.; Jude, K. M.; Di Costanzo, L.; Dmochowski, I. J.; Christianson, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6942–3.
- (5) (a) Casini, A.; Scozzafava, A.; Mincione, F.; Menabuoni, L.; Ilies, M. A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4884–892. (b) Supuran, C. T.; Clare, B. W. *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, *34*, 41–50.
- (6) Nishimori, I.; Onishi, S.; Takeuchi, H.; Supuran, C. T. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 622–30.
- (7) (a) Bowman, M. C.; Ballard, T. E.; Ackerson, C. J.; Feldheim, D. L.; Margolis, D. M.; Melander, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6896–7. (b) Xie, J.; Chen, K.; Lee, H. Y.; Xu, C.; Hsu, A. R.; Peng, S.; Chen, X.; Sun, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7542–3. (c) Wang, A.; Li, S. *BMC Biotechnol.* **2008**, *8*, 46–53.
- (8) Ansell, S. M.; Johnstone, S. A.; Tardi, P. G.; Lo, L.; Xie, S.; Shu, Y.; Harasym, T. O.; Harasym, N. L.; Williams, L.; Bermudes, D.; Liboiron, B. D.; Saad, W.; Prud'homme, R. K.; Mayer, L. D. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3288–96.
- (9) (a) Winum, J. Y.; Rami, M.; Scozzafava, A.; Montero, J. L.; Supuran, C. T. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 445–63. (b) Thiry, A.; Dogné, J. M.; Masereel, B.; Supuran, C. T. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 566–73. (c) Svastova, E.; Hulikova, A.; Rafajova, M.; Zatovicova, M.; Gibadulinova, A.; Casini, A.; Cecchi, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T.; Pastorek, J.; Pastorekova, S. *FEBS Lett.* **2004**, *577*, 439–45. (d) Alterio, V.; Vitale, R. M.; Monti, S. M.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Cecchi, A.; De Simone, G.; Supuran, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8329–35.
- (10) Verma, A.; Uzum, O.; Hu, Y.; Hu, Y.; Han, H. S.; Watson, N.; Chen, S.; Irvine, D. J.; Stellacci, F. *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 588–95.
- (11) Brust, M.; Fink, J.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Kiely, C. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1655–1656.
- (12) Daniel, M. C.; Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346.
- (13) Hilvo, M.; Baranauskienė, L.; Salzano, A. M.; Scaloni, A.; Matulis, D.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Monti, S. M.; De Simone, G.; Lindfors, K.; et al. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 27799–809.
- (14) Khalifah, R. G. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 2561–2573.
- (15) Wistrand, P. J.; Lindqvist, A. In *Carbonic Anhydrase—From Biochemistry and Genetics to Physiology and Clinical Medicine*; Botrè, F., Gros, G., Storey, B. T., Eds.; VCH: Weinheim, 1991; pp 352–378.
- (16) Scozzafava, A.; Briganti, F.; Ilies, M. A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 292–300.

JA805558K