

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

SYNTHÈSE D'HYBRIDES TESTOSTÉRONE-PLATINE(II) POUR LE CIBLAGE
THÉRAPEUTIQUE DU CANCER DE LA PROSTATE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE EXTENSIONNÉE DE
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR
VINCENT OUELLETTE

MARS 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Enjoy!

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement mon directeur de maîtrise, le professeur Gervais Bérubé d'avoir cru en moi et de m'avoir permis de réaliser mes travaux de recherche dans son laboratoire. Merci pour tous tes conseils, ainsi que ton mentorat dans la poursuite de mes études et de ma formation de chimiste. Je remercie également tous les membres du laboratoire pour leur support et leurs conseils particulièrement Caroline et Maude avec qui j'ai eu énormément de plaisir à travailler.

Je remercie aussi les différents collaborateurs au projet, dont Dr René C.-Gaudreault et Marie-France Côté, pour leur apport dans le projet en testant l'activité antiproliférative des molécules synthétisées durant mes travaux de recherche. Je tiens à souligner l'apport du Dr Heidar-Ali Tajmir-Riahi pour les études spectroscopiques qu'il a réalisées sur deux de mes molécules.

Je tiens également à adresser mes remerciements aux membres du laboratoire du professeur Benoit Daoust, Paméla, Caroline, Nicolas, Simon et Frank, mes collègues et amis, pour leur support et conseil. Que ce soit pour les questions de labo ou les nombreuses jasettes, sachez que vous avez contribué à la réussite de ce projet. Je tiens également à remercier tout particulièrement mes amis et collègues, Pam et Nick, que j'ai côtoyés tout au long de mon parcours universitaire. Vous êtes devenus des amis chers et une amitié sincère et précieuse est née durant toutes ces années. Vous m'avez poussé à aller au bout de mes capacités et supporté durant toute cette aventure universitaire. Ces années n'auraient pas été les mêmes sans vous.

Je tiens à remercier ma famille, particulièrement mon père et mes frères, pour leur support inconditionnel et leurs encouragements durant toute la durée de mes études. Maman, je dédie ce mémoire en ta mémoire. Même si tu es partie trop tôt, sache que tu m'as accompagné tout au long de cette étape de ma vie.

Finalement, merci à tous mes amis et ceux qui ont contribué de loin ou de proche à la réussite de cette entreprise qu'a été la maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU	vii
LISTE DES SCHÉMAS	ix
LISTE DES SPECTRES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xii
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xv
RÉSUMÉ	xvi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I LE CANCER DE LA PROSTATE.....	3
1.1 Généralités sur le cancer.....	3
1.2 Le cancer de la prostate	4
1.3 Androgènes et cancer de la prostate	7
1.3.1 Le récepteur des androgènes.....	8
1.4 Les traitements du cancer de la prostate	11
1.4.1 Les antiandrogènes	12
CHAPITRE II LA THÉRAPIE À BASE DE PLATINE.....	16
2.1 Généralités sur le platine	16
2.2 Le cisplatine.....	19
2.3 Le ciblage thérapeutique.....	23
CHAPITRE III DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE	26
3.1 Travaux antérieurs	27
3.2 Objectifs du projet de recherche	31
3.2.1 La synthèse d'hybrides testostérone-platine(II).....	32

3.2.2	La synthèse d'un nouveau dimère de testostérone.....	35
3.2.3	Évaluation de l'activité biologique des molécules synthétisées	38
CHAPITRE IV RÉSULTATS ET DISCUSSION.....		39
4.1	Synthèse d'hybrides testostérone-platine(II).....	39
4.1.1	Fonctionnalisation de la testostérone.....	39
4.1.2	Synthèse du composé précurseur de la formation des hybrides	43
4.1.3	Synthèse des hybrides testostérone-platine(II).....	47
4.2	Progression vers la synthèse d'un nouveau dimère de testostérone	59
4.2.1	Synthèse 1 : utilisation du méthoxyde de sodium.....	60
4.2.2	Synthèse 2 : utilisation d'un catalyseur de ruthénium	63
4.3	Analyse de l'activité biologique	66
CONCLUSION.....		71
ANNEXE A PARTIE EXPÉRIMENTALE		74
A.1	Remarques générales	74
A.2	Protocoles expérimentaux.....	75
ANNEXE B SPECTRES RMN ¹ H ET ¹³ C.....		94
ANNEXE C ARTICLE COMPLÉMENTAIRE 1.....		120
ANNEXE D ARTICLE COMPLÉMENTAIRE 2.....		129
ANNEXE E ARTICLE COMPLÉMENTAIRE 3.....		136
RÉFÉRENCES.....		144

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure		Page
1.1	Représentation de l'appareil reproducteur masculin.....	5
1.2	Structure chimique des principaux androgènes.	7
1.3	Représentation des domaines fonctionnels du récepteur des androgènes.	8
1.4	Représentation schématique du mécanisme d'action de la testostérone avec le récepteur des androgènes.	10
1.5	Mécanisme d'action des antiandrogènes sur les RA.....	13
1.6	Structure chimique de deux antiandrogènes stéroïdiens utilisés en clinique.....	14
1.7	Structure chimique de différents antiandrogènes non-stéroïdiens utilisés en clinique.....	15
2.1	Composés anticancéreux à base de platine.	16
2.2	Structure générale de composés à base de platine.	18
2.3	Mécanisme d'action du cisplatine.....	20
2.4	Adduits intra et interbrins formés par le cisplatine sur la double hélice d'ADN.....	22
3.1	Complexe de platine(II) dérivé d'un précurseur de triphényléthylène et le tamoxifène.....	27
3.2	Structures générales de différents complexes de platine(II) dérivés de l'estradiol.	28

3.3	Structure moléculaire de l'hybride de testostérone-chlorambucil.	29
3.4	Structures moléculaires d'hybrides testostérone-platine(II) de première génération.....	30
3.5	Structures moléculaires de différents dimères de testostérone synthétisés dans le laboratoire.	31
3.6	Concept de synthèse des hybrides de testostérone-platine(II).	33
3.7	Rétrosynthèse générale des hybrides testostérone-platine(II).....	34
3.8	Rétrosynthèse du dimère de testostérone.	37
4.1	Produits formés lors de la réaction de désacétylation avec chauffage.	46
4.2	Composés alcynes utilisés pour la synthèse des hybrides testostérone-platine(II).	48
4.3	Mécanisme de la réaction de cycloaddition azoture-alcyne catalysé au cuivre.....	51
4.4	Hybrides de testostérone-platine(II) synthétisés.	55
4.5	Comparaison des déplacements chimiques des spectres RMH ¹ H du composé triazole 11 (haut) et du complexe de platine 14 (bas).....	57
4.6	Différents complexes de platine pouvant être formés théoriquement suite à la réaction de complexation du composé triazole 12	59
4.7	Produits récupérées suite à la réaction de l'essai de l'obtention du dimère 18	62
4.8	Produits récupérés suite à la deuxième réaction d'alkylation avec le catalyseur de ruthénium.	65

Tableau

Page

4.1	Mesure de l'activité antiproliférative (IC ₅₀) des composés triazoles, des hybrides de testostérone-platine(II) et du cisplatine (CDDP) dans le DMF	68
-----	---	----

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma		Page
4.1	Chemin synthétique menant à la fonctionnalisation de la testostérone en position 7α	40
4.2	Synthèse du précurseur des hybrides, le composé azoture 7	44
4.3	Synthèse des dérivés propargyliques.	48
4.4	Réaction générale de cycloaddition d'azoture-alcyne développée par Sharpless, 2002.	49
4.5	Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un azoture et un alcyne. ...	50
4.6	Synthèse des différents composés triazoles, précurseurs des hybrides de testostérone-platine(II).	52
4.7	Synthèses proposées pour la conception du nouveau dimère de testostérone.	60
4.8	Synthèse d'un dérivé dialkylé linéaire symétrique.	64

LISTE DES SPECTRES

Spectre	Page
B.1	RMN ¹ H du diacétate de 3,5-androstadiène-3,17β-diol (2)..... 95
B.2	RMN ¹ H de l'acétate de 4,6-androstadiène-17β-ol-3-one (3) 96
B.3	RMN ¹ H de l'acétate de 7α-allyl-4-androstène-17β-ol-3-one (4)..... 97
B.4	RMN ¹ H de l'acétate de 7α-(4-chloro-but-2-ènyl)-4-androstèn-17β-ol-3-one (5)..... 98
B.5	RMN ¹ H du 7α-(4-chloro-but-2-ènyl)-4-androstèn-17β-ol-3-one (6)..... 99
B.6	Spectre RMN ¹ H du 7α-(4-méthoxy-but-2-ènyl)-4-androstèn-17β-ol-3-one (6.1)..... 100
B.7	RMN ¹ H du 7α-(4-azido-but-2-ènyl)-4-androstèn-17β-ol-3-one (7) 101
B.8	RMN ¹³ C du 7α-(4-azido-but-2-ènyl)-4-androstèn-17β-ol-3-one (7) 102
B.9	RMN ¹ H du prop-2-ynyl-pyridin-2-ylméthylamine (9)..... 103
B.10	RMN ¹³ C du prop-2-ynyl-pyridin-2-ylméthylamine (9)..... 104
B.11	RMN ¹ H du prop-2-ynyl-pyridin-2-yléthylamine (10)..... 105
B.12	RMN ¹³ C du prop-2-ynyl-pyridin-2-yléthylamine (10)..... 106
B.13	RMN ¹ H du 7α-[4-(4-pyridin-2-yl-[1,2,3]triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstèn-17β-ol-3-one (11)..... 107
B.14	RMN ¹³ C du 7α-[4-(4-pyridin-2-yl-[1,2,3]triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstèn-17β-ol-3-one (11)..... 108

B.15	RMN ¹ H du 7α-[4-(4-(((pyridin-2-ylméthyl)-amino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-èn-1-yl]-4-androstèn-17β-ol-3-one (12)	109
B.16	RMN ¹³ C du 7α-[4-(4-(((pyridin-2-ylméthyl)-amino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-èn-1-yl]-4-androstèn-17β-ol-3-one (12)	110
B.17	Speetre RMN ¹ H du 7α-[4-(4-((2-pyridin-2-yl-éthylamino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstèn-17β-ol-3-one (13).....	111
B.18	Speetre RMN ¹³ C du 7α-[4-(4-((2-pyridin-2-yl-éthylamino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstèn-17β-ol-3-one (13).....	112
B.19	Speetre RMN ¹ H du 7α-[4-(4-pyridin-2-yl-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstèn-17β-ol-3-one dichloroplatine(II) (14)	113
B.20	Speetre RMN ¹³ C du 7α-[4-(4-pyridin-2-yl-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstèn-17β-ol-3-one dichloroplatine(II) (14)	114
B.21	Speetre RMN ¹ H du 7α-[4-(4-(((pyridin-2-ylméthyl)-amino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstèn-17β-ol-3-one chloroplatine(II) (15)	115
B.22	Speetre RMN ¹ H du 7α-[4-(4-((2-pyridin-2-yl-éthylamino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstèn-17β-ol-3-one chloroplatine(II) (16)	116
B.23	Speetre RMN ¹ H de 2-(4-(17β-hydroxy-4-androstène-3-one-7α-yl)-but-2-ènyl) malonate de diméthyle (17).....	117
B.24	Speetre RMN ¹³ C de 2-(4-(17β-hydroxy-4-androstène-3-one-7α-yl)-but-2-ènyl) malonate de diméthyle (17)	118
B.25	Speetre RMN ¹ H du 7α-(buta-1,3-diènyl)-4-androstèn-17β-ol-3-one (18.1).....	119

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
AGF	Addition de groupement fonctionnel
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
APS	Antigène prostatique spécifique
ARE	Élément de réponse de l'androgène
ARN	Acide ribonucléique
C	Carbone
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDCl_3	Chloroforme deutéré
CPA	Acétate de cyprotérone
CRPC	Cancer de la prostate androgéno-résistant (<i>Castration Resistant Prostate Cancer</i>)
CuACC	Cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre
éq.	Équivalent
d	Doublet (RMN)
dd	Doublet de doublet (RMN)
DBD	Domaine de liaison de l'ADN
DCM	Dichlorométhane

DHT	Dihydrotestostérone
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Glu	Acide glutamique (glutamate)
HCl	Acide chlorhydrique
HSP	Protéine de choc thermique
IC ₅₀	Concentration inhibitrice à 50 %
IGF	Interconversion de groupement fonctionnel
IR	Infrarouge
IRM	Imagerie par résonance magnétique
J	Constante de couplage (RMN)
LBD	Domaine de liaison du ligand
LH	Hormone lutéinisante
m	Multiplet (RMN)
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
N	Azote
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimide
RA	Récepteur des androgènes
RMN	Résonance magnétique nucléaire
IRM	Imagerie résonance magnétique
s	Singulet (RMN)
sl	Singulet large (RMN)

SMHR	Spectrométrie de masse haute résolution
SRB	Sulforhodamine B
t	Triplet (RMN)
<i>t</i> -BuOH	tert-Butanol
TEA	Triéthylamine
THF	Tétrahydrofurane
Thr	Thréonine

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

α	Alpha
β	Bêta
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celsius
δ	Delta, déplacement chimique
g	Gramme
h	Heure
Hz	Hertz
J	Constante de couplage en Hz (RMN)
M	Molaire
N	Normale
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
mmol	Millimole
mol	Mole
ppm	Partie par million
μL	Microlitre
μM	Micromolaire

RÉSUMÉ

Le cancer de la prostate est le plus diagnostiqué chez l'homme au Canada. Un homme sur 8 recevra un diagnostic au cours de sa vie. Ce projet de recherche vise le développement de nouveaux composés anticancéreux à base de testostérone pour le traitement de ce cancer. Les androgènes (testostérone et dihydrotestostérone) présentent un rôle important dans le développement et la progression de ce cancer. L'affinité de la testostérone pour le récepteur des androgènes (RA) est très élevée. Le RA s'avère donc une cible biologique intéressante. Il est émis comme hypothèse qu'en ciblant les RA, les hybrides testostérone-platine(II) seront plus sélectifs et moins toxiques que les thérapies anticancéreuses classiques. Une première série d'hybrides testostérone-Pt(II) a été synthétisée dans notre laboratoire et il a été démontré les hybrides à base de thiazolylalanine et pyridylalanine possédaient la meilleure activité antiproliférative *in vitro*. Ils sont 3,7 et 5,3 fois plus puissants que le cisplatine seul sur les cellules cancéreuses LNCaP (AR⁺) et PC3 (AR⁻) respectivement. Ce projet consiste à développer une deuxième génération d'hybrides testostérone-Pt(II) pour le ciblage thérapeutique du cancer de la prostate hormono-dépendant. Les molécules hybrides ont été synthétisées à partir de la testostérone en utilisant une séquence réactionnelle de 8 étapes. La portion testostérone et platine des hybrides sont liées par une chaîne latérale (fonction triazole) plus forte en comparaison à la 1^{re} génération d'hybrides. Ce mémoire présentera la synthèse et le potentiel biologique de la 2^e génération d'hybrides.

Mots-clés : Testostérone, androgène, cancer de la prostate, complexe de platine(II), ciblage thérapeutique.

INTRODUCTION

Le cancer est un fléau qui touche tout le monde. Il représente la deuxième cause de mortalité au niveau mondial avec plus de 8,8 millions de morts en 2015 (OMS). Plus de 200 types de cancers ont été répertoriés jusqu'à présent. Au Canada, il est estimé qu'une personne sur deux sera diagnostiquée d'un cancer au cours de sa vie et qu'une personne sur quatre en succombera selon la Société canadienne du cancer. En 2017, il est projeté qu'un total de 206 200 Canadiens seront diagnostiqués d'un cancer et que 80 800 en mourront. Le cancer est la principale cause de décès au Canada et représente 30 % de toutes les morts répertoriées suivi de 20 % par les maladies cardiovasculaires. Le cancer du poumon, du sein, colorectal et de la prostate représentent plus de la moitié de tous les nouveaux cas de cancer au Canada. Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez l'homme tandis que chez la femme, il s'agit du cancer du sein. Beaucoup de progrès a été réalisé au fil du temps pour améliorer le taux de survie du cancer en passant par la prévention, la détection et les traitements. Malgré les avancées scientifiques en matière de traitements, le cancer tue encore aujourd'hui. Il devient donc important d'assurer la recherche de nouveaux traitements et médicaments pour tenter de guérir cette maladie trop souvent meurtrière. Le présent projet de maîtrise porte sur la synthèse de nouveaux hybrides testostérone-platine et d'un dimère de testostérone antiandrogénique ayant une application pour le ciblage thérapeutique du cancer de la prostate. Les deux premiers chapitres présentent les différents aspects importants qui se rattachent au cancer de la prostate ainsi qu'aux aspects théoriques et pratiques nécessaires à connaître pour la compréhension de la thérapie à base de platine et le traitement par antiandrogène. Ensuite, les objectifs du projet seront présentés en détails suivis de la

discussion sur la conception des molécules synthétisées ainsi que les résultats des tests d'activité biologique effectués sur celles-ci. Finalement, une conclusion clora le mémoire afin de mettre en lumière les constats émis suite aux résultats obtenus et les perspectives de recherche qui s'ouvrent pour de futurs travaux sur le sujet. De plus, trois articles scientifiques ont été publiés suite aux travaux effectués dans le cadre de ce projet de recherche. Les résultats ont été obtenus avec deux des composés synthétisés pendant la maîtrise. Ces articles sont présentés en annexe.

CHAPITRE I

LE CANCER DE LA PROSTATE

1.1 Généralités sur le cancer

Le cancer est caractérisé par une croissance anormale et incontrôlée des cellules induites par des changements génétiques conduisant à un déséquilibre important de la prolifération cellulaire [1]. Il existe différents types de cancer. On les nomme par le type de tissus ou d'organes qu'ils infectent par exemple, cancer de la prostate ou cancer des ovaires. On les classe également par le type de cellules duquel ils sont formés par exemple carcinome, sarcome, leucémie ou encore lymphome [2]. Tout type de cancer débute dans les cellules lorsqu'un changement survient dans celles-ci. Chaque type de cellule a une fonction spécifique à accomplir dans l'organisme qui est déterminée par les gènes de cette dernière. Ce sont les gènes qui déterminent le comportement normal des cellules, c'est-à-dire ce qu'elles doivent être, ce qu'elles font, quand elles doivent se multiplier et quand elles doivent mourir. Ainsi, les gènes assurent le développement et la reproduction normale et contrôlée des cellules. Il arrive que des mutations surviennent et modifient les gènes de la cellule. Ceci fait en sorte que la cellule ne comprend plus ses signaux et commence à se diviser de manière incontrôlée. Il se produit alors une prolifération cellulaire qui mène à la production de nombreuses cellules qui se rassemblent et forme une tumeur cancéreuse [1]. Une tumeur cancéreuse est appelée maligne, car elle peut se répandre et envahir les tissus environnants par des métastases. Les métastases sont des tumeurs qui se sont propagées à distance dans

l'organisme à partir de la tumeur primaire le plus souvent par le système lymphatique ou sanguin. On parle donc de propagation du cancer dans l'organisme, que le cancer s'est métastaté [1]. Les cellules cancéreuses sont différentes des cellules normales par le fait qu'elles se développent de manière incontrôlée sans arrêt et deviennent invasives. Elles ignorent également le signal qui induit leur mort programmée, l'apoptose. Elles peuvent aussi influencer les cellules normales environnantes afin de former des vaisseaux sanguins pour approvisionner la tumeur en oxygène dont elle a besoin pour se développer et grossir. Les vaisseaux sanguins retirent également les déchets de la tumeur [3].

1.2 Le cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les hommes au Canada en 2017 selon la Société canadienne du cancer. Statistiques Canada estime qu'en 2017, 21 300 hommes canadiens recevront un diagnostic de la maladie et que 4 100 en mourront. Le taux de survie est relativement élevé et le taux de mortalité a diminué de 3,3 % depuis 2001. Ceci peut s'expliquer par le dépistage précoce et les meilleures options de traitement de ce cancer. Comme son nom l'indique, le cancer se développe dans la prostate. La prostate est une glande de l'appareil reproducteur masculin, de la grosseur normale d'une noix, qui se situe devant le rectum sous la vessie et entoure l'urètre (Figure 1.1).

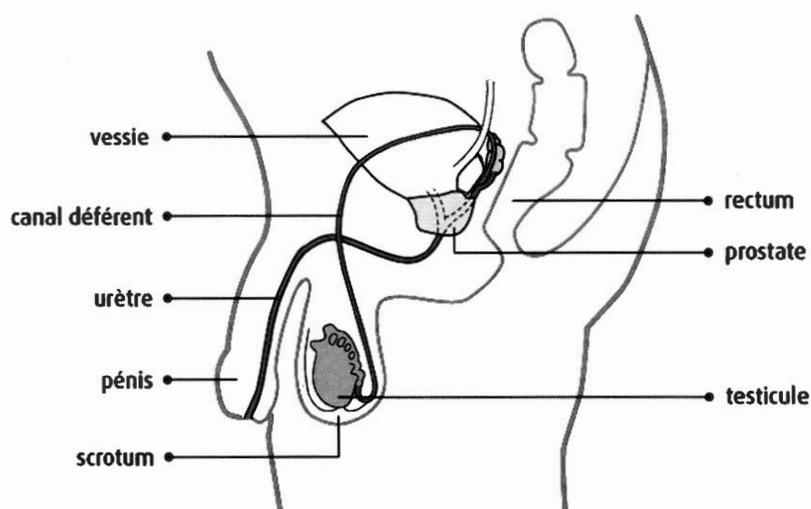


Figure 1.1 Représentation de l'appareil reproducteur masculin (Tirée de <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/prostate>).

La fonction principale de la prostate est de sécréter le liquide prostatique, une composante importante du sperme. Le liquide prostatique est riche en nutriments et enzymes qui permettent de nourrir et protéger les spermatozoïdes. La prostate expulse le liquide prostatique lors de l'excitation sexuelle le long des canaux jusqu'à l'urètre où il se mélange aux spermatozoïdes et autres liquides afin d'être expulsé sous forme de sperme lors de l'éjaculation [4]. La prostate est régulée par la testostérone, un androgène, qui permet l'activité fonctionnelle de celle-ci. D'ailleurs, les androgènes jouent un rôle important dans le développement du cancer de la prostate.

Plusieurs facteurs de risque du cancer ont été identifiés, mais les résultats sont non concluants. L'âge, la race et l'historique familial sont des facteurs qui peuvent accroître le risque de développer ce type de cancer. Les études montrent qu'après l'âge de 50 ans le taux d'incidence et de mortalité du cancer de la prostate augmente de manière exponentielle. La plupart des cas de cancer sont diagnostiqués chez les hommes de plus de 65 ans. Le cancer se manifeste par une prolifération cellulaire incontrôlée des cellules de la prostate. Il est la plupart du temps présent de manière asymptomatique et

latente et diagnostiqué seulement par un examen histologique [5]. C'est pourquoi différents tests doivent être effectués afin de détecter le cancer. Le test le plus commun et facile à effectuer est un examen sanguin afin de mesurer la concentration de l'antigène prostatique spécifique (APS) dans le sang. L'APS est une protéine fabriquée par les cellules de la prostate et la concentration dans le sang est élevée lorsqu'un cancer est présent. La valeur limite supérieure de l'APS est de 4 ng/mL. Un autre test fréquemment utilisé pour le dépistage du cancer est un examen digital rectal de la prostate qui permet de détecter si un nodule est présent. La combinaison de ces deux tests permet de diagnostiquer un cancer de la prostate. Malgré que les études démontrent que le test APS permet de détecter deux fois plus le cancer que l'examen rectal seul, il ne permet que de détecter 70 % des cas de cancer de la prostate [5]. Les deux tests sont donc complémentaires l'un de l'autre. Si un doute persiste, il est possible d'effectuer une biopsie ou une imagerie par résonance magnétique (IRM) de la prostate afin de vérifier la présence de cellules cancéreuses.

Le cancer de la prostate est classé selon quatre stades dépendamment du développement des tumeurs cancéreuses et par un pointage d'une échelle de 1 à 5 appelé pointage de Gleason. Le stade représente l'endroit où le cancer se situe et le pointage de Gleason permet de déterminer l'agressivité des cellules cancéreuses. L'adénocarcinome représente le type de cancer de la prostate le plus courant (95 % de tous les cas). Il se développe dans les cellules glandulaires de la prostate et se situe dans la zone périphérique de celle-ci. Cette zone est facilement palpable par un examen digital rectal ce qui fait en sorte que les médecins sont en mesure de détecter le cancer lorsqu'une tumeur se développe. Un certain nombre d'évènements moléculaires se produisent dans la progression de la formation de la tumeur initiale dans la plupart des cas de cancers [6]. Ces évènements incluent la méthylation anormale, l'inactivation des mécanismes de réparation de l'ADN, l'inactivation des suppresseurs de tumeurs et l'activité des facteurs des récepteurs [7]. Tous ces évènements donnent lieu à un potentiel infini de croissance aux cellules tumorales. Le cancer de la prostate peut se

propager hors de la prostate et se métastaser dans les ganglions et les os lorsqu'il progresse.

1.3 Androgènes et cancer de la prostate

Les androgènes sont une classe d'hormones stéroïdiennes qui régulent le développement et le maintien des caractéristiques dites masculines chez l'homme en se liant aux récepteurs des androgènes (RA). Ceci passe par le développement des organes sexuels primaires ainsi que par le développement des caractéristiques sexuelles secondaires chez l'homme à la puberté [8]. La testostérone représente l'androgène principal dans le sang [9]. Elle est synthétisée majoritairement dans les testicules (plus précisément dans les cellules de Leydig) à la suite d'une réponse à l'hormone lutéinisante (LH). On retrouve également la dihydrotestostérone (DHT), une hormone qui est formée à partir de la testostérone (Figure 1.2) par l'enzyme 5 α -réductase qui réduit la double liaison sur les carbones 4 et 5 de la testostérone. L'affinité de la DHT pour les RA est dix fois supérieure à celle de la testostérone [10]. La DHT est donc un agoniste beaucoup plus puissant des RA et devient le métabolite actif de la testostérone dans les cellules de la prostate.

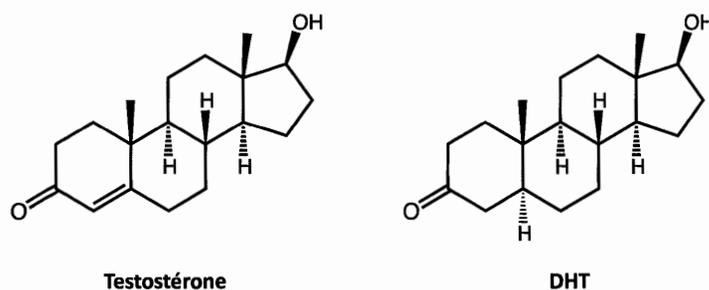


Figure 1.2 Structure chimique des principaux androgènes.

Les androgènes sont nécessaires au développement et au fonctionnement normal de la prostate [11]. Cependant, les androgènes sont également responsables du

développement du cancer de la prostate comme mentionné précédemment. Au diagnostic initial, environ 80 à 90 % des cancers de la prostate sont dépendants des androgènes (hormono-dépendant) [11]. Lorsque le cancer se développe, il arrive qu'il puisse devenir hormono-indépendant et ne soit plus lié à la réponse des androgènes sur les récepteurs.

1.3.1 Le récepteur des androgènes

Les androgènes exercent leur activité biologique lorsqu'ils se lient au récepteur des androgènes. Le RA est un récepteur nucléaire situé principalement dans la prostate et les testicules [12]. Le RA est une phosphoprotéine qui intervient dans les actions de la testostérone et la DHT en agissant comme un facteur de transcription [13]. La fonction principale des RA est de promouvoir le développement et la différenciation des structures uro-génitales masculines. Le RA fait partie de la superfamille des récepteurs stéroïdiens et est composé de 3 domaines majeurs : un domaine N-terminal de régulation transcriptionnelle, un domaine central de liaison à l'ADN et un domaine C-terminal de liaison du stéroïde [14]. Ce récepteur peut se lier tant à la testostérone qu'à la DHT même si l'affinité du récepteur est supérieure pour la DHT, ce qui en fait le ligand principal [15].

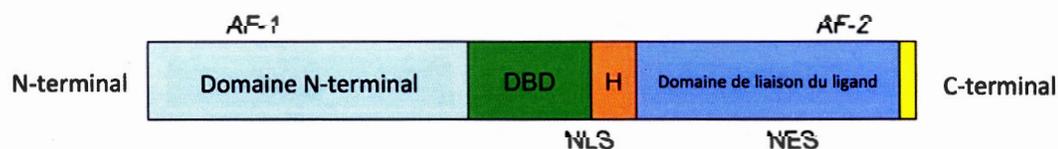


Figure 1.3 Représentation des domaines fonctionnels du récepteur des androgènes (Tirée de [16]).
 DBD : domaine de liaison à l'ADN; H : région charnière; AF-1 et AF-2 : Fonction d'activation 1 et 2; NLS : signal de localisation nucléaire; NES : signal d'exportation nucléaire.

En effet, lorsque la testostérone entre dans la cellule, elle est très souvent convertie en DHT. L'androgène se lie au récepteur par l'interaction de quatre acides aminés situés sur le domaine de liaison du ligand (LBD) avec les fonctionnalités chimiques alcool (Asn et Thr) et cétone (Glu et Arg) présentes sur la molécule par des ponts hydrogène [17]. L'atome d'oxygène de la fonction cétone possède des paires d'électrons libres qui agissent comme accepteur de lien hydrogène ce qui lui permet de former une forte interaction avec les acides aminés chargés ou polaires. De son côté, l'atome d'hydrogène de l'alcool possède une charge partielle positive ce qui lui permet d'interagir avec un atome hautement électronégatif présent sur un résidu d'acide aminé adjacent. D'ailleurs, les ponts hydrogènes sont des liens plus forts que les forces de Van der Waals. Ceci permet d'expliquer pourquoi les androgènes se lient si fortement aux RA et ont une affinité à très basse concentration [18].

Avant la liaison du ligand, le RA est dans un état inactif et est lié par des protéines de choc thermique (HSP) [19]. Lorsque le ligand se lie au RA, il y a dissociation des protéines et un changement de conformation se produit sur ce dernier. Le RA interagit ensuite avec des facteurs de coactivation et se lie sous la forme d'un dimère sur un site spécifique de l'ADN, l'élément de réponse aux androgènes (ARE), pour activer la transcription des gènes et ainsi induire son activité biologique [20].

1.4 Les traitements du cancer de la prostate

Il existe différents traitements disponibles afin de traiter ce type de cancer. On retrouve différents types de traitements selon leurs modes d'action envers le cancer. Il faut tenir compte également du stade du cancer afin de choisir le traitement le plus adéquat. Lorsque le cancer est diagnostiqué et qu'il est encore confiné à la prostate, la chirurgie et la radiothérapie sont envisagées. La chirurgie consiste en une prostatectomie radicale, c'est-à-dire le retrait complet de la prostate et des tissus environnants et du fait même de la tumeur. La radiothérapie permet de bombarder les cellules cancéreuses par des rayons à haute énergie afin de les détruire ou d'inhiber leur progression [23]. Lorsque le cancer devient plus avancé, l'hormonothérapie est utilisée. Ce type de thérapie permet de réduire la quantité d'androgène produite par le patient et permet également l'inhibition de l'expression des RA qui sont responsables de la croissance des cellules cancéreuses [24]. Plusieurs techniques existent pour l'hormonothérapie: l'injection d'analogues de l'hormone qui libère la LH (ablation d'androgènes) afin de réduire de manière pharmacologique les niveaux de testostérone; le traitement avec des antiandrogènes comme le flutamide ou bicalutamide afin de bloquer la liaison de la testostérone au RA (thérapie antiandrogène); et le blocage maximal d'androgène (MAB) qui est la combinaison de traitement antiandrogène et d'ablation d'androgènes [15]. Cependant, même si certaines tumeurs régressent à la suite de ces thérapies, les traitements peuvent devenir inefficaces, car les tumeurs recommencent à croître de manière hormono-indépendante, c'est-à-dire que le cancer ne dépend plus des androgènes pour grossir et se développer. Environ 80 % des patients montrent une réponse positive à ces traitements d'ablation d'androgènes. Par contre, les patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique vont voir le cancer progresser dans les 12 à 18 mois après le traitement antiandrogénique [11]. Malgré cela, les RA sont exprimés tout au long de la progression du cancer et persistent chez la plupart des patients avec un cancer hormono-indépendant. Ils demeurent une cible intéressante pour d'autres options de traitements même si le cancer est devenu

réfractaire aux androgènes pour se développer. Les RA qui ont subi des mutations conservent leur capacité à exercer leur activité de transcription.

La chimiothérapie est également utilisée pour traiter les cas les plus avancés du cancer de la prostate. La chimiothérapie permet de tuer les cellules cancéreuses en utilisant des molécules spécifiques qui ciblent les processus cellulaires et créent des dommages sur l'ADN. Le principal agent chimiothérapeutique utilisé pour traiter le cancer de la prostate est le docétaxel [25, 26]. Cette molécule interrompt le fonctionnement normal des microtubules de la cellule ce qui cause un arrêt dans la division cellulaire. Les microtubules sont responsables du maintien de la structure de la cellule et sont impliqués dans le transport intercellulaire [27]. D'autres agents chimiothérapeutiques sont approuvés et utilisés en clinique comme le mitoxantrone, le prednisone, le cabazitaxel et l'estramustine [25]. Il existe aussi des composés à base de platine qui sont utilisés dans certains cas de traitement comme le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine [28, 29]. Les composés à base de platine seront abordés plus en détail au Chapitre II. Malheureusement, la chimiothérapie occasionne de nombreux effets secondaires chez le patient. Les agents chimiothérapeutiques affectent tant les cellules saines que celles cancéreuses; ils ne sont pas sélectifs. C'est pour cela que le patient peut notamment perdre ses cheveux, avoir des nausées et des vomissements fréquents. Il devient donc pertinent d'essayer de trouver de nouveaux médicaments moins toxiques et plus sélectifs afin qu'ils soient plus efficaces.

1.4.1 Les antiandrogènes

Les antiandrogènes sont une classe de molécules qui permettent de traiter le cancer de la prostate. Ces molécules agissent comme antagonistes des androgènes et empêchent les androgènes d'exercer leur activité biologique en bloquant le domaine de liaison du ligand du RA, ce qui induit une activité de répression [30]. Lorsque l'antiandrogène se

lie au RA, il interfère avec lui ce qui le rend inactif; le RA ne peut donc pas induire son expression génique dans le noyau (Figure 1.5).

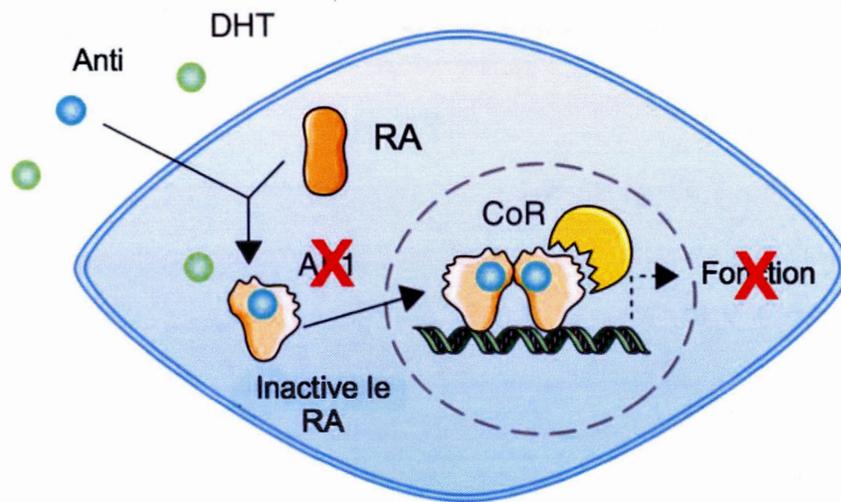


Figure 1.5 Mécanisme d'action des antiandrogènes sur les RA (Tirée de [30]).
Anti: Antiandrogène; CoR: Co-régulateur; DHT: Dihydrotestostérone;
RA: Récepteur des androgènes.

Les antiandrogènes doivent posséder une forte affinité et spécificité pour le récepteur sans toutefois l'activer pour qu'il puisse induire son activité [31]. L'intérêt de ces molécules repose sur le fait qu'elles permettent de bloquer les sites des RA en empêchant les androgènes de se lier et ainsi de produire leur activité nécessaire pour stimuler la croissance des tumeurs cancéreuses.

Il existe deux types d'antiandrogènes basés sur leur structure chimique : les antiandrogènes stéroïdiens et les antiandrogènes non-stéroïdiens. Les antiandrogènes stéroïdiens possèdent une structure analogue aux androgènes afin de maximiser la liaison sur le récepteur. On retrouve différents antiandrogènes utilisés pour le traitement du cancer de la prostate : l'acétate de cyprotérone (CPA) et l'acétate de médroxyprogestérone (MPA).

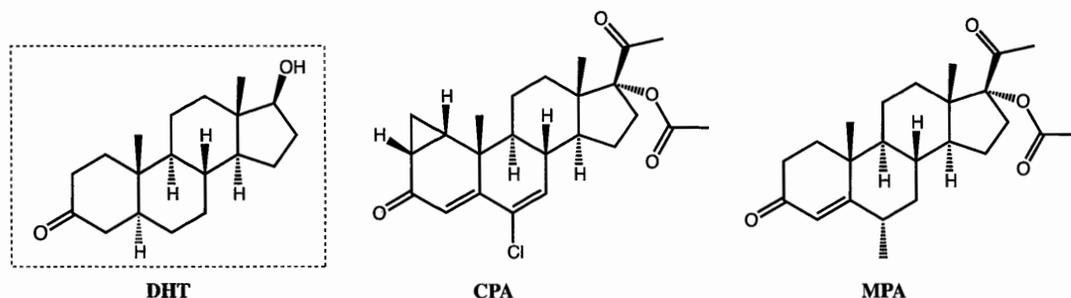


Figure 1.6 Structure chimique de deux antiandrogènes stéroïdiens utilisés en clinique.

Ces antiandrogènes ont été conçus dans le but d'exercer une efficacité de blocage maximal sur les androgènes, mais plusieurs effets secondaires importants ont été observés comme l'hépatotoxicité, perte de libido, problèmes cardiovasculaires ou encore faible efficacité ce qui limite amplement leur utilisation clinique [30]. Ces effets secondaires sont causés par le fait que ces molécules peuvent se lier à d'autres récepteurs stéroïdiens (progestérone, glucocorticoïde) pour lesquels ils sont des agonistes faibles et partiels.

À l'inverse, les antiandrogènes non-stéroïdiens ne possèdent pas un squelette moléculaire semblable aux androgènes et bloquent les RA en n'exerçant aucune activité agoniste sur d'autres récepteurs. Parmi les antiandrogènes non stéroïdiens, on retrouve notamment ceux de la première génération (flutamide, bicalutamide et nilutamide) et celui de la deuxième génération, l'enzalutamide (Figure 1.7). Ces molécules s'opposent aux actions des androgènes au niveau du récepteur et inhibent la croissance de la tumeur cancéreuse. Le bicalutamide est l'antiandrogène le plus toléré et stable présentement utilisé en clinique pour traiter le cancer de la prostate. Ceci s'explique par sa demi-vie de 7 jours ce qui fait qu'on l'administre qu'une seule fois par jour de manière orale. Les études montrent qu'il possède une efficacité similaire au flutamide mais occasionnent des effets secondaires plus tolérables et moins

sévères. L'enzalutamide, l'antiandrogène de deuxième génération, possède certains avantages par rapport au bicalutamide. Ce dernier ne fait pas simplement bloquer la liaison des androgènes, mais inhibe également la translocation du RA vers le noyau et altère la liaison du RA à l'ADN [32].

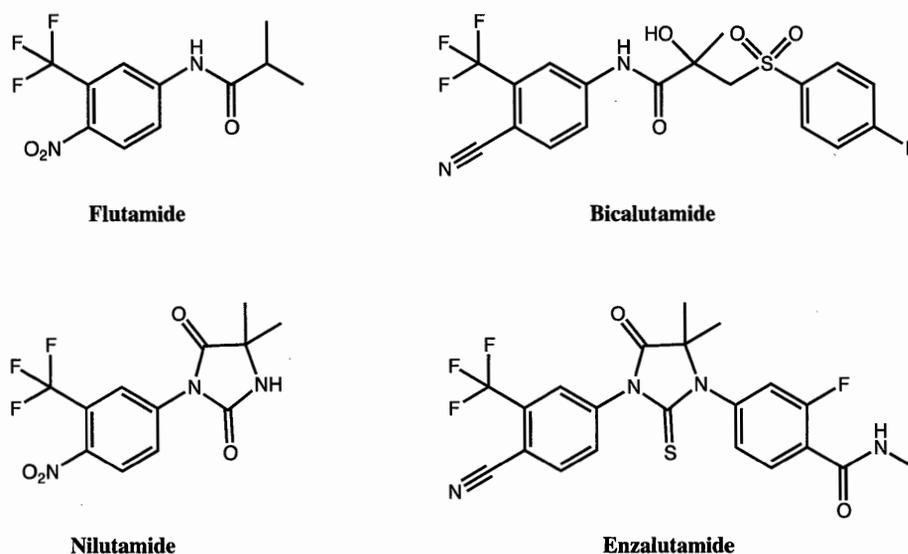


Figure 1.7 Structure chimique de différents antiandrogènes non-stéroïdiens utilisés en clinique.

Cependant, il arrive souvent que ces médicaments deviennent moins efficaces, car le cancer devient hormono-indépendant et se développe sans l'activation des RA comme il a été mentionné précédemment dans le texte. En revanche, même si le cancer est de type *Castration Resistant Prostate Cancer (CRPR)*, c'est-à-dire qu'il se développe par des voies autres que celles des RA, les RA demeurent des cibles intéressantes afin de traiter le cancer. Il devient donc important de trouver de nouveaux antiandrogènes qui pourraient permettre de combattre la progression des cellules cancéreuses et éviter la résistance qui se développe avec ce type de traitement.

CHAPITRE II

LA THÉRAPIE À BASE DE PLATINE

2.1 Généralités sur le platine

La thérapie à base de platine est une méthode couramment utilisée en chimiothérapie pour traiter différents types de cancers. Elle repose sur l'action de composés chimiothérapeutiques qui portent un atome de platine dans leur structure. Ces composés de platines représentent un des plus grands succès dans le domaine de la chimie médicinale inorganique. Il existe trois composés principaux approuvés en clinique : le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine [33]. Même si elles ont été introduites il y a plus de 40 ans, ces molécules demeurent encore parmi les plus utilisées de nos jours en clinique. Environ la moitié des patients qui reçoivent de la chimiothérapie sont traités avec ces molécules [34].

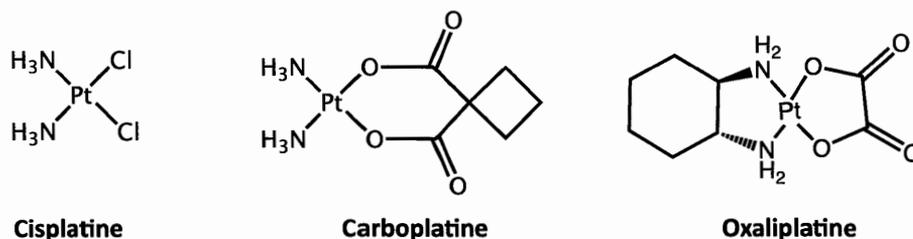


Figure 2.1 Composés anticancéreux à base de platine.

Le cisplatine est considéré comme le *leader* des anticancéreux à base de platine étant le composé le plus présent dans tous les essais cliniques recensés par le U.S. National Institute of Health en 2015 [33]. Les composés à base de platine font partie de la classe d'agents thérapeutiques qu'on appelle des agents alkylants. Ce sont les molécules les plus anciennes et fréquemment utilisées comme agents anticancéreux [35]. Il est à noter que les composés à base de platine ne sont pas à proprement parler des agents alkylants, car ils n'ajoutent pas de groupements alkyles, mais causent tout de même du dommage à l'ADN en se coordonnant et en interférant avec la réparation de l'ADN; ils sont donc considérés comme agents alkylants en raison de leur mécanisme d'action similaire. Il existe une panoplie de ces molécules qui ont démontré leur efficacité clinique à travers divers travaux de recherche. La plupart des agents alkylants ont le même mécanisme d'action, mais leurs effets cliniques varient. Ces composés empêchent la division cellulaire par le *crosslink* des brins d'ADN ce qui cause l'appariement anormal des bases nucléiques et l'inhibition de la division cellulaire [35]. La cellule continue de synthétiser ses autres composantes comme l'ARN et les protéines, ce qui crée un déséquilibre dans la croissance et elle finit par mourir [36]. On retrouve deux types d'agents alkylants : monofonctionnels et bifonctionnels. Ceci indique que le composé réagit avec un ou deux brins d'ADN. Les agents alkylants sont effectifs lors de toutes phases du cycle cellulaire et pour traiter divers types de cancers. Ils sont plus efficaces pour traiter les cancers à croissance lente comme des tumeurs solides par exemple. Toutefois, ces composés présentent des effets secondaires variés et peuvent induire le développement de cancer secondaire à long terme [35].

Le platine est un métal de transition qui existe sous différents états d'oxydation de 0 à 6, les états +2 et +4 étant les plus communs. Le platine possède une configuration électronique de formule suivante : $[\text{Xe}] 4f^{14}5d^96s^1$. La majorité des complexes de platine(II) ont un nombre de coordination de 4 et présentent une géométrie plan-carré d'hybridation dsp^2 [37]. Les composés à base de platine sont des complexes de coordination du platine. Au niveau chimique, ces composés possèdent une structure

générale commune : un cation central de platine coordonné à deux types de ligands, des ligands liants et sortants (Figure 2.2). Les ligands liants sont appelés ainsi, car ils forment des liens thermodynamiquement stables avec le platine et restent liés tout au long du processus intracellulaire. Ils sont composés de groupements contenant des atomes donateurs d'électrons σ et π , le plus souvent des azotes (groupements amines par exemple) [38]. À l'inverse, les ligands sortants quittent la sphère de coordination du platine dans le processus menant à la liaison à l'ADN. Ces ligands labiles sont généralement composés d'espèces anioniques monodentates ou dianioniques chélatantes comme par exemple des ions chlorures ou des ions dicarboxylates. On retrouve différents types de complexes de platine dépendant de leur structure tels que $[\text{PtL}_4]^{2+}$, $[\text{PtL}_3\text{X}]^+$, $[\text{PtL}_2\text{X}_2]$, etc.

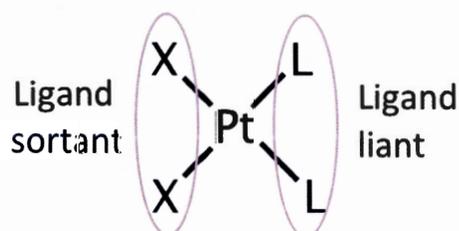


Figure 2.2 Structure générale de composés à base de platine.

Le mécanisme par lequel les composés de platine exercent leur activité anticancéreuse varie selon la structure de ces derniers. Malgré cela, un mécanisme général a été établi suite aux nombreuses études qui ont été faites sur le cisplatine, le composé modèle pour tous les différents complexes de platine synthétisés depuis sa découverte. La cible principale des composés de platine est l'ADN nucléaire des cellules cancéreuses. Pour se lier à leur cible, les composés agissent comme des pro-médicaments et nécessitent l'aquation des ligands sortants labiles dans les cellules afin de pouvoir former des liaisons avec l'atome N7 des bases puriques. Ces liaisons permettent de former des adduits interbrins et intrabrins qui arrêtent la réplication et la transcription

de l'ADN ce qui initie ainsi la mort des cellules, l'apoptose [39]. Le mécanisme d'action du cisplatine sera expliqué de manière plus détaillée dans la section suivante.

2.2 Le cisplatine

Le cisplatine a été synthétisé pour la première fois en 1885, mais ce n'est qu'en 1965 que ses propriétés anticancéreuses ont été découvertes de manière fortuite par Rosenberg et son équipe à l'Université du Michigan [40]. La découverte s'est effectuée lorsque les chercheurs ont remarqué que les produits d'électrolyse des mèches d'électrode composées de platine étaient capables d'inhiber la croissance cellulaire de la bactérie *E. coli*. Cette observation créa beaucoup d'intérêt dans l'utilisation potentielle de ces produits en chimiothérapie [39]. À la suite de la découverte de cette propriété du cisplatine, un intérêt est né pour l'utilisation de complexe de coordination de platine, de palladium et d'autres métaux nobles dans le traitement du cancer. Ce composé démontre beaucoup de versatilité par le fait qu'il possède une activité anticancéreuse sur une variété de tumeurs incluant le cancer des testicules, des ovaires, du cou et de la tête. Il n'est pas utilisé de manière directe pour traiter le cancer de la prostate, mais la partie cytotoxique qu'est le platine est intéressante afin de synthétiser de nouveaux médicaments qui peuvent cibler les cellules cancéreuses de la prostate. L'activité anticancéreuse du composé fait en sorte que la mise au point de nouveaux composés à base de platine est très prometteuse.

Le cisplatine ou *cis*-diaminedichloroplatine(II) (CDDP) est un composé de coordination métallique de géométrie plan-carré [39]. Le terme *cis* dans le nom fait référence à la chiralité des deux atomes de chlore qui sont placés du même côté dans la structure de la molécule. Cette conformation est importante car il a été démontré que le composé transplatine (chiralité opposée) présentait une activité anticancéreuse moindre que son stéréoisomère. Le mécanisme d'action par lequel le cisplatine réalise

son effet anticancéreux a longtemps été débattu par la communauté scientifique et a fait l'objet de nombreuses investigations. Il a été convenu d'un mécanisme général suite à l'étude de composés analogues au cisplatine [33]. Ce mécanisme passe par quatre étapes clés : l'assimilation cellulaire (i), l'aquation/activation (ii), la liaison à l'ADN (iii) et le traitement cellulaire de l'ADN (iv) menant à la mort cellulaire (Figure 2.3). Le cisplatine est administré de manière intraveineuse sous forme d'une solution saline physiologique. La concentration élevée en ion chlorure (environ 100 mM) dans le sang permet de retarder le taux d'hydrolyse de la drogue. Le composé entre ensuite dans la cellule par deux chemins différents : par diffusion passive à travers la membrane plasmique ou par transport actif par des protéines membranaires [41]. La concentration en ion chlorure plus basse (entre 4 et 10 mM) dans la cellule favorise le processus d'hydrolyse du composé [42]. En effet, le composé doit être hydrolysé afin d'être activé et pouvoir exercer les lésions sur l'ADN qui caractérise son activité.

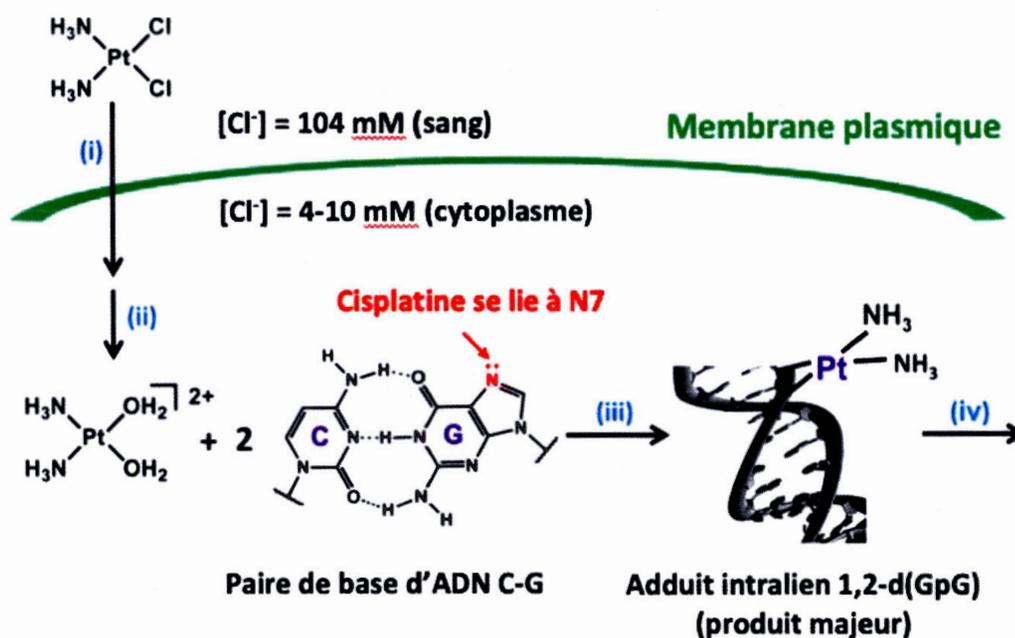


Figure 2.3 Mécanisme d'action du cisplatine (Tirée de [34]).

Le cisplatine subit une substitution de ligand précédant sa liaison à l'ADN : les atomes de chlore labiles de la molécule sont remplacés par des molécules d'eau. On se retrouve donc en présence des composés $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ et $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^+$. La géométrie plan-carré du cisplatine facilite cette substitution de ligand. La charge positive du complexe de platine lui permet d'être attiré par l'ADN qui est chargée de manière négative. Le complexe hydrolysé est un électrophile puissant qui peut réagir avec différents nucléophiles notamment les groupes sulfhydryles présents sur les protéines et les azotes des acides nucléiques de l'ADN [39]. Le complexe de platine hydrolysé est une espèce plus réactive envers les nucléophiles, car les groupements d'eau sont de meilleurs nucléofuges que les ions chlorures. Le composé hydrolysé entre dans le noyau de la cellule où il réagit une première fois avec une base hétérocyclique de l'ADN. La coordination du cisplatine s'effectue sur les sites les plus nucléophiles de l'ADN qui sont les atomes d'azote en position N7 sur le noyau imidazole des résidus purines de la guanine et de l'adénine. Ces sites sont les plus accessibles en étant à découvert dans le grand sillon de la double hélice de l'ADN. Ensuite, l'atome de chlore restant sur le complexe est substitué par une deuxième base purine ce qui forme des liaisons croisées sur l'ADN ce qui amène la formation d'adduits interbrins et intrabrins (Figure 2.4). L'adduit le plus fréquent (65 %) est la liaison intrabrin 1,2-d(GpG) entre deux bases guanines adjacentes (a). On retrouve également des adduits intrabrins 1,2-d(ApG) entre une base adénosine et une base guanine à 25 % (b), des adduits intrabrins 1,3-d(GpXpG) entre deux bases guanines intercalées d'une base X quelconque à 10 % (c) et plus rarement des adduits monofonctionnels coordonnés à une seule purine (d), des adduits interbrins liant les deux brins de la double hélice de l'ADN (e) et des adduits ADN-platine-protéine (f) [43].

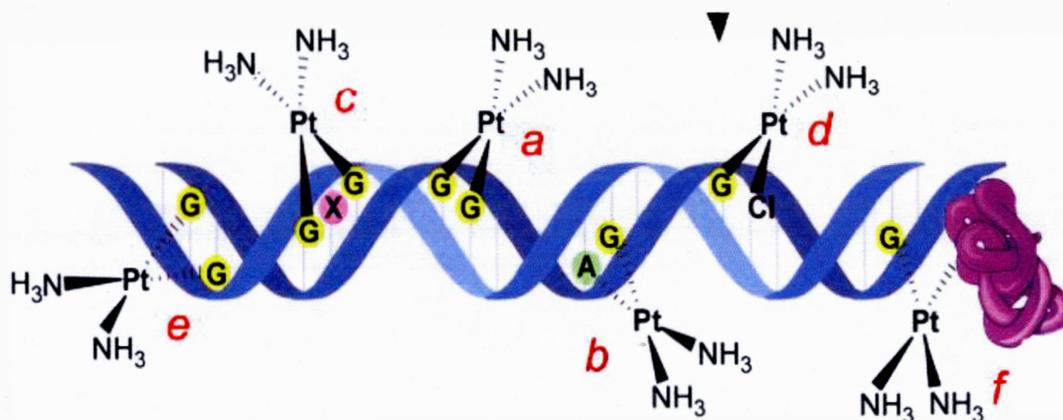


Figure 2.4 Adduits intra (a, b et c) et interbrins (e) formés par le cisplatine sur la double hélice d'ADN (Tirée de [44]).

Ces adduits déforment la structure de l'ADN de manière substantielle par un repliement et un déroulement de la double hélice suite à la platination [45]. Suite au dommage fait par le complexe de platine, la cellule tentera d'arrêter la progression du cycle cellulaire afin de réparer les lésions faites à l'ADN afin de ne pas transmettre les mutations aux cellules filles. Les cellules à l'ADN endommagées par le cisplatine arrêtent le cycle cellulaire au stade G2 afin de réparer l'ADN qui a été complexé par le platine. Les lésions sont retirées et le plus efficacement par la réparation par excision des nucléotides (NER) [34]. La machinerie de réparation doit pouvoir accéder au dommage et si ce dernier n'est pas accessible et réparé, la cellule initie le processus de mort programmée de la cellule, l'apoptose. L'expression de protéines pro-apoptotiques augmente, ce qui cause le relâchement de cytochrome c et l'activation de caspases intracellulaires. Les caspases dégradent les composantes de la cellule qui sont essentielles pour la viabilité cellulaire [46].

Malgré son activité anticancéreuse intéressante, le cisplatine présente deux inconvénients majeurs : il cause de nombreux effets secondaires néfastes pour le patient exposé à ce médicament et le cancer peut développer une résistance à la molécule [47]. Le cisplatine s'attaque à toutes les cellules à croissance rapide sans

exception. Ceci implique qu'il s'attaque non seulement aux cellules cancéreuses, mais également aux cellules saines. Les effets secondaires communs sont les suivants : nausée, vomissements, diarrhée, dommage aux reins, perte d'ouïe, dommage aux nerfs périphériques et répression de la moelle osseuse. Ces effets secondaires peuvent être si sévères que la dose de cisplatine administrée au patient doit être limitée [48]. En administrant une sous-dose du composé pour traiter les tumeurs, on donne une possibilité aux cancers de développer une résistance aux médicaments. La résistance peut s'établir de différentes façons : par réduction de l'assimilation cellulaire, l'augmentation de la dégradation et de la détoxification du médicament par le glutathion à l'intérieur des cellules, par la réduction d'adduits d'ADN-médicament et une augmentation de la tolérance ou de la réparation de l'ADN endommagée. L'élaboration de nouveaux complexes de platine vise ainsi à éviter ces deux inconvénients majeurs afin d'améliorer l'efficacité et la sélectivité de ces nouvelles molécules. Ces inconvénients ont créé un élan soutenu pour l'amélioration de nouveaux médicaments anticancéreux à base de platine. Au cours des 40 dernières années, des milliers de complexes de platine ont été préparés dans l'espoir de trouver de nouveaux médicaments avec un profil toxicologique plus tolérable et une plus grande efficacité [49].

2.3 Le ciblage thérapeutique

Le ciblage thérapeutique, ou thérapie ciblée, est un des modes principaux de traitements médicaux pour le cancer. Cette méthode de traitement a pris de l'ampleur en réponse aux effets secondaires non-désirés et la pauvre sélectivité de la chimiothérapie. La chimiothérapie cible les cellules qui se divisent rapidement, incluant les cellules cancéreuses et les tissus normaux produisant ainsi un profil toxique prévisible. Depuis les années 90, plusieurs changements et progrès significatifs ont été faits dans la gestion du cancer. Même si la chimiothérapie reste le traitement de choix pour

plusieurs types de cancers, les thérapies ciblées sont de plus en plus disponibles en clinique pour traiter différents types de tumeurs cancéreuses [50]. Le ciblage thérapeutique, tout comme la chimiothérapie, peut inhiber la croissance et le développement de maladies métastatiques. La grande différence entre ces deux modes de traitement passe par le mécanisme d'action. Le ciblage thérapeutique peut inhiber certaines cibles moléculaires spécifiques impliquées dans le développement et la propagation du cancer de certaines tumeurs au lieu d'affecter directement la division cellulaire ou la synthèse d'ADN [50]. Par rapport à la chimiothérapie traditionnelle, le ciblage thérapeutique présente deux avantages majeurs : éviter le dommage aux cellules normales et restreindre la résistance aux médicaments. En utilisant cette méthode dans le design de nouveaux médicaments, il peut être possible de viser certains sites afin d'augmenter la spécificité et la distribution (*delivery*) de ces derniers. Le ciblage et la distribution de médicaments représentent un domaine de recherche grandement actif pour permettre aux médicaments de se rendre à leurs cibles biologiques [51]. Au cours des dernières années, diverses approches ont été développées dans le but de minimiser la toxicité systémique et la résistance aux médicaments des composés anticancéreux à base de platine [52]. Le but ultime de ces efforts est d'obtenir des composés de platine hautement sélectifs pour les tumeurs cancéreuses et pouvant être administrés à des doses plus faibles avec moins d'effets secondaires et un indice thérapeutique amélioré [49]. C'est d'ailleurs l'objectif principal de ce projet de maîtrise.

Le ciblage thérapeutique peut être fait de manière active ou passive. Le ciblage thérapeutique actif est celui qui nous intéresse dans ce projet. Il est basé sur les interactions biomoléculaires spécifiques entre le médicament et les éléments cellulaires ou tissulaires. Cette approche peut être appliquée à des tumeurs qui contiennent des entités biochimiques dont la quantité ou la fonctionnalité diffèrent des tissus normaux.

Dans un système actif spécifique, le pharmacophore¹[53] est lié à l'entité ciblée via un espaceur et un connecteur; la fonction spécifique du conjugué à base de transporteur, d'antigène ou de récepteur conduit le médicament vers le tissu tumoral grâce à son affinité de liaison spécifique [54]. Les substances bioactives comme les hormones, les sucres, les acides aminés ou les protéines sont souvent employées pour remplir la fonction de ciblage. L'addition de la fonctionnalité de ciblage aux médicaments permet de discriminer les cellules cancéreuses ou les tissus tumoraux des cellules saines assurant ainsi une efficacité supérieure et des effets secondaires réduits du médicament [55].

¹ Un pharmacophore est être défini comme l'ensemble des caractéristiques stériques et électroniques qui sont nécessaires pour assurer une interaction supramoléculaire optimale avec une cible biologique spécifique pour déclencher sa réponse biologique.

CHAPITRE III

DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE

Le projet de recherche que j'ai effectué s'est déroulé dans le laboratoire du professeur Gervais Bérubé. Ce laboratoire se concentre principalement sur des travaux de recherche portant sur la conception de molécules biologiquement actives pour le traitement de différents types de cancers féminins (ovaires, seins, utérus) et masculins (prostate). Le présent projet porte sur la synthèse de nouveaux complexes (hybrides) de testostérone-platine(II) et d'un dimère de testostérone pour le ciblage thérapeutique du cancer de la prostate. Les molécules synthétisées dans le laboratoire sont dérivées d'hormones sexuelles; estradiol dans le cas des cancers féminins et testostérone pour le cancer de la prostate. Comme il a été expliqué dans la section 1.3, les androgènes se lient aux RA afin d'induire leur activité biologique et sont importants dans la croissance et la progression du cancer de la prostate. Ceci est également applicable aux estrogènes dont fait partie l'estradiol. L'activité biologique de cette hormone passe par le récepteur des estrogènes que l'on retrouve notamment chez les femmes dans différents organes, dont les seins, l'utérus et les ovaires. La stimulation de ce récepteur par les hormones peut permettre aux cancers féminins énumérés précédemment de se développer tout comme pour le cancer de la prostate. Ceci fait donc en sorte que les récepteurs des estrogènes et des androgènes deviennent des cibles biologiques intéressantes pour le développement de différents traitements anticancéreux en utilisant des stéroïdes comme intermédiaire de transport.

3.1 Travaux antérieurs

Depuis plusieurs années, le laboratoire du professeur Bérubé s'intéresse à la synthèse de nouveaux complexes de platine. Des travaux ont porté sur la synthèse de nouveaux complexes de platine(II) dérivés d'un précurseur de triphényléthylène en utilisant différents composés diamines (Figure 3.1) [56]. La cytotoxicité de ces complexes a été évaluée sur des lignées cellulaires du cancer du sein et a montré des résultats supérieurs au tamoxifène, un composé anticancéreux pour le traitement du cancer du sein et des résultats similaires au cisplatine.

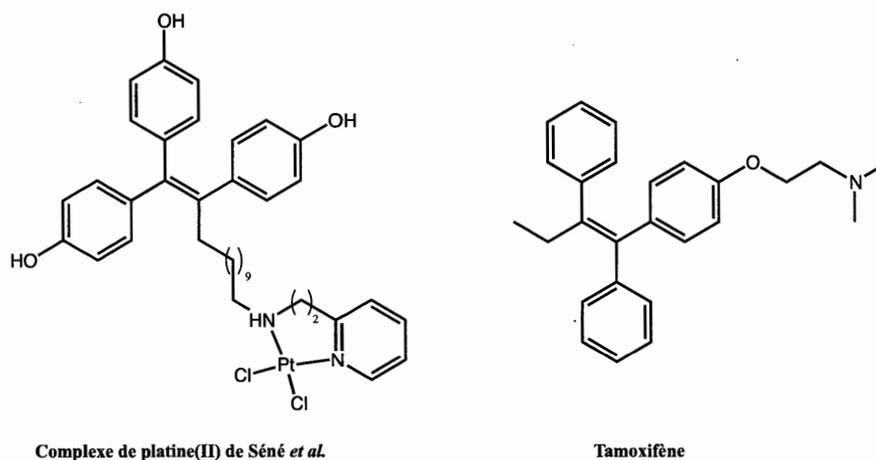


Figure 3.1 Complexe de platine(II) dérivé d'un précurseur de triphényléthylène et le tamoxifène.

Par les résultats intéressants obtenus avec ces complexes, les travaux suivants ont porté sur la synthèse de composés anticancéreux stéroïdiens dans le but de transporter la partie cytotoxique (le platine) aux organes féminins touchés par le cancer (Figure 3.2). Les complexes de la série A synthétisés portent une chaîne latérale 16 β -hydroxyméthyle avec une chaîne alkyle de longueur variable en position C-16 α liant le stéroïde et la partie de platine et ont montré des résultats biologiques intéressants sur des lignées cellulaires du cancer du sein en particulier avec une chaîne de longueur de

10 carbones [57]. Les complexes de la série B ont été synthétisés en intégrant une chaîne alkyle de longueur de 9 carbones en position C-16 β de l'estradiol afin de lier la portion de platine [58]. Les résultats d'activité biologique de cette série ont montré que ces composés possédaient une cytotoxicité élevée sur les cellules cancéreuses du sein. La molécule la plus cytotoxique de cette série, désignée sous le nom VP-128 (n=2 sur la Figure 3.2), montre une grande affinité pour le récepteur alpha des estrogènes et a été synthétisée en neuf étapes avec un rendement global de 10 %. Ce composé a été testé dans un modèle animal du cancer du sein et des ovaires hormono-dépendants et indépendants [59, 60]. Le VP-128 s'est avéré sélectif envers les cancers hormono-dépendants et ne présente pas d'effets toxiques secondaires apparents. Le cisplatine, composé de référence, est quant à lui non sélectif et toxique pour les souris [59, 60].

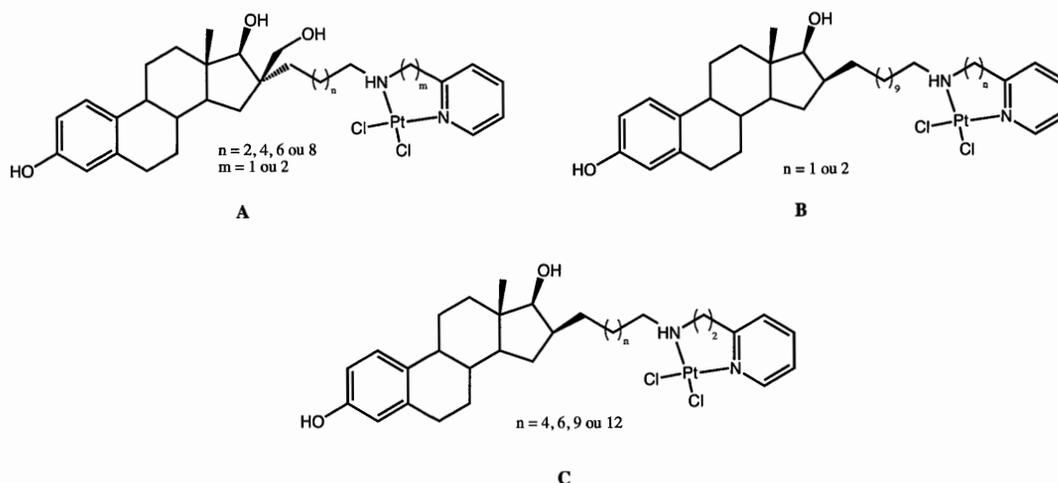


Figure 3.2 Structures générales de différents complexes de platine(II) dérivés de l'estradiol.

Une autre série de composés a été synthétisée par la suite afin de concevoir de nouveaux complexes estradiol-platine améliorés par rapport à ceux obtenus dans la série B [61]. Les complexes de la série C ont été synthétisés en faisant varier la longueur de la chaîne alkyle liant le stéroïde et la portion de platine afin d'observer l'influence de ce paramètre sur l'activité antiproliférative. Les molécules de cette série ont montré

une cytotoxicité importante envers les cellules cancéreuses du sein lors de tests *in vitro* et une affinité forte pour les récepteurs des estrogènes.

Étant donné les résultats biologiques intéressants des molécules hybrides d'estradiol-platine, le laboratoire du professeur Bérubé s'est ensuite intéressé à intégrer les connaissances acquises afin de développer une nouvelle méthode de synthèse de molécules à base de testostérone pour traiter le cancer de la prostate en utilisant la testostérone comme transporteur afin de cibler les récepteurs des androgènes. Le premier hybride de testostérone a été effectué en liant l'androgène à un agent chimiothérapeutique connu, le chlorambucil (Figure 3.3) [62]. Les tests d'activité antiproliférative montrent que l'hybride possède une activité cytotoxique similaire au chlorambucil. Ces travaux ont également permis de développer la méthode synthétique permettant de fonctionnaliser la testostérone à la position C-7 du noyau stéroïde et ainsi d'obtenir le composé 7 α -allyltestostérone, une molécule-clé dans la conception de différents composés anticancéreux de la prostate dans le laboratoire.

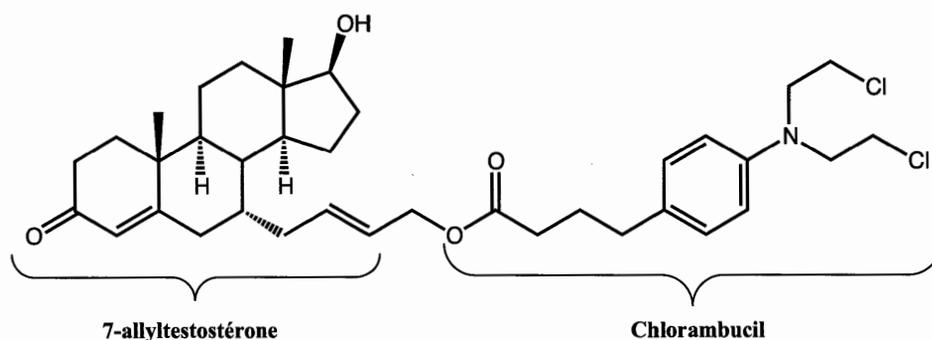


Figure 3.3 Structure moléculaire de l'hybride de testostérone-chlorambucil.

Suite à l'élaboration de cette séquence réactionnelle de fonctionnalisation, la première série de 6 hybrides testostérone-platine(II) a été synthétisée en utilisant le 17 β -acétyl-testostérone et plusieurs complexes de platine(II) formés de différents acides aminés liés à la position 7 α pour viser et améliorer l'activité antiproliférative

des agents chimiothérapeutiques à base de platine sur les cellules cancéreuses de la prostate [63]. Deux hybrides de la série sont montrés en exemple dans la Figure 3.4.

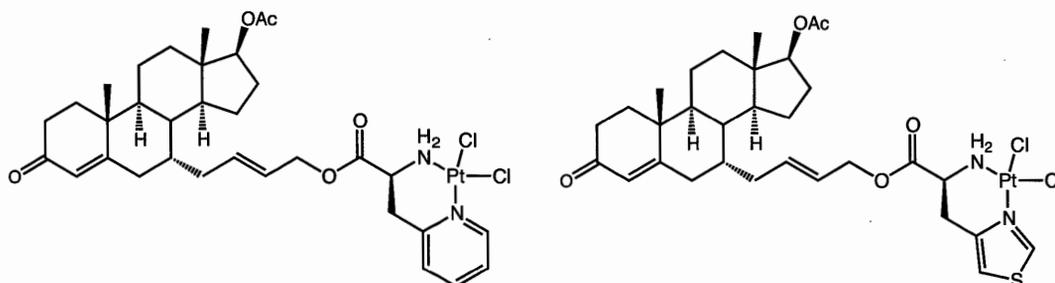


Figure 3.4 Structures moléculaires d'hybrides testostérone-platine(II) de première génération.

Les résultats d'activité antiproliférative des composés sur des lignées cellulaires de la prostate montrent que les complexes possèdent une activité cytotoxique envers les cellules cancéreuses de la prostate. Sur les 6 hybrides, 3 montrent une activité cytotoxique significativement supérieure au cisplatine, qui a été utilisé comme contrôle dans les lignées cellulaires. De plus, une évaluation biologique a permis de démontrer que les trois mêmes composés ont arrêté la progression du cycle cellulaire en induisant la rupture de la double hélice de l'ADN. Les résultats obtenus par cette première série d'hybrides de testostérone-platine(II) montrent leur rôle prometteur comme agents anticancéreux ciblés.

Le laboratoire s'est également intéressé à la synthèse de dimère de testostérone agissant comme antiandrogène. Les deux premiers isomères (*trans* et *cis*, 2:1) d'un dimère de testostérone ont été synthétisés dans le laboratoire en utilisant la métathèse croisée de Grubbs comme étape clé pour former la molécule dimérique à partir du 7 α -allyltestostérone [64]. Le dimère est représenté sur la Figure 3.5 par la molécule A. L'évaluation de l'activité biologique montre que le dimère *cis* possède l'activité cytotoxique la plus élevée sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate.

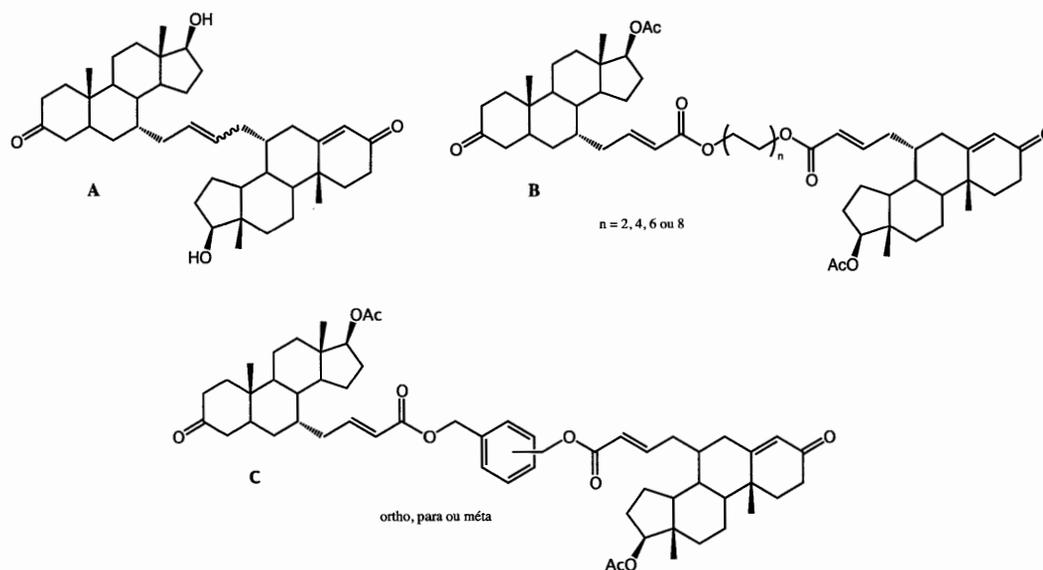


Figure 3.5 Structures moléculaires de différents dimères de testostérone synthétisés dans le laboratoire.

Deux autres séries de dimères (B et C) ont été synthétisées par la suite en utilisant deux types de connecteurs différents cette fois-ci : des diols aliphatiques de longueur variable et des diols aromatiques de substitution variable (*ortho*, *méta* et *para*). Les dimères obtenus sont liés par deux fonctions esters. Les dimères de la série B montrent une activité antiproliférative intéressante sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate. Les dimères obtenus montrent une meilleure activité que leurs monomères correspondants ce qui démontre l'importance de l'efficacité des molécules dimériques dans le mécanisme d'action des composés au potentiel antiandrogénique.

3.2 Objectifs du projet de recherche

Le présent projet de maîtrise vise à développer de nouveaux agents anticancéreux à base de testostérone pour le traitement du cancer de la prostate. Le projet se divise en deux volets : la synthèse de nouveaux hybrides testostérone-platine(II) et la synthèse

d'un nouveau dimère de testostérone. Les molécules sont ensuite testées sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate *in vitro* afin de mesurer l'activité antiproliférative de ces dernières.

3.2.1 La synthèse d'hybrides testostérone-platine(II)

L'objectif principal de ce projet de maîtrise est de synthétiser une deuxième génération d'hybrides testostérone-platine(II) pour le ciblage thérapeutique du cancer de la prostate. Comme il a été mentionné dans la section 3.1, une première série d'hybrides testostérone-platine(II) a été synthétisée et a démontré des résultats d'activité biologique intéressants au niveau de cellules cancéreuses de la prostate. Partant des résultats obtenus précédemment, le but de ce projet est de synthétiser de nouveaux complexes de platine liés à la testostérone avec une chaîne de liaison chimiquement plus solide et une activité antiproliférative supérieure au cisplatine. La stratégie de synthèse générale des hybrides repose sur le concept de ciblage thérapeutique élaborée précédemment à la section 2.3. Le design général des hybrides repose sur le fait de lier un androgène (testostérone) à un agent chimiothérapeutique (platine) afin de pouvoir cibler spécifiquement les récepteurs des androgènes des cellules cancéreuses de la prostate (Figure 3.6). Comme mentionné auparavant, le cisplatine n'est pas très sélectif envers les cellules cancéreuses ce qui fait qu'il cause de nombreux effets secondaires néfastes pour le patient. Notre hypothèse est qu'en ciblant les RA, nous pensons augmenter l'efficacité et la spécificité d'action des hybrides tout en réduisant la toxicité de ces derniers sur les autres cellules saines du patient puisque le transporteur possède une affinité élevée pour ces récepteurs. La testostérone agit ainsi comme transporteur du platine, l'agent chimiothérapeutique. Le platine, selon notre hypothèse, va interférer avec l'ADN en inhibant la réplication cellulaire et induire l'apoptose des cellules cancéreuses selon le mécanisme d'action du cisplatine.



Récepteur / Androgène ----- Partie cytotoxique

Figure 3.6 Concept de synthèse des hybrides de testostérone-platine(II).

Pour y parvenir, nous voulons développer une synthèse plus efficace afin de créer de nouveaux analogues possédant un connecteur différent entre la testostérone et la portion platine. La première génération d'hybride a été synthétisée en utilisant un groupement ester comme connecteur. Il est connu qu'une fonction ester peut s'hydrolyser en milieu physiologique par les estérases pour former un acide carboxylique et un alcool ce qui aurait comme conséquence de séparer la partie androgène et platine. Étant donné ceci, il est possible que le composé hybride soit dégradé avant de se rendre au site des RA et perdre ainsi son efficacité. Avec cette deuxième génération d'hybrides, nous voulons utiliser un connecteur plus résistant dans la synthèse afin que le composé puisse se rendre au site désiré sans être modifié et altéré par les différents systèmes biologiques de l'organisme et puisse exercer son activité anticancéreuse. Nous avons décidé d'utiliser la fonction 1,2,3-triazole comme connecteur afin de concevoir les nouveaux conjugués installés par une réaction de « chimie click ». Une analyse rétrosynthétique générale des hybrides testostérone-platine(II) est présentée dans la Figure 3.7. Cette rétrosynthèse montre le chemin envisagé pour la synthèse des nouveaux hybrides.

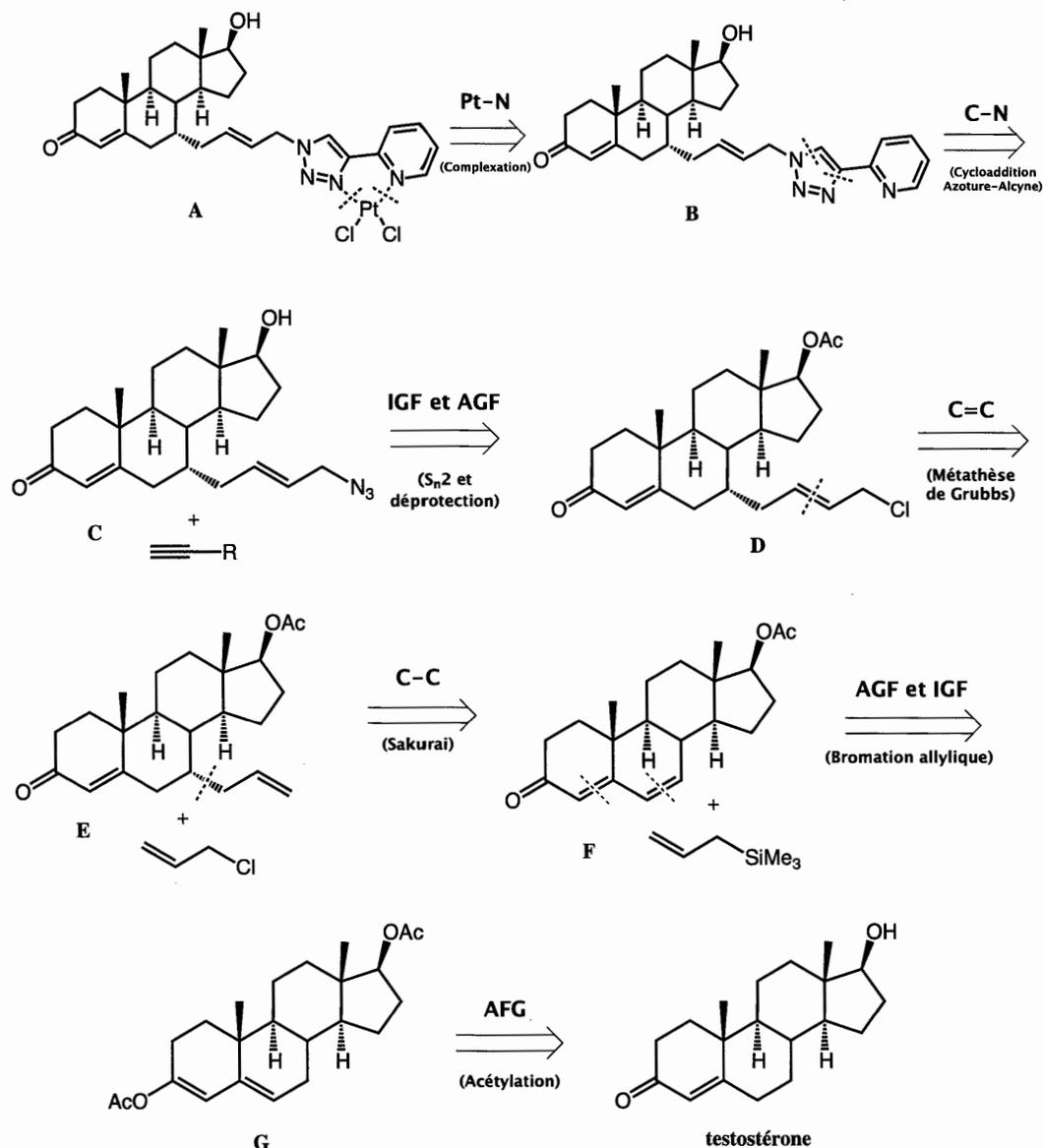


Figure 3.7 Rétrosynthèse générale des hybrides testostérone-platine(II).

Tout d'abord, la rétrosynthèse débute par la rupture des deux liens de coordination entre l'ion platine et les deux azotes (Pt-N) formant le complexe de platine A ce qui permet d'obtenir le ligand triazole B correspondant. Le composé triazole est formé à partir d'une réaction de cycloaddition azoture-alcyne (chimie click) menant au composé azoture C et un réactif possédant une fonction alcyne terminale. L'azoture C

est obtenu par une interconversion de groupement fonctionnel (IGF) à partir du dérivé de testostérone D lequel est obtenu en coupant le lien C=C par une métathèse Grubbs avec un dérivé allylique approprié. Ce dernier doit être porteur d'un bon groupe sortant. Le composé résultant de cette coupure, le 7 α -allyltestostérone (E) est obtenu par une addition conjuguée, la réaction de Sakurai, avec l'allyltriméthylsilane et le composé diènone F. Le composé diènone est converti en deux étapes par IGF et AGF afin d'obtenir la testostérone, le produit de départ de la synthèse des hybrides. Les réactions chimiques de la synthèse seront expliquées plus en détail dans le Chapitre III du mémoire.

3.2.2 La synthèse d'un nouveau dimère de testostérone

L'objectif secondaire de ce projet de maîtrise consiste à synthétiser un nouveau dimère de testostérone qui agirait comme antiandrogène dans le traitement du cancer de la prostate. Le but est de lier deux unités de testostérone par un connecteur afin de pouvoir cibler les RA des cellules cancéreuses de la prostate et ainsi bloquer ces sites afin de réduire la croissance des tumeurs cancéreuses de la prostate. L'intérêt de l'utilisation de molécules dimériques en tant qu'agents thérapeutiques attire l'attention des chercheurs depuis plusieurs années en raison de leur valeur thérapeutique prometteuse pour le traitement de différentes maladies [65]. En effet, les dimères présentent généralement des propriétés biologiques et une affinité supérieures pour les récepteurs qu'ils lient par rapport à leurs monomères correspondants [66]. Au niveau moléculaire, l'étude des interactions de ce type de composés avec des macromolécules biologiques (ADN, ARN, récepteur spécifique, etc.) présente un intérêt fondamental majeur et mène à une meilleure compréhension à la fois des sondes et des macromolécules étudiées [67]. Le raisonnement derrière l'utilisation de ligand bivalent pour le design de médicaments repose sur la probabilité qu'une molécule dimérique puisse se lier à des sites de reconnaissance indépendants sur le récepteur résultant en une liaison

thermodynamiquement favorable plutôt que la liaison monovalente de deux molécules [65]. Ceci peut être également appliqué à deux récepteurs voisins comme les RA dans le cas qui nous intéresse [66]. Le but théorique serait donc de lier deux RA simultanément par l'utilisation d'un dimère de testostérone. De plus, il est connu que les RA doivent se dimériser lors de leur processus cellulaire afin d'induire leurs activités biologiques. L'usage d'un dimère devient alors encore plus intéressant. La double interaction d'une molécule bivalente utilisée comme antiandrogène peut produire une meilleure sélectivité et efficacité comparée à l'activité d'un monomère [65].

Le but est donc de synthétiser un homodimère stéroïdien composé de deux unités identiques de testostérone reliées par un connecteur approprié permettant de se lier aux RA afin de les inactiver. Il est important d'utiliser un connecteur résistant possédant une longueur de chaîne appropriée. En effet, la longueur de la chaîne liant les deux sous-unités exercent un effet direct sur l'activité biologique. En fait, la géométrie, la mobilité conformationnelle et la longueur du connecteur peuvent influencer l'orientation des sous-unités de testostérone ce qui a un impact considérable sur l'affinité du dimère envers le récepteur [64, 65]. Il est donc important d'avoir un connecteur adéquat afin de maximiser la probabilité de liaison aux récepteurs pour pouvoir les activer et interférer avec la transcription de ces derniers afin que le dimère puisse agir comme antiandrogène.

L'analyse rétrosynthétique de la molécule dimérique envisagée est présentée à la Figure 3.8. La synthèse du dimère passe par la même séquence réactionnelle que celle des hybrides de testostérone-platine(II). La fonctionnalisation de la testostérone mène au composé B qui est le précurseur du dimère à synthétiser. Le malonate de diméthyle est ensuite employé comme connecteur pour construire le dimère A par double alkylation du composé B (Figure 3.8). Cette réaction est possible étant donné la facilité avec laquelle une base peut énoliser le malonate de diméthyle et être dialkylé.

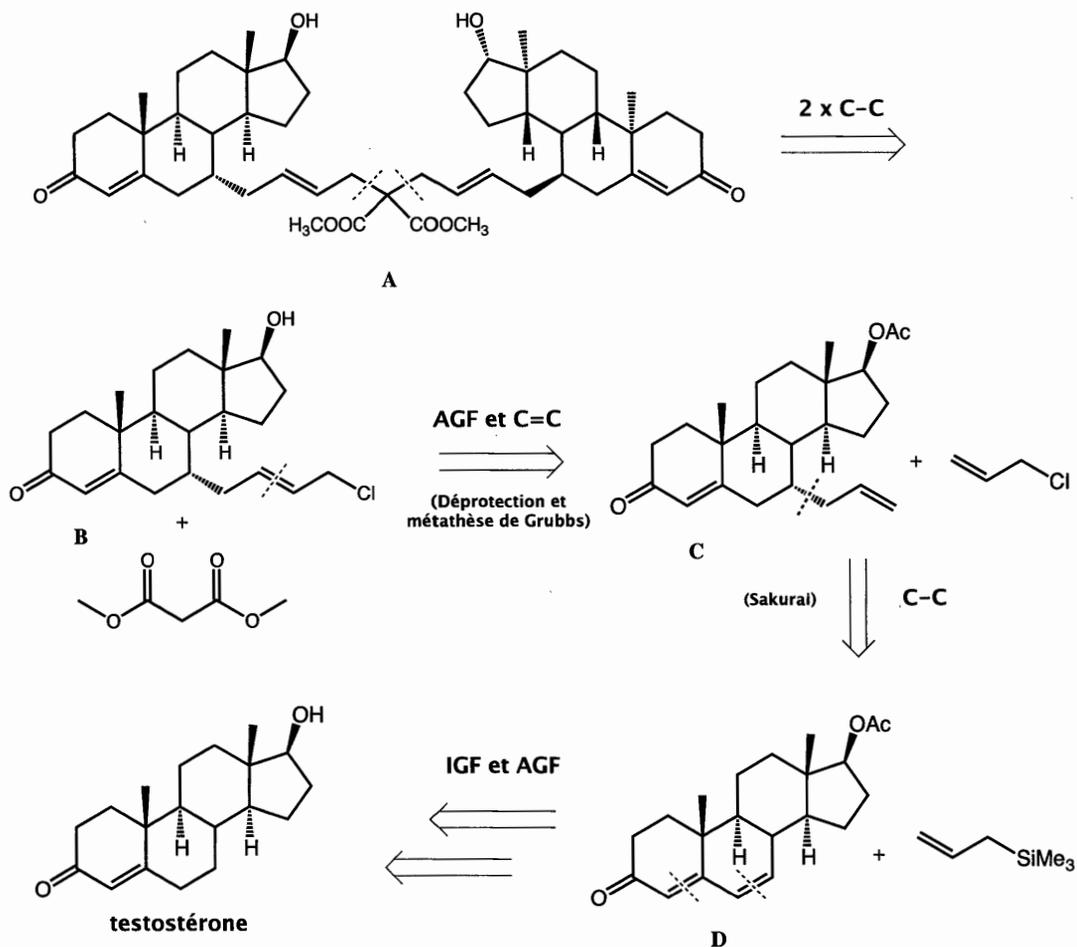


Figure 3.8 Rétrosynthèse du dimère de testostérone.

On peut apprécier la polyvalence du composé C obtenu à partir de la testostérone (Figure 2.8), le 7 α -allyltestostérone, la pierre angulaire de nombreux composés qui ont été synthétisés et qui sont en voie de l'être dans le laboratoire comme on a pu le constater dans la section 3.1.

3.2.3 Évaluation de l'activité biologique des molécules synthétisées

Une fois les molécules synthétisées, l'activité antiproliférative de celles-ci doit être mesurée afin de pouvoir apprécier leur effet sur les cellules cancéreuses de la prostate et voir si elles peuvent être utilisées comme de potentiels agents chimiothérapeutiques. La méthode sera expliquée et les résultats d'activité cytotoxique des composés sur les différentes lignées cellulaires cancéreuses seront présentés dans le chapitre IV.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le présent chapitre présente les résultats de la synthèse des différents composés obtenus dans le laboratoire lors de mes travaux de recherche durant ma maîtrise. Le chapitre est divisé en trois sections distinctes pour chaque objectif énuméré précédemment dans le chapitre III. La discussion est intégrée aux résultats obtenus.

4.1 Synthèse d'hybrides testostérone-platine(II)

4.1.1 Fonctionnalisation de la testostérone

La première étape de la synthèse consiste à fonctionnaliser la testostérone. En effet, la testostérone ne contient aucune fonctionnalité ou site réactif qui permet d'ajouter une unité chimique sur le site B du stéroïde. Il est donc nécessaire de fonctionnaliser la molécule au niveau du carbone 7 en induisant un site réactionnel à cet endroit, permettant ainsi par la suite l'ajout d'une chaîne allyle (Schéma 4.1). Cet endroit est d'autant plus intéressant, car il est situé à mi-chemin entre les fonctions cétone (C-3) et hydroxy (C-17), lesquelles interagissent avec les acides aminés des RA pour effectuer la liaison du ligand. Il ne faut pas modifier ces deux fonctionnalités afin de pouvoir conserver l'interaction entre le stéroïde et le récepteur et ainsi maximiser la probabilité de liaison.

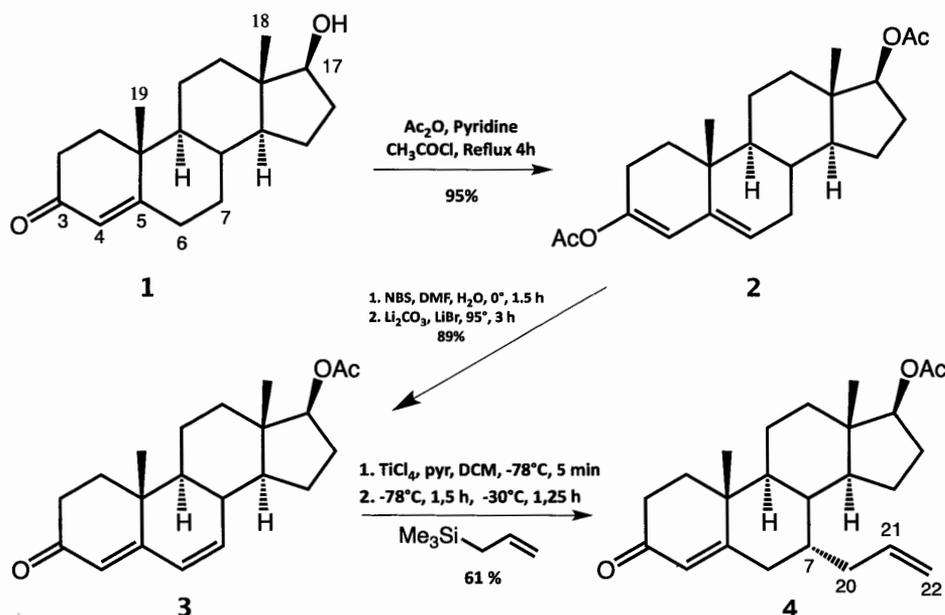


Schéma 4.1 Chemin synthétique menant à la fonctionnalisation de la testostérone en position 7 α .

4.1.1.1 Synthèse du diacétate de 3,5-androstadiène-3,17 β -diol (2)

La première étape consiste à effectuer une séquence de deux étapes afin d'introduire une fonctionnalité, une liaison double, au niveau des carbones 6 et 7 du stéroïde pour obtenir la molécule **3** à partir d'une méthode rapportée dans la littérature utilisant la nandrolone¹ (19-nortestostérone), un dérivé de la testostérone comme molécule de départ [68]. La première partie de la séquence consiste à protéger les fonctionnalités présentes sur les carbones 3 et 17 (cétone et alcool) à l'aide de groupements acétate. La testostérone est transformée en diacétate en présence de chlorure d'acétyle et de pyridine dans de l'anhydride acétique [68]. Le résultat de cette réaction est l'obtention du diacétate de 3,5-androstadiène-3,17 β -diol (molécule **2**) (formation d'un diène acétate). Le monoacétate en position 17 est d'abord formé par la réaction de l'alcool

¹ La seule différence structurale entre la nandrolone et la testostérone, est l'absence d'un groupement méthyle à la position C-19 du noyau stéroïde.

avec le chlorure d'acétyle car la fonction alcool est plus réactive que la cétone en position C-3 ce qui implique qu'elle réagit en premier. C'est ce que nous avons observé par CCM. La pyridine présente dans le milieu trappe le proton sur l'atome d'oxygène du carbone 17 lors de la réaction. Le sel de pyridine formé permet ensuite d'activer la fonction cétone pour l'énoliser avec perte d'un proton en position 6 (le diénol est acylé par les réactifs en présence). La pyridine arrache le proton en position 6 ce qui forme une double liaison. Une deuxième acétylation s'effectue sur le groupement alcool formé ce qui donne le diacétate **2** avec un rendement de 95 %. La littérature rapporte un rendement similaire (93 %) [68]. L'analyse du spectre RMN ^1H permet de constater l'apparition de deux singulets aux positions 2,13 ppm et 2,04 ppm qui correspondent aux deux méthyles des groupements acétates précédemment ajoutés. On note également l'apparition d'un triplet à 5,39 ppm qui correspond au proton de l'alcène situé sur le carbone 6.

4.1.1.2 Synthèse de l'acétate de 4,6-androstadiène-17 β -ol-3-one (**3**)

La deuxième partie de la séquence consiste à déprotéger la cétone en C-3 et faire migrer les doubles liaisons pour obtenir la diénone **3**. Ceci est effectué en traitant le produit diacétate **2** avec du *N*-bromosuccinimide (NBS), du carbonate de lithium (Li_2CO_3) et du bromure de lithium (LiBr) [64, 68]. Un atome de brome est ajouté dans un premier temps sur le carbone 7 par la réaction de bromation allylique avec le NBS. La fonction cétone sur le carbone 3 est ensuite obtenue par l'action du Li_2CO_3 et du LiBr. Le retour des électrons sur l'atome d'oxygène permet de faire migrer les doubles liaisons et d'éjecter l'atome de brome sur le carbone 7 et ainsi générer le site réactionnel désiré. Alternativement, l'ester de diénol **2** pourrait être bromé en position 6 α pour donner l'intermédiaire acétate de 6 α -bromo-4-androstène-17 β -ol-3-one [69]. Le brome serait par la suite éliminé sous l'action Li_2CO_3 et du LiBr. Le produit désiré **3**, l'acétate de 4,6-androstadiène-17 β -ol-3-one, est obtenu avec un rendement de 89 %. La littérature

rapporte un rendement de 62 % [68]. Le spectre RMN ^1H permet de confirmer la structure du produit désiré par la disparition du singulet situé à 2,13 ppm de l'acétate autrefois présent en C-3. On observe également l'apparition d'un singulet à 6,11 ppm qui correspond aux deux protons de l'oléfine en C-6 et C-7.

4.1.1.3 Synthèse de l'acétate de 7α -allyl-4-androstène-17 β -ol-3-one (4)

Avec le nouveau site réactionnel introduit sur le carbone 7, il est maintenant possible d'ajouter une chaîne allyle par la réaction de Sakurai [70-73] et ainsi procéder à la fonctionnalisation de la position 7 du noyau stéroïde. L'ajout de cette chaîne allyle de manière stéréospécifique en α constitue un point d'attache idéal pour l'ajout subséquent de différents groupements fonctionnels. La molécule **3** est traitée, à basse température, avec le tétrachlorure de titane (TiCl_4) et l'allyltriméthylsilane en présence de pyridine dans du dichlorométhane (DCM) selon la procédure rapportée par Nickisch et Laurent [70] sur un stéroïde similaire. La réaction est catalysée par l'ajout d'un acide de Lewis fort, le TiCl_4 . Ce dernier complexe le carbonyle et polarise le système conjugué. Ensuite, les électrons de la double liaison de l'allyltriméthylsilane réagissent avec le carbone δ^+ en C-7 par attaque nucléophile ce qui forme une chaîne intermédiaire comportant un carbocation en position beta de l'atome de silicium. Les carbocations secondaires sont de nature instable, mais dans ce cas-ci, l'effet beta-silicium (ou encore hyperconjugaison du silicium) permet de stabiliser le carbocation secondaire. La stabilisation s'effectue par le recouvrement de l'orbitale p vide du carbocation par l'orbitale σ du lien Si-C [74]. Le mécanisme par lequel s'effectue l'effet de don d'électrons s'explique par l'hyperconjugaison, en particulier la conjugaison $(p-\sigma)_n$. L'implication proposée de la liaison Si-C peut être comprise en considérant le haut degré de polarisation du lien σ Si-C. Ceci permet un coefficient élevé sur le carbone et augmente l'habileté à stabiliser un centre adjacent pauvre en électrons par le recouvrement des orbitales. De plus, l'orbitale de liaison Si-C est plus énergétique que

celle de l'orbitale de liaison H-C ou C-C ce qui fait en sorte le partage avec l'orbitale p vide est meilleur [74]. Il est également intéressant de noter qu'il est possible que la conjugaison $(p-\sigma)_n$ joue un rôle significatif dans l'affaiblissement du lien Si-C et permet ainsi le processus de clivage qui sont fréquemment rencontrés dans les réactions d'organosilanes β -fonctionnalisés, comme celle utilisée pour obtenir le produit **4**, l'acétate de 7α -allyl-4-androstène-17 β -ol-3-one. Le rendement de cette réaction est de 61%. Ce résultat est légèrement inférieur à celui obtenu (rendement de 71 %) par Nickisch et Laurent. Le rendement plus faible de cette réaction par rapport aux deux réactions précédentes s'explique par le fait que le TiCl_4 est une espèce très réactive qui donne lieu à des réactions secondaires. L'analyse du spectre RMN de la molécule **4** permet de voir l'apparition des 3 protons de la chaîne allylique avec deux signaux distincts à 5,62 ppm et 5,00 ppm. De plus, le singulet correspondant aux deux protons alcéniques des carbones 6 et 7 n'est plus présent étant donné le retrait de cette liaison double lors de l'addition de la chaîne.

4.1.2 Synthèse du composé précurseur de la formation des hybrides

Une fois la fonctionnalisation de la testostérone effectuée, nous pouvons maintenant synthétiser le précurseur des hybrides, c'est-à-dire l'azoture **7** qui nous permettra ensuite de former les composés triazoles par chimie « click » (Schéma 4.2).

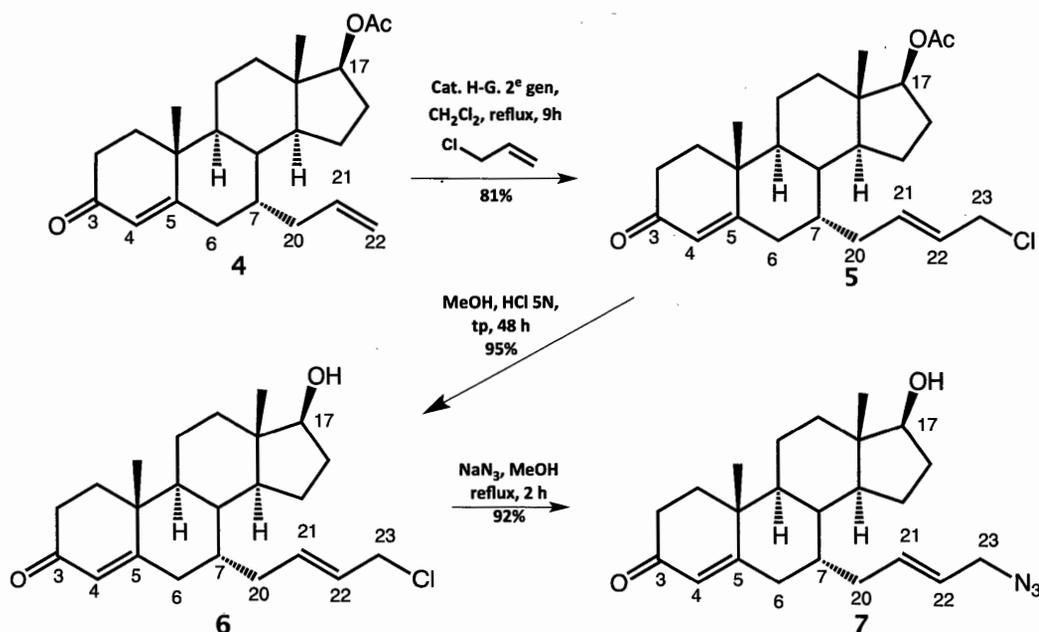


Schéma 4.2 Synthèse du précurseur des hybrides, le composé azoture 7.

4.1.2.1 Synthèse de l'acétate de 7 α -(4-chloro-but-2-ényl)-4-androstène-17 β -ol-3-one (5)

La prochaine étape de la synthèse consiste à ajouter un chlorure d'allyle sur la chaîne allyle de la molécule 4 par la métathèse croisée de Grubbs. Le composé 4, le 7 α -allyltestostérone, est ajouté à du DCM avec le chlorure d'allyle en présence du catalyseur Hoveyda-Grubbs de 2^e génération, un catalyseur à base de ruthénium [75]. La réaction permet d'obtenir le produit désiré 5, l'acétate de 7 α -(4-chloro-but-2-ényl)-4-androstène-17 β -ol-3-one avec un rendement de 81%. La métathèse croisée permet la formation d'un nouveau lien carbone-carbone par la réaction de deux alcènes. Durant la réaction, les alcènes terminaux des deux molécules (le chlorure d'allyle et la chaîne allyle sur la testostérone) réagissent avec le catalyseur métallique de ruthénium pour former une nouvelle chaîne alkyle ne comportant qu'une seule double liaison. La réaction s'effectue par l'interconversion d'un alcène et d'un alkyldène métallique. Le processus se produit via un intermédiaire métallocyclobutane en alternant

cycloaddition [2+2] et cycloréversion [76]. Dans le cas présent, l'alcène terminal de la molécule **4** et l'alcène du chlorure allylique réagissent avec le catalyseur de ruthénium ce qui forme un cycle catalytique durant lequel une chaîne comportant une nouvelle double liaison est formée libérant de l'éthène dans le milieu réactionnel. Le résultat de cette réaction est la molécule **5**. La synthèse de ce composé est intéressante étant donné l'introduction d'un nouveau site réactionnel, l'atome de chlore. L'ajout de ce chlore peut être utilisé pour de nombreuses réactions et être substitué principalement par des nucléophiles pour pouvoir ensuite effectuer de la chimie « click ». Il est possible d'observer que l'addition s'est bien effectuée en observant le spectre RMN ^1H par la présence d'un multiplet à 5,60 ppm qui correspond aux protons de l'alcène sur la chaîne allyle et d'un multiplet situé à 4,01 ppm représentant les protons du CH_2 situé à côté de l'atome de chlore. Le signal qui représentait les protons terminaux du carbone 22 de la molécule **4** n'est plus présent également.

4.1.2.2 Synthèse de 7α -(4-chloro-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 β -ol-3-one (**6**)

Il est maintenant temps de retirer le groupement protecteur acétate installé précédemment en début de synthèse sur le groupement alcool en position C-17 par une réaction de désacétylation. Pour ce faire, un traitement acide (HCl 5N) est effectué sur la molécule **5** avec du méthanol afin d'enlever le groupe acétyle et former le produit **6**, le 7α -(4-chloro-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 β -ol-3-one. Plusieurs essais de cette réaction ont été effectués afin d'obtenir le produit **6** désiré. En premier lieu, le mélange réactionnel a été chauffé à léger reflux pendant 2 heures ce qui aide la réaction à s'effectuer. Cependant, l'analyse du produit brut de réaction obtenu semble indiquer qu'en chauffant, on favorise la formation d'un produit secondaire non-désiré **6.1** (Figure 4.1). L'hypothèse privilégiée est que la chaleur favorise l'attaque $\text{S}_{\text{n}}1$ du méthanol via le carbocation allylique sur le carbone en position 23 ce qui introduit un groupement méthoxy à la place de l'atome de chlore.

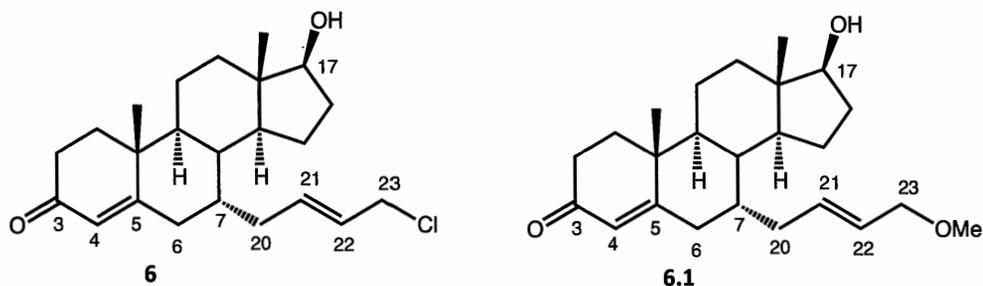


Figure 4.1 Produits formés lors de la réaction de désacétylation avec chauffage.

L'analyse du spectre RMN ^1H de la molécule **6.1** montre le singulet correspondant aux 3 protons du groupement méthoxy en bout de chaîne. De plus, en chauffant, l'analyse de la CCM du produit brut montre 2 tâches distinctes qui correspondent aux produits **6** et **6.1**. Afin d'éviter l'obtention du produit secondaire **6.1**, la réaction a été refaite en laissant la réaction se dérouler à température ambiante sans reflux. La réaction a été complétée après 48 heures. On note ainsi que le temps de réaction est plus long, mais qu'on ne forme qu'un seul produit majoritaire. Le produit **6** est obtenu avec un rendement de 95 %. L'analyse du spectre RMN ^1H de la molécule permet de confirmer la structure du produit par l'absence du singulet correspondant au méthyle du groupement acétate à 2,03 ppm.

4.1.2.3 Synthèse de 7α -(4-azido-but-2-ènyle)-4-androstène-17 β -ol-3-one (7)

La prochaine étape consiste à transformer le composé **6** en composé azoture **7**. Pour ce faire, on utilise l'azoture de sodium (NaN_3) afin de déplacer l'halogénure par substitution nucléophile en bout de chaîne pour former le composé azoture **7**, le 7α -(4-azido-but-2-ènyle)-4-androstène-17 β -ol-3-one. L'anion N_3^- agit comme nucléophile ce qui permet la réaction de substitution du chlore, qui est un bon groupe sortant, afin de former le produit azoture **7**. La structure du produit est confirmée par l'analyse infrarouge du composé. On note une bande d'absorption entre 2094 et 2073 cm^{-1} qui correspond au groupement N_3 introduit sur la molécule. L'ajout d'un groupement

azoture est hautement intéressant, car il permet par la suite de synthétiser des composés par chimie « click ». Le terme chimie « click » a été élaboré et introduit par Sharpless en 2001 afin de décrire un ensemble réactions sélectives, fiables et puissantes permettant la formation rapide de nouveaux produits par des liaisons hétéroatomes [77]. Pour être considéré comme une réaction de chimie « click », différents critères doivent être rencontrés. La réaction doit être modulaire, posséder un vaste champ d'application, donner de hauts rendements, être stéréospécifique et générer des sous-produits inoffensifs facilement éliminables. Les caractéristiques de procédures requises incluent des conditions réactionnelles simples, des réactifs de départ disponibles commercialement, l'utilisation de solvant bénin (comme l'eau) ou facilement retirable et une purification de produit simple [77]. Les réactions de chimie « click » atteignent leurs caractéristiques requises en ayant une force motrice thermodynamiquement élevée, ce qui fait en sorte qu'elles se déroulent rapidement et tendent à être hautement sélectives d'un seul produit de réaction. Les réactions chimiques comprises dans cette famille de réactions comprennent entre autres les cycloadditions d'espèces insaturées, la réaction qui nous intéresse particulièrement pour la formation de composés triazoles.

4.1.3 Synthèse des hybrides testostérone-platine(II)

Ayant synthétisé avec succès le précurseur d'hybrides, le composé azoture **7**, les hybrides peuvent être maintenant synthétisés par l'utilisation de la réaction de cycloaddition d'azoture-alcyne catalysée au cuivre (CuAAC), une réaction de chimie « click » comme expliqué précédemment. Pour y parvenir, trois composés alcyriques (**7**, **8** et **9**) différents sont utilisés pour bâtir les molécules hybrides (Figure 4.2). La molécule **7**, la 2-éthynylpyridine, est commercialement disponible; il n'est donc pas nécessaire de le synthétiser. Cependant, les composés **8** et **9** doivent être synthétisés n'étant pas disponibles commercialement.

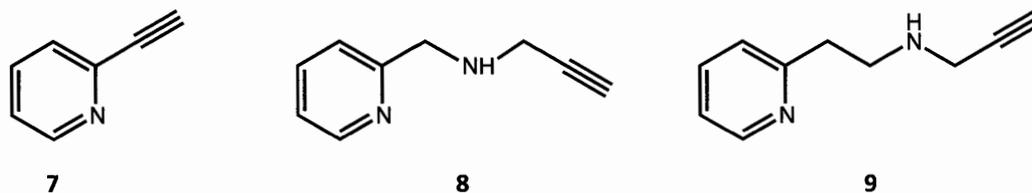


Figure 4.2 Composés alcynes utilisés pour la synthèse des hybrides testostérone-platine(II).

Les deux produits (**8** et **9**) sont synthétisés de la même manière soit par substitution nucléophile de l'aminopyridine correspondant sur le bromure propargylique selon la procédure rapportée par Atilgan *et al.* [78]. On obtient les deux molécules avec des rendements similaires soit de 50 et 46 % pour les composés **8** et **9** respectivement (Schéma 4.3).

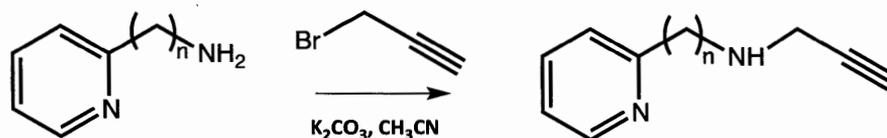


Schéma 4.3 Synthèse des dérivés propargyliques.
(La molécule **8**, $n=1$ et la molécule **9**, $n=2$.)

La littérature rapporte un rendement de 41 % pour la molécule **8** ce qui est très semblable à ce qui a été obtenu [78]. Il n'y a aucun article de la littérature qui rapporte la synthèse de **9**. L'analyse des spectres RMN (¹H et ¹³C) des deux molécules permet de confirmer la structure des produits. La seule différence entre les deux molécules est la présence d'un CH₂ de plus sur la molécule **9**. Ceci fait en sorte que les spectres sont presque identiques en termes de déplacement chimique et allure des pics à l'exception du signal correspondant aux CH₂ de la chaîne entre la portion pyridine et l'amine secondaire. En RMN ¹H, le CH₂ de la molécule **8** sort sous la forme d'un singulet à 3,98 ppm tandis que les deux CH₂ de la molécule **9** sortent sous la forme de deux multiplets identiques à 3,10 et 2,96 ppm. En RMN ¹³C, on compte 9 pics pour chaque

molécule. Ceci correspond bien au nombre de carbones de la molécule **8**, qui compte 9 atomes de carbone dans sa structure chimique. Cependant, la molécule **9** possède 10 atomes de carbone dans sa structure chimique; on devrait donc retrouver 10 pics sur son spectre RMN ^{13}C . Le spectre montre un seul pic à 38,0 ppm correspondant aux deux CH_2 de la chaîne située entre la portion pyridine et l'amine secondaire. On peut confirmer que le pic correspond bien à deux carbones, car l'intensité de ce dernier est presque le double de l'intensité du pic de l'autre CH_2 de la molécule. La structure est également confirmée par l'analyse du spectre RMN ^1H et l'analyse de la masse par spectrométrie de masse à haute résolution (SMHR).

Il est maintenant possible de procéder à la synthèse des composés triazoles, c'est-à-dire les composés précurseurs des hybrides de testostérone-platine(II) par la réaction de cycloaddition d'azoture-alcyne mentionnée précédemment. Les conditions réactionnelles utilisées pour construire les composés triazoles sont basées sur la méthode développée par Sharpless [79] (Schéma 4.4).

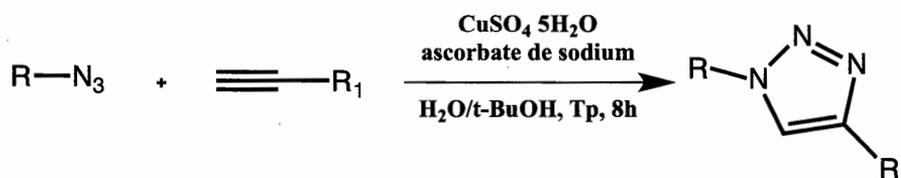


Schéma 4.4 Réaction générale de cycloaddition d'azoture-alcyne développée par Sharpless, 2002.

La réaction développée par Sharpless découle de la réaction de cycloaddition de Huisgen, une cycloaddition 1,3-dipolaire [80]. C'est une réaction chimique entre un composé 1,3-dipolaire et un dipolairophile formant un hétérocycle à 5 membres. La réaction de Huisgen est souvent utilisée pour décrire spécifiquement la cycloaddition entre un azoture organique (1,3-dipolaire) et un alcyne (dipolairophile) permettant la formation de composés 1,2,3-triazole. C'est d'ailleurs sans doute la

réaction la plus utile de cette famille de cycloaddition [79]. Le composé 1,3-dipôle réagit avec le dipolairophile par un mécanisme concerté péricyclique où les 4 électrons π du 1,3-dipôle interagissent avec les 2 électrons π du 1,3-dipolairophile ce qui donne lieu à une cycloaddition $[4_s+2_s]$ [81]. Par contre, le désavantage de cette réaction est qu'elle nécessite une température élevée et donne lieu à la formation d'un mélange équimolaire de deux régioisomères triazoles 1,4- et 1,5-bifonctionnalisés (Schéma 4.5) [79].

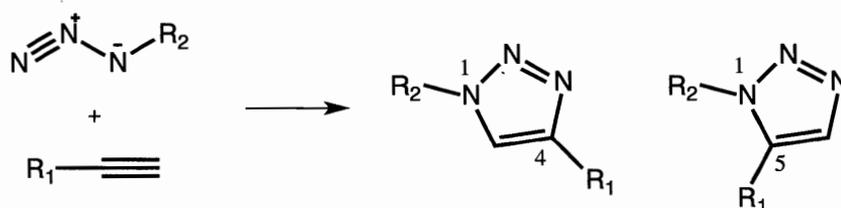


Schéma 4.5 Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un azoture et un alcyne.

La réaction alternative de cycloaddition azoture-alcyne développée par Sharpless règle ce problème en utilisant une version de la réaction qui est catalysée au cuivre(I) permettant de contrôler la régiosélectivité du produit final. Le seul produit de la réaction est le composé régiosélectif 1,2,3-triazole 1,4-bisubstitué. En revanche, une réaction catalysée au ruthénium développée ultérieurement permet d'obtenir la régiosélectivité inverse par l'obtention de composés 1,2,3-triazoles 1,5-bisubstitués [82]. Malgré son efficacité, le mécanisme par lequel évolue cette réaction reste difficile à élucider en raison de l'implication de multiples équilibres entre plusieurs intermédiaires réactifs. Différents mécanismes ont été proposés afin de tenter de comprendre ce qui se produit lors de la réaction de CuAAC [83-86]. Le mécanisme présenté à la Figure 4.3 a été proposé par Worrell *et al.* [87].

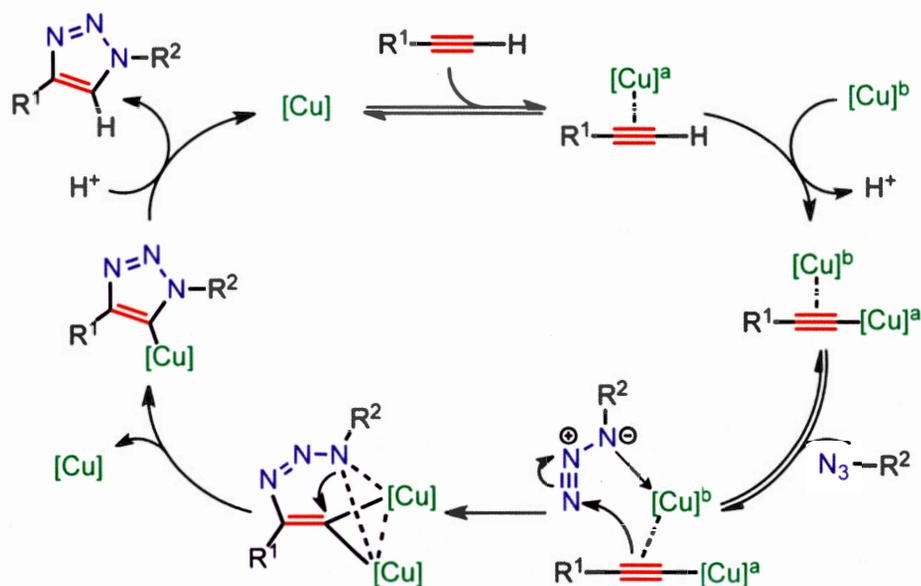


Figure 4.3 Mécanisme de la réaction de cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (Tirée de [87]).

À la suite d'études cinétiques et de marquage isotopique, Worrell *et al.* montrent que, dans le cas d'alcynes terminaux, deux équivalents de cuivre participent à l'activation de la réactivité de chaque molécule envers l'azoture. L'acétylure de cuivre se coordonne à l'azoture amenant la formation d'un métallacycle de cuivre à 6 membres inhabituel. Le deuxième atome de cuivre agit comme un donneur de ligand stabilisant. Il se produit ensuite une contraction de cycle qui permet d'obtenir l'intermédiaire triazole-cuivre qui, à la suite d'une protonolyse, donne le produit triazole attendu ce qui conclut le cycle catalytique. La source de cuivre(I) nécessaire au cycle catalytique de la réaction est formée *in situ* par la réduction du $\text{CuSO}_4(\text{II})$ par l'ascorbate de sodium, un agent réducteur. Au final, l'étude démontre que le mécanisme repose sur la formation d'un acétylure recrutant un atome de cuivre qui réagit avec un partenaire 1,3-dipolaire compatible par une réaction d'annélation [87].

Les trois composés triazoles synthétisés (**11**, **12** et **13**) dans le présent projet sont représentés dans le Schéma 4.6.

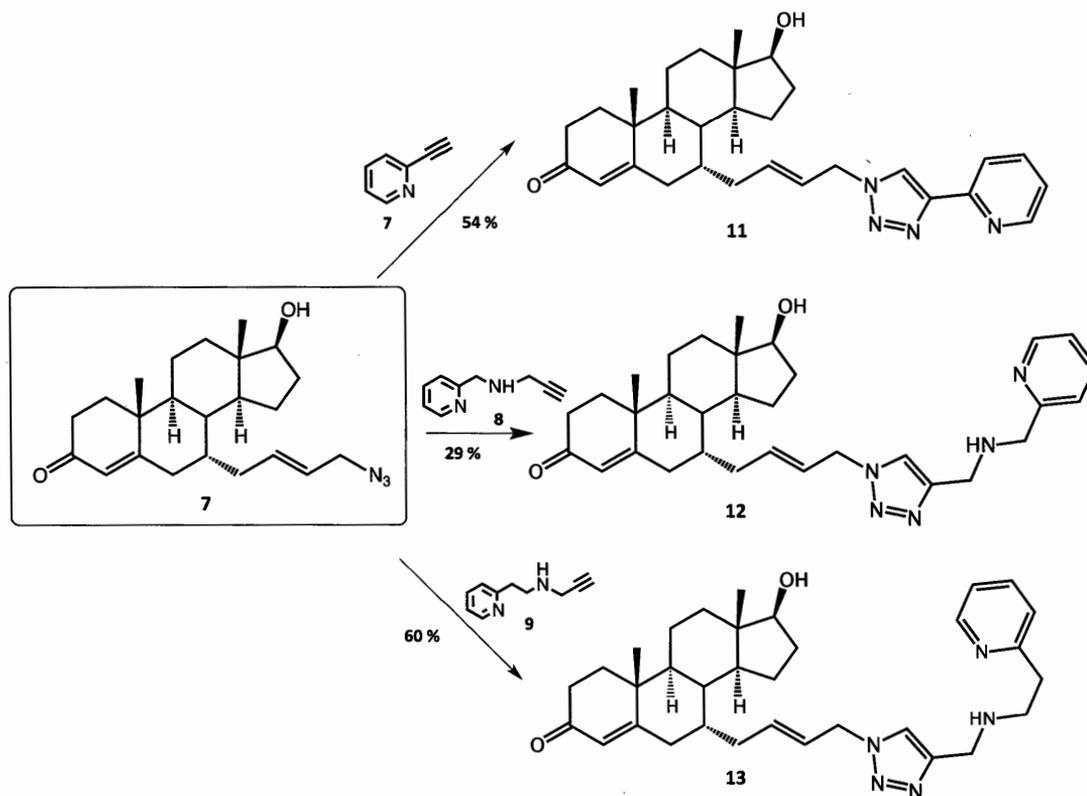


Schéma 4.6 Synthèse des différents composés triazoles, précurseurs des hybrides de testostérone-platine(II).

Le premier composé triazole (**11**) a été synthétisé avec un rendement de 54 %. Toutefois, il a fallu adapter les conditions à notre système afin de synthétiser la molécule désirée. La modification a été faite sur le choix de solvant. Le *tert*-butanol a été remplacé par du THF afin de faciliter la solubilité de l'azoture **7** dans le mélange réactionnel. Avant l'essai, quelques milligrammes de la molécule **7** ont été ajoutés à 1 mL de *tert*-butanol afin de vérifier la solubilité de celle-ci. La molécule n'était pas complètement soluble. Il a donc été décidé de changer de solvant afin de s'assurer du bon déroulement de la réaction. D'ailleurs, dans la publication de Sharpless, il est

mentionné que différents solvants peuvent être utilisés pour effectuer la réaction de cycloaddition. L'analyse du spectre RMN ^1H permet de confirmer la structure du produit obtenu. Le spectre montre les 4 pics des protons présents sur la portion pyridine de la molécule dans la région comprise entre 7 et 9 ppm. On retrouve également un singulet à 8,13 ppm qui correspond au seul proton présent sur la fonction triazole de la molécule.

Le deuxième composé triazole (**12**) a été synthétisé avec un rendement de 29 %. Le rendement est plus faible que le composé triazole **11**. Cette réaction a également été effectuée avec du THF au lieu de *t*-BuOH. Le composé propargylique (**8**) est aussi différent; on utilise ici un dérivé alcyne comportant une fonction amine. Différents essais ont été effectués afin d'améliorer le rendement de cette réaction. Dans un premier temps, la réaction a été effectuée en prenant une quantité équimolaire du composé azoture **7** et du dérivé acétylène **8**. Deux essais ont donné un rendement de 15 et 17 %. D'autres essais ont été effectués en changeant le nombre d'équivalent d'ascorbate de sodium et de sulfate de cuivre; l'augmentation de la quantité de ces deux réactifs ne semble pas influencer le rendement de la réaction. Un autre essai a été effectué en doublant la quantité molaire du dérivé acétylène **8** afin d'avoir un rapport 1:2 azoture/alcyne. Lors de cet essai, le rendement de la réaction a presque doublé à 29 %. De plus, la présence d'une fonction amine sur la molécule la rend plus soluble dans l'eau. Ceci fait en sorte que les phases aqueuses de l'extraction du produit ont été réextraites avec un solvant organique (acétate d'éthyle) afin de récupérer le plus de produit possible et obtenir un meilleur rendement [88]. La purification du produit peut être aussi une cause probable du rendement faible. En effet, la portion amine rend la molécule très polaire ce qui fait que le produit reste « collé » sur la silice lors de la purification par chromatographie éclair étant donné que la silice est acide. Il faut donc utiliser un système d'éluant plus polaire : DCM, méthanol et triéthylamine (TEA) (100:5:1). La TEA permet au produit de moins « coller » à la silice en la rendant plus basique (les composés amines sont généralement basiques). Cependant,

l'utilisation de la TEA comporte un inconvénient : elle est difficile à retirer du produit pur après purification. Il faut donc effectuer un lavage à l'eau afin de la retirer, ce qui peut entraîner une certaine quantité de produit et réduire le rendement de la réaction.

Le troisième composé triazole (**13**) a été synthétisé avec un rendement de 60 %; il représente le rendement le plus élevé de la série. Le produit a été synthétisé en utilisant les conditions énumérées par Sharpless. On a donc utilisé comme solvant un mélange de *t*-BuOH/H₂O dans un rapport 1:1 au lieu du THF comme dans la synthèse des deux autres composés triazoles. Nous voulions tester la réaction avec du *t*-BuOH afin de voir si la réaction fonctionnerait quand même malgré le fait que le produit est partiellement soluble au début de la réaction. Il s'est avéré que le mélange réactionnel était totalement soluble en fin de réaction. Le produit a ensuite été extrait avec de l'acétate d'éthyle et lavé avec deux portions d'une solution de NaCl saturée comme pour le composé **12**. Les phases aqueuses ont également été réextraites avec de l'acétate d'éthyle afin de récupérer le plus de produit possible. La purification a également été faite de la même manière que pour le produit **12** en utilisant de la TEA dans le mélange d'éluants.

Les molécules **12** et **13** ont des spectres RMN ¹H similaires étant donné qu'ils possèdent des structures chimiques presque identiques. L'analyse des spectres montre que les protons situés sur le noyau pyridine et le proton situé sur la fonction triazole sortent tous dans la région comprise entre 7 et 9 ppm. La principale différence des spectres passe par la position des signaux correspondant aux CH₂ se situant entre la portion pyridine et l'amine secondaire, tout comme pour les spectres RMN des dérivés propargyliques **8** et **9**. En effet, le signal correspondant aux deux protons du CH₂ de la molécule **12** sort sous un singulet à 4,03 ppm tandis que celui correspondant aux 4 protons des 2 CH₂ de la molécule **13** sort sous forme de multiplet à 3,01 ppm.

Il ne reste maintenant qu'une dernière étape afin d'obtenir les hybrides de testostérone-platine(II) : la réaction de complexation des composés triazoles par le platine. Il s'agit d'une réaction au cours de laquelle les atomes d'azote des composés triazoles partagent leurs paires d'électrons libres avec les orbitales vides du platine. Il se forme ainsi une liaison covalente de coordination entre le platine et les atomes d'azote pour former un complexe de testostérone-platine(II). Cette complexation se déroule en présence de tétrachloroplatinate(II) de potassium (K_2PtCl_4) dans un mélange de DMF et d'eau (2:1). Le mélange réactionnel est laissé agiter pendant 5 jours à l'obscurité pour obtenir les complexes de platines **14**, **15** et **16** (Figure 4.4).

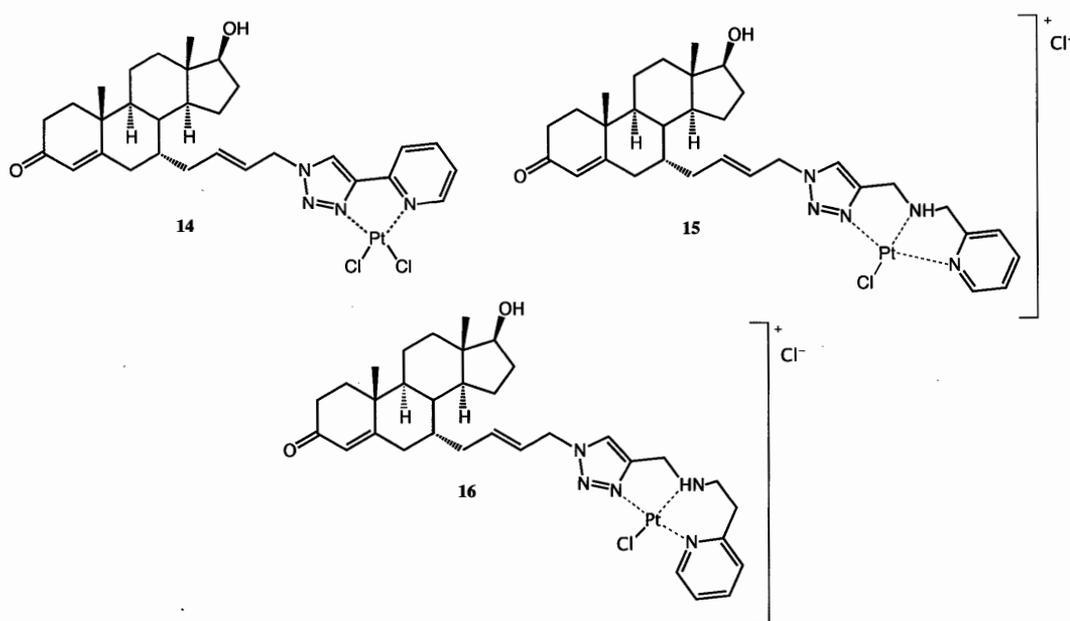


Figure 4.4 Hybrides de testostérone-platine(II) synthésés.

Il se produit un changement de pH (9 à 4) durant la réaction confirmant la formation des complexes de platine. Ce changement de pH est caractéristique de l'interaction du partage des électrons des atomes d'azotes avec le platine. Les produits obtenus sont des solides qui ont précipité lors de la réaction de complexation. Ils ont été lavés plusieurs fois à l'eau et filtrés afin d'enlever les impuretés et le léger excès de K_2PtCl_4 dans le

mélange réactionnel. Les complexes sont très peu solubles dans les solvants organiques comme l'acétone, le chloroforme ou encore le DCM. Afin d'effectuer les analyses RMN des complexes, il a fallu utiliser un mélange de chloroforme (CDCl_3) et de méthanol (CD_3OD) et du DMF- d_7 afin de dissoudre ces derniers. On obtient un rendement de 34 % pour le complexe **14**, un rendement de 77 % pour le complexe **15** et un rendement de 60 % pour le complexe **16**. Il est à noter que seul le complexe **14** a été purifié par chromatographie éclair sur colonne. Les deux autres complexes n'ont pas été purifiés sur colonne. Il a été décidé de ne pas purifier les deux derniers complexes, car lors d'un essai de purification du complexe **16**, le produit a été détruit/perdu sur la colonne. Étant en présence de molécules très peu solubles, il devient difficile de purifier les produits et de trouver un système d'éluant qui permet de les faire migrer. De plus, les produits **15** et **16** semblent assez purs par l'allure de leurs spectres RMN ^1H et par le fait qu'une seule tache soit visible en CCM pour chacun des complexes ce qui indique la formation d'un seul produit majoritaire.

L'analyse des spectres RMN ^1H permet de confirmer la formation des complexes de platine. Les spectres des complexes présentent la même allure que leurs composés triazoles correspondants. Le fait d'ajouter un métal sur la molécule n'ajoute aucun nouveau signal sur les spectres car il n'y a aucun proton sur la nouvelle partie ajoutée de Pt et Cl. La principale différence entre les spectres des composés triazoles et leurs complexes est le décalage et la déformation des pics des protons qui sont influencés par le platine (les protons proches du platine dans l'environnement chimique de la molécule). Ce décalage s'explique par la présence du platine qui est un métal paramagnétique. C'est d'ailleurs par cet effet, entre autres, qu'il est possible de déterminer la structure des complexes **14**, **15** et **16** et confirmant que la réaction de complexation s'est bien effectuée. La Figure 4.5 montre le décalage des pics causé par l'effet paramagnétique du platine sur les protons du complexe **14** par rapport au ligand, le composé triazole **11** à titre d'exemple. On voit bien l'influence des déplacements chimiques des 4 protons (a, b, c et d) présents sur la portion pyridine et le proton (C-24)

de la portion triazole dans la région comprise entre 7 et 9 ppm. On voit même une influence sur les protons de l'alcène (C-21 et 22) situé sur la chaîne latérale qui sortaient sous un seul signal sur la molécule **11** et sortent maintenant sous un signal différent plus vaste et étendu. On observe la même tendance de décalage des déplacements chimiques chez les spectres RMN ^1H des complexes **15** et **16**.

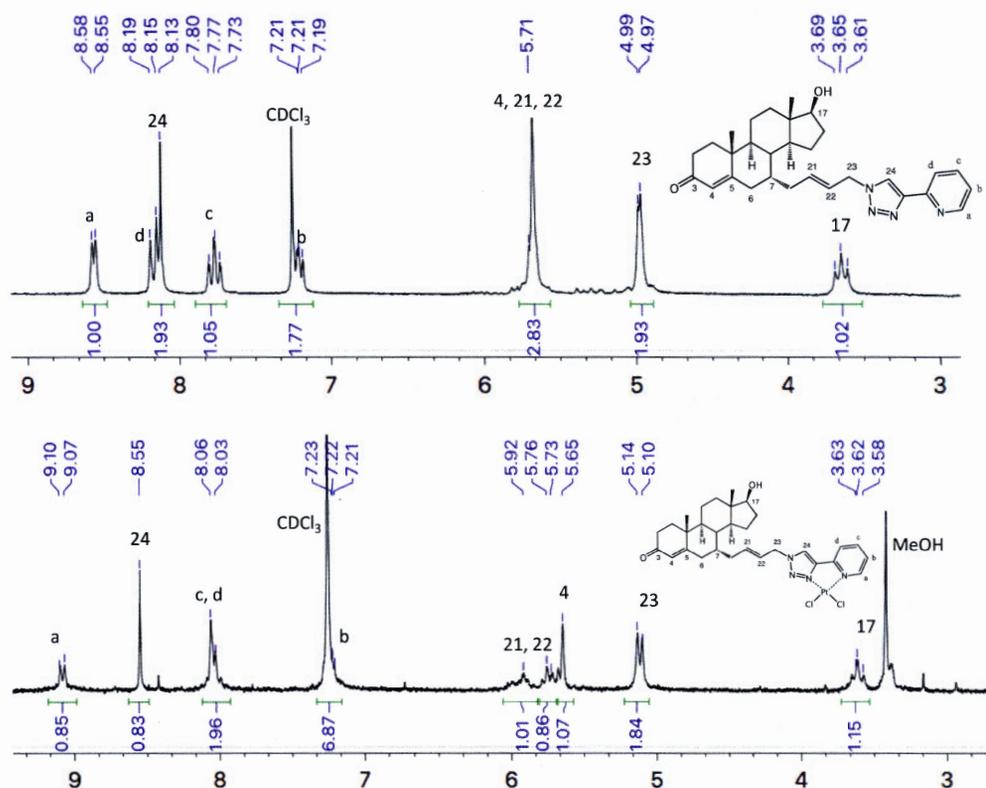


Figure 4.5 Comparaison des déplacements chimiques des spectres RMN ^1H du composé triazole **11** (haut) et du complexe de platine **14** (bas).

Il est à noter que le platine influence également l'acquisition et la qualité générale du spectre. Les spectres des composés de platine ne permettent pas d'obtenir des spectres de la même qualité de ceux obtenus pour leurs précurseurs. D'ailleurs, il faut également mentionner que les complexes **15** et **16** sont insolubles dans la plupart des solvants organiques ce qui a compliqué grandement l'acquisition des spectres RMN. Il a été

possible d'obtenir des spectres RMN ^1H des complexes **15** et **16**, mais impossible d'obtenir des spectres RMN ^{13}C . Il était difficile d'effectuer le *lock* sur l'appareil RMN et le champ magnétique finissait par dériver au long de l'expérience ce qui donnait un spectre inadéquat et impossible à analyser étant donné le grand temps de l'expérience. Nous avons réussi à solubiliser le produit dans le DMF- d_7 (pris directement d'une ampoule neuve de 1,0 g), mais le solvant deutéré était contaminé par la présence importante d'eau ce qui masquait la plupart des signaux de la molécule. Nous savons que les complexes sont solubles également dans le DMSO- d_6 mais il est connu que le DMSO réagit avec les complexes de platine par solvolysse. Il se produit un échange de ligand entre l'atome de chlore lié au platine et le DMSO ce qui au final altère la structure du complexe de platine et peut inhiber l'activité cytotoxique de ces derniers [89]. De plus, le produit est difficilement récupérable après avoir été dissout dans le DMSO étant donné son point d'ébullition élevé. Nous avons donc exclu l'idée de solubiliser les complexes dans ce solvant pour ne pas les altérer et les détruire.

Les composés triazoles **12** et **13** présentent 3 atomes d'azotes riches en électrons où le platine pourrait potentiellement se lier, ce qui implique que l'on pourrait théoriquement former trois complexes différents pour une molécule donnée (Figure 4.6) : un complexe coordonné aux trois azotes (molécule **15**), un complexe lié à l'atome d'azote de la pyridine et à l'atome d'azote de la fonction amine (molécule **15.1**) et un complexe lié à l'atome d'azote en position 3 du triazole et à l'atome d'azote de la fonction amine (molécule **15.2**). La spectrométrie de masse a permis de confirmer que les complexes de platine trivalent **15** et **16** ont été formés.

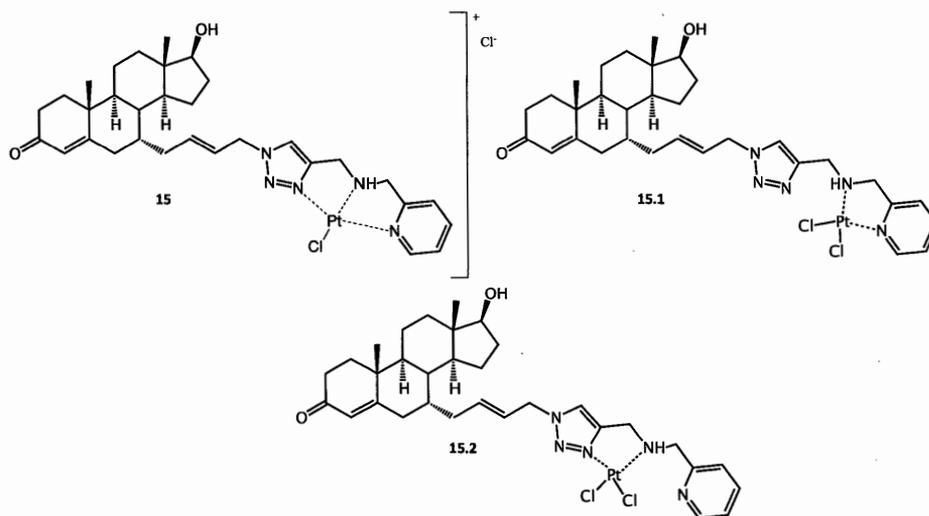


Figure 4.6 Différents complexes de platine pouvant être formés théoriquement suite à la réaction de complexation du composé triazole **12**.

En effet, le patron isotopique des complexes permet de confirmer la présence d'un seul atome de chlore dans la structure moléculaire des deux complexes et également par les masses moléculaires calculées qui correspondent bien aux structures obtenues. Ceci indique que le platine est lié de façon trivalente aux azotes. De plus, les spectres RMN ^1H présentent un décalage des pics appartenant aux protons de la portion pyridine, amine et triazole. Par ailleurs, la littérature recense différents complexes de platine(II) tridentates comme ceux obtenus dans ce projet [90-93].

4.2 Progression vers la synthèse d'un nouveau dimère de testostérone

Le deuxième objectif du projet est de synthétiser un nouveau dimère de testostérone qui agirait comme antiandrogène pour le traitement du cancer de la prostate. La synthèse du dimère passe par le même chemin synthétique élaboré pour la synthèse des hybrides de testostérone-platine(II). Nous n'allons pas répéter toutes les étapes de la fonctionnalisation de la testostérone (voir Section 3.1 du présent chapitre). Les quatre premières étapes sont les mêmes ce qui implique que nous partons de la molécule **5**

pour expliquer la synthèse du dimère **18**. Le Schéma 4.7 montre les deux synthèses envisagées pour la conception du dimère.

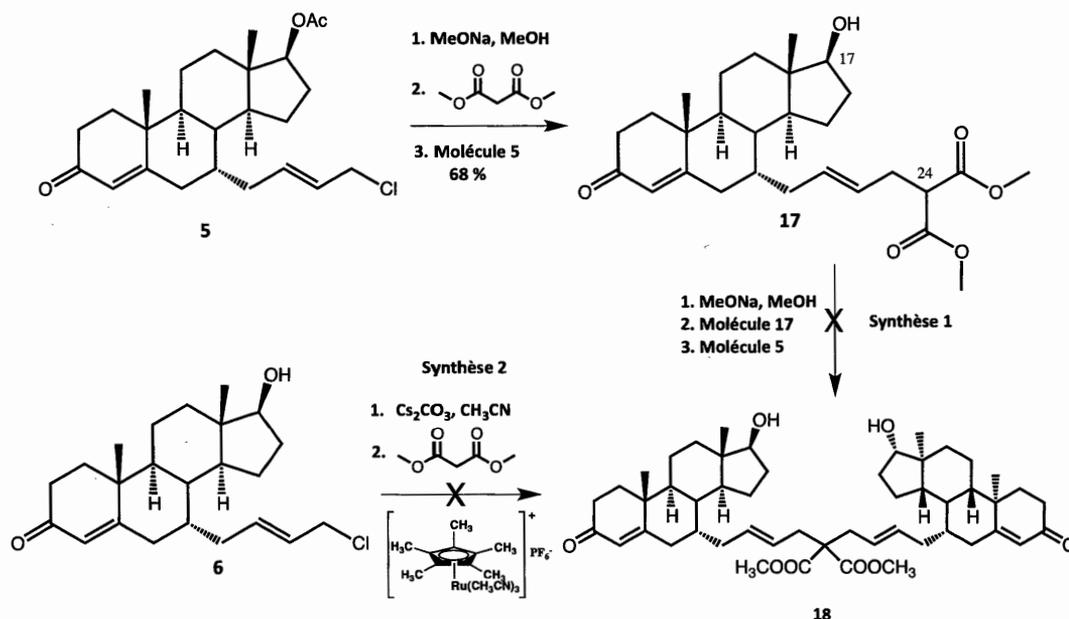


Schéma 4.7 Synthèses proposées pour la conception du nouveau dimère de testostérone.

4.2.1 Synthèse 1 : utilisation du méthoxyde de sodium

La première synthèse a été effectuée en utilisant le malonate de diméthyle comme réactif afin de lier les deux unités de testostérone par double alkylation. Le malonate de diméthyle, un composé 1,3-dicarbonylé, est facilement énoisible en présence d'une base, et ainsi, l'anion généré peut facilement être alkylé. Le méthoxyde de sodium a été formé *in situ* en ajoutant le sodium métallique dans du méthanol anhydride. Le malonate de diméthyle, en excès, a ensuite été placé dans la solution afin de former l'énolate correspondant. La molécule **5** a ensuite été ajoutée au mélange réactionnel afin de former le produit monoalkylé **17** désiré avec un rendement de 68 % (Schéma 4.7). De plus, lors de cette réaction, le groupement acétate situé sur le

carbone 17 a été détruit, comme prévu, par le méthoxyde de sodium pour libérer la fonction hydroxyle de départ. On observe un rendement plus faible en raison de produits secondaires qui se sont formés lors de la réaction. L'hypothèse de départ semble donc confirmée pour l'instant par la réussite de la monoalkylation du malonate de diméthyle tel que mentionné dans l'objectif. L'analyse RMN ^1H confirme la structure du produit désiré. On observe un singulet à 3,72 ppm qui correspond aux 6 protons des deux groupements méthyles de la fonction malonate. On note la disparition du signal correspondant aux 3 protons situés sur le groupement méthyl de l'acétate qui était situé à 2,03 ppm étant donné le retrait de cette fonctionnalité. De plus, le spectre infrarouge montre un signal O-H à 3446 cm^{-1} ce qui correspond à la fonction alcool du carbone 17. On note également un triplet situé à 3,41 ppm correspondant au proton situé sur le carbone 24 reliant les deux fonctions esters sur la chaîne allyle.

Après avoir effectué la monoalkylation du malonate de diméthyle (molécule **17**) avec le chlorure allylique (molécule **5**), il est maintenant possible d'énoliser de nouveau cette molécule en présence de méthoxyde de sodium afin d'ajouter une autre unité de testostérone afin de former le dimère désiré. La molécule **17** est donc placée en présence de méthoxyde de sodium dans du méthanol et la molécule **5** est ensuite ajoutée après 30 minutes d'agitation. La réaction est agitée à température pièce pendant 72 heures. Le produit brut de réaction a été purifié sur chromatographie éclair pour obtenir 3 fractions différentes (Figure 4.7). Après caractérisation des trois fractions, il a été déterminé que le dimère **18** n'a pas été obtenu.

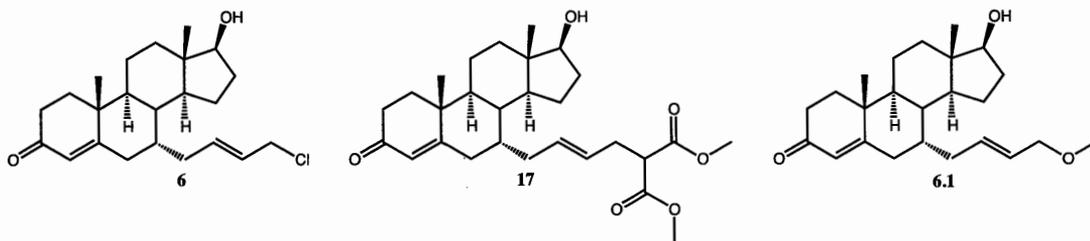


Figure 4.7 Produits récupérés suite à la réaction de l'essai de l'obtention du dimère **18**.

Le malonate de diméthyle monoalkylé **17** a été récupéré à 40 % ce qui indique qu'il n'a pas réagi avec le chlorure allylique **5** comme prévu pour former le dimère **18**. L'alcool **6**, le produit déprotégé en C-17 issu de l'ester **5** a été isolé à 44 %. Aussi, le composé **6.1** issu de la substitution nucléophile du chlorure **6** par le méthoxyde de sodium a été isolé à 22 %. Il est à noter que le malonate de diméthyle monoalkylé **17** et le chlorure allylique **5** ont été mis dans un rapport équimolaire. Lors la réaction précédente, le malonate de diméthyle avait été mis en excès afin que le chlorure allylique réagisse complètement et forme le produit monoalkylé **17**. Il est donc possible d'émettre comme hypothèse qu'en ne mettant aucun excès du malonate monoalkylé, le chlorure allylique n'ait pas pu réagir étant donné la quantité limitée de la molécule **17** ce qui indique que la réaction n'a pas été efficace. Il faut mentionner l'encombrement stérique comme facteur potentiel empêchant la réaction de se dérouler correctement. Il se peut également que la molécule **17** n'a pas été énolisée correctement, ce qui a pu affecter la réaction avec le chlorure de testostérone (molécule **5**). Le malonate de diméthyle peut théoriquement être alkylé deux fois par un substituant électrophile étant donné que les deux protons en α peuvent être arrachés par une base et former l'énolate. La première alkylation s'est effectuée comme il avait été prédit dans l'hypothèse de départ.

D'autres essais ont été effectués en changeant les conditions réactionnelles afin de tenter d'obtenir le dimère à la suite de l'échec du premier essai. Un essai a été réalisé

en utilisant une base plus forte, l'hydrure de sodium (KH), dans un milieu anhydre (THF sec) afin d'être sûr que le composé s'énolise. Un autre essai a été fait en mettant un excès de la molécule monoalkylé **17** afin de favoriser la réaction avec le chlorure allylique **5** et garder les mêmes conditions que la réaction initiale d'alkylation permettant d'obtenir le produit **17**. De plus, nous avons également essayé de favoriser la réaction en travaillant avec une concentration plus élevée de réactifs dans une quantité limitée de solvant. Ainsi, le chlorure de testostérone aurait davantage de probabilité de réagir avec le malonate monoalkylé afin d'augmenter les chances de former le dimère convoité. Finalement, un dernier essai a été réalisé en conditions de catalyse de transfert de phase [94]. Tous ces essais ont été infructueux et n'ont malheureusement pas permis d'obtenir le dimère de testostérone **18**.

4.2.2 Synthèse 2 : utilisation d'un catalyseur de ruthénium

Suite à l'échec de l'obtention du dimère par l'utilisation de la première synthèse proposée, une deuxième synthèse a été envisagée et testée. Cette synthèse repose encore une fois sur l'utilisation du malonate de diméthyle comme composante de base pour la conception du dimère. Cependant, cette synthèse passe par l'utilisation d'un catalyseur de ruthénium afin de permettre la double alkylation du malonate de diméthyle par le composé **6**. Les conditions réactionnelles utilisées sont celles qui ont été publiées par Zhang *et al.* [95]. L'article présente la méthode d'allylation de composés 1,3-dicarbonylés avec des substrats allyliques aliphatiques sous des conditions réactionnelles douces en présence de différents catalyseurs de ruthénium. Le catalyseur qui nous intéresse est le catalyseur $[\text{Ru}(\text{Cp}^*)(\text{MeCN})_3] [\text{PF}_6]$ (Cp^* = pentaméthylcyclopentadiényle) car il permet de favoriser la double alkylation du composé 1,3-dicarbonylé ce qui mène au produit linéaire dialkylé selon les travaux de Zhang *et al.* (Schéma 4.8).

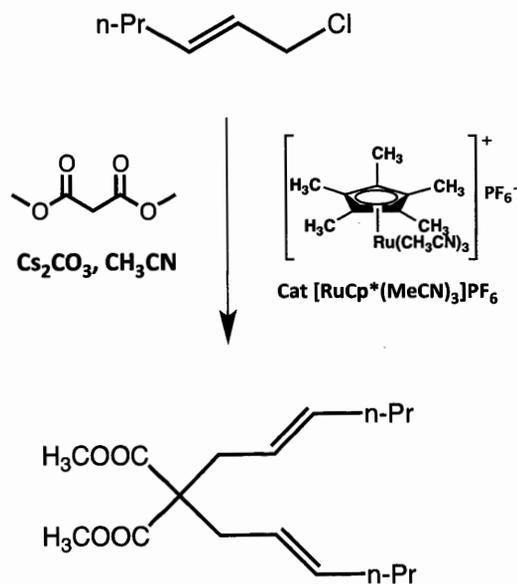


Schéma 4.8 Synthèse d'un dérivé dialkylé linéaire symétrique (Tiré de [95]).

La réaction a été effectuée en combinant le malonate de diméthyle avec le chlorure de testosterone **6** en présence de la base Cs_2CO_3 et le catalyseur de ruthénium dans l'acétonitrile. La réaction a été laissée réagir pendant plus de 20 heures. Le produit brut a été purifié pour obtenir deux produits majoritaires : le produit de départ (chlorure de testosterone **6**) et le composé monoalkylé **17** avec un rendement de 41 %. Nous pensions pouvoir obtenir le produit dialkylé directement suite à cette réaction étant donné les résultats obtenus Zhang *et al.* Nous avons suivi les mêmes conditions réactionnelles en mettant le malonate de diméthyle comme réactif limitant et le chlorure de testosterone en excès (2,5 équivalents) afin de favoriser la double alkylation du composé 1,3-dicarbonylé. Suite à l'échec de l'obtention du dimère en une seule réaction, nous avons décidé de faire comme pour la méthode synthétique précédente avec le méthoxyde de sodium, en traitant la molécule **17** monoalkylée (1 équivalent) avec un léger excès de chlorure de testosterone **6** (1.5 équivalent) en présence du catalyseur de ruthénium afin d'effectuer une deuxième alkylation sur le composé 1,3-dicarbonylé et pouvoir enfin obtenir le dimère **18** convoité. La réaction a été agitée à température pièce pendant 72 h afin de bien laisser réagir les réactifs ensemble.

Suite à l'analyse des fractions récoltées lors de la purification du produit brut, aucun dimère n'a été obtenu. Les produits récupérés sont représentés dans la Figure 4.8.

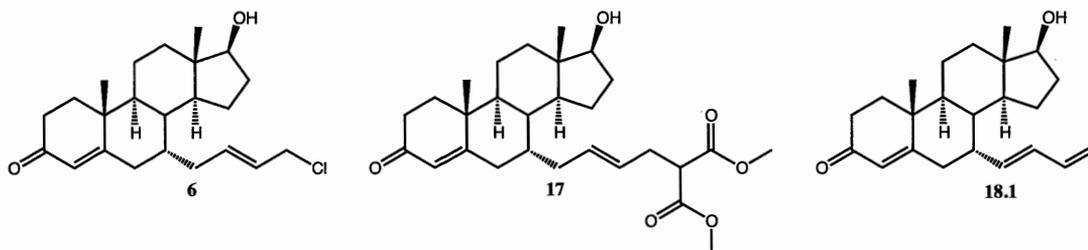


Figure 4.8 Produits récupérés suite à la deuxième réaction d'alkylation avec le catalyseur de ruthénium.

Comme on peut le constater par les produits récupérés, le produit monoalkylé **17** (récupéré à 73 %) n'a pas réagi du tout avec le composé chlorure **6** (récupéré à 43 %) pour être alkylé une deuxième fois afin de former le dimère. On observe seulement la formation de 7 mg (18 % de rendement) d'un produit secondaire de réaction : la molécule **18.1**. La formation de cette molécule peut s'expliquer par la présence de la base dans le milieu ce qui a donné lieu à une réaction d'élimination pour former l'alcène terminal par l'éjection de l'atome de chlore. On observe la présence d'un diène conjugué par le RMN ^1H . Ceci pourrait permettre d'effectuer potentiellement une réaction de Diels-Alder avec un diénophile fort. À la suite de ce second échec, on peut affirmer que l'encombrement stérique de la molécule a un impact direct sur la réaction.

La formation du dimère par double alkylation du malonate de diméthyle n'a pas été obtenue suite à l'essai de deux séquences réactionnelles différentes. Il s'agit de la première tentative de synthèse d'un dimère de testostérone par la double alkylation du malonate de diméthyle. Il ne reste plus qu'à trouver les bonnes conditions réactionnelles afin de favoriser la formation du dimère convoité. Il est à noter que cette stratégie, une fois développée, pourrait s'appliquer à d'autres composés 1,3-dicarbonylés permettant l'obtention d'une série de dimères différents. Une fois obtenu,

il serait pertinent d'évaluer l'activité biologique du nouveau dimère comme agent thérapeutique sur les cellules cancéreuses de la prostate.

4.3 Analyse de l'activité biologique

Les molécules synthétisées ont été testées sur trois lignées cellulaires du cancer de la prostate : DU145, PC3 et LNCaP. Elles sont considérées comme les lignées cellulaires standards utilisées en recherche pour ce type de cancer [96, 97]. Les cellules cancéreuses des lignées DU145 et PC3 sont des cellules hormono-indépendantes (RA⁻) tandis que les cellules de la lignée LNCaP sont des cellules hormono-dépendante (RA⁺). Les cellules de la lignée DU145 proviennent d'une métastase du système nerveux central d'un adénocarcinome primaire de la prostate et les cellules de PC3 proviennent d'une métastase des os d'un adénocarcinome prostatique de stade IV [98, 99]. Les cellules de la lignée LNCaP proviennent d'une lésion métastatique d'un ganglion lymphatique d'un adénocarcinome prostatique [97]. Le cisplatine a également été testé pour servir de composé de référence afin de comparer les résultats des nouvelles molécules synthétisées. De plus, afin de vérifier davantage le potentiel biologique, nos composés ont aussi été testés sur des lignées cellulaires du cancer de la peau et de l'estomac : HaCaT et HT-29.

Les tests *in vitro* ont été effectués sur des cellules en culture. L'activité antiproliférative des molécules a été mesurée par une évaluation à la sulforhodamine B (SRB) selon la méthode développée initialement dans les années 90 par Skehan *et al.* [100]. Cette méthode demeure encore aujourd'hui l'une des méthodes les plus utilisées pour le criblage cytotoxique. La SRB est un colorant fluorescent anionique de couleur rose pâle possédant deux groupements sulfoniques qui se lient aux résidus d'acide aminé sous conditions acides douces et qui se dissocient sous conditions basiques [101]. Il est possible de mesurer la quantité de colorant extrait des cellules colorées et ainsi de connaître la concentration massique des cellules étant donné que la liaison du SRB se

fait de manière stœchiométrique et est directement proportionnelle à la masse cellulaire. Ainsi, la quantité de colorant lié aux cellules peut être utilisée comme indicateur pour mesurer la prolifération cellulaire par extrapolation. Le développement de la coloration est rapide et on mesure ensuite l'absorbance du colorant à 510 nm pour obtenir la concentration des cellules résiduelles vivantes. Les tests de prolifération cellulaire se déroulent en quatre étapes principales : préparation du traitement, incubation des cellules, fixation des cellules et coloration au SRB, et mesure d'absorbance. On commence tout d'abord par la préparation des solutions des composés synthétisés en les diluant dans du DMF. Les tests de prolifération cellulaire ont été faits sur des cellules préalablement incubées à 37 °C pendant une période de 72 h sous une atmosphère composée à 5 % de CO₂ avant les traitements des différentes dilutions des solutions des composés à 25 µM. La concentration des solutions a été fixée à 25 µM étant donné qu'à une concentration plus élevée, les composés **15** et **16** n'étaient pas totalement solubles ce qui produisait une suspension. Une fois le traitement fait, on mesure l'absorbance pour obtenir la concentration inhibitrice de chaque composé. Les expériences ont été effectuées en triplicata pour chaque composé à l'exception des essais avec la lignée cellulaire LNCaP qui a été fait une seule fois en raison d'un problème de laboratoire au niveau de la croissance de cette lignée cellulaire.

La valeur obtenue pour mesurer l'activité antiproliférative des composés se nomme l'IC₅₀, c'est-à-dire la concentration inhibitrice à 50 %. L'IC₅₀ représente la concentration nécessaire de médicament pour inhiber de 50 % la croissance cellulaire des cellules cancéreuses *in vitro*. Une valeur faible d'IC₅₀ représente une activité antiproliférative importante étant donné qu'il faut une plus petite concentration de composé pour inhiber de 50 % la croissance cellulaire. À l'inverse, une valeur élevée d'IC₅₀ montre une activité antiproliférative moindre car il est nécessaire d'avoir une plus grande quantité de médicaments pour inhiber la croissance cellulaire de 50 %.

Les résultats d'activité antiproliférative des différents composés sont présentés dans le Tableau 4.1.

Tableau 4.1

Mesure de l'activité antiproliférative (IC_{50}) des composés triazoles, des hybrides de testostérone-platine(II) et du cisplatine (CDDP) dans le DMF

Composé	IC_{50} (μM)				
	LNCaP (AR ⁺)	PC3 (AR ⁻)	DU145 (AR ⁺)	HT-29	HaCat
11	6,3	11,0	12,3	19,9	18,0
12	20,0	13,3	13,8	14,7	18,3
13	>25	10,5	14,4	8,5	16,4
14	2,2	13,3	8,8	>25	>25
15	>25	>25	>25	>25	>25
16	>25	>25	>25	>25	>25
CDDP	2,1	0,5	1,0	1,3	5,1

Tout d'abord, il est important de noter que les composés triazoles et les hybrides ont été testés afin de pouvoir comparer l'effet de l'ajout du platine et voir le résultat que ce dernier produit sur l'activité antiproliférative sur les cellules cancéreuses. Selon l'hypothèse de départ suggérée et à la suite des résultats obtenus de la première génération d'hybrides, les complexes de platine devraient posséder une activité antiproliférative supérieure que celle de leur précurseur triazole correspondant. En effet, comme mentionné au chapitre II, le platine est un métal qui possède des propriétés anticancéreuses et cytotoxiques. Les résultats obtenus vont en quelque sorte à l'encontre de l'hypothèse de départ. En effet, en observant le tableau, on constate que seulement l'hybride **14** est actif biologiquement sur les lignées cellulaires du cancer de la prostate (LNCaP, PC3 et DU145) tandis que les deux autres hybrides (**15** et **16**) ne le sont pas. Ils présentent des résultats supérieurs à 25 μM . Il n'est donc pas possible

de savoir si ces deux complexes présentent une activité antiproliférative à une concentration supérieure étant donné que la limite de solubilité de ceux-ci est atteinte à 25 μM , ceci pose un inconvénient et limite l'information qui peut être tirée de l'analyse biologique de ces molécules. Un facteur important pouvant contribuer à la solubilité de ces deux molécules est leur structure différente de celle de l'hybride **14**. En effet, dans la structure de la molécule **14**, le platine est lié de façon bivalente aux atomes d'azote tandis que dans les molécules **15** et **16**, il est lié de façon trivalente. En étant lié de façon trivalente, le complexe devient chargé positivement tandis que lorsqu'il est lié de façon bivalente, il possède une charge neutre. La littérature rapporte la synthèse de complexes de platine trivalent et note également la faible solubilité des molécules synthétisées [91]. Malgré cela, le complexe **14** possède une activité biologique non-négligeable. Il est actif tant sur les lignées hormono-indépendantes (DU145 et PC3) que celle dépendante (LNCaP). Il a une activité supérieure sur la lignée dépendante avec un IC_{50} de 2,2 μM , ce qui est pratiquement équivalent à l' IC_{50} du cisplatine qui est de 2,1 μM . Cependant, il faut toutefois mentionner que seulement un essai a été effectué avec cette lignée. Il faut donc prendre ces résultats préliminaires avec précaution. Toutefois, cela semble indiquer que le composé est très actif sur cette lignée cellulaire. Le même composé ne montre pas une activité antiproliférative aussi élevée que le cisplatine sur les lignées indépendantes avec 13,3 μM pour PC3 et 8,8 μM pour DU145. Il n'est pas actif ($\text{IC}_{50} > 25 \mu\text{M}$) sur les lignées cellulaires HT-29 et HaCat. On peut donc tirer comme hypothèse que le composé est plus sélectif envers les cellules cancéreuses de la prostate que celle de l'estomac et de la peau. Ces résultats préliminaires montrent que l'hybride testostérone-platine(II) (**14**) pourrait être sélectif contre les cancers hormono-dépendants de la prostate.

Pour ce qui est des composés triazoles (**11**, **12** et **13**), ils possèdent tous une activité antiproliférative sur les différentes lignées sauf pour le composé **13** sur la lignée LNCaP (supérieur à 25 μM). Il est intéressant de constater que ces composés possèdent

une activité biologique même si elle est inférieure à celle du cisplatine. On constate que les résultats pour les trois composés sont similaires pour les cinq lignées cellulaires. Ceci semble indiquer qu'il n'y ait pas de sélectivité pour un type de cancer en particulier. Il est important de souligner que le complexe **14** montre une activité supérieure à son précurseur **11** dans seulement deux des cinq lignées cancéreuses (LNCaP et DU145) et une activité similaire pour la lignée PC3 (13,3 vs 11,0 μM). L'hypothèse selon laquelle les hybrides seraient plus actifs que leur précurseur ne s'avère pas tout à fait confirmée avec les résultats obtenus lors des essais biologiques. Toutefois, les composés triazoles possèdent tout de même une activité antiproliférative non-négligeable. D'ailleurs, il est rapporté dans la littérature que différents composés ayant une fonction 1,2,3-triazole possèdent une activité biologique intrinsèque et sont utilisés comme agents anticancéreux [102]. On observe par ces résultats la même tendance.

Sommes toutes, l'objectif était de synthétiser des hybrides testostérone-platine possédant une activité antiproliférative sur les cellules cancéreuses de la prostate. Avec les résultats obtenus, on constate que l'objectif est partiellement atteint. Sur les trois hybrides synthétisés, seulement un est actif au niveau des cellules cancéreuses de la prostate avec des résultats essentiellement équivalents au cisplatine. Toutefois, les composés précurseurs triazoles montrent également un potentiel avec des résultats d'activité antiproliférative non-négligeable. Il pourrait être pertinent de tester le précurseur **11** et l'hybride **14** dans un modèle animal (*in vivo*) afin d'évaluer leur activité anticancéreuse.

CONCLUSION

Dans le cadre de ce projet de recherche, une deuxième génération d'hybrides testostérone-platine(II) a été synthétisée pour le ciblage thérapeutique du cancer de la prostate suite aux résultats prometteurs obtenus avec les hybrides de la première génération [63]. La testostérone est un androgène important présent dans le sang et joue un rôle primordial dans le développement et le fonctionnement normal de la prostate. Cependant, la testostérone est également responsable du développement du cancer de la prostate. L'androgène doit se lier au RA pour produire son activité biologique ce qui en fait une cible intéressante pour le traitement de ce cancer. Les thérapies à base de platine classiques (cisplatine) sont peu sélectives envers les cellules cancéreuses et causent de nombreux effets secondaires au patient qui les reçoit. Le but du projet a donc été de synthétiser de nouveaux complexes de platine liés à la testostérone pour améliorer la sélectivité (via les RA) et l'efficacité tout en étant moins toxique.

Le but principal du projet est de construire des hybrides possédant une chaîne liant la testostérone et le platine plus résistante que celle utilisée pour construire la première génération d'hybrides. Ces derniers étaient liés par une liaison ester. Nous avons donc choisi d'utiliser la fonction triazole pour y arriver. Les hybrides ont été synthétisés par l'emploi d'une séquence réactionnelle développée dans le laboratoire permettant de fonctionnaliser la testostérone afin d'y attacher une chaîne latérale en 7α . Nous avons donc introduit un groupement azoture au bout de cette chaîne afin d'utiliser la réaction de cycloaddition avec un alcyne approprié pour synthétiser les précurseurs des hybrides par la formation d'une fonction triazole. Les complexes de platine(II) ont ensuite été

obtenus par la réaction de complexation avec le platine pour obtenir les trois composés **14**, **15** et **16**. Les trois hybrides ont été synthétisés en huit étapes réactionnelles avec des rendements globaux de 7 % pour l'hybride **14**, 8 % pour l'hybride **15** et 13 % pour l'hybride **16**. L'activité antiproliférative des hybrides a été testée sur des lignées cellulaires cancéreuses de la prostate. Les résultats montrent que les composés triazoles (précurseurs des hybrides) sont actifs sur les différentes lignées cellulaires testées. Ils pourraient possiblement agir en tant qu'antiandrogènes. Nous constatons aussi qu'un seul des hybrides (**14**) est actif sur les lignées cellulaires de la prostate. Les deux autres hybrides ne montrent pas d'activité biologique. Ces derniers sont beaucoup moins solubles que l'hybride **14**. Nous considérons que la synthèse de ce type d'hybride « trivalent » est à proscrire. Ainsi, il serait important d'essayer de synthétiser la version bivalente des hybrides **15** et **16** afin d'évaluer leur activité antiproliférative. Ceci pourrait être fait en essayant de complexer avec le platine les composés triazoles **8** et **9** dans un premier temps et ensuite d'effectuer la réaction de cycloaddition azoture-alcyne avec le composé azoture **7** afin de pouvoir obtenir des complexes de platine bivalents et neutres comme pour le composé **14**. Par contre, si cette méthode fonctionne, il est possible que les complexes trivalents soient quand même obtenus étant donné la proximité des azotes sur ces molécules.

L'objectif secondaire du projet était de synthétiser un dimère de testostérone qui pourrait agir comme un antiandrogène en occupant les RA pour bloquer les androgènes (testostérone et DHT) responsables du cancer de la prostate. Un dimère pourrait théoriquement occuper les RA et empêcher les androgènes naturels d'agir normalement. La synthèse envisagée passe par la même séquence réactionnelle initiale que pour la synthèse des hybrides qui permet la fonctionnalisation de la testostérone. Le but était de procéder à la double alkylation du malonate de diméthyle avec le chlorure allylique **5** ou **6** afin d'ajouter deux unités de testostérone. Le dimère convoité n'a pas été obtenu par les différents essais réalisés même en changeant les conditions réactionnelles. Nous avons essayé deux réactions différentes sans succès en employant

principalement le méthoxyde de sodium et un catalyseur de ruthénium en présence du malonate de diméthyle et d'un dérivé halogéné de la testostérone. Dans tous les cas, seulement le produit de monoalkylation a été obtenu. Il semble que l'encombrement stérique de l'unité de testostérone joue un rôle dans le déroulement de la réaction et ne permette pas la double alkylation du composé 1,3-dicarbonylé. Il faudra essayer d'autres conditions réactionnelles afin de pouvoir obtenir le dimère dans de futurs travaux de recherche. Une option intéressante à essayer serait de remplacer l'atome de chlore de la molécule **5/6** par un atome d'iode. L'iode est un meilleur nucléofuge que le chlore et pourrait potentiellement permettre d'effectuer plus facilement la réaction d'alkylation et réussir la deuxième alkylation nécessaire pour l'obtention du dimère de testostérone.

En conclusion, l'objectif de ce projet de maîtrise portait sur le design de nouveaux agents anticancéreux pour le ciblage thérapeutique du cancer de la prostate. Une nouvelle génération d'hybride testostérone-platine(II) a été synthétisée et évaluée sur les lignées cancéreuses de la prostate. Un seul des hybrides est actif et montre une activité antiproliférative sur les cellules cancéreuses. Il en va de même pour les composés triazoles (précurseurs des hybrides) qui possèdent une activité non-négligeable intéressante. Il serait pertinent d'étudier l'interaction bimoléculaire des complexes avec l'ADN afin de voir l'effet produit et d'évaluer l'affinité de ceux-ci sur les RA. Finalement, les résultats d'activité antiproliférative obtenus ne sont pas ceux que nous voulions obtenir, mais la recherche est ce qu'elle est ... imprévisible et remplie de surprises. Ceci permet tout de même d'approfondir les connaissances dans le domaine et de faire avancer la recherche. En continuant à faire de la recherche, peut-être trouverons-nous un jour la molécule pour traiter de manière irréversible le cancer.

ANNEXE A

PARTIE EXPÉRIMENTALE

A.1 Remarques générales

Les produits commercialement disponibles ont été utilisés sans purification. Les solvants ont été utilisés directement ou préalablement distillés par des méthodes standards [103]. Les réactions anhydres ont été réalisées sous atmosphère inerte d'azote. Les parachèvements des réactions ont été faits par extraction aqueuse, puis la phase organique était séchée sur du sulfate de magnésium anhydre, filtrée et évaporée sur un évaporateur rotatif et sur pompe à pression réduite.

Le suivi des réactions a été effectué par chromatographie sur couche mince (CCM). Les chromatographies ont été faites sur des plaques en verre recouvertes d'une couche de 0,25 mm d'épaisseur de gel de silice (Sigma T 6145, 60 Å). À la suite de l'élution, les plaques ont été révélées sous une lampe à rayonnement ultraviolet (UV). La chromatographie éclair sur colonne a été utilisée pour effectuer la purification des molécules synthétisées selon la méthode de Still *et al.* [104]. La phase stationnaire est constituée d'un gel de silice de maille 40-63 microns et tous les solvants utilisés pour l'élution ont été préalablement distillés avant leur utilisation.

Les molécules synthétisées ont été analysées par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN). Les spectres de proton (RMN ^1H) et de carbone (RMN ^{13}C) ont été obtenus à l'aide d'un appareil RMN Varian 200 MHz. Les déplacements chimiques (δ) des différents signaux sont exprimés en ppm par rapport à une référence interne. La multiplicité des spectres est exprimée par les abréviations suivantes : s (singulet), sl (singulet large), d (doublet), dd (doublet de doublet), dt (doublet de triplet), t (triplet), q (quadruplet) et m (multiplet).

Les spectres infrarouges (IR) des molécules ont été obtenus avec un spectrophotomètre FTIR Thermo is10 en déposant le produit directement sur la pointe de diamant de ce dernier. Les bandes d'absorption sont exprimées en cm^{-1} .

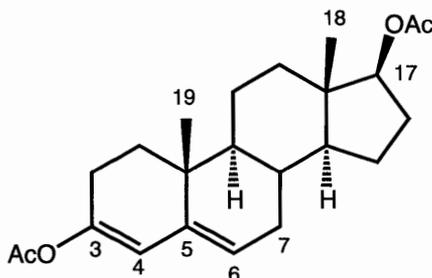
Les points de fusion ont été mesurés avec un appareil de type Electrothermal IA9100 et n'ont pas été corrigés. Les valeurs sont exprimées en degré Celsius.

Les analyses de masse de haute résolution des molécules ont été réalisées avec un spectromètre de masse Time-of-Flight Agilent 6210 (Agilent Technologies, CA, USA) utilisant une source electrospray en mode positif. Entre 5 à 20 microlitres ont été infusés dans la source d'ions. Avant les analyses, le spectromètre de masse a été étalonné avec un standard du manufacturier couvrant la plage de masse d'intérêt.

A.2 Protocoles expérimentaux

Il est à noter que les réactions permettant d'obtenir les molécules **2** à **6** ont été développées dans le laboratoire et les résultats ont déjà été publiés dans la littérature [62, 64]. Ainsi, seulement le spectre RMN ^1H , l'analyse IR et le point de fusion ont été pris afin de confirmer la structure des produits.

Synthèse du diacétate de 3,5-androstadiène-3,17 β -diol (2)



La testostérone (1,0 g, 3,47 mmol) est dissoute dans l'anhydride acétique (1,31 mL, 13,91 mmol). La pyridine (0,28 mL, 3,48 mmol) et le chlorure d'acétyle (3,62 mL, 50,73 mmol) sont ajoutés au mélange réactionnel dans cet ordre. La réaction est agitée et portée à reflux pendant 4 heures puis refroidie 30 minutes à température pièce. Les solvants sont évaporés à sec sous l'évaporateur rotatif. Le produit est solubilisé dans une petite quantité de dichlorométhane et est filtré sur un gel de silice. Le solvant est évaporé. Le produit final **2** est obtenu avec un rendement de 95 % (1,23 g).

95 % (1,23 g), solide blanc

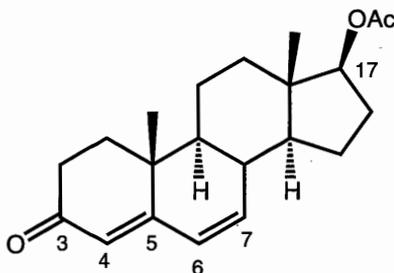
Point de fusion: 142-147°C

IR (cm⁻¹): 1736 (C=O, acétate), 1666 (C=C), 1248 (C-O).

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 5,69 (1H, sl, 4-CH), 5,39 (1H, m, 6-CH), 4,61 (1H, t, J=8,4 Hz, 17-CH), 2,13 (3H, s, -OAc), 2,04 (3H, s, -OAc), 1,01 (3H, s, 19-CH₃), 0,83 (3H, s, 18-CH₃).

Ces données correspondent à celles de la littérature [64].

Synthèse de l'acétate de 4,6-androstadiène-17 β -ol-3-one (3)



Le produit diacétate **2** (1,01 g, 2,72 mmol) est dissous dans le DMF (7,21 mL) et quelques gouttes d'eau et le mélange réactionnel est amené à 0°C. Le NBS, préalablement dissous dans le DMF, est ajouté sur une période d'une heure suivi d'une agitation de 40 minutes. Le carbonate de lithium (LiCO₃) et le bromure de lithium (LiBr) sont ajoutés au mélange réactionnel à température pièce. Le mélange est porté à reflux à 95°C sur une période de 4 heures et refroidie ensuite. Le mélange est versé sur un mélange glace/eau de 150 mL contenant 10 mL d'acide acétique. Le produit en suspension est filtré et lavé avec de l'eau, hexane, dissous dans de l'éther et séché. Le produit est filtré et purifié sur un gel de silice avec l'éluant hexane/acétone (9/1) pour donner un rendement de 81 % du produit **3** (728 mg).

81 % (728 mg), solide

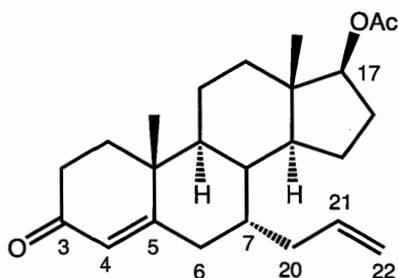
Point de fusion: 144-147°C.

IR (cm⁻¹): 1735 (C=O, acétate), 1664 (C=O), 1613 (C=C, ènone), 1252 (C-O).

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 6,10 (2H, s, 6-CH et 7-CH), 5,67 (1H, s, 4-CH), 4,63 (1H, t, J=8,2 Hz, 17-CH), 2,05 (3H, s, -OAc), 1,11 (3H, s, 19-CH₃), 0,88 (3H, s, 18-CH₃).

Ces données correspondent à celles de la littérature [64].

Synthèse de l'acétate de 7 α -allyl-4-androstène-17 β -ol-3-one (4)



Sous atmosphère d'azote, le stéroïde **3** (780 mg, 2,37 mmol) est dissous dans du dichlorométhane sec (22 mL). Le mélange est refroidi à -78°C à l'aide d'un bain d'azote liquide et d'acétone. La pyridine (0,19 mL, 2,37 mmol) est ajoutée à la solution suivie du tétrachlorure de titane (TiCl_4) (1,33 mL, 12,11 mmol). Après 5 minutes d'agitation, l'allyltriméthylsilane (2,31 mL, 14,53 mmol), préalablement dilué dans du dichlorométhane sec (4 mL), est ajouté au mélange réactionnel. Le mélange réactionnel, de couleur bleu noire, est agité pendant 1,5 h à -78°C et ensuite pendant 1,25 h à -30°C . Le mélange est dilué dans de l'éther et lavé une première fois avec une portion de solution de HCl 3,7 %. La phase organique est ensuite lavée 3 fois avec l'eau. Le parachèvement est ensuite terminé par le séchage de la phase organique avec du sulfate de magnésium, filtration et l'évaporation. Le produit brut de réaction a été purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec comme éluant hexane/acétone (9,5/0,5) pour obtenir 537 mg de produit pur **4** avec un rendement de 61 %.

61 % (537 mg), solide

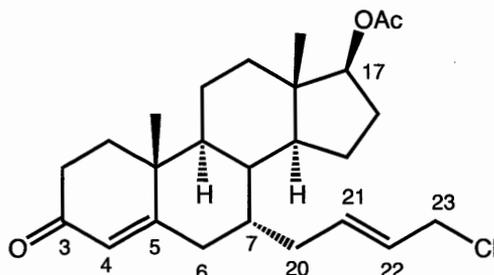
Point de fusion: 148-150 $^{\circ}\text{C}$.

IR (cm^{-1}): 1736 (C=O, acétate), 1678 (C=O, ènone), 1616 (C=C), 1243 (C-O).

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 5,72 (1H, s, 4-CH), 5,62 (1H, m, 21-CH), 5,05-4,94 (2H, m, 22-CH), 4,61 (1H, t, $J=8,2$ Hz, 17-CH), 2,05 (3H, s, -OAc), 1,21 (3H, s, 19- CH_3), 0,85 (3H, s, 18- CH_3).

Ces données correspondent à celles de la littérature [64].

Synthèse de l'acétate de 7 α -(4-chloro-but-2-ényl)-4-androstèn-17 β -ol-3-one (5)



Sous atmosphère d'azote, le stéroïde **4** (303 mg, 0,82 mmol) est dissous dans du dichlorométhane sec. Le catalyseur Hoveyda-Grubbs de 2^e génération (27,9 mg, 0,04 mmol), préalablement dissous dans 1 mL de dichlorométhane sec, est ajouté au mélange. Le chlorure d'allyle (0,53 mL, 6,56 mmol) est ensuite ajouté au mélange réactionnel. Ce dernier est porté à reflux pendant 9 heures. Le mélange est évaporé à sec et le produit brut de couleur brun-noir est purifié par chromatographie éclair (hexane/acétone, 9,5/0,5) sur gel de silice. Le produit pur **5** est obtenu avec un rendement de 81 % (273 mg).

81 % (273 mg), solide

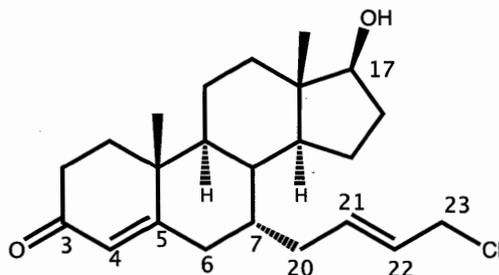
Point de fusion: 87-91°C.

IR (cm⁻¹): 1728 (C=O, acétate), 1669 (C=O, ènone), 1614 (C=C), 1250 (C-O).

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 5,71 (1H, s, 4-CH), 5,60 (2H, m, 21-CH et 22-CH), 4,60 (1H, t, J=8,2 Hz, 17-CH), 4,01 (2H, m, 23-CH₂), 2,03 (3H, s, -OAc), 1,19 (3H, s, 19-CH₃), 0,83 (3H, s, 18-CH₃).

Ces données correspondent à celles de la littérature [62].

Synthèse de 7 α -(4-chloro-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 β -ol-3-one (6)



Le stéroïde **5** (842 mg, 2,01 mmol) est dissous dans le méthanol (16 mL) et le mélange est agité. Une solution d'acide chlorhydrique de 5 N (5 mL) est ajoutée au mélange réactionnel. Le tout est agité pendant 48 heures à température de la pièce. Une fois le temps de réaction terminé, le mélange est dilué avec de l'éther (50 mL). La phase organique est ensuite lavée avec une portion de 50 mL de solution aqueuse saturée de carbonate de sodium (NaHCO₃). La phase organique est récupérée et lavée avec trois portions d'eau distillée (25 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium (MgSO₄), filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair avec comme éluant un mélange d'hexane : acétone (8/2). Le produit **6** pur est obtenu avec une masse de 640 mg avec un rendement de 95 %.

95 % (640 mg), solide

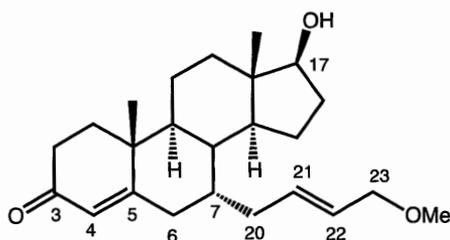
Point de fusion: 142 – 145 °C

IR (cm⁻¹): 3423 (O-H), 1669 (C=O, ènone), 1614 (C=C), 1250 (C-O).

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 5,67 (1H, s, 4-CH), 5,56 (2H, m, 21-CH et 22-CH), 3,98 (2H, m, 23-CH₂), 3,62 (1H, t, J=8,2 Hz, 17-CH), 1,17 (3H, s, 19-CH₃), 0,76 (3H, s, 18-CH₃).

Ces données correspondent à celles de la littérature [62].

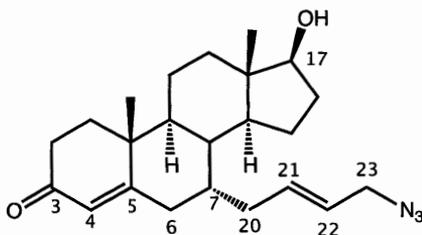
Synthèse de 7 α -(4-méthoxy-but-2-ényl)-4-androstèn-17 β -ol-3-one (6.1)



Ce produit secondaire est formé dans les mêmes conditions réactionnelles que pour la synthèse du produit **6** à l'exception qu'il faut porter le mélange réactionnel à reflux pendant 2 heures. On obtient alors le composé **6.1** comme produit majoritaire dans ces conditions. Étant un produit non-désiré, seulement l'analyse du RMN ^1H a été effectuée.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 5,69 (1H, s, 4-CH), 5,53 (2H, m, 21-CH et 22-CH), 3,85 (2H, m, 23- CH_2), 3,64 (1H, t, $J=8,3$ Hz, 17-CH), 3,30 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 1,19 (3H, s, 19- CH_3), 0,78 (3H, s, 18- CH_3).

Synthèse de 7 α -(4-azido-but-2-ényl)-4-androstèn-17 β -ol-3-one (7)



Le stéroïde **6** (218 mg, 0,578 mmol) est dissous dans une portion de 10 mL de méthanol. L'azoture de sodium (226 mg, 3,47 mmol) est ajouté au mélange et agité à reflux pendant 2 heures. On laisse le mélange réactionnel refroidir à température de la pièce. Une extraction liquide-liquide est ensuite effectuée sur le mélange en diluant ce

dernier dans 75 mL d'un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther (8:2). La phase organique est extraite avec 3 portions d'eau de 25 mL et une portion de 25 mL de solution de NaCl saturée. Finalement, la phase organique est séchée avec du MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit n'a pas nécessité de purification par colonne étant donné que le produit semble pur en RMN ¹H et montre qu'une seule tache en CCM. Il a donc été utilisé tel quel pour la prochaine étape de synthèse. On obtient une masse de 204 mg pour le produit **7** avec un rendement de 92 %.

92 % (204 mg), solide beige

Point de fusion: 139 – 143 °C

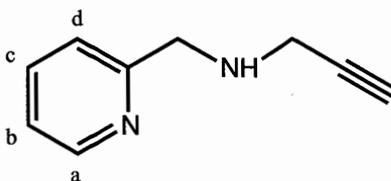
IR (cm⁻¹): 3432 (O-H), 2945, 2915 et 2873 (C-H), 2094 et 2073 (N=N=N), 1653 (C=O), 1617 (C=C), 1239 (C-O), 875 (C-Cl).

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 5,72 (1H, s, 4-CH), 5,56 (2H, m, 21-CH et 22-CH), 3,67 (3H, m, 23-CH₂ et 17-CH), 1,21 (3H, s, 19-CH₃), 0,80 (3H, s, 18-CH₃).

RMN ¹³C (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 199,1 (C-3), 169,1 (C-5), 134,9 (C-21), 126,2 (C-22), 125,1 (C-4), 81,6 (C-17), 52,6, 47,2, 46,2, 42,9 (C-23), 38,9, 38,8, 36,9, 36,5, 36,4, 36,2, 34,2, 30,5, 28,8, 23,0, 21,1, 18,2, 11,2.

SMHR (ESI+): (M+H)⁺ calculé pour C₂₃H₃₄N₃O₂ = 384,2646; masse trouvée = 384,2662.

Synthèse de prop-2-ynyl-pyridin-2-ylméthylamine (9)



La 2-picolylamine (1,0 mL, 9,7 mmol) et le K_2CO_3 (1,34 g, 9,70 mmol) sont dissous dans 5 mL d'acétonitrile (CH_3CN) et agités pendant 10 minutes. Le bromure propargylique (0,43 mL, 4,85 mmol), préalablement dilué dans 25 mL de CH_3CN , est ajouté goutte à goutte au mélange réactionnel sur une période de 2 heures. La solution est ensuite agitée pendant 16 heures à la température de la pièce. Une fois la réaction terminée, la solution est filtrée sur verre fritté afin d'éliminer le K_2CO_3 et le solvant est évaporé par la suite. Le produit est purifié sur colonne chromatographique avec comme éluant un mélange de dichlorométhane : méthanol : triéthylamine (100:5:1). Le produit pur est une huile orange foncé avec un rendement de 50 % (355 mg).

50 % (355 mg), huile orange-brune

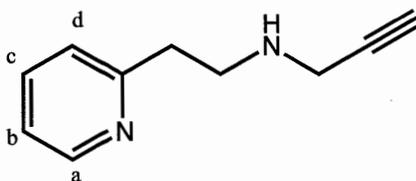
IR (cm^{-1}): 3293 (NH secondaire), 1674, 1590, 1569, 1474, 1433, 1357, 1148, 1121,

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 8,55 (1H, d, $J=4,7$ Hz, a-CH), 7,62 (1H, td, $J=7,8$ Hz et 1,8 Hz, c-CH), 7,30 (1H, d, $J=7,8$ Hz, d-CH), 7,14 (1H, m, b-CH), 3,98 (2H, s, pyr- $\underline{CH_2}$ -NH- $\underline{CH_2}$), 3,48 (2H, d, $J=2,3$ Hz, pyr- $\underline{CH_2}$ -NH- $\underline{CH_2}$), 2,23 (1H, t, $J=2,5$ Hz, CH alcyne), 2,12 (1H, sl, NH).

RMN ^{13}C (200 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 159,0, 149,3, 136,4, 122,4, 122,0, 81,8, 71,7, 53,6, 37,7.

SMHR (ESI+): $(M+H)^+$ calculé pour $C_9H_{11}N_2 = 147,0917$; masse trouvée = 147,0920.

Synthèse de prop-2-ynyl-pyridin-2-yléthylamine (10)



La 2-(2-aminoéthyl)pyridine (1,00 mL, 8,40 mmol) et le K_2CO_3 (1,16 g, 8,41 mmol) sont dissous dans 5 mL d'acétonitrile (CH_3CN) et agités pendant 10 minutes. On ajoute goutte à goutte le bromure propargylique (0,37 mL, 4,20 mmol) préalablement dilué dans 25 mL de CH_3CN au mélange réactionnel pendant 2 heures. La solution est ensuite agitée pendant 16 heures à la température de la pièce. Une fois la réaction terminée, la solution est filtrée sur verre fritté afin d'éliminer le K_2CO_3 et le solvant est évaporé par la suite. Le produit est purifié sur colonne chromatographique avec comme éluant un mélange de dichlorométhane: méthanol: triéthylamine (100:5:1). Le produit pur est une huile orange avec un rendement de 46 % (309 mg).

46 % (309 mg), huile orange

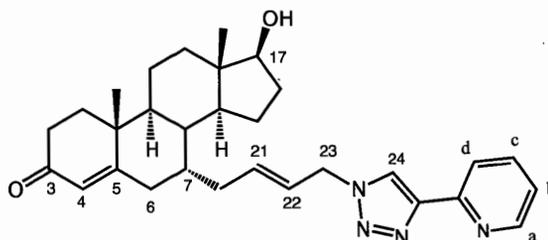
IR (cm^{-1}): 3294 (NH secondaire), 1674, 1591, 1568, 1474, 1433, 1116, 749, 629.

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 8,51 (1H, d, $J=4,7$ Hz, a-CH), 7,59 (1H, td, $J=7,8$ Hz et 2,0 Hz, c-CH), 7,17 (1H, d, $J=7,8$ Hz, d-CH), 7,10 (1H, m, b-CH), 3,44 (2H, d, $J=2,7$ Hz, $CH_2CH_2-NH-CH_2$), 3,10 (2H, m, $CH_2CH_2-NH-CH_2$), 2,96 (2H, m, $CH_2CH_2-NH-CH_2$), 2,18 (1H, t, $J=2,5$ Hz, CH alcyne), 1,81 (1H, sl, NH).

RMN ^{13}C (200 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 159,9, 149,2, 136,3, 123,2, 121,3, 82,0, 71,4, 48,0, 38,0 (2 CH_2)

SMHR (ESI+): $(M+H)^+$ calculé pour $C_{10}H_{13}N_2$ = 161,1073; masse trouvée = 161,1077.

Synthèse du 7 α -[4-(4-pyridin-2-yl-[1,2,3]triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstèn-17 β -ol-3-one (11)



L'azoture **7** (84 mg, 0,22 mmol) et la 2-éthynylpyridine (37 μ L, 0,37 mmol) sont ajoutés à 6 mL d'un mélange de THF/H₂O (3:1) dans un ballon de 15 mL. On ajoute ensuite l'ascorbate de sodium (108 mg, 0,548 mmol) et le sulfate de cuivre pentahydraté (16,4 mg, 0,065 mmol) et on laisse agiter le mélange réactionnel à la température de la pièce pendant 16 heures. Le produit est extrait avec de 50 mL d'acétate d'éthyle et lavé avec 3 portions d'eau de 30 mL. La phase organique est séchée avec MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut de réaction est purifié sur colonne chromatographique avec comme éluant un mélange hexane : acétone (7:3). Le produit pur est une huile visqueuse brune avec un rendement de 54 % (57 mg).

54 % (57 mg), huile visqueuse.

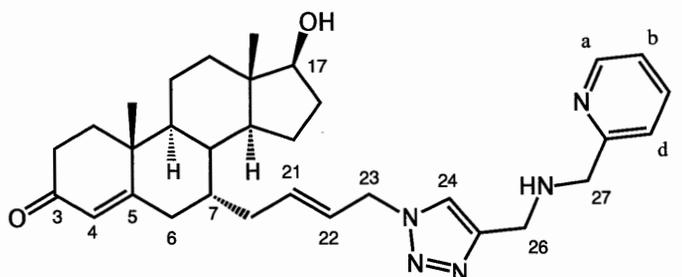
IR (cm⁻¹): 3391 (O-H), 3150 (C-H triazole), 2944 (C-H), 1610 (C=O), 1570 (C=N), 1436, 1355, 1225, 950, 785.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8,56 (1H, d, J=5,2 Hz, a-CH), 8,17 (1H, d, J=7,8 Hz, d-CH), 8,13 (1H, s, 24-CH-triazole), 7,77 (1H, td, J=7,8 Hz et 1,6 Hz, c-CH), 7,21 (1H, m, b-CH), 5,68 (3H, sl, 4-CH, 21-CH et 22-CH), 4,98 (2H, m, 23-CH₂), 3,65 (1H, t, J=8,0 Hz, 17-CH), 1,20 (3H, s, 19-CH₃), 0,79 (3H, s, 18-CH₃).

RMN ¹³C (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 198,9, 168,9, 150,2, 149,3, 148,5, 136,9, 135,5, 126,1, 124,9, 122,9, 121,7, 120,3, 81,5, 52,1, 47,1, 46,2, 42,9, 38,7, 38,5, 36,3, 36,2, 36,1, 35,9, 33,9, 30,2, 28,6, 22,8, 20,8, 17,9, 10,9.

SMHR (ESI+): $(M+H)^+$ calculé pour $C_{30}H_{39}N_4O_2 = 487,3068$; masse trouvée = 487,3080.

Synthèse du 7 α -[4-(4-(((pyridin-2-ylméthyl)-amino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstèn-17 β -ol-3-one (12)



Dans un ballon de 15 mL, on dissout et agite le stéroïde **7** (55 mg, 0,14 mmol) et le dérivé propargylique **9** (42 mg, 0,29 mmol) dans 1,3 mL d'un mélange de THF/H₂O (1:1). On ajoute ensuite l'ascorbate de sodium (5,7 mg, 0,029 mmol) et le sulfate de cuivre pentahydraté (3,6 mg, 0,015 mmol) et on laisse agiter le mélange réactionnel à la température de la pièce pendant 16 heures. Le produit est extrait avec de 50 mL d'acétate d'éthyle et lavé avec deux portions de 30 mL d'une solution de NaCl saturée. Les deux phases aqueuses ont été réextraites avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques ont été combinées, séchées avec MgSO₄, filtrées et évaporées sur pression réduite. Le produit brut de réaction est purifié sur colonne chromatographique avec comme éluant dichlorométhane: méthanol: triéthylamine (100:5:1). Le produit pur est une huile orange avec un rendement de 29 % (22 mg).

29 % (22 mg), huile orange

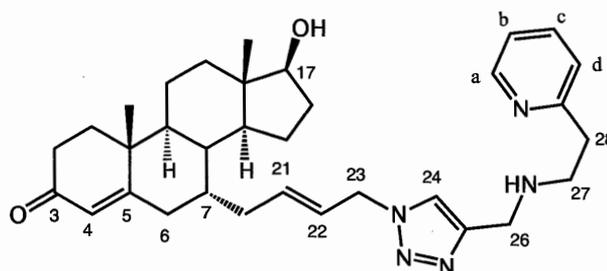
IR (cm⁻¹): 3304 (O-H), 2939 (C-H), 2094, 2073, 1654 (C=O), 1611 (C=C).

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8,54 (1H, m, a-CH), 7,65 (1H, m, c-CH), 7,56 (1H, s, 24-CH), 7,35 (1H, m, d-CH), 7,18 (1H, m, b-CH), 5,60 (3H, sl, 4-CH, 21-CH et 22-CH), 4,89 (2H, m, 23-CH₂), 4,03 (4H, m, 26-CH₂ et 27-CH₂), 3,64 (1H, t, J=8,2 Hz, 17-CH), 1,19 (3H, s, 19-CH₃), 0,79 (3H, s, 18-CH₃).

RMN ^{13}C (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 199,0, 169,0, 158,7, 149,3, 146,4, 136,6, 135,2, 126,1, 125,1, 122,5, 122,2, 121,7, 81,5, 51,9, 47,1, 46,1, 44,1, 42,9, 38,7, 38,5, 36,4, 36,2, 36,0, 35,9, 33,9, 30,2, 29,7, 28,8, 22,8, 20,8, 17,9, 10,9.

SMHR (ESI+): $(\text{M}+\text{H})^+$ calculé pour $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_2 = 530,3490$; masse trouvée = 530,3505.

Synthèse du 7 α -[4-(4-((2-pyridin-2-yl-éthylamino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ényl]-4-androstèn-17 β -ol-3-one (13)



Dans un ballon de 10 mL, on dissout et agite le stéroïde **7** (56 mg, 0,15 mmol) et le dérivé propargylique **10** (25 mg, 0,16 mmol) dans 2 mL d'un mélange de *t*-BuOH/ H_2O (1:1). On ajoute ensuite l'ascorbate de sodium (5,8 mg, 0,029 mmol) et le sulfate de cuivre pentahydraté (3,6 mg, 0,015 mmol) et on laisse agiter le mélange réactionnel à la température de la pièce pendant 16 heures. Le produit est extrait avec de 50 mL d'acétate d'éthyle et lavé avec deux portions de 30 mL d'une solution de NaCl saturée. Les deux phases aqueuses ont été réextraites avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques ont été combinées, séchées avec MgSO_4 , filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit brut de réaction est purifié sur colonne chromatographique avec comme éluant dichlorométhane: méthanol: triéthylamine (100:5:1). Le produit pur est une huile orange avec un rendement de 60 % (48 mg).

60 % (48 mg), huile

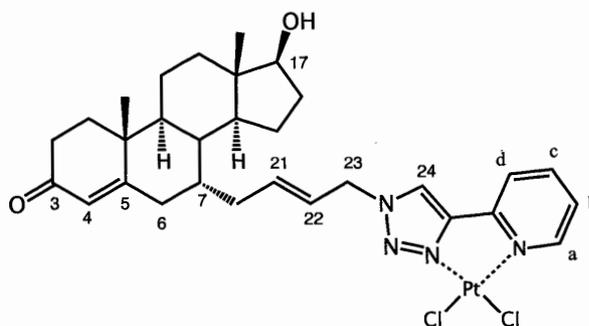
IR (cm^{-1}): 3306 (O-H et N-H), 2936 (C-H), 1659 (C=O), 1613 (C=C), 1592, 1374, 1222, 1138, 1051, 750.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 8,47 (1H, d, $J=4,7$ Hz, a-CH), 7,56 (1H, td, $J=7,8$ Hz et 1,8 Hz, c-CH), 7,48 (1H, s, 24-CH-triazole), 7,10 (2H, m, b-CH et d-CH), 5,58 (3H, sl, 4-CH, 21-CH et 22-CH), 4,85 (2H, m, 23- CH_2), 3,93 (2H, s, 26- CH_2), 3,61 (1H, t, $J=8,2$ Hz, 17-CH), 3,01 (4H, m, 27- CH_2 et 28- CH_2), 1,22 (3H, s, 19- CH_3), 0,76 (3H, s, 18- CH_3).

RMN ^{13}C (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 198,9, 168,9, 159,9, 149,2, 146,5, 136,5, 135,2, 126,1, 125,1, 123,3, 121,5, 121,4, 81,4, 51,9, 48,7, 47,1, 46,1, 44,5, 42,9, 38,7, 38,5, 36,4, 36,2, 36,0, 35,9, 33,9, 30,2, 29,7, 28,7, 22,8, 20,8, 17,9, 10,9.

SMHR (ESI $^+$): $(\text{M}+\text{H})^+$ calculé pour $\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_2 = 544,3646$; masse trouvée = 544,3662.

Synthèse du 7 α -[4-(4-pyridin-2-yl-[1,2,3]triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstèn-17 β -ol-3-one dichloroplatine(II) (14)



Le composé triazole **11** (57 mg, 0,12 mmol) est ajouté à 1,0 mL de DMF et agité dans un ballon de 10 mL. Le tétrachloroplatinate(II) de potassium (51 mg, 0,12 mmol) (K_2PtCl_4) est dilué dans un 0,5 mL d'eau et ajouté à la solution. Le mélange réactionnel est agité à l'obscurité pendant 5 jours. Après 5 jours, 2 mL d'une solution de KCl saturée ainsi que 0,2 g de KCl est ajouté au mélange et laissé agiter vigoureusement toute la nuit pendant 16 heures. Le produit est filtré et lavé à l'eau. Le produit est purifié par colonne chromatographique avec comme solvant un mélange de chloroforme:méthanol (95:5). On obtient 30,3 mg d'une poudre jaune avec un rendement de 34 %.

34 % (30,3 mg), solide jaune.

Point de fusion: 255 – 257 °C

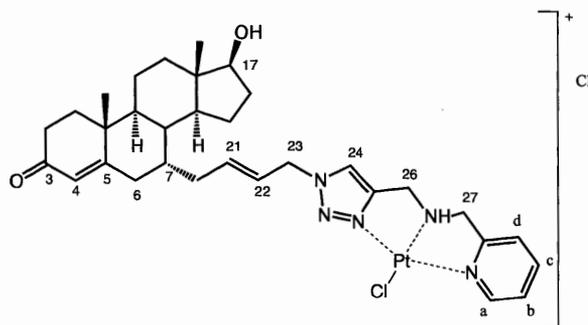
IR (cm⁻¹): 3403 (N-H et OH), 3103, 2931 (C-H), 1653 (C=O), 1623 (C=C), 1463, 1356, 1274, 1052, 985, 775.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 9,08 (1H, m, a-CH), 8,55 (1H, s, 24-CH), 8,05 (2H, m, c-CH et d-CH), 7,26 (1H, m, b-CH), 5,92 (1H, m, 4-CH), 5,65 (2H, m, 21-CH et 22-CH), 5,12 (2H, m, 23-CH₂), 3,62 (1H, t, J=9,0 Hz, 17-CH), 1,19 (3H, s, 19-CH₃), 0,78 (3H, s, 18-CH₃).

RMN-¹³C (200 MHz, CDCl₃ + CD₃OD (9 : 1), δ ppm): 199,9, 170,4, 149,4, 148,4, 139,7, 139,1, 137,0, 125,8, 124,9, 122,8, 122,4, 81,1, 54,8, 50,6, 50,1, 47,1, 46,1, 42,8, 38,7, 38,5, 36,5, 36,1, 35,8, 33,9, 29,8, 28,9, 22,7, 20,8, 17,9, 10,9.

SMHR (ESI+): (M+NH₄)⁺ calculé pour C₃₀H₄₂Cl₂N₅O₂Pt = 770,2348; masse trouvée = 770,2376.

Synthèse du 7α-[4-(4-(((pyridin-2-ylméthyl)-amino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstène-17β-ol-3-one chloroplatine(II) (15)



Le composé triazole **12** (34,2 mg, 0,06 mmol) est ajouté à 1,0 mL de DMF et agité dans un ballon de 10 mL. Le tétrachloroplatinate(II) de potassium (28,1 mg, 0,07 mmol) (K₂PtCl₄) est dilué dans un 0,5 mL d'eau et ajouté à la solution. Le mélange réactionnel est agité à l'obscurité pendant 5 jours. Après 5 jours, 2 mL d'une solution de KCl saturée ainsi que 0,2 g de KCl est ajouté au mélange et laissé agiter vigoureusement

toute la nuit pendant 16 heures. Le produit est filtré et lavé à l'eau. On obtient 37,4 mg d'une poudre beige avec un rendement de 77 %.

77 % (37,4 g), solide beige.

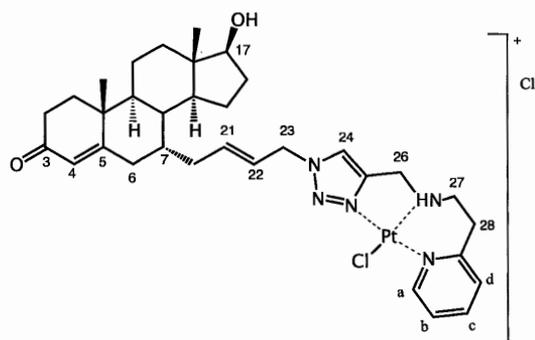
Point de fusion : dégradation à 256 °C.

IR (cm⁻¹): 3438 (O-H et N-H), 3080, 2931 (C-H), 2360 – 2154 (N-N=N), 1653 (C=O), 1614 (C=C), 1442, 1348, 1240, 1056, 950, 771.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃ + CD₃OD (9 : 1), δ ppm): 8,82 (1H, m, a-CH), 7,96 (2H, m, 24-CH et c-CH), 7,51 (1H, m, d-CH), 7,35 (1H, m, b-CH), 5,82 – 5,45 (3 H, m, 4-CH, 21-CH et 22-CH), 4,91 (2H, m, 24-CH₂), 4,59 (2H, m, CH₂), 4,22 – 4,00 (2H, m, CH₂), 3,49 (1H, t, 17-CH), 1,12 (3H, s, 19-CH₃), 0,69 (3H, s, 18-CH₃).

SMHR (ESI+) : (M⁺) calculé pour C₃₂H₄₃ClN₅O₂Pt = 760,2747; masse trouvée = 760,2771.

Synthèse du 7α-[4-(4-((2-(pyridin-2-yl-éthylamino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ènyl)-4-androstène-17β-ol-3-one chloroplatine(II) (16)



Le composé triazole **13** (53 mg, 0,1 mmol) est ajouté à 1,5 mL de DMF et agité dans un ballon de 10 mL. Le tétrachloroplatine de potassium (42,5 mg, 0,1 mmol) (K₂PtCl₄) est dilué dans un 0,75 mL d'eau et ajouté à la solution. Le mélange réactionnel est agité à l'obscurité pendant 5 jours. Après 5 jours, 2 mL d'une solution de KCl saturée ainsi que 0,2 g de KCl est ajouté au mélange et laissé agiter vigoureusement toute la nuit

pendant 16 heures. Le produit est filtré et lavé à l'eau. On obtient 45 mg du complexe **16** (une poudre beige) avec un rendement de 60 %.

60 % (45 mg), solide beige

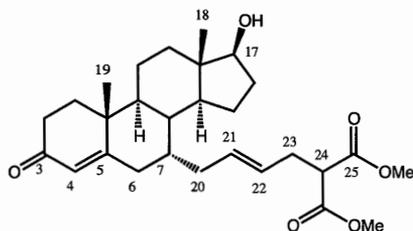
Point de fusion: dégradation à 253 °C.

IR (cm⁻¹): 3413 (N-H et O-H), 3120, 2925 et 2854 (C-H), 2361 – 2160, 1653 (C=O), 1612 (C=C), 1446, 1352, 1272, 1020, 960, 747.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃ + CD₃OD (9 : 1), δ ppm): 9,14 (1H, d, J=6,3 Hz, a-CH), 8,09 (1H, s, 24-CH), 7,87 (1H, t, J=7,2 Hz, c-CH), 7,38 (2H, m, b-CH et d-CH), 5,75 – 5,51 (3H, m, 4-CH, 21-CH et 22-CH), 5,01 (2H, m, 23-CH₂), 4,10 – 3,83 (2H, m, 26-CH₂), 3,59 (1H, t, J=8,2 Hz, 17-CH), 3,38 – 2,84 (4H, m, 27-CH₂ et 28-CH₂), 1,17 (3H, s, 19-CH₃), 0,76 (3H, s, 18-CH₃).

SMHR (ESI+): (M*+) calculé pour C₃₃H₄₅ClN₅O₂Pt = 774,2904; masse trouvée = 774,2928.

Synthèse de 2-(4-(17β-hydroxy-4-androstène-3-one-7α-yl)-but-2-ényl) malonate de diméthyle (**17**)



Méthode 1 :

Dans un ballon de 50 mL, 180 mg (7,64 mmol) de sodium métallique est ajouté à 20 mL de méthanol anhydre afin de former le méthoxyde de sodium *in situ*. La solution est agitée pendant 30 minutes jusqu'à la dissolution complète du sodium. Le malonate de diméthyle (0,98 mL, 8,59 mmol) est ajouté au mélange réactionnel et laissé agiter 15 minutes afin de bien former le malonate de sodium. Le stéroïde **5** (400 mg, 0,95 mmol), préalablement dissous dans 2,0 mL de méthanol, est ajouté au mélange

réactionnel et le tout est agité pendant 16 heures. Le mélange est dissous dans 25 mL l'éther et est lavé avec 2 portions de 15 mL d'une solution de chlorure d'ammonium saturée. La phase organique est ensuite lavée avec 3 portions d'eau de 15 mL, séchée, filtrée et évaporée. Le produit brut est purifié par chromatographie éclair (hexane/acétone, 75:25) pour donner 299 mg du produit désiré avec un rendement de 68 %.

Méthode 2 :

Le malonate de diméthyle (10 μ L, 0,09 mmol) et le catalyseur de ruthénium $\text{Ru}(\text{Cp}^*)(\text{MeCN})_3 [\text{PF}_6]$ (2,70 mg, 3 mol%) sont ajoutés à une solution de chlorure de testostérone **6** (74,6 mg, 0,20 mmol) et de carbonate de césium (64,5 mg, 0,20 mmol) dans l'acétonitrile (4,0 mL) dans un ballon de 25 mL. Le mélange réactionnel est agité à température de la pièce pendant 20 h. Le solvant de la réaction est évaporé et le produit brut est purifié par chromatographie éclair (hexane/acétone, 80:20) pour obtenir 17,7 mg du produit monoalkylé **17** avec un rendement de 41 %.

Point de fusion: 110 – 113 °C

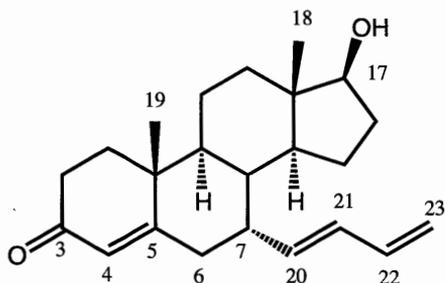
IR (cm^{-1}): 3446 (O-H, alcool), 1733 (C=O, ester), 1651 (C=O, ènone), 1614 (C=C), 1235 (C-O).

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 5,66 (1H, s, 4-CH), 5,33 (2H, m, 21-CH et 22-CH), 3,72 (6H, s, 2 x -OCH₃), 3,64 (1H, t, J=8.2 Hz, 17-CH), 3,41 (1H, t, J = 7,6 Hz, 24-CH), 2,58 (2H, dd, 23-CH₂), 1,19 (3H, s, 19-CH₃), 0,78 (3H, s, 18-CH₃).

RMN ^{13}C (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 199,0 (C-3), 169,4 (C-5), 169,3 (C-25 et C-25'), 132,0 (C-21), 127,6 (C-22), 126,1 (C-4), 81,6 (C-17), 52,5, 51,8, 47,1, 46,2, 46,1, 42,9, 38,7, 38,5, 36,2, 35,9, 34,0, 31,9, 30,9, 30,3, 28,8, 22,7, 20,8, 17,9, 10,9.

SMHR (ESI+): (M+H)⁺ calculé pour $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{O}_6$ = 473,2884; masse trouvée = 473,2898.

Analyse RMN ^1H de 7α -(buta-1,3-diényl)-4-androstèn-17 β -ol-3-one (18.1), produit secondaire de la réaction (méthode 2) :

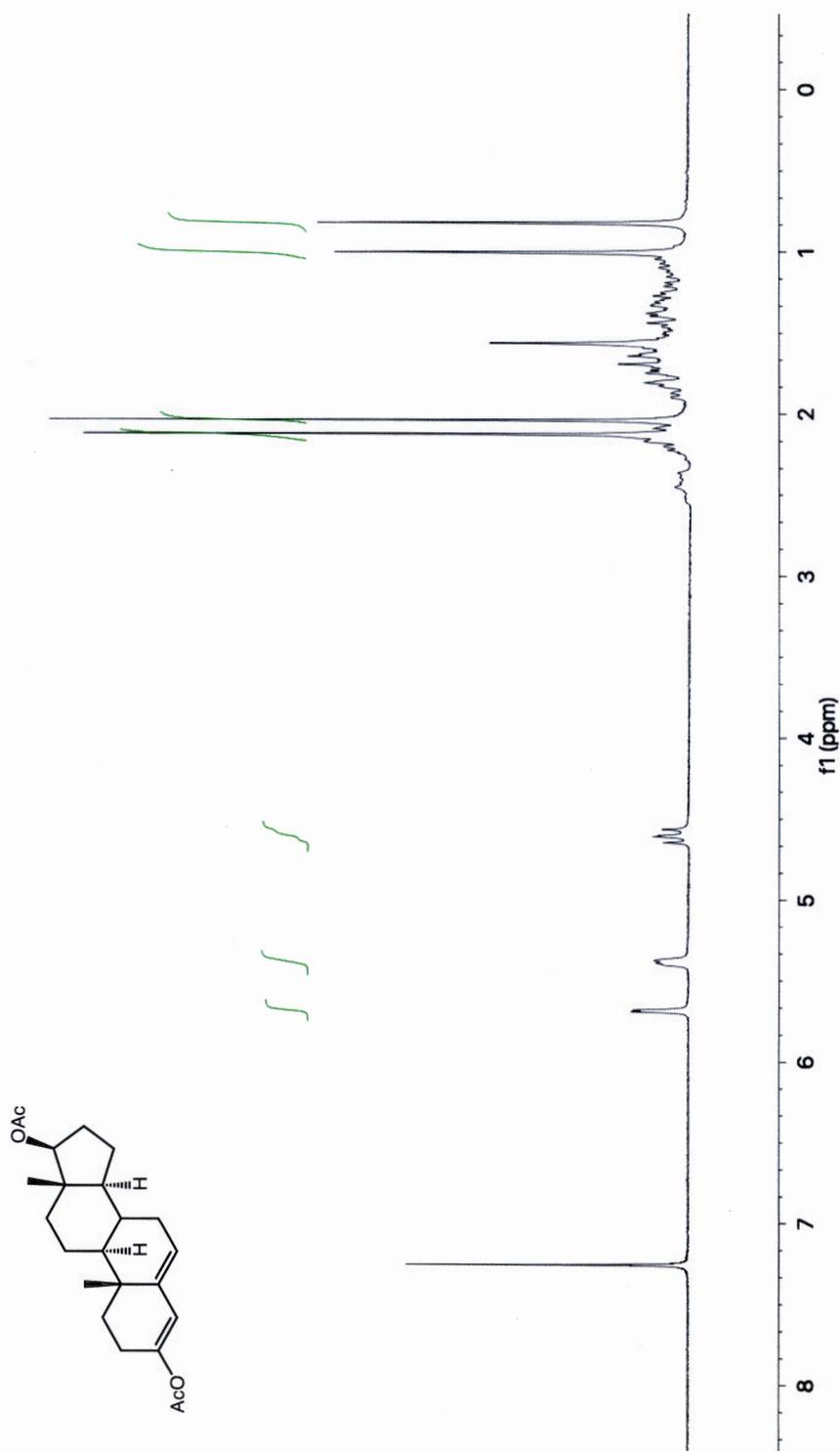


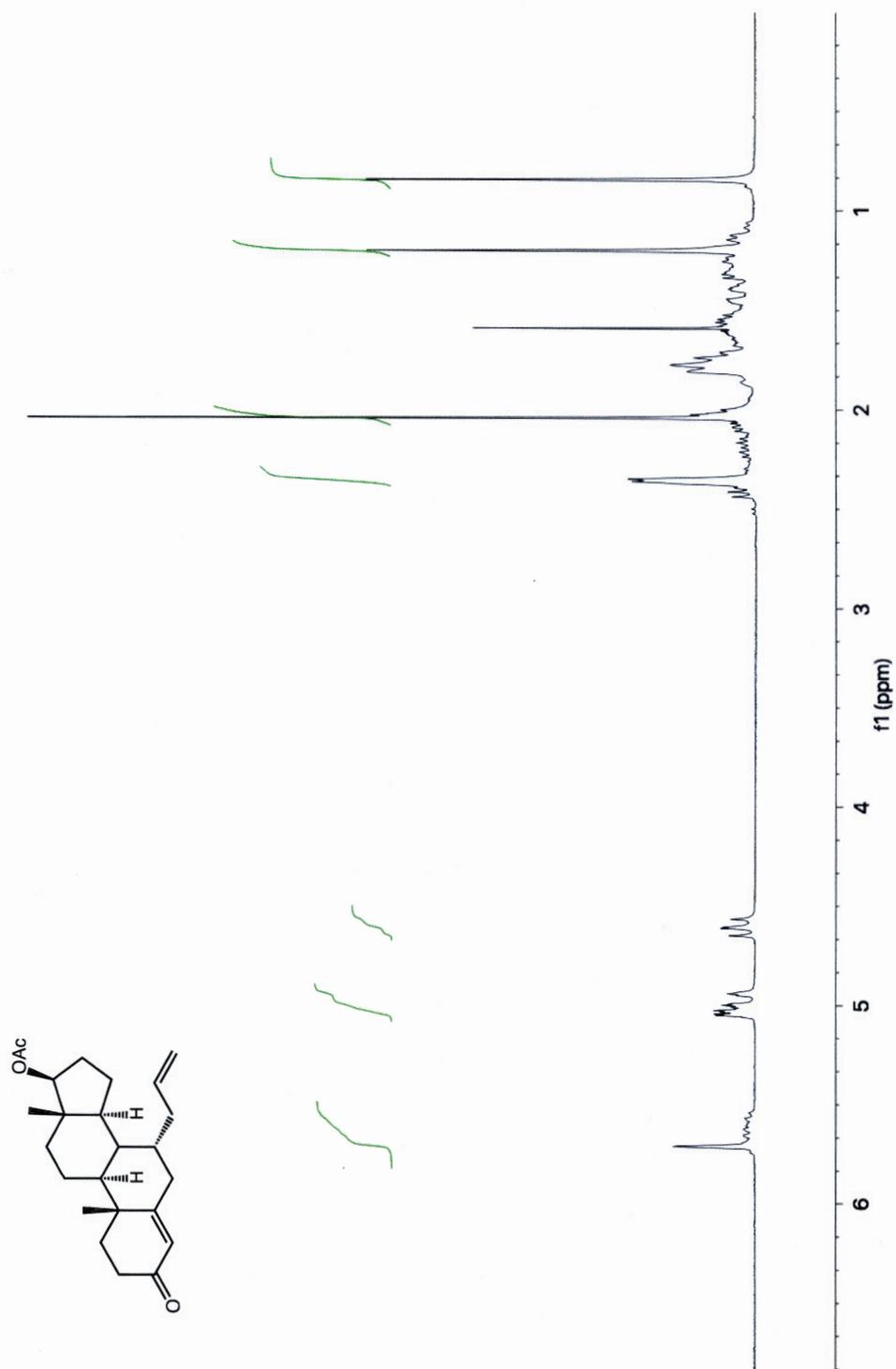
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 6,37 – 6,03 (2H, m, 20-CH et 21-CH), 5,71 (1H, s, 4-CH), 5,68 – 5,53 (1H, m, 22-CH) 5,16 – 5,00 (2H, m, 23- CH_2), 3,62 (1H, t, $J=8,0$ Hz, 17-CH), 1,23 (3H, s, 19- CH_3), 0,79 (3H, s, 18- CH_3).

ANNEXE B

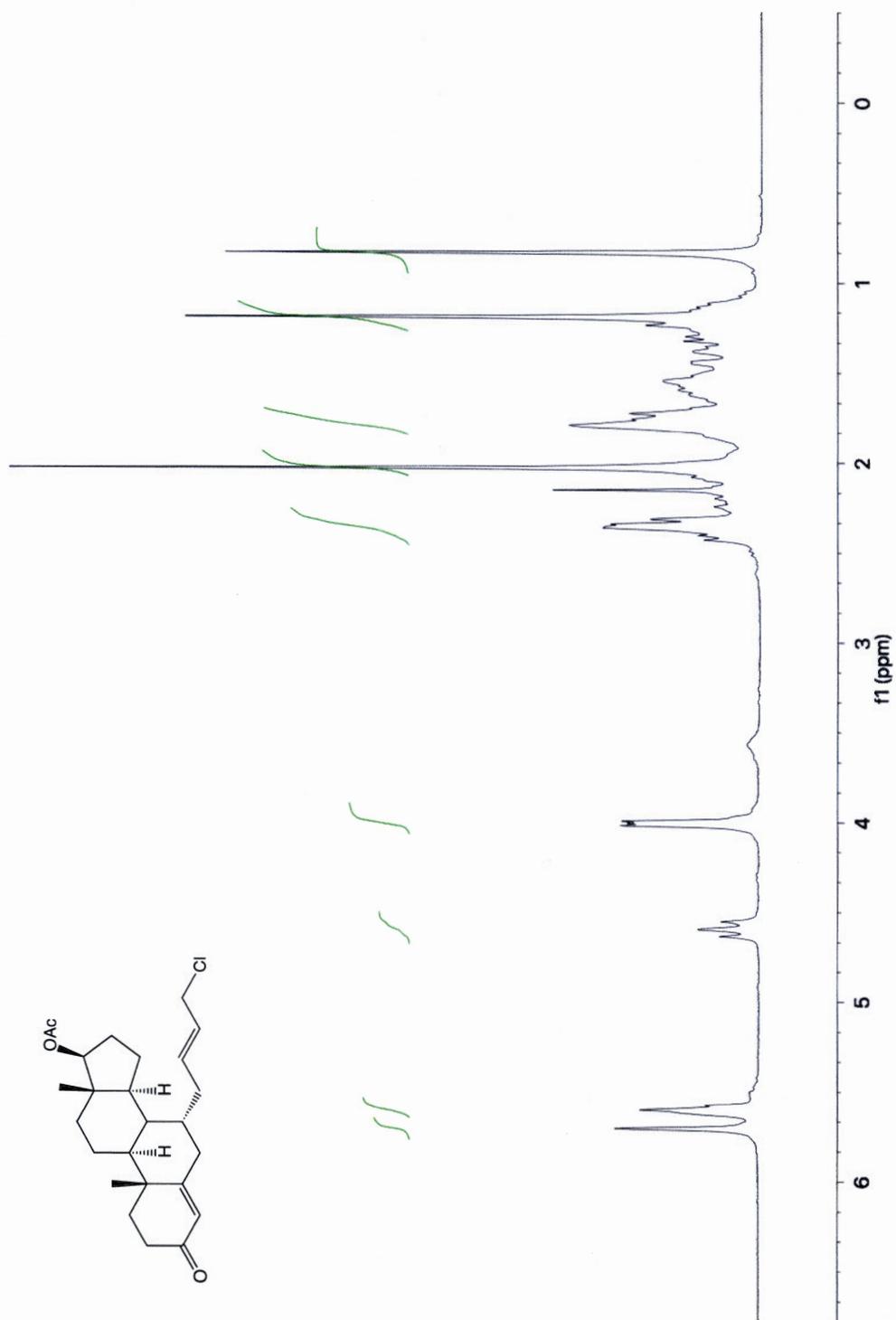
SPECTRES RMN ^1H ET ^{13}C

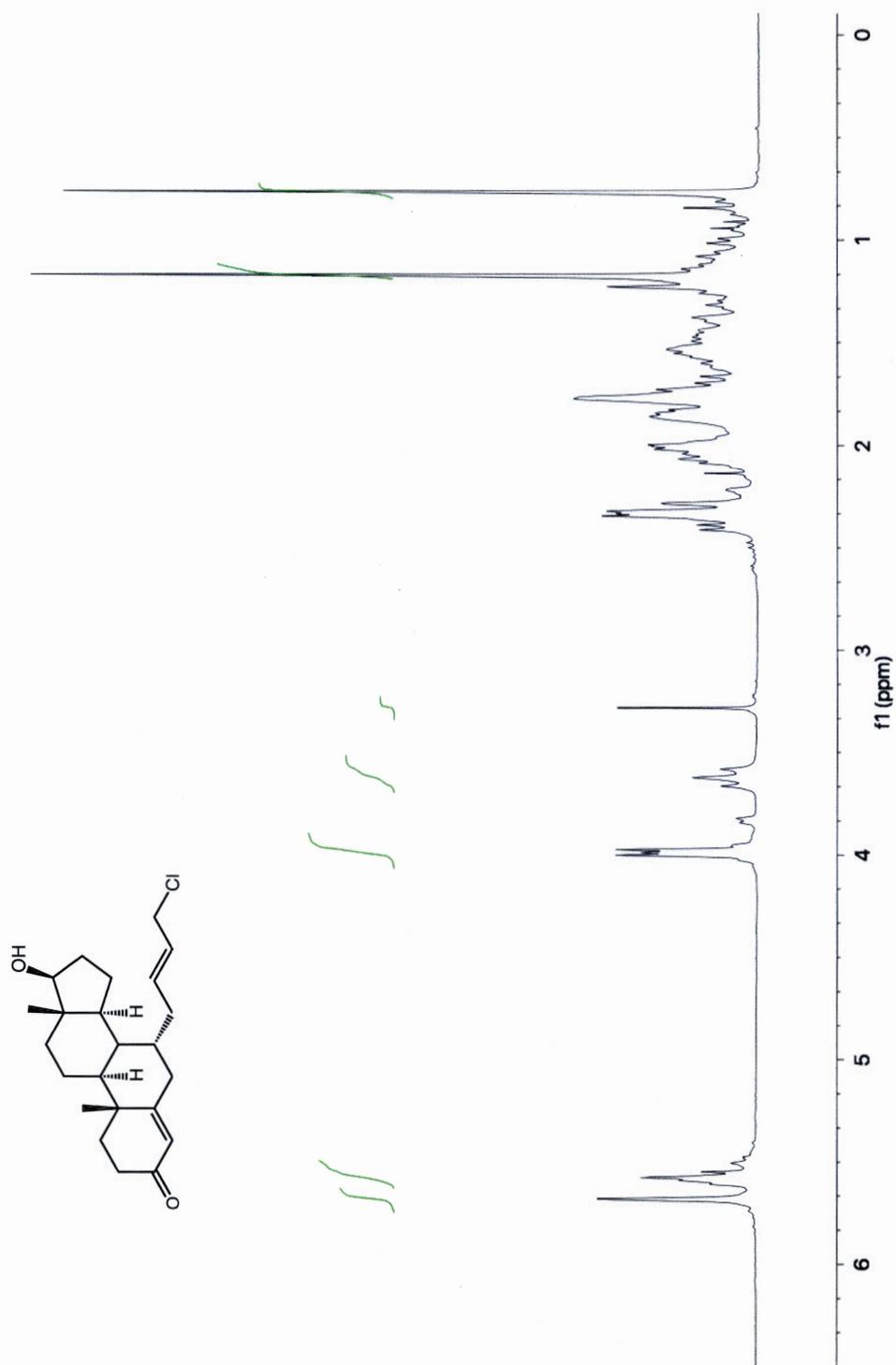
Les spectres RMN ^1H et ^{13}C des composés synthétisés sont présentés selon la numérotation indiquée dans le corps du texte. Chaque composé présente le spectre RMN ^1H suivi du spectre RMN ^{13}C à l'exception des composés connus **2**, **3**, **4**, **5** et **6**, des produits secondaires de réaction **6.1** et **18.1** et des hybrides **15** et **16**. Ces deux derniers n'étaient pas suffisamment solubles dans les solvants organiques utilisés.

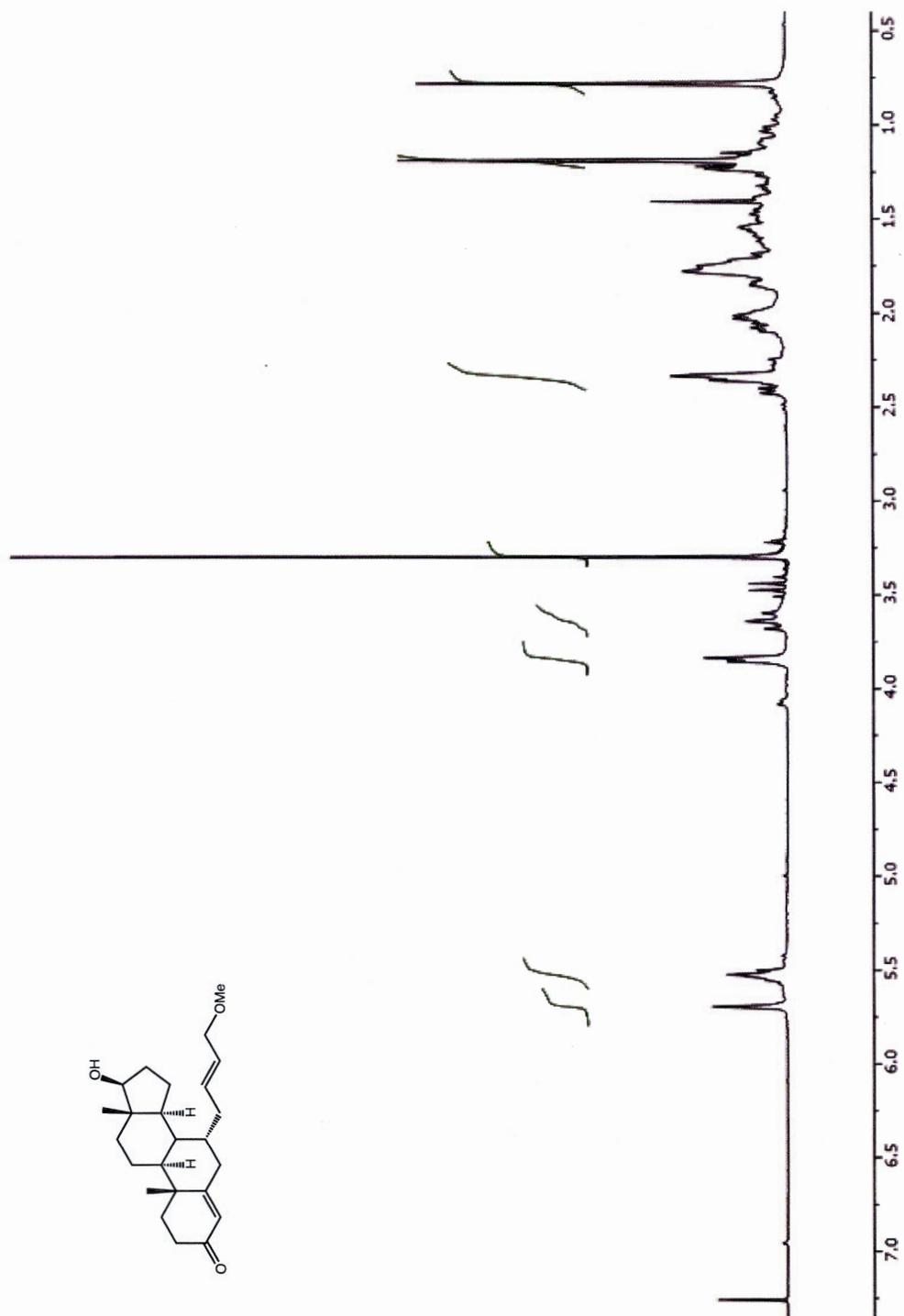
Spectre B.1 RMN ^1H du diacétate de 3,5-androstadiène-3,17 β -diol (2)

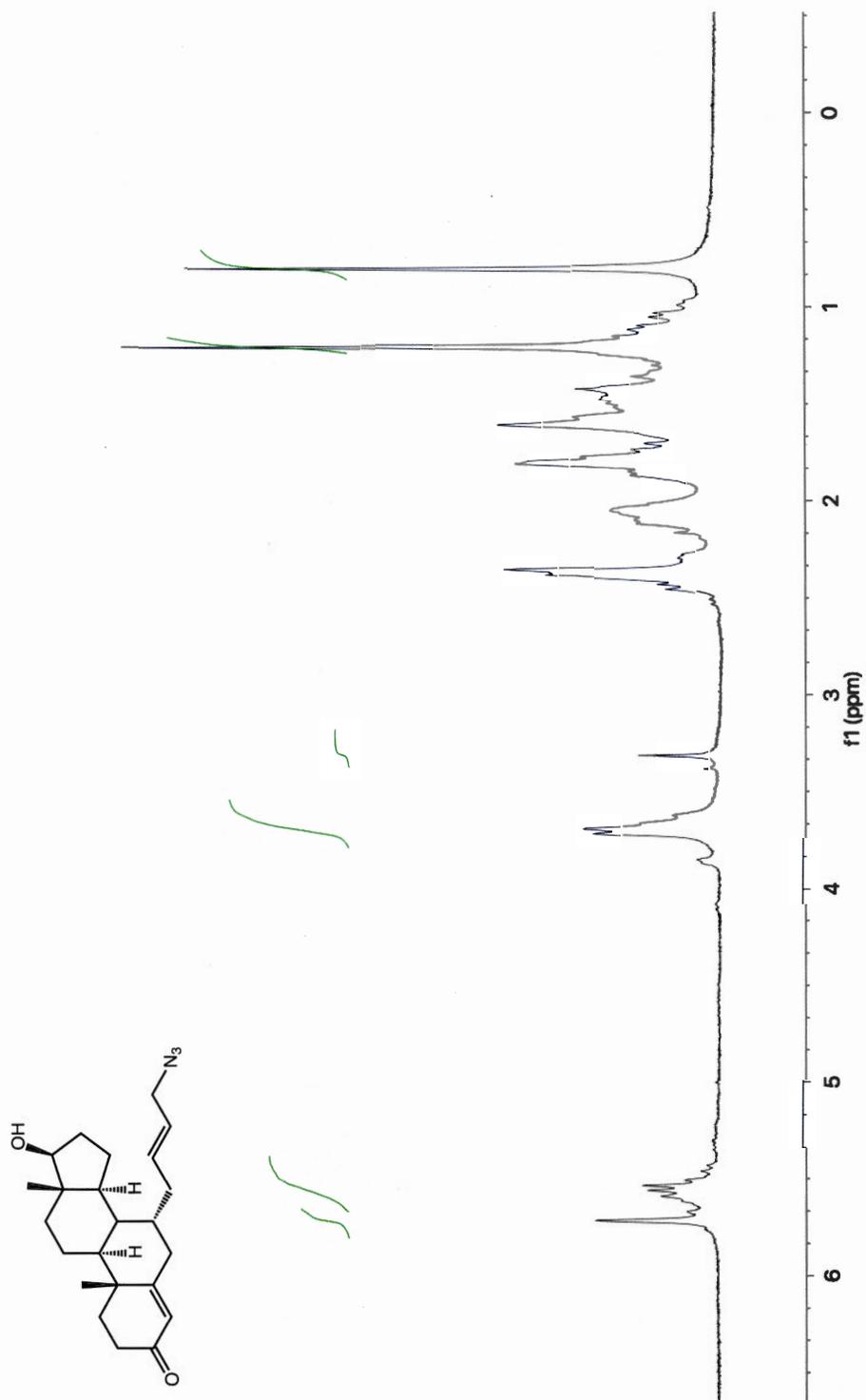
Spectre B.3 RMN ^1H de l'acétate de 7α -allyl-4-androstène-17 β -ol-3-one (4)

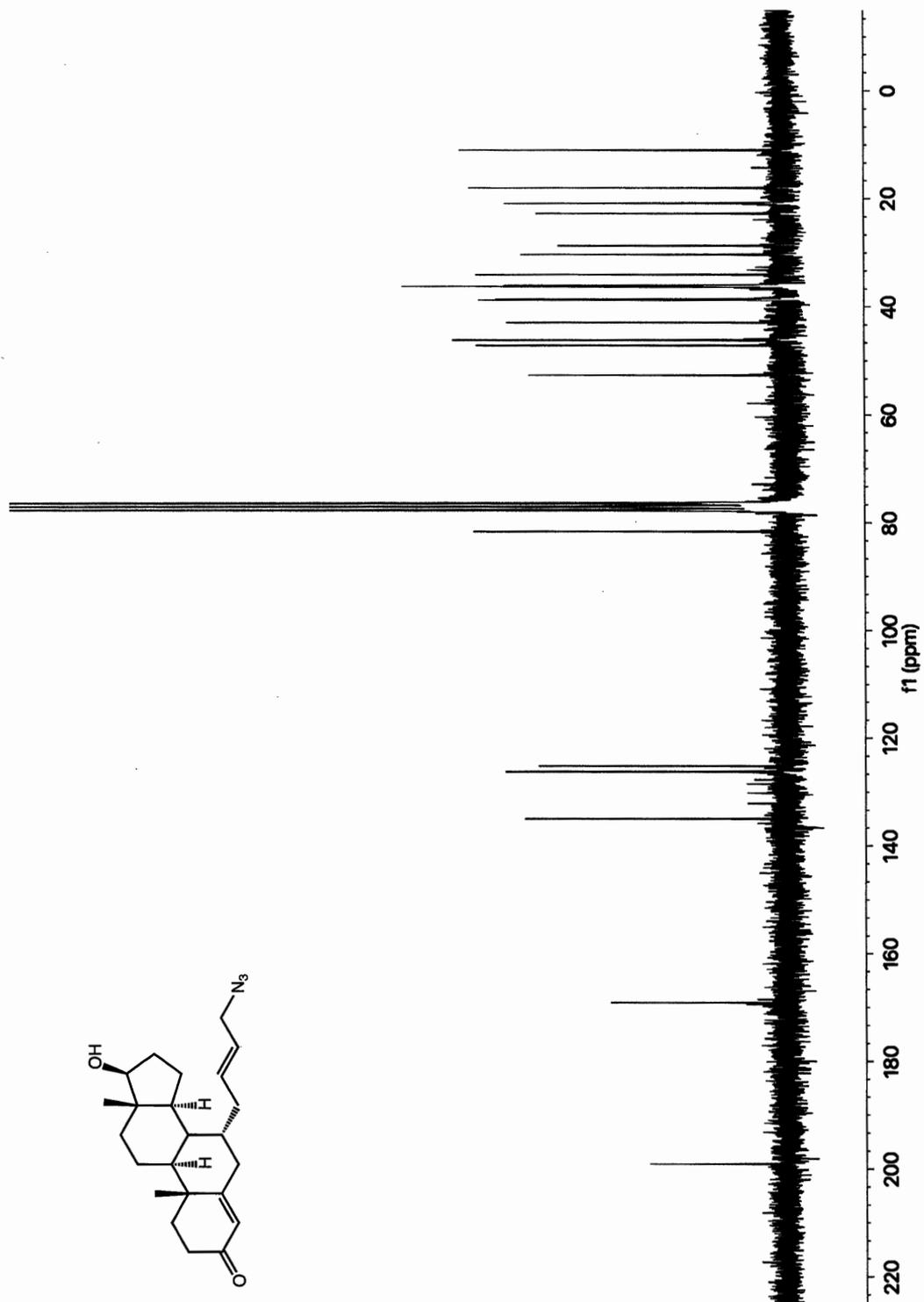
Spectre B.4 RMN ^1H de l'acétate de 7α -(4-chloro-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 β -ol-3-one (5)

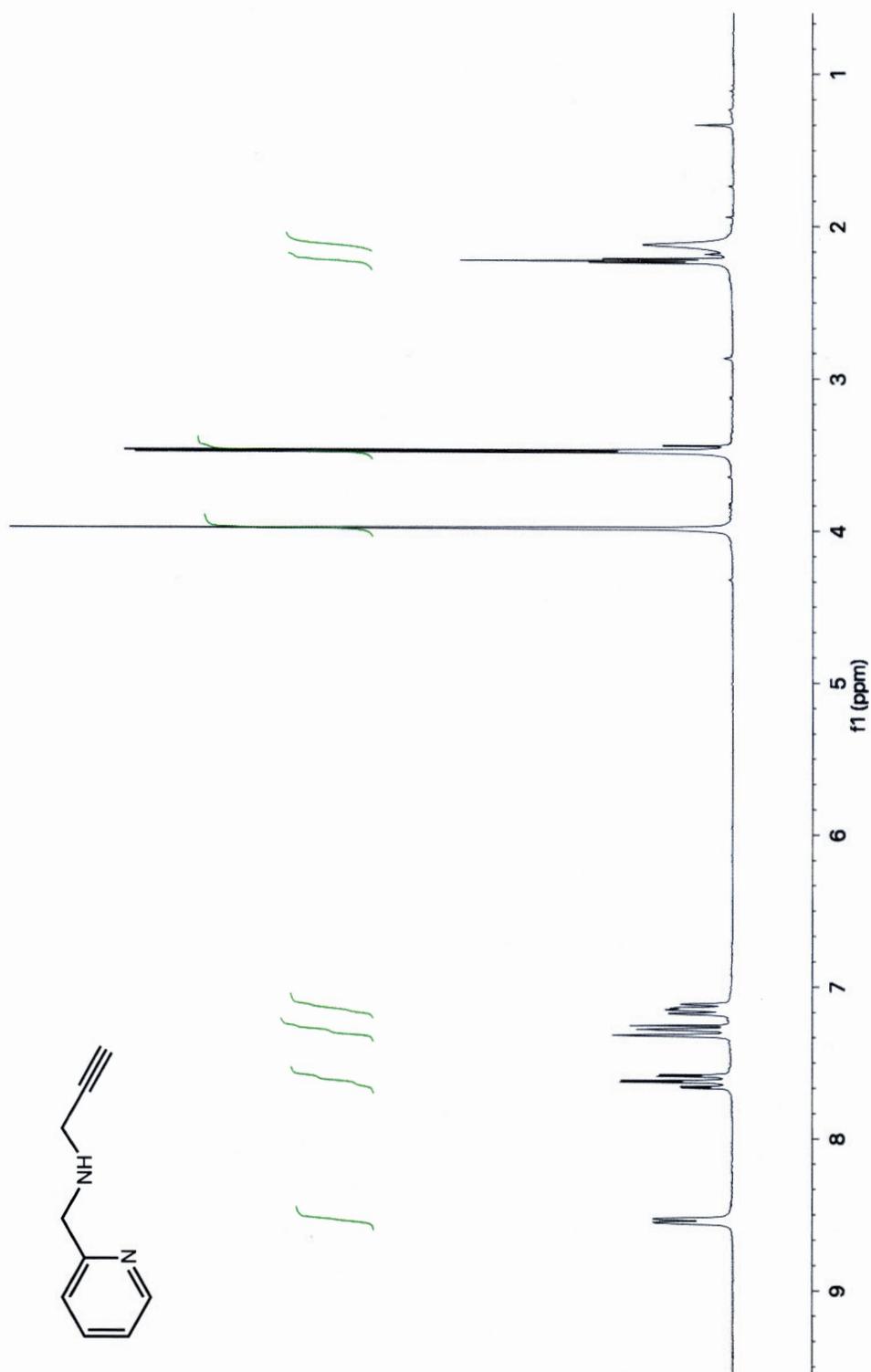


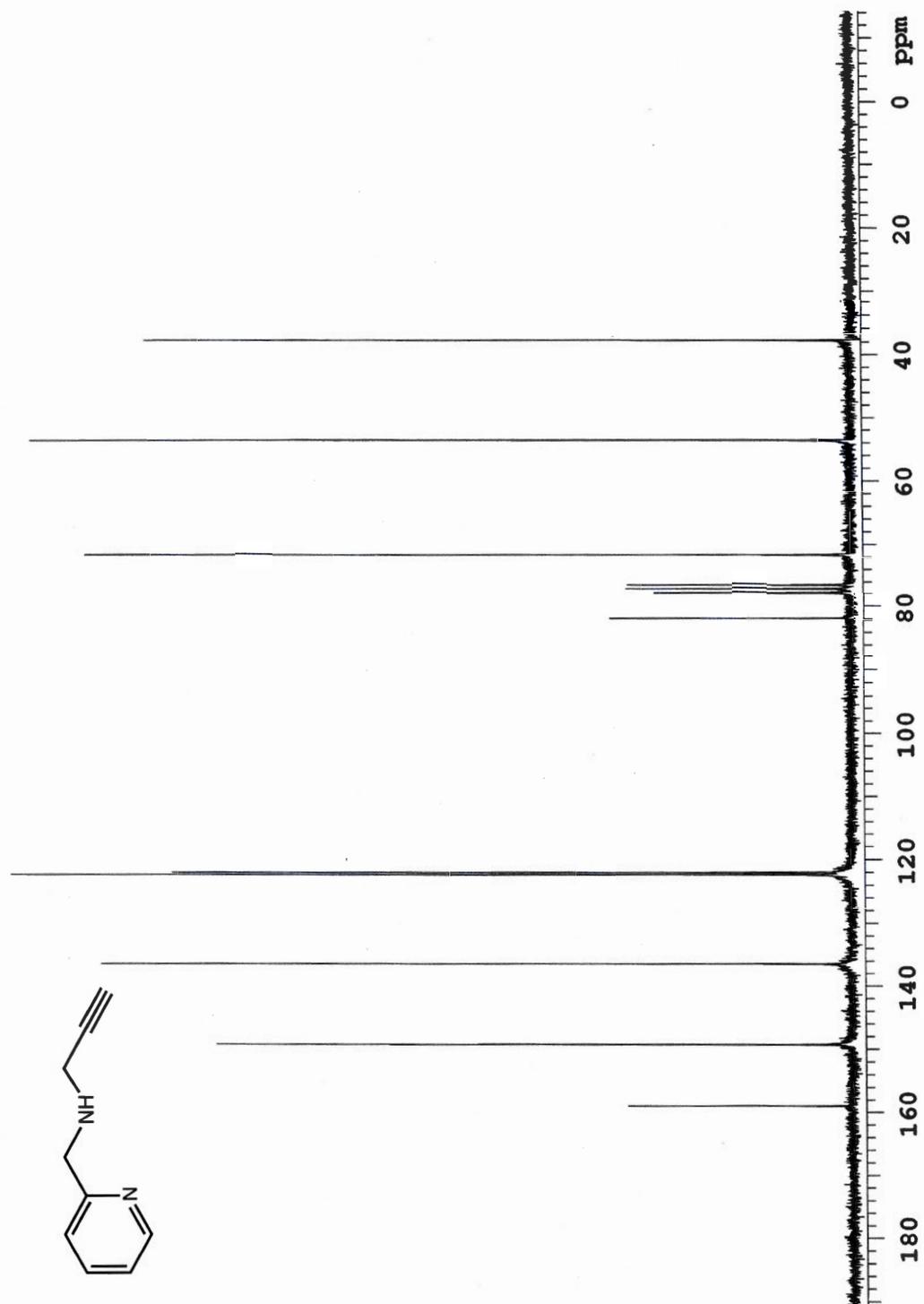
Spectre B.5 RMN ^1H du 7α -(4-chloro-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 β -ol-3-one (6)

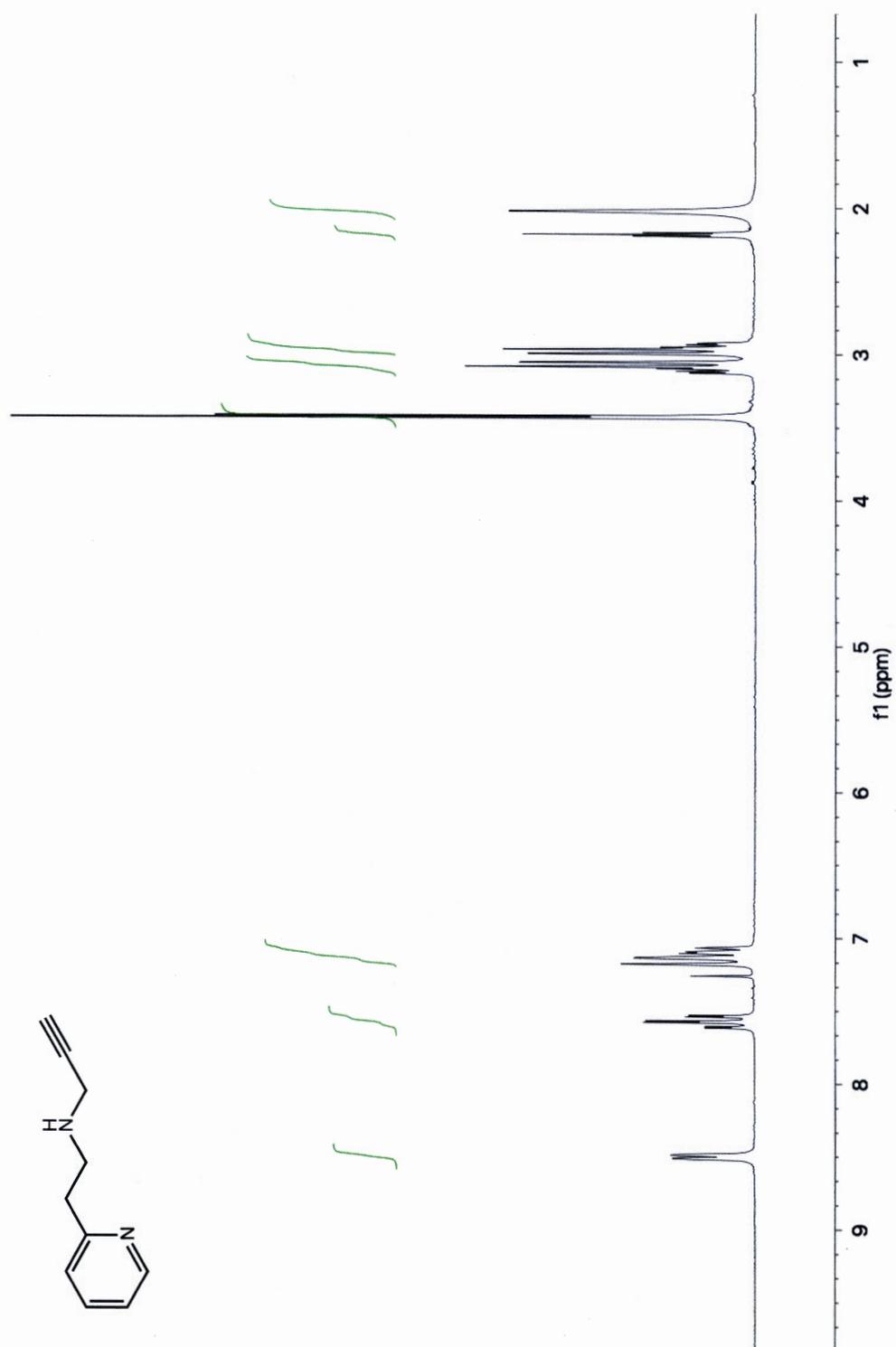
Spectre B.6 Spectre RMN ^1H du 7α -(4-méthoxy-but-2-ényl)-4-androstèn-17 β -ol-3-one (**6.1**)

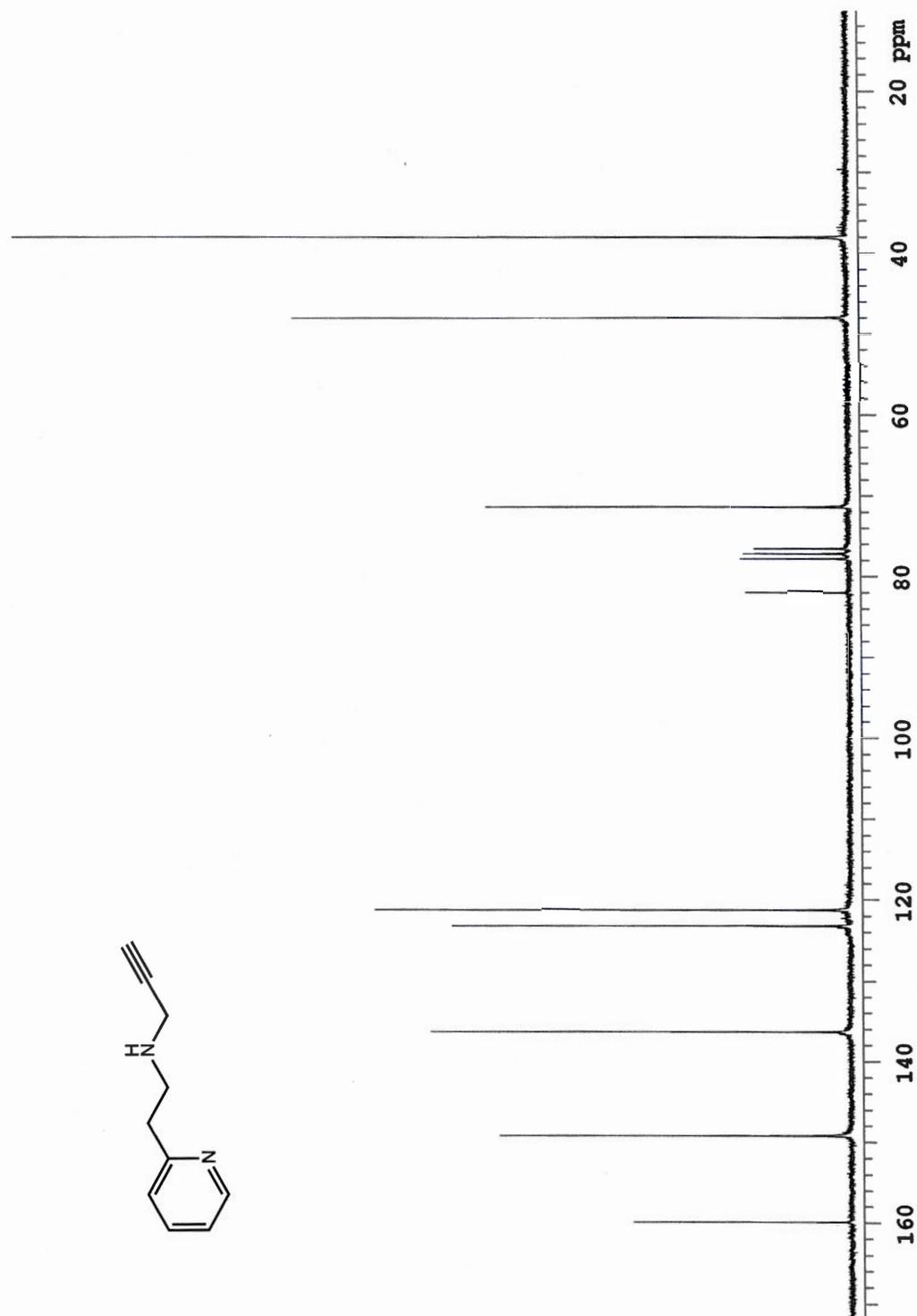
Spectre B.7 RMN ^1H du 7α -(4-azido-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 β -ol-3-one (7)

Spectre B.8 RMN ^{13}C du 7α -(4-azido-but-2-ényl)-4-androstèn-17 β -ol-3-one (7)

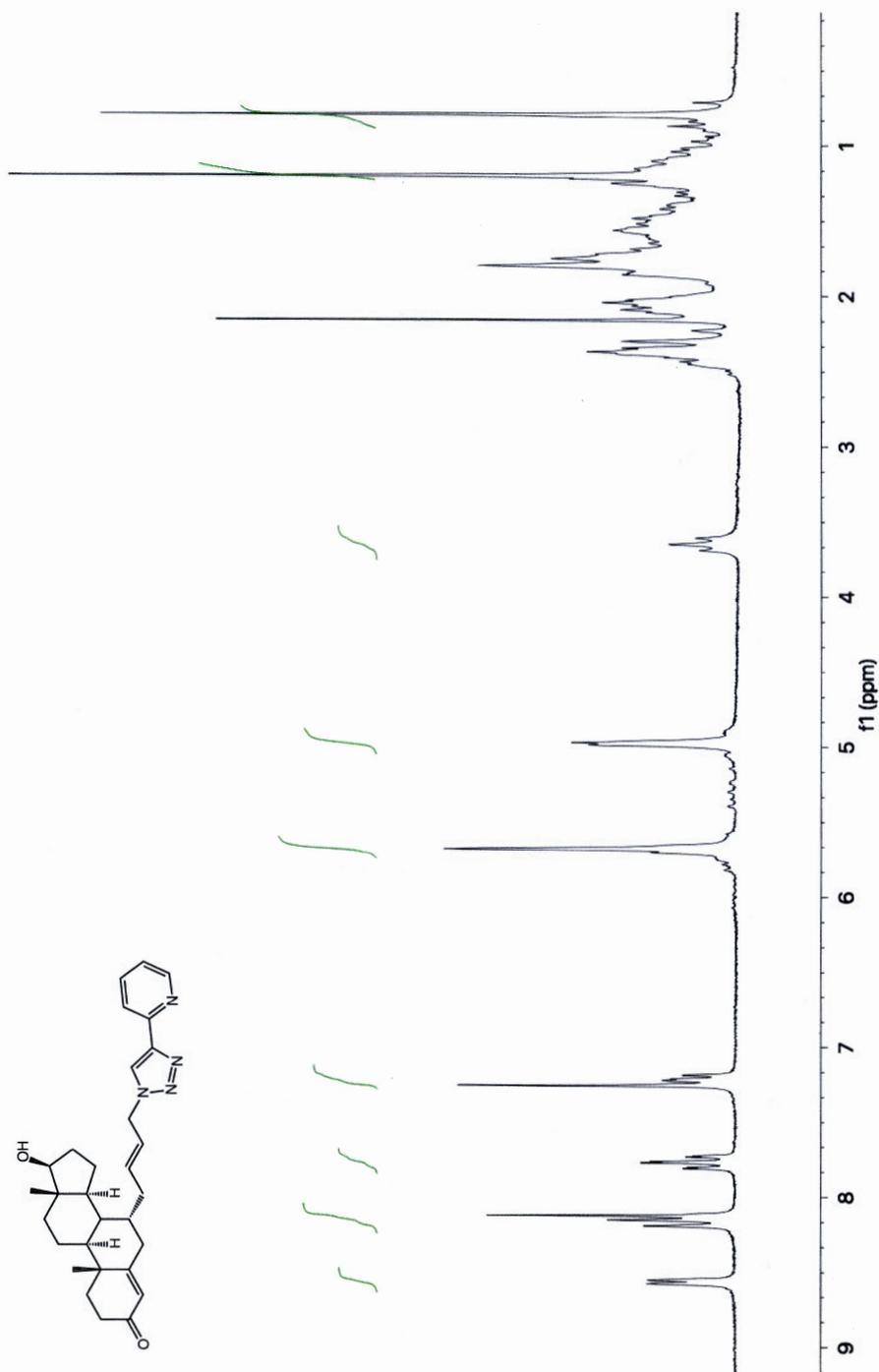
Spectre B.9 RMN ^1H du prop-2-ynyl-pyridin-2-ylméthylamine (9)

Spectre B.10 RMN ^{13}C du prop-2-ynyl-pyridin-2-ylméthylamine (9)

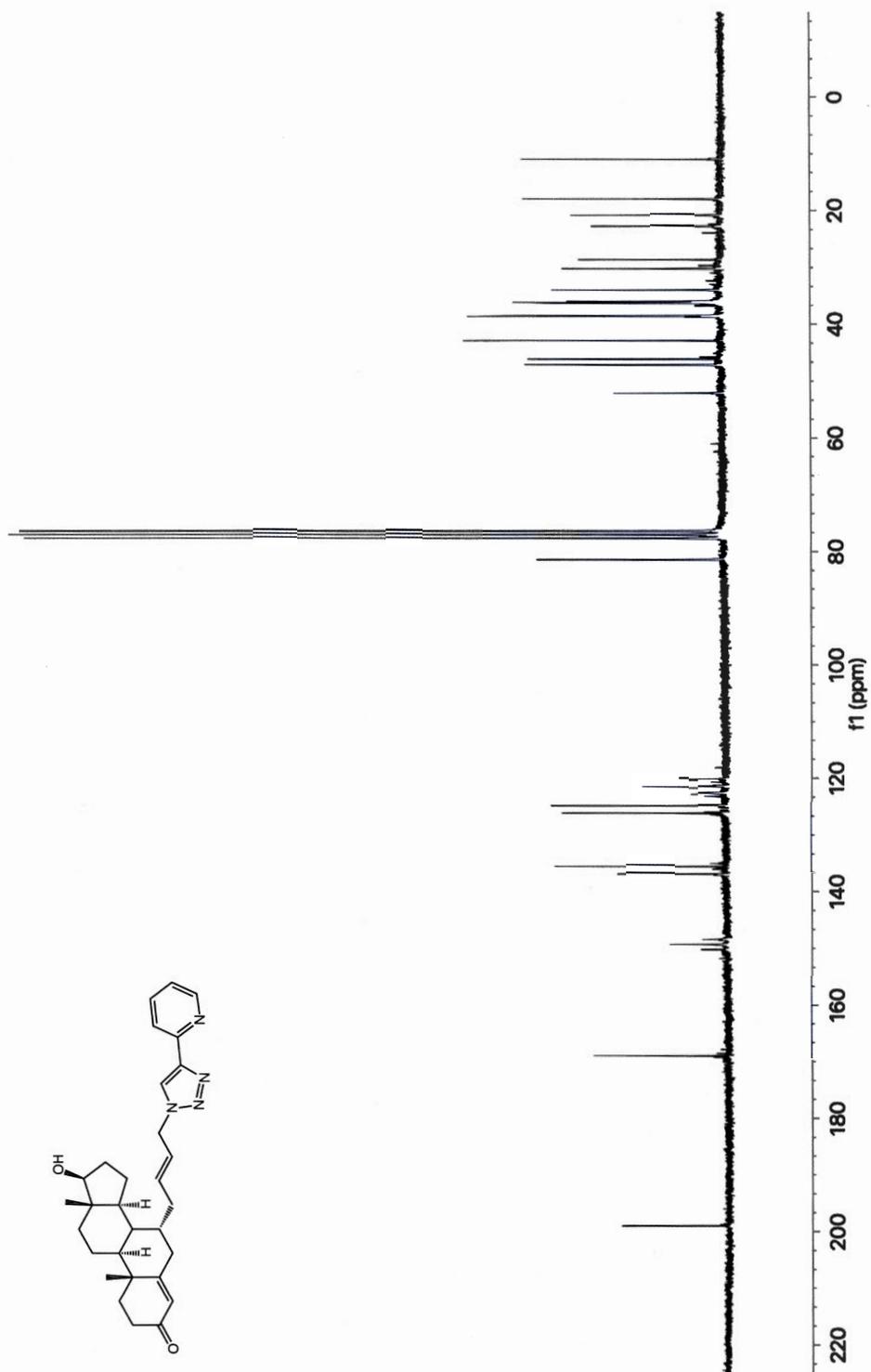
Spectre B.11 RMN ^1H du prop-2-ynyl-pyridin-2-yléthylamine (**10**)

Spectre B.12 RMN ^{13}C du prop-2-ynyl-pyridin-2-yléthylamine (10)

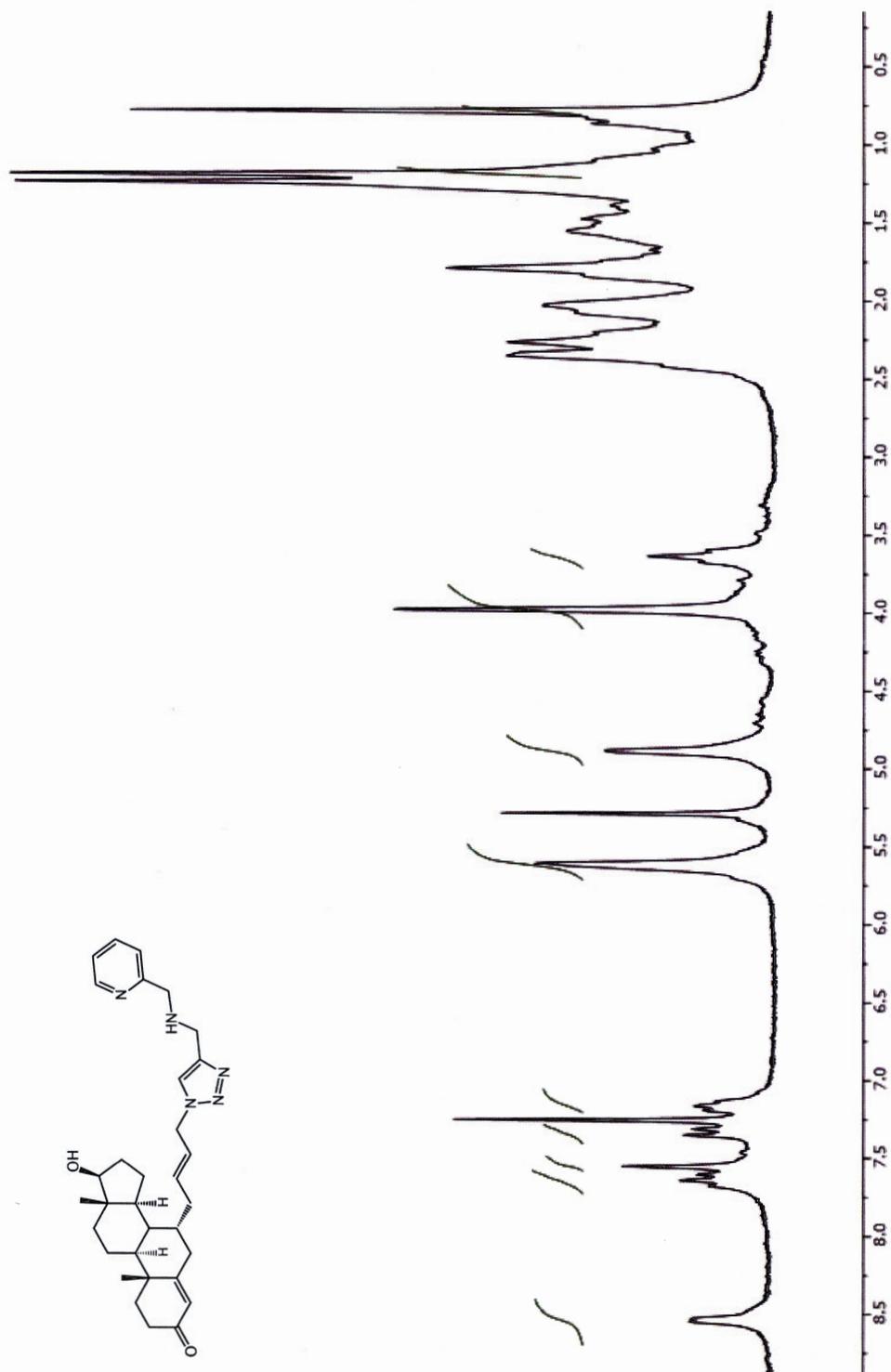
Spectre B.13 RMN ^1H du 7α -[4-(4-pyridin-2-yl-[1,2,3]triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstèn-17 β -ol-3-one (**11**)



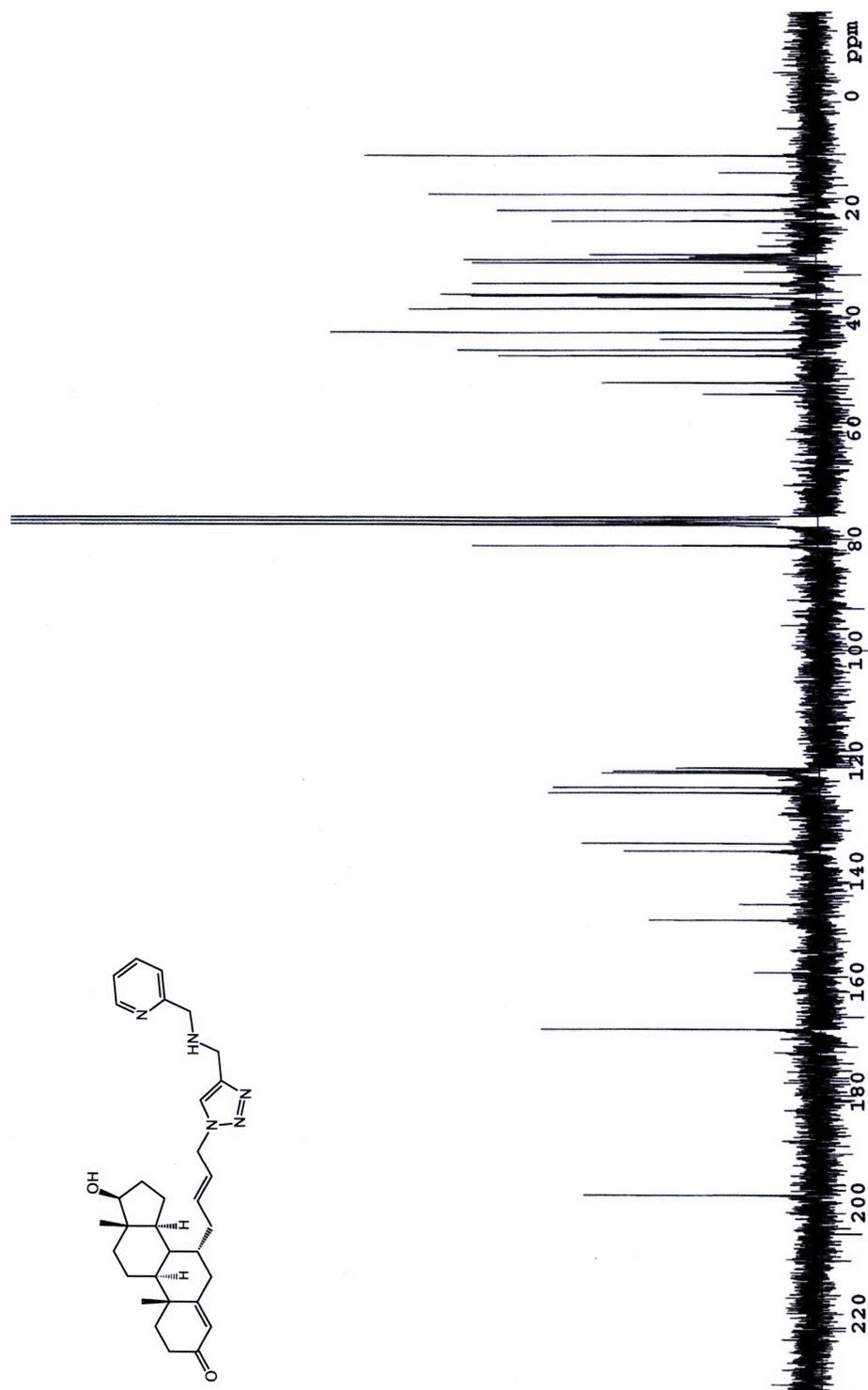
Spectre B.14 RMN ^{13}C du 7 α -[4-(4-pyridin-2-yl-[1,2,3]triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstèn-17 β -ol-3-one (**11**)



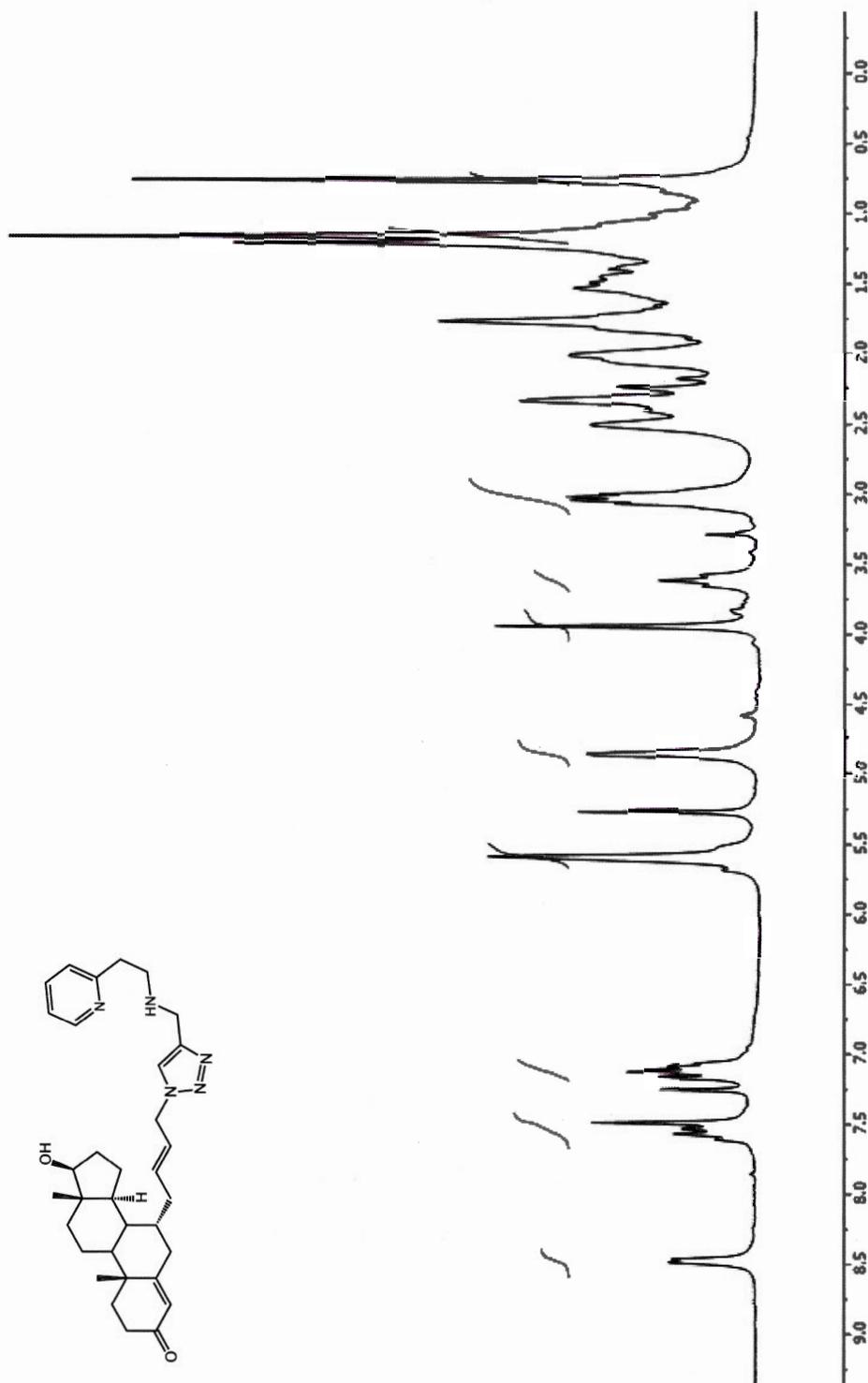
Spectre B.15 RMN ^1H du 7α -[4-(4-(((pyridin-2-ylméthyl)-amino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-èn-1-yl]-4-androstèn-17 β -ol-3-one (**12**)



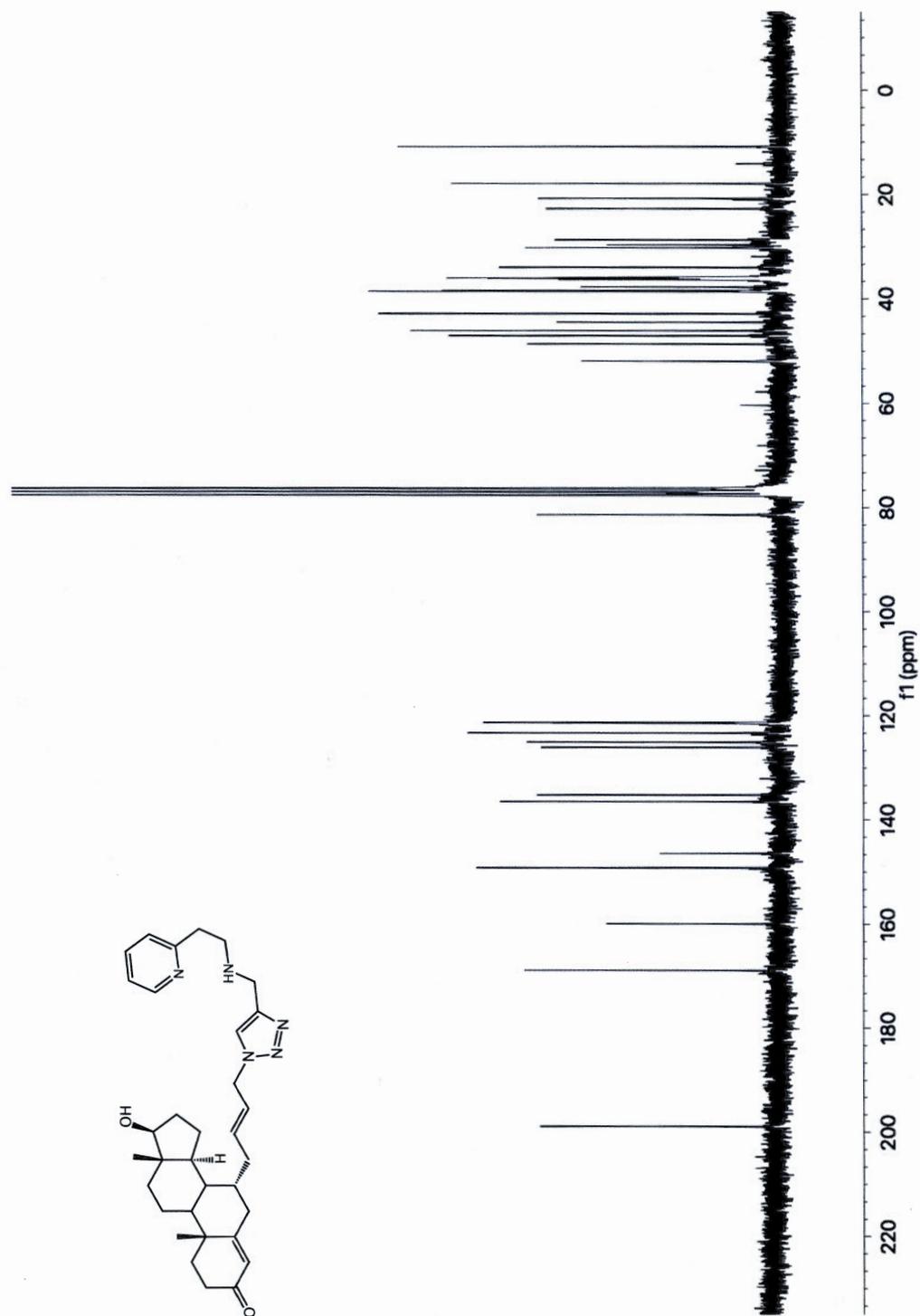
Spectre B.16 RMN ^{13}C du 7 α -[4-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)-amino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-èn-1-yl]-4-androstèn-17 β -ol-3-one (12)



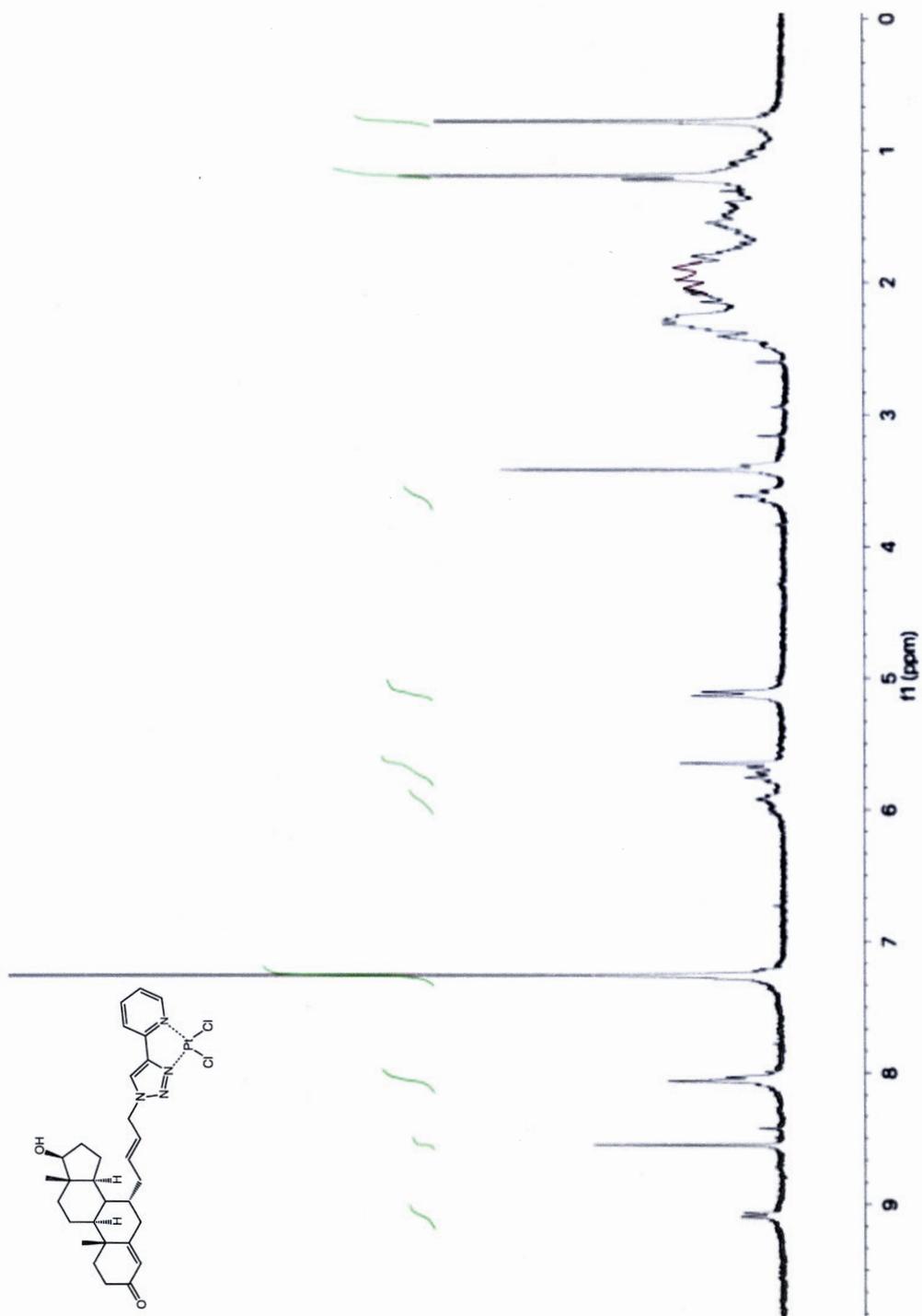
Spectre B.17 Spectre RMN ^1H du 7α -[4-(4-((2-pyridin-2-yl-éthylamino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ényl]-4-androstèn-17 β -ol-3-one (13)



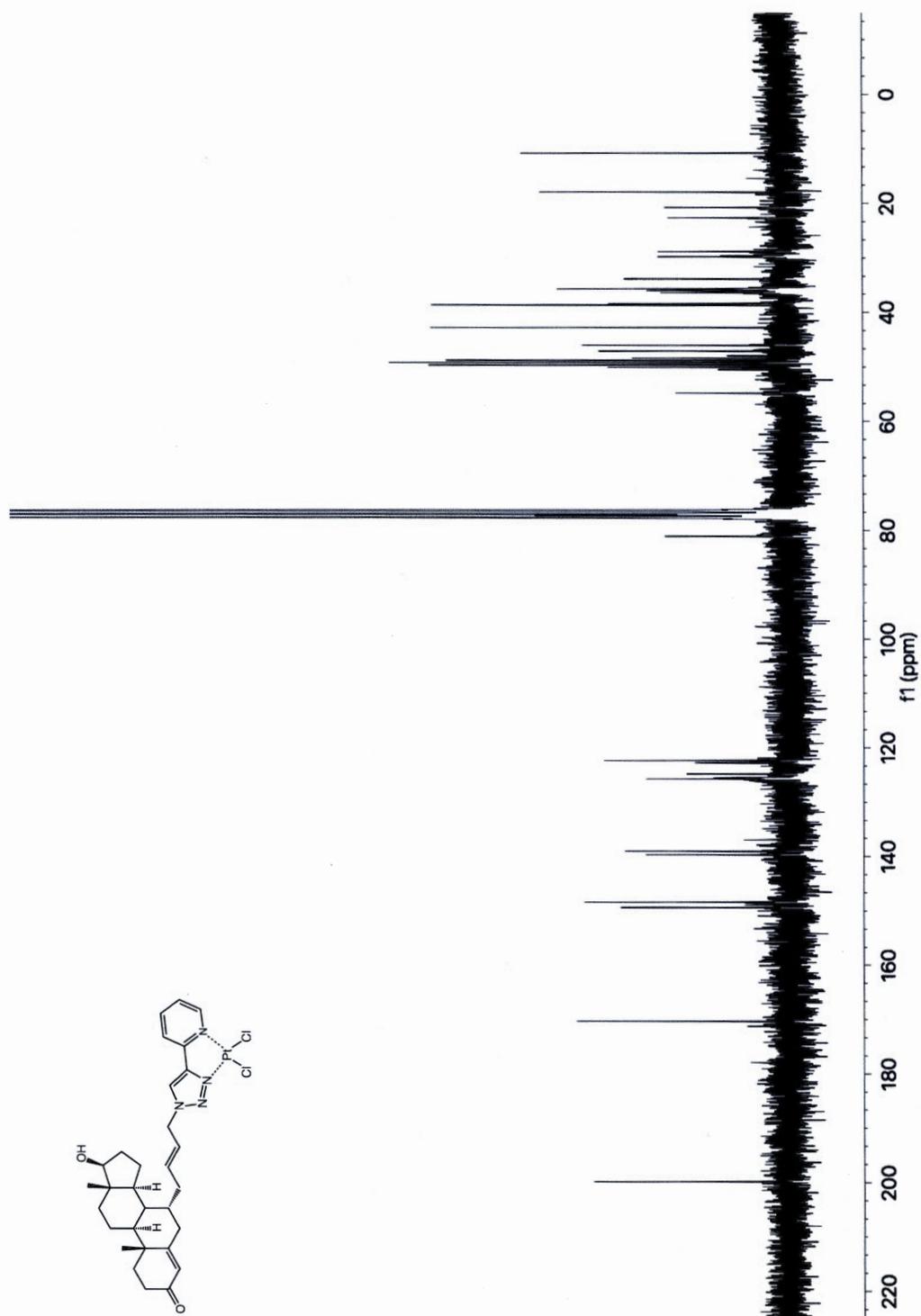
Spectre B.18 Spectre RMN ^{13}C du 7α -[4-(4-((2-pyridin-2-yl-éthylamino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ényl]-4-androstèn-17 β -ol-3-one (**13**)



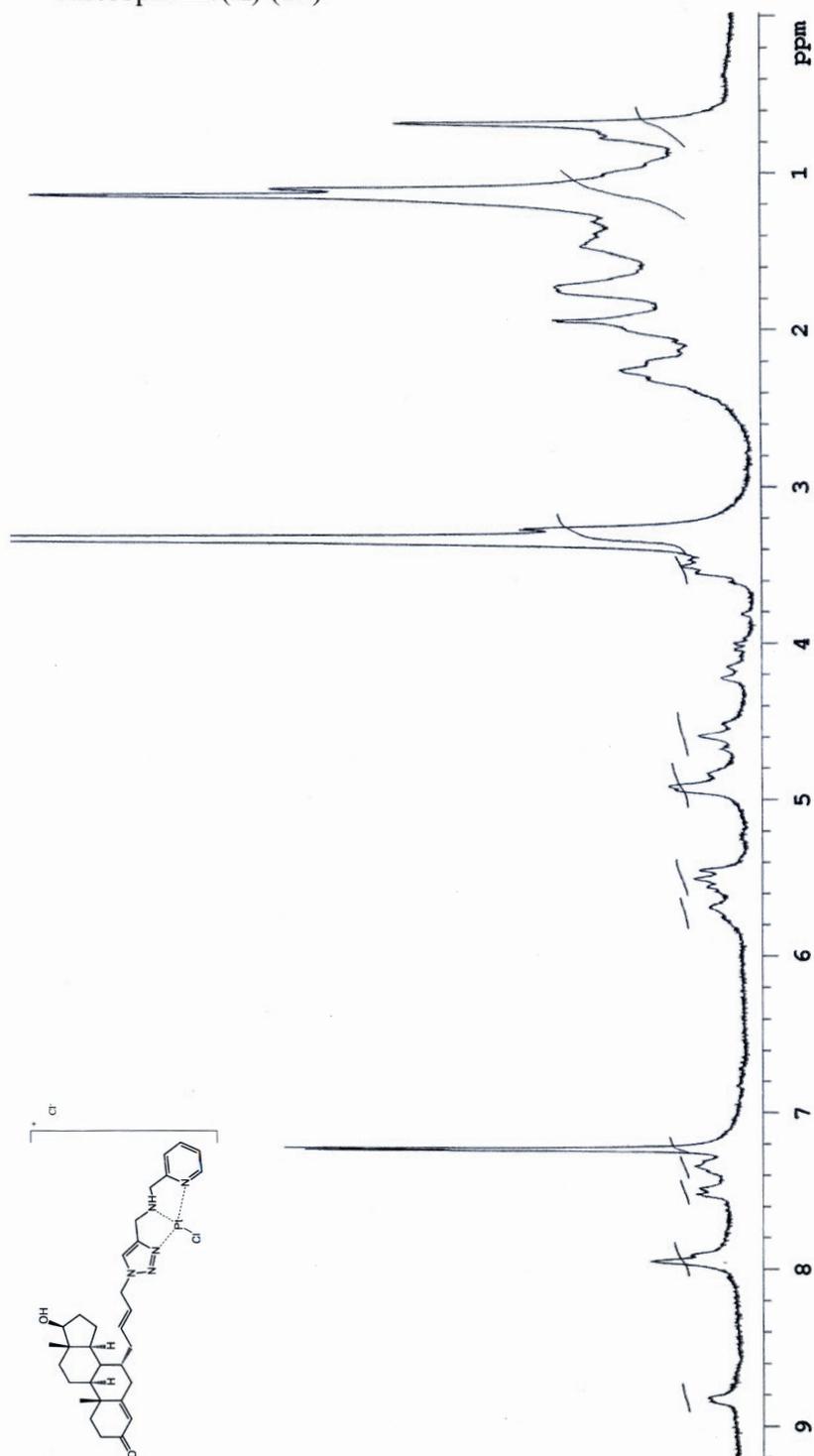
Spectre B.19 Spectre RMN ^1H du 7α -[4-(4-pyridin-2-yl-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstèn-17 β -ol-3-one dichloroplatine(II) (**14**)



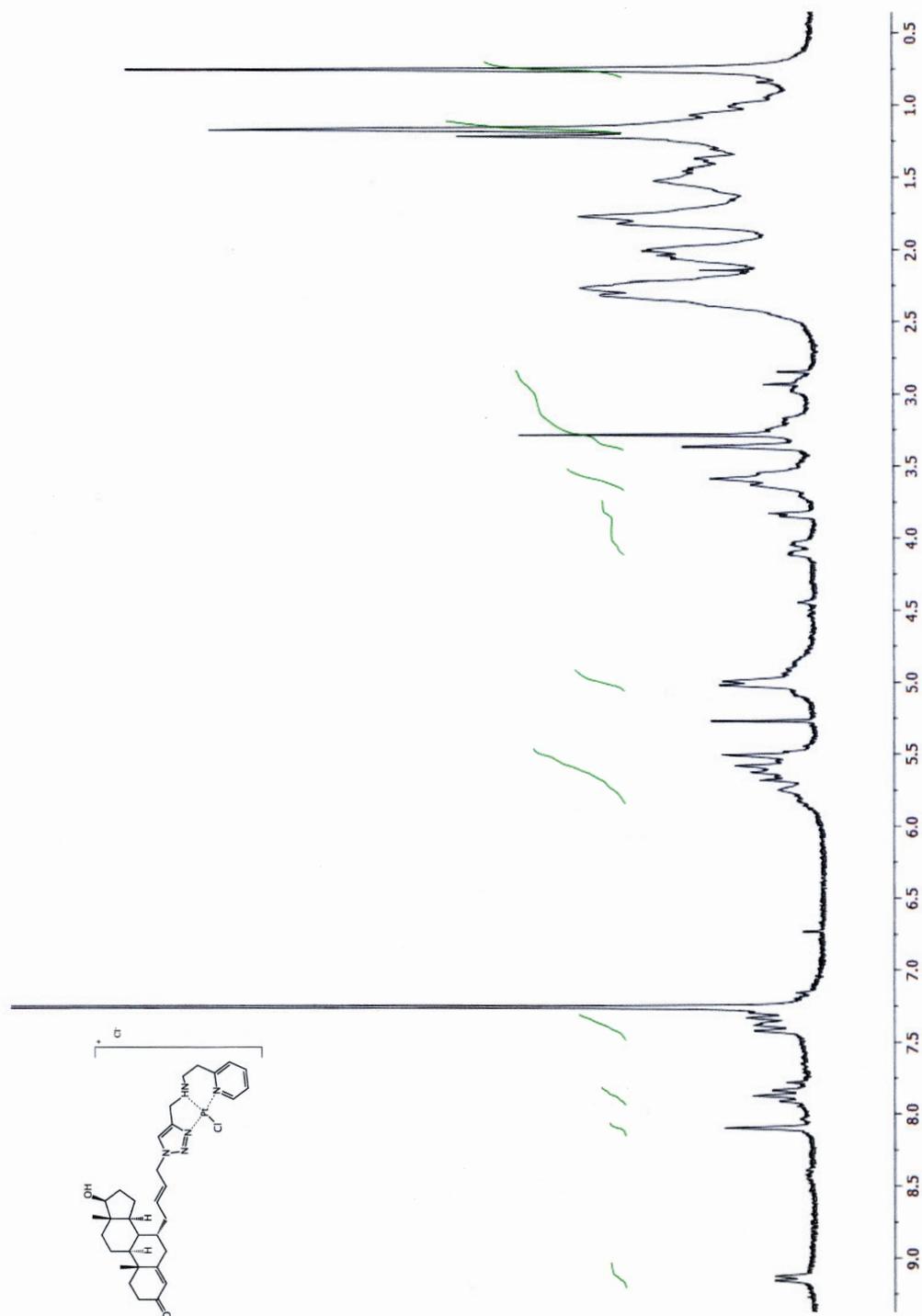
Spectre B.20 Spectre RMN ^{13}C du 7α -[4-(4-pyridin-2-yl-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ènyl]-4-androstèn-17 β -ol-3-one dichloroplatine(II) (**14**)



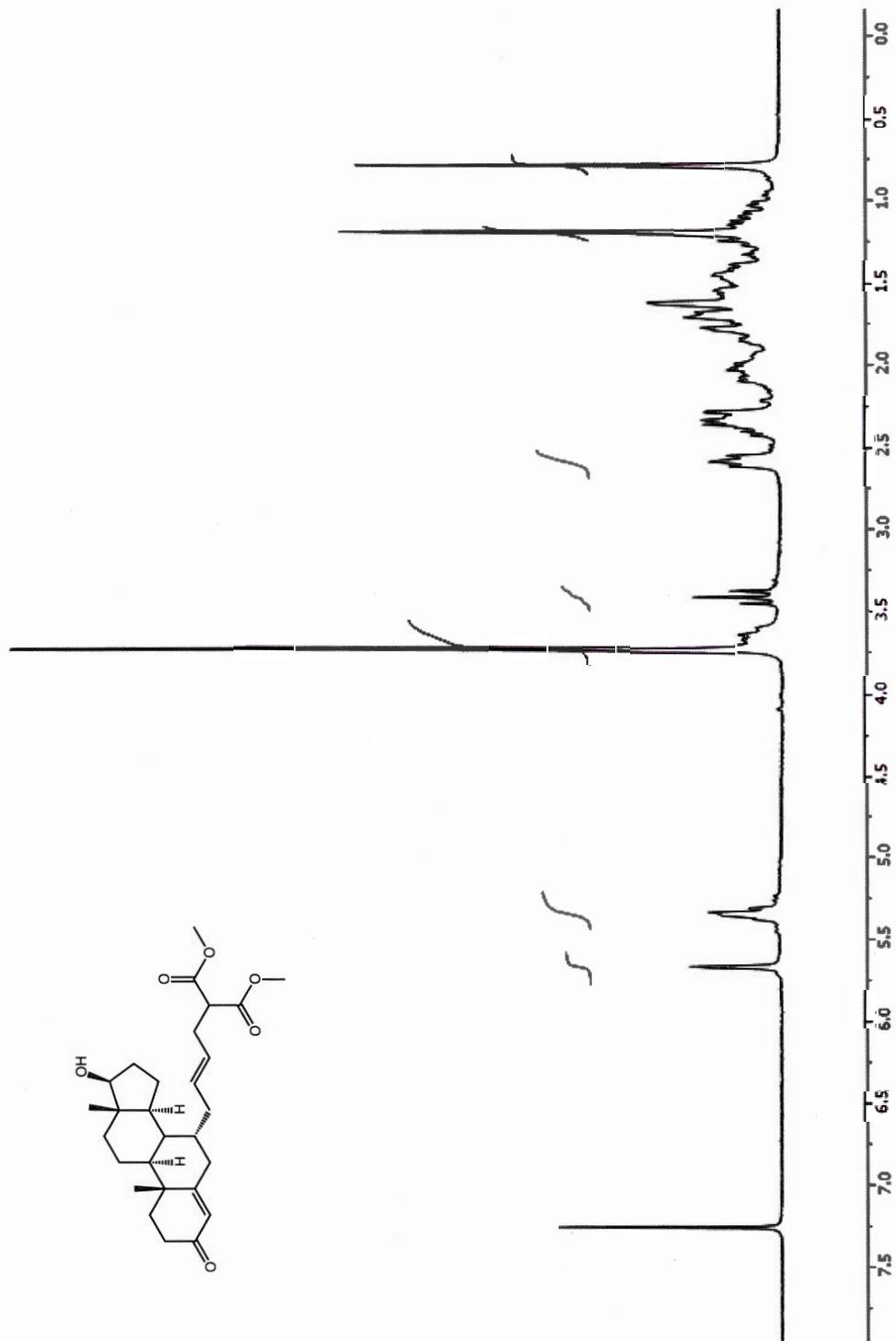
Spectre B.21 Spectre RMN ^1H du 7α -[4-(4-(((pyridin-2-ylméthyl)-amino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ène]-4-androstène-17 β -ol-3-one chloroplatine(II) (**15**)



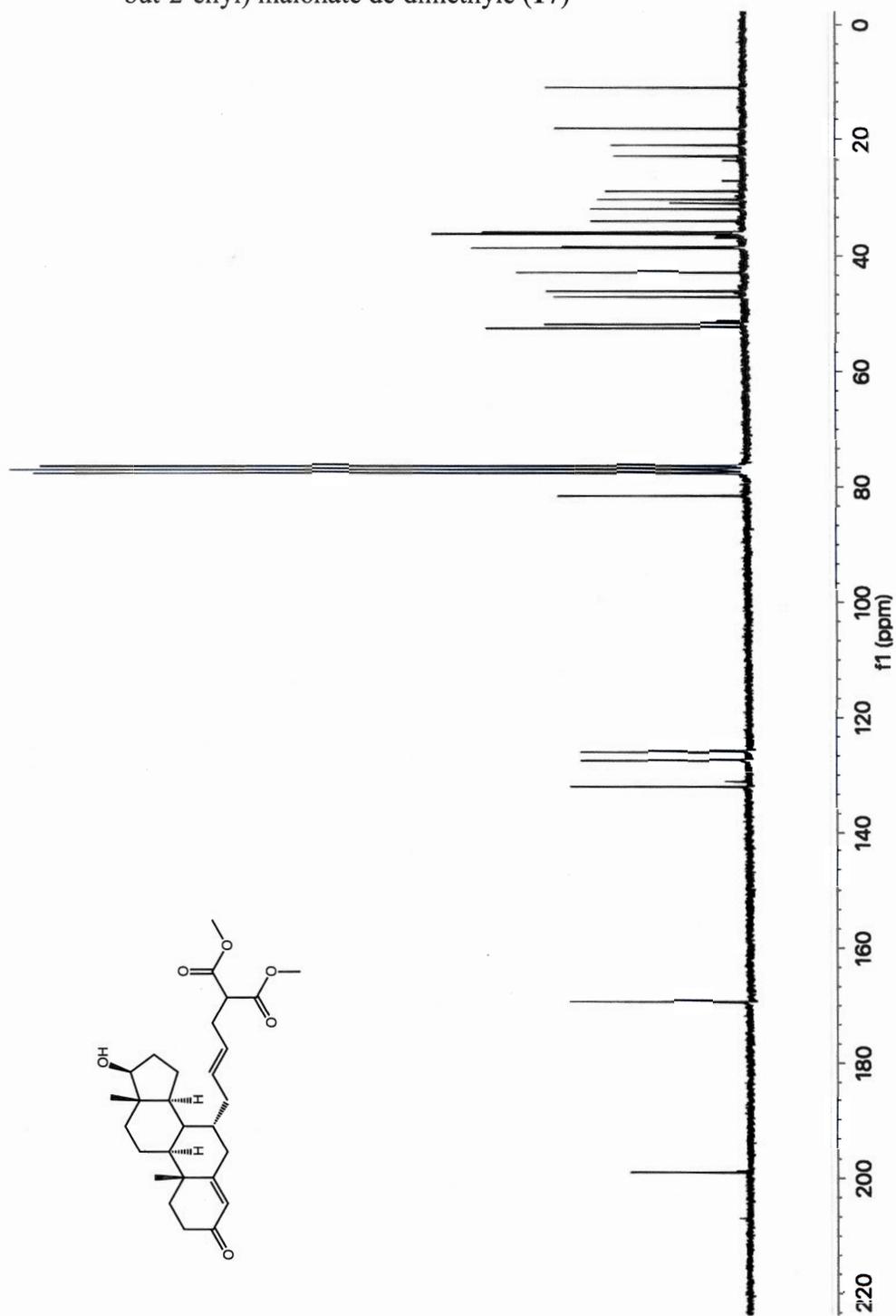
Spectre B.22 Spectre RMN ^1H du 7α -[4-(4-((2-pyridin-2-yl-éthylamino)-méthyl)-[1,2,3]-triazol-1-yl)-but-2-ène]-4-androstèn-17 β -ol-3-one chloroplatine(II) (**16**)



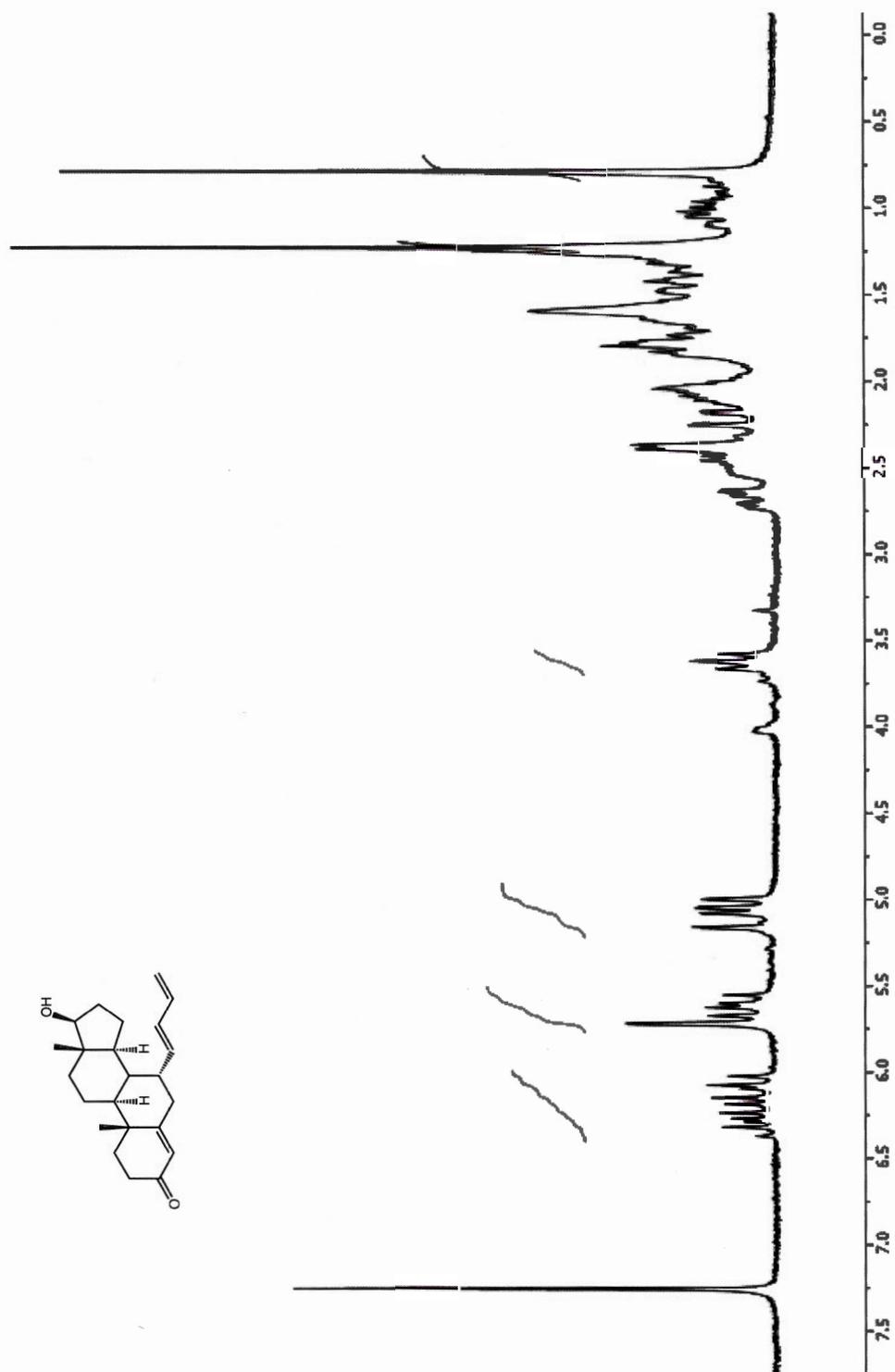
Spectre B.23 Spectre RMN ^1H de 2-(4-(17 β -hydroxy-4-androstène-3-one-7 α -yl)-but-2-ènyl) malonate de diméthyle (17)



Spectre B.24 Spectre RMN ^{13}C de 2-(4-(17 β -hydroxy-4-androstène-3-one-7 α -yl)-but-2-ènyle) malonate de diméthyle (17)



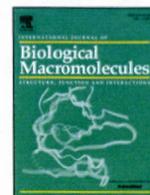
Spectre B.25 Spectre RMN ^1H du 7α -(buta-1,3-diényl)-4-androstène-17 β -ol-3-one
(18.1)



ANNEXE C

ARTICLE COMPLÉMENTAIRE 1

Cette annexe contient le premier article complémentaire à mon projet de maîtrise qui a été publié en juillet 2018 dans la revue *International Journal of Biological Macromolecules* intitulé « *Conjugation of testo and testo-Pt(II) with serum proteins: Loading efficacy and protein conformation* ». Les travaux ont été effectués en collaboration avec l'équipe du Dr Heidar-Ali Tajmir-Riahi sur les molécules **11** et **14**. L'article porte sur la conjugaison de ces deux molécules sur des protéines sériques. L'étude évalue l'efficacité de la liaison des molécules sur les protéines sériques à l'aide de différentes techniques spectroscopiques.



Conjugation of testo and testo-Pt(II) with serum proteins: Loading efficacy and protein conformation

P. Chanphai, V. Ouellette, G. Bérubé*, H.A. Tajmir-Riahi*

Department of Chemistry, Biochemistry and Physics, University of Québec at Trois-Rivières, C. P. 500, Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 June 2018

Received in revised form 26 June 2018

Accepted 29 June 2018

Available online 02 July 2018

Keywords:

testo
testo-Pt(II)
Serum protein
Delivery
Loading efficacy
Thermodynamic
Modeling

ABSTRACT

The potential application of hybrid anticancer molecules requires further investigation. There is a great interest in developing new site-specific anticancer agents able to efficiently destroy cancer cells with minimal toxic side effects. Serum proteins are known to play an important role as drug delivery system with important clinical applications. Hence, the conjugation of testo and testo-Pt(II) (two semi-synthetic testosterone derivatives) with human serum albumin (HSA), bovine serum albumin (BSA) and beta-lactoglobulin (β -LG) was investigated in aqueous solution at physiological pH. Multiple spectroscopic methods, thermodynamic analysis and modeling were used to determine the binding efficacy of these bioactive compounds to serum proteins. Drug-protein conjugation occurred via ionic contacts. BSA forms more stable conjugates than HSA and β -LG with the order of stability testo > testo-Pt(II). Major alterations of protein secondary structures were observed upon drug complexation. Serum proteins can be used to deliver these bioactive materials in vitro.

© 2018 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The development of hybrid anticancer molecules is gaining momentum world-wide. The prospect of discovering drugs with multiple biological properties in a single meticulously crafted molecule might hold the promise of better treatments with reduced toxic side effects for patient afflicted with cancer and other diseases. Several recent literature reviews show the magnitude of research in this field [1–14]. We have developed a testosterone nitrogen mustard hybrid as well as several testosterone platinum(II) hybrids with promising biological properties [15,16]. They are designed to target the androgen receptor in hormone-dependent prostate cancer. In both type of hybrids, the testosterone component was linked to the cytotoxic moiety by an ester function. Despite the fact that some of the testosterone-Pt(II) were quite potent on a variety of cancer cell lines, it was clear that an ester function could be hydrolysed by esterase in vivo. Hence to avoid hydrolysis, we designed testosterone-Pt(II) with a stronger tether chain incorporating a 1,2,3-triazole ring system; testo and testo-Pt(II) in order to examine the biological potential of such hybrid molecules (Scheme 1). Since these molecules are also likely to interact with key serum proteins, it

is relevant to investigate their bimolecular interactions with HSA, BSA and β -LG giving additional insights with the potential transport of these hybrids in the blood.

Serum proteins contain multiple binding sites with different affinity and can transport drugs, fatty acids, steroid hormones and many other bioactive materials [17–20]. Serum albumins are emerging as versatile protein carriers for drug targeting systems and for improving the pharmacokinetic profile of peptide or protein-based drugs [21–23]. In order to evaluate the potential application of serum proteins in delivery of testo and testo-Pt, it was of interest to compare the loading efficacy of these bioactive compounds to serum proteins in aqueous solution. Recent studies showed encapsulation of testosterone and its dimeric derivatives by serum proteins [24,25]. Carrier proteins such as HSA, BSA and β -LG, show different hydrophobicity [26,27] and exhibit different affinity towards drug interactions.

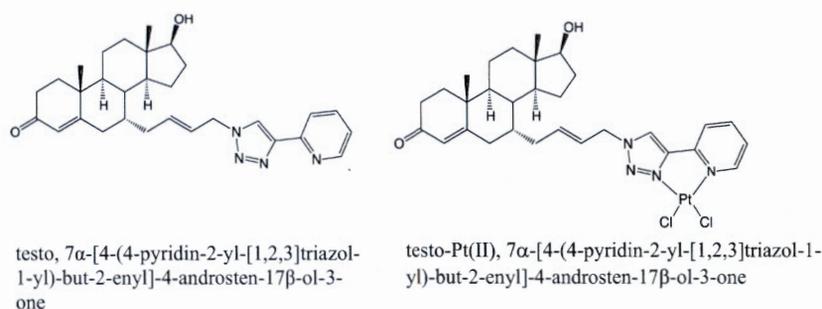
Common methods used to investigate the binding of small ions or molecules to albumin proteins are UV-visible [28,29], fluorescence [30,31], synchronous fluorescence [32], FTIR [33] and circular dichroism (CD) [34] spectroscopy, as well as equilibrium dialysis [35] and potentiometry [36,37]. Among these methods, equilibrium dialysis is used widely; but it requires the analysis of free and total drug concentration and takes a long time. In the potentiometric method, ion selective electrodes are used. Unfortunately, these electrodes are nonselective in case of many ligands, such as e.g. drug molecules [36, 37].

We report the loading efficacy of testo and testo-Pt (Scheme 1) with human and bovine serum albumins as well as milk β -lactoglobulin,

Abbreviations: HSA, human serum albumin; BSA, bovine serum albumin; β -LG, beta-lactoglobulin; testo, 7 α -[4-(4-pyridin-2-yl)-[1,2,3]triazol-1-yl]-but-2-enyl]-4-androsten-17 β -ol-3-one; testo-Pt(II), 7 α -[4-(4-pyridin-2-yl)-[1,2,3]triazol-1-yl]-but-2-enyl]-4-androsten-17 β -ol-3-one dichloroplatinum(II); FTIR, Fourier transform infrared.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: Gervais.Berube@uqtr.ca (G. Bérubé), tajmirri@uqtr.ca (H.A. Tajmir-Riahi).



Scheme 1. Chemical structure and name of testo and testo-Pt(II).

using multiple spectroscopic methods, thermodynamic analysis and molecular modeling. This study provides useful information for the application of serum proteins in delivery of testo and its platinum drug in vitro.

2. Experimental

2.1. Materials

HSA, BSA fraction V and β -lactoglobulin (A variant, purity >90) were purchased from Sigma Chemical Company (St-Louis, MO) and used as supplied. Testo or 7 β -[4-(4-pyridin-2-yl-[1,2,3]triazol-1-yl)-but-2-enyl]-4-androsten-17 α -ol-3-one and testo-Pt(II) or 7 α -[4-(4-pyridin-2-yl-[1,2,3]triazol-1-yl)-but-2-enyl]-4-androsten-17 β -ol-3-one dichloroplatinum(II) (Scheme 1) were synthesized in our laboratory

using testosterone (purchased from Steraloids Inc.) as the starting material. The novel semi-synthetic testosterone derivatives were characterized by IR, proton and carbon NMR spectroscopy. The spectral data were in complete agreement with the compounds made for this study and will be published elsewhere. Other chemicals were of reagent grade and used without further purification.

2.2. Preparation of testo- and testo-Pt-protein complexes

Appropriate amounts of protein (BSA, HSA or β -LG) were dissolved in aqueous solution (125 μ M) containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.2). BSA and HSA concentrations were determined spectrophotometrically using the extinction coefficient of 36,500 $M^{-1} cm^{-1}$ at 280 nm [38]. β -LG concentration was determined spectrophotometrically using the extinction coefficient of 17,600 $M^{-1} cm^{-1}$ at 280 nm [39]. Testo and

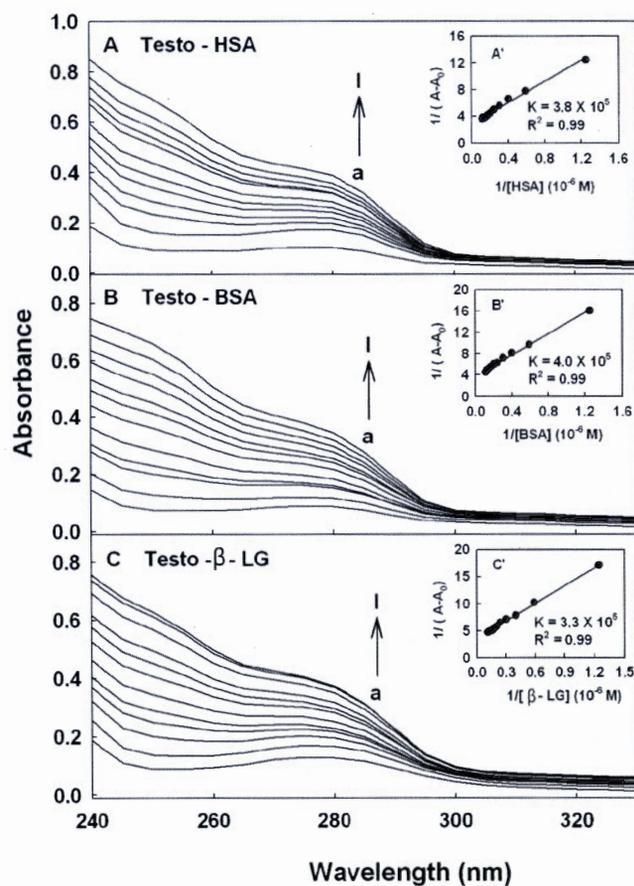


Fig. 1. UV-visible spectra of testo and their conjugates with HSA (A), BSA (B) and β -LG (C) at 50 μ M (a) and its testo conjugates (b-i) for testo at 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 μ M; Inset: plot of $1/(A-A_0)$ vs $(1/\text{testo concentration})$ and binding constants (K) for drug-protein conjugates.

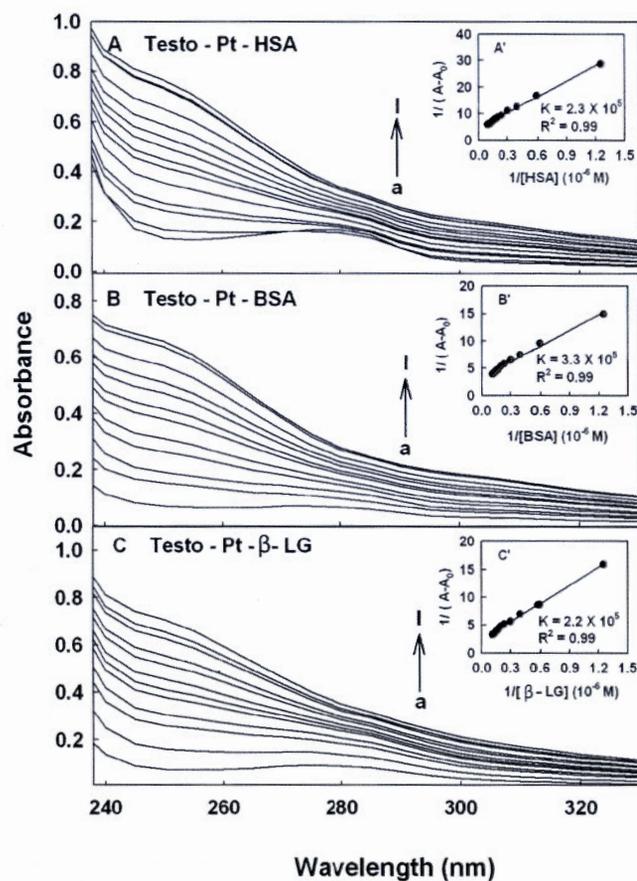


Fig. 2. UV-visible spectra of testo-Pt and their conjugates with HSA (A), BSA (B) and β -LG (C) at 50 μ M (a) and its testo-Pt conjugates (b-i) for testo at 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 μ M; Inset: plot of $1/(A-A_0)$ vs $(1/\text{testo-Pt concentration})$ and binding constants (K) for drug-protein conjugates.

Table 1

Variations of the binding constants for HSA, BSA and β -LG with testo and testo-Pt at different temperatures.

Complexes	Temperature (K)	Binding constant K (mol/L) ⁻¹
testo - HSA	298.15	$3.75 (\pm 0.9) \times 10^5$
	308.15	$2.42 (\pm 0.5) \times 10^5$
	318.15	$1.84 (\pm 0.4) \times 10^5$
testo - BSA	298.15	$3.95 (\pm 0.8) \times 10^5$
	308.15	$3.20 (\pm 0.5) \times 10^5$
	318.15	$2.46 (\pm 0.4) \times 10^5$
testo - β - LG	298.15	$3.28 (\pm 0.6) \times 10^5$
	308.15	$2.84 (\pm 0.4) \times 10^5$
	318.15	$2.49 (\pm 0.3) \times 10^5$
testo - Pt - HSA	298.15	$2.26 (\pm 0.5) \times 10^5$
	308.15	$1.76 (\pm 0.4) \times 10^5$
	318.15	$1.47 (\pm 0.3) \times 10^5$
testo - Pt - BSA	298.15	$3.34 (\pm 0.8) \times 10^5$
	308.15	$2.79 (\pm 0.5) \times 10^5$
	318.15	$2.21 (\pm 0.4) \times 10^5$
testo - Pt - β - LG	298.15	$2.15 (\pm 0.6) \times 10^5$
	308.15	$1.99 (\pm 0.5) \times 10^5$
	318.15	$1.84 (\pm 0.3) \times 10^5$

testo-Pt (200 μ M) were dissolved in methanol/H₂O (50/50%) and then diluted by serial dilution to different concentrations in Tris-HCl (pH 7.2). These solutions were swiftly used after their preparation in order to avoid any potential degradation.

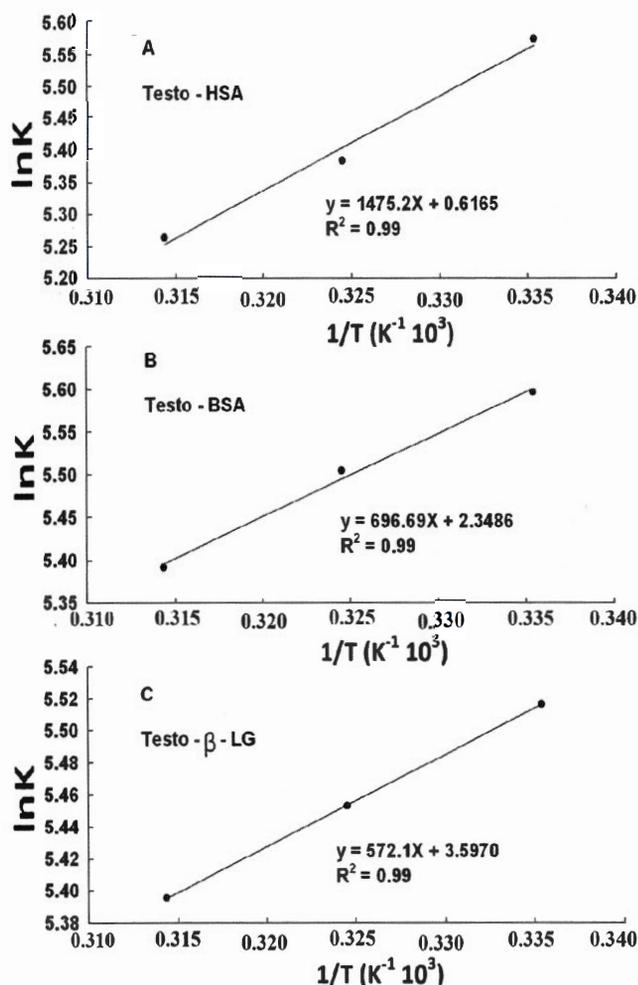


Fig. 3. lnK vs 1/T for testo with HSA (A), BSA (B) and β -LG (C) conjugates.

2.3. UV-visible spectroscopy

The UV-Vis spectra were recorded on a Cary 60 UV-Visible spectrophotometer with a slit of 2 nm and scan speed of 400 nm min⁻¹. Quartz cuvettes of 1 cm were used. The absorbance measurements were performed at pH 7.2 by keeping the concentration of protein constant (60 μ M), while increasing drug concentrations (1 μ M to 60 μ M). The binding constants of drug-protein complexes were obtained as reported [40].

2.4. FTIR spectroscopy

Infrared spectra were recorded on a FTIR spectrometer (Impact 420 model), equipped with deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector and KBr beam splitter, using AgBr windows. Solution of drug was added dropwise to the protein solution with constant stirring to ensure the formation of homogeneous solution and to reach the target drug concentrations of 15, 30 and 60 μ M with a final protein concentration of 60 μ M. Interferograms were accumulated over the spectral range 4000–600 cm⁻¹ with a nominal resolution of 2 cm⁻¹ and 100 scans. The difference spectra [(protein solution + drug solution) – (protein solution)] were generated using water combination mode around 2300 cm⁻¹, as standard [41]. When producing difference spectra, this band was adjusted to the baseline level, in order to normalize difference spectra. Analysis of the secondary structures of HSA and BSA and their polyphenol complexes were carried out as reported [42, 43]. The curve-fitting analysis was performed using the GRAMS/AI Version 7.01 software of the Galactic Industries Corporation.

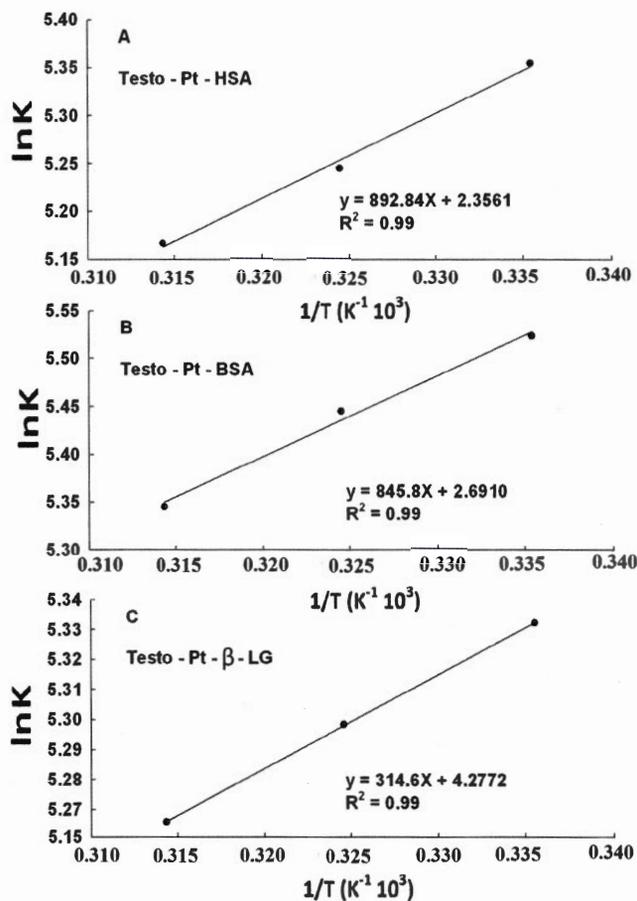


Fig. 4. lnK vs 1/T for testo-Pt with HSA (A), BSA (B) and β -LG (C) conjugates.

Table 2Thermodynamic parameters calculated for HSA, BSA and β -LG conjugates with testo and testo-Pt.

Complexes	Thermodynamic parameters			
	ΔH^0 (kJ. mol ⁻¹ \pm 2)	ΔS^0 (J. mol ⁻¹ . K ⁻¹ \pm 1)	$T\Delta S^0$ (kJ. mol ⁻¹ \pm 1)	ΔG^0 (kJ. mol ⁻¹ \pm 2)
testo - HSA	-12.26	5.13	1.53	-13.79 (298.15 K)
			1.58	-13.84 (308.15 K)
testo - BSA	-5.79	19.53	1.63	-13.90 (318.15 K)
			5.82	-11.61 (298.15 K)
testo - β -LG	-4.76	29.91	6.02	-11.81 (308.15 K)
			6.21	-12.00 (318.15 K)
testo - Pt - HSA	-7.42	19.59	8.92	-13.67 (298.15 K)
			9.22	-13.97 (308.15 K)
testo - Pt - BSA	-7.03	22.37	9.51	-14.27 (318.15 K)
			5.84	-13.26 (298.15 K)
testo - Pt - β -LG	-2.62	35.56	6.04	-13.46 (308.15 K)
			6.23	-13.66 (318.15 K)
			6.67	-13.70 (298.15 K)
			6.89	-13.93 (308.15 K)
			7.12	-14.15 (318.15 K)
			10.60	-13.22 (298.15 K)
			10.96	-13.57 (308.15 K)
			11.31	-13.93 (318.15 K)

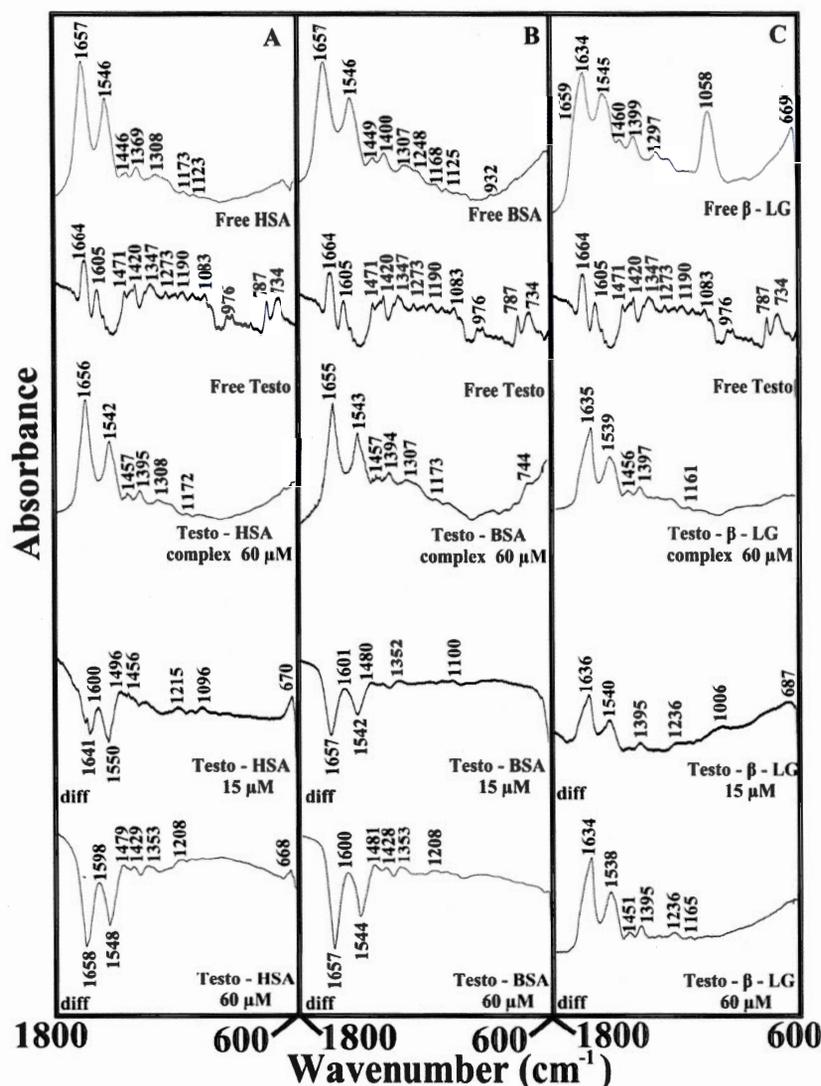


Fig. 5. FTIR spectra in the region of 1800–600 cm⁻¹ of hydrated films (pH 7.2) for free HSA for (A), BSA (B) β -LG (C) with testo (60 μ M) and the difference spectra (diff.) of drug-protein conjugates (bottom two curves) obtained at different drug concentrations (indicated in the figure).

2.5. Molecular modeling

The structure of free HSA (PDB id:1A06, chain A) obtained by X-ray crystallography was used as a template [44]. The structure of BSA was predicted by automated homology modeling using SWISS-MODEL Workspace from the amino acid sequence NP-851335 [45–47]. The β -LG structure was obtained from literature report [48]. The docking studies were performed with ArgusLab 4.0.1 software (Mark A. Thompson, Planaria Software LLC, Seattle, WA, <http://www.arguslab.com>). Three dimensional structure of testo were generated from PM3 semi-empirical calculations, using Chem3D Ultra 6.0.

3. Results and discussion

3.1. Stability of testo- and testo-Pt-protein conjugates by UV spectroscopy

The testo and testo-Pt conjugation with serum proteins causes major changes in the absorption spectra of protein and this can be used to calculate the drug-protein binding constants. The UV spectra of drugs with HSA, BSA and β -LG complexes are presented in Figs. 1 and 2. Drug conjugation with protein occurred with an increase in the intensity of protein band at 280 nm.

The drug-protein binding constants were calculated as described in materials and methods [40], using plots of $1/(A-A_0)$ vs $(1/\text{drug concentrations})$ (Figs. 1 and 2), where A_0 is the initial absorbance of the free protein at 280 nm and A is the recorded absorbance of complexes at different drug concentrations. The double reciprocal plot is linear and gives the overall binding constants (Figs. 1, 2 and Table 1). The results showed that strong drug-protein interaction was observed with the order of stability drug-BSA > drug-HSA > drug- β -LG with testo forming stronger conjugates than testo-Pt (Figs. 1, 2 and Table 1). Evidence regarding hydrophobic, hydrophilic or H-bonding contacts comes from the thermodynamic analysis of drug-protein complexes discussed below.

3.2. Thermodynamic parameters of drug-protein conjugates

The interactions between testo and testo-Pt with serum proteins were characterized by thermodynamic parameters. Based on the data of ΔH^0 and ΔS^0 , the drug-protein interaction can be elucidated [49, 50]. The thermodynamic parameters for the interaction of drug and protein complexes at 298.15, 308.15 and 318.15 K are presented in Figs. 3, 4 and Table 2. The negative sign of ΔG^0 shows that the binding process between drug and protein is spontaneous. Furthermore, all the drug-protein complexes have negative ΔH^0 , which means the complex formation between protein and drug is an exothermic reaction. The

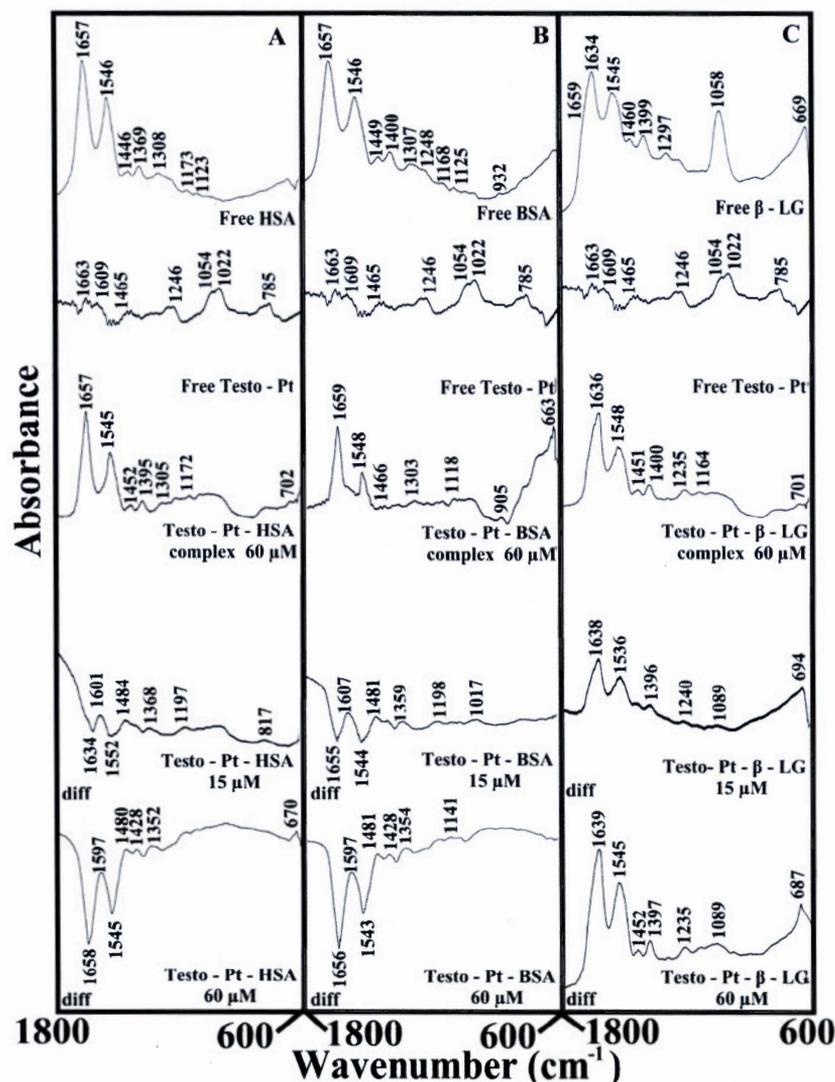


Fig. 6. FTIR spectra in the region of 1800–600 cm⁻¹ of hydrated films (pH 7.2) for free HSA for (A), BSA (B) β -LG (C) with testo-Pt (60 μ M) and the difference spectra (diff.) of drug-protein conjugates (bottom two curves) obtained at different drug concentrations (indicated on the figure).

Table 3Changes in protein secondary structure contents (infrared) of the free HSA, BSA and β -LG with their testo and testo-Pt conjugates in hydrated film at pH 7.2.

Sample	Amide I (cm^{-1}) components				
	α -helix % (± 2) 1654–1600	β -helix % (± 1) 1614–1637	Random coil % (± 1) 1638–1648	Turn % (± 2) 1670–1678	β -Antiparallel % (± 1) 1680–1691
Free HSA (60 μm)	57	14	12	13	4
testo - HSA (60 μm)	41	12	15	24	8
testo - Pt - HSA (60 μm)	46	8	14	25	7
Free BSA (60 μm)	63	16	6	12	3
testo - BSA (60 μm)	36	13	15	23	12
testo - Pt - BSA (60 μm)	38	7	19	24	11
β - LG (60 μm)	11	58	0	14	17
testo - β - LG (60 μm)	21	31	26	17	5
testo - Pt - β - LG (60 μm)	19	34	25	16	6

negative ΔH^0 and positive ΔS^0 for drug-protein conjugates indicate that ionic contacts are observed in the drug-protein complexation [51, 52]. A detailed thermodynamic analysis of drug-protein interactions shows the importance of the binding constant K , ΔH^0 , ΔS^0 and ΔG^0 in determining what type of interaction is predominant in these drug-protein conjugates [50–52]. For drug-protein, the enthalpy provides more contribution to ΔG^0 than entropy, which indicates that the binding process is enthalpy driven (Table 2).

The binding efficacy for drug-protein complexes was determined as reported [53]. The binding efficacy was estimated to be 30%–45% for the drug-HSA system, 30–50% for the drug- β -LG system and increased to 40–55% for the drug-BSA system. The loading efficacy was larger for testo-protein than testo-Pt-protein complexes.

3.3. Binding analysis of drug-protein by FTIR spectroscopy

The conjugation of testo and testo-Pt with HSA, BSA and β -LG was characterized by infrared spectroscopy and its derivative methods. Drug-protein interactions alter protein conformation and induce spectral change for protein amide I band at 1659–1657 cm^{-1} (mainly C=O stretch) and amide II band at 1546–1545 cm^{-1} (C–N stretching coupled with N–H bending modes) [54]. The intensity variations of protein amide I and amide II bands obtained by difference spectra [(protein solution + drug solution) – (protein solution)] are shown in Figs. 5 and 6.

At low drug concentration (15 μM), while protein amide I and amide II showed no major shifting, while a major intensity changes were observed for the protein amide I and amide II, in the difference spectra of the drug-HSA and drug-BSA and drug- β -LG complexes (Figs. 5 and 6, diff 15 μM). The positive and negative features due to the increase and decrease in intensity of amide I and amide II bands are located in the difference spectra at 1720–1500 cm^{-1} (Figs. 5 and 6, diff 15 μM). As drug concentration increased (60 μM), more intensity variations of protein amide I and amide II were observed with stronger features around 1700–1500 cm^{-1} (Figs. 5 and 6, diff 60 μM). The spectral variations observed are due to changes in the intensity of the amide I and amide II band, upon drug interactions with protein C–O, C–N and NH groups (hydrophilic contacts) and also related to reduction of protein α -helix contents discussed below.

The secondary structures of the free HSA, BSA and β -LG and their testo and testo-Pt conjugates are shown in Table 3. The free HSA has 57% α -helix (1656 cm^{-1}), β -sheet 14% (1628 and 1617 cm^{-1}), turn structure 13% (1679 cm^{-1}), β -antiparallel 4% (1689 cm^{-1}) and random coil 12% (1637 cm^{-1}) (Table 3). The free BSA contains α -helix 63%

(1656 cm^{-1}), β -sheet 16% (1612 and 1626 cm^{-1}), turn 12% (1678 cm^{-1}), β -antiparallel 3% (1691 cm^{-1}) and random coil 6% (1638 cm^{-1}) (Table 3). The free β -LG has major β -sheet 58% (1640, 1623), α -helix 11% (1655 cm^{-1}), turn 14% (1667 cm^{-1}) and β -antiparallel 17% (1679) (Table 3). Upon drug interaction, a decrease of α -helix from 57% (free HSA) to 46–41% with an increase in random and turn structures (drug-HSA) were observed (Table 3). Similarly, for BSA a decrease of α -helix from 63% (free BSA) to 38–36% with an

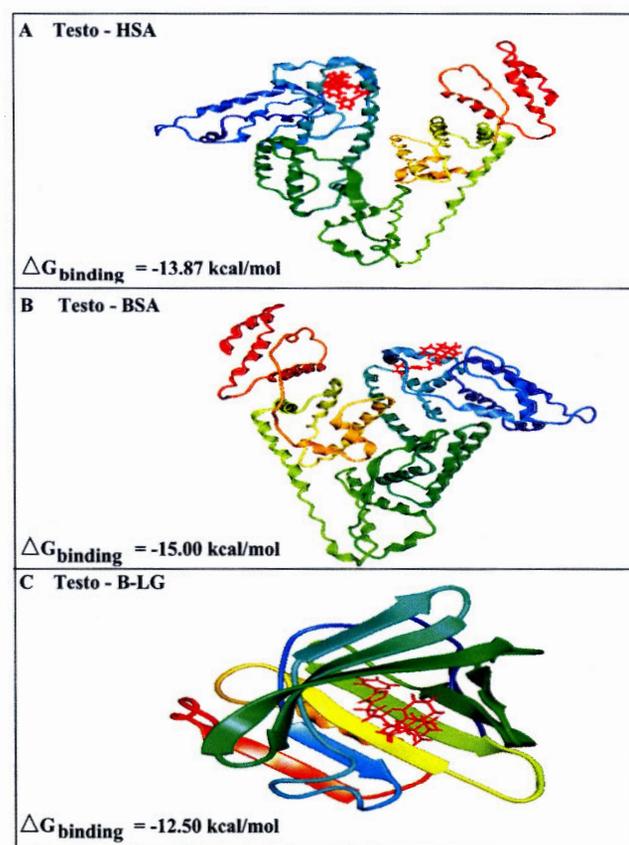


Fig. 7. Best docked conformations of testo-HSA (A), testo-BSA (B) and testo- β -LG conjugates (C) with the free binding energy changes (testo is shown in red color). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 4

Amino acid residues involved in testo - HSA, testo - BSA, and testo - β -LG complexes with the free binding energy changes as determined by docking.

Complexes	Residues involved in the interaction	$\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)
testo - HSA	^a Arg261, Arg186, Glu141, Ile142, Leu115, Leu182, Leu185, Lys137, Met123, Phe134, Pro118, Tyr138, Tyr161, Val116	-13.87
testo - BSA	Asp142, ^a Asp153, Glu154, Ile165, Leu139, Leu146, Leu162, Lys140, Phe150, Phe157, Pro141, Trp158, Tyr161	-15.00
testo - β -LG	Asn90, Asp85, Ile56, Ile71, Ile84, Leu39, Leu46, Leu58, Leu103, Leu122, Lys69, Met107, Phe105, Pro38, Val41, Val43, Val92	-12.50

^a Hydrogen bonding observed with this residue.

increase of turn and random coil structures (drug-BSA) were observed, upon drug complexation (Table 3). However, for β -LG a decrease of β -sheet from 58% (free β -LG) to 34–31% with an increase of α -helix, turn and random structures (drug- β -LG) were observed, upon drug conjugation (Table 3). The results showed that major conformational changes occurred for HSA, BSA and β -LG drug complexes, leading to a partial protein destabilization [55–58]. Similar protein conformational changes were observed for HSA, BSA and β -LG upon various ligands complexation [59–63].

3.4. Drug binding sites located by docking

Docking results for testo conjugated with HSA, BSA and β -LG are presented in Fig. 7 and Table 4. In drug-HSA and drug-BSA conjugates, testo is surrounded by both hydrophilic and hydrophobic amino acids with one H-bonding system, stabilizing the testo-protein conjugates (Table 4). However, in the testo- β -LG adduct, drug is surrounded by different amino acid residues with no H-bonding system, indicating different drug binding modes (Table 4). Testo forms more stable conjugates (larger free binding energy) with BSA than HSA and β -LG (Table 4), which is consistent with the spectroscopic results (Table 1).

4. Conclusions

Testo and testo-Pt bind serum proteins via ionic contacts with BSA forming more stable conjugates than HSA and β -LG. Testo forms stronger protein conjugates than testo-Pt with $K_{\text{testo-protein}}$ ranging from 3.95 to 3.28×10^5 (mol/L)⁻¹ and $K_{\text{testo-Pt}}$ ranging from 3.34 to 2.15×10^5 (mol/L)⁻¹. The binding efficacies were 40% to 55% for testo-protein and 30% to 50% for testo-Pt-protein conjugates. Serum proteins can be used for the delivery of testo and testo-Pt in vitro. Drug interaction induced major perturbations of protein conformations leading to protein destabilization. Future research should be focused on the applications of serum proteins as major drug delivery tools for transporting small molecules.

Acknowledgements

The financial support of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC 100) to H.A. Tajmir-Riahi is highly appreciated.

References

- [1] R. Schobert, B. Biersack, Multimodal HDAC inhibitors with improved anticancer activity, *Curr. Cancer Drug Targets* 18 (2018) 39–56.
- [2] N. Kerru, P. Singh, N. Koorbanally, R. Raj, V. Kumar, Recent advances (2015–2016) in anticancer hybrids, *Eur. J. Med. Chem.* 142 (2017) 179–212.
- [3] R.A.M. Serafim, F.G. Pémichelle, E.I. Ferreira, The latest advances in the discovery of nitric oxide hybrid drug compounds, *Expert Opin. Drug Discovery* 12 (2017) 941–953.
- [4] S. Nekkanti, R. Tokala, N. Shankaraiah, Targeting DNA minor groove by hybrid molecules as anticancer agents, *Curr. Med. Chem.* 24 (2017) 2887–2907.

- [5] M.O. Pedrosa, R.M.D. da Cruz, J.O. Viana, R.O. de Moura, H.M. Ishiki, J.M.B. Filho, M.F.F.M. Diniz, M.T. Scotti, L. Scotti, F.J.B.M. Junior, Hybrid compounds as direct multitarget ligands: a review, *Curr. Top. Med. Chem.* 17 (2017) 1044–1079.
- [6] E. Kucuksayan, T. Ozben, Hybrid compounds as multitarget directed anticancer agents, *Curr. Top. Med. Chem.* 17 (2017) 907–918.
- [7] M. Yang, U. Bierbach, Metal-containing pharmacophores in molecularly targeted anticancer therapies and diagnostics, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2017) 1561–1572.
- [8] G. Bérubé, An overview of molecular hybrids in drug discovery, *Expert Opin. Drug Discovery* 11 (2016) 281–305.
- [9] A. Rana, J.M. Alex, M. Chauhan, G. Joshi, R. Kumar, A review on pharmacophoric designs of antiproliferative agents, *Med. Chem. Res.* 24 (2015) 903–920.
- [10] M.-H. Teiten, M. Dicato, M. Diederich, Hybrid curcumin compounds: a new strategy for cancer treatment, *Molecules* 19 (2014) 20839–20863.
- [11] S. Sandhu, Y. Bansal, O. Silakari, G. Bansal, Coumarin hybrids as novel therapeutic agents, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 3806–3814.
- [12] K. Nepali, S. Sharma, D. Kumar, A. Budhiraja, K.L. Dhar, Anticancer hybrids - a patent survey, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 9 (2014) 303–339.
- [13] S. Fortin, G. Bérubé, Advances in the development of hybrid anticancer drugs, *Expert Opin. Drug Discovery* 8 (2013) 1029–1047.
- [14] P. Saha, C. Debnath, G. Bérubé, Steroid-linked nitrogen mustards as potential anticancer therapeutics: a review, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 137 (2013) 271–300.
- [15] D. Bastien, R. Hanna, V. Leblanc, E. Asselin, G. Bérubé, Synthesis and preliminary in vitro biological evaluation of 7 α -testosterone-chlorambucil hybrid designed for the treatment of prostate cancer, *Eur. J. Med. Chem.* 64 (2013) 442–447.
- [16] S. Fortin, K. Brasseur, N. Morin, E. Asselin, G. Bérubé, New platinum(II) complexes conjugated at position 7 α of 17 β -acetyl-testosterone as new combi-molecules against prostate cancer: design, synthesis, structure-activity relationships and biological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.* 68 (2013) 433–443.
- [17] F. Yang, Y. Zhang, H. Liang, Interactive association of drugs binding to human serum albumin, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 3580–3595.
- [18] J. Ghuman, P.A. Zunszain, I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, M. Ottagiri, S. Curry, Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin, *J. Mol. Biol.* 353 (2005) 38–52.
- [19] N.A. Kratochwil, W. Huber, F. Müller, M. Kansy, P.R. Gerber, Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 1355–1374.
- [20] A. Ahmed Ouameur, S. Diamantoglou, M.R. Sedaghat-Herati, Sh. Nafisi, R. Carpentier, H.A. Tajmir-Riahi, An overview of drug binding to human serum albumin: protein folding and unfolding, *Cell Biochem. Biophys.* 45 (2006) 203–213.
- [21] B. Elsadek, F. Kratz, Impact of albumin on drug-delivery-new application on the horizon, *J. Control. Release* 157 (2012) 4–28.
- [22] F. Kratz, B. Elsadek, Clinical impact of serum proteins on drug delivery, *J. Control. Release* 161 (2012) 429–445.
- [23] F. Kratz, Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles, *J. Control. Release* 132 (2008) 171–183.
- [24] P. Chanphai, A.R. Vesper, L. Bekale, G. Bérubé, H.A. Tajmir-Riahi, Encapsulation of testosterone and its aliphatic and aromatic dimers by milk beta-lactoglobulin, *Int. J. Biol. Macromol.* 76 (2015) 153–160.
- [25] P. Chanphai, A.R. Vesper, L. Bekale, G. Bérubé, H.A. Tajmir-Riahi, Transporting testosterone and its dimers by serum proteins, *J. Photochem. Photobiol. B* 153 (2015) 173–183.
- [26] Y. Akdogan, J. Reichenwallner, D. Hinderberger, Evidence for water-tuned structural differences in proteins: an approach emphasizing variations in local hydrophilicity, *PLoS One* 7 (2012) 1–11, e456810.
- [27] G.B. Jamesona, J.J. Adams, L.K. Creamer, Flexibility, functionality and hydrophobicity of bovine β -lactoglobulin, *Int. Dairy J.* 12 (2002) 319–329.
- [28] S. Tunç, O. Duman, B.K. Bozoğlan, Studies on the interactions of chloroquine diphosphate and phenelzine sulfate drugs with human serum albumin and human hemoglobin proteins by spectroscopic techniques, *J. Lumin.* 140 (2013) 87–94.
- [29] S. Tunç, A. Çetinçay, O. Duman, Spectroscopic investigations of the interactions of tramadol hydrochloride and 5-azacytidine drugs with human serum albumin and human hemoglobin proteins, *J. Photochem. Photobiol. B* 120 (2013) 59–65.
- [30] O. Duman, S. Tunç, B.K. Bozoğlan, Characterization of the binding of metoprolol tartrate and guaifenesin drugs to human serum albumin and human hemoglobin proteins by fluorescence and circular dichroism spectroscopy, *J. Fluoresc.* 23 (2013) 659–669.
- [31] S. Tunç, O. Duman, I. Soylu, B.K. Bozoğlan, Study on the bindings of dichlorprop and diquat dibromide herbicides to human serum albumin by spectroscopic methods, *J. Hazard. Mater.* 273 (2014) 36–43.
- [32] S. Tunç, O. Duman, I. Soylu, B.K. Bozoğlan, Spectroscopic investigation of the interactions of carbofuran and amitrol herbicides with human serum albumin, *J. Lumin.* 151 (2014) 22–28.
- [33] J. Tang, F. Luan, X. Chen, Binding analysis of glycyrrhetic acid to human serum albumin: fluorescence spectroscopy, FTIR, and molecular modeling, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 3210–3217.
- [34] B.K. Bozoğlan, S. Tunç, O. Duman, Investigation of neohesperidin dihydrochalcone binding to human serum albumin by spectroscopic methods, *J. Lumin.* 155 (2014) 198–204.
- [35] M. Tanaka, Y. Asahi, S. Masuda, Interaction between drugs and water-soluble polymers. VII. Binding of berberine with bovine serum albumin, *J. Macromol. Sci. A* 32 (1995) 339–347.
- [36] E. Ayranci, O. Duman, Binding of fluoride, bromide and iodide to bovine serum albumin, studied with ion-selective electrodes, *Food Chem.* 84 (2004) 539–543.
- [37] E. Ayranci, O. Duman, Binding of fluoride, bromide and iodide to bovine serum albumin, studied with ion-selective electrodes, *Protein Pept. Lett.* 11 (2004) 331–337.

- [38] L. Painter, M.M. Harding, P.J. Beeby, Synthesis and interaction with human serum albumin of the first 3,18-disubstituted derivative of bilirubin, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 18* (1998) 3041–3044.
- [39] M. Collini, L. D'Alfonso, G. Baldini, New insights on β -lactoglobulin binding sites by 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate fluorescence decay, *Protein Sci.* 9 (2000) 1968–1974.
- [40] W. Zhong, Y. Wang, J.S. Yu, Y. Liang, K. Ni, S. Tu, The interaction of human serum albumin with a novel antidiabetic agent-SU-118, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 1039–1046.
- [41] F. Dousseau, M. Therrien, M. Pezolet, On the spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of aqueous solutions of proteins, *Appl. Spectrosc.* 43 (1989) 538–542.
- [42] D.M. Byler, H. Susi, Examination of the secondary structure of proteins by deconvoluted FTIR spectra, *Biopolymers* 25 (1986) 469–487.
- [43] R. Beauchemin, C.N. N'soukpoe-Kossi, T.J. Thomas, T. Thomas, R. Carpentier, H.A. Tajmir-Riahi, Polyamine analogues bind human serum albumin, *Biomacromolecules* 8 (2007) 3177–3183.
- [44] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution, *Protein Eng.* 12 (1999) 439–446.
- [45] K. Arnold, A.K. Bordoli, L. Kopp, T. Schwede, A web-based environment for protein structure homology modeling, *Bioinformatics* 22 (2006) 195–201.
- [46] B. Rost, Twilight zone of protein sequence alignment, *Protein Eng.* 12 (1999) 85–94.
- [47] P. Bourassa, I. Hasni, H.A. Tajmir-Riahi, Folic acid complexes with human and bovine serum albumins, *Food Chem.* 129 (2011) 1148–1155.
- [48] B.Y. Qin, M.C. Bewley, L.K. Creamer, H.M. Baker, E.N. Baker, G.B. Jameson, Structural basis of the tanford transition of bovine β -lactoglobulin, *Biochemistry* 37 (1998) 14014–14023.
- [49] L. Bekale, D. Agudelo, H.A. Tajmir-Riahi, Effect of polymer molecular weight on chitosan-protein interaction, *Colloids Surf., B* 125 (2015) 309–317.
- [50] L. Bekale, P. Chanphai, S. Sanyakamdhorn, D. Agudelo, H.A. Tajmir-Riahi, Microscopic and thermodynamic analysis of PEG-lactoglobulin interaction, *RSC Adv.* 4 (2014) 31084–31093.
- [51] P.D. Ross, S. Subramanian, Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability, *Biochemistry* 20 (1981) 3096–3102.
- [52] A. Bose, Interaction of tea polyphenols with serum albumins: a fluorescence spectroscopic analysis, *J. Lumin.* 169 (2016) 220–226.
- [53] S. Chandra, S. Dietrich, H. Lang, D. Bahadur, Dendrimer-doxorubicin conjugate for enhanced therapeutic effects for cancer, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 5729–5737.
- [54] S. Krimm, J. Bandekar, Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins, *Adv. Protein Chem.* 38 (1986) 181–364.
- [55] J. Tian, J. Liu, Z. Hu, X. Chen, Binding of the scutellarin to albumin using tryptophan fluorescence quenching, CD and FT-IR spectra, *Am. J. Immunol.* 1 (2005) 21–23.
- [56] J. Grdadolnik, Saturation effects in FTIR spectroscopy: intensity of amide I and amide II bands in protein spectra, *Acta Chim. Slov.* 50 (2003) 777–788.
- [57] J. Essemine, I. Hasni, R. Caprpentier, T.J. Thomas, H.A. Tajmir-Riahi, Binding of biogenic and synthetic polyamines to β -lactoglobulin, *Int. J. Biol. Macromol.* 49 (2011) 201–211.
- [58] M. Gokara, G.B. Kimavathb, A. R. Podileb, R. Subramanyam, Differential interactions and structural stability of chitosan oligomers with human serum albumin and α -1-glycoprotein, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 33 (2014) 196–210.
- [59] D.P. Yeggoni, M. Gokara, D.M. Manidhar, A. Rachamalla, S. Nakka, C.S. Reddy, R. Subramanyam, Binding and molecular dynamics studies of 7-hydroxycoumarin derivatives with human serum albumin and its pharmacological importance, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 1117–1131.
- [60] L. Bekale, D. Agudelo, H.A. Tajmir-Riahi, Effect of polymer molecular weight on chitosan-protein interaction, *Colloids Surf., B* 125 (2015) 309–317.
- [61] A. Nerusu, P.S. Reddy, D.B. Ramachary, R. Subramanyam, Unraveling the stability of plasma proteins upon interaction of synthesized androstenedione and its derivatives—a biophysical and computational approach, *ACS Omega* 2 (2017) 6514–6524.
- [62] I. Hasni, P. Bourassa, H.A. Tajmir-Riahi, Binding of cationic lipids to milk β -lactoglobulin, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 6683–6690.
- [63] D. Agudelo, G. Bérubé, H.A. Tajmir-Riahi, An overview on the delivery of antitumor drug doxorubicin by carrier proteins, *Int. J. Biol. Macromol.* 88 (2016) 354–360.

ANNEXE D

ARTICLE COMPLÉMENTAIRE 2

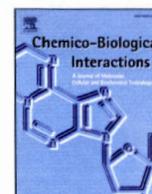
Cette annexe contient le deuxième article complémentaire à mon projet de maîtrise qui a été publié en septembre 2018 dans la revue *Chemico-Biological Interactions* intitulé « *Testo and testo-Pt(II) bind DNA at different locations* ». Les travaux ont été effectués en collaboration avec l'équipe du Dr Heidar-Ali Tajmir-Riahi sur les molécules **11** et **14**. L'article porte sur la conjugaison de ces dernières à l'ADN de thymus de veau. L'étude évalue l'efficacité de liaison des composés sur les doubles hélices de l'ADN à l'aide de différentes méthodes spectroscopiques.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint

Testo and testo-Pt(II) bind DNA at different locations

P. Chanphai^a, V. Ouellette^a, Sanat K. Mandal^{b,c}, G. Bérubé^{a,**}, H.A. Tajmir-Riahi^{a,*}^a Department of Chemistry-Biochemistry and Physics, University of Québec at Trois-Rivières C. P. 500, Trois-Rivières (Québec), G9A 5H7, Canada^b Faculty of Medicine, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, A1B 3V6, Canada^c College of the North Atlantic, Ridge Road Campus, Newfoundland, A1C 6L8, Canada

ARTICLE INFO

Keywords:

DNA
Testo
Testo-pt
Conjugation
Spectroscopy
Molecular modeling

ABSTRACT

The development of new targeted anticancer agents able to efficiently and specifically destroy cancer cells with minimal toxic side effects is nowadays a subject of intensive research endeavors. We report the conjugation of testo and testo-Pt(II) (two semi-synthetic testosterone derivatives) with calf thymus DNA in aqueous solution at physiological pH. Multiple spectroscopic methods, thermodynamic analysis and modeling were used to determine the binding efficacy of these drugs to DNA duplex. Thermodynamic parameters showed drug-DNA conjugation occurs *via* ionic interactions with testo-Pt(II) forming more stable DNA adducts than testo with $K_{\text{testo-DNA}} = 1.80 (\pm 0.5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ and $K_{\text{testo-Pt(II)-DNA}} = 2.3 (\pm 0.8) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Molecular modeling shows that testo and testo-Pt(II) bind DNA at different locations.

1. Introduction

Cisplatin is a clinically useful drug for the treatment of a variety of cancers including bladder, brain, breast, head and neck, lung, ovarian and testicular cancers [1]. It is used either alone or in combination therapy depending on cancer's development stage and aggressiveness [1]. Recent reviews present a comprehensive survey of its activity, molecular mechanisms of action and cellular processing [1–5]. It is known that cisplatin is a DNA bis-alkylating agent inducing important yet subtle structural molecular deformations that interfere with DNA repair mechanisms, trigger DNA damages and lead to cancer cells apoptosis [1–5]. Despite its importance in cancer treatment, cisplatin possesses several debilitating side effects including nephrotoxicity, ototoxicity, hair loss, fatigue, nausea, etc. [6]. Furthermore, resistance to cisplatin is also a major impediment to its use [1–5]. Hence, there is much effort towards the development of targeted-platinum(II) therapies [7–9]. We have also explored the synthesis of testosterone-linked DNA alkylating agents; nitrogen mustard [10] and platinum(II) complexes [11]. Preliminary biological results show that these testosterone-linked DNA alkylating agents were active on prostate cancer cells, particularly the platinum(II) derivatives [11]. In fact, tested on a variety of cancer cell lines some testosterone-platinum(II) complexes displayed significantly superior antiproliferative activity in comparison to cisplatin used as the control drug [11]. These hybrid molecules have the

potential to target the androgen receptor found in hormone-dependant prostate cancer cells. Recently, a second generation testosterone platinum(II) complex was made and its interaction with DNA is investigated in this study.

It has been shown that steroid-DNA interaction increases DNA/RNA stability [12], while complexation of “testosterone-based platinum drugs” with DNA significantly alters biopolymer structure and dynamic [13,14]. Similarly, the effect of steroid receptor–DNA interactions on transcriptional regulation is well investigated [15,16]. It has been shown that testosterone and its dimer derivatives alter DNA and RNA morphology [17,18]. Recently, steroid-protein interactions and the delivery of testosterone and its dimers by serum proteins have been reported [19]. Similarly, the conjugation of testo and testo-Pt(II) with serum proteins is known [20]. Even though the interactions of nucleic acids with steroids were studied some years ago [21], the conjugation effect of testo and testo-Pt(II) on DNA structure and dynamic is not yet investigated.

In this paper we report the conjugation of testo and testo-Pt(II) (two new derivatives of testosterone) (Scheme 1) with DNA in aqueous solution and the effect of drug complexation on DNA structure and dynamic, using multiple spectroscopic methods, thermodynamic analysis and molecular modeling.

Abbreviations: testo, 7 α -[4-(4-pyridin-2-yl-[1,2,3]triazol-1-yl)-but-2-enyl]-4-androsten-17 β -ol-3-one; testo-Pt(II), 7 α -[4-(4-pyridin-2-yl-[1,2,3]triazol-1-yl)-but-2-enyl]-4-androsten-17 β -ol-3-one dichloroplatinum(II); FTIR, Fourier transform infrared

* Corresponding author.

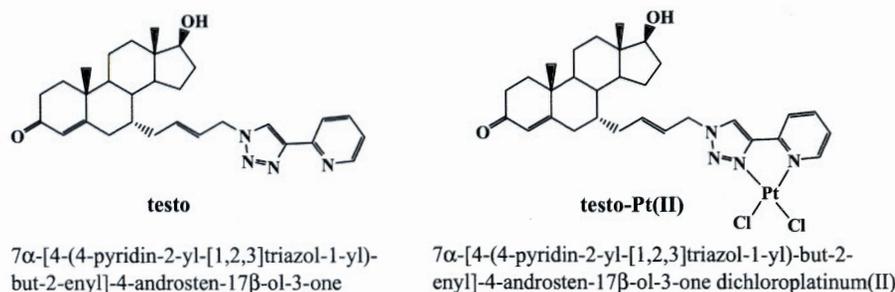
** Corresponding author.

E-mail addresses: Gervais.Berube@uqtr.ca (G. Bérubé), heidar-ali.tajmir-riahi@uqtr.ca (H.A. Tajmir-Riahi).<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.09.008>

Received 8 August 2018; Received in revised form 27 August 2018; Accepted 17 September 2018

Available online 22 September 2018

0009-2797/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.



Scheme 1. Chemical structures of testo and testo-Pt(II) and their respective chemical names.

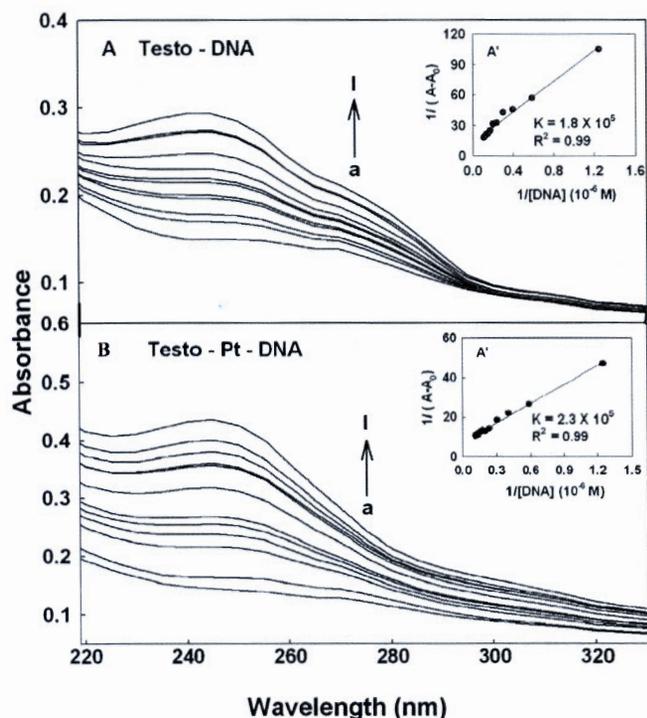


Fig. 1. UV-visible spectra of testo and testo-Pt(II) conjugation with DNA (A) testo and (B) testo-Pt(II) with free drug 60 μ M (a) and DNA at 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 μ M (b-i). Inset: plot of $1/(A-A_0)$ vs $1/[\text{DNA}]$ concentration) and binding constant (K) for drug-DNA conjugates.

Table 1

Variations of the binding constants for DNA with Testo and Testo-Pt(II) complexes at different temperatures.

Complexes	Temperature (K)	Binding constant $K(\text{mol/L})^{-1}$
Testo - DNA	298.15	$1.80 (\pm 0.5) \times 10^5$
	308.15	$1.64 (\pm 0.3) \times 10^5$
	318.15	$1.52 (\pm 0.4) \times 10^5$
Testo - Pt(II) - DNA	298.15	$2.30 (\pm 0.8) \times 10^5$
	308.15	$2.04 (\pm 0.7) \times 10^5$
	318.15	$1.69 (\pm 0.5) \times 10^5$

2. Experimental section

2.1. Materials

Testo and testo-Pt(II) (Scheme 1) were made from testosterone as the starting material. The final product, testo-Pt(II) was obtained with an eight-step reaction sequence with about 7% overall yield. The products were characterized by IR, by NMR spectroscopy (proton and carbon) and with mass spectrometry. The spectral data correspond to

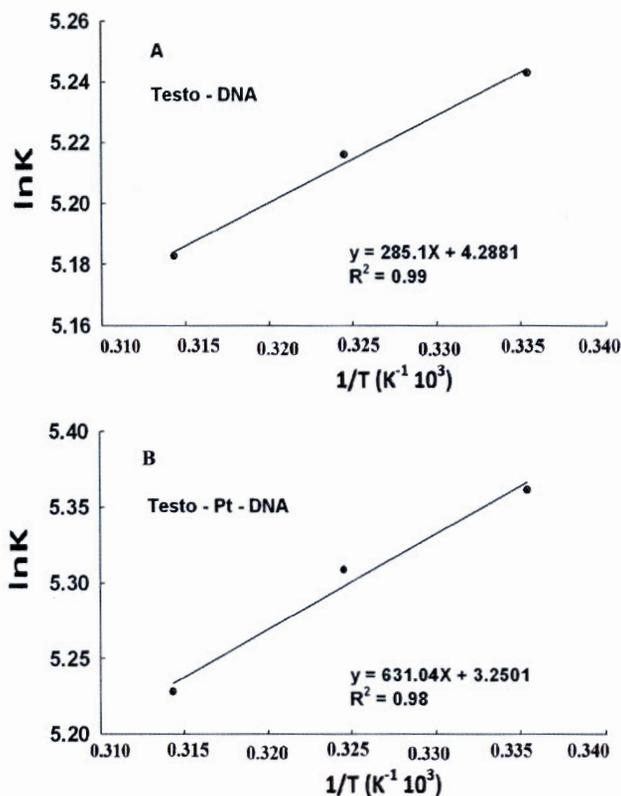


Fig. 2. $\ln K$ vs. $1/T$ for testo (A) and testo-Pt(II) (B) with DNA conjugates.

the compounds made and will be published in another study. Highly polymerized type I calf-thymus DNA sodium salt (7% Na content) was purchased from Sigma Chemical Company (St-Louis, MO) and was deproteinated by the addition of CHCl_3 and isoamyl alcohol in NaCl solution. In order to check the protein content of DNA solution, the absorbance at 260 and 280 nm was recorded [22].

2.2. Synthesis of testo- and testo-Pt(II)-DNA conjugates

Sodium-DNA was dissolved to 0.5% w/w (5 mg/ml) in Tris-HCl (pH 7.4) at 5 $^\circ\text{C}$ for 24 h with occasional stirring to ensure the formation of a homogeneous solution. The final concentration of the stock DNA solution was determined spectrophotometrically at 260 nm by using molar extinction coefficient of $6600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (expressed as molarity of phosphate groups) [23]. The UV absorbance at 260 nm of a diluted solution (40 μ M) of calf-thymus DNA used in our experiments was measured to be 0.25 (path length was 1 cm) and the final concentration of the stock DNA solution was calculated to be 12.5 mM in DNA phosphate. The average length of the DNA molecules, estimated by gel electrophoresis was 9000 base pairs (molecular weight $\sim 6 \times 10^6 \text{ Da}$). Testo and testo-Pt(II) (200 μ M) were dissolved in methanol/ H_2O (50/

Table 2
Thermodynamic parameters for DNA with Testo and Testo-Pt(II) complexes.

Complexes	Thermodynamic parameters			
	ΔH° (kJ. mol ⁻¹)	ΔS° (J. mol ⁻¹ . K ⁻¹)	$T\Delta S^{\circ}$ (kJ. mol ⁻¹)	ΔG° (kJ. mol ⁻¹)
Testo- DNA	-2.37	35.65	10.63	-13.00 (298.15 K)
			10.99	-13.36 (308.15 K)
			11.34	-13.71 (318.15 K)
Testo - Pt(II) - DNA	-5.25	27.02	8.06	-13.30 (298.15 K)
			8.33	-13.57 (308.15 K)
			8.60	-13.84 (318.15 K)

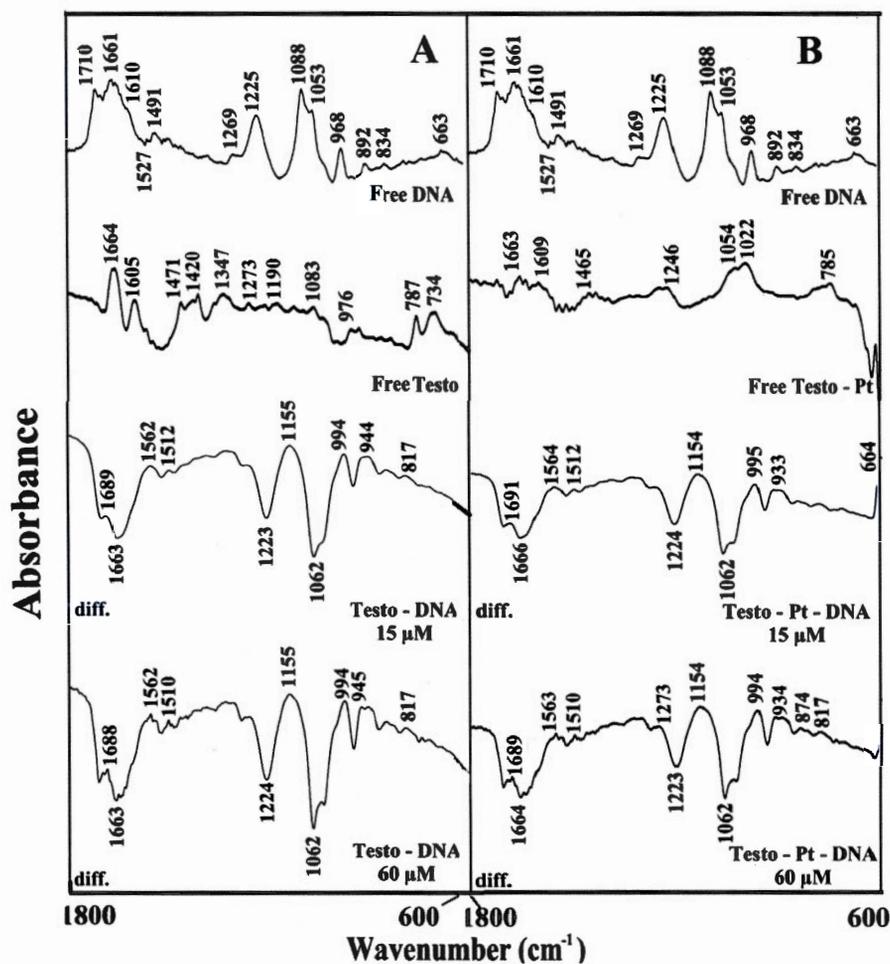


Fig. 3. FTIR spectra in the region of 1800–600 cm⁻¹ of hydrated films (pH 7.4) for free DNA (60 μM) and its drug complexes for (A) testo, (B) testo-Pt(II) with difference spectra (diff.) (bottom two curves) obtained at different drug concentrations (indicated on the figure).

50%) and then diluted by serial dilution to different concentrations in Tris-HCl (pH 7.2). The drug solution was added to DNA solution for preparation of drug-DNA conjugates. Drug-DNA conjugates were characterized by multiple spectroscopic methods, thermodynamic analysis and as well as with molecular modeling.

2.3. UV-visible spectroscopy

The UV-Vis spectra were recorded on a Cary 60 UV-Visible spectrophotometer with a slit of 2 nm and scan speed of 400 nm min⁻¹. Quartz cuvettes of 1 cm were used. The absorbance measurements were performed at pH 7.2 by keeping the concentration of drug constant (60 μM), while increasing DNA concentrations (1 μM–60 μM). The binding constants of drug-DNA complexes were obtained as reported [24].

2.4. FTIR spectroscopy

Infrared spectra were recorded on a FTIR spectrometer (Impact 420 model, Digilab), equipped with deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector and KBr beam splitter, using AgBr windows. The solution of steroid was added dropwise to the DNA solution with constant stirring to ensure the formation of homogeneous solution and to reach the target steroid concentrations of 15, 30 and 60 μM with a final DNA concentration of 60 μM. The detailed spectroscopic treatments were carried out according to previous reports [25].

2.5. Molecular docking

The docking studies were carried out with Scigress Explorer Ultra, Version: 7.7.0.47, Fujitsu. DNA structure was obtained from the PDB

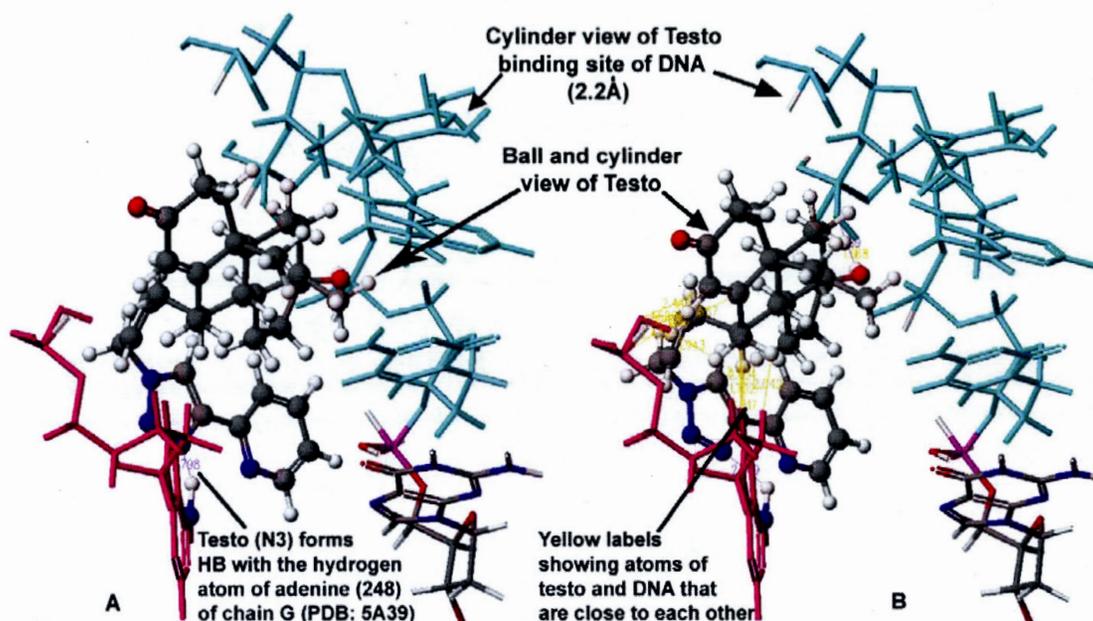


Fig. 4. Docking results of testo-DNA adduct. View of the nearest nucleobases surrounding drug with free binding energy. DNA sequence from PDB (ID: 5A39).

Table 3
Binding sites of testo with DNA bases.

Chain C	Chain G
T(234)	A (248)
A(235)	
C(236)	
G(237)	

(ID: 5A39) [26].

3. Results and discussion

3.1. Stability of drug-DNA conjugates by UV spectroscopy

The drug-DNA binding constants were determined as described in Materials and Methods [24]. An increasing DNA concentration resulted into a decrease in UV light absorption, as can be observed (Fig. 1). This is consistent with the aggregation of DNA upon drug interaction (Fig. 1A and B). The double reciprocal plot of $1/(A_0 - A)$ vs $1/(\text{DNA concentration})$ is linear and the binding constants (K) are estimated from the ratio of the intercept to the slope (Fig. 1A and B), where A_0 is the initial absorbance of the free drug at 250 nm and A is the recorded absorbance of complexes at different DNA concentrations. The overall binding constants at 298 K are estimated to be constants $K_{\text{testo-DNA}} = 1.80 (\pm 0.5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, and $K_{\text{testo-Pt(II)-DNA}} = 2.3 (\pm 0.8) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ with the order of stability testo-Pt(II)-DNA > testo-DNA (Fig. 1 and Table 1). Drug-DNA interactions regarding hydrophobic, hydrophilic or H-bonding contacts characterized by thermodynamic analysis of drug-DNA adducts discussed below.

3.2. Thermodynamic analysis of drug-DNA conjugates

The interactions between testo and testo-Pt(II) with DNA were characterized by thermodynamic analysis. Based on the data of ΔH^0 and ΔS^0 , the drug-DNA interaction can be elucidated [27,28]. The thermodynamic parameters for the interaction of drug and DNA complexes at 298.15, 308.15 and 318.15 K are presented in Fig. 2 and Table 2. The negative sign of ΔG^0 shows that the binding process between drug and DNA is spontaneous. Furthermore, all the drug-DNA conjugates have

negative ΔH^0 , which means the complex formation between DNA and drug is an exothermic reaction. The negative ΔH^0 and positive ΔS^0 for drug-DNA adducts indicate that ionic interactions are observed in the drug-DNA complexation [29,30]. For drug-DNA complexes, the enthalpy provides more contribution to ΔG^0 than entropy, which indicates that the binding process is enthalpy driven (Table 2).

The binding efficacy for drug-DNA conjugates was determined as reported [31]. The binding efficacy was estimated to be 45% for the testo-DNA and 60% for the testo-Pt(II)-DNA complexes. The loading efficacy was larger for testo-Pt(II) than testo-DNA adducts.

3.3. Structural analysis of drug-DNA conjugates by FTIR spectroscopy

Infrared spectral features of testo and testo-Pt(II)-DNA conjugates are presented in Fig. 3A and B. Major alterations of DNA-in-plane vibrations [32–35] were observed, upon drug-DNA conjugation. At low and high drug concentrations (15–60 μM), major intensity variations and shifting were observed for the guanine band at 1710, thymine at 1661, adenine at 1610, cytosine at 1527 and the PO_2 band at 1225 cm^{-1} (asymmetric stretch) and 1088 cm^{-1} (symmetric stretch) (Fig. 3). The negative features observed in the difference spectra of testo- and testo-Pt(II)-DNA conjugates in the region $1715\text{--}1000 \text{ cm}^{-1}$ for 1715–1705 (guanine), 1661–1658 (thymine) and $1225\text{--}1223 (\text{PO}_2)$ and $1080\text{--}1076 \text{ cm}^{-1}$ (PO_2) are due to decrease in intensity of DNA vibrations as results of drug interactions with G-C and A-T base pairs and the phosphate group (Fig. 3A and B, diff, 15 and 60 μM). The overall spectral shifting observed for the guanine, thymine and adenine bands is due to hydrophilic binding of drug to guanine and adenine N7, thymine O2 and backbone PO_2 groups. It should be noted that since the B-DNA marker bands at 1710 (guanine), 1225 (phosphate) and 834 cm^{-1} (phosphodiester) did not shift upon drug-DNA conjugation and DNA remains in the B-family structures.

3.4. Docking studies of drug-DNA conjugates

To further examine the DNA binding mode of metal free testo and its platinum derivative testo-Pt(II), we used the DNA X-ray structure of PDB ID, 5A39 [26] following our earlier methods [36]. Briefly, we have used modeling and docking tools [37] to perform docking experiments of testo for a total of 60,000 generations of which 30,000 generations

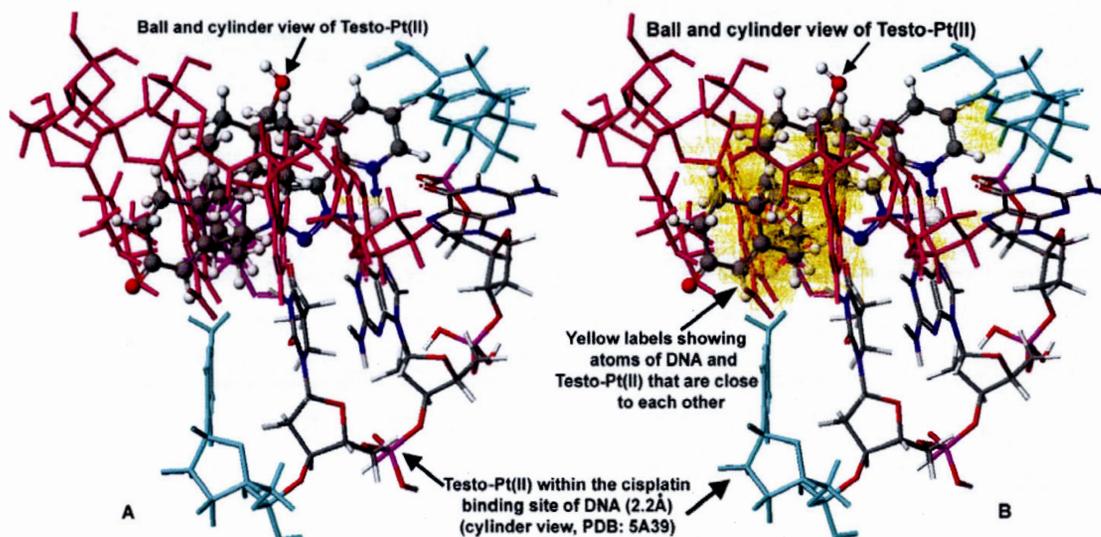


Fig. 5. Docking results of testo-Pt(II)-DNA adduct. View of the nearest nucleobases surrounding drug with free binding energy. DNA sequence from PDB (ID: 5A39).

Table 4
Binding sites of testo-Pt(II) with DNA bases.

Chain C	Chain G
C(236)	T(246)
G(237)	G(247)
G(238)	A (248)
T(239)	C(249)
C(240)	

per iteration. We obtained a very good docking score of -110.028 kcal/mol. Fig. 4A, shows the binding mode of testo with the DNA molecule (within 2.2 \AA of testo) and the hydrogen bond (1.798 \AA) between 1,2,3-triazole ring nitrogen and adenine. The third nitrogen atom of triazole ring system of testo forms hydrogen bond with one of the amino hydrogen atoms of adenine (248) of chain G. Fig. 4B shows overlapping of atoms, yellow labels, between atoms of testo and the DNA molecule that are close to each other. A fewer yellow labels is indicative of less repulsion due to less number of overlapping atoms. So the testo and the DNA molecule form a stable complex for three reasons (i) docking score (the Potential of Mean Force (PMF) is -110.028 kcal/mol, (ii) forms a hydrogen bond (N-H bond distance is 1.798 \AA), and (iii) very few yellow labels indicative of relatively less steric repulsion. Table 3 shows the DNA nucleotides of chain C and chain G that are within 2.2 \AA of testo molecule and chain ID is shown in the parenthesis.

For the platinum complex, testo-Pt(II), we performed the docking experiments by superimposition technique using 3D structure (PDB ID: 5A39) of the cisplatin bound to DNA molecule and the testo-Pt(II) compound. We obtained a RMS error value of 0.0267 . Fig. 5A shows the docking view of testo-Pt(II). The testo-Pt(II) does not form any number of hydrogen bonds. As indicated by the number of yellow labels (Fig. 5B), that many atoms of DNA molecule are closed and are within 2.2 \AA of testo-Pt(II) molecule. Table 4 shows the DNA nucleotides with the chain ID in the parenthesis of chain C and chain G that are within 2.2 \AA of testo-Pt(II) compound.

As shown in Tables 3 and 4, the number of nucleotides is greater within 2.2 \AA of testo-Pt(II) compared to testo molecule. Similarly, Fig. 5B shows more yellow labels compared to Fig. 4B. As indicated above, testo forms one hydrogen bond with the DNA molecule and has fewer overlapping atoms compared to testo-Pt(II) (Fig. 4B). It is important to note that testo and testo-Pt(II) bind DNA at some location but interact with different nucleotides sequences (Tables 3 and 4). Furthermore, testo-DNA complex is more stable compared to the testo-Pt(II)-DNA complex. This is in contrast with our experimental results that

showed testo-Pt(II) binds more effectively than testo. This may be due to the structural differences with the calf thymus DNA used in our experiments in comparison to the PDB ID, 5A39 sequences reported [26]. It is noteworthy, that the testo-Pt(II) derivative was initially forced (fixed) into the known cisplatin DNA binding site of 5A39 which can also explained the discrepancies between experimental and molecular modeling studies.

4. Conclusions

Testo and testo-Pt(II) bind DNA via ionic interactions. Testo-Pt(II) forms more stable complexes than with testo, which is not consistent with theoretical modeling. The reason can be related to the fact that testo-Pt(II) was positioned into the cisplatin binding sites in the molecular modeling studies. Testo and testo-Pt(II) bind DNA at different locations. The testo-Pt(II) drug forms more stable adduct than those of the *cis*-Pt-DNA complexes [38,39]. No conformational changes were observed for DNA duplex upon testo and testo-Pt(II) complexation as it remains in the B-family structures.

Acknowledgments

We thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for the financial support.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.09.008>.

References

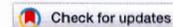
- [1] S. Dasari, P.B. Tchounwou, Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action, *Eur. J. Pharmacol.* 740 (2014) 364–378.
- [2] V. Brabec, O. Hrabina, J. Kasparkova, Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents, *Coord. Chem. Rev.* 351 (2017) 2–31.
- [3] D. Wang, S.J. Lippard, Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 307–320.
- [4] T.C. Johnstone, K. Suntharalingam, S.J. Lippard, The next generation of platinum drugs: targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs, *Chem. Rev.* 116 (2016) 3436–3486.
- [5] M.G. Apps, E.H.Y. Choi, N.J. Wheate, The state-of-play and future of platinum drugs, *Endocr. Relat. Canc.* 22 (2015) R219–R233.
- [6] R. Ralhan, J. Kaur, Alkylating agents and cancer therapy, *Expert Opin. Ther. Pat.* 17 (2007) 1061–1075.
- [7] H.S. Walter, S. Ahmed, Targeted therapies in cancer, *Surgery* 36 (2018) 122–127.
- [8] T.C. Johnstone, K. Suntharalingam, S.J. Lippard, The next generation of platinum

- drugs: targeted Pt (II) agents, nanoparticle delivery, and Pt (IV) prodrugs, *Chem. Rev.* 116 (2016) 3436–3486.
- [9] X. Wang, Z. Guo, Targeting and delivery of platinum-based anticancer drugs, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 202–224.
- [10] D. Bastien, R. Hanna, V. Leblanc, É. Asselin, G. Bérubé, Synthesis and preliminary in vitro biological evaluation of 7 α -testosterone–chlorambucil hybrid designed for the treatment of prostate cancer, *Eur. J. Med. Chem.* 64 (2013) 442–447.
- [11] S. Fortin, K. Brasseur, N. Morin, É. Asselin, G. Bérubé, New platinum (II) complexes conjugated at position 7 α of 17 β -acetyl-testosterone as new combi-molecules against prostate cancer: design, synthesis, structure–activity relationships and biological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.* 68 (2013) 433–443.
- [12] C.F. Blecziński, C. Richert, Steroid–DNA interactions increasing stability, sequence selectivity, DNA/RNA discrimination, and hydrochromicity of oligonucleotide duplexes, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 10889–10894.
- [13] S. Cui, Y. Wang, G. Chen, Disturbance of DNA conformation by the binding of testosterone-based platinum drugs via groove-face and intercalative interactions: a molecular dynamics simulation study, *BMC Struct. Biol.* 13 (2013) 1–12.
- [14] C. Sanchez-Cano, M. Huxley, C. Ducani, A.E. Hamad, M.J. Browning, C. Navarro-Ranninger, A.G. Quiroga, A. Rodger, M.J. Hannon, Conjugation of testosterone modifies the interaction of mono-functional cationic platinum(II) complexes with DNA, causing significant alterations the DNA helix, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 39 (2010) 11365–11374.
- [15] D.L. Bain, K.D. Connaghan, N.K. Maluf, Q. Yang, M.T. Miura, R.W. De Angelis, G.D. Degala, J.R. Lamber, Steroid receptor–DNA interactions: toward a quantitative connection between energetics and transcriptional regulation, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 691–700.
- [16] M.L.K. Chua, R.G. Bristow, Testosterone in androgen receptor signaling and DNA repair: enemy or frenemy? *Clin. Canc. Res.* (2016), <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0381>.
- [17] P. Chanphai, D. Agudelo, A.R. Vesper, G. Bérubé, H.A. Tajmir-Riahi, Effect of testosterone and its aliphatic and aromatic dimers on DNA morphology, *Int. J. Biol. Macromol.* 95 (2017) 850–855.
- [18] P. Chanphai, D. Agudelo, A.R. Vesper, G. Bérubé, H.A. Tajmir-Riahi, Testosterone and its dimers alter tRNA morphology, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 134 (2017) 269–274.
- [19] P. Chanphai, A.R. Vesper, G. Bérubé, H.A. Tajmir-Riahi, Review on the delivery of steroids by Carrier proteins, *J. Photochem. Photobiol., B* 161 (2016) 184–191.
- [20] P. Chanphai, V. Ouellette, G. Bérubé, H.A. Tajmir-Riahi, Conjugation of testo and testo-Pt(II) with serum proteins: loading efficacy and protein conformation, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 1112–1119.
- [21] S.K. Aryaf, J.T. Yangiyanga, Interaction of steroids with nucleic acids, *Biochemistry* 14 (1975) 963–969.
- [22] J. Marmur, A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from Microorganisms, *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 208–218.
- [23] R. Vijayalakshmi, M. Kanthimathi, V. Subramanian, DNA cleavage by a chromium (III) complex, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271 (2000) 731–734.
- [24] K. Connors, *Binding Constants: the Measurement of Molecular Complex Stability*, John Wiley & Sons, New York, 1987.
- [25] D. Agudelo, L. Kreplak, H.A. Tajmir-Riahi, Microscopic and spectroscopic analysis of chitosan–DNA conjugates, *Carbohydr. Polym.* 137 (2016) 207–213.
- [26] S.C. Koch, J. Kuper, K.L. Gasteiger, N. Simon, R. Strasser, D. Eisen, S. Geiger, S. Schneider, C. Kisker, T. Carell, Structural insights into the recognition of cisplatin and Aaf-Dg lesion by Rad14 (Xpa), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 (2015) 8272–8277.
- [27] L. Bekale, D. Agudelo, H.A. Tajmir-Riahi, Effect of polymer molecular weight on chitosan–protein interaction, *Colloids Surf., B* 125 (2015) 309–317.
- [28] L. Bekale, P. Chanphai, S. Sanyakmdhorn, D. Agudelo, H.A. Tajmir-Riahi, Microscopic and thermodynamic analysis of PEG–lactoglobulin interaction, *RSC Adv.* 4 (2014) 31084–31093.
- [29] A. Boss, Interaction of tea polyphenols with serum albumins: A fluorescence spectroscopic analysis, *J. Lumin.* 169 (2016) 220–226.
- [30] P.D. Ross, S. Subramanian, Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability, *Biochemistry* 20 (1981) 3096–3102.
- [31] S. Chandra, S. Dietrich, H. Lang, D. Bahadur, Dendrimer–doxorubicin conjugate for enhanced therapeutic effects for cancer, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 5729–5737.
- [32] S. Alex, P. Dupuis, FTIR and Raman investigation of cadmium binding by DNA, *Inorg. Chim. Acta.* 157 (1989) 271–281.
- [33] A. Ahmed Ouameur, H.A. Tajmir-Riahi, Structural analysis of DNA interactions with biogenic polyamines and cobalt (III) hexamine studied by Fourier transform infrared and capillary electrophoresis, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 42041–42054.
- [34] R. Marty, C.N. N'soukpoe-Kossi, D. Charbonneau, C.M. Weinert, L. Kreplak, H.A. Tajmir-Riahi, Structural Analysis of DNA complexation with cationic lipids, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 849–857.
- [35] Y. Mao, L.N. Daniel, N. Whittaker, U. Saffiotti, DNA binding to crystalline silica characterized by Fourier Transform infrared spectroscopy, *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl 10) (1994) 165–171.
- [36] S. Mandal, M. Moudgil, S.K. Mandal, Rational drug design, *Eur. J. Pharmacol.* 625 (2009) 90–100.
- [37] *Scigress Explorer Ultra, Version: 7.7.0.vol. 47*, Fujitsu.
- [38] C.N. N'soukpoe-Kossi, C. Descoteaux, E. Asselin, H.A. Tajmir-Riahi, G. Berube, DNA interaction with novel antitumor estradiol–platinum(II) hybrid molecule: a comparative study with cisplatin drug, *DNA Cell Biol.* 27 (2008) 101–107.
- [39] S. Nafisi, Z. Norouzi, A comparative study on the interaction of cis - and trans - platin with DNA and RNA, *DNA Cell Biol.* 28 (2009) 469–477.

ANNEXE E

ARTICLE COMPLÉMENTAIRE 3

Cette annexe contient le troisième article complémentaire à mon projet de maîtrise qui a été publié en décembre 2018 dans la revue *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* intitulé « *Location of multiple binding sites for testo and testo–Pt(II) with tRNA* ». Les travaux ont été effectués en collaboration avec l'équipe du Dr Heidar-Ali Tajmir-Riahi sur les molécules **11** et **14**. L'article porte sur l'étude de liaison des molécules à l'ARNt par méthodes spectroscopiques.



Location of multiple binding sites for testo and testo-Pt(II) with tRNA

P. Chanphai^a, V. Ouellette^a, S. Mandal^b, S. K. Mandal^c, G. Bérubé^a and H. A. Tajmir-Riahi^a

^aDepartment of Chemistry-Biochemistry and Physics, University of Québec at Trois-Rivières C. P. 500, Trois-Rivières, QC, Canada; ^bInstitute of Cardiovascular Sciences, St. Boniface Hospital Albrechtsen Research Centre, Department of Physiology and Pathophysiology, College of Medicine, Rady Faculty of Health Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada; ^cSt. John's, Newfoundland, Canada and College of the North Atlantic, Faculty of Medicine, Memorial University of Newfoundland, Newfoundland, Canada

Communicated by Ramaswamy H. Sarma

ABSTRACT

We report the binding of testo and testo-Pt(II) complexes (testosterone derivatives) with tRNA in aqueous solution at physiological pH. Thermodynamic parameter ΔH_0 -8 to -3 (kJ mol⁻¹), ΔS_0 35 to 18 (J mol⁻¹K⁻¹) and ΔG_0 -14 to -13 (kJ mol⁻¹) and other spectroscopic results showed drug-tRNA binding occurs via ionic contacts with testo-Pt(II) forming more stable tRNA complexes in comparison to testo: $K_{\text{testo-Pt(II)-tRNA}} = 3.2 (\pm 0.9) \times 10^5 \text{ M}^{-1} > K_{\text{testo-tRNA}} = 2.1 (\pm 0.7) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Molecular modeling showed multiple binding sites for testo and testo-Pt(II) on tRNA molecule. Some of the useful molecular descriptors are calculated. Major structural changes were observed for biopolymers upon drug complexation, while tRNA remains in the A-family structures.

ARTICLE HISTORY

Revised 22 October 2018
Accepted 22 October 2018

KEYWORDS

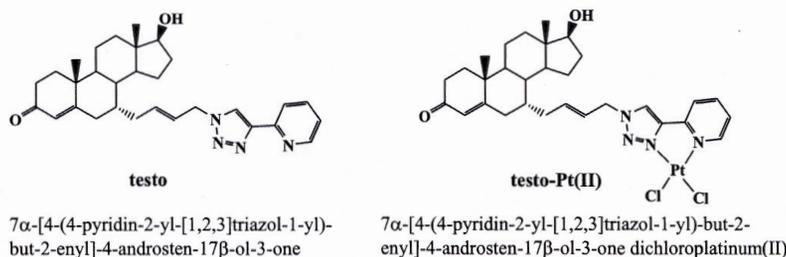
tRNA; testo-Pt(II);
conjugation; spectroscopy; docking

Introduction

The platinum anticancer drugs are of great clinical importance for the treatment of a variety of solid tumors including bladder, cervical, head and neck, lung, ovarian as well as testicular cancer (Dasari & Tchounwou, 2014; Wang & Lippard, 2005). Their main mechanism of action is due to their ability to crosslink with the purine bases on DNA (Dasari & Tchounwou, 2014). This alters the DNA repair mechanisms, leads to important DNA damages and ultimately apoptosis in cancer cells. Unfortunately, the platinum drugs are quite toxic and resistance to treatment occurs in most cases. So the development of improved platinum-based drugs is still a subject of considerable interest to scientists. Recent literature reviews report that long noncoding RNAs are linked to cisplatin resistance (Hu et al., 2018; Kung, Colognori, & Lee, 2013). The expression of long noncoding RNAs are associated to lung adenocarcinoma and ovarian cisplatin resistance and could be used as novel biomarkers (Hu et al., 2018, 2017; Li et al., 2018). A recent report analyzed the binding of cisplatin to RNA (Melnikov, Söll, Steitz, & Polikanov, 2016). Even

though the exact role of cisplatin interaction to RNA is essentially unknown, there are evidence that it could contribute to its overall toxicity (Melnikov et al., 2016). In this context, it is relevant to study the association of novel targeted platinum(II) molecule with RNA and to advance our understanding of such biomolecular interactions.

The effect of RNA-steroid receptor interactions on transcriptional repression and cancer cell is well investigated (Hudson et al., 2015; Oner, Coşan, & Colak, 2016). It has been demonstrated that steroid interaction stabilizes DNA/RNA structure (Blecinski & Richert, 1999), while conjugation of testosterone-based platinum drugs with nucleic acids significantly alters biopolymer structure and dynamic (Cui, Wang, & Chen, 2013; Sanchez-Cano et al., 2010). The interaction of testosterone with nucleic acids does not alter DNA and RNA conformations (Arya & Yang, 1975). However, the conjugation of synthetic estrogen such as diethylstilbestrol (DES) induced major DNA conformational transition (Neault & Tajmir-Riahi, 1996), while RNA structure was not modified (Neault & Tajmir-Riahi, 1997). It has been shown that testosterone and its dimer derivatives alter DNA and tRNA morphology (Chanphai,



Scheme 1. Chemical structures of testo and testo-Pt(II) and their respective chemical names.

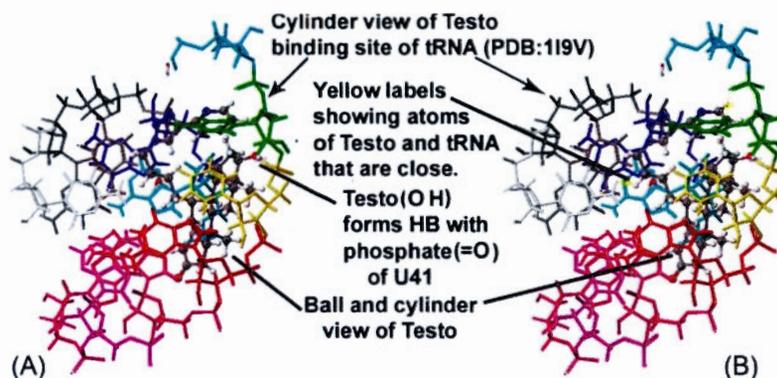


Figure 1. Docking results of testo-tRNA adduct. View of the nearest nucleobases surrounding drug with free binding energy. tRNA sequence from PDB ID 1I9V.

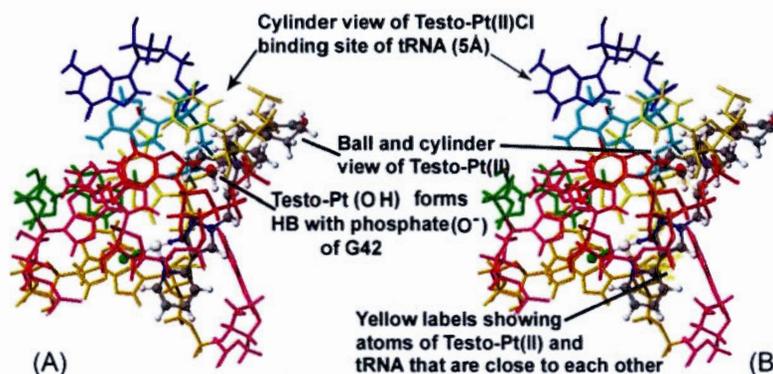


Figure 2. Docking results of testo-Pt(II)-tRNA adduct. View of the nearest nucleobases surrounding drug with free binding energy. tRNA sequence from PDB ID 1I9V.

Table 1. Comparison of tRNA sequences within 3 Å of Neomycin (NMY), testo, and testo-Pt(II).

#	Neomycin	testo	testo-Pt(II)
1	G20	C27	A9
2	A23	C40	G22
3	A44	U41	A23
4	G45	G42	G42
5		G43	G43
6		A44	

Agudelo, Vesper, Bérubé, & Tajmir-Riahi, 2017a, 2017b). Therefore, it was of interest to determine the effect of testo and testo-Pt(II) on tRNA structure and dynamic.

In this article, we report the conjugation of testo and testo-Pt(II) (Scheme 1) with tRNA in aqueous solution and discuss the effect of drug complexation on tRNA structure and molecular dynamic, by means of multiple spectroscopic methods, thermodynamic analysis and molecular modeling.

Experimental

Materials

Transfer RNA from Baker's yeast was purchased from Sigma Chemical Co., and used as supplied. The A_{260}/A_{280} ratio of tRNA was 2.2, indicating that the tRNA was sufficiently free from protein. Testo and testo-Pt(II) (Scheme 1) were made from testosterone purchased from Steraloids Inc., Newport, RI. The final product, testo-Pt(II) was obtained using an eight-step reaction sequence with 7% overall yield. The products were characterized by multiple spectroscopic methods and mass spectrometry (Ouellette et al., 2018).

Preparation of testo- and testo-Pt(II)-tRNA complexes

tRNA was dissolved to 0.5% w/v (5 mg/ml) in Tris-HCl (pH 7.4) at 5 °C for 24 h with occasional stirring to ensure the formation of a homogeneous solution. The final concentration of the stock tRNA solution was determined spectrophotometrically at 260 nm by using molar extinction coefficient of $9250 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ at 260 nm (expressed as molarity of phosphate groups). The methanol/H₂O (50%) stock solutions of testo and testo-Pt(II) (200 μM) were diluted by serial dilution to different concentrations in Tris-HCl (pH 7.2). The drug solution was added to tRNA solution to prepare the drug-tRNA conjugates. Drug-tRNA adducts were characterized by multiple spectroscopic methods, thermodynamic analysis and molecular modeling.

Molecular docking

The docking studies were carried out with Scigress Explorer Ultra, Version: 7.7.0.47, Fujitsu. tRNA structure was obtained from the PDB ID 1I9V (Koch et al., 2015).

UV-Visible spectroscopy

The UV-Vis spectra were recorded on a Cary 60 UV-Visible spectrophotometer with a slit of 2 nm and scan speed of 400 nm min^{-1} . Standard quartz cuvettes of 1 cm were used. The absorbance measurements were performed at pH 7.2 by keeping the concentration of drug constant (60 μM), while increasing tRNA concentrations (1–90 μM). The binding

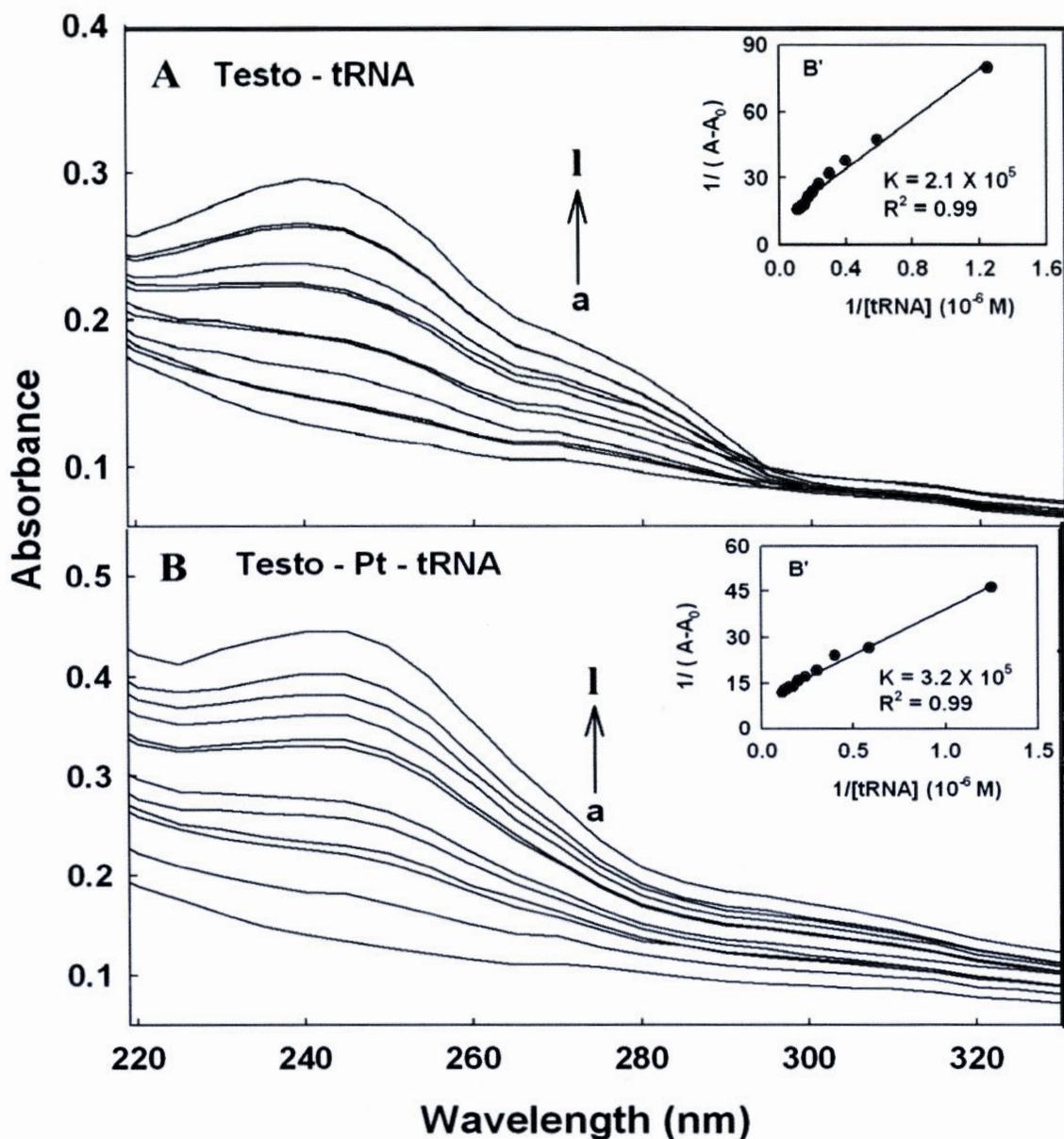


Figure 3. UV-visible spectra of testo and testo-Pt(II) conjugation with tRNA (A) testo and (B) testo-Pt(II) with free drug 60 μM (a) and tRNA at 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, and 90 μM (b-l). Inset: plot of $1/(A_0 - A)$ versus $1/[\text{tRNA}]$ concentration) and binding constant (K) for drug-tRNA conjugates.

Table 2. Variations of the binding constants for tRNA with testo and testo-Pt(II) conjugates at different temperatures.

Complexes	Temperature (K)	Binding constant $K(\text{mol/L})^{-1}$
testo-tRNA	298.15	2.10×10^5
	308.15	1.90×10^5
	318.15	1.77×10^5
testo-Pt(II)-tRNA	298.15	3.21×10^5
	308.15	2.35×10^5
	318.15	1.97×10^5

constants of drug-tRNA complexes were obtained as reported in the literature (Connors, 1987).

FTIR spectroscopy

Infrared spectra were recorded on a FTIR spectrometer (Impact 420 model, Digilab), equipped with deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector and KBr beam splitter, using AgBr windows. The solution of steroid was added dropwise

to the tRNA solution with constant stirring to ensure the formation of homogeneous solution and to reach the target steroid concentrations of 15, 30 and 60 μM with a final tRNA concentration of 60 μM . The detailed spectroscopic treatments were carried out according to previous reports (Alex & Dupuis, 1989).

Results and discussion

Modeling of drug-tRNA complexes

To examine the tRNA binding mode of ligand testo and its platinum derivative testo-Pt(II), we have used the tRNA X-ray structure of PDB ID 119V (Koch et al., 2015). This PDB is a tRNA-neomycin (NMY) complex. We performed docking experiments according to our published method (Gupta et al., 2008; Mandal et al., 2007, 2009). Briefly, we have used the modeling and docking tools (Scigress Explorer Ultra, Version:

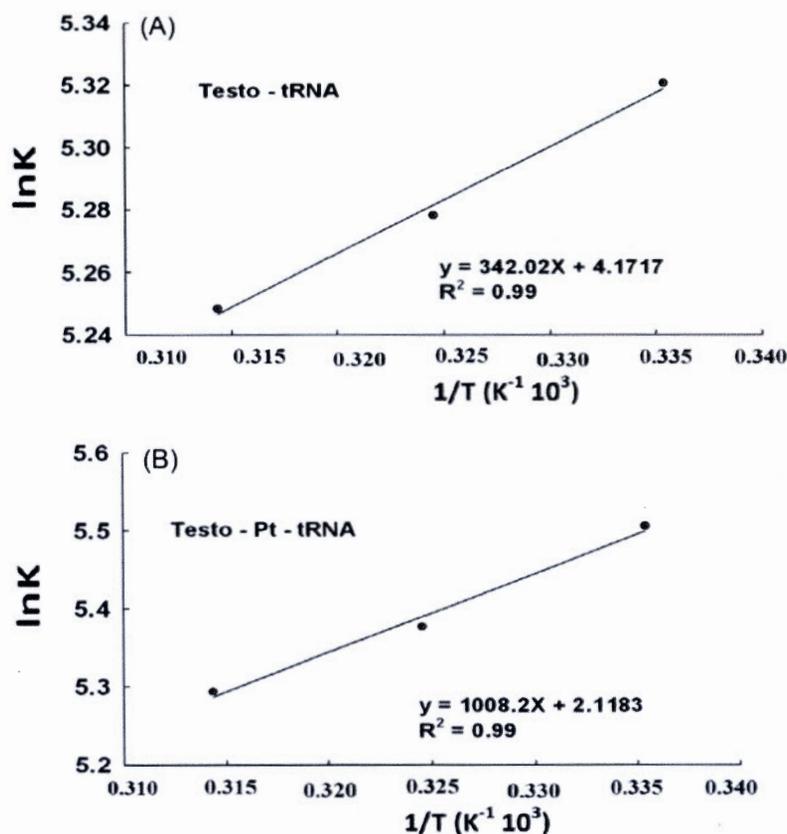


Figure 4. In K versus 1/T for testo and testo-Pt(II) with tRNA conjugates.

Table 3. Thermodynamic parameters for tRNA with testo and testo-Pt(II) conjugates.

Complexes	Thermodynamic parameters			
	ΔH° (kJ. mol ⁻¹)	ΔS° (J. mol ⁻¹ . K ⁻¹)	$T\Delta S^{\circ}$ (kJ. mol ⁻¹)	ΔG° (kJ. mol ⁻¹)
testo-tRNA	-2.84	34.68	10.34	-13.18 (298.15 K)
			10.69	-13.53 (308.15 K)
			11.03	-13.88 (318.15 K)
testo-Pt(II)-tRNA	-8.38	17.61	5.25	-13.63 (298.15 K)
			5.43	-13.81 (308.15 K)
			5.60	-13.99 (318.15 K)

7.7.0.47, Fujitsu) to perform docking experiments of these two compounds, testo and testo-Pt(II)Cl₂. All atoms of tRNA including neomycin (NMY) and water molecules were locked to keep the coordinate positions unchanged. Then hydrogen atoms were added, examined and fixed the hybridization and valence, attention was given to the phosphate groups, and finally performed the molecular mechanics (MM2) to refine the position of the hydrogen atoms. Next, we selected the active site within 10 Å of neomycin. Then docking experiments for a total of 30,000 generations of which 300 iterations per generation were performed. After the docking experiments, we performed molecular mechanics (MM2) to relax both the tRNA and the testo molecule. We obtained a very good docking score of -75.281 kcal/mol. Figure 1(A), shows the binding mode of testo with the tRNA molecule and the hydrogen bond (2.067 Å) between the hydrogen atom (OH) of testo and the phosphate (=O) of uracil (U41). Figure 1(B) shows overlapping of atoms, yellow labels, between atoms of testo and the tRNA molecule that are

close to each other. A fewer yellow labels indicative of less repulsion due to less number of overlapping atoms. For the platinum complex, testo-Pt(II)Cl₂, we used similar approach as above, but we removed one of the chlorine (Cl) atoms. According to published report (Melnikov et al., 2016), the binding mode of cisplatin to mRNA and tRNA is rather different than DNA. In mRNA and tRNA, the cisplatin forms single coordinated bond (Melnikov et al., 2016) by the loss of one of the chlorine atoms. For this reason, we used testo-Pt(II)Cl for docking experiments. Despite reports in the literature for X-ray structures of tRNA-cisplatin complex, we did not find any cisplatin bound 3D structure of tRNA. However, we found the X-ray structure of cisplatin bound to mRNA (Melnikov et al., 2016). We obtained a very similar docking score (-81.468 kcal/mol) for testo-Pt(II)Cl. Figure 2(A) shows the docking view of testo-Pt(II)Cl. As for testo, an hydrogen bond if formed between the OH group of testo-Pt(II)Cl and the phosphate (O⁻) of guanine (G42). As indicated by the number of yellow labels (Figure 2B), that atoms of tRNA molecule and testo-Pt(II)Cl are close to each other. It is interesting to note that despite more yellow labels the tRNA-testo-Pt(II)Cl complex is slightly more stable than testo for two reasons (i) the hydrogen bond distance for testo-Pt(II)Cl is shorter (2.045 Å) than tRNA-testo (2.067 Å) and (ii) the docking score of testo-Pt(II)Cl is more negative value (-81.468 kcal/mol) than testo (-75.781 kcal/mol). Both the testo and testo-Pt(II)Cl form stable complex with tRNA molecule. As shown in Table 1, that NMY, testo, and testo-Pt(II)Cl all share some common nucleotide sequences viz. A23 and A44. According to Table 1, the number of

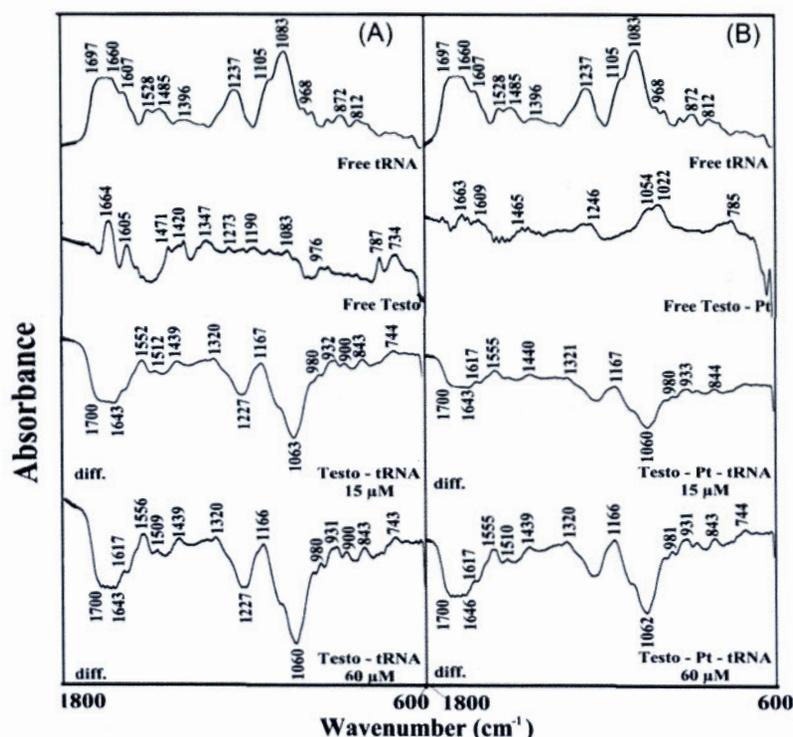


Figure 5. FTIR spectra in the region of 1800–600 cm^{-1} of hydrated films (pH 7.4) for free tRNA (60 μM) and its drug complexes for (A) testo, (B) testo–Pt(II) with difference spectra (diff.) (bottom two curves) obtained at different drug concentrations (indicated on the Figure).

nucleotides is more in numbers for testo compared to testo–Pt(II)Cl molecule. Similarly, Figure 2(B) shows more yellow labels compared to Figure 1(B). These results are in agreement to our experimental results. Also, we have calculated some of the useful descriptors such as $\log P$ (testo 4.295, and testo–Pt(II) 3.937), dipole moments (testo 6.048 D and testo–Pt(II) 20.802D) and solvent accessibility surface area (testo 457.814 \AA^2 and testo–Pt(II) 504.977 \AA^2) for testo and testo–Pt(II) compounds. These are important descriptors to predict the solubility, the distribution, and the toxicity of a drug compound in a biological system.

UV spectra and stability of drug–tRNA complexes

The drug–tRNA binding constants were determined as reported (Connors, 1987). An increasing tRNA concentration resulted into a decrease in UV light absorption, as can be observed (Figure 3). This is consistent with the aggregation of DNA upon drug interaction (Figure 3(A, B)). The double reciprocal plot of $1/(A_0 - A)$ versus $1/(\text{tRNA concentration})$ is linear and the binding constants (K) are calculated from the ratio of the intercept to the slope (Figure 3(A, B)), where A_0 is the initial absorbance of the free drug at 250 nm and A is the recorded absorbance of complexes at different tRNA concentrations. The overall binding constants at 298 K are estimated to be constants $K_{\text{testo-tRNA}} = 2.1 (\pm 0.7) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, and $K_{\text{testo-Pt(II)-tRNA}} = 3.2 (\pm 0.9) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ with the order of stability testo–Pt(II)–tRNA > testo–tRNA (Figure 3 and Table 2). The nature of drug–tRNA interactions regarding hydrophobic, hydrophilic, or H-bonding contacts are determined by thermodynamic analysis of drug–tRNA complexes discussed below.

Thermodynamic analysis of drug–tRNA complexes

The interactions between testo and testo–Pt(II) with tRNA were characterised by thermodynamic analysis. Based on ΔH_0 and ΔS_0 , the drug–tRNA interaction can easily be determined (Boss, 2016; Ross & Subramanian, 1981). The thermodynamic parameters for the interaction of drug and tRNA complexes at 298.15, 308.15 and 318.15 K are presented in Figure 4 and Table 3. The negative sign of ΔG_0 shows that the binding process between drug and tRNA is spontaneous. Furthermore, all the drug–tRNA adducts have negative ΔH_0 , which means the complex formation between tRNA and drug is an exothermic reaction. The negative ΔH_0 and positive ΔS_0 for drug–tRNA adducts indicate that ionic interactions are predominant in the drug–tRNA complex formation (Bekale, Agudelo, & Tajmir-Riahi, 2015; Bekale, Chanphai, Sanyakamdhorn, Agudelo, & Tajmir-Riahi, 2014). For drug–tRNA complexes, the enthalpy provides more contribution to ΔG_0 than entropy, which indicates that the binding process is enthalpy driven (Table 2).

The drug–tRNA binding efficacy was determined as reported (Chandra et al., 2011). The binding efficacy was estimated to be 40% for the testo–tRNA and 50% for the testo–Pt(II)–tRNA adducts. The binding efficacy was superior for testo–Pt(II) than testo–tRNA conjugates.

FTIR spectra and the binding mode of drug–tRNA conjugates

Major alterations of tRNA-in-plane vibrations (Ahmed Ouameur et al., 2010; Marty et al., 2009; N'soukpoé-Kossi et al., 2014) were observed, upon drug–biopolymer conjugation (Figure 5A, B). At low and high drug concentrations

(30–60 μM), major intensity variations and shifting were observed for the guanine band at 1697, uracil at 1660, adenine at 1607, cytosine at 1528 and the PO_2 band at 1237 cm^{-1} (asymmetric stretch) and 1083 cm^{-1} (symmetric stretch) (Figure 5). The negative features observed in the difference spectra of testo- and testo-Pt(II)-RNA complexes in the region 1700–1000 cm^{-1} for guanine, uracil and PO_2 bands are due to decrease in intensity of RNA vibrations caused by drug interactions with G–C and A–U base pairs and the phosphate group (Figure 5(A, B), diff, 15 and 60 μM). The overall spectral shifting observed for the guanine, thymine and adenine bands is due to hydrophilic binding of drug to guanine and adenine N7, uracil O2 and backbone PO_2 groups. It should be noted that since the A-RNA marker bands at 1687 (guanine), 1237 (phosphate) and 812 cm^{-1} (phosphodiester) did not shift upon drug–RNA complexation and thus, RNA remains in the A-family structures.

Conclusions

Testo and testo-Pt(II) bind tRNA at multiple sites via ionic contact and H-bonding. Testo-Pt(II) forms stronger tRNA conjugate than testo. The binding sites of testo and testo-Pt(II) are different. The drug loading efficacy was 40–50%. The testo-Pt(II) drug forms more stable conjugates than those of the cis-Pt–RNA adducts (Nafisi & Norouzi, 2009). Testo and testo-Pt(II) are capable of replacing neomycin from tRNA structure. Major alterations of tRNA were observed upon drug complexation, while tRNA remains in A-family structure.

Acknowledgments

The authors thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for the financial support.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

- Ahmed Ouameur, A., Bourassa, P., & Tajmir-Riahi, H. A. (2010). Probing tRNA interaction with biogenic polyamines. *RNA*, *16*, 1968–1979.
- Alex, S., & Dupuis, P. (1989). FTIR and Raman investigation of cadmium binding by DNA. *Inorganica Chimica Acta*, *157*, 271–281.
- Arya, S. K., & Yang, J. T. (1975). Interaction of steroids with nucleic acids. *Biochemistry*, *14*, 963–969.
- Bekale, L., Agudelo, D., & Tajmir-Riahi, H. A. (2015). Effect of polymer molecular weight on chitosan-protein interaction. *Colloids Surfaces B*, *125*, 309–317.
- Bekale, L., Chanphai, P., Sanyakamdhorn, S., Agudelo, D., & Tajmir-Riahi, H. A. (2014). Microscopic and thermodynamic analysis of PEG-lactoglobulin interaction. *RSC Advances*, *4*, 31084–31093.
- Bleczinski, C. F., & Richert, C. (1999). Steroid-DNA interactions increasing stability, sequence selectivity, DNA/RNA discrimination, and hydrochromicity of oligonucleotide duplexes. *Journal of the American Chemical Society*, *121*, 10889–10894.
- Boss, A. (2016). Interaction of tea polyphenols with serum albumins: A fluorescence spectroscopic analysis. *Journal of Luminescence*, *169*, 220–226.
- Chandra, S., Dietrich, S., Lang, H., & Bahadur, D. (2011). Dendrimer–doxorubicin conjugate for enhanced therapeutic effects for cancer. *Journal of Materials Chemistry*, *21*, 5729–5737.
- Chanphai, P., Agudelo, D., Vesper, A. R., Bérubé, G., & Tajmir-Riahi, H. A. (2017a). Effect of testosterone and its aliphatic and aromatic dimers on DNA morphology. *International Journal of Biological Macromolecules*, *95*, 850–855.
- Chanphai, P., Agudelo, D., Vesper, A. R., Bérubé, G., & Tajmir-Riahi, H. A. (2017b). Testosterone and its dimers alter tRNA morphology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *134*, 269–274.
- Connors, K. (1987). *Binding constants: The measurement of molecular complex stability*. New York: John Wiley & Sons.
- Cui, S., Wang, Y., & Chen, G. (2013). Disturbance of DNA conformation by the binding of testosterone-based platinum drugs via groove-face and intercalative interactions: A molecular dynamics simulation study. *BMC Structural Biology*, *13*, 1–12.
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, *740*, 364–378.
- Gupta, A., Mandal, S. K., Leblanc, V., Descôteaux, C., Asselin, E., & Bérubé, G. (2008). Synthesis and cytotoxic activity of benzopyran-based platinum(II) complexes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *18*, 3982–3987.
- Hu, L., Chen, J., Zhang, F., Wang, J., Pan, J., Chen, J., & Wang, Y. (2017). Aberrant long noncoding RNAs expression profiles affect cisplatin resistance in lung adenocarcinoma. *BioMed Research International*, *2017*, 7498151.
- Hudson, W. H., Pickard, M. R., de Vera, I. M. S., Kuiper, E. G., Mourtada-Maarabouni, M., Conn, G. L., ... Ortlund, A. E. (2015). Conserved sequence-specific lincRNA-steroid receptor interactions drive transcriptional repression and direct cell fate. *Nature Communications*, *5*, 5395. doi:10.1038/ncomms 6395.
- Hu, Y., Zhu, Q.-N., Deng, J. L., Li, Z.-X., Wang, G., & Zhu, Y.-S., (2018). Emerging role of long non-coding RNAs in cisplatin resistance. *Oncotargets and Therapy*, *11*, 3185–3194.
- Koch, S. C., Kuper, J., Gasteiger, K. L., Simon, N., Strasser, R., Eisen, D., ... Carell, T. (2015). Structural insights into the recognition of cisplatin and Aaf-Dg lesion by Rad14 (Xpa). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*, 8272.
- Kung, J. T. Y., Colognori, D., & Lee, J. T. (2013). Long noncoding RNAs: Past, present, and future. *Genetics*, *193*, 651–669.
- Li, Q., Zhang, J., Zhou, J., Yang, B., Liu, P., Cao, L., ... Liu, H. (2018). LncRNAs are novel biomarkers for differentiating between cisplatin-resistant and cisplatin-sensitive ovarian cancer. *Oncology Letters*, *15*, 8363–8370.
- Mandal, S., Bérubé, G., Asselin, E., Richardson, V. J., Church, J. G., Bridson, J., ... Mandal, S. K. (2007). A new platinum complex of triazine demonstrates G1 arrest with novel biological profile in human breast cancer cell line, MDA-MB-468. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *17*(8), 2139–2145.
- Mandal, S., Moudgil, M., & Mandal, S. K. (2009). Rational drug design. *European Journal of Pharmacology*, *625*(1–3), 90–100.
- Marty, R., N'soukpoe-Kossi, C. N., Charbonneau, D., & Kreplak, L., Tajmir-Riahi, H. A. (2009). Structural characterization of cationic lipid-tRNA complexes. *Nucleic Acids Research*, *37*, 5197–5207.
- Melnikov, S. V., Söll, D., Steitz, T. A., & Polikanov, Y. S. (2016). Insights into RNA binding by the anticancer drug cisplatin from the crystal structure of cisplatin-modified ribosome. *Nucleic Acids Research*, *44*(10), 4978–4987.
- N'soukpoe-Kossi, C. N., Bourassa, P., Mandeville, J. S., & Tajmir-Riahi, H. A. (2014). Modelling of vitamin A binding to tRNA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *99*, 28–34.
- Nafisi, S., & Norouzi, Z. (2009). A comparative study on the interaction of cis- and trans-platin with DNA and RNA. *DNA and Cell Biology*, *28*, 469–477.
- Neault, J. F., & Tajmir-Riahi, H. A. (1996). Diethylstilbestrol-DNA interaction studied by Fourier transform infrared and Raman spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, *271*, 8140–8143.

- Neault, J. F., & Tajmir-Riahi, H. A. (1997). RNA-Diethylstilbestrol interaction studied by Fourier transform infrared difference spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 8901–8904.
- Oner, C., Coşan, D. T., E., & Colak, E. (2016). Estrogen and androgen hormone levels modulate the expression of PIWI interacting RNA in prostate and breast cancer. *PLoS One*, 11, e0159044.
- Ouellette, V., Côté, M.-F., Gaudreault, R. C., Tajmir-Riahi, H. A., & Bérubé, G. (2018). 2nd Generation testosterone-platinum(II) hybrid molecules for site-specific treatment of androgen receptor positive prostate cancer: Design, synthesis and antiproliferative activity. (Manuscript in Preparation).
- Ross, P. D., & Subramanian, S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20, 3096–3102.
- Sanchez-Cano, C., Huxley, M., Ducani, C., Hamad, A. E., Browning, M. J., Navarro-Ranninger, C., ... Hannon, M. J. (2010). Conjugation of testosterone modifies the interaction of mono-functional cationic platinum(II) complexes with DNA, causing significant alterations the DNA helix. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 39, 11365–11374.
- Scigress Explorer Ultra, Version: 7.7.0.47, Fujitsu.
- Wang, D., & Lippard, S. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 4, 307–320.

RÉFÉRENCES

- [1] Ruddon, R.W. *Cancer Biology*. Oxford University Press, **2007**.
- [2] Kleinsmith, L.J. *Principles of Cancer Biology*. Pearson Benjamin Cummings, **2006**.
- [3] Fleming, S., The molecular biology of cancer: The basics. *Surgery (Oxford)*, **2003**, *21*, (11).
- [4] Martini, F.H.; Timmons, M.J.; Tallitsch, R.B. *Human Anatomy (7th Edition)*. Pearson Benjamin Cummings, **2012**.
- [5] Pentyala, S.N.; Lee, J.; Hsieh, K.; Waltzer, W.C.; Trocchia, A.; Musacchia, L.; Rebecchi, M.J.; Khan, S.A., Prostate cancer: A comprehensive review. *Medical Oncology*, **2000**, *17*, (2), 85-105.
- [6] Hanahan, D.; Weinberg, R.A., The Hallmarks of Cancer. *Cell*, **2000**, *100*, (1), 57-70.
- [7] Russell, P.J.; Bennett, S.; Stricker, P., Growth factor involvement in progression of prostate cancer. *Clinical Chemistry*, **1998**, *44*, (4), 705-723.
- [8] Sriram, D. *Medicinal Chemistry*. Pearson Education, **2010**.
- [9] Carson, N. In *Physiology of Behavior, 11th edition*; Pearson, **2012**, p 768.
- [10] Jin, Y.; Penning, T.M., Steroid 5 α -reductases and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2001**, *15*, (1), 79-94.
- [11] Heinlein, C.A.; Chang, C., Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine Reviews*, **2004**, *25*, (2), 276-308.

- [12] Lu, N.Z.; Wardell, S.E.; Burnstein, K.L.; Defranco, D.; Fuller, P.J.; Giguere, V.; Hochberg, R.B.; McKay, L.; Renoir, J.-M.; Weigel, N.L.; Wilson, E.M.; McDonnell, D.P.; Cidlowski, J.A., International Union of Pharmacology. LXV. The Pharmacology and Classification of the Nuclear Receptor Superfamily: Glucocorticoid, Mineralocorticoid, Progesterone, and Androgen Receptors. *Pharmacological Reviews*, **2006**, *58*, (4), 782-797.
- [13] Lindzey, J.; Kumar, M.V.; Grossman, M.; Young, C.; Tindall, D.J., Molecular Mechanisms of Androgen Action. *Vitamins and Hormones*, **1994**, *49*, 383-432.
- [14] MacLean, H.E.; Warne, G.L.; Zajac, J.D., Localization of functional domains in the androgen receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **1997**, *62*, (4), 233-242.
- [15] Grossmann, M.E.; Huang, H.; Tindall, D.J., Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, **2001**, *93*, (22), 1687-1697.
- [16] Davey, R.A.; Grossmann, M., Androgen receptor structure, function and biology: From bench to bedside. *The Clinical Biochemist Reviews*, **2016**, *37*, (1), 3-15.
- [17] Pereira de Jésus-Tran, K.; Côté, P.-L.; Cantin, L.; Blanchet, J.; Labrie, F.; Breton, R., Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. *Protein Science*, **2006**, *15*, (5), 987-999.
- [18] Mowszowicz, I.; Irene, M.; Wright, F.; Bouchard, P.; Kuttann, F.; Mauvais-Jarvis, P., Androgen receptor in human skin cytosol. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **1981**, *52*, (2), 338-344.
- [19] Yeh, S.; Chang, H.-C.; Miyamoto, H.; Takatera, H.; Rahman, M.; Kang, H.-Y.; Thin, T.H.; Lin, H.-K.; Chang, C., Differential induction of the androgen receptor transcriptional activity by selective androgen receptor coactivators. *The Keio Journal of Medicine*, **1999**, *48*, (2), 87-92.
- [20] Lallous, N.; Dalal, K.; Cherkasov, A.; Rennie, S.P., Targeting alternative sites on the androgen receptor to treat castration-resistant prostate cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **2013**, *14*, (6).

- [21] Wadosky, K.M.; Koochekpour, S., Therapeutic rationales, progresses, failures, and future directions for advanced prostate cancer. *International Journal of Biological Sciences*, **2016**, *12*, (4), 409-426.
- [22] Green, S.M.; Mostaghel, E.A.; Nelson, P.S., Androgen action and metabolism in prostate cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2012**, *360*, (1), 3-13.
- [23] Mottet, N.; Bellmunt, J.; Bolla, M.; Briers, E.; Cumberbatch, M.G.; De Santis, M.; Fossati, N.; Gross, T.; Henry, A.M.; Joniau, S.; Lam, T.B.; Mason, M.D.; Matveev, V.B.; Moldovan, P.C.; van den Bergh, R.C.N.; Van den Broeck, T.; van der Poel, H.G.; van der Kwast, T.H.; Rouvière, O.; Schoots, I.G.; Wiegel, T.; Cornford, P., EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and local treatment with curative intent. *European Urology*, **2017**, *71*, (4), 618-629.
- [24] Denis Louis, J.; Griffiths, K., Endocrine treatment in prostate cancer. *Seminars in Surgical Oncology*, **1999**, *18*, (1), 52-74.
- [25] Cornford, P.; Bellmunt, J.; Bolla, M.; Briers, E.; De Santis, M.; Gross, T.; Henry, A.M.; Joniau, S.; Lam, T.B.; Mason, M.D.; van der Poel, H.G.; van der Kwast, T.H.; Rouvière, O.; Wiegel, T.; Mottet, N., EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of relapsing, metastatic, and castration-resistant prostate cancer. *European Urology*, **2017**, *71*, (4), 630-642.
- [26] Michael, A.; Syrigos, K.; Pandha, H., Prostate cancer chemotherapy in the era of targeted therapy. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, **2008**, *12*, 13-16.
- [27] Vale, R.D., The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport. *Cell*, **2003**, *112*, (4), 467-480.
- [28] Hager, S.; Ackermann, C.J.; Joerger, M.; Gillessen, S.; Omlin, A., Anti-tumour activity of platinum compounds in advanced prostate cancer—a systematic literature review. *Annals of Oncology*, **2016**, *27*, (6), 975-984.
- [29] Sundararajan, S.; Vogelzang, N., Chemotherapy in the treatment of prostate cancer - The past, the present, and the future. *American Journal of Hematology/Oncology*, **2014**, *10*, (6).

- [30] Helsen, C.; Van den Broeck, T.; Voet, A.; Prekovic, S.; Van Poppel, H.; Joniau, S.; Claessens, F., Androgen receptor antagonists for prostate cancer therapy. *Endocrine-related cancer*, **2014**, *21*, (4), 105-118.
- [31] Singh, S.M.; Gauthier, S.; Labrie, F., Androgen receptor antagonists (antiandrogens) structure-activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*, **2000**, *7*, (2), 211-247.
- [32] Tran, C.; Ouk, S.; Clegg, N.J.; Chen, Y.; Watson, P.A.; Arora, V.; Wongvipat, J.; Smith-Jones, P.M.; Yoo, D.; Kwon, A., Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*, **2009**, *324*, (5928), 787-790.
- [33] Johnstone, T.C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S.J., The next generation of platinum drugs: targeted Pt (II) agents, nanoparticle delivery, and Pt (IV) prodrugs. *Chemical Reviews*, **2016**, *116*, (5), 3436-3486.
- [34] Johnstone, T.C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S.J., Third row transition metals for the treatment of cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, **2015**, *373*, (2037).
- [35] Ralhan, R.; Kaur, J., Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **2007**, *17*, (9), 1061-1075.
- [36] Chu, C.S.; Rubin, S.C. In *Clinical Gynecologic Oncology (Eighth Edition)*. Di Saia, P.J.; Creasman, W.T., Eds.; Mosby: Philadelphia, **2012**, pp 515-538.
- [37] Sigel, H., Clinical aspects of platinum anticancer drugs. *Metal ions in biological systems, metal complexes as anticancer agents*, **1980**.
- [38] Wilson, J.J.; Lippard, S.J., Synthetic methods for the preparation of platinum anticancer complexes. *Chemical Reviews*, **2013**, *114*, (8), 4470-4495.
- [39] Dasari, S.; Tchounwou, P.B., Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, **2014**, *740*, 364-378.
- [40] Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T., Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, **1965**, *205*, (4972), 698-699.

- [41] Gately, D.P.; Howell, S.B., Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *British Journal of Cancer*, **1993**, *67*, (6), 1171-1176.
- [42] Reishus, J.W.; Martin Jr, D.S., cis-Dichlorodiammineplatinum (II). Acid Hydrolysis and Isotopic Exchange of the Chloride Ligands¹. *Journal of the American Chemical Society*, **1961**, *83*, (11), 2457-2462.
- [43] Kartalou, M.; Essigmann, J.M., Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **2001**, *478*, (1), 1-21.
- [44] Brabec, V.; Hrabina, O.; Kasparikova, J., Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents. *Coordination Chemistry Reviews*, **2017**, *351*, 2-31.
- [45] Cohen, G.L.; Bauer, W.R.; Barton, J.K.; Lippard, S.J., Binding of cis- and trans-dichlorodiammineplatinum (II) to DNA: evidence for unwinding and shortening of the double helix. *Science*, **1979**, *203*, (4384), 1014-1016.
- [46] Wang, D.; Lippard, S.J., Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2005**, *4*, 307-320.
- [47] Apps, M.G.; Choi, E.H.Y.; Wheate, N.J., The state-of-play and future of platinum drugs. *Endocrine-related Cancer*, **2015**, *22*, (4), R219-R233.
- [48] Ruggiero, A.; Trombatore, G.; Triarico, S.; Arena, R.; Ferrara, P.; Scalzone, M.; Pierri, F.; Riccardi, R., Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management. *Anti-cancer Drugs*, **2013**, *24*, (10), 1007-1019.
- [49] Wang, X.; Guo, Z., Targeting and delivery of platinum-based anticancer drugs. *Chemical Society Reviews*, **2013**, *42*, (1), 202-224.
- [50] Walter, H.S.; Ahmed, S., Targeted therapies in cancer. *Surgery (Oxford)*, **2018**, *36*, (3), 122-127.
- [51] Strebhardt, K.; Ullrich, A., Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer*, **2008**, *8*, (6), 473-480.

- [52] Bruijninx, P.C.A.; Sadler, P.J., New trends for metal complexes with anticancer activity. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2008**, *12*, (2), 197-206.
- [53] Wermuth, C.G.; Ganellin, C.R.; Lindberg, P.; Mitscher, L.A. In *Pure and Applied Chemistry*, **1998**; Vol. 70, pp 1129-1143.
- [54] Dancey, J.E.; Chen, H.X., Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. *Nature Reviews Drug discovery*, **2006**, *5*, (8), 649-659.
- [55] Momekov, G.; Momekova, D., Recent developments in antitumour platinum coordination compounds. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **2006**, *16*, (10), 1383-1403.
- [56] Séné, A.; Bérubé, G.; Gaudreault, R.C., Synthesis and preliminary in vitro cytotoxic activity of novel cisplatin and carboplatin analogues. *Drug Design and Discovery*, **1998**, *15*, (4), 277-285.
- [57] Descôteaux, C.; Provencher-Mandeville, J.; Mathieu, I.; Perron, V.; Mandal, S.K.; Asselin, É.; Bérubé, G., Synthesis of 17 β -estradiol platinum(II) complexes: biological evaluation on breast cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2003**, *13*, (22), 3927-3931.
- [58] Perron, V.; Rabouin, D.; Asselin, É.; Parent, S.; C.-Gaudreault, R.; Bérubé, G., Synthesis of 17 β -estradiol-linked platinum(II) complexes and their cytotoxic activity on estrogen-dependent and -independent breast tumor cells. *Bioorganic Chemistry*, **2005**, *33*, (1), 1-15.
- [59] Van Themsche, C.; Parent, S.; Leblanc, V.; Descôteaux, C.; Simard, A.-M.; Bérubé, G.; Asselin, E., VP-128, a novel oestradiol-platinum (II) hybrid with selective anti-tumour activity towards hormone-dependent breast cancer cells in vivo. *Endocrine-related Cancer*, **2009**, *16*, (4), 1185-1195.
- [60] Brasseur, K.; Leblanc, V.; Fabi, F.; Parent, S.; Descôteaux, C.; Bérubé, G.; Asselin, E., ER α -targeted therapy in ovarian cancer cells by a novel estradiol-platinum (II) hybrid. *Endocrinology*, **2013**, *154*, (7), 2281-2295.

- [61] Descôteaux, C.; Leblanc, V.; Bélanger, G.; Parent, S.; Asselin, É.; Bérubé, G., Improved synthesis of unique estradiol-linked platinum(II) complexes showing potent cytotoxic activity and affinity for the estrogen receptor alpha and beta. *Steroids*, **2008**, *73*, (11), 1077-1089.
- [62] Bastien, D.; Hanna, R.; Leblanc, V.; Asselin, É.; Bérubé, G., Synthesis and preliminary in vitro biological evaluation of 7 α -testosterone-chlorambucil hybrid designed for the treatment of prostate cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2013**, *64*, 442-447.
- [63] Fortin, S.; Brasseur, K.; Morin, N.; Asselin, É.; Bérubé, G., New platinum (II) complexes conjugated at position 7 α of 17 β -acetyl-testosterone as new combi-molecules against prostate cancer: Design, synthesis, structure-activity relationships and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2013**, *68*, 433-443.
- [64] Bastien, D.; Leblanc, V.; Asselin, É.; Bérubé, G., First synthesis of separable isomeric testosterone dimers showing differential activities on prostate cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2010**, *20*, (7), 2078-2081.
- [65] Bérubé, G., Natural and synthetic biologically active dimeric molecules: anticancer agents, anti-HIV agents, steroid derivatives and opioid antagonists. *Current Medicinal Chemistry*, **2006**, *13*, (2), 131-154.
- [66] Portoghese, P.S., The role of concepts in structure-activity relationship studies of opioid ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1992**, *35*, (11), 1927-1937.
- [67] Vesper, A.-R.; Lacroix, J.; René, C.; Tajmir-Rihai, H.-A.; Bérubé, G., Synthesis of novel C2-symmetric testosterone dimers and evaluation of antiproliferative activity on androgen-dependent and-independent prostate cancer cell lines. *Steroids*, **2016**, *115*, 98-104.
- [68] Bucourt, R.; Vignau, M.; Torelli, V., New biospecific adsorbents for the purification of estradiol receptor. *J Biol Chem*, **1978**, *253*, (22), 8221-8228.
- [69] Douglas, G.H.; Teller, D.M.; Smith, H.; 6-substituted-13-polycarbon-alkyl-18 19-dinoregn-4-en-3-ones, US Patent 3,644,440, **1972**.
- [70] Nickisch, K.; Laurent, H., Stereoselektive Synthese von 7 α -allyl- und 7 α -propylsteroiden. *Tetrahedron Letters*, **1988**, *29*, (13), 1533-1536.

- [71] Hosomi, A.; Sakurai, H., Syntheses of γ,δ -unsaturated alcohols from allylsilanes and carbonyl compounds in the presence of titanium tetrachloride. *Tetrahedron Letters*, **1976**, *17*, (16), 1295-1298.
- [72] Yamasaki, S.; Fujii, K.; Wada, R.; Kanai, M.; Shibasaki, M., A General Catalytic Allylation Using Allyltrimethoxysilane. *Journal of the American Chemical Society*, **2002**, *124*, (23), 6536-6537.
- [73] Pardo, R.; Zahra, J.-P.; Santelli, M., Conjugate addition of allylsilanes to α,β -enones. Obtention of cyclobutyl derivatives. *Tetrahedron Letters*, **1979**, *20*, (47), 4557-4560.
- [74] Colvin, E.W. In *Silicon in Organic Synthesis*; Butterworth-Heinemann, **1981**, pp 15-20.
- [75] Yee, N.K.; Farina, V.; Houpis, I.N.; Haddad, N.; Frutos, R.P.; Gallou, F.; Wang, X.-j.; Wei, X.; Simpson, R.D.; Feng, X.; Fuchs, V.; Xu, Y.; Tan, J.; Zhang, L.; Xu, J.; Smith-Keenan, L.L.; Vitous, J.; Ridges, M.D.; Spinelli, E.M.; Johnson, M.; Donsbach, K.; Nicola, T.; Brenner, M.; Winter, E.; Kreye, P.; Samstag, W., Efficient large-scale synthesis of BILN 2061, a potent HCV protease inhibitor, by a convergent approach based on ring-closing metathesis. *The Journal of Organic Chemistry*, **2006**, *71*, (19), 7133-7145.
- [76] Trnka, T.M.; Grubbs, R.H., The development of L2X2RuCHR olefin metathesis catalysts: an organometallic success story. *Accounts of Chemical Research*, **2001**, *34*, (1), 18-29.
- [77] Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B., Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, **2001**, *40*, (11), 2004-2021.
- [78] Atilgan, A.; Tanriverdi Eçik, E.; Guliyev, R.; Uyar, T.B.; Erbas-Cakmak, S.; Akkaya Engin, U., Near-IR-triggered, remote-controlled release of metal ions: A novel strategy for caged ions. *Angewandte Chemie International Edition*, **2014**, *126*, (40), 10854-10857.
- [79] Rostovtsev Vsevolod, V.; Green Luke, G.; Fokin Valery, V.; Sharpless, K.B., A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie*, **2002**, *114*, (14), 2708-2711.

- [80] Huisgen, R., 1,3-Dipolare Cycloadditionen Rückschau und Ausblick. *Angewandte Chemie*, **1963**, *75*, (13), 604-637.
- [81] Huisgen, R., 1,3-Dipolar cycloadditions. 76. Concerted nature of 1,3-dipolar cycloadditions and the question of diradical intermediates. *The Journal of Organic Chemistry*, **1976**, *41*, (3), 403-419.
- [82] Boren, B.C.; Narayan, S.; Rasmussen, L.K.; Zhang, L.; Zhao, H.; Lin, Z.; Jia, G.; Fokin, V.V., Ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition: Scope and mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, **2008**, *130*, (28), 8923-8930.
- [83] Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V.V.; Noodleman, L.; Sharpless, K.B.; Fokin, V.V., Copper (I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *Journal of the American Chemical Society*, **2005**, *127*, (1), 210-216.
- [84] Rodionov, V.O.; Fokin, V.V.; Finn, M.G., Mechanism of the ligand-free CuI-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. *Angewandte Chemie*, **2005**, *117*, (15), 2250-2255.
- [85] Rodionov, V.O.; Presolski, S.I.; Díaz Díaz, D.; Fokin, V.V.; Finn, M.G., Ligand-accelerated Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition: A mechanistic report. *Journal of the American Chemical Society*, **2007**, *129*, (42), 12705-12712.
- [86] Kuang, G.-C.; Guha, P.M.; Brotherton, W.S.; Simmons, J.T.; Stankee, L.A.; Nguyen, B.T.; Clark, R.J.; Zhu, L., Experimental investigation on the mechanism of chelation-assisted, copper (II) acetate-accelerated azide-alkyne cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, **2011**, *133*, (35), 13984-14001.
- [87] Worrell, B.T.; Malik, J.A.; Fokin, V.V., Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu (I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science*, **2013**, *340*, (6131), 457-460.
- [88] Struthers, H.; Viertl, D.; Kosinski, M.; Spingler, B.; Buchegger, F.; Schibli, R., Charge dependent substrate activity of C3' and N3 functionalized, organometallic Technetium and Rhenium-labeled thymidine derivatives toward human thymidine kinase 1. *Bioconjugate Chemistry*, **2010**, *21*, (4), 622-634.

- [89] Hall, M.D.; Telma, K.A.; Chang, K.-E.; Lee, T.D.; Madigan, J.P.; Lloyd, J.R.; Goldlust, I.S.; Hoeschele, J.D.; Gottesman, M.M., Say no to DMSO: dimethylsulfoxide inactivates cisplatin, carboplatin, and other platinum complexes. *Cancer Research*, **2014**.
- [90] Jennette, K.W.; Lippard, S.J.; Vassiliades, G.A.; Bauer, W.R., Metallointercalation reagents. 2-hydroxyethanethiolato (2, 2', 2''-terpyridine)-platinum (II) monocation binds strongly to DNA by intercalation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1974**, *71*, (10), 3839-3843.
- [91] Hannon, M.J.; Green, P.S.; Fisher, D.M.; Derrick, P.J.; Beck, J.L.; Watt, S.J.; Ralph, S.F.; Sheil, M.M.; Barker, P.R.; Alcock, N.W., An estrogen-platinum terpyridine conjugate: DNA and protein binding and cellular delivery. *Chemistry—A European Journal*, **2006**, *12*, (31), 8000-8013.
- [92] Allampally, N.K.; Daniliuc, C.-G.; Strassert, C.A.; De Cola, L., Tuning the structural and photophysical properties of cationic Pt (II) complexes bearing neutral bis (triazolyl) pyridine ligands. *Inorganic chemistry*, **2015**, *54*, (4), 1588-1596.
- [93] Deo, K.M.; Ang, D.L.; McGhie, B.; Rajamanickam, A.; Dhiman, A.; Khoury, A.; Holland, J.; Bjelosevic, A.; Pages, B.; Gordon, C., Platinum coordination compounds with potent anticancer activity. *Coordination Chemistry Reviews*, **2017**.
- [94] Thompson, D.L.; Reeves, P.C., Phase-transfer-catalyzed alkylation of ethyl acetoacetate and diethyl malonate. *Journal of Chemical Education*, **1985**, *62*, (10), 907.
- [95] Zhang, H.J.; Demerseman, B.; Xi, Z.; Bruneau, C., Ruthenium catalysts for controlled mono-and bis-allylation of active methylene compounds with aliphatic allylic substrates. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2009**, *351*, (16), 2724-2728.
- [96] Alimirah, F.; Chen, J.; Basrawala, Z.; Xin, H.; Choubey, D., DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: Implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Letters*, **2006**, *580*, (9), 2294-2300.

- [97] Horoszewicz, J.S.; Leong, S.S.; Kawinski, E.; Karr, J.P.; Rosenthal, H.; Chu, T.M.; Mirand, E.A.; Murphy, G.P., LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Research*, **1983**, *43*, (4), 1809-1818.
- [98] Stone Kenneth, R.; Mickey Don, D.; Wunderli, H.; Mickey George, H.; Paulson David, F., Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International Journal of Cancer*, **1978**, *21*, (3), 274-281.
- [99] Kaighn, M.E.; Narayan, K.S.; Ohnuki, Y.; Lechner, J.F.; Jones, L.W., Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative Urology*, **1979**, *17*, (1), 16-23.
- [100] Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R., New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, **1990**, *82*, (13), 1107-1112.
- [101] Vichai, V.; Kirtikara, K., Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, **2006**, *1*, (3), 1112-1116.
- [102] H Zhou, C.; Wang, Y., Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. *Current Medicinal Chemistry*, **2012**, *19*, (2), 239-280.
- [103] Armarego, W.L.F.; Chai, C.L.L. In *Purification of Laboratory Chemicals (Sixth Edition)*; Butterworth-Heinemann: Oxford, **2009**, p 743.
- [104] Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, A., Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *The Journal of Organic Chemistry*, **1978**, *43*, (14), 2923-2925.