

**Université catholique de Louvain**

Institut de la Matière Condensée et des Nanosciences (IMCN)

Pôle Molécules, Solides et Réactivité (MOST)

Professeur Olivier Riant



**Développement et validation *in vitro* de  
nouvelles prodrogues sélectives de l'hypoxie  
tumorale**

Thèse présentée en vue de l'obtention  
du grade de docteur en sciences

**Fatakanwa Claver**

Louvain-la-Neuve

**Juin 2016**



# Composition du Jury

**Professeur Daniel PEETERS (Président)**

Université catholique de Louvain

**Professeur Michael SINGLETON**

Université catholique de Louvain

**Professeure Annemieke MADDER**

Ghent University

**Professeur Sébastien PAPOT**

Université de Poitiers

**Professeur Olivier Riant (Promoteur)**

Université catholique de Louvain

**Professeur Olivier FERON (Promoteur)**

Université catholique de Louvain



# Remerciements

L'aboutissement de cette thèse est le fruit des efforts de différentes personnes auxquelles je tiens à rendre hommage.

Mes vifs remerciements s'adressent tout particulièrement au Professeur Olivier RIAANT, le promoteur de la présente thèse. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a témoignée pour intégrer son équipe de recherche. Tout commence en 2010 lorsque j'ai intégré son équipe pour faire le stage de recherche de niveau master 2, à l'issue duquel cette thèse a été entreprise. Sa bienveillance pour la recherche du financement de cette thèse mérite une reconnaissance inexprimable. Merci pour ses enseignements réguliers qui ont été des voies de sortie après quelques échecs tout au long de cette thèse. Son sens humain combiné à ses capacités scientifiques resteront gravés dans ma mémoire. Ces courtes phrases sont loin d'être la réalité de ma reconnaissance envers son soutien pendant mon séjour en Belgique, que ses ambitions soient réalisées.

J'exprime aussi ma profonde gratitude au Professeur Olivier FERON, également promoteur de cette thèse qui m'a accueilli dans son laboratoire. Il a régulièrement organisé des réunions qui ont combiné les connaissances de chimistes à celles de biologistes pour une bonne orientation de cette thèse. Je serai toujours reconnaissant pour ces discussions scientifiques et pour le travail réalisé dans son laboratoire.

Mes remerciements vont également aux membres du jury qui ont accepté de lire, juger et apporter leur contribution scientifique à cette thèse, malgré leurs agendas surchargés. Tout particulièrement, le Professeure Annemieke MADDER de l'Université de Ghent, qui a accepté de faire partie du comité d'accompagnement pour ma formation doctorale et de participer à ce jury de thèse, est remerciée. Ses précieuses observations et remarques formulées au milieu de la thèse nous ont été utiles pour la suite de la thèse.

Ma reconnaissance va également au Professeur Sébastien PAPOT de l'Université de Poitiers qui m'a fait l'honneur de juger cette thèse. Son expertise dans le domaine des prodrogues anti-cancéreuses et son attention apportée à ce travail ont bien contribué à sa qualité finale.

Merci au Professeur Michael SINGLETON, pour son intérêt accordé en lisant en détail cette thèse. Ses observations et suggestions ont été enrichissantes pour la qualité de cette thèse. Je remercie également le Professeur Daniel Peeters qui a assuré la présidence de ce jury.

Ma gratitude va aussi au Professeur Raphaël ROBIETTE qui a accepté de faire partie de mon comité d'accompagnement.

Je remercie chaleureusement Madame Chantal DELAET pour tous les aspects administratifs du début à la fin de mon parcours doctoral. Son humanisme et sa bonne humeur qui anime le labo me marqueront toujours.

Je témoigne également ma gratitude à Madame Laurence PETIT qui a réalisé avec gentillesse les manipulations biologiques présentées dans cette thèse.

Cette thèse a été réalisée dans un environnement scientifique de qualité. Mes remerciements vont également à tous mes cher(e)s collègues membres du laboratoire, anciens et nouveaux que j'ai côtoyés pendant mon parcours doctoral. Leur relation amicale, l'ambiance, les conseils et les discussions scientifiques ont rendu le laboratoire un environnement de travail agréable. Plus particulièrement Mathieu SOETENS qui a relu généreusement tout le manuscrit pour les fautes d'orthographe et les erreurs grammaticales. Sa gentillesse, sa disponibilité et son sens du perfectionnement m'ont fort marqué.

Merci à François BILLARD pour les aspects techniques et logistiques permettant au labo de tourner à la normale. Ses travaux d'analyse par DLS en collaboration avec Elio POGGI sont remerciés. Merci à Antonin DESMECHT pour les analyses XPS, et Tommy HAYNES pour les images TEM. Je ne peux pas oublier Thomas HERMANT qui m'a appris à manipuler et Seb. Vercruysse, Fady, Yohan pour l'animation dans le labo, Virginie, Zainab, Fleur nos anciens pour leurs discussions scientifiques enrichissantes dans les séminaires

hebdomadaires. Merci à Corentin appelé actuellement doyen de l'équipe pour son aide pendant ces 5 années passées ensemble au labo, Xavier pour les conseils et les moments passés ensemble en bus vers Bruxelles, Loic pour l'aspect informatique. Merci à Audric champion du labo, ton encouragement pour faire les 5 miles de LLN m'a rajeuni de 5 ans, mes co-équipiers Seb. Leloux, Ricky, Arnaud, et Phoenix, Adrien, Yoshiko, Kiran notre nouveau reçu,... Ils sont nombreux à figurer ici, que chacun trouve ici ma reconnaissance. Le Professeur Jean NTAGANDA du département de chimie à l'Université du Rwanda est vivement remercié pour ses encouragements et les conseils qu'il m'a donnés avant d'embarquer pour la Belgique en 2009.

Finalement je remercie mon épouse, nos enfants et ma famille élargie, pour leurs encouragements et compréhension. Ce travail est en partie le fruit de leur affection.

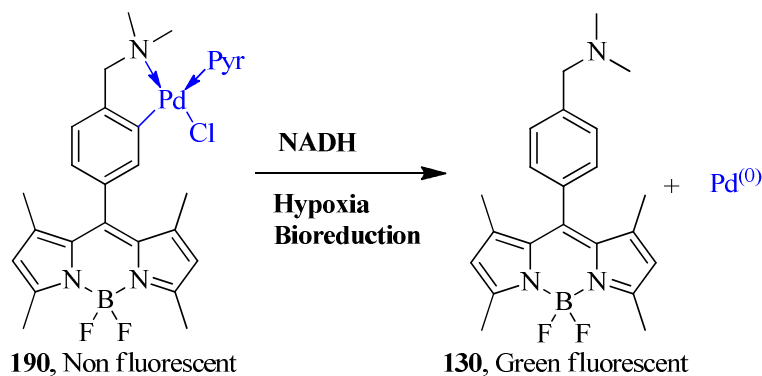
Je suis également très reconnaissant envers l'Université Catholique de Louvain qui a accepté de financer mon séjour doctoral et les fonds de la FNRS.

Que toute personne qui a apporté son aide, qu'elle soit un sourire, un encouragement, trouve ici ma reconnaissance.



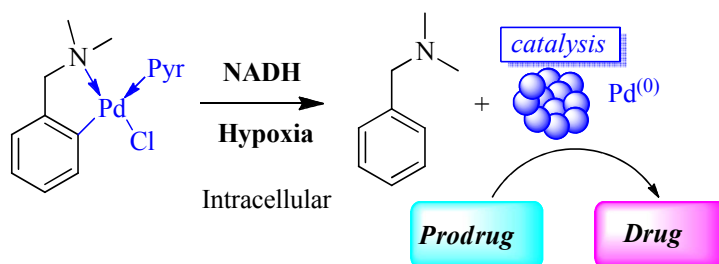
# Abstract

During this PhD thesis, we have explored the domain of chemical reactions catalyzed by palladium in cancer cells. Firstly, we have developed a tumor hypoxia marker based on BODIPY fluorescent ligand complexed to palladium (Figure 1). This non fluorescent marker **190** can undergo a selective bioreduction in hypoxia cancer cells with high rates of NADH to release the fluorescent BODIPY ligand **130**.



**Figure 1:** Potential marker of tumor hypoxia.

We have also demonstrated that, during its bioreduction, this **190** marker liberates palladium (0). This *in situ* generated palladium (0) was used in the second part of this thesis to catalyze the organometallic activation of a cytotoxic prodrug in cancer cells (Figure 2).



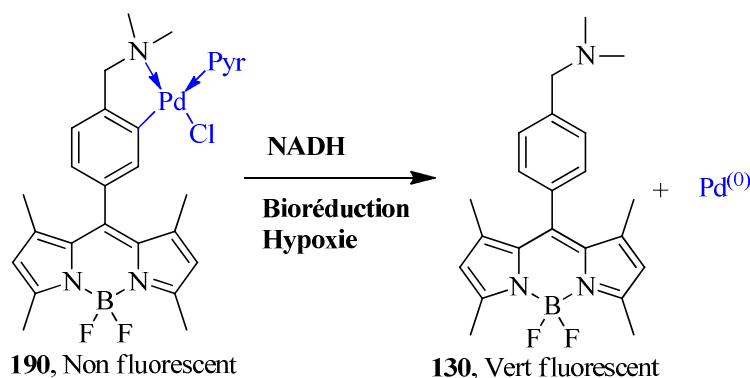
**Figure 2:** Organometallic catalysis of a caged cytotoxic drug.

The experience gained from the previous parts of this thesis led us to develop a

simplified version having both the cytotoxic prodrug and the palladium precatalyst in the same system. This system may prove to be easier to control for *in cellulo* applications.

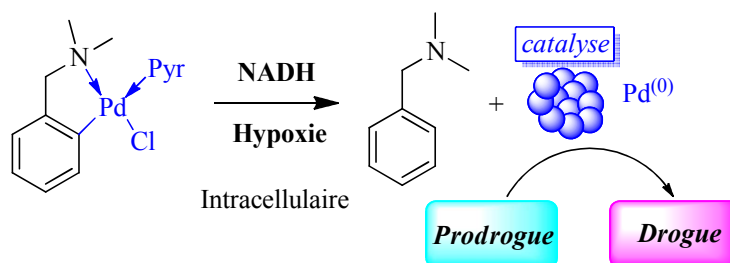
# Résumé

Dans cette thèse, nous avons exploré le domaine des réactions pallado-catalysées dans les cellules cancéreuses. Dans un premier temps, nous avons mis au point un marqueur potentiel de l'hypoxie tumorale à base d'un ligand fluorescent BODIPY complexé au palladium (Figure 3). Ce marqueur non fluorescent **190** subit une bioréduction sélective dans les cellules cancéreuses en hypoxie avec des taux élevés de NADH pour donner le ligand fluorescent BODIPY **130**.



**Figure 3:** Marqueur potentiel de l'hypoxie tumorale.

Nous avons également démontré que dans sa bioréduction, ce marqueur libère le palladium (0). Ce dernier, généré *in situ*, a été utilisé dans la deuxième partie de cette thèse, pour catalyser une réaction organométallique d'activation d'une prodrogue cytotoxique dans les cellules cancéreuses (Figure 4).



**Figure 4:** Catalyse organométallique d'une drogue cancéreuse cagée.

L'expérience acquise dans les deux parties précédentes nous a permis en fin de développer un système simplifié qui porte à la fois la drogue cytotoxique et le précatalyseur de palladium. Ce système sera plus facile à contrôler pour des applications *in cellulo*.

# Symboles et abréviations

|                   |                                            |
|-------------------|--------------------------------------------|
| $\delta$          | Déplacement chimique                       |
| %                 | Pourcent                                   |
| Ac                | Acétyle                                    |
| AcO               | Acétate                                    |
| ADC               | Acyclic diaminocarbene                     |
| Alloc             | Allyloxycarbonyle                          |
| APCI              | <i>Atomic Pressure Chemical Ionisation</i> |
| Boc               | Tert-butyloxycarbonyle                     |
| °C                | Degré Celsius                              |
| CCM               | Chromatographie sur Couche Mince           |
| CDCl <sub>3</sub> | Chloroforme deutéré                        |
| COD               | 1,5-cyclooctadiène                         |
| Cp*               | Pentamethylcyclopentadiene                 |
| D <sub>2</sub> O  | Eau deutéré                                |
| dba               | Dibenzylidène acétone                      |
| DCM               | Dichlorométhane                            |
| DIBAL-H           | Hydruure de diisobutylaluminium            |
| DLS               | Dynamic Light Scattering                   |
| DMAP              | 4-diméthylaminopyridine                    |
| DMF               | <i>N,N</i> -diméthylformamide              |
| DMSO              | Diméthylsulfoxyde                          |
| DMSO-d            | Diméthylsulfoxyde deutéré                  |
| dppe              | 1,2-Bis(diphénylphosphino)éthane           |
| dppf              | 1,2-Bis(diphénylphosphino)ferrocène        |
| équiv.            | équivalent                                 |
| equiv.            | equivalent                                 |
| ESI               | Electrospray ionization                    |

|                       |                                                               |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------|
| Et                    | Ethyle                                                        |
| eV                    | ElectronVolt                                                  |
| FT-IR                 | <i>Fourier Transformation Infra-Red</i>                       |
| g                     | Gramme                                                        |
| GSH                   | Glutathion                                                    |
| h                     | Heure                                                         |
| HAEC                  | Cellules endothéliales aortiques humaines                     |
| HeLa                  | Cellules tumorales d'Henrietta Lacks                          |
| HUVEC                 | Cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain |
| Hz                    | Hertz                                                         |
| IC <sub>50</sub>      | Concentration inhibitrice médiane                             |
| ICP-MS                | spectrométrie de masse à plasma couplé par induction          |
| <i>J</i>              | Couplage proton-proton                                        |
| L                     | Ligand                                                        |
| MCF7                  | Cellules tumorales mammaires humaines                         |
| MDA-MB231             | Cellules tumorales mammaires humaines                         |
| mg                    | Milligramme                                                   |
| min                   | Minute                                                        |
| mL                    | Milliliter                                                    |
| mmol                  | Millimole                                                     |
| mol                   | Mole                                                          |
| MS                    | Mass Spectroscopy                                             |
| N                     | Normale                                                       |
| NADH/NAD <sup>+</sup> | Nicotinamide Adenine Dinucleotide                             |
| NADPH                 | Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate                   |
| ng                    | Nanogramme                                                    |
| nm                    | Nanomètre                                                     |
| NMR                   | Nuclear Magnetic Resonance                                    |
| NOE                   | Nuclear Overhauser Effect                                     |
| NOESY                 | Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy                        |

|               |                                                     |
|---------------|-----------------------------------------------------|
| <i>o</i>      | <i>ortho</i>                                        |
| <i>p</i>      | <i>para</i>                                         |
| PBS           | Phosphate buffered solution                         |
| PE            | petroleum ether                                     |
| Ph            | Phényle                                             |
| Pyr           | Pyridine                                            |
| RMN           | Résonance Magnétique Nucléaire                      |
| Rdt           | Rendement                                           |
| R.T.          | Room temperature                                    |
| SiHa          | Lignée cellulaire dérivant du carcinome de l'utérus |
| T.A.          | Température ambiante                                |
| TEM           | Microscopie électronique en transmission            |
| THF           | Tétrahydrofurane                                    |
| TFA           | Trifluoroacetic acid                                |
| TLC           | Thin Layer Chromatography                           |
| tppts         | Triphénylphosphine trisulfonate                     |
| VEGF          | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>           |
| VEGFR         | <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>  |
| $\lambda$     | Longueur d'onde                                     |
| $\mu\text{L}$ | Microlitre                                          |
| $\mu\text{M}$ | Micromolaire                                        |
| UV            | Ultraviolet                                         |
| XPS           | Spectroscopie des photoélectrons X                  |



# Table des matières

|                                                               |             |
|---------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Composition du Jury</b>                                    | <b>iii</b>  |
| <b>Remerciements</b>                                          | <b>v</b>    |
| <b>Abstract</b>                                               | <b>ix</b>   |
| <b>Résumé</b>                                                 | <b>xi</b>   |
| <b>Symboles et abréviations</b>                               | <b>xiii</b> |
| <b>Table des matières</b>                                     | <b>xvii</b> |
| <b>Introduction générale</b>                                  | <b>23</b>   |
| <b>Partie I : Bibliographie</b>                               | <b>29</b>   |
| <b>1. Chimie bio-orthogonale</b>                              | <b>31</b>   |
| 1.1. Introduction                                             | 31          |
| 1.2. Réactions bioorthogonales développées                    | 32          |
| 1.3. Applications des réactions bioorthogonales               | 34          |
| <b>2. Métaux de transition en biologie</b>                    | <b>35</b>   |
| 2.1. Création des liaisons carbone-carbone                    | 35          |
| 2.2. Déprotection et modification des groupements chimiques   | 38          |
| <b>3. Prodrogues antitumorales</b>                            | <b>43</b>   |
| 3.1. Prodrogues utilisant la réaction de Staudinger           | 44          |
| 3.2. Prodrogues utilisant les cycloadditions                  | 46          |
| 3.3. Prodrogues activables par les enzymes et approche double | 48          |
| 3.4. Prodrogues dérivées des complexes métalliques            | 53          |
| <b>4. Hypoxie tumorale</b>                                    | <b>58</b>   |
| 4.1. Vascularisation tumorale                                 | 58          |
| 4.2. Effets cellulaires de l'hypoxie tumorale                 | 59          |

|                                                                         |                                                                           |            |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.                                                                    | Hypoxie et résistance aux traitements                                     | 60         |
| 4.4.                                                                    | Prodrogues sélectives de l'hypoxie tumorale                               | 62         |
| 5.                                                                      | <b>Conclusion</b>                                                         | <b>76</b>  |
| <b>Objectifs de la thèse</b>                                            |                                                                           | <b>77</b>  |
| 1.                                                                      | <b>Palladacycles-BODIPY, marqueurs de l'hypoxie tumorale</b>              | <b>78</b>  |
| 2.                                                                      | <b>Applications des palladacycles en catalyse <i>in cellulo</i></b>       | <b>79</b>  |
| 3.                                                                      | <b>Prodrogues bioactivables <i>via</i> la déallylation de Tsuji-Trost</b> | <b>80</b>  |
| <b>Partie II : Palladacycles-BODIPY marqueurs de l'hypoxie tumorale</b> |                                                                           | <b>83</b>  |
| <hr/>                                                                   |                                                                           |            |
| 1.                                                                      | <b>Introduction</b>                                                       | <b>85</b>  |
| 2.                                                                      | <b>BODIPY : découverte, voies de synthèse et applications</b>             | <b>85</b>  |
| 2.1.                                                                    | Introduction et découverte                                                | 85         |
| 2.2.                                                                    | Voies de synthèse                                                         | 86         |
| 2.3.                                                                    | Propriétés photophysiques et applications                                 | 89         |
| 3.                                                                      | <b>Idée et origine du projet</b>                                          | <b>90</b>  |
| 4.                                                                      | <b>Synthèses des palladacycles au BODIPY</b>                              | <b>92</b>  |
| 4.1.                                                                    | Complexes monodentés de la première classe                                | 95         |
| 4.2.                                                                    | Complexes bidentés de la deuxième classe                                  | 97         |
| 4.3.                                                                    | Complexes cationiques de la troisième classe                              | 99         |
| 5.                                                                      | <b>Propriétés photophysiques</b>                                          | <b>100</b> |
| 6.                                                                      | <b>Réduction <i>in vitro</i> par l'ascorbate de sodium (AscNa)</b>        | <b>102</b> |
| 6.1.                                                                    | Rôle de l'acide ascorbique comme agent réducteur                          | 103        |
| 6.2.                                                                    | Principe de la réduction                                                  | 104        |
| 6.3.                                                                    | Réduction du palladacycle modèle                                          | 105        |
| 6.4.                                                                    | Réduction des palladacycles de première classe                            | 107        |
| 6.5.                                                                    | Réduction des palladacycles de deuxième classe                            | 109        |

|            |                                                                                                     |            |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 6.6.       | Réduction des palladacycles de troisième classe _____                                               | 111        |
| 6.7.       | Test de la réversibilité de la réduction _____                                                      | 113        |
| 6.8.       | Bilan et conclusion partielle _____                                                                 | 114        |
| <b>7.</b>  | <b>Bioréduction <i>in cellulo</i> _____</b>                                                         | <b>115</b> |
| 7.1.       | Principe de la bioréduction _____                                                                   | 115        |
| 7.2.       | Résultats préliminaires _____                                                                       | 117        |
| 7.3.       | Bilan et conclusions _____                                                                          | 120        |
| <b>8.</b>  | <b>Réduction <i>in vitro</i> par NADH et GSH _____</b>                                              | <b>121</b> |
| 8.1.       | Introduction _____                                                                                  | 121        |
| 8.2.       | Transfert d'hydrure en chimie biologique _____                                                      | 122        |
| 8.3.       | Influence de NADH, NAD <sup>+</sup> , GSH sur la fluorescence du BODIPY _____                       | 124        |
| 8.4.       | Réduction des palladacycles par le NADH et le GSH _____                                             | 126        |
| 8.5.       | Synthèse de dihydropyridines simples, analogues de NADH _____                                       | 129        |
| 8.6.       | Réduction des palladacycles par des dihydropyridines _____                                          | 130        |
| 8.7.       | Conclusion _____                                                                                    | 133        |
| <b>9.</b>  | <b>Etudes mécanistiques _____</b>                                                                   | <b>134</b> |
| 9.1.       | Introduction _____                                                                                  | 134        |
| 9.2.       | Synthèse des analogues simples des palladacycles au BODIPY _____                                    | 134        |
| 9.3.       | Etude de stabilité par <sup>1</sup> H-RMN des palladacycles en solution _____                       | 135        |
| 9.4.       | Réduction des palladacycles par un modèle de NADH : études en solution par <sup>1</sup> H-RMN _____ | 140        |
| 9.5.       | Isoler le ligand libre BODIPY fluorescent _____                                                     | 148        |
| 9.6.       | Mécanisme proposé _____                                                                             | 150        |
| 9.7.       | Deutération du ligand BODIPY _____                                                                  | 153        |
| 9.8.       | Nature des espèces de palladium _____                                                               | 156        |
| 9.9.       | Conclusion _____                                                                                    | 165        |
| <b>10.</b> | <b>Bioréduction dans les lignées cellulaires présentant des taux élevés de NADH _____</b>           | <b>166</b> |

|                                                                                        |                                                          |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------|
| 10.1.                                                                                  | Détermination des longueurs d'onde d'excitation-émission | 166        |
| 10.2.                                                                                  | Principe de bioréduction                                 | 167        |
| 10.3.                                                                                  | Optimisation des différents paramètres                   | 167        |
| <b>11.</b>                                                                             | <b>Conclusion</b>                                        | <b>171</b> |
| <b><i>Partie III : Application des palladacycles en catalyse in cellulo</i></b>        |                                                          | <b>173</b> |
| <b>1.</b>                                                                              | <b>Principe et objectif</b>                              | <b>175</b> |
| <b>2.</b>                                                                              | <b>Test en catalyse <i>in vitro</i></b>                  | <b>177</b> |
| 2.1.                                                                                   | Synthèse du modèle fluorogénique cagé                    | 177        |
| 2.2.                                                                                   | Etude du décageage par fluorescence en solution          | 178        |
| 2.3.                                                                                   | Changement du modèle fluorogénique cagé                  | 188        |
| <b>3.</b>                                                                              | <b>Applications en catalyse <i>in cellulo</i></b>        | <b>197</b> |
| 3.1.                                                                                   | Décageage du fluorophore                                 | 197        |
| 3.2.                                                                                   | Décageage du prodroge                                    | 203        |
| <b>4.</b>                                                                              | <b>Conclusion</b>                                        | <b>218</b> |
| <b><i>Partie IV : Prodrogues bioréductibles via la déallylation de Tsuji-Trost</i></b> |                                                          | <b>219</b> |
| <b>1.</b>                                                                              | <b>Introduction et objectifs</b>                         | <b>221</b> |
| <b>2.</b>                                                                              | <b>Stratégie de synthèse</b>                             | <b>223</b> |
| 2.1.                                                                                   | Taille de l'espaceur                                     | 224        |
| 2.2.                                                                                   | Choix du fluorophore                                     | 224        |
| 2.3.                                                                                   | Choix des ligands                                        | 225        |
| <b>3.</b>                                                                              | <b>Synthèse des prodrogues</b>                           | <b>226</b> |
| 3.1.                                                                                   | Synthèse des alcools allyliques                          | 226        |
| 3.2.                                                                                   | Activation des alcools allyliques                        | 228        |
| 3.3.                                                                                   | Tentatives de couplage                                   | 229        |
| <b>4.</b>                                                                              | <b>Stratégie utilisant un linker auto-immolant</b>       | <b>232</b> |

|                                                  |                                                                                       |            |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1.                                             | Nouvelle structure des prodrogues _____                                               | 233        |
| 4.2.                                             | Synthèse du rapporteur connecté au linker _____                                       | 234        |
| 4.3.                                             | Couplage du linker-rapporteur aux alcools allyliques activés ____                     | 235        |
| 4.4.                                             | Synthèse des prodrogues par activation du linker _____                                | 236        |
| 4.5.                                             | Synthèse linéaire _____                                                               | 238        |
| 4.6.                                             | Synthèse des iminophosphines précurseurs des complexes _____                          | 240        |
| 4.7.                                             | Complexation des imines au palladium _____                                            | 241        |
| <b>5.</b>                                        | <b>Vérification de la validité du concept _____</b>                                   | <b>242</b> |
| 5.1.                                             | Test sur les carbamates simples _____                                                 | 244        |
| 5.2.                                             | Réduction des prodrogues par l'ascorbate de sodium _____                              | 246        |
| <b>6.</b>                                        | <b>Conclusion _____</b>                                                               | <b>247</b> |
| <b>Conclusion générale et perspectives _____</b> |                                                                                       | <b>249</b> |
| <b>Partie V : Experimental section _____</b>     |                                                                                       | <b>257</b> |
| <b>1.</b>                                        | <b>Chemistry section _____</b>                                                        | <b>259</b> |
| 1.1.                                             | General information _____                                                             | 259        |
| 1.2.                                             | Synthesis of BODIPY palladium complexes _____                                         | 261        |
| 1.3.                                             | Synthesis of bis-allyloxycarbonyl-protected rhodamine 110 ____                        | 282        |
| 1.4.                                             | Synthesis of <i>N</i> -allyloxycarbonyl-protected coumarine _____                     | 283        |
| 1.5.                                             | Synthesis of <i>N</i> -allyloxycarbonyl-protected sunitinib _____                     | 287        |
| 1.6.                                             | Synthesis of bioactivables prodrugs <i>via</i> the Tsuji-Trost reaction __            | 288        |
| 1.7.                                             | <i>In vitro</i> reduction of BODIPY palladium complexes _____                         | 312        |
| 1.8.                                             | <i>In vitro</i> deprotection of <i>N, N'</i> -alloc rhodamine 110 _____               | 315        |
| 1.9.                                             | <i>In vitro</i> deprotection of <i>N-alloc</i> coumarin _____                         | 318        |
| 1.10.                                            | Nature of palladium species generated <i>in situ</i> _____                            | 320        |
| 1.11.                                            | <i>In vitro</i> decoupling activable prodrugs <i>via</i> the Tsuji-Trost deallylation | 321        |
| <b>2.</b>                                        | <b>Biology section _____</b>                                                          | <b>324</b> |
| 2.1.                                             | General information _____                                                             | 324        |

|                                |                                                                     |            |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.2.                           | Bioreduction of BODIPY palladium complexes _____                    | 324        |
| 2.3.                           | Uncoupling <i>N</i> -alloc rhodamine 110 inside cancer cells _____  | 325        |
| 2.4.                           | Deprotection of <i>N</i> -alloc sunitinib inside cancer cells _____ | 327        |
| <b><i>Références</i> _____</b> |                                                                     | <b>328</b> |

# Introduction générale



## Introduction générale

---

Le cancer regroupe un ensemble de maladies résultant de la croissance incontrôlée de cellules ayant accumulé des anomalies génétiques. Au fur et à mesure du temps, ces cellules se divisent, envahissent les organes environnants et disséminent dans l'organisme pour former des métastases. La difficulté de réguler ou de prévenir une telle propagation des cellules cancéreuses conduit souvent à la mort du patient.

L'apparition du cancer est causée par des mutations génétiques des cellules. Ces mutations résultent de l'action de nombreux facteurs qui interagissent les uns avec les autres. Ces facteurs peuvent être exogènes ou endogènes.<sup>1,2</sup> Les facteurs externes incluent des organismes infectieux, une mauvaise alimentation, des pesticides, des toxines environnementales, l'alcool et le tabac. Les facteurs internes proviennent essentiellement de mutations génétiques héréditaires, des conditions immunitaires et hormonales. Il existe plusieurs étapes de progression du cancer qui sont généralement établies avec la taille de la tumeur, de l'étendue de la tumeur primaire et de la capacité de propagation des ganglions lymphatiques avoisinants ou d'autres organes.

Dans le cas des tumeurs solides, les altérations génétiques et métaboliques acquises peuvent être amplifiées par le microenvironnement de la tumeur. C'est le cas de l'hypoxie tumorale. En effet, lorsqu'une masse tumorale atteint un certain volume, les cellules cancéreuses constituant la partie centrale de la tumeur ne sont plus suffisamment oxygénées et meurent. Cependant, certaines d'entre elles, développent un métabolisme anaérobie, leur permettant de survivre malgré tout.

À cause d'une large gamme de facteurs, l'occurrence de la maladie est difficile à prédire. Selon l'OMS, 8.2 millions de décès ont été recensés en 2012 au niveau mondial, et le nombre de nouveaux cas devrait augmenter de 70% dans les deux prochaines décennies.<sup>3</sup>

La chimiothérapie est l'une des méthodes les plus utilisées pour traiter les cancers. Grace aux recherches extensives menées dans le développement de nouvelles molécules, les traitements sont de plus en plus efficaces et les chances

moyennes de guérir augmentent chaque année. Cependant, malgré ces avancées, il reste encore plusieurs types de cancer peu sensibles à la chimiothérapie classique, comme les tumeurs du cerveau ou le cancer de prostate. Le second problème est lié aux effets secondaires désagréables qui accompagnent la plupart des agents de chimiothérapie. Citons par exemple les nausées, la perte des cellules, la diminution de l'immunité, tous étant causés par le manque de sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses.

Le manque de sélectivité est un problème majeur dans le traitement du cancer. Il a été montré que la grande majorité des agents anticancéreux présentent une pénétration faible et lente dans le microenvironnement tumoral. Ainsi, certaines régions tumorales ne sont pas exposées à des concentrations létales de chimiothérapie. Il a d'ailleurs été démontré dans la plupart des études que les chimiothérapies classiques présentent une décroissance de la concentration d'agent antitumoral avec la distance à partir des vaisseaux sanguins. Cette concentration peut s'avérer nulle dans les zones faiblement oxygénées appelées zones hypoxiques. De plus, les tumeurs peuvent développer de la résistance contre les agents anticancéreux après un traitement prolongé.<sup>4</sup> Cela montre alors qu'il y a besoin de développer des nouveaux agents anticancéreux avec des propriétés améliorées.

Pour une thérapie effective du cancer, il faut améliorer et développer les nouvelles stratégies pour la délivrance effective des chimiothérapies aux cellules cancéreuses. L'administration directe des drogues dans l'environnement tumoral serait d'autant plus profitable et effective lorsque le cancer est encore localisé. Cependant, le pronostic est totalement différent lorsque les tumeurs commencent à se métastaser pour envahir les tissus sains environnants en altérant leur phénotype.

L'objectif de cette thèse est de développer des prodrogues sélectives de l'hypoxie tumorale. Dans la première partie, nous passerons en revue des stratégies utilisées actuellement pour développer des prodrogues antitumorales

## Introduction générale

---

en général, ainsi que celles qui ciblent l'hypoxie en particulier. Ensuite, nous exposerons les résultats obtenus en présentant des prodrogues tumorales développées qui ciblent l'hypoxie, tout en insistant sur leurs mécanismes de sélectivité. Pour conclure, nous présenterons les perspectives des voies potentielles à envisager pour simplifier le modèle afin de libérer de manière contrôlée des anticancéreux dans les cellules en conditions d'hypoxie.



# Partie I : Bibliographie

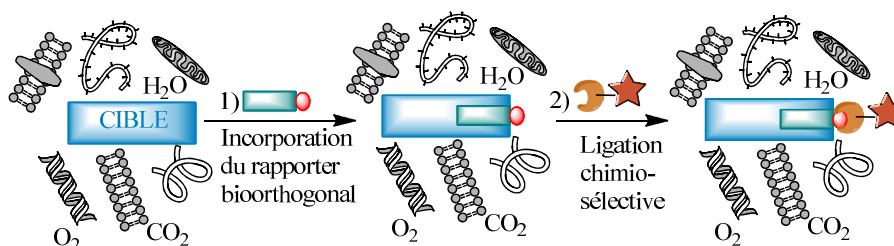


## 1. Chimie bio-orthogonale

### 1.1. Introduction

Les processus biologiques qui ont lieu dans l'organisme vivant sont extrêmement complexes, mais il est possible de les comprendre *via* la chimie. La chimie bio-orthogonale en plein essor est un outil très prometteur. Elle représente tout un ensemble des réactions chimiques spécifiques qui peuvent s'effectuer dans des systèmes biologiques, sans perturber le fonctionnement de tout le reste du système biologique en présence.<sup>5,6</sup> Depuis quelques années, cette stratégie est utilisée pour sonder et suivre l'évolution d'une biomolécule comme par exemple un métabolite, un médicament, un inhibiteur d'enzyme, etc. à l'intérieur de la cellule.

De façon générale, la bio-conjugaison basée sur les réactions bio-orthogonales implique une stratégie en deux étapes : la première étape consiste à introduire une fonction réactive sur la biomolécule (chimiquement ou biochimiquement) qui n'affecte pas son activité biologique, avant de l'introduire dans la cellule. Elle est suivie d'une seconde étape, celle du greffage d'un fluorophore ou bien une sonde complémentaire du groupement fonctionnel qui réagira avec cette précédente afin de marquer la biomolécule que l'on veut suivre (Figure 5).<sup>7</sup>



**Figure 5:** Marquage des biomolécules.<sup>7</sup>

Pour être qualifiées de réactions biorthogonales, ces réactions doivent répondre à un certain nombre de critères :

- Les groupements fonctionnels incorporés à la biomolécule et la sonde doivent réagir sélectivement entre eux en conditions physiologiques,

sans réagir avec d'autres groupements fonctionnels chimiques présents dans les protéines ou d'autres biomolécules.

- Les réactifs doivent être stables cinétiquement, thermodynamiquement, et métaboliquement avant la réaction et sans être toxiques pour les systèmes vivants.
- Les produits des réactions doivent être stables en conduisant à des produits secondaires non ou peu toxiques.

Malgré les difficultés de remplir ces conditions, quelques réactions chimiosélectives avec une bonne biocompatibilité vis-à-vis des systèmes vivants ont été décrites.

### **1.2. Réactions bioorthogonales développées**

Dans la dernière décennie, un nombre limité de réactions incluant la condensation des cétones/aldéhydes avec des nucléophiles amines, la ligation de Staudinger, la réaction Click et la ligation des tétrazines ont été développées. Les réactions bio-orthogonales les plus développées et exploitées sont présentées sur la Figure 6.<sup>5</sup>

## Partie I : Bibliographie

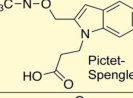
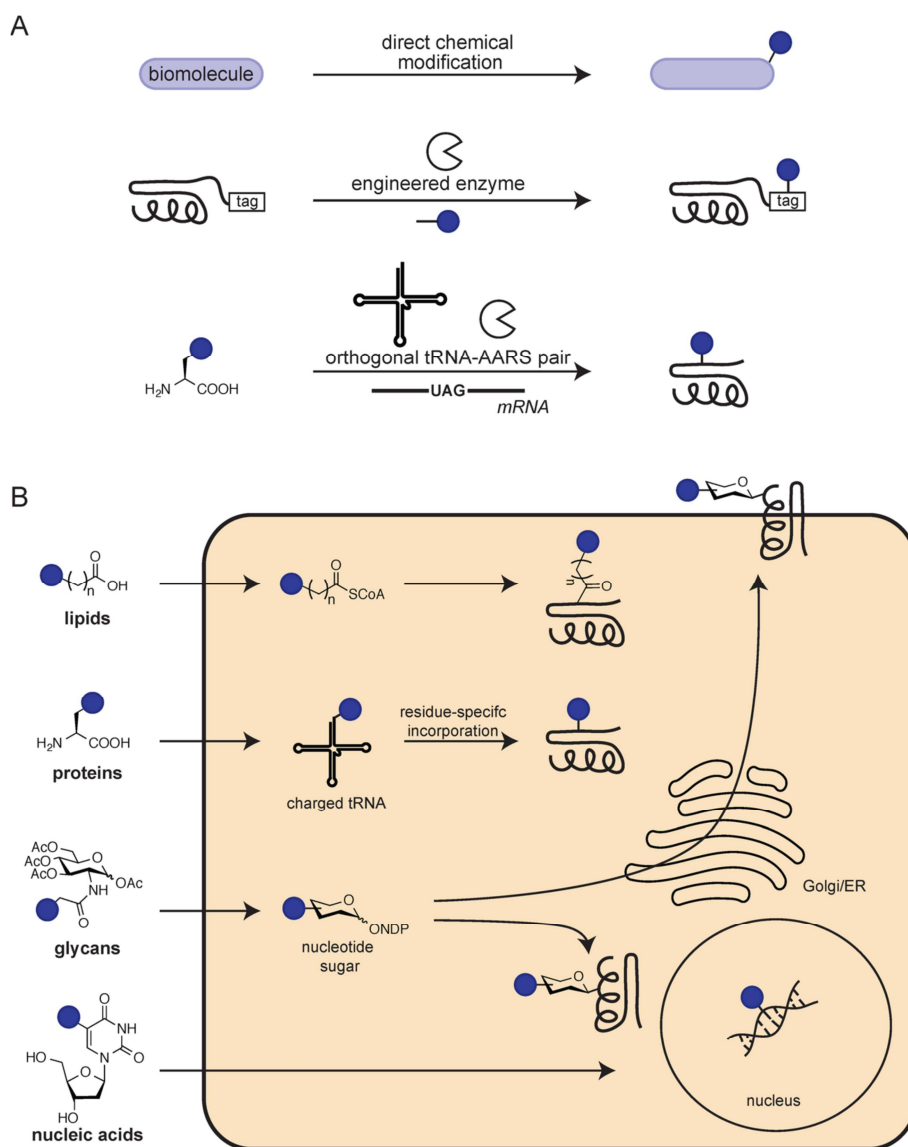
| Reaction type                                       | Reactant 1<br> | Reactant 2<br>         | Approximate rate constant (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | Comments                                                            | References                  |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Aldehyde/ketone condensation                        |                |                        | 0.001 (H <sub>2</sub> O)                                     | adducts prone to hydrolysis; aniline catalyst can be used           | Jencks 1959                 |
|                                                     |                                                                                                 |                        |                                                              |                                                                     |                             |
|                                                     |                                                                                                 | <br>Pictet-Spengler    | 0.26 (100 mM sodium phosphate)                               | reaction provides more stable C-C linkages                          | Agarwal 2013                |
| Staudinger ligation                                 | R-N <sub>3</sub>                                                                                |                        | 0.003 (PBS)                                                  | phosphines susceptible to oxidation                                 | Saxon 2000                  |
| Cyanobenzothiazole condensation                     |                |                        | 9.19 (PBS)                                                   | side reactivity with free thiols                                    | Rao 2009                    |
| CuAAC                                               | R-N <sub>3</sub>                                                                                |                        | k <sub>obs</sub> 10-100 (10-100 μM Cu)                       | copper catalyst required                                            | Tornøe 2002                 |
| Strain-promoted azide-alkyne cycloadditions (SPAAC) |                                                                                                 | <br>OCT, DIFO, BCN     | 0.0012-0.14 (ACN)                                            | no metal catalyst; some octynes susceptible to thiol attack         | Agard 2004                  |
|                                                     |                                                                                                 | <br>BARAC, DIBO, DIBAC | 0.17-0.96 (ACN)                                              |                                                                     | Jewett 2010                 |
| Alternative 1,3-dipolar cycloadditions              |               |                       | 0.013-3.9 (ACN/H <sub>2</sub> O)                             | some nitrones susceptible to hydrolysis                             | McKay 2010                  |
|                                                     |              |                      | 30 (H <sub>2</sub> O)                                        | nitrile oxide generated <i>in situ</i> (photolysis)                 | Gutsmiedl 2009              |
|                                                     |              |                      |                                                              |                                                                     |                             |
|                                                     |              |                      | 0.15-58 (1:1 ACN:PBS)                                        | nitrile imine generated <i>in situ</i> (photolysis)                 | Yu 2012                     |
|                                                     |              |                      | 13.5 (ACN/H <sub>2</sub> O)                                  | diazo generated from azide precursor                                | McGrath 2012                |
|                                                     | R-N <sub>3</sub>                                                                                |                      | 70,000-106,000 (H <sub>2</sub> O)                            | oxanorbornadiene susceptible to reactivity with basic amino acids   | van Berkel 2007             |
| Inverse Electron-Demand Diels-Alder (IED-DA)        |              |                      | 210-2,800,000 (PBS, 37°C)                                    | TCO can isomerize over time                                         | Blackman 2008               |
|                                                     |              |                                                                                                         | 0.12-9.46 (95:5 H <sub>2</sub> O:MeOH)                       | norbornene and functionalized cyclopropenes are shelf stable        | Devaraj 2008                |
|                                                     |              |                                                                                                         | 0.03-13 (12-15% DMSO in PBS)                                 |                                                                     | Yang 2012<br>Patterson 2012 |
| Hetero-Diels-Alder                                  | RS-CH=CH <sub>2</sub>                                                                           |                      | 0.0015 (5:1 H <sub>2</sub> O:MeOH)                           | quinone methide generated <i>in situ</i>                            | Li 2013                     |
| Miscellaneous ligations                             |              |                      | 0.03-0.3 (PBS/tBuOH)                                         | ruthenium catalyst required                                         | Lin 2013                    |
|                                                     |              |                      | 0.25 (PBS/EtOH)                                              | requires nickel-stabilization of pi-electrons                       | Sletten 2011                |
|                                                     |              |                      | 0.12-0.57 (THF/H <sub>2</sub> O)                             | products can hydrolyze in water                                     | Stockmann 2011              |
|                                                     | Ar-X                                                                                            | R-B(OH) <sub>2</sub> , [Pd]                                                                             | N/A                                                          | palladium catalyst required; boronic acids are moderately cytotoxic | Chalker 2009                |
|                                                     | Ar-X                                                                                            | ≡-R, [Pd]                                                                                               |                                                              | palladium catalyst required                                         | Kodama 2007                 |

Figure 6: Réactions bioorthogonales décrites.<sup>5</sup>

### 1.3. Applications des réactions bioorthogonales

Les réactions bioorthogonales présentées sur la Figure 6 ont été largement utilisées dans des réactions de bio-conjugaison de protéines, glycanes, acides nucléiques et lipides.<sup>7,8,9</sup> Ces applications sont résumées sur la Figure 7.



**Figure 7:** Applications des réactions bioorthogonales.<sup>5</sup>

L'application de ces réactions bioorthogonales a rendu possible le marquage direct des protéines à l'intérieur de cellules ou l'identification ciblée de petites molécules bioactives. Cependant, la biocompatibilité comme la sensibilité et la sélectivité de ces réactifs dans l'environnement biologique nécessite toujours des améliorations.

## **2. Métaux de transition en biologie**

A part ces réactions bioorthogonales classiques présentées précédemment, des réactions catalysées par les métaux de transition ont montré également des applications intéressantes en biologie. Les métaux de transition les plus utilisés sont le palladium, le cuivre, le ruthénium, et le fer. Les réactions catalysées par ces métaux peuvent être classées en deux catégories :

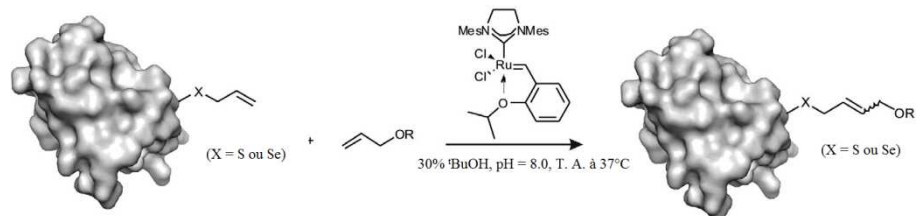
### **2.1. Création des liaisons carbone-carbone**

Les réactions de couplages croisés de Suzuki-Miyaura<sup>10</sup> ou Sonogashira ont été explorées comme des outils synthétiques pour créer des liaisons C-C *in vitro* et *in vivo*. Les réactions catalysées par le palladium ont été employées en chimie biologique depuis la mise au point de catalyseurs de Pd coordonnés à des ligands hydrosolubles comme le tri (3-sulfonatophenyl) phosphane trisodium salt (TPPTS).<sup>11</sup>

#### **2.1.1. Réaction de bioconjugaison par métathèse croisée au ruthénium**

En 2008, Davis et son équipe ont décrit la première réaction de métathèse croisée dans le marquage spécifique des protéines contenant un groupement allyle sulfure *in vitro* (Figure 8).<sup>12</sup> Après avoir fait un criblage de plusieurs alcènes simples, ils ont remarqué que la réaction de métathèse croisée était efficace pour effectuer la ligation entre des protéines modifiées comportant une (S)-allylcystéine avec l'alcool allylique en utilisant le catalyseur de Hoveyda-Grubbs de deuxième-génération.<sup>13</sup> Ils ont développé ensuite une réaction de métathèse croisée plus rapide et efficace en utilisant le Se-allyl-selenocystéine

pour le marquage *in vitro* et l'ingénierie des protéines.<sup>14</sup>

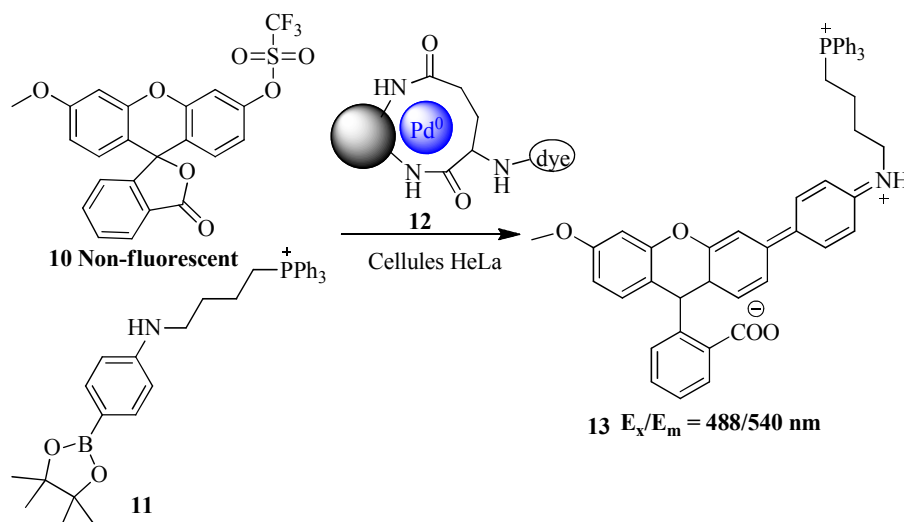


**Figure 8:** Marquage des protéines par métathèse croisée catalysée par le ruthénium.<sup>15</sup>

### 2.1.2. Réactions de bioconjugaison par couplage croisé au palladium

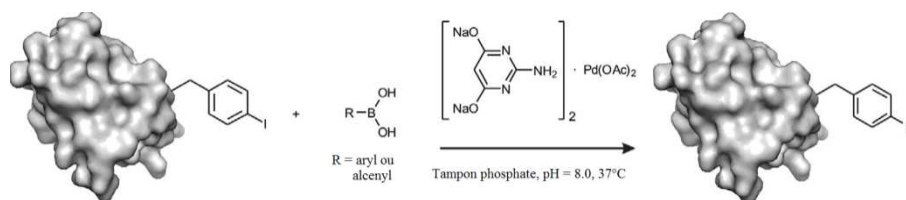
Les réactions de couplage catalysées par le palladium ont été exploitées également pour le marquage spécifique et l'ingénierie des protéines. Les réactions de couplage croisé au palladium de protéines génétiquement modifiées portant le *p*-iodophénylalanine ou le *p*-boronophénylalanine ont longtemps souffert de faibles rendements ou de conditions réactionnelles très dures.<sup>16,17,18</sup>

Le premier exemple de couplage croisé de Suzuki en cellules vivantes a été décrit par Bradley et son équipe par couplage du triflate non fluorescent **10** au boronate **11** à l'intérieur du cytoplasme des cellules vivantes à l'aide des microsphères de palladium **12** (Figure 9).<sup>10</sup> Les cellules deviennent alors fluorescentes après formation du produit de couplage dérivé de la rhodamine **13**.



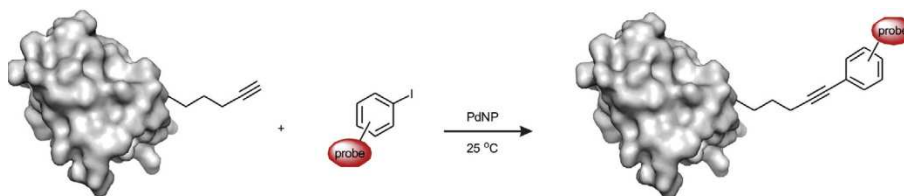
**Figure 9:** Couplage de Suzuki réalisé par Bradley à l'intérieur du cytoplasme des cellules vivantes cancéreuses HeLa.<sup>10</sup>

Dans le but de ne pas utiliser les catalyseurs de Pd hétérogènes en milieux vivants, Davis et son équipe ont développé plus tard un catalyseur de palladium hydrosoluble qui est un sel de 2-amino-4,6-dihydroxypyrimidine [ $\text{Pd}(\text{OAc})_2(\text{ADHP})_2$ ]. Ce catalyseur a été utilisé pour le couplage croisé de Suzuki-Miyaura entre le groupement *p*-iodobenzyle génétiquement encodé et des aryl-alcényles acides boroniques variés (Figure 10).<sup>19,20</sup> Cette réaction donne des rendements élevés à 37°C en 1h. Et elle a été utilisée pour le marquage spécifique de la membrane protéinique OmpC sur la surface d'*Escherichia coli*.



**Figure 10:** Réaction de couplage croisé de Suzuki-Miyaura entre une protéine avec la *p*-iodophénylalanine encodée génétiquement et un aryle (ou alcényle) acide boronique catalysée par le catalyseur hydrosoluble,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2(\text{ADHP})_2$ .<sup>19,20</sup>

Une autre réaction de couplage croisé très célèbre est le couplage de Sonogashira. Ce dernier a été également utilisé pour le marquage des protéines modifiées par des alcynes. Qing Li et son équipe ont décrit d'abord une réaction de couplage croisée bioorthogonale catalysée par le complexe de palladium-aminopyridine (II) pour modifier sélectivement une protéine ubiquitine encodée par l'homopropargylglycine (HPG) en milieu aqueux mais également dans l'*Escherichia coli*.<sup>21</sup> Cependant, un excès de palladium doit être utilisé car il est désactivé par les protéines cellulaires à la suite de sa complexation par les nombreux thiols présents dans les milieux biologiques. Ceci constitue un défi majeur en vue de l'application de la catalyse au palladium *in cellulo*.<sup>22</sup> Récemment, Chen et son équipe ont développé une réaction de couplage de Sonogashira catalysée seulement par le palladium sans ligand (Figure 11). Dans cette réaction, ils ont montré que les nanoparticules de palladium générées au départ de  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  sont des catalyseurs efficaces et biocompatibles pour le marquage du site spécifique des protéines modifiées par les alcynes à l'intérieur d'*Escherichia coli* et d'autres pathogènes bactériens à gram-négatifs comme le *Shigella*.<sup>23</sup>

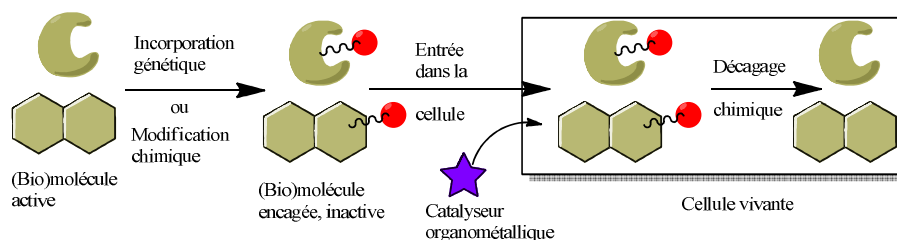


**Figure 11:** Réactions de couplage croisé de Sonogashira sans ligand entre des groupements alcynes encodés génétiquement aux protéines et différents iodophényles, catalysées par les PdNP générées au départ du  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ .<sup>23</sup>

## 2.2. Déprotection et modification des groupements chimiques

Ce domaine de recherche est très récent avec peu d'exemples publiés, mais reste néanmoins très prometteur. Les réactions de déprotection et de modification des groupements chimiques *in cellulo* et *in vivo* ont été revues en détail très

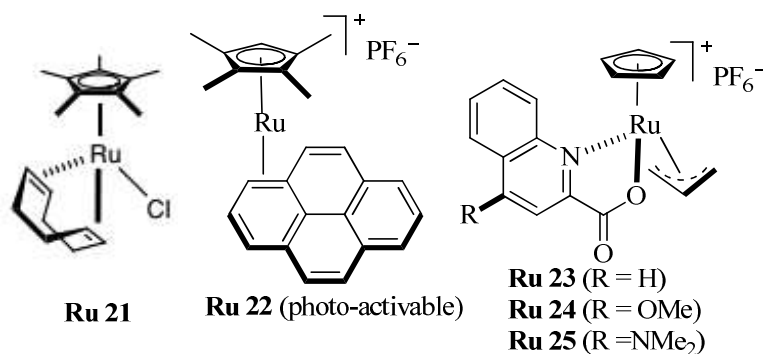
récemment par E. Meggers.<sup>24</sup> Ces réactions, toutes fondées sur le même principe (Figure 12), sont catalysées par le ruthénium, le palladium, et le fer.



**Figure 12:** Activation temporelle et contrôlée d'une (bio) molécule par catalyse organométallique.<sup>24</sup>

### 2.2.1. Le ruthénium dans les réactions de décaage *in cellulo*

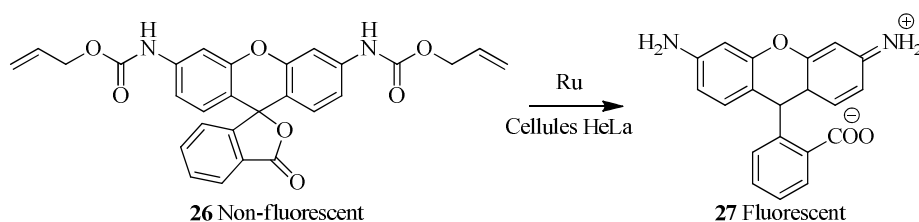
Le premier exemple d'activation *in cellulo* d'une molécule encagée par un catalyseur organométallique a été décrit en 2006 par Eric Meggers, par clivage des allylcarbamates en amines primaires correspondantes en milieux biologiques typiques (en présence d'air, d'eau et des thiols) par un complexe de ruthénium (II)  $[\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{COD})\text{Cl}]$ , avec  $\text{Cp}^* = \eta^5\text{-pentamethylcyclopentadienyl}$  et  $\text{COD} = \eta^4\text{-1,5-cyclooctadiène}$  (**Ru 21** Figure 13).



**Figure 13:** Complexes de ruthénium développés par Meggers pour le clivage catalytique des allylcarbamates.

En guise d'application dans le domaine, ils ont réussi à décager la rhodamine protégée (*N,N*-bis-allyloxy-carbonyl rhodamine 110) non fluorescente **26** dans

les cellules cancéreuses HeLa (Figure 14). Celle-ci a été convertie en rhodamine 110 fluorescente **27** à la suite du clivage de deux groupements protecteurs. Les cellules étaient fluorescentes, comme révélé par le microscope à fluorescence confocale. Cependant, ce premier exemple souffre des limitations liées à une faible efficacité catalytique, avec un faible *turnover number* (TON) de 4. De plus, il était nécessaire d'utiliser des nucléophiles soufrés aromatiques comme le thiophénol pour obtenir des cinétiques acceptables.<sup>25</sup>



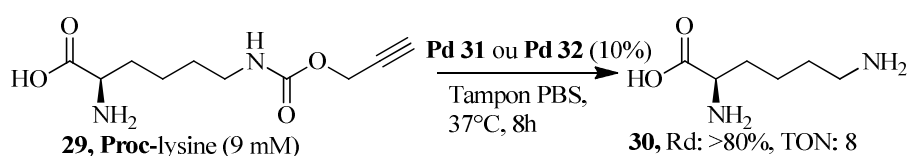
**Figure 14:** Décageage de la rhodamine-110 par les complexes de ruthénium.

Une faible amélioration de cette réaction a été reportée plus tard par la même équipe en utilisant un catalyseur de ruthénium (II) photoactivable (**Ru 22** Figure 13). Cependant, la présence des thiols reste toujours nécessaire.<sup>26</sup> Pour s'affranchir des problèmes de toxicité des thiols aromatiques, ils ont très récemment reporté une amélioration nette du clivage catalytique des allyl-carbamates dans les cellules par l'utilisation des complexes de ruthénium (IV) [CpRu(QA-R)( $\eta^3$ -allyl)]PF<sub>6</sub> (QA= 2-quinolinecarboxylate, R = groupements électro donneurs : **Ru 23**, **Ru 24** et **Ru 25** Figure 13). Ainsi, l'incubation de la rhodamine-110 *N*-alloc avec ces catalyseurs a montré une augmentation de l'intensité de la fluorescence de plus de 130 fois après 30 minutes.<sup>27</sup>

### 2.2.2. Palladium dans les réactions de décageage *in cellulo*

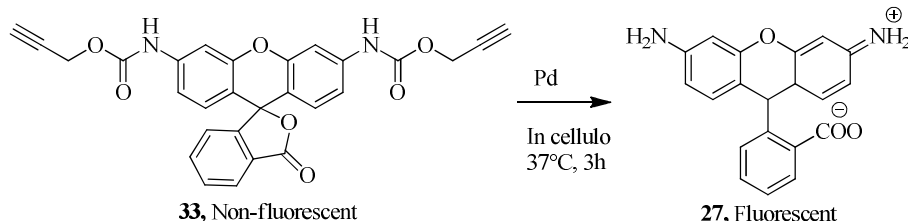
Comme le ruthénium, le palladium a également été utilisé dans cette stratégie d'activation en cellules vivantes. Par exemple Chen a reporté une série de complexes de palladium capables de cliver catalytiquement des amines protégées dans des cellules humaines.<sup>28</sup> Ces expériences de criblage *in vitro* ont

permis de mettre en évidence deux complexes de palladium, le  $[\text{allylPdCl}]_2$  (**Pd 31**) et le  $[\text{Pd}(\text{dba})_2]$  (**Pd 32**, dba = dibenzylidène acétone) les plus efficaces. Ainsi, une lysine protégée par un groupement propargyloxycarbonyl (Proc-lysine) **29** a pu être convertie dans la lysine (Figure 15) correspondante **30** en tampon cellulaire avec une charge catalytique de 10% et une conversion supérieure à 80% en 8h à 37°C.



**Figure 15:** Déprotection catalytique de la Proc-lysine par les complexes de palladium.<sup>28</sup>

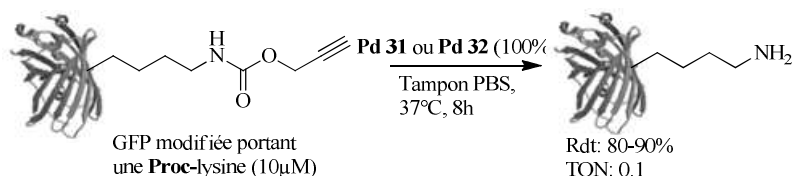
Cette méthodologie a été utilisée *in cellulo* d'abord pour la déprotection d'une Proc-rhodamine dans différentes lignées cellulaires (Figure 16). Une augmentation de la fluorescence de plus de 4 fois a été observée lorsqu'une concentration de 50  $\mu\text{M}$  de Proc-rhodamine a été traitée avec 10  $\mu\text{M}$  de ces catalyseurs de palladium.



**Figure 16:** Déprotection de la poc-rhodamine par les complexes de palladium.<sup>28</sup>

La méthodologie a été ensuite testée pour la libération de résidu lysine sur deux protéines, plus précisément une GFP-Proc-Lysine et l'enzyme OspF phosphothréonine lyase également modifiée contenant une Proc-lysine. Dans un tampon cellulaire le rendement de déprotection après une heure était de 90%, lorsque 10 équivalents de catalyseurs étaient utilisés (TON : 0.1) (Figure 17). Une charge catalytique élevée est cependant nécessaire en raison de la

séquestration du palladium.<sup>23,29</sup>

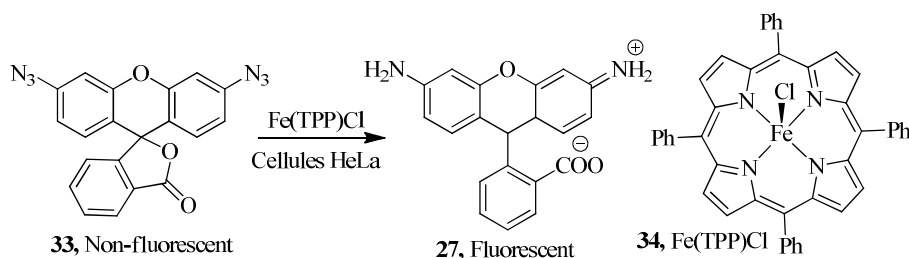


**Figure 17:** Déprotection catalytique d’une protéine GFP modifiée par la Proc-lysine par les complexes de palladium.<sup>28</sup>

Celui-ci est le premier exemple d’activation sélective des protéines *in vitro* et *in vivo* par catalyse au palladium, prouvant ainsi que ces complexes de palladium sont biocompatibles et applicables dans les autres stratégies de déprotection ou de modification des amines en milieu cellulaire.

### 2.2.3. Fer dans les réactions de décadeage *in cellulo*

Dans le même but, Meggers a rapporté en 2012 la réduction des azides aromatiques en amines correspondantes à l’intérieur de cellules vivantes par catalyse au complexe de fer [Fe(TPP)Cl] (TPP = 5,10,15,20-tetraphenylporphyrine) **34** et en présence des agents réducteurs comme des thiols.<sup>30</sup> Pour facilement quantifier son activité catalytique, ce catalyseur de fer a été utilisé pour l’activation de la bis-azido rhodamine 110 **33** non fluorescente en rhodamine-110 **27** fluorescente dans les cellules cancéreuses HeLa en dix minutes. Malheureusement, pour les expériences *in vivo* dans le poisson zèbre et les nématodes *Caenorhabditis elegans*, la bis-azido rhodamine est activée directement en rhodamine correspondante sans influence du fer.<sup>30</sup>



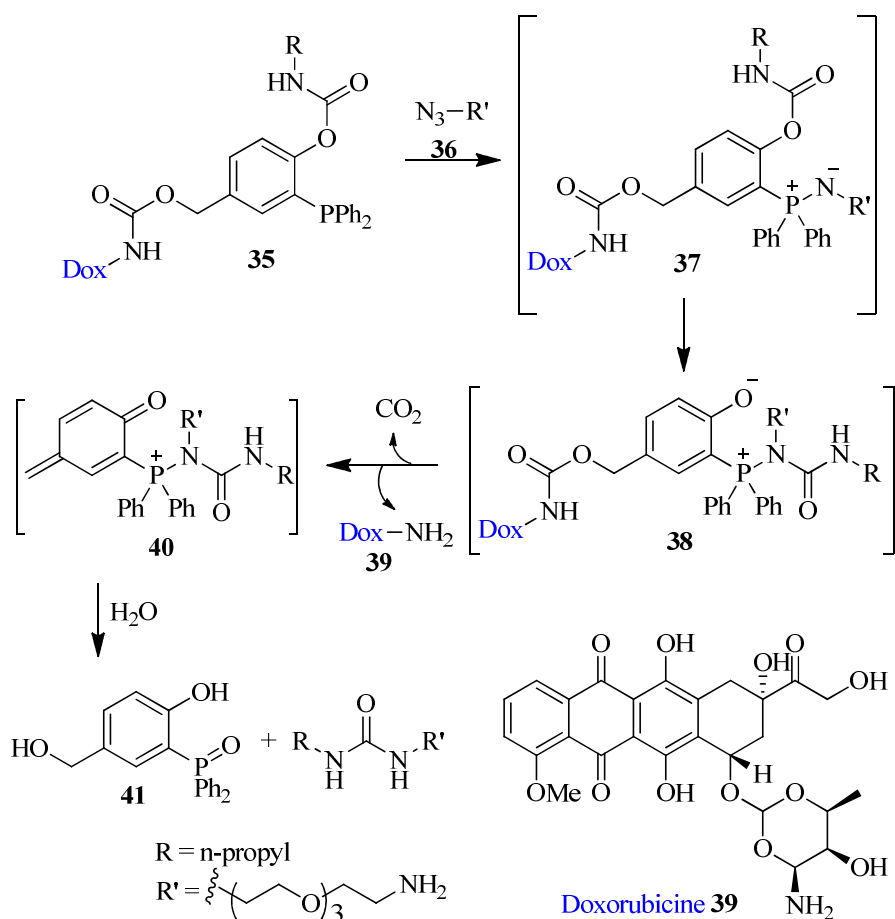
**Figure 18:** Réduction de la bis-azido rhodamine **33** en rhodamine 110 catalysée par le fer dans les cellules HeLa.<sup>30</sup>

### 3. Prodrogues antitumorales

Les drogues anticancéreuses de type chimiothérapie conventionnelle sont non sélectives, conduisant ainsi à des effets secondaires résultant de la toxicité sur les cellules saines avoisinantes. De nouvelles générations de drogues plus ciblées ont été générées mais leur sélectivité n'est pas complète. Pour surmonter ces difficultés et améliorer l'efficacité des traitements, la stratégie utilisée dans le développement moderne des drogues cytotoxiques se focalise sur les prodrogues, activées directement sur le site de la tumeur.<sup>31</sup> Cette stratégie consiste à attacher sur la drogue anticancéreuse un fragment de la molécule capable de désactiver ses propriétés pharmacologiques. Une fois dans les cellules cancéreuses, ce fragment est clivé et les propriétés de la drogue sont restaurées. Cette activation est généralement déclenchée par la surexpression d'enzymes ou le changement des autres facteurs de l'environnement tumoral comme le pH. D'autres déclencheurs peuvent être exogènes comme les radiations électromagnétiques, la présence de réactifs chimiques ou de complexes organométalliques. Plusieurs prodrogues antitumorales ont alors été développées afin de libérer des drogues seulement à leur site d'action.<sup>32,33</sup>

### 3.1. Prodrogues utilisant la réaction de Staudinger

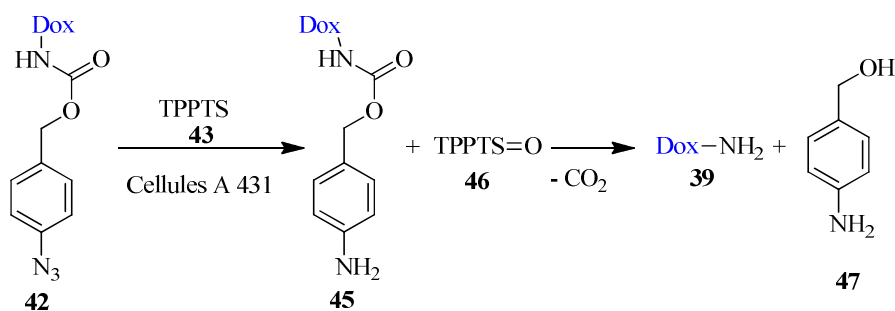
Pendant quelques années, la chimie bioorthogonale a été largement utilisée dans l'imagerie mais peu d'exemples ont été reportés dans le *design* des prodrogues antitumorales. Le premier exemple utilisant une réaction bioorthogonale pour l'activation d'une prodrogue antitumorale par réaction de Staudinger date de 2006 (Figure 19).<sup>34</sup> Dans cet exemple, la prodrogue phosphine dérivée de la doxorubicine **35** a été traitée avec deux équivalents d'azoture **36** dans un mélange THF/H<sub>2</sub>O.



**Figure 19:** Mécanisme d'activation de la prodrogue **35** via la réaction de Staudinger.<sup>34</sup>

L'analyse du brut réactionnel par HPLC montre la libération de la doxorubicine **39** avec un rendement de 90% après 3h, à 37°C. Cependant, la rapidité d'oxydation des phosphines utilisées a limité le développement de cette réaction dans un environnement biologique plus complexe. Ainsi, d'autres stratégies utilisant les réactions bioorthogonales ont fait l'objet d'investigations.

Le meilleur exemple de la réaction de Staudinger a été reporté par Robillard en 2008 selon une stratégie légèrement modifiée de la précédente.<sup>35</sup> Dans cet exemple, l'incubation combinée de l'azoture organique, prodroge de la doxorubicine **42** avec l'arylphosphine **43** dans les cellules cancéreuses A431 conduit à la doxorubicine **39** (Figure 20). La doxorubicine libérée dans cette réaction donne des cytotoxicités forts similaires à celles de la doxorubicine libre de départ **3**.<sup>35</sup>



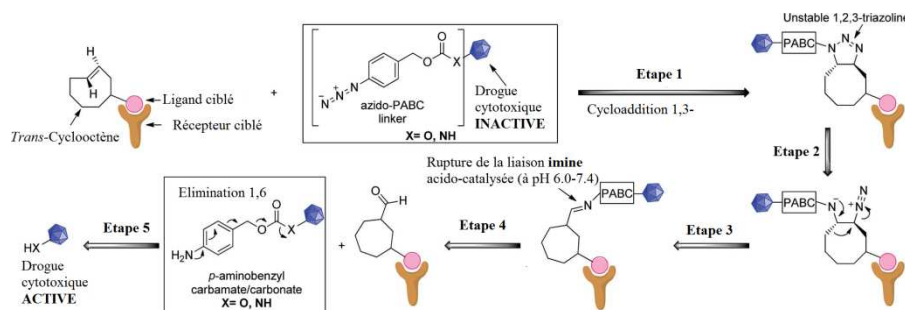
**Figure 20:** Activation de la prodroge **42** via la réduction des azides.<sup>35</sup>

Cependant, l'arylphosphine **43** est désactivée directement après 4 heures par oxydation via un autre mécanisme qui n'est pas la réaction de Staudinger, ce qui limite l'application étendue de cette méthodologie. De plus, il reste à ce stade la question de savoir si l'activation de la prodroge **42** a lieu à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule cancéreuse.

### 3.2. Prodrogues utilisant les cycloadditions

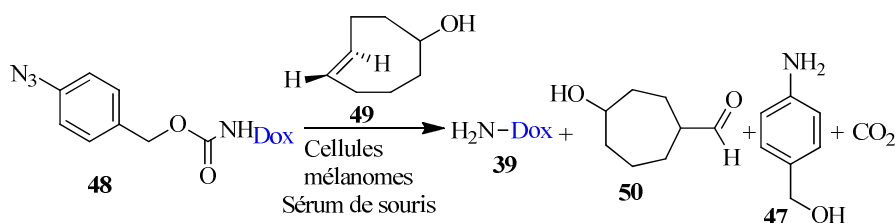
#### 3.2.1. Cycloaddition 1,3 dipolaire pour l'activation des azotures par le *trans* cyclooctenol

A cause de ces problèmes inhérents aux phosphines, une nouvelle activation bioorthogonale de prodrogue basée sur la réaction click 1,3-dipolaire entre le *trans* cyclooctenol et l'azoture a été développée.<sup>36</sup> L'activation *in vitro* de ces prodrogues passe par un schéma représenté à la Figure 21.<sup>36</sup>



**Figure 21:** Mécanisme proposé pour l'activation d'une prodrogue antitumorale *via* une cycloaddition dipolaire-1,3.<sup>36</sup>

Dans le sérum de souris, des valeurs des  $IC_{50}$  similaires à celles de la doxorubicine de départ 39 ont été obtenues, 0.96  $\mu M$  et 0.71  $\mu M$  respectivement pour la doxorubicine libre 39 et l'incubation de la prodrogue 48 avec la TCO 49 (Figure 22). De façon importante, une stabilité remarquable de la prodrogue 48 a été observée ; aucune dégradation due à l'hydrolyse par des thiols cellulaires (GSH ou cystéine) n'a pu être décelée lors de l'étude. Un rendement de 51% est obtenu après 4 h, et 79% après 48 h.

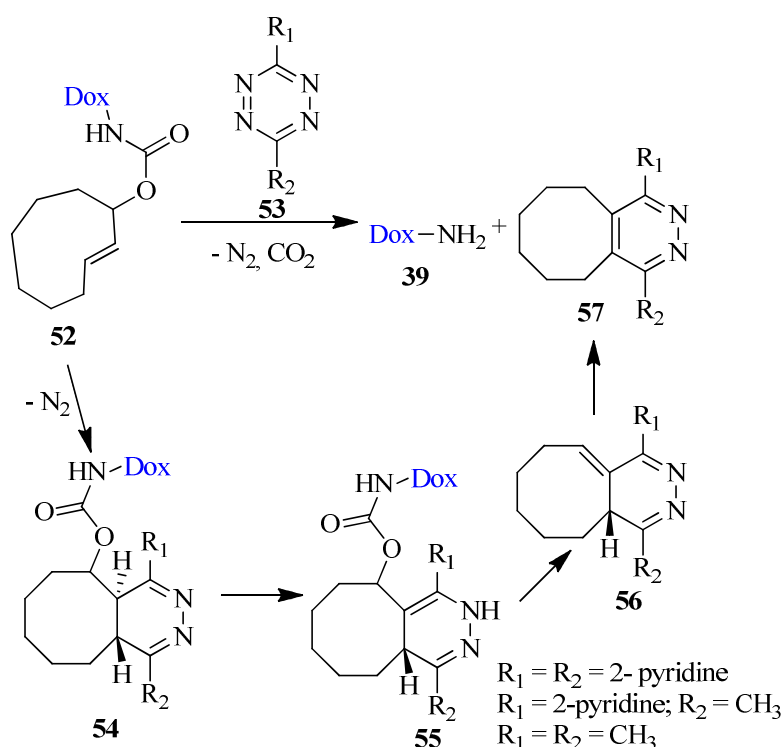


**Figure 22:** Activation de la prodrogue 48 *via* la cycloaddition 1,3.<sup>36</sup>

Cependant, il n'y a pas des arguments pour affirmer avec exactitude si l'activation de la prodrogue **48** a lieu en milieu intra ou extracellulaire.

### 3.2.2. Prodrogues utilisant la réaction de Diels-Alder

Par une méthodologie modifiée, Robillard a décrit en 2013 la ligation des *trans*-cyclooctène (TCO)/tétrazine pour l'activation des prodrogues dérivées de la doxorubicine (Figure 23).<sup>37</sup>



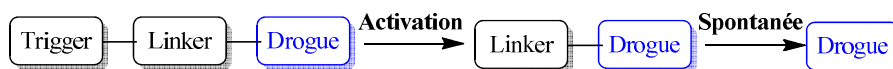
**Figure 23:** Activation de la prodrogue **52** via la cycloaddition 1,3-dipolaire.<sup>37</sup>

Dans ces travaux, l'incubation de la prodrogue **52** avec la tétrazine **53** dans les cellules A431 a conduit à la libération de la doxorubicine **39** par une réaction de Diels-Alder inverse, avec une faible cytotoxicité. Par exemple, des valeurs d'IC<sub>50</sub> de 0.280  $\mu\text{M}$  pour  $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{pyridine}$  ont été obtenues contre des IC<sub>50</sub> = 0.034  $\mu\text{M}$  pour la doxorubicine libre de départ **39**. Ces faibles cytotoxicités sont

attribuées à un faible passage membranaire et donc une faible internalisation de la prodrogue 52 dans les cellules.

### 3.3. Prodrogues activables par les enzymes et approche double

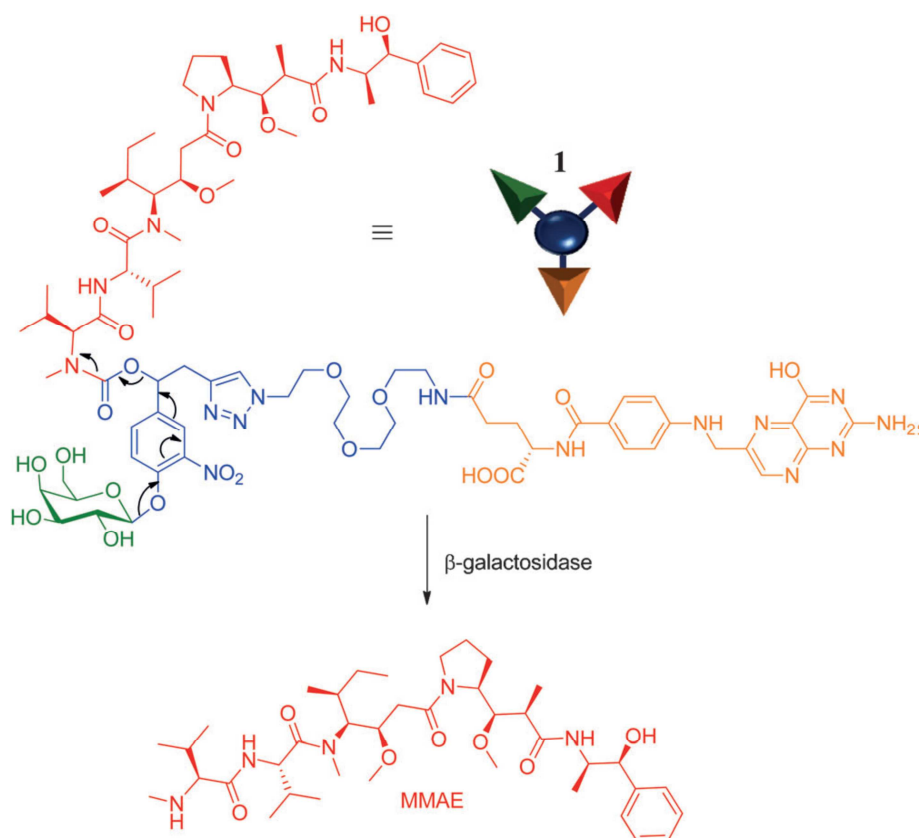
À part ces prodrogues activées par des réactions bioorthogonales, d'autres prodrogues activables par des enzymes ont été développées. Ces prodrogues sont formées par la drogue portant un trigger activable par des enzymes intra ou extracellulaires exprimées par les cellules tumorales. Malheureusement, l'activation enzymatique directe est souvent moins efficace à cause de l'encombrement stérique lorsque la fonction chimique activable n'est pas accessible pour le site actif de l'enzyme. La stratégie adoptée pour surmonter efficacement ces obstacles consiste à utiliser des linkers auto-immolants capables de subir un clivage après l'activation enzymatique ou chimique et ainsi conduire ultérieurement à la fragmentation spontanée de la prodrogue.<sup>38,39</sup> Ce processus, souvent en cascade, est représenté à la Figure 24.<sup>38</sup>



**Figure 24:** Représentation schématique d'une prodrogue avec un linker (espaceur) s'auto-immolant.<sup>38</sup>

Un des exemples utilisant cette approche est une prodrogue clivable par la  $\beta$ -galactosidase conçue pour tirer profit des récepteurs spécifiques associés à la tumeur.<sup>40</sup> Cette prodrogue est composée du déclencheur galactoside (vert), un ligand ciblant les FR (orange clair), et un antimétabolite MMAE (orange foncé) conjugué au linker (bleu) auto-immolant (Figure 25).<sup>40</sup> L'activation passe par 4 étapes : 1) fixation sélective de la prodrogue sur des cellules cancéreuses facilitée par des récepteurs à folate, 2) endocytose facilitée par les mêmes récepteurs, 3) libération de la drogue catalysée par la  $\beta$ -galactosidase et 4)

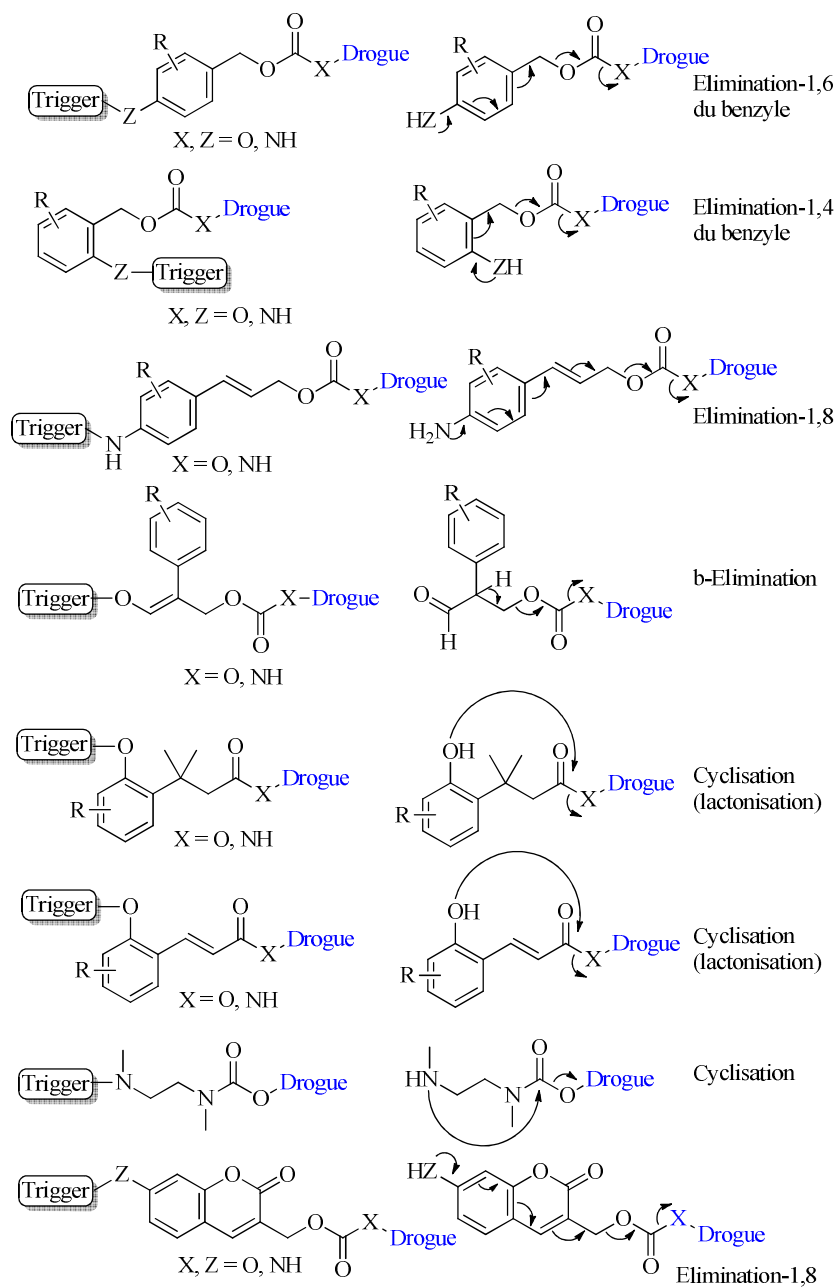
diffusion de la drogue dans les cellules cancéreuses conduisant ainsi à la mort cellulaire. Comme la  $\beta$ -galactosidase est présente dans les cellules tumorales et saines, la sélectivité d'activation intratumorale a été obtenue en attachant à la prodrogue un ligand capable de cibler les récepteurs de folate. Ainsi, la sélectivité de la prodrogue est fonction de la concentration des récepteurs de folate (FR) exprimés par des cellules tumorales. Par exemple dans les cellules KB à surexpression élevée de FR, des valeurs d' $IC_{50} = 0.240$  nM similaires à celles de la MMAE sont obtenues. Par contre, dans les cellules A549 exprimant faiblement les FR, une faible efficacité est observée avec des valeurs d' $IC_{50} = 195.230$  nm comparée à des  $IC_{50} = 0.872$  nM pour la MMAE. Les études *in vivo* de cette prodrogue ont été réalisées sur des souris nudes xénogreffées avec des cellules tumorales KB et transfectées avec la luciférase. Une inhibition totale de la croissance tumorale et un taux de survie amélioré (jusque 30 jours) ont été observés pour les souris traitées avec la prodrogue, sans aucune toxicité comparée à l'inhibiteur MMAE seul.



**Figure 25:** Libération de l'antimitotique MMAE catalysée par la  $\beta$ -galactosidase.<sup>40</sup>

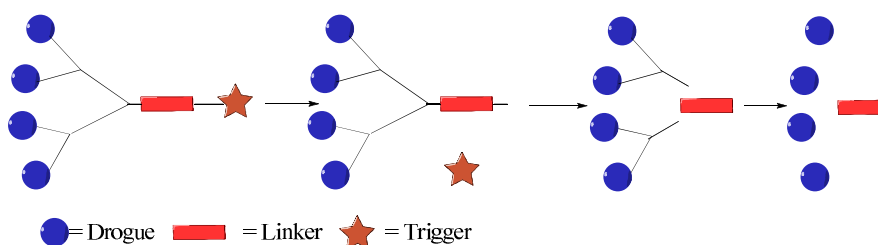
Selon leurs mécanismes d'action, les linkers auto-immolants peuvent conduire à des mécanismes d'élimination ou de cyclisation. Les exemples des linkers les plus souvent utilisés et leurs mécanismes réactionnels associés sont présentés sur la Figure 26.<sup>39,41</sup>

## Partie I : Bibliographie



**Figure 26:** Exemples des linkers auto-immolant généralement utilisées dans le design des prodrogues antitumorales et leurs mécanismes d'action.<sup>39,41</sup>

Une application notable de ces espaceurs se retrouve au niveau du développement des dendrimères auto-immolants. Ces derniers, après une première et seule activation du déclencheur (trigger), subissent des réactions en cascade conduisant au désassemblage du dendrimère entier et libère plusieurs drogues antitumorales (Figure 27). Cette libération multiple et simultanée de plusieurs drogues par une seule étape d'activation est devenue très attractive dans d'autres applications dont une partie d'entre elles ont été passées en revue récemment.<sup>42</sup>



**Figure 27:** Stratégie d'auto-immolation des dendrimères conduisant à la libération de plusieurs drogues après fragmentation.

Cependant, bien que fort intéressante, l'approche des dendrimères est limitée en chimiothérapie par les rendements et la réactivité. D'une part l'encombrement stérique du système fait que peu de drogues anticancéreuses peuvent être utilisées.<sup>42</sup> De plus, il n'est pas facile de synthétiser des larges dendrimères auto-immolants parce que des synthèses multi étapes sont nécessaires. D'autre part, le degré des dendrimères est un autre frein ; car les dendrimères de taille très élevée ne pénètrent pas efficacement dans les cellules.

Cette stratégie souffre de certaines limitations. Comme les enzymes utilisées pour l'activation des prodrogues sont également présentes dans les cellules normales, l'activation enzymatique de la prodrogue peut avoir lieu également dans les tissus sains. Il faut donc que l'absorption de la prodrogue par la tumeur soit aussi maximale que possible pour un ciblage spécifique. D'autre part, il est possible d'envisager de caractériser la surexpression des enzymes d'intérêt dans la tumeur individuelle qui sont impliquées dans l'activation de la prodrogue,

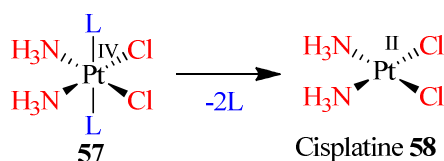
pour une thérapie ciblée. Cependant, ça n'est pas chose aisée sur le plan préclinique ou clinique. Cette difficulté constitue toujours un défi dans le développement des prodrogues capables d'être activées spécifiquement sur le site tumoral. De plus, ces prodrogues ne ciblent pas l'hypoxie qui est un facteur négatif dans la chimio- et la radiosensibilité. Les métaux de transition sont venus comme une alternative.

### 3.4. Prodrogues dérivées des complexes métalliques

Nous allons montrer les exemples les plus importants de métalloprodrogues utilisées dans le traitement du cancer ainsi que les avancées dans l'élaboration des prodrogues activables dans les cellules tumorales.

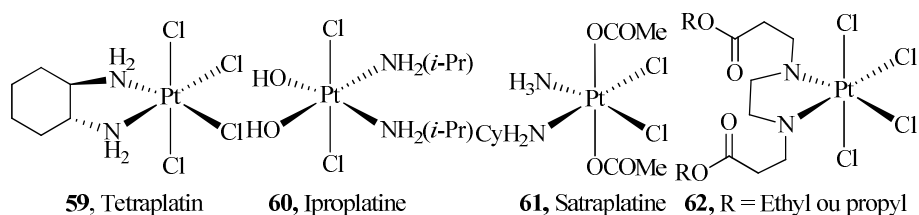
#### 3.4.1.1. Platine

Le cisplatine **58** (Figure 28) est l'une des drogues anticancéreuses la plus utilisée. Ses analogues carboplatine et oxaliplatine sont actuellement dans les étapes cliniques. Cependant, peu de tumeurs peuvent être traitées au moyen du cisplatine ; cette limitation pourrait être surmontée en utilisant les prodrogues réductibles de Pt(IV) **57** (Figure 28).<sup>43</sup> Les complexes de Pt(IV) ont un spin bas avec une configuration électronique  $d^6$  et une géométrie octaédrique. Cette configuration est relativement inerte à la substitution. Les réactions avec les nucléophiles biologiques sont donc défavorisées par rapport aux complexes de Pt(II), ce qui peut prolonger leur durée de vie dans le milieu biologique.



**Figure 28:** Activation d'une prodrogue de Pt(IV) portant les ligands axiaux L, ligands  $\text{NH}_3$ , et les ligands chlorures  $\text{Cl}^-$  en position équatoriales.<sup>44</sup>

La variation des ligands axiaux dans les complexes de Pt(IV) est une stratégie pour altérer leur lipophilie et les potentiels redox. Ces facteurs influencent fortement le passage au-travers de la membrane cellulaire avant d'être réduits. Une série de prodrogues de Pt(IV) n'incorporant pas des ligands biologiquement actifs ont été évalués *in vitro*. Les trois complexes qui sont passés en essais cliniques sont le tétra- (59), ipro- (60), et satraplatine (61) (Figure 29). Après les premiers essais cliniques, le tetraplatine (59), a été abandonné à la suite de sa neurotoxicité élevée. L'iproplatine (60) a montré un intérêt faible dans la phase II à cause de sa réactivité faible. Le satraplatine (61) la première drogue candidat à base de Pt disponible oralement, a quant à lui été abandonné en phase (III).<sup>45</sup> Aucune de ces trois prodrogues n'est passée en clinique à cause de leur faible efficacité comparée au cisplatine, la variabilité dans la distribution, ou alors à cause d'effets secondaire importants.<sup>46</sup>



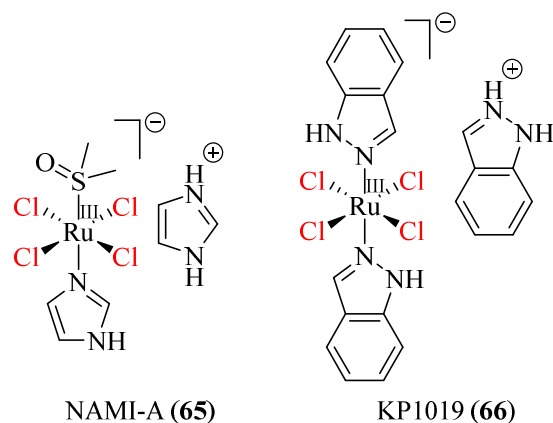
**Figure 29:** Prodrogues de Pt(IV) bioactives.

Ensuite, d'autres complexes de Pt(IV), tels que PtCl<sub>4</sub>(R<sub>2</sub>eddp), R = ethyl, ou n-propyl (62) contenant les esters de ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propionic acid (eddp) comme ligands bidentées, ont été décrits et puis testés (Figure 29). Ces prodrogues dérivées de ligands non cytotoxiques ont cependant montré des valeurs des IC<sub>50</sub> d'au moins dix fois supérieures par rapport au cisplatine.<sup>47</sup>

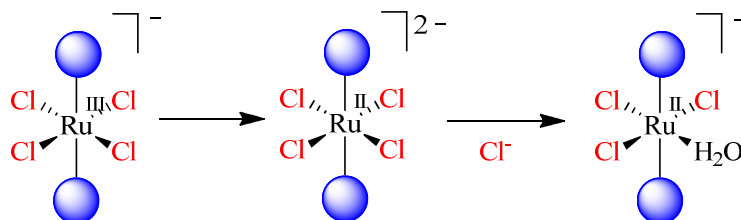
### 3.4.1.2. Ruthénium

L'activité anticancéreuse des composés de ruthénium a été reconnue pour la première fois dans les années 1980. Plusieurs drogues à base de Ru ont été développées avec une efficacité significative contre les différents types de tumeurs *in vivo*<sup>48</sup> avec une toxicité plus faible par rapport au cisplatine *in*

*vitro*.<sup>49,50</sup> Les exemples les plus intéressants sont les complexes de Ru(III) bioréductibles avec des ligands donneurs *N*-hétérocycliques. Pour cette classe, deux prodrogues sont actuellement en phase II des essais cliniques. Ce sont le NAMI-A (**65**) et le KP1019 (**66**) qui sont actives après réduction par des réducteurs cellulaires comme l'ascorbate et le glutathion (Figure 30).



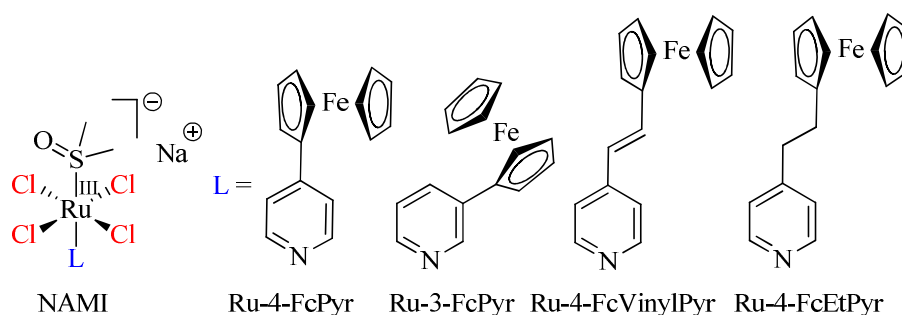
**Figure 30:** Prodrogues de Ru(III) NAMI-A et KP1019.



**Figure 31:** Bioactivation des prodrogues de Ru(III).

Bien que les prodrogues de Ru(III) soient réduites en conditions physiologiques comme le Pt(IV), le Ru(II) résultant maintient toujours son ligand axial et donc une géométrie octaédrique (Figure 31). Bien que ces deux prodrogues soient de structures similaires, mais le NAMI-A **65** est très intéressant car il est moins toxique et cible le développement et la croissance des métastases. Le KP1019 **66** quant à lui traite essentiellement des tumeurs solides comme le carcinome colorectal.<sup>51</sup> Au vu de leur activité anticancéreuse intéressante, l'action combinée du NAMI avec les ferrocènes a été évaluée.<sup>52</sup>

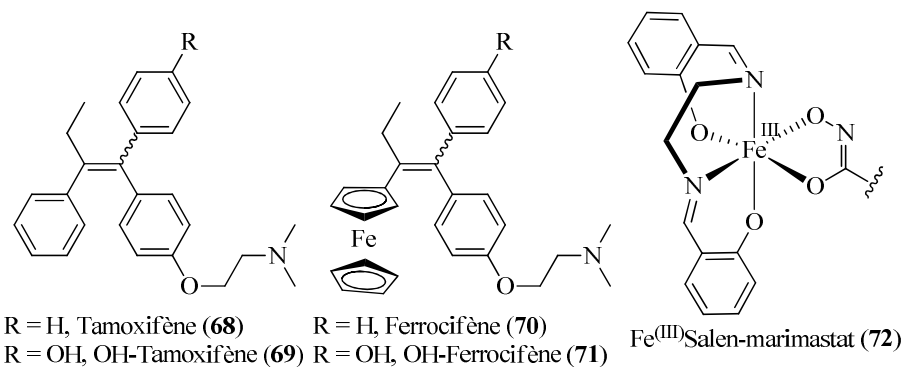
Ainsi, les prodrogues résultantes ont montré un mode d'interaction unique avec les cellules cancéreuses.<sup>53</sup> Des meilleurs cytotoxicités ont été obtenues pour le NAMI fonctionnalisé avec des ferrocènes par rapport au NAMI non fonctionnalisé *in vitro* dans les cellules de l'adénocarcinome prostatique (Figure 32). Ces résultats montrent qu'il est également possible de tirer profit de l'effet synergique de deux métaux dans le *design* des agents anticancéreux.<sup>53</sup>



**Figure 32:** Prodrogues de Ru(III) avec des ligands dérivés du ferrocène.<sup>53</sup>

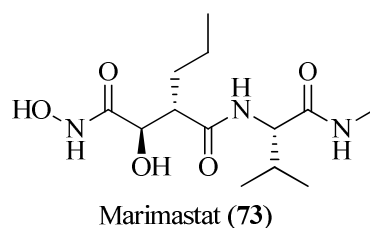
### 3.4.1.3. Fer

A part son couplage au NAMI, le ferrocène a été également couplé à différentes drogues pour améliorer leur efficacité et élargir l'étendue des métallodrogues utilisés dans le traitement du cancer.<sup>54,55</sup> Les drogues anticancéreuses développées à base de ferrocène en phases cliniques sont le ferrocifène **70**, l'hydroxy-ferrocifène **71** dérivé du tamoxifène **68**, et l'hydroxytamoxifène **69** respectivement (Figure 33).<sup>56</sup> Ces derniers sont des modulateurs sélectifs du récepteur des œstrogènes (SERM) utilisés dans le traitement du cancer du sein.



**Figure 33:** Ferrocifène (70), hydroxyferrocifène (71) et le complexe de  $Fe(III)$ salen-marimastat (72) utilisés tous comme agents anticancéreux en clinique.

Le fer (III) a été également utilisé dans des prodrogues avec le marimastat **73**, un inhibiteur de MMPs (matrice de la métalloprotéinase) surexprimés dans les cellules cancéreuses. Ainsi, le complexe octaédrique  $Fe(III)$  marimastat salen (**72**) a montré une activité MMP *in vitro* approximativement 30 fois moindre par rapport au marimastat **73** seul (Figure 34). L'activité inhibitrice réduite du marimastat par sa complexation au Fer *via* sa fonction hydroxamate et les données électrochimiques ont montré qu'il est possible de développer des prodrogues de  $Fe(III)$  bioréduites sélectivement en hypoxie.<sup>57</sup>



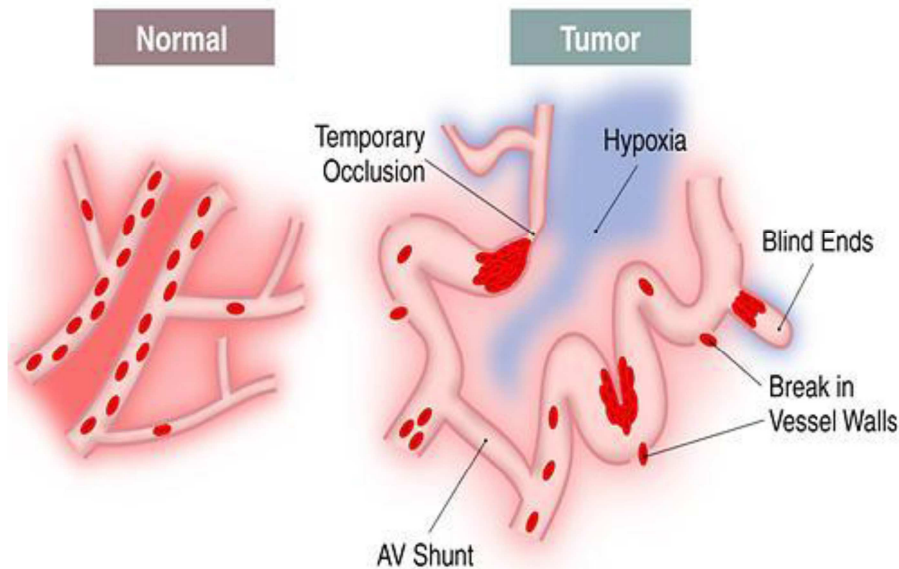
**Figure 34:** Marimastat 73, inhibiteur de MMP.

## **4. Hypoxie tumorale**

### **4.1. Vascularisation tumorale**

La croissance cellulaire des tissus normaux est un processus contrôlé et régulé qui passe par plusieurs points de contrôle. La dérégulation du cycle cellulaire suite à des anomalies génétiques est à l'origine d'une croissance cellulaire incontrôlée, donnant naissance à des cellules cancéreuses qui forment une tumeur. Rapidement la croissance tumorale incontrôlée nécessite la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour fournir nutriments et oxygène. Le réseau vasculaire des tumeurs solides est différent de celui des tissus normaux. Les tissus sains présentent des vaisseaux sanguins relativement uniformes et bien ordonnés pour distribuer l'oxygène et les nutriments dans tous les tissus. A l'inverse, les vaisseaux sanguins tumoraux sont tortueux, immatures et organisés de façon chaotique<sup>58</sup>. Ils présentent des anomalies structurelles les rendant peu fonctionnelles et justifiant que même si le réseau vasculaire est parfois plus dense que dans un tissu sain, la distribution du sang dans la tumeur reste très hétérogène.

Il résulte de cette organisation mal hiérarchisée de la vascularisation tumorale que certaines régions d'une tumeur restent hypoxiques. On distingue en l'occurrence deux types d'hypoxie. L'hypoxie dite de perfusion (ou hypoxie chronique) qui touche les cellules tumorales éloignées de plus de 150  $\mu\text{m}$  des capillaires environnants.<sup>58</sup> Dans un tissu normal, les cellules les plus éloignées des capillaires sont toujours à une distance inférieure à cette limite qui correspond à la distance maximale de diffusion de l'oxygène (Figure 35).<sup>59,60</sup> Le développement des régions hypoxiques se produit dès le début de la croissance tumorale et des zones hypoxiques sont toujours présentes dans n'importe quelle tumeur solide qui a atteint un diamètre de plus de 2-3 mm.<sup>61</sup> La seconde forme d'hypoxie est l'hypoxie aigue ou intermittente : elle concerne les cellules tumorales qui sont transitoirement privées d'oxygène. Ce phénomène provient d'une interruption temporaire du flux sanguin.<sup>62</sup>

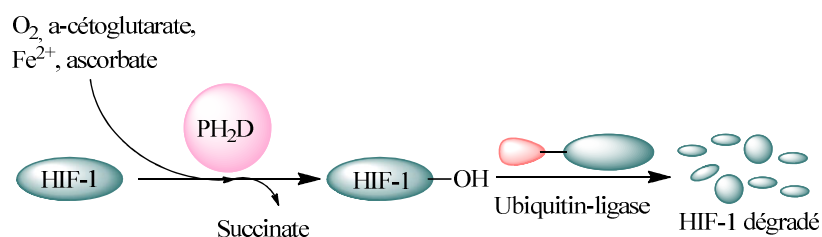


**Figure 35:** Différences entre la vascularisation du tissu sain et tumoral.<sup>58</sup>

#### 4.2. Effets cellulaires de l'hypoxie tumorale

Un apport faible des nutriments par les vaisseaux sanguins aux cellules tumorales permet à celles-ci de développer d'autres mécanismes pour survivre. D'une part, les cellules sélectionnent des mécanismes biologiques permettant de survivre sans métabolisme oxydatif mais aussi de proliférer malgré les conditions physiopathologiques difficiles. Cela aboutit à un phénotype plus agressif qui favorise la progression tumorale et le pouvoir métastatique.<sup>63</sup>

Le facteur de transcription hétérodimérique HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) est responsable de l'activation des voies de signalisation qui permettent à la cellule cancéreuse de s'adapter au stress de l'hypoxie. Dans les cellules saines suffisamment oxygénées, la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est hydroxylée par l'enzyme prolylhydroxylase (PHD) en présence d'ascorbate, de fer(II), d'oxygène et d' $\alpha$ -cétoglutarate (Figure 36).<sup>61</sup> Le HIF-1 $\alpha$  hydroxylé est alors reconnu par des enzymes de type ubiquitine-ligase qui entraîne la dégradation du facteur de transcription.<sup>61</sup>



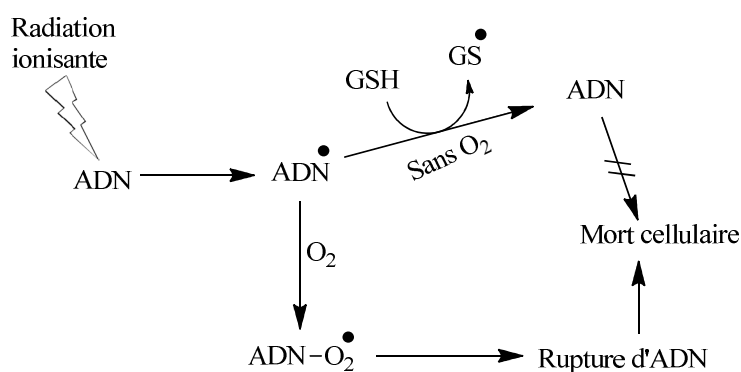
**Figure 36:** Dégradation cellulaire du HIF-1 (facteur de transcription induite-1) dans les cellules suffisamment oxygénées.<sup>61</sup>

En conditions d'hypoxie, la dégradation de HIF-1 $\alpha$  est inhibée, ce qui cause son accumulation à l'intérieur du noyau cellulaire où il interagit avec la protéine nucléaire, l'ARyl hydrocarbon receptor Nuclear Translocator (ARNT) pour former un hétéro-dimère. HIF1 est responsable de l'expression de plusieurs gènes permettant aux cellules tumorales de s'adapter à l'hypoxie.<sup>64</sup> Parmi ceux-ci, on peut mentionner le gène codant pour le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). L'expression du VEGF joue un rôle clé dans l'initiation du processus d'angiogenèse évoqué plus haut.<sup>65,66</sup> HIF1 favorise également l'expression des enzymes glycolytiques comme l'hexokinase et du transporteur du glucose permettant à la cellule tumorale de soutenir une activité glycolytique élevée et de produire de l'ATP malgré le déficit de respiration mitochondriale résultant de l'hypoxie.<sup>64,67</sup>

#### 4.3. Hypoxie et résistance aux traitements

La présence de l'hypoxie est problématique dans le traitement du cancer, car elle est corrélée à un mauvais pronostic pour les patients.<sup>68</sup> Les cellules tumorales hypoxiques ont par exemple une résistance élevée à la radiothérapie. En effet, la radiothérapie génère des radicaux, entre autre au sein des molécules d'ADN (Figure 37). En présence d'oxygène, ces radicaux sont fixés, entraînant des cassures des brins d'ADN et favorisant la mort cellulaire. En conditions hypoxiques, par contre, les lésions occasionnées à l'ADN ont une probabilité

plus grande d'être réparées.<sup>69</sup> Il a été estimé que les cellules hypoxiques sont approximativement 3 fois moins sensibles aux dommages radio-induits.<sup>70</sup>



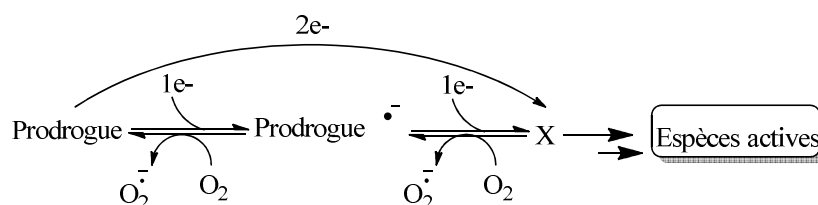
**Figure 37:** Résistance des cellules hypoxiques tumorales à la radiothérapie.<sup>68</sup>

Les cellules tumorales en hypoxie présentent également une résistance élevée aux traitements chimiothérapeutiques. L'hypoxie peut influencer les thérapies par plusieurs voies : d'abord, la distribution de la drogue peut diminuer dans les tissus à cause d'une perfusion inadéquate.<sup>71</sup> Le faible apport sanguin dans les régions hypoxiques des tumeurs justifie également une moindre distribution de la drogue. Deuxièmement, la croissance rapide des tumeurs conduit à des vaisseaux malformés et obstrués qui ne peuvent pas assurer correctement leur fonction. Troisièmement, la faible pression partielle en oxygène peut ralentir le cycle cellulaire. Pour cette raison, les agents chimiothérapeutiques sont moins susceptibles d'agir sur des cellules tumorales hypoxiques peu proliférantes. De plus, l'environnement acide des régions tumorales hypoxiques peut influencer l'équilibre acido-basique de la drogue, et en altérer la diffusion. Bref, l'hypoxie est un paramètre fondamental à l'origine de processus multiples de résistance à la chimiothérapie et justifie la recherche de différentes stratégies visant à améliorer les propriétés pharmacocinétiques des drogues.<sup>72</sup>

#### 4.4. Prodrogues sélectives de l'hypoxie tumorale

Si l'hypoxie est une source de chimiorésistance, elle peut paradoxalement également être exploitée pour développer des stratégies capables d'améliorer l'efficacité des drogues anticancéreuses. Dans ce contexte, une stratégie explorée depuis plusieurs années est celle des « **prodrogues** » réduites en conditions d'hypoxie. Les prodrogues développées à cette fin tuent préférentiellement les cellules tumorales hypoxiques, laissant ainsi les cellules saines (et tumorales) aérobies non affectées. La combinaison d'une chimiothérapie classique à des prodrogues activées par l'hypoxie tumorale est dès lors proposée comme une stratégie attractive pour atteindre les différents compartiments tumoraux, à savoir les cellules tumorales oxygénées et celles qui sont en hypoxie.<sup>73</sup>

L'étape d'activation diffère d'une classe de prodrogue à l'autre.<sup>74</sup> Le schéma général de compétition entre les réductions mono-électronique et bi-électroniques est illustré à la Figure 38.

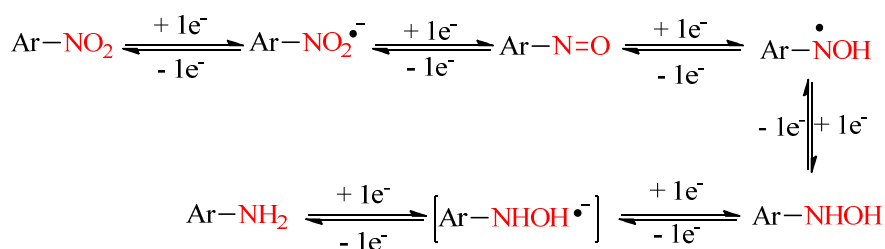


**Figure 38:** Mécanisme général d'activation métabolique des prodrogues bioréductibles.

Dans les cellules en normoxie, les adduits radicalaires subissent une réoxydation par l'oxygène moléculaire pour régénérer la prodrogue de départ (Figure 38).<sup>75</sup> C'est un cycle redox qui diminue la concentration des radicaux intermédiaires dans les cellules en normoxie. Actuellement, quatre classes des prodrogues sélectives de l'hypoxie tumorale ont été développées : les nitro(hétéro)cycliques, les *N*-oxydes (aromatiques et aliphatiques), les quinones, et les complexes métalliques.

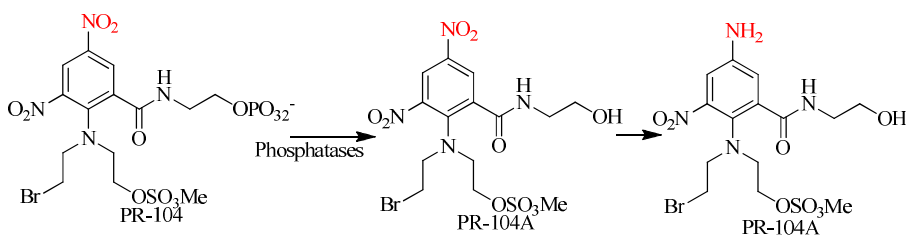
#### 4.4.1. Prodrogues nitro-aromatiques

Les prodrogues nitro-aromatiques sont réduites en amines correspondantes par une cascade de transferts monoélectroniques faisant intervenir un bilan total de 6 électrons (Figure 39).



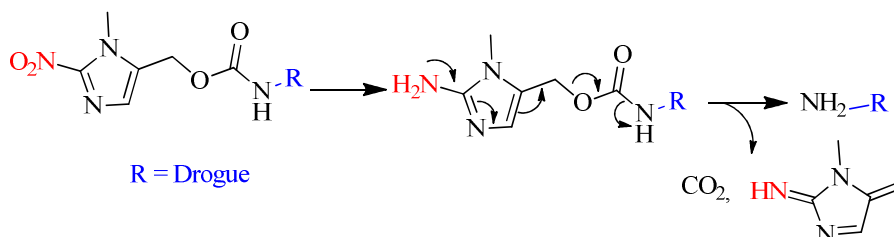
**Figure 39:** Mécanisme général de réduction mono-électronique enzymatique des composés nitro aromatiques.

Par exemple, le PR-104A est une moutarde azotée portant un groupement dinitrobenzamide dont ses propriétés alkylantes ont été bloquées par introduction de ces groupements électrocapteurs de type nitro sur l'aromatique. Il provient du PR-104, un ester phosphate normalement hydrolysé par les phosphatases.<sup>76</sup> Le PR-104A est réduit par les flavoenzymes<sup>77,78</sup> réductases mono-électroniques d'abord en *p*-hydroxylamine et ensuite en *p*-amine pour générer la drogue.<sup>79</sup> En plus, le PR-104 peut être réduit par les oxydoréductases bi-électroniques AKR1C3 selon un mécanisme insensible à l'oxygène (Figure 40).<sup>80</sup> Le PR-104 est actuellement en phase II des essais cliniques.



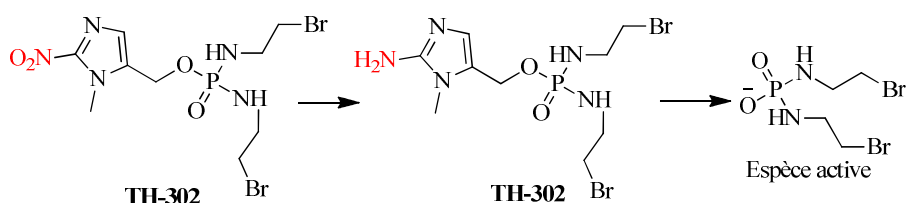
**Figure 40:** Nitroréduction de la prodrogue PR-104.

Le groupement nitro a été utilisé pour développer d'autres prodrogues qui ciblent l'hypoxie suivant une fragmentation illustrée à la Figure 41.



**Figure 41:** Activation réductrice des prodrogues de 1-méthyl-2-nitroimidazol-5-ylmethyl carbamate.

L'exemple le plus intéressant de ces prodrogues est la TH-302 (Figure 42). Sa réduction par les oxydoréductases mono-électroniques dans les cellules tumorales en hypoxie conduit à la fragmentation qui libère finalement une moutarde bromo-isophosphoramide.<sup>81</sup> Celle-ci est un intercalant d'ADN particulièrement efficace pour les lignées cellulaires ayant une déficience dans les voies recombinantes de réparation de l'ADN.<sup>82</sup> La combinaison du TH-302 avec d'autres agents chimiothérapeutiques est actuellement en investigation en phases II et III en essais cliniques.

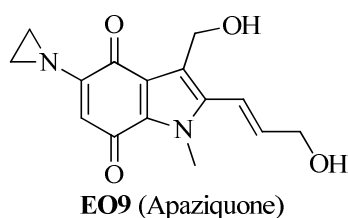


**Figure 42:** Activation réductrice des prodrogues de 1-méthyl-2-nitroimidazol-5-ylmethyl carbamate.

#### 4.4.2. Prodrogues dérivées des quinones

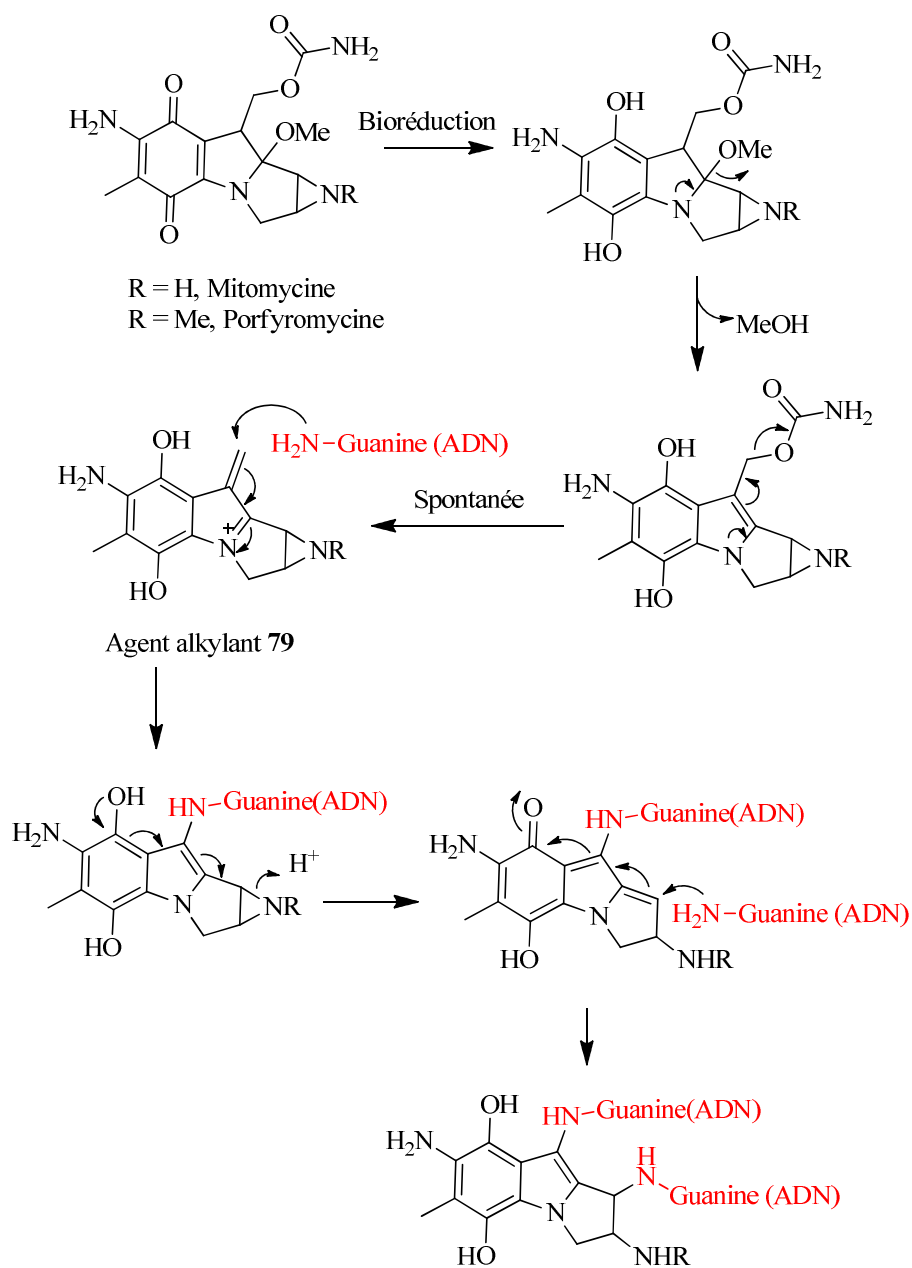
Le développement des quinones comme prodrogues bioréductibles prend son départ avec la mytomycine C, reportée vers les années 1980, qui fut la première prodrogue d'un agent alkylant qui cible l'hypoxie tumorale.<sup>83</sup> Cependant, il fut abandonné à cause d'une faible sélectivité pour l'hypoxie en comparaison avec

la normoxie. D'autres prodrogues de cette classe ont été alors développées, comme la porfiromycine<sup>84</sup> et l'EO9 (Apaziquone) (Figure 43).<sup>85</sup>



**Figure 43:** Structure chimique de l'Apaziquone.

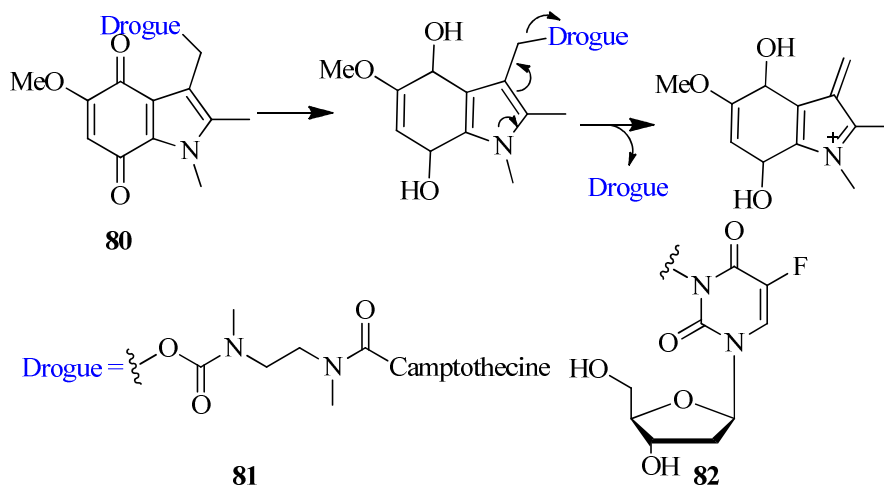
L'activation des quinones en hypoxie est réalisée grâce à des oxydoréductases mono-électroniques comme le cytochrome P450 réductases<sup>86,87</sup> et la DT-diaphorase<sup>88,89</sup> qui conduit à l'agent alkylant de l'ADN **79** *via* la guanine après fragmentation (Figure 44).



**Figure 44:** Activation par bioréduction de la mitomycine C et de la porfirimycine conduisant à la formation d'agents alkylants bifonctionnels.

Pour toutes les prodrogues de cette classe développées, une meilleure sélectivité a été observée pour l'Apaziquone.<sup>90,91,92</sup> Cependant, celle-ci souffre de limitations liées à ses faibles propriétés pharmacocinétiques. Elle a été évaluée en phase II en essais cliniques pour le cancer de la vessie, où l'administration locale de la prodrogue est possible.<sup>93</sup> L'Apaziquone est actuellement en phase III.

Les prodrogues des quinones ont été également développées en attachant la drogue à la position-3 de l'indolequinone. A part la sélectivité de la drogue, la réduction de ces prodrogues forme également des cations ammonium toxiques pour les cellules tumorales en hypoxie (Figure 45). Les exemples décrits les plus importants en suivant ce modèle sont les prodrogues de la camptothécine et de 5-fluorouracile. Par exemple, la prodrogue **82**, montre une cytotoxicité importante avec une valeur faible d'IC<sub>50</sub> de 150 nm pour les cellules EMT6/KU en hypoxie. Celle-ci est une sélectivité d'environ 50 fois supérieure avec un IC<sub>50</sub> de 8.1 µM de la drogue FUDR de départ.<sup>94</sup>



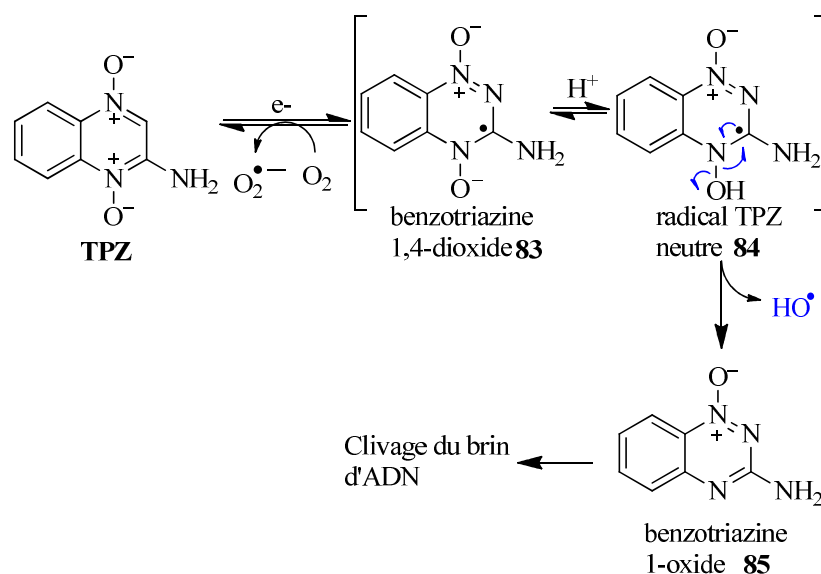
**Figure 45:** Fragmentation sélective des prodrogues dérivées des quinones en milieu hypoxique.

La prodrogue **81** a montré une sélectivité importante vis-à-vis de l'hypoxie tumorale à l'inverse de la Camptothécine de départ.<sup>95</sup>

#### 4.4.3. N-oxydes

Les deux prodrogues de cette classe les plus étudiées, aujourd'hui en phase clinique, sont la tirapazamine (TPZ) et l'AQ4N. Tous les deux donnent des résultats prometteurs en combinaison avec la radiothérapie ou d'autres chimiothérapies.<sup>96</sup>

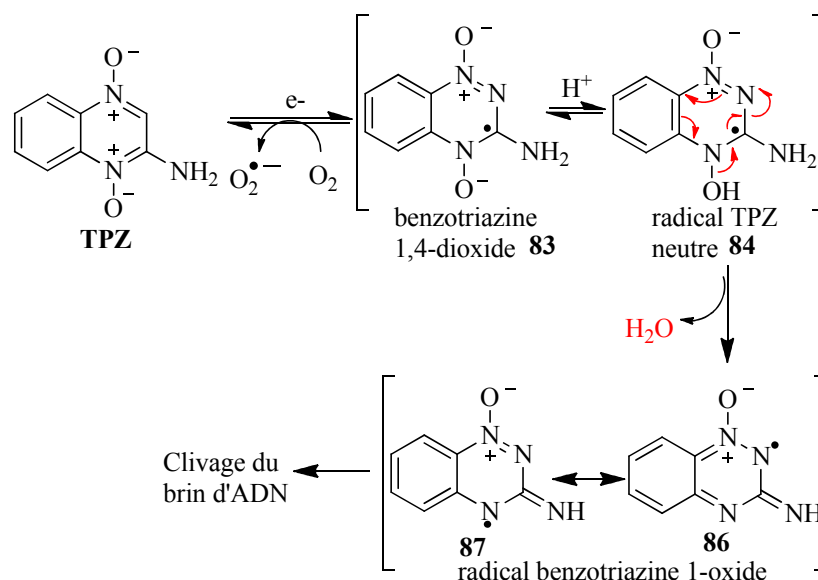
Le mécanisme d'activation de TPZ a été étudié par plusieurs groupes en s'intéressant aux espèces oxydantes responsables du clivage de l'ADN.<sup>96,97</sup> Il a été proposé initialement que le radical neutre TPZ **84** lui-même serait responsable de la rupture du brin d'ADN.<sup>98</sup> Il a été montré plus tard que c'est le radical hydroxyle libéré de ce radical neutre TPZ après la réduction mono-électronique qui est plus vraisemblablement l'espèce active responsable du clivage de l'ADN (Figure 46).<sup>99</sup>



**Figure 46:** Mécanisme d'activation de la TPZ par élimination du radical toxique hydroxyle.<sup>99</sup>

D'autres études ultérieures ont révélé que les radicaux benzotriazinyle 1-oxyde **86** et **87** provenant de la déshydratation du radical neutre TPZ sont responsables du clivage oxydatif de l'ADN comme montré sur la Figure 47.<sup>100,101</sup> Les

réductases responsables de l'activation par réduction mono-électronique sont le cytochrome P450, même si la réduction bi-électronique est également possible.

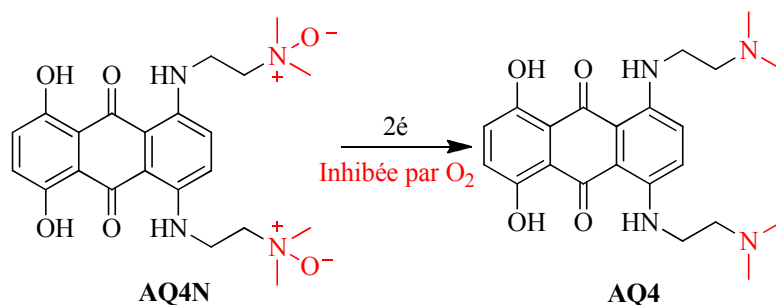


**Figure 47:** Mécanisme d'activation de TPZ faisant intervenir l'élimination d'eau pour donner les espèces actives responsables du clivage du brin d'ADN.

Les résultats des études précliniques réalisées sur la TPZ en combinaison avec la radiothérapie ou le cisplatine étaient prometteurs dans plusieurs cas.<sup>102,103,104,105</sup> Cependant, les résultats de la phase II n'ont pas montré d'efficacité supérieure par rapport aux autres traitements conventionnels en phase III des essais cliniques, ce qui a limité son passage à la phase III.<sup>106,107</sup>

L'autre prodrogue de la classe des *N*-oxyde la plus prometteuse en étude clinique est l'AQ4N. Celle-ci peut subir une réduction bi-électronique avec les enzymes cellulaires, comme le cytochrome CP450 en générant l'AQ4, c'est-à-dire l'amine tertiaire correspondante. L'AQ4 est un agent intercalant de l'ADN et un inhibiteur de la topoisomérase II. La chaîne terminale de l'amine tertiaire est critique pour son interaction électrostatique en se liant sur l'ADN et en lui

conférant ainsi une bonne distribution intracellulaire.<sup>108</sup> Leur sélectivité pour l'hypoxie provient de l'inhibition du processus de réduction enzymatique irréversible par l'oxygène, comme montré sur la Figure 48.<sup>109</sup>



**Figure 48:** Activation réductrice de l'AQ4N en hypoxie tumorale.

Cependant, aucune prodrogue de cette classe n'a connu de succès jusque-là pour passer dans les essais cliniques. Généralement, les limitations qui leur sont attribuées sont soit la faible sélectivité pour l'hypoxie ou la nécessité de concentrations très élevées.<sup>74</sup>

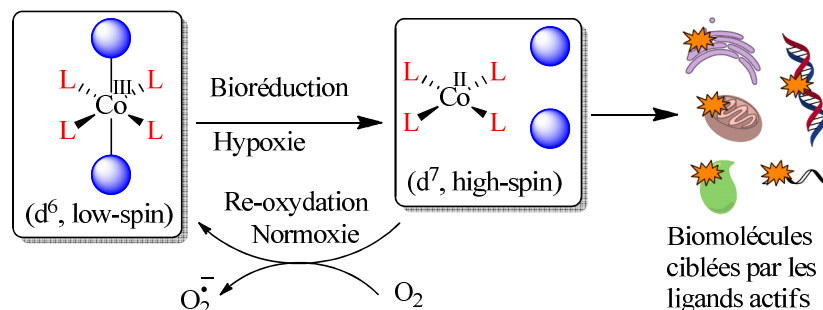
Parmi ces trois dernières classes, le groupement nitro aromatique semble être le trigger le plus prometteur pour le *design* des prodrogues ciblant l'hypoxie tumorale. Le concept de réduction nitro (hétéro)aromatique suivi de la fragmentation pour générer les espèces actives peut être appliqué pour presque toutes les drogues. Cependant, il n'est pas facile de moduler les propriétés redox des prodrogues nitro car en introduisant des substituants électro capteurs, la vitesse de fragmentation diminue drastiquement. Par la suite, une toute nouvelle classe des centres redox a été explorée. Il s'agit des prodrogues aux complexes métalliques.

#### **4.4.4. Prodrogues métalliques bioactivées sélectivement en hypoxie**

Bien qu'une série de prodrogues métalliques de Pt(IV), Ru(III) et Fe(III) aient été développées et réduites dans les cellules cancéreuses avec des meilleures activités plus que le cisplatine, aucune d'entre elles n'a montré une sélectivité vis-à-vis de l'hypoxie même pour les études réalisées *in vitro*. Les complexes métalliques de Co (III) et Cu (II) ont le potentiel d'être utilisés comme agents sélectifs de l'hypoxie mais, aucun n'a été développé pour les usages cliniques.

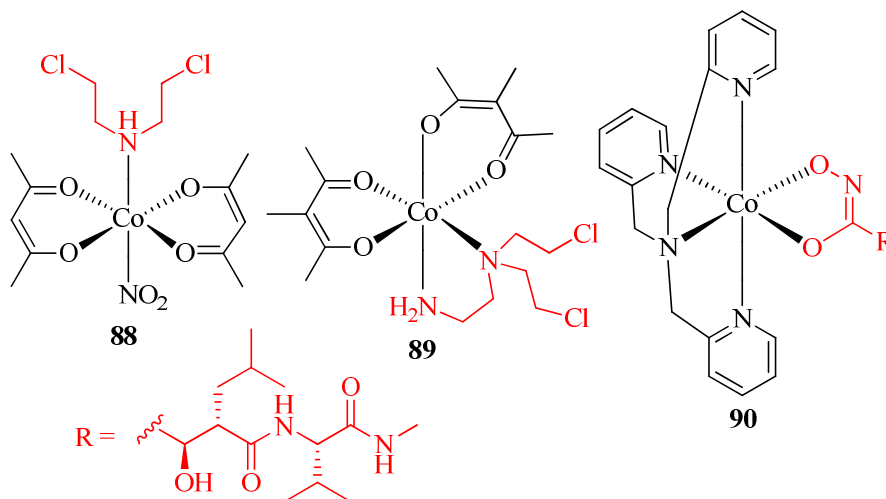
##### **4.4.4.1. Cobalt**

Le cobalt est un élément essentiel trouvé sous forme des traces dans tous les animaux. Le cobalt joue un rôle crucial dans plusieurs processus biologiques importants, et il est trouvé abondamment sous forme de vitamine B12 (cobalamine). Le cobalt est moins toxique comparé aux autres métaux non essentiels comme le platine. Ceci a poussé les chercheurs à mener des investigations sur des composés à base de cobalt comme alternatives moins toxiques des agents anticancéreux dérivés du platine.<sup>110</sup> La différence de réactivité des complexes de cobalt (II et III) a permis le développement des prodrogues de cobalt(III) qui peuvent être activées par bioréduction dans des régions hypoxiques des tumeurs solides.<sup>111</sup> Les complexes de cobalt(III) adoptent une géométrie octaédrique et une configuration électronique  $d^6$ . Ces complexes sont typiquement de bas spin ( $d^6$ , low-spin). Ainsi, ils sont relativement inertes, ce qui leur confère une énergie de stabilisation élevée due au champ cristallin. Par contre, les complexes de cobalt(II) ( $d^7$ , high-spin) sont très labiles et sujets à la substitution de ligands. Après internalisation dans les cellules hypoxiques, les complexes de cobalt(III) sont réduits en cobalt(II) et des ligands cytotoxiques sont finalement libérés (Figure 49). En normoxie, le Co(II) réduit est réoxydé en Co(III), inerte. L'activation des prodrogues de cobalt(III) est réalisée par les réductases cellulaires endogènes comme pour les autres prodrogues bioréductibles discutées précédemment.



**Figure 49:** Mécanisme proposé pour l'activation bioréductive des prodrogues des complexes de Co(III).<sup>110</sup>

Pour les ligands cytotoxiques utilisés, un intérêt particulier a été accordé aux moutardes azotées, qui sont des agents alkylants des bases purines.<sup>112</sup> La première prodrogue de cette classe qui a donné une meilleure sélectivité de bioréduction hypoxique est la prodrogue **88**. C'est un complexe de Co(III) qui combine des ligands acétylacétonate (acac) et la bis(2-chloroethyl)amine (BCA) (Figure 50). Dans sa forme oxydée, la prodrogue **88** est inerte, car la paire libre d'azote de BCA est impliquée dans la coordination du cobalt et est donc indisponible pour la cyclisation intramoléculaire formant l'ion aziridinium, qui est l'espèce active pour l'alkylation de l'ADN. Dans sa forme réduite, le BCA est libéré du complexe de Co(II) conduisant ainsi à son effet de cytotoxicité. De façon intéressante, la prodrogue **88** a permis de surmonter la résistance observée du ligand moutarde dans les cellules cancéreuses du carcinome squameux. Les études *in vivo* réalisées sur les souris ont permis de remarquer également une augmentation supérieure à 60 jours de la durée de vie de souris porteuses de leucémie (L1210) et une faible croissance (plusieurs jours) du fibrosarcome tumoral.<sup>113</sup>



**Figure 50:** Prodrogue de Co(III) les plus prometteurs.

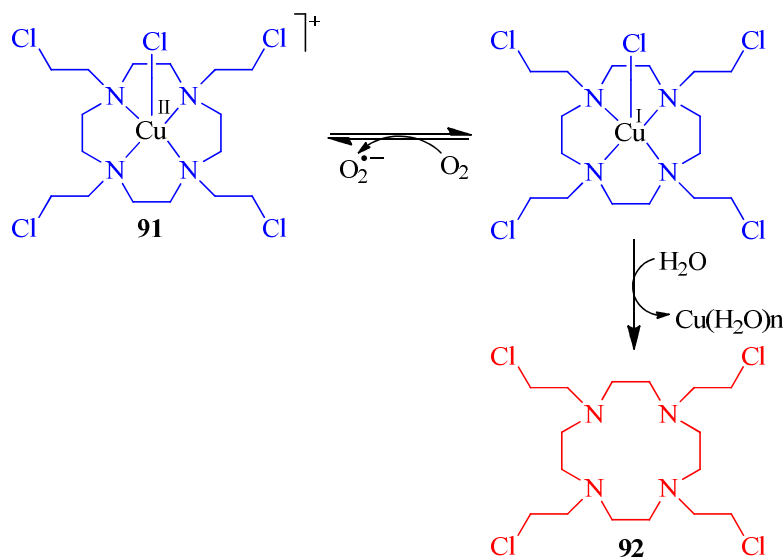
Dans le but d'améliorer la stabilité cinétique, et la sélectivité hypoxique, la moutarde bidentate *N,N'*-bis(2-chloroéthyl)éthylènediamine (BCE) a été utilisée pour la prodrogue **89** (Figure 50). Celle-ci a montré une sélectivité de cytotoxicité pour les cellules cancéreuses de carcinome mammaire de plus de 20.3 fois par rapport aux cellules incubées en normoxie<sup>114</sup>. Cependant, les études *in vivo* réalisées plus tard ont montré que cette prodrogue était métaboliquement instable, conduisant ainsi à une toxicité systémique élevée et une faible radio sensibilité à la bioréduction.<sup>114</sup>

Pour explorer les applications des prodrogues de Co(III) pour différents effets thérapeutiques, Hambley et son équipe ont exploité les propriétés électrochimiques des complexes de Co(III) pour délivrer sélectivement les inhibiteurs de métalloprotéases matricielles (MMP) en cellules hypoxiques.<sup>115</sup> Même si plusieurs inhibiteurs MMP exogènes ont été développés pour restreindre les métastases cancéreuses, aucune n'a été approuvée en phase clinique. La limitation majeure dans le *design* de quelques inhibiteurs de MMP est leur fonction acide hydroxamique terminale. En effet, la faible biodisponibilité orale de ces inhibiteurs en essais cliniques proviendrait de réactions secondaires entre l'acide hydroxamique et les biomolécules.<sup>116</sup> Pour

surmonter ces limitations, le marimastat inhibiteur de MMP a été complexé au Co(III)-tris(2-méthylpyridyl)amine (TPA) *via* sa fonction acide hydroxamique.<sup>115</sup> Les propriétés du marimastat ont donc été désactivées, et puis restaurées seulement après la libération sélective dans les sites hypoxiques par réduction du complexe inerte de Co(III) en complexe de Co(II) plus labile. Dans une étude *in vivo*, la prodrogue **90** était 2-3 fois beaucoup plus efficace pour réduire la croissance de la tumeur des tissus adipeux mammaires de souris plus que l'inhibiteur MMP libre. Cependant, dans une étude biochimique ultérieure, il a été observé que la prodrogue **90** et le marimastat ont favorisé des métastases par rapport au contrôle.<sup>115</sup>

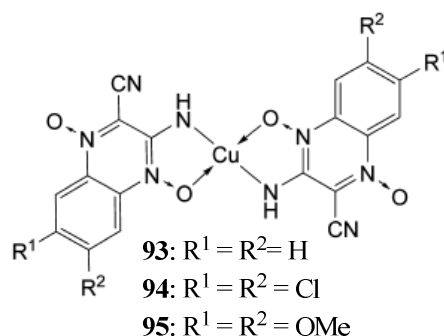
#### 4.4.4.2. Cuivre

La chimie du cuivre est également intéressante pour le développement des prodrogues sélectives de l'hypoxie, parce que le Cu a deux étages d'oxydation et les potentiels de réductions accessibles en milieu cellulaire.<sup>117</sup> Les applications des complexes de cuivre comme agents antitumoraux ont été passées en revue récemment.<sup>118</sup>



**Figure 51:** Mécanisme d'activation des prodrogues de Cu(II) à la moutarde azotée cyclen.<sup>121</sup>

Comme pour le Co(III), les complexes de Cu(II) peuvent être réduits pour former les complexes de Cu(I) instables et libérer le ligand cytotoxique actif. De plus, les isotopes radioactifs du Cu peuvent être utilisés, combinant ainsi la radiothérapie et la bioactivation sélective. A cet effet, le ligand tirapazamine a été suggéré comme cytotoxine hypoxique pour être utilisé avec le Cu radioactif, combinant ainsi l'activité antitumorale du complexe de cuivre avec sa radioactivité.<sup>119</sup> Les isotopes du cuivre sont le  $^{64}\text{Cu}$  ou  $^{67}\text{Cu}$ . Les complexes de cuivre avec des ligands bis(thiocarbazone) et bis(-salicylaldimine) radiomarqués au  $^{64}\text{Cu}$  ont montré une sélectivité pour l'hypoxie lorsqu'il est employé comme traitement sur des cellules cancéreuses d'ovaires de hamster chinois.<sup>120</sup> Le ligand macrocyclique cyclen a été utilisé pour le *design* de prodrogues sélectives de l'hypoxie. Le complexe de Cu(II) **91** avec la moutarde azotée basée sur le cyclen **92** a montré une sélectivité hypoxique sur des cellules cancéreuses du poumon. La sélectivité hypoxique proviendrait du cycle redox en tissus normoxiques, similaire au comportement des prodrogues de Co(III) décrites ci-haut (Figure 51).<sup>121</sup>



**Figure 52:** Complexes de cuivre (II) dérivés de la quinoxaline  $N^1$ ,  $N^4$ -dioxyde.<sup>123</sup>

Dans le but d'améliorer le profil bioactif des prodrogues sélectives de l'hypoxie, les nouveaux complexes de Cu(II) de formule générale  $[\text{Cu}(\text{HL})_2]$  ont été développés avec des ligands de type 3-aminoquinoline-2-carbonitrile- $N^1$ ,  $N^4$ -dioxide.<sup>122,123</sup> Leur cytotoxicité a été évaluée dans des cellules cancéreuses V79

en conditions hypoxiques et normoxiques. Bien que de structures similaires, seul le complexe **95** a montré une sélectivité hypoxique comparée à ses analogues (Figure 52).<sup>123</sup>

## 5. Conclusion

Comme nous l'avons passé en revue précédemment, les agents chimiothérapeutiques utilisés actuellement présentent une faible pénétration dans le microenvironnement tumoral, ce qui réduit leur efficacité. Des recherches sont toujours réalisées pour développer des nouvelles prodrogues capables d'atteindre les cellules tumorales hypoxiques. L'un des domaines les plus attrayants et prometteurs est la chimie des métaux de transition, où le métal peut être utilisé pour délivrer et contrôler l'activité du ligand cytotoxique ou même contribuer à la toxicité elle-même. Les exemples discutés précédemment illustrent le potentiel des complexes métalliques en chimiothérapie actuelle. A cet égard, les complexes de cobalt(III) et cuivre(II) activés sélectivement en hypoxie montrent qu'il est capable d'activer des autres métaux de transition avec des potentiels redox accessibles dans le milieu biologique comme le palladium. Pour obtenir une éventuelle sélectivité hypoxique, il importe cependant de jouer sur les ligands coordonnant le centre métallique comme cela a déjà été montré pour le fer.<sup>57</sup>

## Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons montré dans la première partie de cette thèse, des exemples des réactions chimiques métallo-catalysées ont été reportés dans la littérature. Parmi ces métaux, le palladium occupe une place particulièrement intéressante.

En effet, la chimie du palladium est bien connue et de nombreuses réactions sont déjà connues et maîtrisées. Les réactions sont assez robustes, et peuvent se faire à température ambiante. Les activités catalytiques sont en général assez bonnes et de nombreuses réactions peuvent se faire en milieu aqueux. Le palladium possède une série d'espèces avec des nombres d'oxydation accessibles en milieu physiologique. Il y a une bonne expérience dans la littérature sur la compatibilité avec de nombreuses biomolécules. Par exemple, le palladium a été utilisé pour réaliser des modifications de protéines au moyen des réactions de Tsuji-Trost, de Sonogashira, ou de Suzuki. Ces réactions ont été revues récemment dans la littérature.<sup>24</sup>

Le palladium a été également utilisé pour activer des prodrogues anticancéreuses. Cependant, il n'y a encore que peu de résultats dans la littérature sur des approches de catalyse *in cellulo*. Nous nous sommes intéressés à ce domaine de recherche récent avec objectif de développer l'aspect de bio-activation du catalyseur de manière sélective en hypoxie. Cette nouvelle approche est prompte à amener des effets supplémentaires de sélectivité pour l'activation de prodrogues qui pourra rendre les drogues encore plus sélectives des tumeurs. Cela permettra ensuite de développer des systèmes encore plus complexes en ajoutant des effets d'accumulation par vectorisation pour des applications *in vivo*.

Les aspects redox de la chimie du palladium sont également faciles à contrôler. En effet, les mécanismes des réactions catalysées par le palladium sont des processus à  $2e^-$  ( $Pd^{(0)}/Pd^{(II)}$ ) alors que les mécanismes associés aux autres

métaux utilisés en catalyse *in cellulo* sont des processus monoélectroniques ( $\text{Fe}^{\text{(II)}}$ / $\text{Fe}^{\text{(III)}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{(I)}}$ / $\text{Cu}^{\text{(II)}}$  et  $\text{Co}^{\text{(II)}}$ / $\text{Co}^{\text{(III)}}$ ).

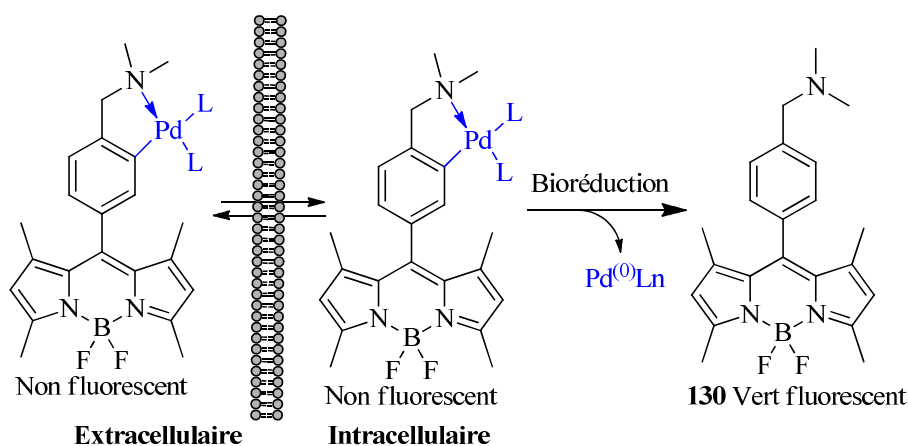
De plus, le palladium n'est pas présent dans l'organisme vivant ce qui assure un autre effet de sélectivité pour l'activation des prodrogues.

Au départ des avantages listés des réactions métallo-catalysées *in cellulo* et en particulier le palladium, nous nous sommes alors intéressés à explorer les réactions pallado-catalysées dans le but de délivrer sélectivement des drogues antitumorales en hypoxie.

L'objectif global de la thèse consiste en la mise au point de nouvelles prodrogues sélectives de l'hypoxie tumorale. Les prodrogues développées seront activées par des complexes métalliques de palladium pour libérer sélectivement la drogue anti-cancéreuse dans les cellules hypoxiques.

## **1. Palladacycles-BODIPY, marqueurs de l'hypoxie tumorale**

Le premier objectif de cette thèse consiste à trouver un marqueur de l'hypoxie tumorale à base d'un ligand fluorescent de type BODIPY attaché à un complexe de palladium. Pour ce faire, nous avons opté pour l'utilisation de complexes de palladium (II) non fluorescents dotés d'un groupement fluorescent de type BODIPY. Le BODIPY est un ligand fluorescent, mais dès qu'il est complexé au métal comme le palladium, ce dernier désactive sa fluorescence. Dans la suite, le métal sera réduit sélectivement en hypoxie libérant ainsi le ligand fluorescent de départ (BODIPY) (Figure 53). Des variations seront réalisées au niveau électronique et stérique sur le ligand pour obtenir la bioréduction sélective dans les cellules tumorales en hypoxie.

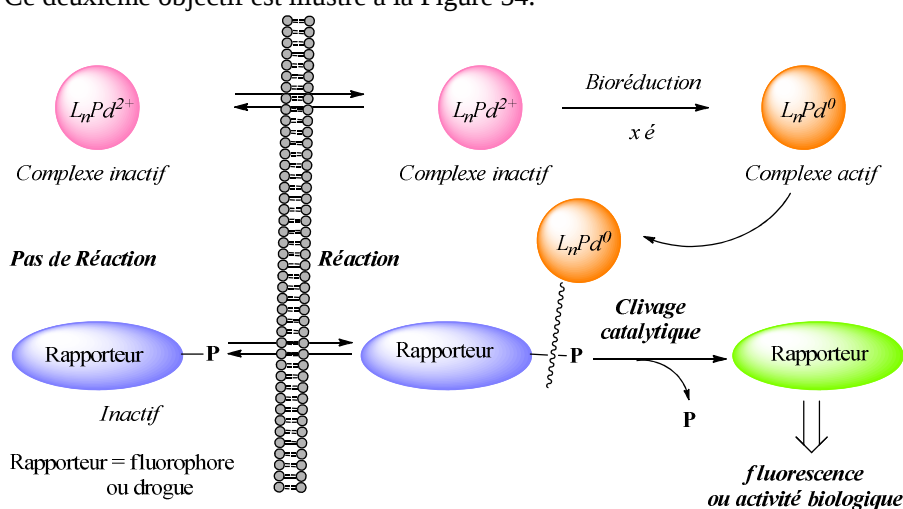


**Figure 53:** Bioréduction sélective des palladacycles-BODIPY, marqueurs de l'hypoxie tumorale.

## 2. Applications des palladacycles en catalyse *in cellulo*

Comme nous l'avons précédemment expliqué, notre but est de pouvoir réaliser des réactions métallo-catalysées en milieu biologique. Le deuxième objectif de cette thèse est d'étendre ce concept à l'activation hypoxique d'un complexe métallique pour catalyser l'activation d'une prodrogue anti-tumorale. Les résultats de la première partie permettront de mettre en évidence une possibilité de bioréduction sélective en milieu hypoxique qui pourra être par la suite appliquée en catalyse pour délivrer sélectivement une drogue anti-cancéreuse dans des cellules en hypoxie. Dans ce deuxième objectif, un système catalytique optimisé sera alors utilisé. Concrètement, un complexe de palladium identifié dans le premier objectif comme marqueur potentiel de l'hypoxie tumorale sera utilisé pour catalyser cette réaction de délivrance des drogues cancéreuses dans les cellules en hypoxie. Typiquement, un complexe de palladium (II) inactif sera incubé en présence de cellules cancéreuses. Après internalisation il sera réduit en palladium (0). Celui-ci catalysera alors une réaction de décaageage de la prodrogue anti-cancéreuse sélectivement en cellules hypoxiques. Dans un premier temps, un fluorophore sera utilisé pour faciliter le suivi de cette réaction

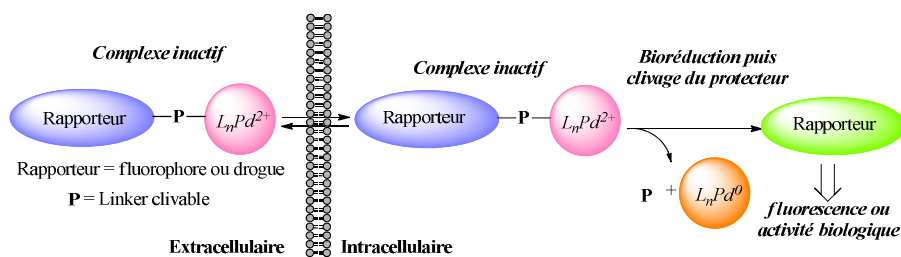
de catalyse *in cellulo* par les méthodes de fluorescence confocale. Dans la suite, le système catalytique optimisé sur le fluorophore sera utilisé pour libérer sélectivement un agent antitumoral cagé dans les cellules tumorales en hypoxie. Ce deuxième objectif est illustré à la Figure 54.



**Figure 54:** Décageage *in cellulo* de la prodrogue par le palladium (0) formé *in situ*.

### 3. Prodrogues bioactivables *via* la déallylation de Tsuji-Trost

Le troisième objectif de cette thèse consiste à mettre au point un système organométallique beaucoup plus simplifié capable de libérer une drogue anticancéreuse dans les cellules hypoxiques selon la réaction de Tsuji-Trost. Contrairement au deuxième objectif, les nouvelles prodrogues que nous allons développer seront formées en un seul système de la drogue anticancéreuse, le groupement protecteur et le centre métallique (Figure 55).



**Figure 55:** Décageage *in cellulo* de la prodrogue via la réaction de Tsuji-Trost.

Les ligands stabilisant le palladium (0) seront utilisés pour éviter une éventuelle fragmentation de la prodrogue avant que la réaction catalytique n'ait lieu. De plus, le rapporteur sera connecté au centre métallique par le linker clivable par des liaisons stables de type carbamate suffisamment stables en milieux biologiques.



## Partie II : Palladacycles- BODIPY marqueurs de l'hypoxie tumorale



## 1. Introduction

La première partie de notre travail vise à mettre au point des marqueurs fluorescents de l'hypoxie tumorale qui fonctionneront sous le mode on/off selon s'ils sont placés en milieu normoxique ou hypoxique. La fluorescence du ligand fluorescent BODIPY sera éteinte par complexation du palladium, et puis retrouvée après élimination du palladium (0). Ce palladium (0) sera utilisé dans un deuxième temps, pour catalyser sélectivement le décageage d'une drogue anti-cancéreuse dans les cellules cancéreuses en hypoxie.

## 2. BODIPY : découverte, voies de synthèse et applications

### 2.1. Introduction et découverte

Le noyau BODIPY « **BoronDiPyrr**omethen » ou 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène est une entité polycyclique hétéro-aromatique formé de 2 sous unités pyrroliques, complexées par les atomes d'azote au centre « BF<sub>2</sub> ». L'atome de bore adopte une géométrie tétraédrique et les deux sous unités de pyrroles sont coplanaires. La synthèse du BODIPY a été décrite pour la première fois par Treibs et Kreuzer en 1968 par condensation du 2,4-diméthylpyrrole sur le 2-acétylpyrrole en milieu acide.<sup>124</sup> En complexant ce système avec le bore, il devient fluorescent. Depuis lors, les BODIPY ont reçu une attention très considérable grâce à leurs propriétés photophysiques intéressantes.

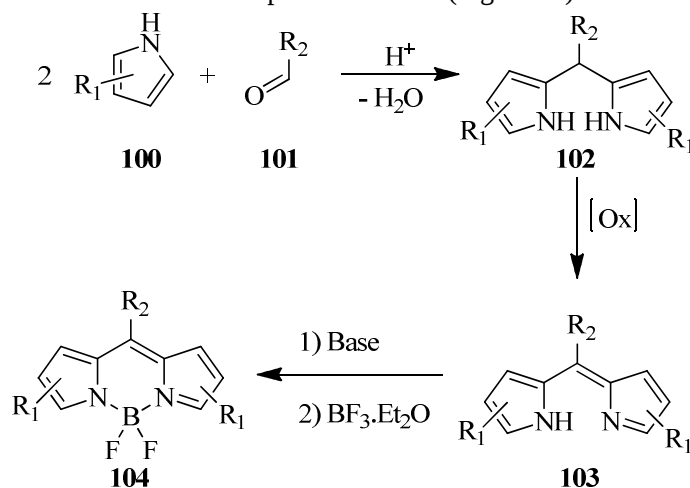
## 2.2. Voies de synthèse

### 2.2.1. BODIPY symétriques

Les BODIPY symétriques peuvent être synthétisées par condensation de deux molécules de pyrrole soit sur une molécule d'aldéhyde, soit sur une molécule dérivée d'un acide carboxylique. Ces deux voies impliquent des étapes légèrement différentes.

#### 2.2.1.1. Synthèse à partir d'aldéhydes

Cette synthèse se réalise en 4 étapes successives (Figure 56).

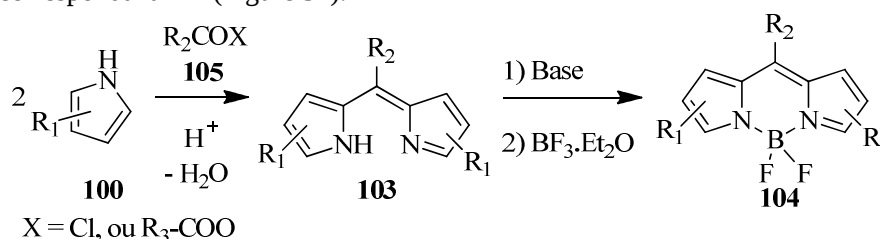


**Figure 56:** Synthèse de BODIPY à partir d'aldéhydes.

Elle débute par la condensation de 2 équivalents de pyrrole **100** sur 1 équivalent d'aldéhyde **101**, en présence d'une quantité catalytique d'acide, de préférence l'acide trifluoroacétique.<sup>125</sup> L'intermédiaire dipyrrométhane **102** est alors formé. La deuxième étape est une oxydation par un dérivé de quinone (DDQ ou chloranil) aboutissant au dipyrrométhène **103**. L'utilisation du chloranil, analogue chloré du DDQ, est en général privilégié.<sup>126,127</sup> Enfin, les deux dernières étapes consistent à déprotonner l'un des pyrroles par une base (Et<sub>3</sub>N ou DIPEA) puis à complexer les deux noyaux aromatiques par ajout d'un excès de BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O pour donner le BODIPY correspondant **104**.

### 2.2.1.2. Synthèse à partir de dérivés d'acides

Le dipyrrométhène peut être directement obtenu par condensation de deux équivalents de pyrrole **100** sur un chlorure d'acide ou un anhydride **105**, suivie d'une réorganisation des systèmes électroniques  $\pi$  conduisant ainsi à l'intermédiaire **103**. Les deux dernières étapes, identiques à la précédente voie de synthèse, consistent à déprotonner cet intermédiaire **103** puis complexer l'intermédiaire formé par du  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , de façon à former le BODIPY correspondant **114** (Figure 57).

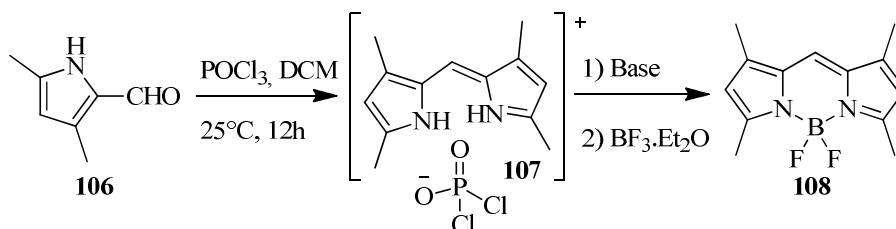


**Figure 57:** Synthèse de BODIPY à partir de dérivés d'acides.

Cette voie de synthèse présente l'avantage d'éviter l'étape d'oxydation du dipyrrométhane, et diminue ainsi les risques de dégradation. Cependant, elle présente des inconvénients majeurs liés à la grande réactivité des dérivés d'acide utilisés comme électrophiles. En pratique, des dérivés pyrroles porteurs des fonctions nucléophiles ne peuvent pas être utilisés ainsi. De plus, les dérivés d'acides utilisés que sont les anhydrides et les chlorures d'acides sont instables, ce qui rend cette voie de synthèse plus difficile pour la synthèse de BODIPY, en comparaison avec la première.

### 2.2.1.3. Synthèse par auto-condensation du formyl pyrrole

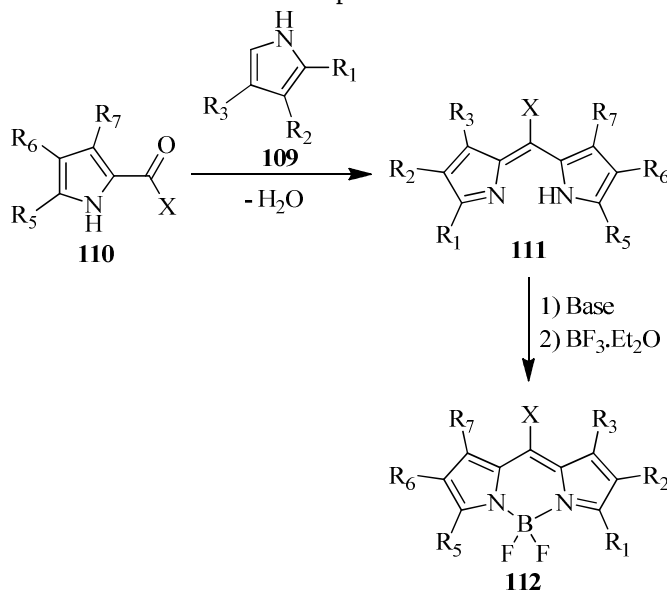
Cette dernière voie de synthèse a été mise au point par Burgess en 2008.<sup>128</sup> Celle-ci se base sur la condensation en condition acide de 2-formylpyrroles **106** sur lui-même (Figure 58). L'intermédiaire réactionnel formé **107** est ensuite déprotonné comme dans les voies précédentes et complexé enfin par du  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  pour donner la BODIPY d'intérêt **108**.



**Figure 58:** Exemple d'auto-condensation de formyl pyrrole.

### 2.2.2. BODIPY dissymétriques

Cette stratégie de synthèse diffère complètement de la précédente (Figure 59). Elle repose sur la condensation d'une unité de pyrrole **109** sur le second pyrrole **110** portant un groupe carbonyle dont la nature de l'aldéhyde ou de la cétone est déterminée par le substituant ( $\text{X} = \text{H}$  ou aromatique). L'intermédiaire réactionnel **111** formé est ensuite déprotonné, puis chélaté par du  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  et aboutit aux dérivés BODIPY **112** correspondants.<sup>129</sup>



**Figure 59:** Synthèse des BODIPY dissymétriques.

La difficulté réside dans l'obtention de l'intermédiaire **111**, et plus particulièrement dans l'obtention de dérivés cétopyrroliques aromatiques **110** qui sont généralement instables au cours du temps.<sup>130</sup>

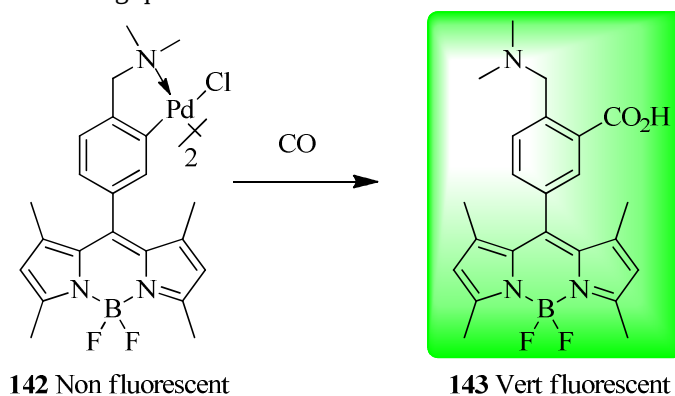
### 2.3. Propriétés photophysiques et applications

Les BODIPY sont des fluorophores relativement insensibles à la polarité et au pH de leur environnement et ils sont raisonnablement stables en conditions physiologiques. Du point de vue photophysique, les BODIPY sont des fluorophores très attractifs grâce à leur coefficient d'extinction molaire importants, leur rendement quantique de fluorescence élevée et grâce à une photostabilité remarquable.<sup>125,131</sup> De moindres modifications à leurs structures permettent de moduler leurs caractéristiques de fluorescence. Par conséquent, l'intérêt porté aux BODIPY pour des applications biomédicales et bioanalytiques n'a cessé de croître.<sup>128,132</sup> Ces fluorophores ont été largement utilisés pour marquer les protéines et l'ADN.<sup>133,134,135,136,137</sup>

Cependant, les BODIPY ont le principal inconvénient d'avoir un déplacement de Stokes faible, conduisant ainsi à un recouvrement important des spectres d'absorption et d'émission ce qui nécessite l'emploi des bandes de filtres plus spécifique pour des applications biologiques. De plus, beaucoup de BODIPY émettent à moins de 600 nm, et seulement peu de BODIPY hydrosolubles ont été synthétisées et utilisées en biotechnologie.<sup>126</sup> La structure plane du cœur du noyau BODIPY peut faciliter la formation d'agrégats provoquant alors une extinction de la fluorescence. Pour remédier à ce phénomène, des groupements encombrés sont alors utilisés.<sup>138</sup> Malgré ces limitations, les BODIPY sont très utilisées comme réactifs de marquage, chimiosenseurs, colorants pour lasers, mais aussi comme switches de fluorescence. Il existe une revue détaillée pour ces applications dans la littérature.<sup>126</sup>

### 3. Idée et origine du projet

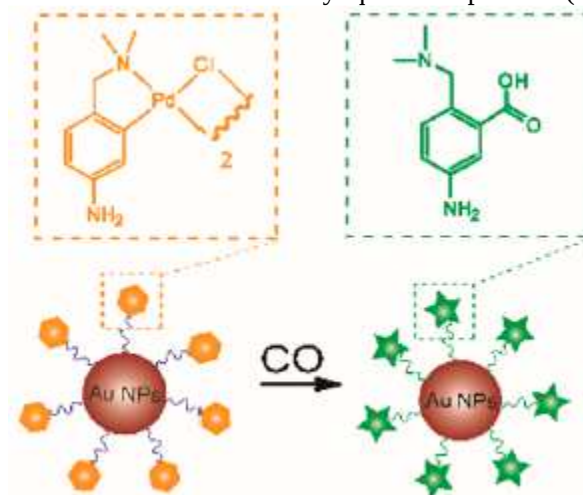
Comme nous l'avons détaillé dans les paragraphes précédents, les métaux de transition ont été largement utilisés dans plusieurs domaines de la biologie cellulaire pendant ces dernières années. En 2012, Chang et son équipe ont utilisé un complexe de palladium (II) attaché à un ligand fluorescent de type BODIPY comme sonde sélective du CO parmi d'autres petites molécules présentes dans l'environnement biologique.<sup>139</sup> Dans ce complexe **142**, la fluorescence du ligand BODIPY est quenchée par les effets électroniques du palladium. Ce complexe **142** faiblement fluorescent réagit sélectivement avec le CO par insertion de ce dernier dans la liaison carbone-palladium suivi de l'hydrolyse conduisant ainsi au produit fluorescent **143** incorporant une fonction acide carboxylique en générant le palladium (0) (Figure 60). Le CO peut donc être détecté sélectivement par des méthodes de fluorescence parmi d'autres petites molécules réactives telles H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ONO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO ou NO<sub>2</sub>, qui sont présentes dans le milieu biologique.



**Figure 60:** Détection sélective de CO dans les cellules vivantes.<sup>139</sup>

Cette récente application de la littérature montre clairement que la fluorescence du ligand BODIPY est quenchée lorsqu'elle est attachée au palladium et qu'elle peut être restaurée dès qu'une réduction du palladium (II) en palladium (0) se produit. De façon intéressante, deux études différentes de toxicité qui ont été réalisées sur les cellules **HEK293T** ont montré que cette sonde **142** et ses

métabolites ne sont pas toxiques aux cellules pendant toute la durée de l'expérience (4 heures) à des concentrations de la sonde allant jusqu'à 500  $\mu\text{M}$ . Très récemment, l'analogue de ce complexe immobilisé sur des nanoparticules d'or a été utilisé pour sonder le monoxyde de carbone parmi d'autres petites molécules biologiques, sans aucune interférence de ces dernières.<sup>140</sup> Par un mécanisme identique, le CO s'insère dans la liaison C-Pd de ce nanosenseur d'AuNP/PC par une réaction de carbonylation et une élimination réductrice subséquente conduit alors à l'acide carboxylique correspondant (Figure 61).



**Figure 61:** Détection du CO dans un milieu biologique par AuNP/PC.<sup>140</sup>

Les méthodes de caractérisation par TEM et XPS après incubation de ce nanosenseur avec le CO montrent que la réaction de carbonylation a lieu effectivement sur la surface de ces nanoparticules. De plus, les expériences *in vivo* réalisées sur des cellules cancéreuses HeLa ont montré que ces nanoparticules d'or entrent dans les cellules et s'accumulent dans le cytosol par endocytose, avec une cytotoxicité inférieure à 10% après 12h.

Sur base de ces résultats récents de la littérature, nous avons décidé d'utiliser le complexe **142** et ses dérivés dans des réactions de réduction sélective de palladium (II) en palladium (0), selon le mode de fluorescence on/off. Cette bio-réduction serait assurée par agents réducteurs présents dans les cellules, en

régénérant ainsi le ligand BODIPY fluorescent, facile à suivre par les méthodes d'imagerie par fluorescence.

Notre objectif principal est ici de montrer qu'il est possible d'opérer cette bio-réduction en environnement biologique par des mécanismes qui resteront à déterminer, mais également de le faire sélectivement en milieu hypoxique par rapport à la normoxie, en jouant sur les propriétés stéréoélectroniques des ligands autour du palladium. En effet, le palladium existe sous deux étages d'oxydations stables et courants que sont le palladium (II) et le palladium (0) avec des potentiels redox accessibles en milieu biologique.<sup>141</sup> La Figure 62 reprend brièvement notre objectif.

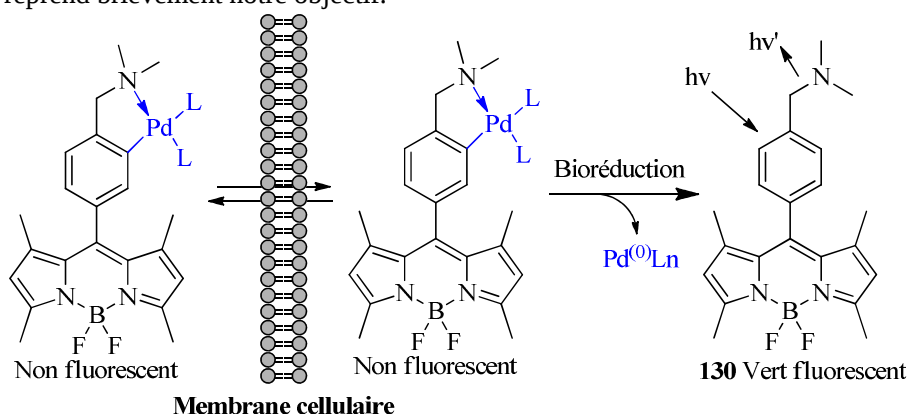
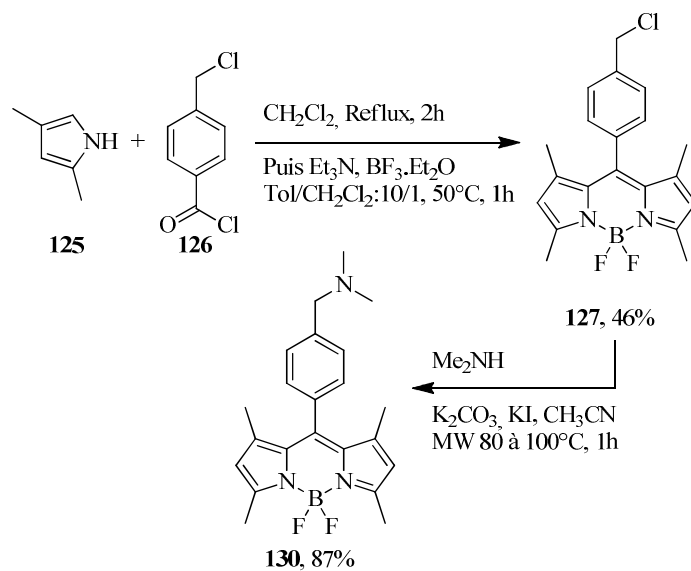


Figure 62: Bref rappel du premier objectif.

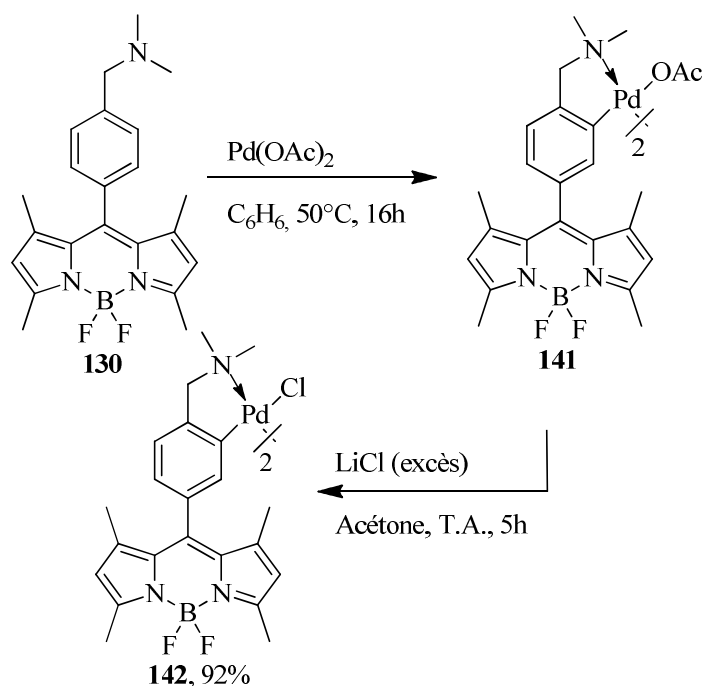
#### 4. Synthèses des palladacycles au BODIPY

Le premier palladacycle modèle **142** incorporant un ligand fluorescent de type BODIPY a été synthétisé selon le protocole décrit dans la littérature.<sup>139</sup> La synthèse a commencé par alkylation du chlorure de benzoyle **126** avec le 2,4-diméthyl pyrole **125** au reflux du dichlorométhane pendant deux heures. Après évaporation partielle du solvant, le résidu est repris dans le toluène et complexé par du  $\text{BF}_3$  étherate en présence de triéthylamine à  $50^\circ\text{C}$  pendant 1 heure. Le ligand BODIPY **127** est alors isolé sous forme d'un solide orange fluorescent avec un rendement de 46%.



**Figure 63:** Synthèse du ligand BODIPY **130**.<sup>139</sup>

Une substitution nucléophile du chlorure a été réalisée par un excès de diméthylamine en présence de KI dans un mélange d'acétonitrile/eau par chauffage au four à microonde à 100°C pendant 1 heure. Le produit fluorescent **130** a été obtenu sous forme d'un solide orange avec un rendement de 87% (Figure 63).



**Figure 64:** Synthèse du complexe **142**.<sup>139</sup>

La cyclopalladation du ligand **130** a été ensuite réalisée au moyen du  $\text{Pd(OAc)}_2$  dans le benzène à  $50^\circ\text{C}$  durant une nuit à l'abri de la lumière. Le solide orange non fluorescent **141** est précipité par ajout d'hexane et est filtré puis séché sous air. Ce dernier co-cristallise avec le benzène du milieu réactionnel et il a été utilisé comme tel sans autre purification. Un échange de ligand a été ensuite effectué en traitant le complexe dimère  $\mu$ -acétato **141** par une solution d'acétone saturée en LiCl pendant 5 heures à température ambiante. Après évaporation, le brut est filtré sur célite pour donner le complexe **142** orange non fluorescent. Cette séquence réactionnelle est représentée sur la Figure 64.

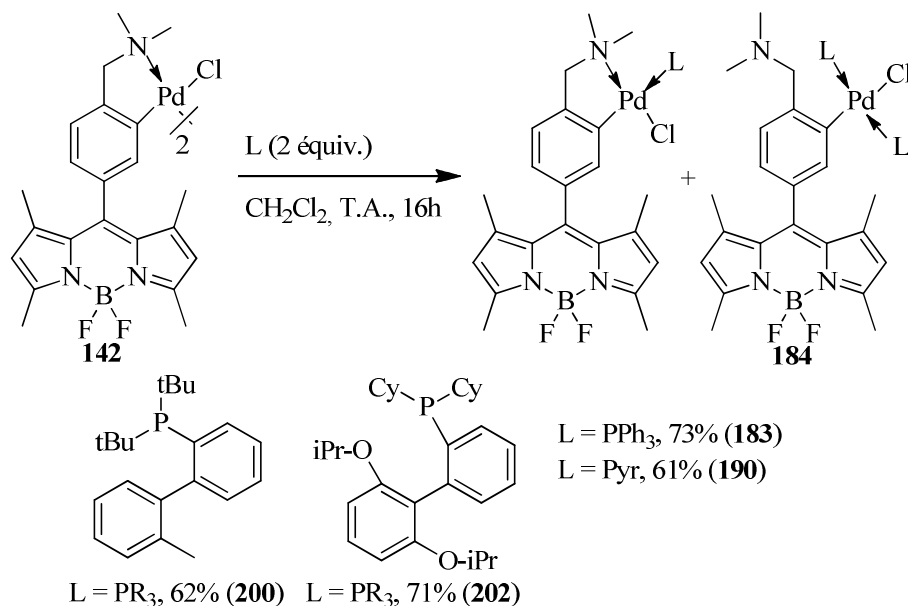
Les deux palladacycles dimériques **141** et **142** ont servi de substrat de départ pour la synthèse de tous les autres complexes de BODIPY utilisés dans ce projet. Différentes variations ont été effectuées sur le centre métallique en substituant les ligands acétate ou chlorure. Différents ligands dotés de propriétés électroniques et stériques différentes ont été utilisés à cette fin. Nous avons opté

pour ces variations sur le centre métallique car elles auraient une influence sur les propriétés redox du complexe comme l'absorption ou l'internalisation du complexe au travers de la membrane cellulaire, ainsi que la distribution et le métabolisme cellulaire de ces complexes.<sup>142</sup> Pour les propriétés redox, nous avons fait un screening des ligands selon la série spectrochimique en partant des ligands  $\pi$ -donneurs comme le chlorure, puis aux ligands  $\sigma$ -donneurs et enfin aux ligands  $\pi$ -accepteurs et  $\sigma$ -donneurs comme les phosphines. Concrètement, nous avons travaillé avec trois classes de ligands commercialement disponibles et bon marché.

Nous avons utilisé des ligands avec des effets électroniques différents comme les ligands bipyridyle qui sont basiques. En effet, les ligands diamines sont connus pour être des meilleurs ligands  $\sigma$ -donneurs, mais des faibles  $\pi$ -accepteurs. Par contre, les ligands diphosphines sont des bons  $\pi$ -accepteurs et devraient donc avoir un comportement différent lors de la réduction *in cellulo*. Les propriétés  $\sigma$ -donnatrices des diphosphines dépendent des substituants en place.

#### 4.1. Complexes monodentés de la première classe

Les ligands utilisés pour cette première classe sont des ligands azotés et phosphines monodentés que sont la pyridine, la  $PPh_3$  et les phosphines encombrées de type Buchwald. La synthèse a été réalisée en s'appuyant sur une synthèse similaire développée dans la littérature.<sup>143,144</sup> Cette première classe des complexes mononucléaires a été obtenue en traitant un équivalent du complexe chloro- $\mu$  dimérique **142** par deux équivalents de ligand monodenté dans le dichlorométhane à température ambiante durant toute la nuit à l'abri de la lumière (Figure 65). La solution orange est filtrée sur célite de dichlorométhane, évaporée pour rester avec un minimum de solvant. Après ajout de l'éther, les complexes qui précipitent sont isolés par filtration.



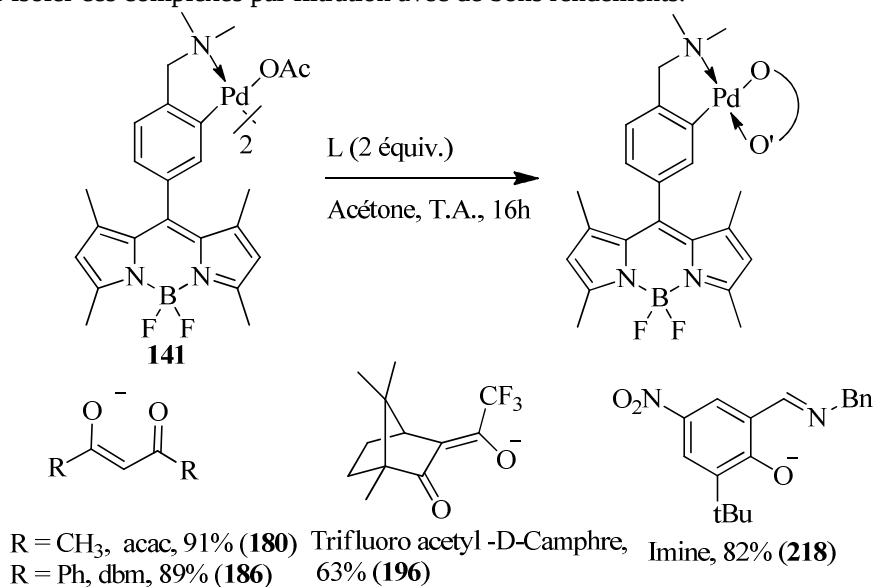
**Figure 65:** Synthèse des complexes monodentés de la première classe.

Les rendements de la réaction sont relativement bons et varient de 60% à 70% (basé sur le palladium de départ). Dans cette synthèse, un contrôle judicieux de la quantité des ligands ajoutés est nécessaire afin d'éviter la formation des complexes mononucléaires **184** résultant de l'ouverture de cycle lorsque l'excès de ligand est ajouté. Ces derniers seraient moins intéressants dans notre cas.

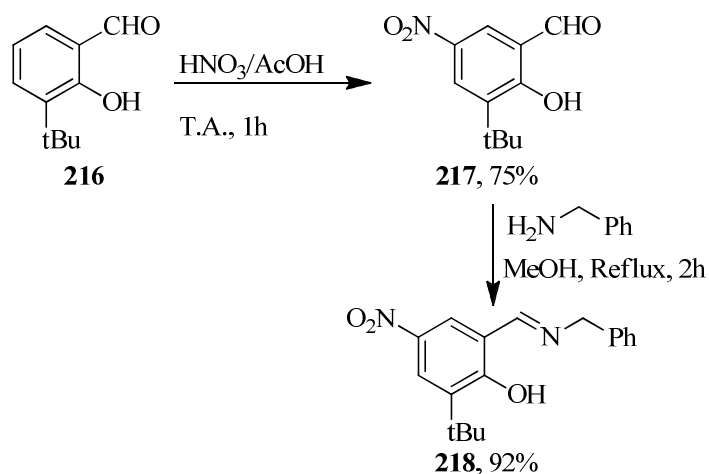
Les analyses  $^1\text{H}$ -RMN montrent dans tous les cas que les  $-\text{CH}_2\text{-N}$  apparaissent sous forme de doublets ce qui implique un couplage scalaire avec le phosphore ( $J(\text{PH}) > 1.4 \text{ Hz}$ ). Le spectre de  $^{31}\text{P}\{\text{H}\}$  montre que le phosphore est un singulet qui apparaît à  $\delta = 42,9 \text{ ppm}$  pour **183**,  $35,93 \text{ ppm}$  pour **202** et  $53,06 \text{ ppm}$  pour **200**.

## 4.2. Complexes bidentés de la deuxième classe

Nous nous sommes ensuite dirigés vers les ligands bidentés oxygénés (O, O') l'acetylacetonate : acac (**180**), le dibenzoylmethanate : dbm (**186**) et le 3-(Trifluoroacetyl)-D-camphre (**196**). Nous avons opté également pour le ligand bidenté (N, O') de type imine portant le nitro comme groupe électro-attracteur attaché sur le noyau aromatique (**218**). Ces complexes neutres sont obtenus par échange de ligands au départ du palladacycle dimérique acétate **141** dans l'acétone (Figure 66). Après une nuit d'agitation à T. A.; le solvant est évaporé et le résidu est refiltré sur célite de dichlorométhane. L'ajout de l'éther permet d'isoler ces complexes par filtration avec de bons rendements.



**Figure 66:** Synthèse des complexes bidentés de la deuxième classe.



**Figure 67:** Synthèse du ligand imine **218**.

Le ligand imine utilisé pour la synthèse du complexe **218** a été obtenu en deux étapes à partir du salicylaldéhyde **216**. Celui-ci est d'abord nitré en conditions acides pour conduire à l'aldéhyde nitré correspondant **217** avec un rendement de 75%.<sup>145</sup> Ensuite, la condensation avec la benzylamine au reflux du méthanol a donné le ligand imine d'intérêt **218** dans deux heures avec un rendement de 92% (Figure 67).

## 4.3. Complexes cationiques de la troisième classe

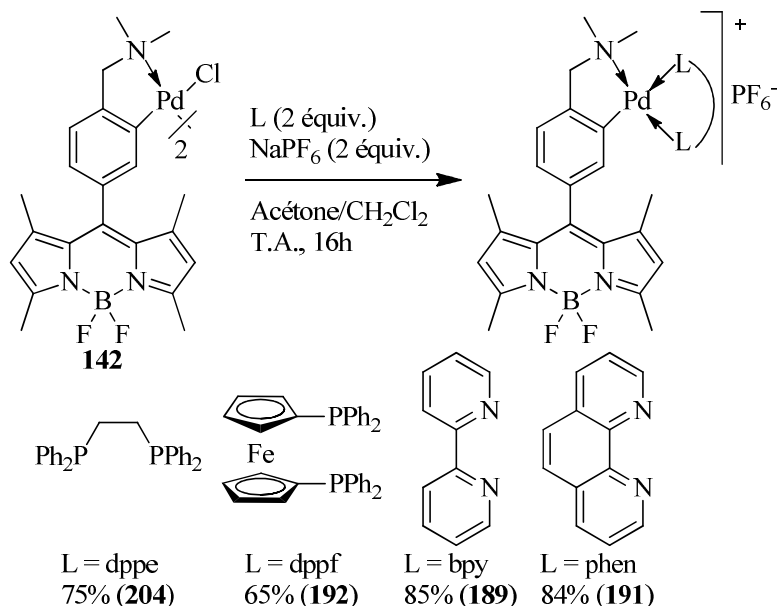


Figure 68: Synthèse des complexes cationiques de la troisième classe.

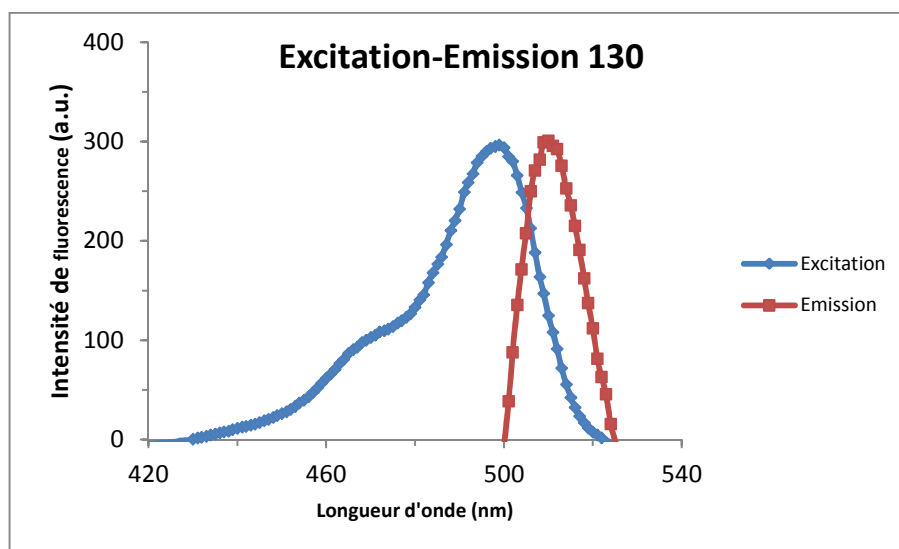
A part ces deux premières classes, nous avons synthétisé également des complexes cationiques avec des ligands azotés et phosphines différents (Figure 68). Nous avons utilisé des ligands bidentés azotés comme la bipyridine (**189**), la phénanthroline (**191**) et les ligands bidentés phosphorés comme la dppe (**204**) et la dppf (**192**). Ces complexes cationiques sont stabilisés par le  $\text{PF}_6^-$ , utilisé en chimie de coordination comme contre-anion non coordonnant. Ces complexes sont quant à eux obtenus au départ du dimère chloré **142**, isolés avec de bons rendements par filtration (Figure 68).

Comme nous l'avons souligné précédemment, ces palladacycles devront être incubés dans des cellules cancéreuses en conditions normoxiques (sous oxygène) et hypoxiques (sans oxygène) pour tester la sélectivité de la libération du ligand BODIPY fluorescent **130** exclusivement en hypoxie. Par conséquent, il fallait donc synthétiser les complexes de potentiel de réduction différent en variant le ligand autour du métal.

En effet, la formation d'un complexe plus stable lorsque le métal est à un degré d'oxydation élevé favorise l'oxydation et rend le potentiel de réduction plus négatif. Dans notre cas, le palladium (II) est un cation mou et est donc stabilisé par les ligands mous. De ce fait, l'usage des ligands mous comme les phosphines ou la pyridine stabilisent le complexe en diminuant son potentiel redox ce qui rend le complexe ainsi difficile à réduire. D'autre part, les ligands durs comme le chlorure augmentent son potentiel de réduction, rendant ainsi le complexe facile à réduire de sorte qu'il soit facilement réduit en conditions hypoxiques et normoxiques. Certains de ces complexes pourraient donc être réduits en normoxie et en hypoxie alors que les autres ne seraient donc réduits qu'en hypoxie.

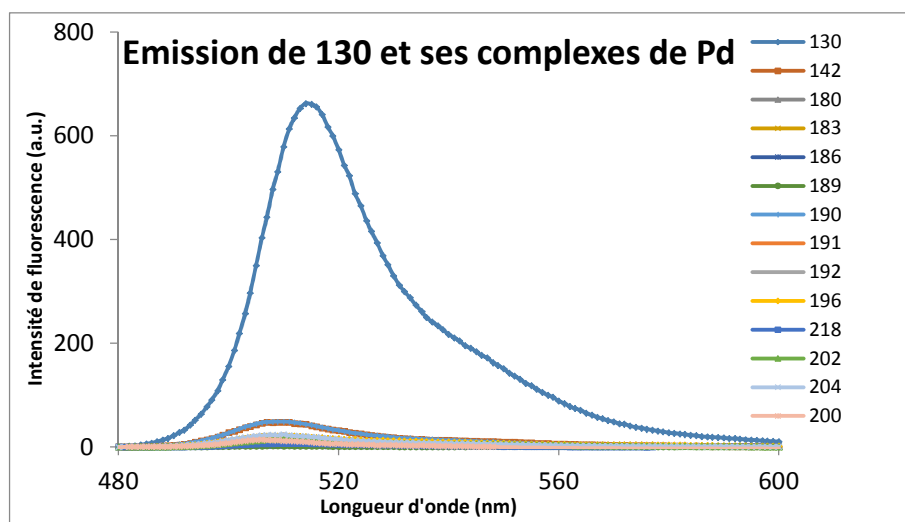
## 5. Propriétés photophysiques

Une fois les complexes synthétisés, nous avons enregistré leur spectre d'émission pour vérifier qu'ils sont faiblement fluorescents pour être distingués facilement du ligand libre BODIPY **130**. Les propriétés photophysiques étudiées dans un premier temps sont l'absorption et l'émission, qui sont les deux paramètres les plus importants pour ce projet. Comme nous pouvons le remarquer sur la Figure 69, le ligand de départ le BODIPY **130** présente des spectres d'absorption et d'émission usuels, avec des maxima d'absorption et d'émission positionnés à 498 et 510 nm respectivement (Figure 69).



**Figure 69:** Spectres d'excitation (bleu), et d'émission (rouge) du ligand BODIPY **130** dans le H<sub>2</sub>O/DMSO:99/1, concentration 10  $\mu$ M.

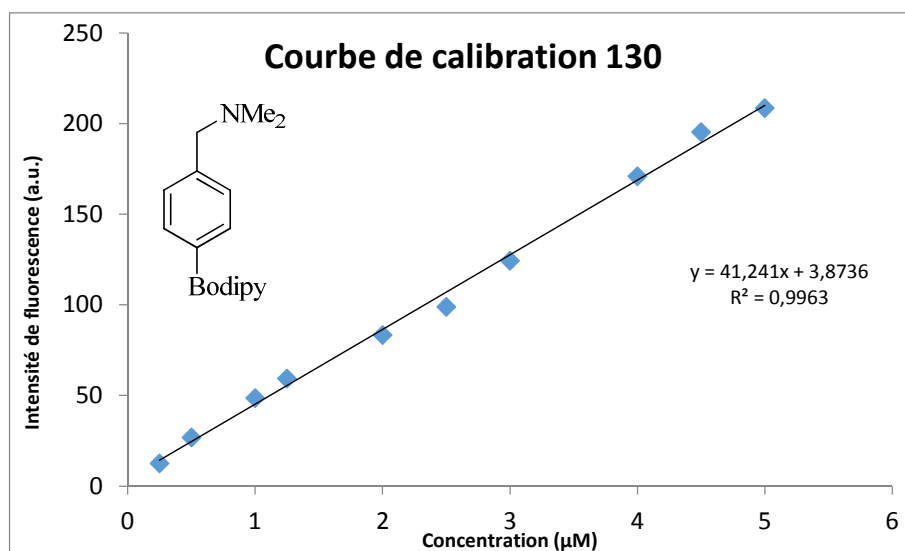
Les mesures des spectres d'émission de fluorescence des complexes ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment. Les spectres d'émission obtenus sont regroupés sur la Figure 70. Les maxima d'émission enregistrés sont positionnés à 530 nm, relativement similaires à ce qui a été observé pour le ligand libre **130** de départ. Cependant, au vu de la Figure 70 nous pouvons facilement remarquer que les palladacycles synthétisés sont faiblement fluorescents par rapport au ligand de départ **130**. La diminution de l'intensité de la fluorescence est beaucoup plus perceptible pour tous les complexes. Elle est inférieure d'un facteur de 50 par rapport au ligand de départ **130**. Il est donc possible de suivre le retour de la fluorescence de ces palladacycles.



**Figure 70:** Fluorescences du ligand **130** et ses palladacycles en solution DMSO/H<sub>2</sub>O : 95/5, concentration 50  $\mu$ M ; à une longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{exc}$  = 475 nm.

## 6. Réduction *in vitro* par l'ascorbate de sodium (AscNa)

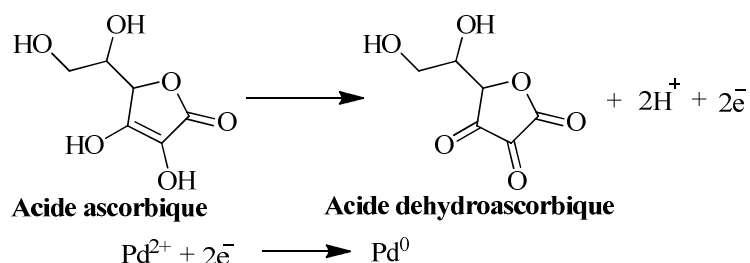
Avant de tester le retour de la fluorescence de ces palladacycles par bioréduction *in cellulo*, nous avons réalisé des suivis cinétiques de la réduction en solution. Cette étude a été réalisée par spectroscopie de fluorescence. Nous avons tout d'abord recherché des réducteurs biologiques qui pourraient réaliser la réduction des complexes de palladium et apporter des informations sur les mécanismes de bioréduction. Notre choix s'est tout d'abord porté sur l'ascorbate (vitamine C) cofacteur redox bien connu et qui fonctionne principalement par des étapes de transferts mono-électroniques.<sup>146</sup> Tout d'abord, nous avons réalisé une courbe d'étalonnage (Figure 71) qui pourra servir à quantifier le retour de la fluorescence en solution lorsque ces palladacycles sont mis en présence du réducteur. La courbe de calibration a été réalisée sur des solutions aqueuses du ligand **130** à des concentrations allant de 0.25  $\mu$ M à 5  $\mu$ M, avec excitation à 475 nm.



**Figure 71:** Courbe de calibration par fluorescence du ligand BODIPY 130 en solution aqueuse DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/99 à  $\lambda_{\text{exc}} = 475 \text{ nm}$ .

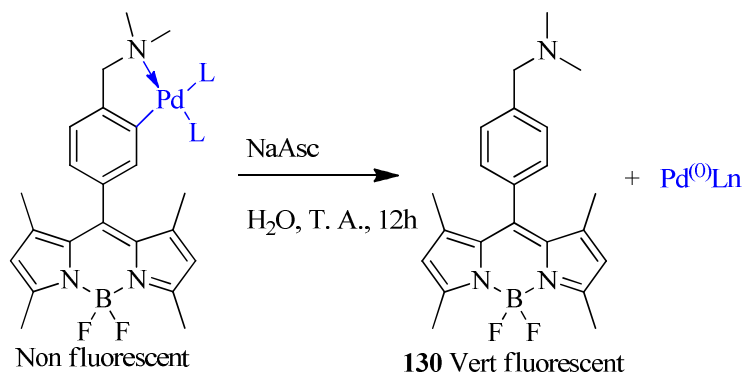
### 6.1. Rôle de l'acide ascorbique comme agent réducteur

Le réducteur de notre choix a été l'ascorbate de sodium car il est non seulement bon marché, mais également a été largement utilisé en solution aqueuse dans des expériences similaires de réduction des complexes des métaux de transition.<sup>147,148,149,150,151</sup> Dans cette réaction, le fait d'engager un excès empêcherait la réoxydation du palladium (0) de Nanoparticule (PdNPs) formant des agrégats en solution (Figure 72). De plus, la réduction du palladium (II) en palladium (0) par le NaAsc peut être complète sans aucun autre agent de stabilisation.<sup>148</sup> Nous supposons que sous air, le palladium (0) formé peut se réoxyder en palladium (II). En absence d'oxygène, la réoxydation des espèces de palladium(0) en palladium (II) ne serait pas possible pour peu que l'étude soit réalisée en solution dégazée et sous argon.



**Figure 72:** Réduction des complexes de palladium (II) par l'acide ascorbique.

## 6.2. Principe de la réduction



**Figure 73:** Réduction des palladacycles par le NaAsc.

L'équation globale de cette réaction est représentée à la Figure 73. Une solution aqueuse d'ascorbate de sodium (10 équiv.) est ajoutée à la solution aqueuse du palladacycle 2,5  $\mu\text{M}$  préparée à partir d'une solution mère de 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$  (95/5) et la réaction est suivie par fluorescence. Afin d'évaluer l'influence de l'oxygène, les réactions ont été réalisées dans la cellule UV-visible sous air en enregistrant continuellement les spectres d'émission toutes les trente minutes. D'autre part, les réactions ont été réalisées en batch sur des solutions dégazées et sous atmosphère inerte d'argon en prélevant des échantillons sur le mélange réactionnel, mis en cuves et analysés par spectroscopie en fluorescence.

**Dégazage :** Pour toutes les expériences réalisées en fluorescence sous argon, les solutions ont été dégazées d'oxygène comme suit : La solution aqueuse du palladacycle est introduite dans un ballon rond. Ensuite, celui-ci est déposé dans l'azote liquide jusqu'à ce que les solvants gèlent. Trois cycles vides argon sont réalisés pendant environ deux minutes, le ballon est maintenu dans l'azote liquide. Il est ensuite sorti de l'azote liquide et porté à T. A. sous atmosphère d'argon. L'opération est répétée trois fois. La solution du cofacteur est dégazée de la même manière. La réaction est lancée lorsque les deux solutions sont à T. A.

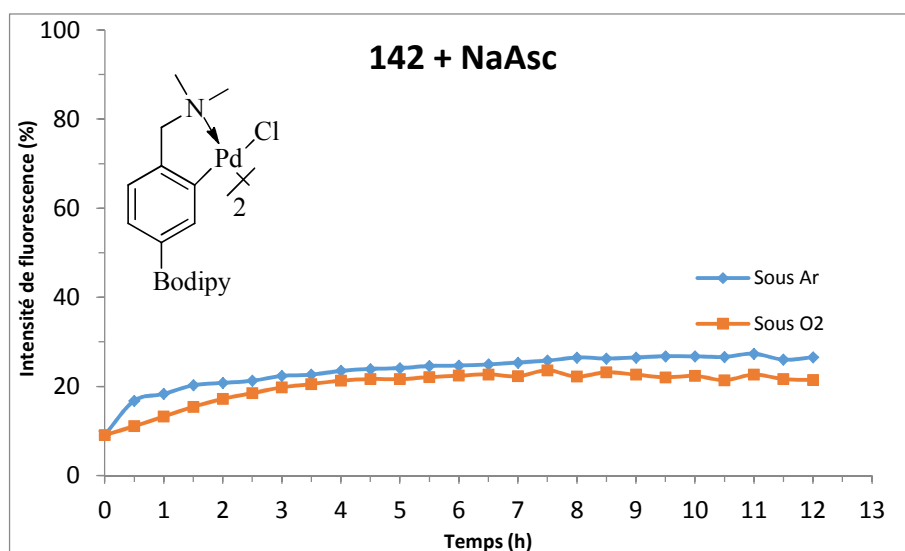
Dans chaque complexe étudié, nous avons superposé les spectres d'émission pour les expériences réalisées sous air et celles effectuées en solution dégazée de manière à observer facilement l'influence d'oxygène. Le retour de la fluorescence est exprimé en pourcentage par rapport à la fluorescence du ligand BODIPY libre **130** pour la même concentration, dans les mêmes conditions.

Tout d'abord, les expériences de contrôle négatif ont été réalisées pour évaluer le retour de la fluorescence en absence du réducteur. Sans surprise, nous n'avons pas observé d'augmentation de la fluorescence des palladacycles en solution au cours du temps. Cette observation préliminaire confirme que ces palladacycles sont suffisamment stables en solution aqueuse jusqu'à 24 heures.

### 6.3. Réduction du palladacycle modèle

Nous avons commencé par tester la réduction du palladacycle **142** par le NaAsc. Comme nous pouvons le remarquer sur la Figure 74 l'intensité de la fluorescence augmente graduellement au cours du temps. Pour ce premier palladacycle, le retour de la fluorescence a été observé tant en solution dégazée qu'en solution non dégazée. Ceci suggère que le dégazage des solutions a une faible influence sur le retour de la fluorescence. De plus, le retour de la fluorescence est rapide et la cinétique est linéaire pendant les deux premières

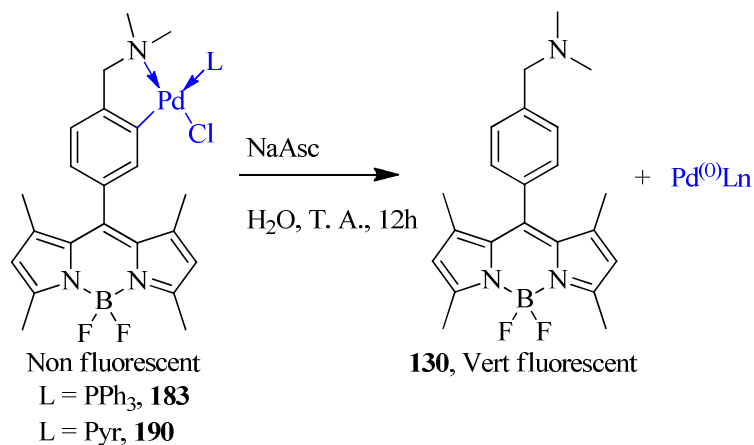
heures et un plateau est observé après 10 heures. Dans la suite, ces tests de réduction seront donc limités à 12 heures sur les palladacycles des trois classes synthétisés. Ce résultat montre néanmoins que la réduction est très lente pour ce complexe dimère et reste très peu efficace car on n'observe pas plus de 30% de la fluorescence théorique avec 10 équivalents de réducteur. Cet arrêt de l'augmentation de l'intensité en fluorescence pour les solutions dégazées serait probablement dû au fait que les solutions aqueuses sont très difficiles à dégazer d'oxygène complètement.



**Figure 74:** Réduction du palladacycle **142** traité avec l'NaAsc (10 équiv.)

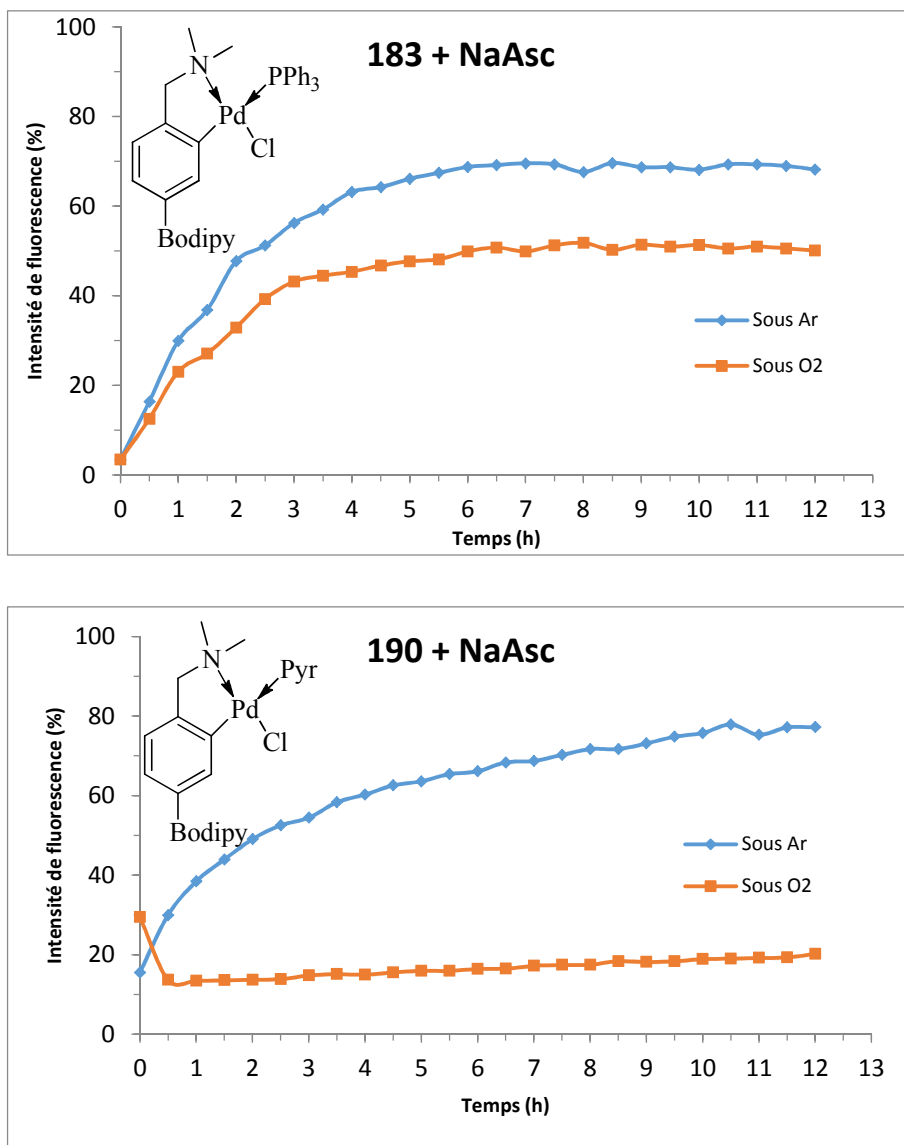
Conditions opératoires :  $\lambda_{\text{exc}} = 475 \text{ nm}$ , émission 490-600 nm, concentration en palladacycle 2,5  $\mu\text{M}$  (DMSO/H<sub>2</sub>O <1/99).

#### 6.4. Réduction des palladacycles de première classe



**Figure 75:** Réduction des palladacycles de première classe par le NaAsc.

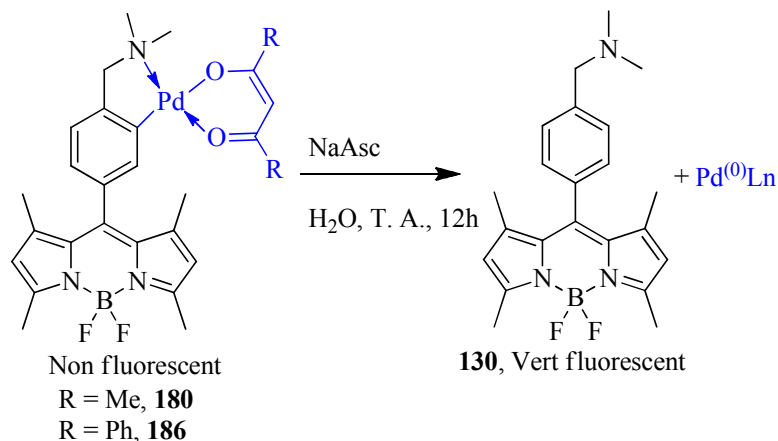
Pour cette classe, les deux palladacycles **183** et **190** ont été soumis à des conditions de réduction préalablement établies pour le palladacycle modèle **142**. Comme nous pouvons le remarquer, ces deux palladacycles répondent bien à l'ajout du réducteur par une augmentation intense de leur fluorescence (Figure 75). Leur intensité de fluorescence augmente jusqu'à atteindre une valeur maximale allant de 10 à 15 fois la valeur initiale, ce qui correspond à 65-70% de l'intensité attendue. Visiblement, une certaine sélectivité est observée pour le palladacycle **190** comportant le ligand pyridine selon si la réduction est réalisée en présence ou en absence d'oxygène. Cependant, une faible influence est observée pour son analogue **183** incorporant le ligand triphénylphosphine.



**Figure 76:** Réduction des palladacycles **183** et **190** traités avec l'NaAsc (10 équiv.).

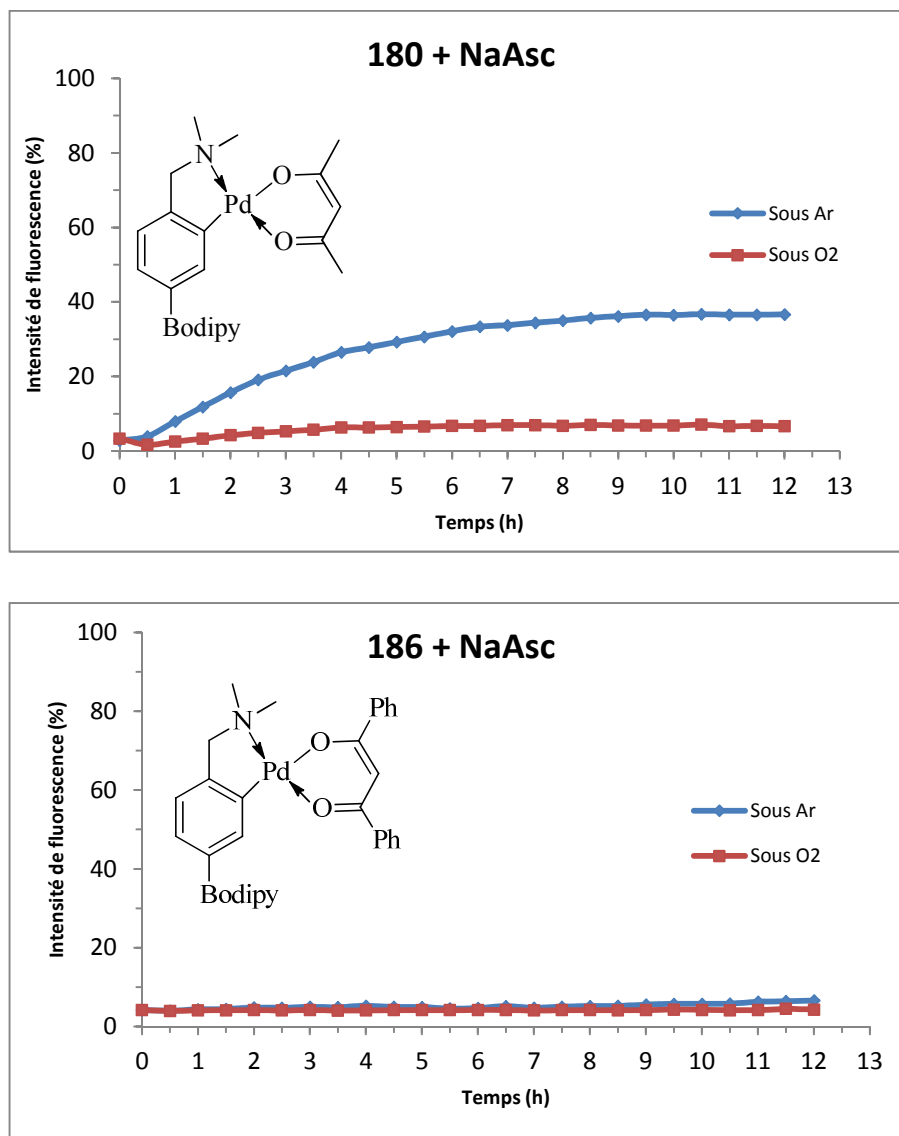
Conditions opératoires :  $\lambda_{\text{exc}} = 475 \text{ nm}$ , émission 490-600 nm, concentration en palladacycle  $2,5 \mu\text{M}$  (DMSO/H<sub>2</sub>O <1/99).

### 6.5. Réduction des palladacycles de deuxième classe



**Figure 77:** Réduction des palladacycles de deuxième classe par le NaAsc.

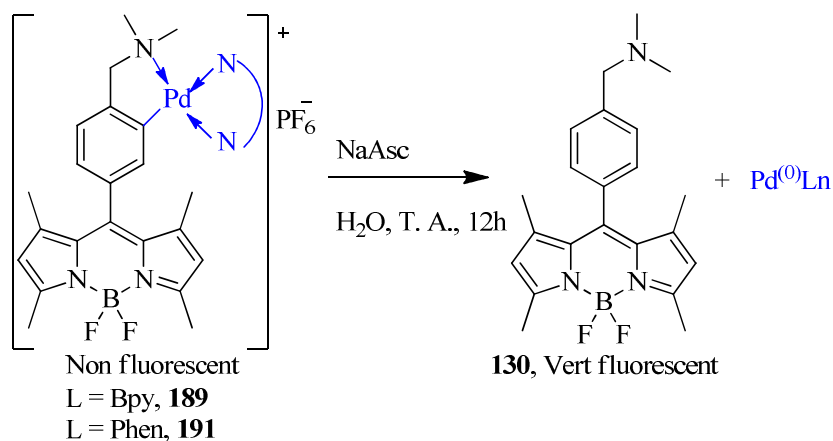
L'équation de la réaction de réduction de ces palladacycles est représentée à la Figure 77. De façon surprenante, pour le produit **186** comportant le ligand dibenzoylmethanate (dbm), l'intensité de la fluorescence ne varie quasiment pas au cours du temps. Ceci serait dû probablement à l'encombrement stérique des groupements phényles sur le ligand. Ce problème de reproductibilité serait dû également du fait que les solutions aqueuses utilisées sont très difficiles à dégazer complètement d'oxygène. Par ailleurs, pour son analogue bidenté oxygéné **180** au ligand acetylacetonate (acac), une augmentation rapide de la fluorescence est observée. Cependant, elle reste également à environ 37% (Figure 78). Ces complexes portant des ligands de type acetylacetonate sont donc peu réactifs. Une raison peut provenir de la stabilité de ces complexes qui ne portent pas de ligands labiles sur leur structure.



**Figure 78:** Réduction des palladacycles **180** et **186** traités avec l'NaAsc (10 équiv.).

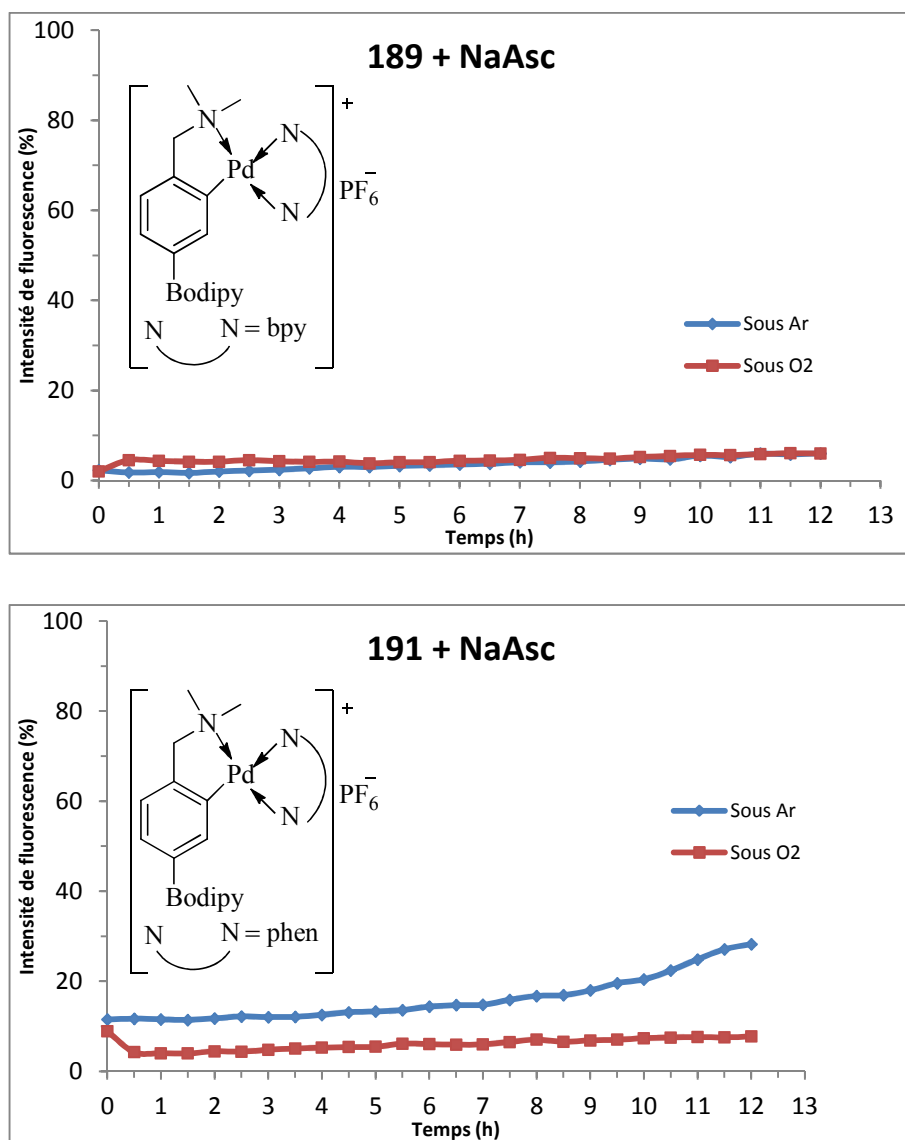
Conditions opératoires :  $\lambda_{\text{exc}} = 475 \text{ nm}$ , émission 490-600 nm, concentration en palladacycle  $2,5 \mu\text{M}$  (DMSO/H<sub>2</sub>O <1/99).

## 6.6. Réduction des palladacycles de troisième classe



**Figure 79:** Réduction des palladacycles de troisième classe par le NaAsc.

Pour les complexes avec les ligands bipyridine **189** et phénanthroline **191** (Figure 79), des fluctuations du retour de la fluorescence ont été observées après 2 heures. Ceci suggère soit que le complexe se dégrade en solution aqueuse ou bien que le système serait réversible. Nous pourrions également remarquer que pour le produit **189**, le comportement devient plus aléatoire et difficile à rationaliser. Dans ces deux derniers cas, il semble que l'intensité de la fluorescence ne soit pas influencée par l'ajout d'un réducteur ou alors par les conditions opératoires. La Figure 80 illustre les résultats obtenus.

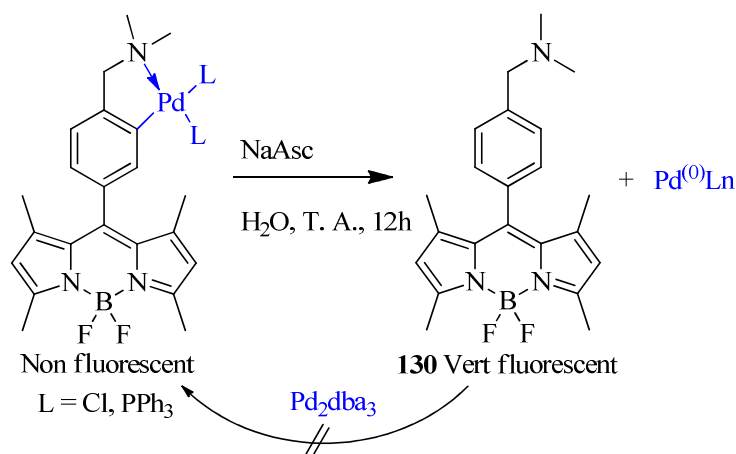


**Figure 80:** Réduction des palladacycles **189** et **191** traités avec l'NaAsc (10 équiv.).

Conditions opératoires :  $\lambda_{\text{exc}} = 475 \text{ nm}$ , émission 490-600 nm, concentration en palladacycle 2,5  $\mu\text{M}$  (DMSO/H<sub>2</sub>O <1/99).

Au vu de l'allure de ces graphes, nous pouvons remarquer que pour tous les palladacycles traités avec l'ascorbate de sodium, le retour de la fluorescence est lent et dans certains cas le maximum est observé après 8 heures. L'augmentation de l'intensité de la fluorescence en solution est une indication de l'augmentation de la concentration de ligand **130**. Dans tous les cas, le retour de la fluorescence n'atteint pas le maximum. Ces observations sont en accord avec les études antérieures similaires avec des métaux de transition qui ont montré que la réduction des complexes métalliques est incomplète pour les complexes avec de faibles<sup>147</sup> potentiels redox.<sup>152,153</sup> Ceci montre qu'une certaine proportion du BODIPY fluorescent **130** reste coordonné au palladium.

### 6.7. Test de la réversibilité de la réduction



**Figure 81:** Test de la réversibilité de réduction des palladacycles par le NaAsc.

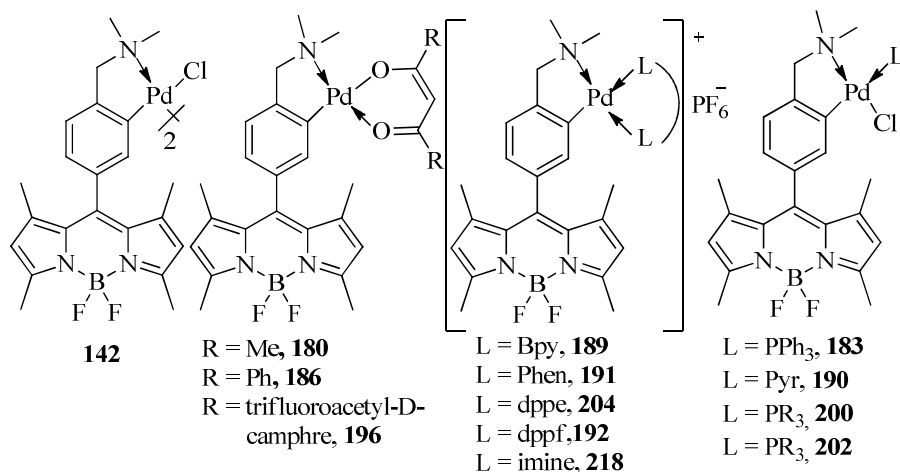
Afin de vérifier si le faible taux de retour de la fluorescence est dû à la réversibilité du système, nous avons ajouté le Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (1 équivalent) en solution DMSO/H<sub>2</sub>O 95/5, à la réaction des complexes **142** et **183** traités avec le NaAsc (Figure 81). Dans tous les cas, l'influence du Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> est quasi nulle qu'il soit ajouté au début ou après 12 h lorsque le système a atteint l'équilibre. Ceci suggère en fait que le système n'est pas réversible. En solution, le faible retour

de la fluorescence observé par rapport à la valeur attendue du ligand libre **130** proviendrait probablement d'une faible réduction du palladium (II) en palladium (0) dont nous supposons qu'il reste en grande partie coordonné sur le BODIPY.

### 6.8. Bilan et conclusion partielle

Au vu de ces résultats de réduction, nous ne pouvons pas prédire à ce stade le palladacycle qui pourra montrer une bioréduction sélective dans les cellules tumorales en hypoxie. Nous avons un certain nombre de complexes qui ne réagissent pas comme les complexes cationiques de la troisième classe. Cependant, les complexes de deuxième classe comme le **183** et **190** ont une activité et le **190** commence à présenter une sélectivité en milieu dégazé d'oxygène. Cela va nous guider sur les premiers tests biologiques pour trouver les bonnes conditions et guider sur les structures les plus intéressantes. Ces études seront menées en parallèle par l'étude d'autres paramètres comme le temps d'incubation, la concentration, ainsi que l'utilisation d'autres réducteurs biologiques comme le NADH ou le glutathion.

## 7. Bioréduction *in cellulo*



**Figure 82:** Palladacycles évalués pour la bioréduction *in cellulo*.

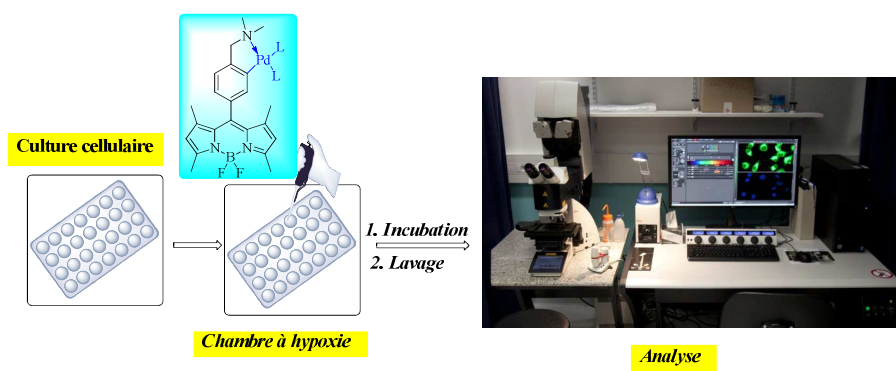
Les premières évaluations biologiques ont été effectuées pour tester la potentialité de ces palladacycles quant à la sélectivité de la réduction en conditions hypoxiques. La Figure 82 reprend la structure des palladacycles qui ont été soumis à la bioréduction en cellules cancéreuses.

### 7.1. Principe de la bioréduction



**Figure 83:** Chambre à hypoxie.

Les cellules endothéliales ou cancéreuses ont étéensemencées sur des lames couvre-objet placées dans des boîtes multi-puits à la concentration d'environ 40 000 cellules/puits. Les palladacycles ont été solubilisés dans le DMSO et dilués dans l'eau puis dans le milieu de culture cellulaire à une concentration finale de 0.1  $\mu$ M. Ces palladacycles ont ensuite été déposés sur des cellules dans les puits et incubés à 37°C en conditions normoxiques (21% O<sub>2</sub>) et en conditions hypoxiques (1% O<sub>2</sub>). Les tests réalisés dans les conditions hypoxiques sont réalisés dans une chambre à hypoxie (Figure 83) dans laquelle le pourcentage d'oxygène peut être contrôlé pour mimer les conditions biologiques de l'hypoxie.



**Figure 84:** Illustration du protocole d'évaluation du processus de bioréduction *in cellulo*.

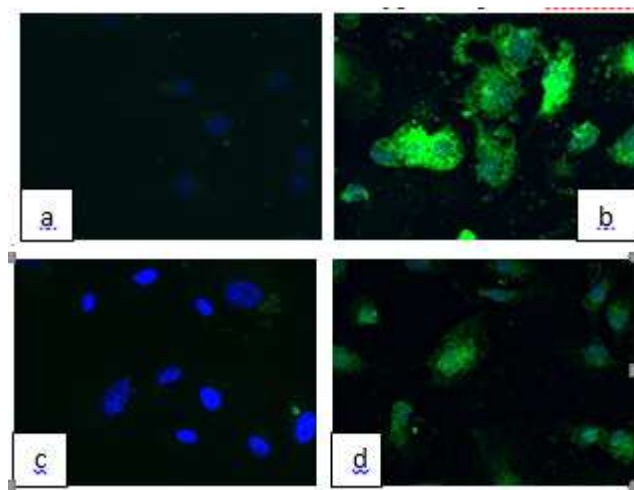
Les cellules incubées dans ces conditions vont donc s'adapter au milieu pauvre en oxygène et cette technique permet de mimer les conditions de l'hypoxie tumorale. Après deux heures d'incubation, le milieu de culture a été enlevé et les cellules ont été lavées abondamment avec une solution tampon phosphatée pour enlever tous les produits extracellulaires. Enfin, les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI (bleu). Les lames contenant les produits internalisés dans les cellules ont été visualisées sur un microscope à fluorescence utilisant la technologie pseudoconfocale Apotome (Zeiss) (Figure 84). Il s'agit d'un système breveté par Zeiss qui, par un artifice optique, permet de prendre des

photos « en 3D » en conservant la netteté de l'image. Des puits sans palladacycles, contenant uniquement les cellules et le ligand fluorescent **130** ont servi de référence. Les premières expériences ont été réalisées d'abord sur des cellules endothéliales HUVEC (cellules endothéliales de veine ombilicale humaine) ainsi que sur des lignées cellulaires tumorales MCF-7 et MDA-MB231 (cancer mammaire) en réplicats.

## 7.2. Résultats préliminaires

Une expérience pilote sur des cellules HUVEC a révélé que deux complexes montrent une sélectivité de bio-réduction en hypoxie (Figure 85). Il s'agit de **183** et **190**. Ces complexes de structure similaire sont internalisés et réduits dans les cellules hypoxiques. Le composé **183** contient la triphénylphosphine  $\text{PPh}_3$  et le **190** la pyridine comme ligands attachés au palladium. Comme nous pouvons le remarquer sur les images, il est intéressant de remarquer que ces complexes pénètrent bien à l'intérieur de la cellule.<sup>139</sup> La fluorescence verte observée dans la région d'émission du ligand **130** montre qu'en conditions hypoxiques les palladacycles libèrent le ligand **130**, fluorescent dans le milieu intracellulaire. Pour les autres complexes, la fluorescence a été observée aussi bien en hypoxie qu'en normoxie.

Au vu de ces résultats préliminaires, nous pouvons penser que la sélectivité de bioréduction *in cellulo* dépend de la nature des ligands attachés sur le centre métallique. Ces complexes ont des potentiels de réduction différents car en variant les ligands autour du métal, le potentiel de réduction du complexe obtenu change également.



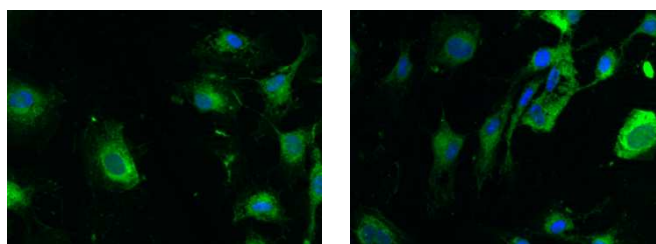
**Figure 85:** Cellules HUVECensemencées avec les palladacycles **183** (L= PPh<sub>3</sub>) et **190** (L= Pyr) à 37°C pendant 2 heures ; en normoxie (21% O<sub>2</sub>) et en hypoxie (1% O<sub>2</sub>). Photos prises avec les filtres des bandes d'excitation de 470/20 nm et l'émission à 525/50 nm. (a) et (b) pour 183 respectivement en normoxie et en hypoxie, et (c) et (d) pour 190 respectivement pour normoxie et hypoxie ; pour ce dernier la durée d'exposition était plus longue pour détecter la fluorescence verte, raison pour laquelle les noyaux apparaissent également plus distinctement.

En effet, la formation d'un complexe plus stable lorsque le métal est à un degré d'oxydation élevé favorise l'oxydation et rend le potentiel de réduction plus négatif. Dans notre cas, le palladium (II) est un cation mou et il serait donc favorisé par les ligands mous. Ainsi, l'usage des ligands mous comme les phosphines ou la pyridine stabilisent le complexe en diminuant son potentiel redox, ce qui rend le complexe ainsi plus difficile à réduire. Donc, les complexes **183** et **190** ne seraient pas facilement réduits en normoxie ce qui pourrait expliquer la sélectivité observée.

D'autre part, les ligands durs comme le chlorure ( $\pi$ -donneur) enrichissent le centre métallique ce qui augmente le potentiel de réduction du métal. Ainsi, le complexe formé se réduit facilement que ce soit en conditions hypoxiques ou normoxiques. Ceci expliquerait pourquoi la fluorescence a été observée pour le

complexe **142** en hypoxie et en normoxie.

Pour les complexes avec les ligands bidentés oxygénés comme le **180**, **186** et **196** également réductibles en normoxie, leur potentiel de réduction serait également trop faible pour être réduits en normoxie car ces ligands sont  $\pi$ -donneurs et  $\sigma$ -donneurs comme les ligands bidentés azotés bipyridine (**189**) et phénanthroline (**191**). D'autre part, les complexes dotés de ligands phosphines encombrés de type Buchwald de la première classe **200** et **202** ne sont pas sélectifs car ces derniers, bien que  $\sigma$ -donneurs et  $\pi$ -accepteurs, sont basiques et se réduisent alors facilement en normoxie. Dans un cas pareil, aucune sélectivité de bioréduction n'est observée ; la fluorescence est observée en normoxie et en hypoxie (Figure 86).



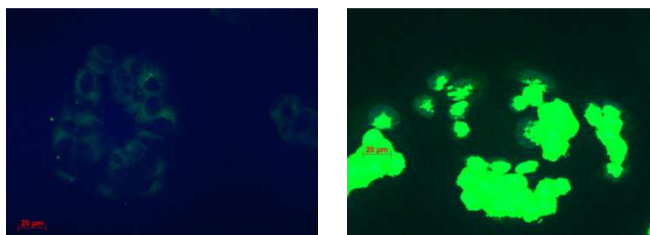
**Figure 86:** Cellules HUVECensemencées avec le palladacycle **200** à 37°C pendant deux heures ; en normoxie (à gauche) et en hypoxie (à droite) ; concentration : 0.1  $\mu$ M. Photos prises avec les filtres des bandes d'excitation de 470/20 nm et l'émission à 525/50 nm.

Un nouveau test a été entrepris en réplicats sur les lignées cellulaires tumorales MCF7 et MDA-MB231. Dans ce screening, seul le palladacycle **190** avec le ligand pyridine a montré une sélectivité vis-à-vis de l'hypoxie et seulement dans les cellules MCF7 (Figure 87).<sup>1</sup> Comme précédemment, pour les autres complexes, la fluorescence a été observée aussi bien en hypoxie qu'en normoxie ou la fluorescence n'a été observée dans aucune des deux conditions.

---

<sup>1</sup> Manipulations réalisées par Laurene PETIT

L'ensemble des images pour sur ces différentes expériences est incluses dans l'annexe 1.



**Figure 87:** Cellules MCF7 incubées avec le palladacycle **190** à 37°C pendant 2 heures ; en normoxie à gauche (21% O<sub>2</sub>) et en hypoxie à droite (1% O<sub>2</sub>) ; une concentration : 0.1 µM. Photos prises avec les filtres des bandes d'excitation de 470/20 nm et l'émission à 525/50 nm.

### 7.3. Bilan et conclusions

Au début de ce travail, nous avons postulé que les potentiels redox seraient peut être importants pour la réduction sélective en milieu faiblement oxygéné. Cependant, les premiers tests réalisés montrent que ces potentiels redox ne sont pas déterminants. Ces premiers tests semblent montrer des effets de sélectivité en fonction de la structure du complexe des co-ligands sur l'atome de palladium mais également en fonction du type cellulaire. Néanmoins, ces résultats prometteurs sont encore à considérer comme très préliminaires car des problèmes de reproductibilité ont été rencontrés lors de ces manipulations. Il est donc nécessaire dans la suite de ce projet de se focaliser sur un nombre plus restreint de complexes tels que **183** et **190** pour étudier de manière plus approfondie les paramètres des expériences *in vitro* (concentration, temps d'incubation, lignée cellulaire...).

## 8. Réduction *in vitro* par NADH et GSH

### 8.1. Introduction

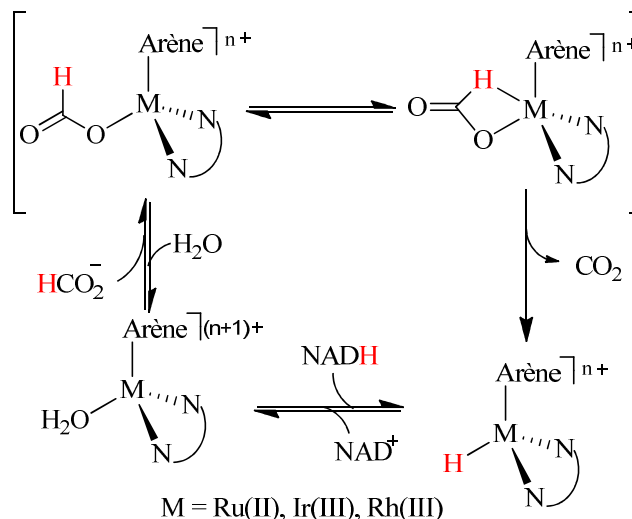
L'absence de sélectivité pour certains des palladacycles BODIPY dans les expériences préliminaires nous a incités à réaliser un criblage de différents réducteurs cellulaires afin de trouver et expliquer l'origine de la sélectivité recherchée. En effet, le déplacement du fluorophore **130** sur le métal peut être causé par les réductases et/ou des co-facteurs redox *via* deux mécanismes différents, soit par la réduction du centre métallique de palladium (II) suivi du déplacement du ligand (mécanisme électronique de réduction par l'ascorbate de sodium), soit par un mécanisme d'échange direct avec le ligand.<sup>146</sup> Les réducteurs cellulaires les plus probables pour ce deuxième mécanisme sont soit le NADH, le glutathion ou plus généralement des résidus cystéines.<sup>146</sup> Il nous est apparu important de déterminer si la sélectivité observée pour les deux complexes **183** et **190** ne proviendrait pas de la bioactivation *via* ce deuxième mécanisme. Cette hypothèse nous a été suggérée par le fait que les complexes qui semblent les plus sélectifs portent un ligand monodenté (phosphine ou pyridine) sur l'atome de palladium. Ces ligands peuvent être potentiellement labiles et libérer un site de coordination sur le métal qui pourrait intervenir dans un mécanisme de réduction n'impliquant pas un ou des transferts mono-électroniques que nous avons initialement postulé.

Il est connu dans la littérature que les thiols cellulaires à l'instar du glutathion sont des donneurs d'électrons. En l'occurrence, le glutathion (GSH), la cystéine, (Cys), le dithiothreitol (DTT) et l'homocystéine (Hcy) ont été utilisés pour l'activation de prodrogues variées sélectives de l'hypoxie tumorale.<sup>154,155</sup> Nous nous sommes donc intéressés à d'autres familles de cofacteurs redox, et en particulier, les composés de la famille des dihydropyridines. Nous avons sélectionné pour ce projet le NADH et le glutathion. Rappelons que pour ce projet, l'idéal était d'obtenir de la fluorescence pour les palladacycles incubées dans des cellules cancéreuses en hypoxie et non en normoxie. Seuls les

palladacycles **183** et **190** ont donné des résultats allant dans ce sens et ont donc été considérés dans la suite des expériences.

## 8.2. Transfert d'hydrure en chimie biologique

Les réactions de transfert d'hydrure de formate sur les complexes métalliques de Ru(II), Rh(III) et Ir(III) par exemple sont connues de la littérature et génèrent l'hydrure métallique (M-H) correspondante. De façon intéressante, les intermédiaires d'hydrure métalliques (M-H) formés sont stables dans l'eau et isolables.

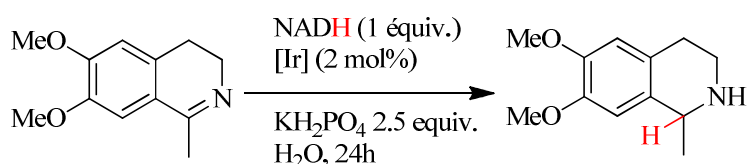


**Figure 88:** Transfert d'hydrure sur un complexe métallique et régénération de NADH par réduction de  $NAD^+$ .

Récemment, l'équipe de Peter Sadler a trouvé que les complexes de Ru peuvent perturber l'équilibre  $NADH/NAD^+$  cellulaire par transfert d'hydrure de NADH sur le métal ; qui le transfère à son tour à des substrats biologiques cellulaires.<sup>156</sup> Le mécanisme catalytique implique la coordination initiale de NADH sur le métal suivi du transfert de son hydrure sur le métal et la libération irréversible de  $NAD^+$ . La même équipe a très récemment mis en évidence l'interconversion sélective de  $NAD^+$  en NADH par transfert d'hydrure métallique généré en

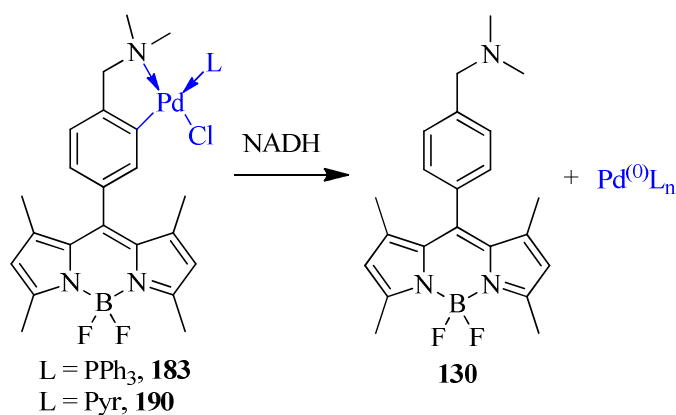
utilisant le formate comme transfert d'hydrure (Figure 88).<sup>157</sup>

Inspiré par ces travaux, nous développons dans notre laboratoire une méthodologie d'hydrogénation d'imine par transfert d'hydrure métallique pour des applications *in cellulo*. Ce sont les travaux de thèse en cours de Mathieu Soetens. Au cours de son mémoire, il a réalisé l'hydrogénation catalytique d'une imine cyclique par transfert d'hydrure en utilisant le NADH comme donneur d'hydrure et un catalyseur organométallique d'iridium de type *half sandwich* (Figure 89).<sup>158</sup> Une méthodologie est en cours de développement dans notre laboratoire pour améliorer ces résultats.



**Figure 89:** Transfert d'hydrure sur une imine métallo catalysée.<sup>158</sup>

Nous nous sommes inspirés de ces résultats préliminaires de notre laboratoire et des travaux de Peter Sadler pour les appliquer à notre problématique. Notre hypothèse de travail était la suivante : le NADH présent avec des taux élevés dans les cellules tumorales en hypoxie réduirait les palladacycles avec des ligands monocoordinants faiblement liés au palladium que sont la pyridine (**190**) et la triphénylphosphine (**183**) (Figure 90).<sup>159</sup> Vraisemblablement, les autres complexes ne sont pas réduits par le NADH en hypoxie, nous en discuterons plus loin.

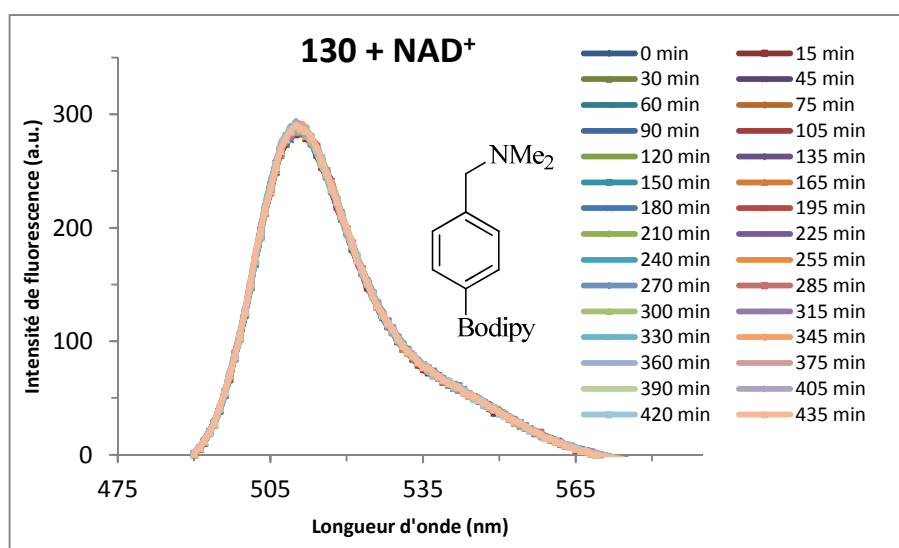
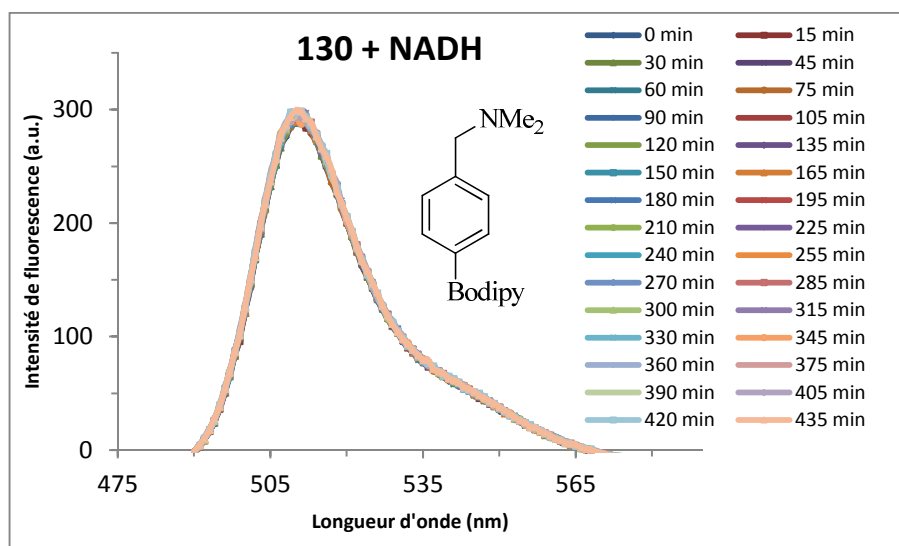


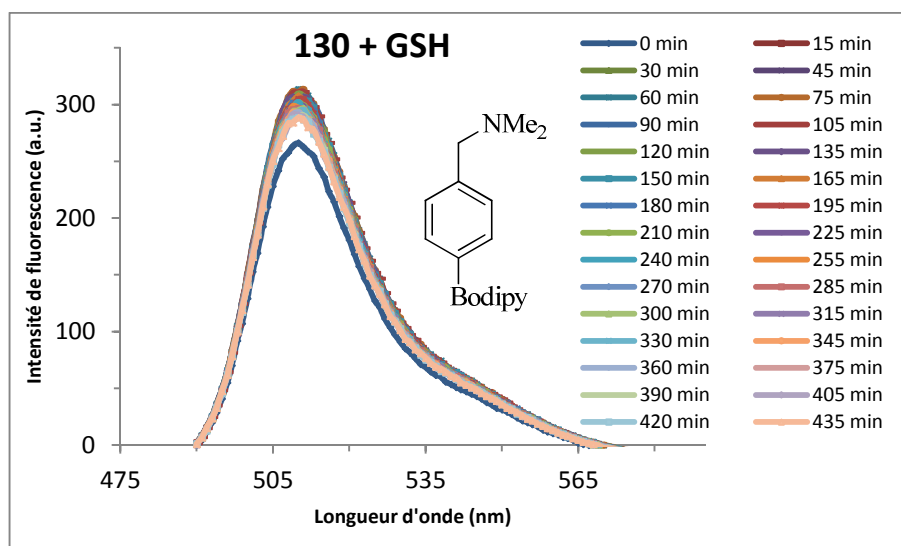
**Figure 90:** Nouvelle hypothèse de travail : Réduction des palladacycles- BODIPY **183** et **190** par le NADH.

### 8.3. Influence de NADH, $\text{NAD}^+$ , GSH sur la fluorescence du BODIPY

Avant de suivre la réaction par la fluorescence, il fallait d'abord vérifier que la fluorescence du ligand libre BODIPY **130** n'est pas quenchée par la présence de NADH,  $\text{NAD}^+$  ou le glutathion. Pour ce faire, le ligand libre fluorescent **130** a été dilué en solution aqueuse et 10 équivalents de NADH,  $\text{NAD}^+$  ou GSH ont été ajoutés. La réaction a été suivie dans la cellule UV-vis en enregistrant les spectres d'émission en fluorescence du mélange réactionnel toutes les 15 minutes jusqu'à 6 heures. Au vu des graphiques enregistrés représentés à la Figure 91, nous avons remarqué que la fluorescence du ligand libre BODIPY fluorescent **130** reste stationnaire au temps de réaction, ce qui signifie que sa fluorescence n'est pas du tout affectée par le NADH, ni le  $\text{NAD}^+$ , ni même le glutathion.

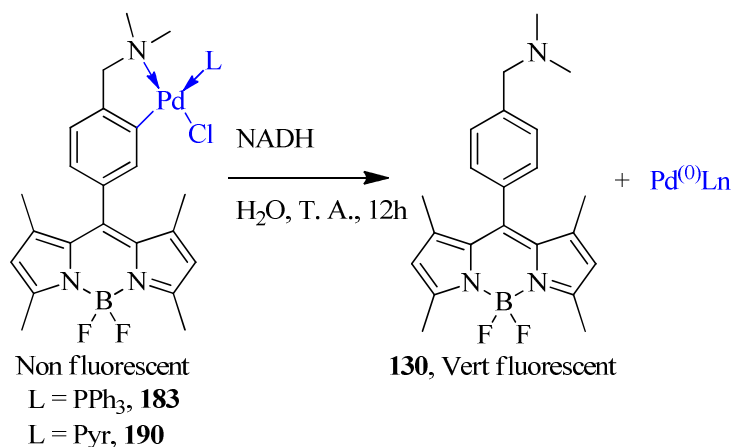
Partie II : Palladacycles-BODIPY, marqueurs de l'hypoxie tumorale





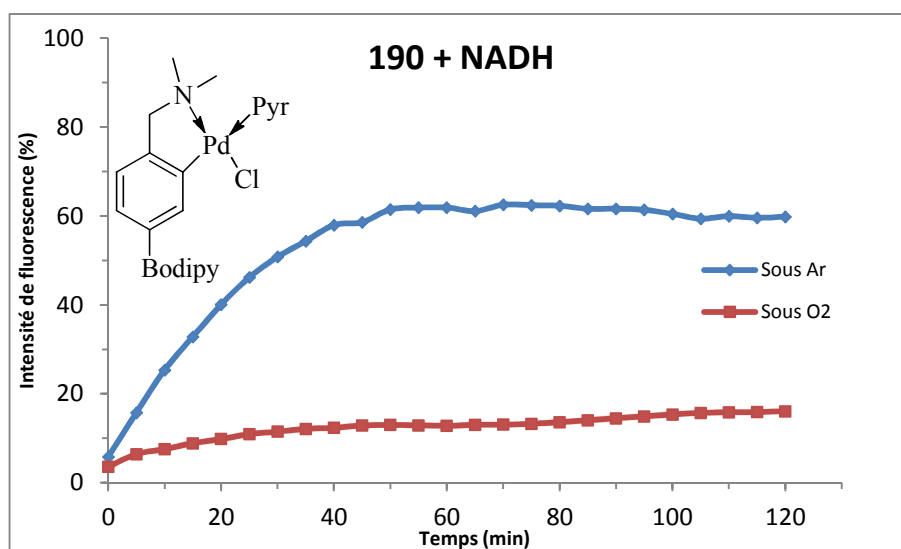
**Figure 91:** Fluorescence du ligand BODIPY **130** traité par l'excès de NADH, NAD<sup>+</sup> et GSH (10 équiv.). Concentration : 45.4  $\mu$ M dans DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100, par excitation à  $\lambda_{\text{exc}} = 475$  nm.

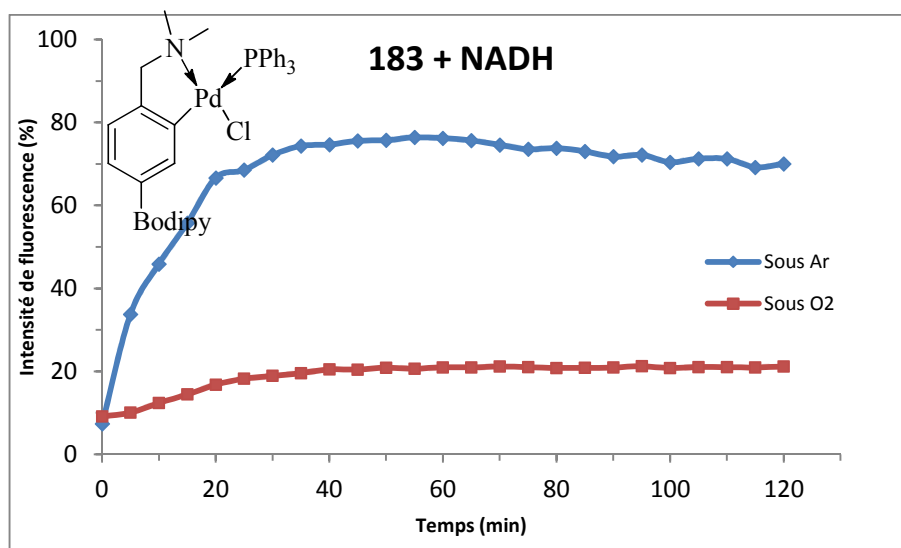
#### 8.4. Réduction des palladacycles par le NADH et le GSH



Ces premières observations nous ont permis de constater que le NADH, NAD<sup>+</sup> et GSH ne quenchent pas la fluorescence du ligand BODIPY **130**. Ceci nous assure qu'il est possible de suivre le retour de la fluorescence des complexes de

palladium-BODIPY traités par les réducteurs cellulaires comme le NADH ou le glutathion. Afin de nous assurer de la reproductibilité, toutes les expériences ont été réalisées en trois répliques sous oxygène et en l'absence de l'oxygène. La moyenne des trois valeurs est reportée ici. L'intensité de la fluorescence mesurée est exprimée en pourcentage par rapport à l'intensité de la fluorescence du ligand libre **130**. Pour ce faire, les complexes de palladium au BODIPY avec les ligands triphénylphosphine **183** et la pyridine **190** ont été traités avec un large excès de NADH (50 équivalents) et le retour de la fluorescence a été suivi par spectroscopie de fluorescence en enregistrant les spectres d'émission toutes les 5 minutes (Figure 92) pendant deux heures directement dans la cellule UV-vis.





**Figure 92:** Fluorescence des palladacycles **190** et **183** traités par l'excès de NADH (50 équiv.) sous argon ou sous air. Concentration : 45.4  $\mu$ M dans DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100, par excitation à  $\lambda_{\text{exc}} = 475$  nm.

Nous avons remarqué que le retour de la fluorescence est rapide, avec des maxima atteints aux environs d'une heure. En plus, la fluorescence observée est d'environ 10 fois plus intense qu'au début de l'expérience. En présence d'oxygène, la fluorescence n'est faiblement que deux fois supérieure à la valeur du départ. Comme cela a déjà été le cas avec l'utilisation de l'ascorbate comme réducteur, nous observons que le système le plus performant est celui qui utilise le complexe **190** porteur du co-ligand pyridine. Dans ce cas, nous obtenons de manière reproductible environ 80% de la fluorescence théorique du fluorophore BODIPY.

D'autre part, ces palladacycles ont été traités avec un excès d'une solution aqueuse de glutathion (50 équivalents) dans les mêmes conditions que précédemment pendant deux heures. Nous avons remarqué que le GSH n'induit pas le retour de la fluorescence avec ces palladacycles. La sélectivité a été testée également dans un mélange de NADH avec 50 équivalents de glutathion, comme réducteur potentiel compétitif, et aucun changement d'intensité de

fluorescence n'a été observé en comparaison à l'utilisation de NADH seul. Soulignons cependant que nous n'avons pas testé d'autres thiols dans ces expériences. Cette observation nous indique que le glutathion utilisé dans ces expériences n'a aucune réactivité et que ces palladacycles **183** et **190** montrent une sélectivité élevée vis-à-vis de la réduction par le NADH. De façon intéressante, cette sélectivité vis-à-vis de NADH sera importante pour le développement des prodrogues sélectives pour l'hypoxie tumorale pour les cellules tumorales hypoxiques. De plus, cette dernière observation est en accord avec ce qui est rapporté dans la littérature par rapport à la bioactivation des prodrogues métalliques par les thiols biologiques.<sup>160</sup>

### 8.5. Synthèse de dihydropyridines simples, analogues de NADH

Comme montré précédemment, nous avons également décidé de travailler en parallèle sur des analogues simplifiés du NADH et avons sélectionné deux composés **401** et **402**, aisément préparés à grande échelle. Cette synthèse est bien décrite dans la littérature, et elle se réalise en deux étapes (Figure 93).<sup>161</sup> Tout d'abord l'alkylation des dérivés de pyridine par le bromure de benzyle au reflux de l'acétonitrile pendant 16h donne les sels correspondants (**399** et **400**). Ensuite, ces sels sont réduits par le  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  dans l'eau basifiée par du  $\text{NaHCO}_3$ . Les deux dihydropyridines **401** et **402** sont isolées sous formes des solides jaunes avec de bons rendements.

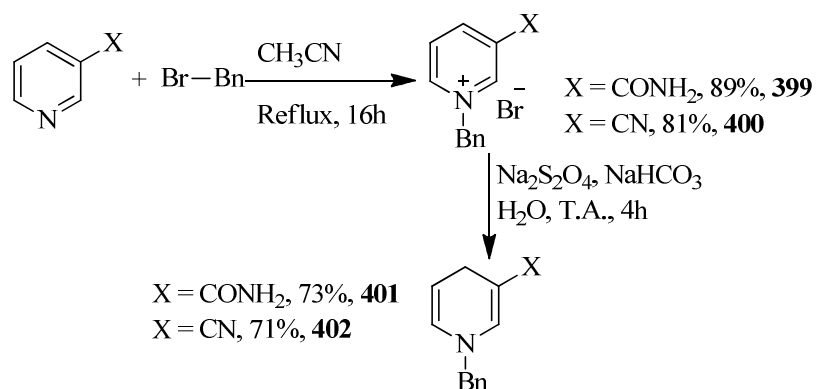


Figure 93: Synthèse des dihydropyridines **401** et **402**.<sup>161</sup>

## 8.6. Réduction des palladacycles par des dihydropyridines

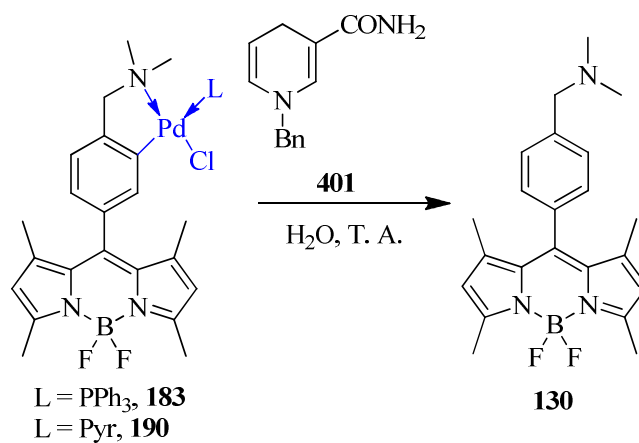
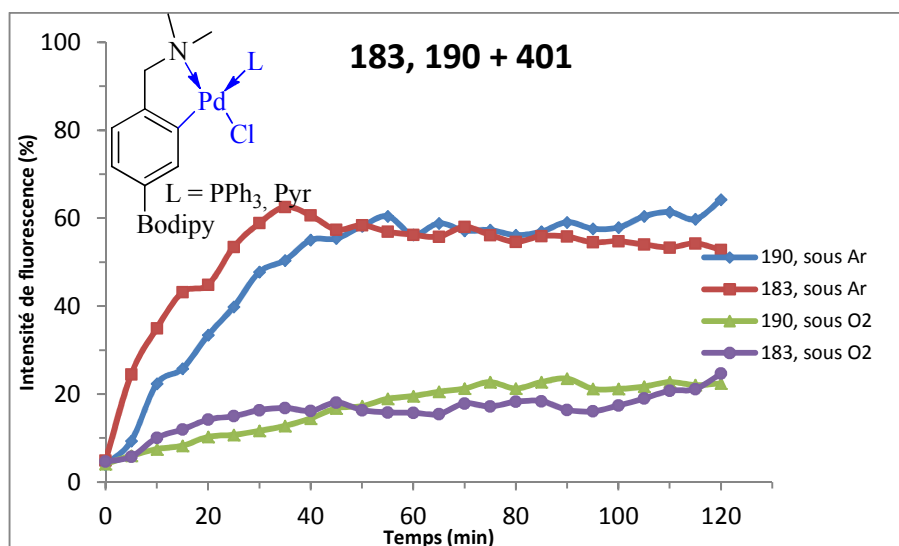
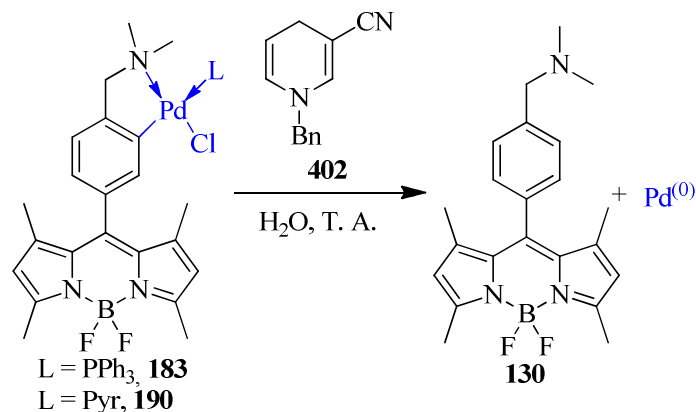


Figure 94: Réduction des palladacycles **183** et **190** par la dihydropyridine **401**.



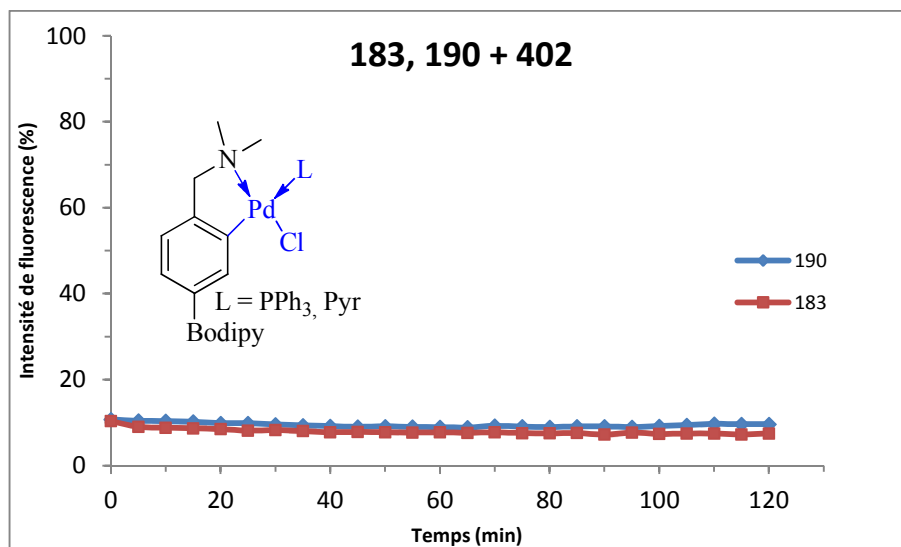
**Figure 95:** Fluorescence des palladacycles **183** et **190** traités par l'excès de la dihydropyridine **401** (50 équiv.) sous argon ou sous air. Concentration : 45.4  $\mu$ M dans DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100, par excitation à  $\lambda_{\text{exc}} = 475$  nm.

Etant donné le prix élevé du NADH et en vue d'obtenir des informations sur le mécanisme de réduction, nous avons décidé de synthétiser un analogue possédant le même noyau actif 1,4-dihydropyridine (**DHP**, **401**) (8.5). Nous avons ensuite traité les palladacycles **183** et **190** avec ce dernier dans les mêmes conditions qu'avec le NADH (Figure 94). Les profils de réapparition de la fluorescence sont semblables à ceux observés précédemment (Figure 95). Ce résultat confirme que le noyau dihydropyridine est capable d'effectuer la réduction du complexe de palladium.



**Figure 96:** Réduction des palladacycles **183** et **190** par la dihydropyridine **402**.

Pour montrer l'importance de la fonction amide sur la réduction de ces palladacycles, nous avons utilisé l'analogue dihydropyridine (**402**) porteur de la fonction nitrile sur la position-3 (Figure 96). Nous avons choisi cette fonction pour conserver un effet électronique capteur sur l'hétérocycle, tout en modifiant les capacités de coordination de la dihydropyridine sur un atome métallique, cette coordination pouvant jouer un rôle important dans le mécanisme de réduction. Sans surprise, la faible fluorescence observée pour les complexes a été stationnaire pendant deux heures. Des temps de réaction prolongés allant jusqu'à 24 heures ont été employés mais toujours en vain (Figure 97). Ceci suggère donc l'importance de la coordination de la fonction amide sur le palladium. Dans le cas de la fonction nitrile, la coordination reste possible mais, l'hydrure en position 1,4- n'est pas à mesure de s'approcher du centre métallique de coordination et de se transférer sur le palladium par effet de rapprochement. Ce point sera discuté en détail dans la partie consacrée à l'étude du mécanisme de bio-réduction.



**Figure 97:** Fluorescence des palladacycles **183** et **190** traités par l'excès de la dihydropyridine **402** (50 équiv.) sous argon. Concentration : 45.4  $\mu$ M dans DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100, par excitation à  $\lambda_{\text{exc}}$  = 475 nm.

## 8.7. Conclusion

- Les deux palladacycles prometteurs **183** et **190** sont réduits par le NADH et son analogue simple la dihydropyridine **401**. Comme attendu, nous n'avons pas observé une réduction en utilisant la dihydropyridine porteuse d'une fonction nitrile **402**.
- Une sélectivité de réduction est observée lorsque les solutions sont dégazées d'oxygène.
- Ces résultats montrent qu'une sélectivité de bioréduction hypoxique pourrait être observée dans les cellules tumorales présentant des taux élevés de NADH.

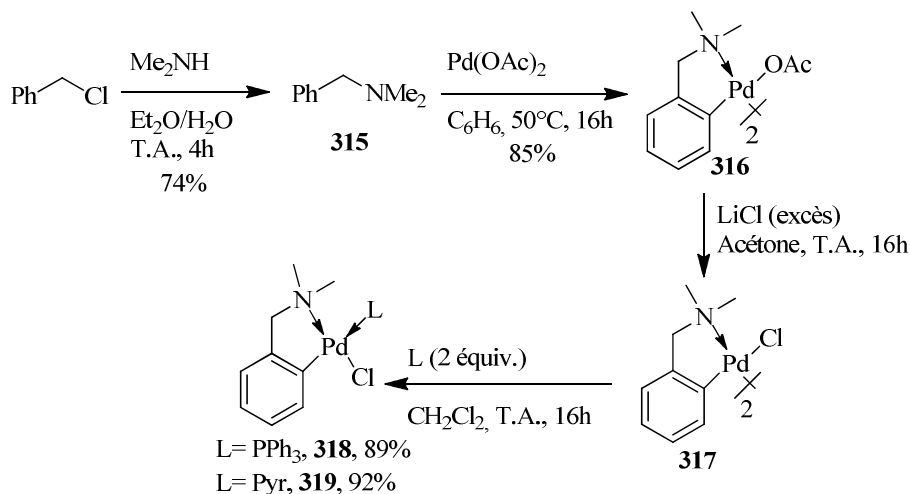
## 9. Etudes mécanistiques

### 9.1. Introduction

Dans la section précédente (8) nous avons observé une réduction sélective de deux palladacycles **183** et **190** par le NADH et son dérivé simple **401**. A présent, nous allons nous intéresser à la stabilité des palladacycles en solution et des espèces qui sont présentes dans le mélange réactionnel.

### 9.2. Synthèse des analogues simples des palladacycles au BODIPY

Dans le but de simplifier certaines études du mécanisme, nous avons synthétisé deux nouveaux complexes **318** et **319** qui sont respectivement les analogues simples des complexes de **183** et **190**, deux complexes qui sont potentiellement des marqueurs de l'hypoxie tumorale. La synthèse a été accomplie selon une méthodologie (Figure 98) similaire utilisée pour la synthèse de leurs analogues correspondants avec le ligand fluorescent de type BODIPY. Tout d'abord la cyclopalladation a été effectuée avec l'acétate de palladium Pd(OAc)<sub>2</sub> au départ de la diméthylbenzylamine **315**, préparée selon une méthode de la littérature.<sup>162</sup> Ensuite, l'échange du ligand acétate par le chlorure donne le complexe **316**. Ce dernier traité par deux équivalents des ligands PPh<sub>3</sub> et Pyridine dans le dichlorométhane donne des complexes d'intérêt **318** et **319** avec des bons rendements.



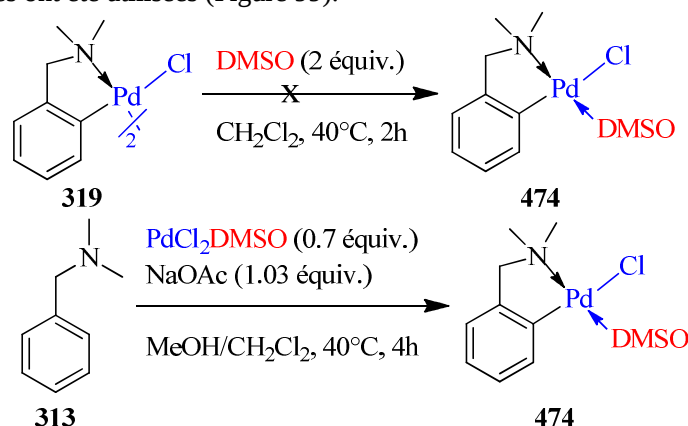
**Figure 98:** Synthèse des complexes simples analogues des palladacycles au BODIPY.

### 9.3. Etude de stabilité par <sup>1</sup>H-RMN des palladacycles en solution

Les palladacycles au BODIPY ont été synthétisés pour être réduits *in cellulo*. Les résultats préliminaires des tests biologiques réalisés sur les cellules cancéreuses HUVEC, MCF7 et MDA-MB231 ont montré des variabilités importantes pour deux produits **183** et **190**, qui s'étaient révélés prometteurs à ce stade quant à la sélectivité vis-à-vis de l'hypoxie tumorale. Concrètement, pour des répliques, nous avons remarqué l'absence de fluorescence pour les expériences réalisées avec des solutions stock préparées et gardées au congélateur. Ces problèmes d'absence de fluorescence ne peuvent pas être attribués à l'instabilité de ces complexes en phase solide car tous les complexes de palladium au BODIPY synthétisés sont stables sous leurs formes solides. De plus, une stabilité remarquable de plus d'une semaine est également observée en solution des solvants non-coordinants comme le CHCl<sub>3</sub>. On pourrait dès lors supposer *a priori* que l'absence de fluorescence provienne des solutions stocks en DMSO qui se dégradent au cours du temps par échange des ligands entre la triphenylphosphine ou la pyridine et le DMSO.

### 9.3.1. Synthèse du complexe $\text{dmba}(\text{Pd})\text{Cl-DMSO}$

En vue de nous assurer de la nature du complexe formé en solution, nous nous sommes intéressés à synthétiser le complexe **474** ( $(\text{dmba})\text{PdCl}(\text{DMSO})$ ) pour réaliser des études de stabilité de nos complexes par RMN. Deux méthodologies différentes ont été utilisées (Figure 99).

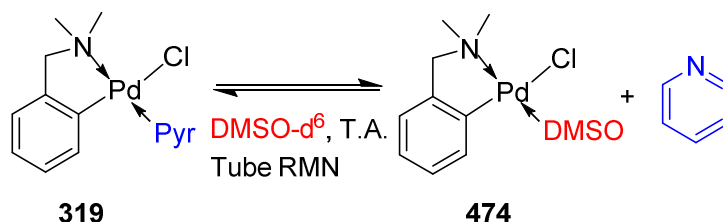


**Figure 99:** Synthèse du complexe **474**.

La première synthèse au départ du palladacycle **319** a conduit à l'échec et le départ **319** a été récupéré. Dans le deuxième cas, une palladation directe du ligand **313** à l'aide du  $\text{PdCl}_2\text{DMSO}$  nous a permis d'isoler le complexe **474** avec un rendement de 41%, selon une méthodologie modifiée de la littérature.<sup>163</sup>

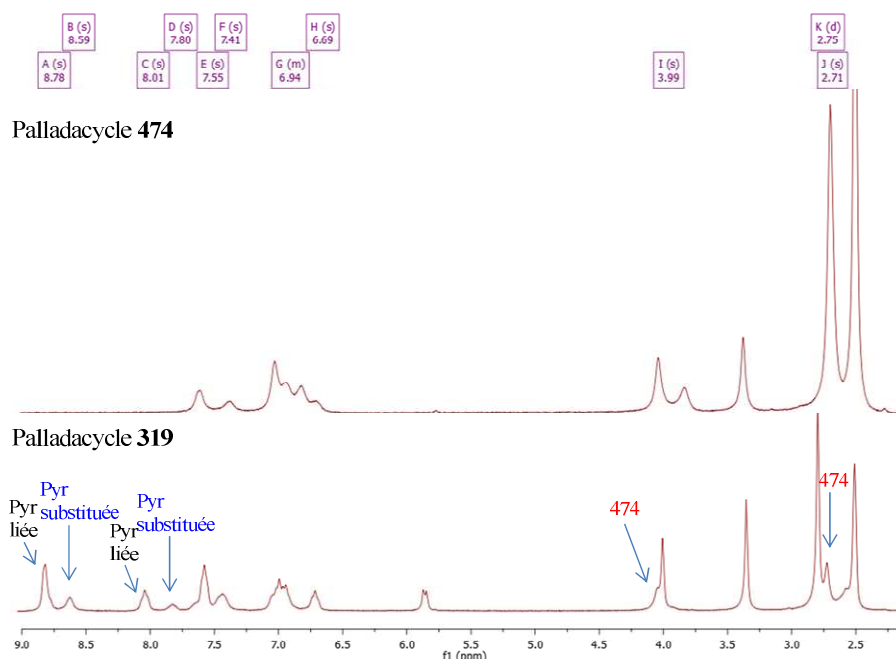
### 9.3.2. Stabilité du complexe **319** en solution DMSO

A la suite des problèmes de reproductibilité rencontrés dans les expériences *in cellulo*, nous avons vérifié si les palladacycles étaient suffisamment stables en solution stocks de DMSO. Pour vérifier l'hypothèse de l'échange des ligands triphenylphosphine ou pyridine par le DMSO, nous avons travaillé avec un modèle simple de **190**, il s'agit alors du complexe **319** sans le BODIPY.



**Figure 100** : Stabilité du complexe **319** en solution DMSO.

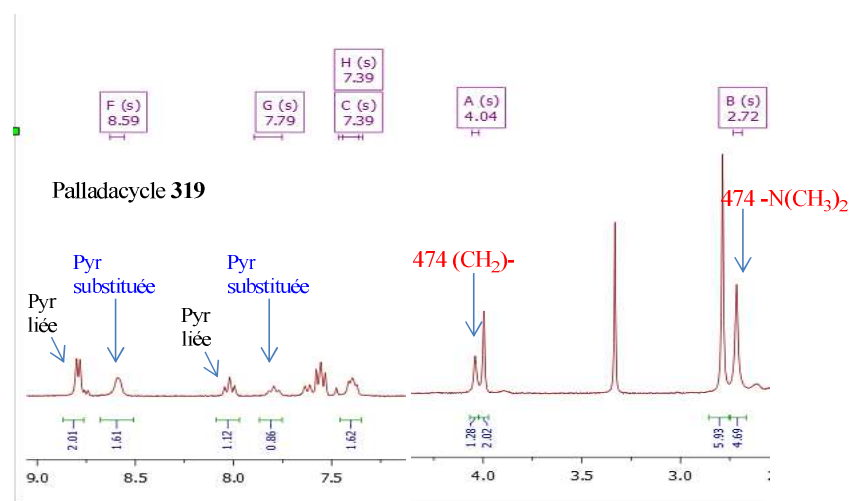
Dans cette étape, un échantillon du complexe **319** (60 mM, en  $\text{DMSO-d}^6$ ) a été préparé et sa stabilité en solution a été étudiée par spectroscopie RMN- $^1\text{H}$  (Figure 100). Les expériences RMN sont réalisées par dissolution de 10.8 mg de **319** dans 500  $\mu\text{L}$  de solvant deutéré, soit 0,03 mM tandis que dans les expériences biologiques, les solutions stocks sont de 1 mM environ. Bien que le modèle ne soit pas tout à fait parfait il d'agit de mettre en évidence le phénomène.



**Figure 101**: Spectre  $^1\text{H}$ -RMN du palladacycle **474** superposé au spectre du palladacycle **319** dissout dans  $\text{DMSO-d}^6$  après 20 minutes.

La Figure 101 illustre le spectre  $^1\text{H}$ -RMN du palladacycle **474** superposé à celui du palladacycle **319** enregistré après 20 minutes dans du  $\text{DMSO-d}^6$ . Dans cette expérience, nous remarquons une substitution directe de la pyridine coordonnée au palladium par le  $\text{DMSO-d}^6$ . Un équilibre s'établit plus vite à l'échelle de temps de la mesure de RMN parce que la concentration de la pyridine libre observée après dissolution reste identique pendant toute la durée de l'expérience (même jusqu'à 2 jours). Les pics correspondant à la pyridine n'évoluent pas avec le temps. Notons que les signaux du DMSO coordonné sur le palladium ne peuvent pas être observés car les manipulations d'échange de pyridine par DMSO ont été réalisées en  $\text{DMSO-d}^6$ .

Dans la région aromatique il est facile d'observer les pics correspondant à la pyridine substituée à  $\delta = 8.59$  ppm et  $\delta = 7.79$  ppm. En plus, des nouveaux pics correspondants à  $\text{CH}_2$ - et  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$  ont été observés dans la région aliphatique respectivement à  $\delta = 4.04$  ppm et  $\delta = 2.72$  ppm (Figure 102). Cette observation suggère *a priori* qu'un nouveau complexe est formé en solution. Ces nouveaux pics qui apparaissent dans la région aliphatique correspondent au complexe **474**.



**Figure 102:** Spectre  $^1\text{H}$ -RMN du palladacycle **319** dissout dans  $\text{DMSO-d}^6$  après 20 minutes (agrandi).

### 9.3.3. Stabilité du complexe **319** en solution DMSO/H<sub>2</sub>O

Le DMSO est un solvant très hygroscopique et il se peut que le changement observé provienne de la dégradation des complexes par H<sub>2</sub>O. De plus, pour les expériences biologiques *in vitro*, le milieu biologique de culture cellulaire dans lequel sont diluées les solutions mères des palladacycles contient l'eau. Il est alors important de se demander si les variations observées ne proviendraient pas également de l'influence d'eau de dilution. Pour le faire, nous avons réalisé des études de cinétique en diluant le complexe **319** dans DMSO avec des teneurs en eau de 0% (en volume), 10% et 90%, avant de réaliser les mêmes expériences par <sup>1</sup>H-RMN. Dans l'hypothèse où l'eau est sans influence, les profils des spectres <sup>1</sup>H-RMN seraient identiques dans les trois cas de % d'eau, et notre hypothèse serait rejetée. Pour question de facilité, le D<sub>2</sub>O a été choisi en remplacement du H<sub>2</sub>O qui nécessiterait les techniques de suppression des pics de H<sub>2</sub>O en RMN.

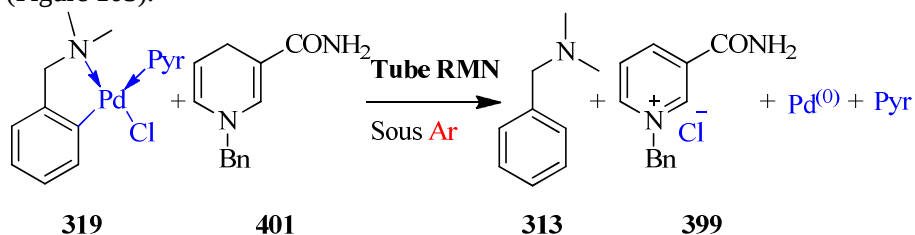
- Dans un premier cas avec 0% D<sub>2</sub>O, l'équilibre est atteint très vite et il n'évolue pas jusqu'à deux jours, c'est le cas précédent (Figure 101).
- Dans le deuxième cas utilisant 10% de D<sub>2</sub>O, après dissolution deux produits sont visibles dans le tube RMN. Il s'agirait du produit **319** et **474** en proportions 50%/50%. Après deux jours, l'équilibre évolue vers la formation du produit **474** uniquement car le complexe de départ **319** disparaît complètement. Il semblerait alors que c'est ce complexe correspondant à la substitution du DMSO qui ne soit pas bioréduit par les réductases cellulaires pour des expériences réalisées sur des solutions stocks. Les spectres RMN enregistrés sont néanmoins de mauvaise qualité et ne sont pas reproduits ici.

- Dans le troisième cas, 90% D<sub>2</sub>O, un précipité blanc insoluble dans l'eau est formé et le complexe **319** est présent sous forme des traces. Avec le temps celui-ci disparaît complètement après sept jours et les pics correspondant au complexe **474** sont de nouveau identifiés.

Suite à l'identification de ce problème d'instabilité des complexes en solution aqueuse, les futures manipulations *in cellulo* seront systématiquement réalisées sur des solutions fraîchement préparées.

#### 9.4. Réduction des palladacycles par un modèle de NADH : études en solution par <sup>1</sup>H-RMN

Nos hypothèses initiales partent du fait que les palladacycles-BODIPY **183** et **190** seraient réduits *in cellulo* par le NADH, présent avec des taux élevés en hypoxie tumorale. En vue de faciliter la tâche, nous sommes partis de nouveau avec le complexe **319**, qui est le modèle simple du palladacycle **190**. Nous avons donc conduit une étude en tube RMN en analysant directement le mélange du brut réactionnel en traitant le palladacycle **319** par la dihydropyridine **401** (Figure 103).

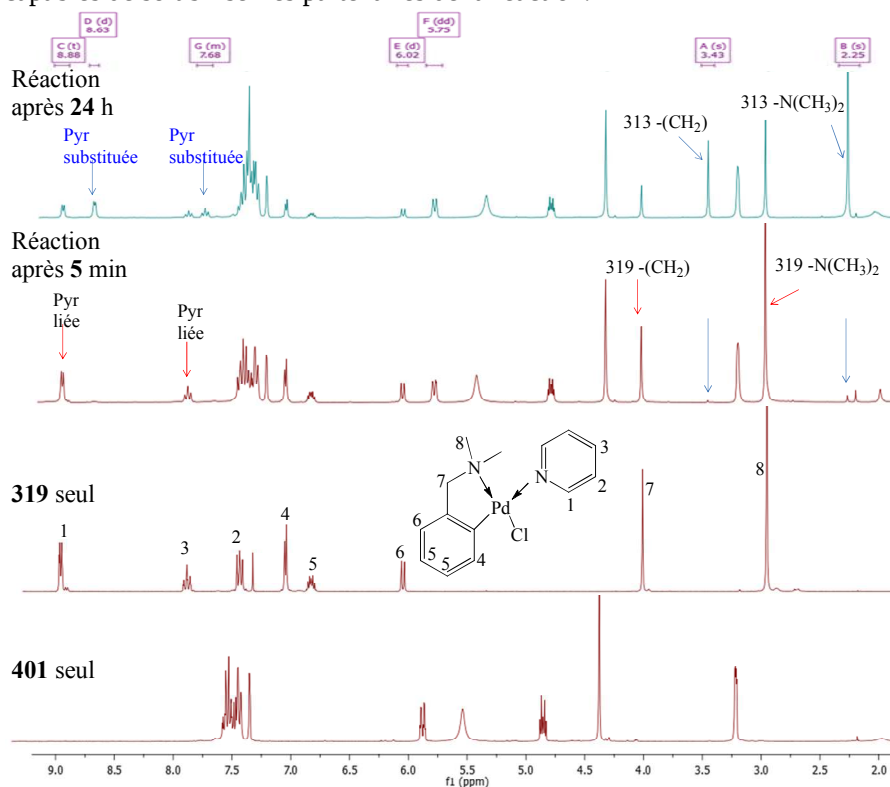


**Figure 103:** Réduction du palladacycle **319** par la dihydropyridine **401**.

Ces premières expériences ont pour but de nous donner des informations sur la manière de réagir de ces complexes avec les réducteurs de type NADH. Dans ce premier temps, la connaissance des espèces en solution nous renseignerait sur le mécanisme réactionnel. De plus, cela pourrait nous servir de sélectionner le temps d'incubation optimal de ces palladacycles en cellules cancéreuses pour

des futures bio-activations *in cellulo*. Anticipativement, la mise en évidence de la présence du produit **313** en solution devrait nous permettre de valider à ce stade de la faisabilité de nos hypothèses de départ.

Il est important de noter que le manque de solubilité des complexes en solvants protiques nous a empêché de réaliser ces expériences dans D<sub>2</sub>O ou CD<sub>3</sub>-OD. Nous avons donc décidé de travailler dans des solvants de polarités différentes et capables de solubiliser les partenaires de la réaction.



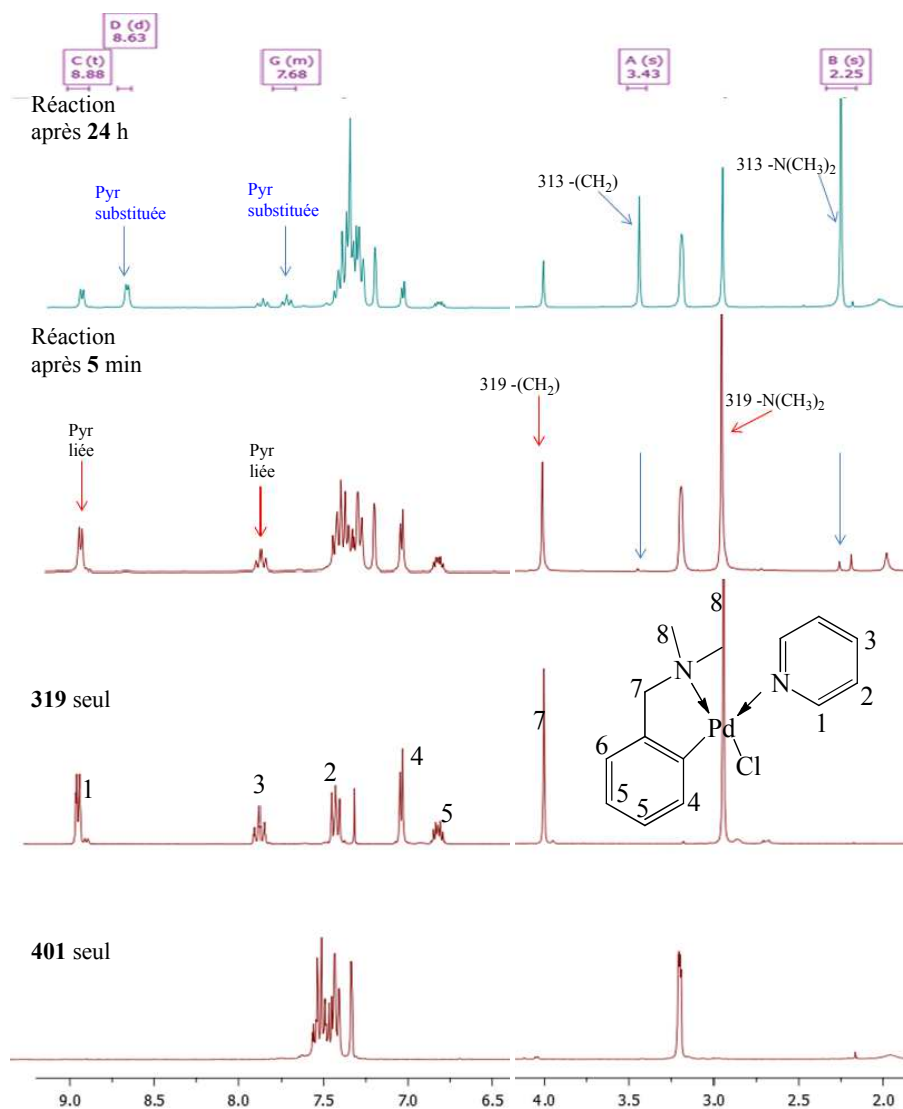
**Figure 104:** Spectre <sup>1</sup>H-RMN dans CDCl<sub>3</sub> du complexe **319** traité avec la dihydropyridine **401** sous argon.

Les premiers tests effectués consistaient en la réaction de **319** et deux équivalents de la dihydropyridine **401** directement en tube RMN dans des solvants deutérés (CDCl<sub>3</sub>, DMSO-d<sup>6</sup> et CD<sub>3</sub>CN). Après la mise en solution, le

tube RMN est coloré en jaune à cause des deux réactifs de départ (**319** et **401**). Après un intervalle de temps de 30 minutes à 2 heures, une légère formation du noir de palladium est observée dans le tube RMN, signe de la présence d'espèces de palladium (0). La présence de cette couleur noire qui se développe avec le temps est le signe pour nous que le mécanisme de cette réaction passerait par un intermédiaire palladium (0) qui se détacherait du complexe de départ **319**. Le tube RMN a été laissé alors reposé à température ambiante et la coloration noire persistante s'est développée avec le temps. Afin de s'affranchir des problèmes liés à la présence des espèces de palladium (0) paramagnétiques lors des caractérisations par RMN-<sup>1</sup>H, le brut noir est filtré sur micro-filtre HPLC (0.2 µm) Teflon et la solution jaune-orange du brut est ensuite analysée par <sup>1</sup>H-RMN. Le spectre du mélange réactionnel de ce brut est repris à la Figure 104 pour la réaction réalisée dans le CDCl<sub>3</sub>. Dans ces expériences, l'observation d'un autre intermédiaire quelconque ou l'obtention d'un tel autre produit serait un autre indice mécanistique supplémentaire.

Le spectre de ce mélange du brut est à analyser avec attention. La mise en réaction de ces deux réactifs conduit *à priori* à des réactions reprises à la Figure 103.

Au vu de cette situation, il semblerait que les espèces en solution soient le complexe de palladium **319** de départ si la conversion n'est pas totale, la dihydropyridine **401** de départ, car elle a été utilisée en excès, le produit **313**, la pyridine et le nicotinium (**399**) (dont sa concentration serait inversement proportionnelle à la concentration du complexe **319** et/ou la dihydronicotinamide transformé) qui est observé lorsque la réaction est réalisée dans le DMSO-d<sup>6</sup>. Soulignons également de la présence des espèces de noir de palladium formées au cours du temps.



**Figure 105** : Palladacycle **319** traité par la dihydropyridine **401** sous argon dans le CDCl<sub>3</sub>.

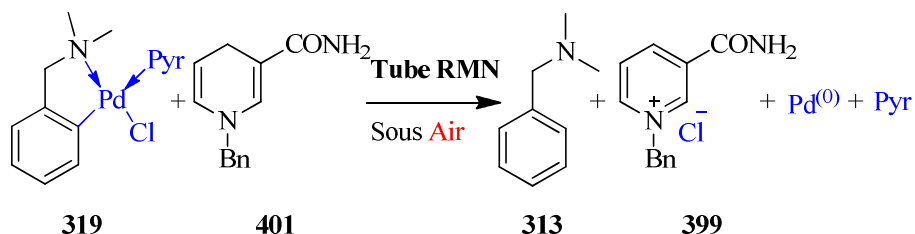
Le spectre <sup>1</sup>H-RMN agrandi est représenté à la Figure 105 pour illustrer cette situation. Les analyses du brut réactionnel sont en parfait accord avec la présence de ces 5 composants dans le mélange. Sur ces spectres superposés, nous nous sommes intéressés à identifier les nouveaux pics formés, quelques

informations sont à extraire alors:

- Dans la région aliphatique, un singulet plus intense à  $\delta = 2.25$  ppm est observé et correspond à  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$  du produit **313** libéré ainsi qu'un autre singulet observé à  $\delta = 3.44$  ppm correspondant à  $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ .
- Dans la région aromatique, deux pics correspondant à la pyridine libérée sont observés à  $\delta = 8.63$  ppm et 7.68. L'autre pic qui devrait apparaitre à  $\delta = 7.30$  ppm environ est recouvert des pics aromatiques des produits **319** et **401** de départ.
- Le pyridinium **399** non soluble dans le chloroforme et dans l'acétonitrile a été éliminé probablement lors de la filtration sur milipore. Il n'est pas donc observable dans les spectres d'arrivé.

En plus de ces deux nouveaux produits identifiés, tous les autres produits de départ sont visibles sur le spectre.

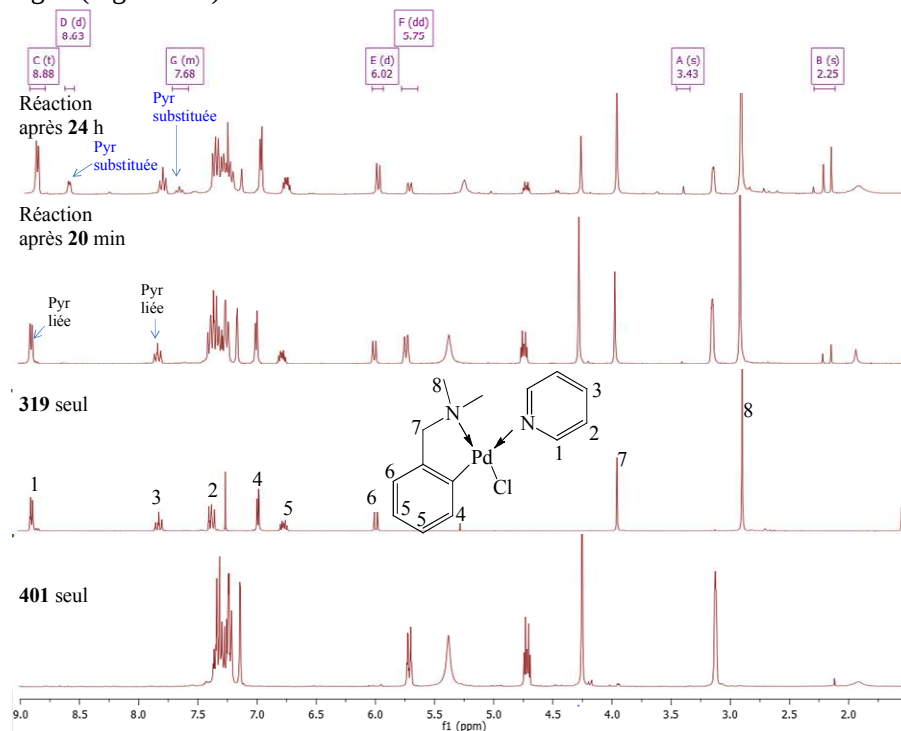
#### 1.1.1.1.1 Influence de l'oxygène



**Figure 106:** Réduction du palladacycle **319** par la dihydropyridine **401**.

L'expérience précédente a été reprise et réalisée sous air (Figure 106). Comme précédemment, les espèces de noir de palladium formées sont filtrées sur micro-filtre HPLC (0.2  $\mu\text{m}$ ) téflon après 24h. Contrairement au cas précédent, cette réaction a l'air d'être lente et semble conduire à des sous-produits difficiles à identifier dans le mélange du brut. Sans surprise cette réaction donne un comportement différent de celui observé lorsque la réaction est effectuée sous

argon (Figure 107).

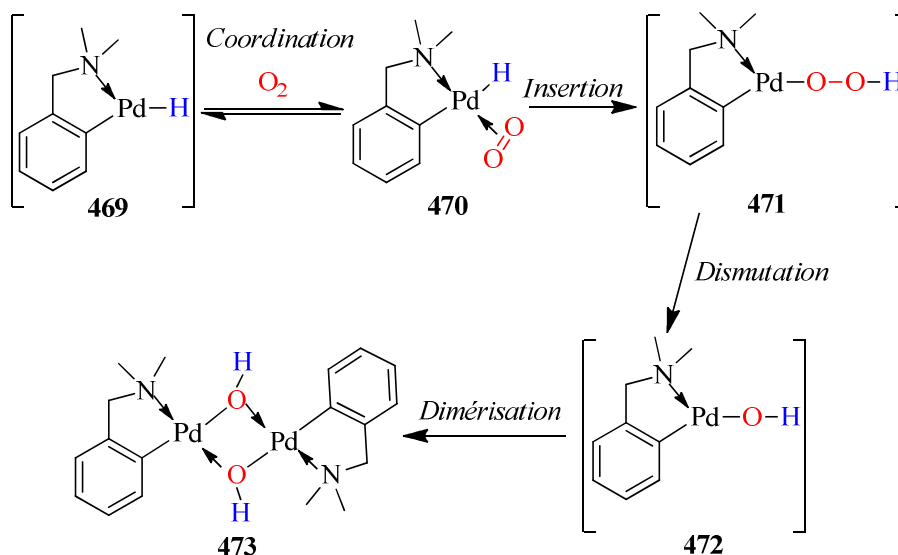


**Figure 107:** Palladacycle **319** traité par la dihydropyridine **401** sous air dans le  $\text{CDCl}_3$ .

En effet, le ligand **313** attendu n'a pas été formé. Cependant, le palladacycle de départ **319**, la dihydropyridine de départ **401**, la pyridine et le nicotinium **399** (observé lorsque la réaction est réalisée en  $\text{DMSO}-d^6$ ) sont observés. Le spectre de la réaction n'est pas propre surtout lorsque la réaction est réalisée dans du  $\text{DMSO}-d^6$ .

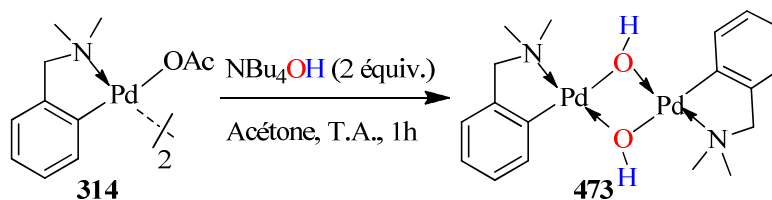
- Dans le  $\text{CD}_3\text{CN}$  comme pour le  $\text{CDCl}_3$ , nous observons la pyridine substituée dans la région aromatique, et les produits non identifiés dans la région aliphatique.
- De plus, les produits de départ, le complexe **319** et la dihydropyridine **401** sont observés.

Comme nous pouvons le remarquer sur ces spectres (Figure 107), à l'inverse du cas précédent, le produit de la réaction **313** est observé sous forme des traces ( $\text{CH}_2$ , s,  $\delta = 3.44$  ppm) et ( $\text{CH}_3$ , s,  $\delta = 2.25$  ppm) avec des produits de décomposition non identifiés. Il s'agirait peut être des traces du produit dimère **473**. La présence de ce dernier expliquerait donc l'hypothèse de la désactivation de la réduction. Comme nous le verrons avec le mécanisme proposé, cette réaction passe par la formation de l'intermédiaire d'hydrure de palladium Pd-H **469**. Ainsi, en absence d'oxygène, cet intermédiaire subirait une élimination réductrice rapide pour fournir les ligands **130** et **313** qui se détachent du palladium. Cependant, en présence d'oxygène moléculaire, celui-ci empêcherait l'élimination réductrice. Dans un premier temps, l' $\text{O}_2$  se coordonne sur le palladium en donnant l'intermédiaire **470**. Dans la suite, l'insertion 1,2 de l'oxygène dans la liaison Pd-H conduirait à la formation de l'intermédiaire palladium-peroxo **471** qui ne peut pas subir d'élimination réductrice qui conduirait au ligand libre et le palladium (0). L'intermédiaire peroxo **471** instable se dismute en donnant l'intermédiaire hydroxo correspondant **472** (Figure 108). Dans une dernière étape, la dimérisation donnerait le complexe **473**. Ces mécanismes ont été postulés dans la littérature pour la réaction de l'oxygène moléculaire avec certains hydrures de palladium.<sup>164,165,166</sup>



**Figure 108:** Voie de désactivation de l'élimination réductrice de l'intermédiaire **469**.

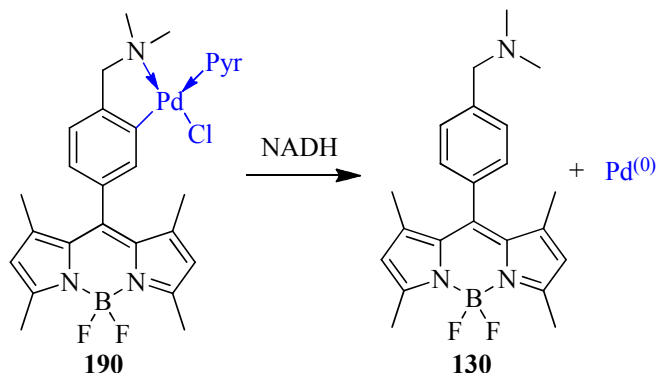
Cependant, d'autres investigations devraient être réalisées pour le prouver. Jusque-là, nous n'avons pas d'arguments pour l'affirmer. Ceci expliquerait pourquoi lorsque nous travaillons sous oxygène le rendement de la réaction diminue. Pour le mettre en évidence, nous avons synthétisé et isolé le complexe dimérique *hydroxo* correspondant **473**. Celui-ci a été synthétisé en modifiant un mode opératoire de la littérature, pour la synthèse des complexes dimères hydroxo de cette famille (Figure 109).<sup>167,168</sup> Le complexe dimère acétate **314** a été traité par l'hydroxyde de tétrabutylammonium dans l'acétone. Après 1 h d'agitation à température ambiante, le complexe hydroxy correspondant **473** a été obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 57%.



**Figure 109:** Synthèse du complexe de palladium (II) **473**.

Malheureusement, le dimère **473** n'a pas été bien observé sur des spectres  $^1\text{H}$ -RMN lorsque le palladacycle **319** est traité avec la dihydropyridine **401** sous air. Suite à ces informations préliminaires, nous avons voulu réaliser quelques expériences en batch pour isoler le ligand correspondant. Pour des raisons pratiques, nous avons décidé de travailler avec le complexe-BODIPY **190** car le ligand correspondant **130** sera plus facilement isolable sur de petite quantité que la *N,N*-diméthylbenzylamine **313** correspondant au complexe **319**.

### 9.5. Isoler le ligand libre BODIPY fluorescent



**Figure 110:** Réduction du palladacycle au BODIPY **190** par le NADH.

L'équation de la réaction que nous voulons réaliser est représentée à la Figure 110. A la suite des observations en tube RMN, nous avons fait plusieurs tentatives pour optimiser les paramètres de cette réaction et isoler le ligand libre BODIPY **130**. Nos premières investigations ont commencé par traiter le palladacycle **190** avec le NADH lui-même. Ensuite, nous avons opté pour la 1,4-dihydropyridine **401** (2 équiv.), moins chère, et possédant des propriétés similaires au NADH, mais plus soluble dans les solvants employés. Plusieurs conditions testées sont reprises dans le Tableau 1. Au départ, la solution du complexe de palladium-BODIPY **190** est orange, et à la fin de la réaction, le mélange tourne au vert fluorescent avec un solide noir déposé sur les parois du ballon réactionnel. Les meilleurs résultats sont obtenus dans un mélange de

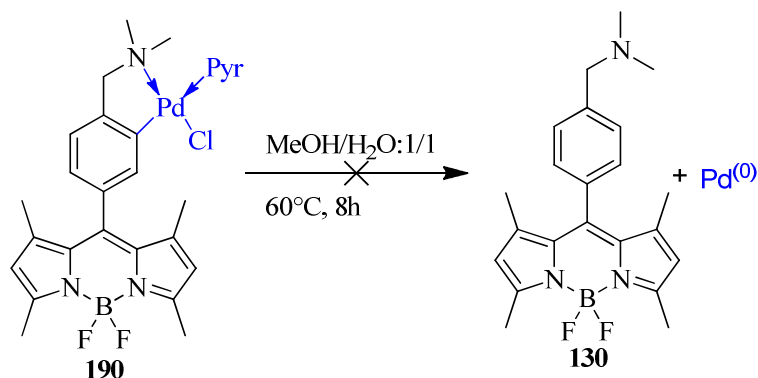
Partie II : Palladacycles-BODIPY, marqueurs de l'hypoxie tumorale

MeOH/H<sub>2</sub>O 1/1 à 60°C pendant 8 heures sous argon (entrée 9, Tableau 1).

| Entrée | Solvant                         | T°    | Temps | Réducteur et observation | Rdt (%) |
|--------|---------------------------------|-------|-------|--------------------------|---------|
| 1      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | T.A.  | 24    | NADH insoluble           | 38      |
| 2      | H <sub>2</sub> O                | T.A.  | 24    | <b>401</b> insoluble     | -       |
| 3      | MeOH                            | T.A.  | 24    | <b>401</b>               | 29      |
| 4      | THF                             | T.A.  | 24    | <b>401</b>               | Traces  |
| 5      | MeOH/H <sub>2</sub> O           | T.A.  | 24    | <b>401</b>               | 42      |
| 6      | THF/H <sub>2</sub> O            | T.A.  | 24    | <b>401</b>               | 23      |
| 7      | MeOH/H <sub>2</sub> O           | 37 °C | 8h    | <b>401</b>               | 56      |
| 8      | MeOH/H <sub>2</sub> O           | 37 °C | 24h   | <b>401</b>               | 67      |
| 9      | MeOH/H <sub>2</sub> O           | 60 °C | 8h    | <b>401</b>               | 79      |

**Tableau 1:** Conditions opératoires pour isoler le ligand BODIPY 130.

Nous avons également vérifié que dans ces conditions, le méthanol seul ne réduit pas les palladacycles en l'absence des réducteurs que sont la dihydropyridine **401** ou le NADH. Pour ce faire, le complexe **190** a été solubilisé dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O: 1/1 et a été porté à 60°C. Après 8 heures de réaction, le complexe de départ **190** a été récupéré intact (Figure 111). Cependant des temps de réaction prolongés allant jusqu'à 16 heures ont conduit à la décomposition du produit de départ, mais aucune trace du ligand libre fluorescent **130** n'a été observée. Ceci suggère dès lors l'importance capitale des réducteurs le NADH et son analogue la dihydropyridine **401**.



**Figure 111:** Palladacycle 190 chauffé dans le MeOH/H<sub>2</sub>O.

L'optimisation de cette réaction sera importante pour notre étude de mécanisme car nous allons par la suite tenter de l'adapter à un marquage au deutérium.

## 9.6. Mécanisme proposé

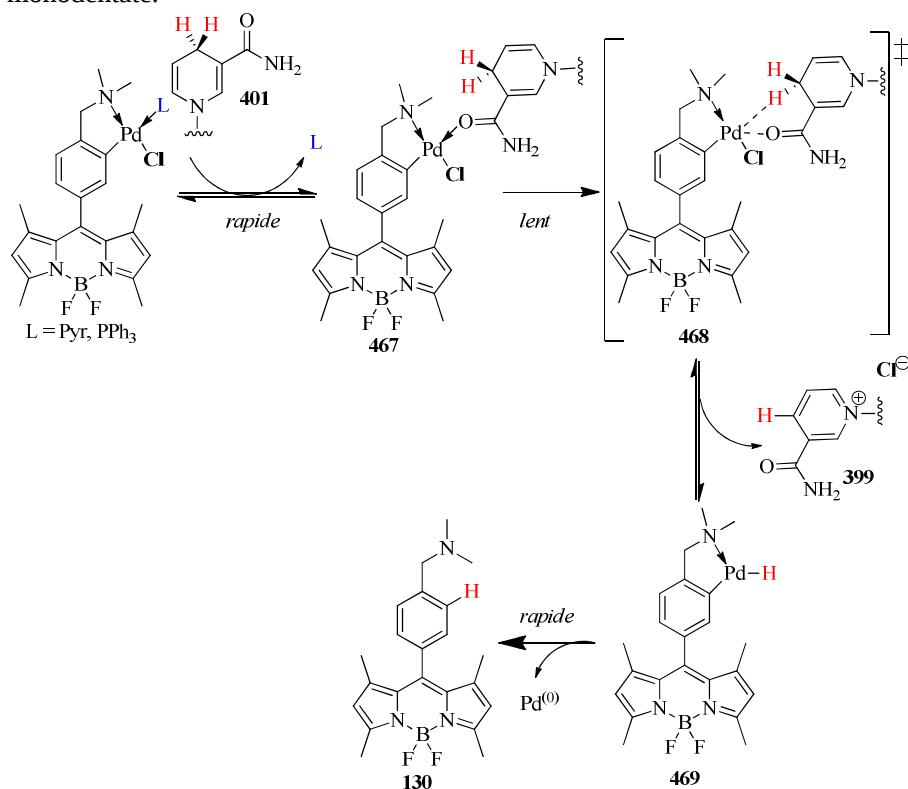
Au départ des informations obtenues par ces études en RMN, et en batch, nous avons proposé le mécanisme suivant pour cette réaction de réduction. Dans la première étape, le NADH se coordonne sur le palladium en déplaçant le ligand pyridine ou triphenylphosphine. Vraisemblablement, ces ligands déplacés seraient faiblement liés sur le palladium. Potentiellement, cette première étape serait très rapide. L'intermédiaire **467** est alors formé.

Dans la deuxième étape, le NADH transfère son hydrure sur le palladium par un mécanisme concerté et l'espèce hydrure **468** est formée. Celle-ci évoluera vers la libération de l'espèce de nicotinium **399**. C'est cette deuxième étape qui est lente et déterminante dans le mécanisme de la réaction, conduisant à l'hydrure de palladium **469**.

Dans la troisième étape et la dernière, une élimination réductrice du palladium (II) a lieu, ce qui donne le ligand libre BODIPY **130** et le palladium (0) (Figure 112). Cependant, cet hydrure peut évoluer dans un autre sens si la réaction est réalisée sous oxygène; pour ne pas conduire à l'élimination réductrice.

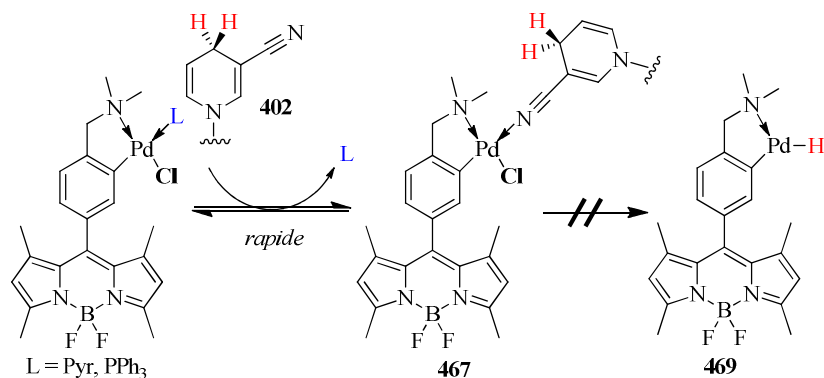
Si ce mécanisme postulé est plausible, il est clair alors pour notre travail que les

complexes de la 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> classe ne seront pas alors réduits parce que le NADH ne parviendra pas à substituer les ligands bidentates alors qu'il est monodentate.



**Figure 112:** Mécanisme proposé pour la réduction des palladacycles par le NADH.

Ce mécanisme est également compatible avec l'expérience réalisée avec la dihydropyridine dans laquelle le groupe amide a été substitué par un nitrile. Dans ce cas, on n'observe pas de réduction du complexe de palladium et la Figure 113 montre l'hypothèse en accord avec notre mécanisme :



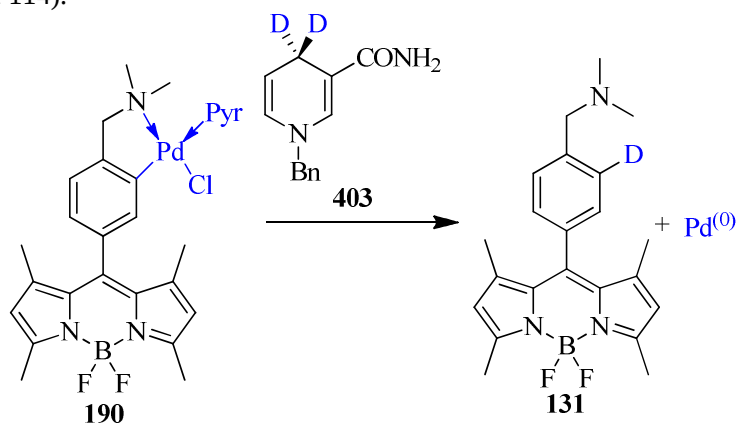
**Figure 113:** Réduction des palladacycles **183** et **190** par la dihydropyridine substituée par le nitrile **402**.

Dans le cas de ce nitrile, la coordination sur l'atome de palladium reste possible mais l'angle de coordination du cyano sur l'atome métallique montre que l'hydrure est alors trop éloigné du centre métallique et ne peut pas se transférer pour former l'hydrure de palladium **469**.

Pour renforcer cette proposition de mécanisme, il nous reste à montrer qu'un des hydrures de la dihydropyridine **401** est bien transférée sur l'aromatique du ligand libre après l'étape d'élimination réductrice. Ceci peut être facilement envisagé par le biais d'un marquage de la dihydropyridine de départ par des atomes de deutérium.

## 9.7. Deutération du ligand BODIPY

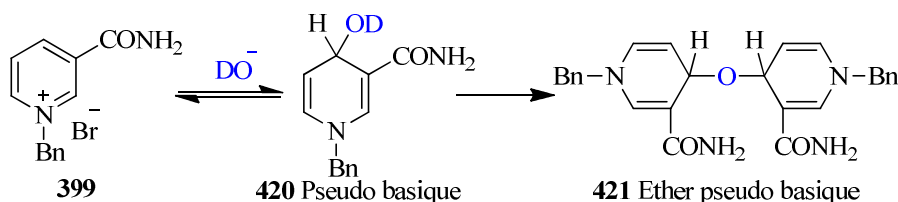
Afin de soutenir le mécanisme proposé sur la Figure 52, nous avons donc entrepris de traiter le complexe **190** par la dideutéropyridine **403** afin d'isoler et caractériser le ligand BODIPY correspondant **131** incorporant un deutérium (Figure 114).



**Figure 114:** Deutération du ligand BODIPY **130**.

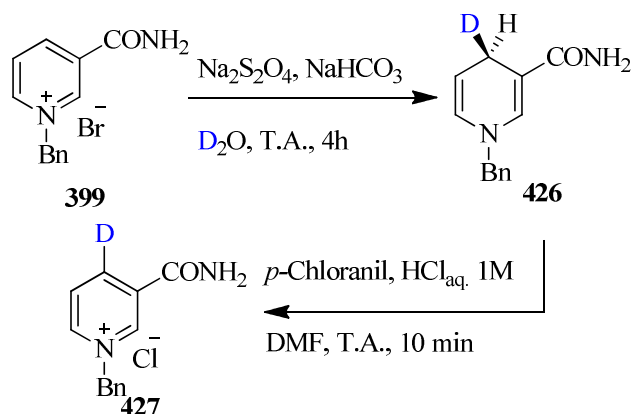
### 9.7.1. Deutération de la dihydropyridine **401**

L'obtention de la dideutéropyridine **403** se fait selon une méthodologie décrite dans la littérature.<sup>169</sup> Les procédures expérimentales sont néanmoins peu explicites et nous avons dû réoptimiser cette séquence. Cette deutération se réalise par plusieurs cycles de réduction-oxydation. Tout d'abord la réduction du sel **399** a été réalisée au moyen d'une base forte le NaOD 40% dans  $\text{D}_2\text{O}$ , tel que décrit dans la littérature.<sup>169</sup> Dans ces conditions, le produit de réduction **426** n'a pas été obtenu. Cependant, un solide jaune orange a précipité et a été filtré. Celui-ci est soluble dans les solvants organiques comme le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ou le  $\text{CHCl}_3$ . Nous n'avons pas réussi à le caractériser par RMN mais sur base de la littérature, il serait un dimère **421** selon un schéma repris à la Figure 115.<sup>170</sup> Un examen plus détaillé de la littérature montre que ces réactions de réductions de dihydropyridine fonctionnent seulement bien en conditions basiques faibles en utilisant le  $\text{NaHCO}_3$  ou le  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .



**Figure 115:** Dimérisation de l'intermédiaire **399** en conditions aqueuses fortement basiques.

Nous avons ensuite entrepris la deutération en utilisant le  $\text{NaHCO}_3$  dans  $\text{D}_2\text{O}$ , conditions faiblement basiques par rapport aux précédentes. Pour cette réduction, le produit de réduction **426** est obtenu avec un bon rendement par simple précipitation du milieu réactionnel. A l'issue de cette étape, le produit est donc deutéré à 50% environ. Le pourcentage de deutération des composés dihydropyridine et pyridinium est facilement quantifié par RMN  $^1\text{H}$ . L'oxydation du produit obtenu **426** est réalisée dans du DMF à température ambiante pendant 15 minutes en présence du *p*-chloranil. Une solution aqueuse de HCl 1M est ajoutée à la fin de la réaction et les composés organiques neutres et la DMF sont séparés du cation pyridinium par plusieurs lavages de la phase aqueuse. Après élimination de l'eau à l'évaporateur rotatif, la purification du solide brut se fait par cristallisation. Il est repris dans l'éthanol et trituré à température ambiante. Le produit **426** précipite sous forme d'un solide blanc et est filtré puis lavé avec un minimum d'EtOH froid. Il est obtenu avec une sélectivité de deutération d'environ 50%. Pour avoir le produit **426** complètement deutéré, plusieurs cycles de réduction-oxydation dans ces dernières conditions exposées précédemment sont réalisés (Figure 116).



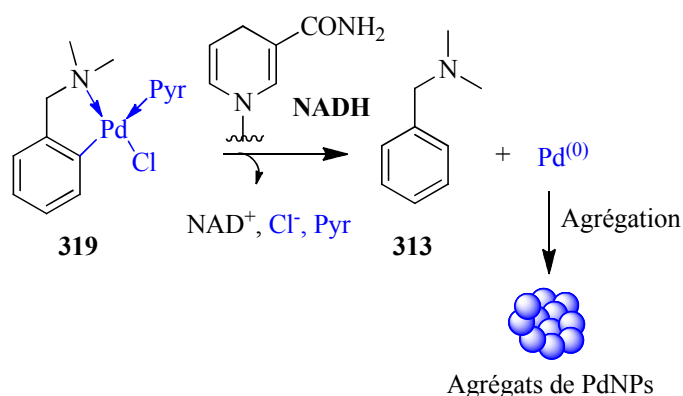
**Figure 116:** Deutération de l'analogue de NADH **401**.

Le carbonyle tourne librement autour de la liaison carbone, ce qui engendre une chiralité axiale de deux hydrogènes en position 4. Une équipe de recherche du Professeur Kawai en 1998 s'est intéressée au mécanisme d'échange isotopique primaire et secondaire qui serait associés à l'oxydation de la dihydropyridine par des quinones de potentiels redox variés, y compris le *p*-chloranil.<sup>171</sup> Il a remarqué que le rapport H : D dans le produit oxydé est indépendant du temps de la réaction, ce qui implique qu'il n'y a pas échange isotopique du proton par le deutérium au cours du temps entre les formes oxydée et réduite dans les conditions réactionnelles.

Finalement, trois cycles de réduction-oxydation exposés sur la Figure 116 ont été réalisés et le produit **403** a été obtenu avec un rendement global d'environ 25% (sur 6 étapes) avec un rapport D:H de 90:10.

### 9.8. Nature des espèces de palladium

Au vu des résultats précédents, nous avons procédé à l'analyse de la nature des espèces de palladium générées lorsque le palladacycle **319** est soumis à la réduction par du NADH. Comme précédemment, cette manipulation a été réalisée sous atmosphère inerte (argon) et sous oxygène afin d'évaluer l'influence de ce dernier. Dans cette étude, nous nous intéresserons tout d'abord à connaître l'étage d'oxydation du palladium généré *in situ*, la taille des nanoparticules ainsi que leur stabilité au cours du temps en fonction des conditions réactionnelles. Ainsi, les méthodes analytiques comme la DLS (diffusion dynamique de la lumière), la TEM (microscope électronique à transmission) et XPS (spectroscopie de photoélectrons) ont été choisies et utilisées pour caractériser les nanoparticules en solution, mais également dans leur état individuel. Pour obtenir une information directe sur la taille des nanoparticules, les analyses par DLS ont été réalisées en solution. Les expériences TEM et XPS ont été réalisées sur des échantillons solides dont les particules de palladium ont été encapsulées par un agent adsorbant pour éviter une éventuelle interaction avec des ligands organiques. L'équation représentant la formation des particules de Pd est reprise à la Figure 117.

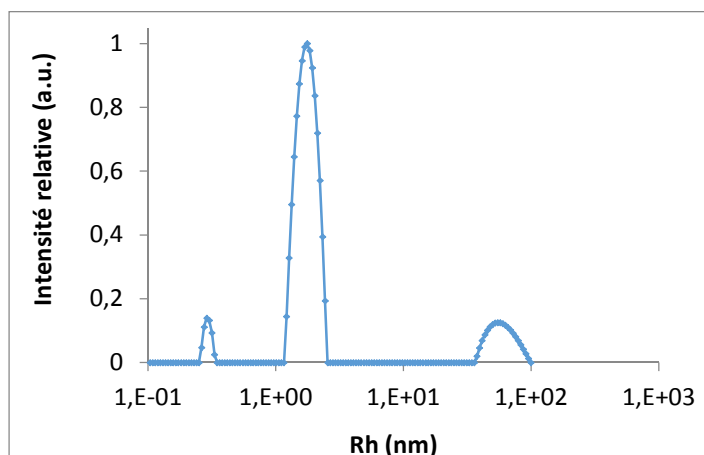


**Figure 117:** Nanoparticules de Pd générées *in situ* par réduction du palladacycle **319** par NADH.

### 9.8.1. Analyses par DLS

La mesure du rayon hydrodynamique moyen apparent ( $R_{h,app}$ ) des particules en solution a été réalisée par la DLS à 25°C. Ces analyses ont été réalisées directement sur une solution aqueuse du palladacycle **319** 0.56  $\mu\text{M}$  traité avec un excès de NADH (50 équiv.). La réaction a été effectuée tout d'abord sous atmosphère inerte d'argon en utilisant des solutions suffisamment dégazées en oxygène. La courbe enregistrée après 10 minutes montre que trois populations différentes sont présentes en solution (Figure 118).

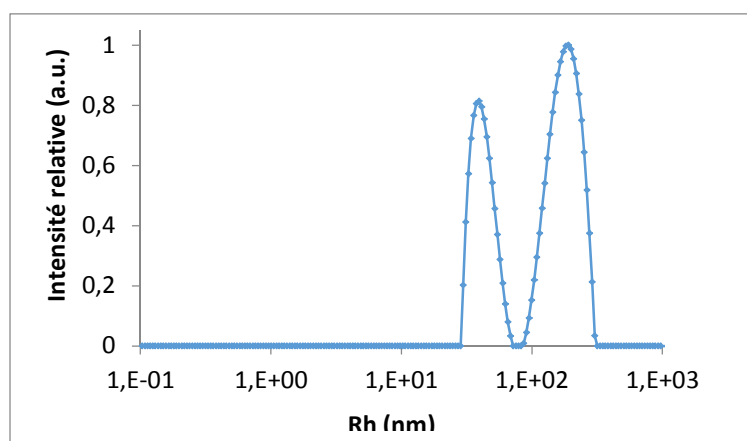
- La première population de très faible intensité avec un rayon hydrodynamique moyen apparent  $R_{h,app}$  inférieur à 1 nm (se forme après dix minutes et disparaît).
- La deuxième population de plus grande intensité avec un  $R_{h,app} = 1.5$  nm correspondrait à des nanoparticules unitaires en solution.
- Une troisième population de faible intensité avec un  $R_{h,app} = 80$  nm pourrait être attribuée à l'agrégation des nanoparticules avec le temps.



**Figure 118:** Nanoparticules de Pd observées par DLS en solution par réduction du palladacycle **319** par le NADH sous argon, après 10 min.

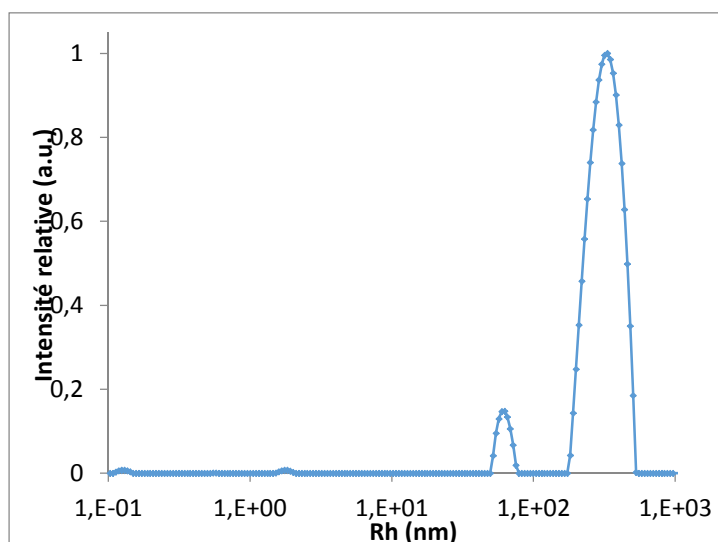
Afin d'évaluer la stabilité de ces nanoparticules en solution en fonction du temps, la même analyse a été réalisée après 1 heure. Deux populations de grande

taille ont été alors observées. La première population avec un rayon hydrodynamique moyen apparent de 87 nm et une autre de grande taille de 188 nm (Figure 119). Clairement, la réduction du palladacycle **319** par un excès de NADH conduit à la formation de nanoparticules qui s'agrègent avec le temps. Malheureusement, ces nanoparticules de grande taille (> 10 nm) ont tendance à être moins actives en catalyse si aucun agent stabilisant n'est utilisé pour empêcher une éventuelle agrégation.<sup>172</sup>



**Figure 119:** Nanoparticules de Pd observées par DLS en solution par réduction du palladacycle **319** par le NADH sous argon, après 1 h.

Afin d'évaluer l'influence de l'oxygène sur la taille et le comportement de nanoparticules de palladium en solution, les mêmes manipulations ont été réalisées sous air en utilisant des solutions non dégazées en oxygène. Dans ces conditions, la courbe enregistrée après 1 heure montre un comportement différent de celui observé précédemment. Ainsi, deux populations de grande taille ont été observées, avec des rayons hydrodynamiques moyens apparents de 87 nm et 384 (Figure 120).



**Figure 120:** Nanoparticules de Pd observées par DLS en solution par réduction du palladacycle **319** par le NADH sous oxygène, après 1 h.

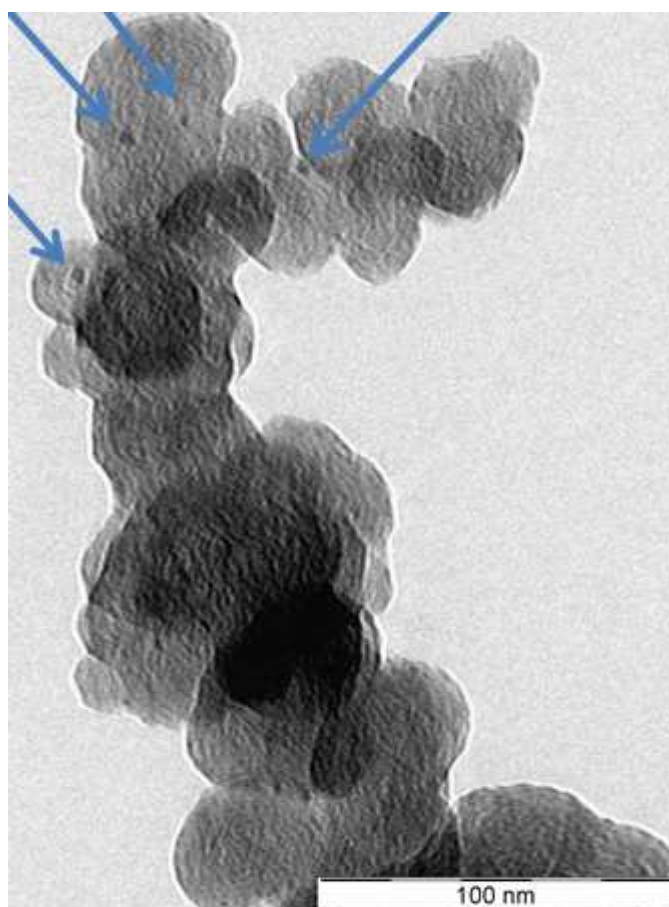
Il ressort de ces premières observations que la taille des particules de palladium générées *in situ* serait fonction du niveau d'oxygène, qui favoriserait l'agrégation et donc la formation des espèces beaucoup plus volumineuses. De plus, le temps aurait une influence nette sur la taille finale des nanoparticules qui s'agglomèrent en formant des agrégats. Ces observations très préliminaires seront dans la suite consolidées par les caractérisations avec la TEM.

### 9.8.2. Analyses par la TEM

Les analyses TEM et XPS ont été réalisées sur des particules adsorbées sur du noir de carbone. Concrètement, une solution aqueuse 0.56  $\mu\text{M}$  du palladacycle **319** a été traitée par du NADH (50 équiv.) pendant 30 minutes. Le noir de carbone a été ajouté, et la réaction a été agitée pendant 30 minutes supplémentaires. Les nanoparticules de palladium ont été isolées par filtration et lavées par de l'éthanol puis analysés par la TEM et l'XPS.

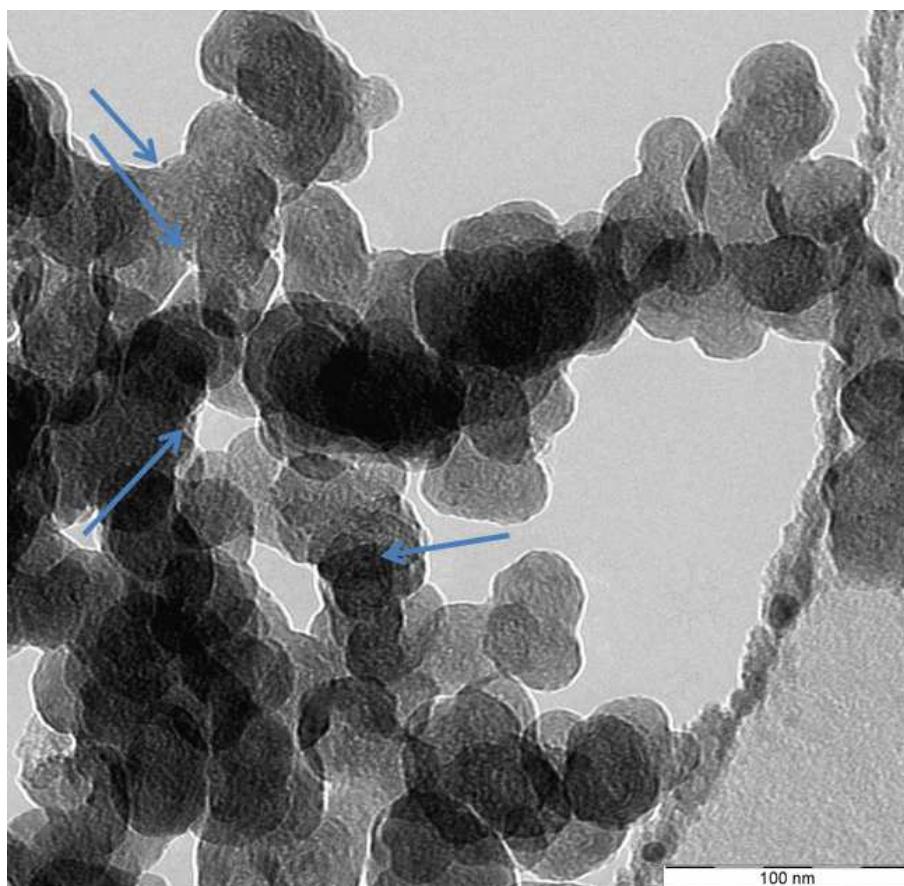
La TEM est une technique qui permet de visualiser les particules, leur état d'agrégation, de dispersion, ainsi que leur taille moyenne et permet le comptage

de particules pour obtenir des statistiques fiables. Pour obtenir une information suffisante sur la morphologie des espèces du palladium, les analyses TEM ont été ensuite réalisées. Les images TEM réalisées sur des PdNPS obtenues lorsque la réaction est réalisée sous air sont présentées à la Figure 121. Ces images montrent que les nanoparticules sont de petite taille.



**Figure 121:** Images en TEM de nanoparticules de palladium isolées par réduction du palladacycle **319** par le NADH sous air.

De façon surprenante, dans le cas des nanoparticules formées par réduction sous atmosphère inerte d'argon, les micrographes de TEM montrent une formation des nanoparticules également de petite taille presque similaire au cas précédent (Figure 122).

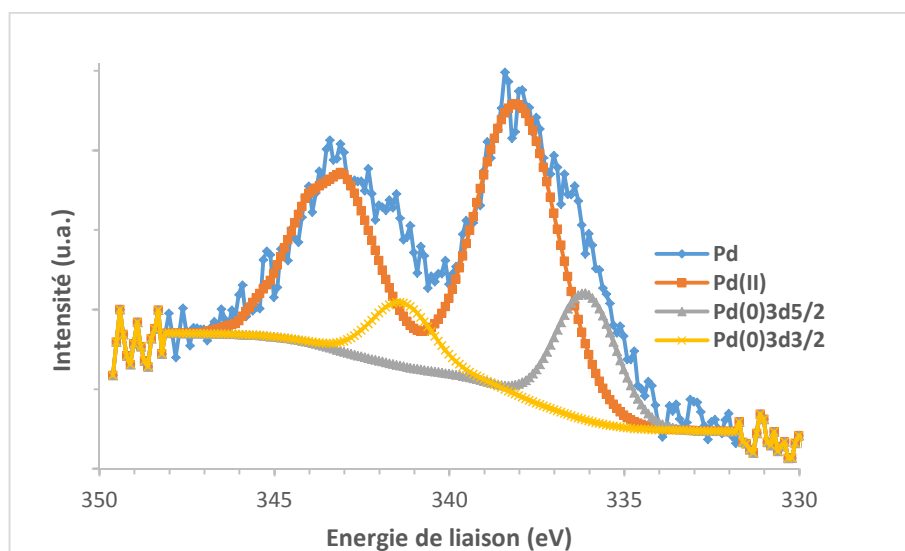


**Figure 122:** Images en TEM de nanoparticules de palladium isolées en traitant le palladacycle 319 par le NADH sous argon.

Ces analyses TEM montrent que des nanoparticules sont bien formées. Cependant, aucune différence nette n'est observée sur ces images. Ces analyses ont été réalisées dix jours plus tard et il semblerait que bien que les nanoparticules adsorbées se soient oxydées ou agglomérées. Une future caractérisation devrait être envisagée pour comprendre ce phénomène. Les analyses avec XPS confirmeront ou nieront une éventuelle oxydation du palladium (0) généré *in situ* pour donner du palladium (II).

### 9.8.3. Analyses par XPS

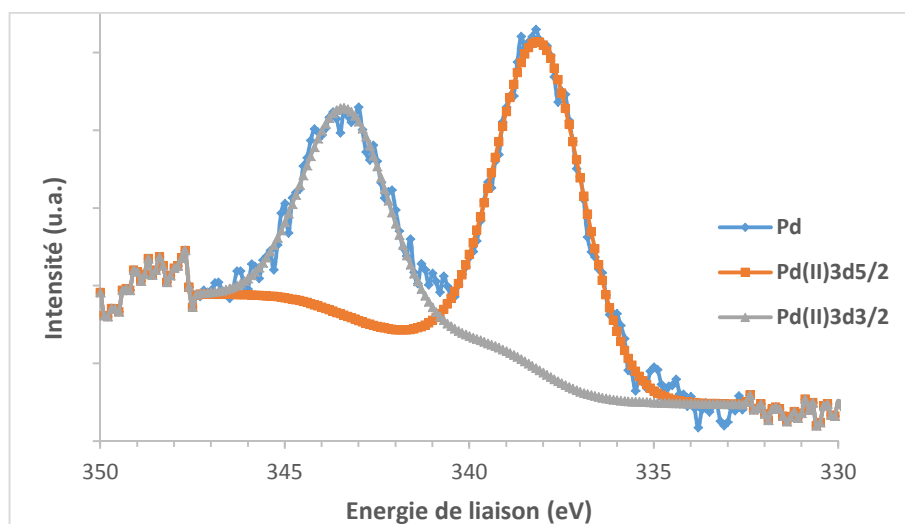
La dernière technique à laquelle nous avons fait appel pour caractériser les espèces de palladium est l'XPS. C'est une technique d'analyse de surface qui permet de détecter la présence des différents éléments, ainsi que leur état d'oxydation. C'est une technique très utile pour le palladium qui est une espèce facilement oxydable. Contrairement à la DLS et la TEM, les analyses par XPS nous ont permis de connaître l'état d'oxydation du palladium. Le spectre XPS réalisé après 3 jours sur des nanoparticules lorsque la réaction est effectuée sous argon montre la position des pics  $3d_{5/2}$  et  $3d_{3/2}$  du palladium (0) respectivement vers 336 eV et 341 eV; ce qui confirme clairement la formation des nanoparticules de palladium (0) (Figure 123). Cependant, deux autres pics correspondant respectivement à des composantes  $3d_{5/2}$  et  $3d_{3/2}$  ont été également observés à 338 et 343 eV; ce sont des espèces de palladium (II). La proportion expérimentale du palladium (II) est de 77% contre 23% pour le palladium (0). Ces espèces de palladium (II) proviendraient probablement d'une réduction partielle du complexe de palladium **319** par du **NADH**. Ce résultat n'est pas surprenant si l'atmosphère n'est pas suffisamment contrôlée, d'autant plus qu'il n'est pas facile de dégazer complètement l'eau de l'oxygène. De plus, une éventuelle oxydation du palladium (0) durant le stockage n'est pas à écarter.



**Figure 123:** Spectre XPS présentant les pics de palladium lorsque la réaction est réalisée sous atmosphère inerte d'argon.

Il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences en ajoutant un agent stabilisant capable d'empêcher l'agglomération et donc l'oxydation des nanoparticules.

Sans surprise, le spectre XPS réalisé sur des nanoparticules isolées lorsque la réaction est effectuée sous air montre uniquement un doublet correspondant au palladium (II) (Figure 124). Ces analyses XPS viennent enfin de consolider les résultats obtenus dans ce travail, à savoir une réduction sélective des palladacycles par le NADH en milieu faiblement oxygéné, comme nous l'avons postulé auparavant.



**Figure 124:** Spectre XPS présentant le pic du palladium lorsque la réaction est réalisée sous air.

Suite à ces trois études, nous pouvons affirmer que le palladium généré *in situ* est sous forme de nanoparticules. Les analyses DLS et TEM nous ont permis de remarquer que la taille des nanoparticules dépend essentiellement du temps. D'autre part, l'étage d'oxydation du palladium dépend quant à lui du niveau d'oxygène. Ainsi, pour obtenir des nanoparticules de palladium (0), il est important de travailler en absence de l'oxygène.

### 9.9. Conclusion

- Les palladacycles sont stables en solution dans les solvants non coordinants mais ne sont pas stables en solution de DMSO et donc les prochaines expériences *in cellulo* ont été réalisées sur des solutions DMSO/H<sub>2</sub>O fraîches.
- L'étude du mécanisme de réduction du palladacycle **319** par la dihydropyridine **401** a confirmé nos hypothèses. Les espèces présentes en solution à l'équilibre sont en accord avec la réduction de ces palladacycles par déplacement de ligand coordonnant pyridine. De plus, cette étude a montré que la réaction va jusqu'au bout.
- La réduction du palladacycle **319** par la dihydropyridine **401** doit être réalisée sous atmosphère inerte ; en absence d'oxygène.
- Cette précédente observation rend compte qu'une sélectivité de bioréduction sélective des palladacycles **183** et **190** pourra être observée dans les cellules cancéreuses présentant des taux élevés de NADH.

## 10. Bioréduction dans les lignées cellulaires présentant des taux élevés de NADH<sup>2</sup>

Au vu des informations pertinentes obtenues *in vitro*, nous avons poursuivi nos investigations *in cellulo* avec les deux palladacycles prometteurs **183** et **190**. En préambule à ces expériences sur cellules tumorales, il est important de rappeler que par rapport aux cellules saines, les cellules tumorales génèrent des taux élevés des formes réduites de NAD<sup>+</sup>, NADH et NADPH, agissant comme cofacteurs ou éléments redox nécessaires à la prolifération cellulaire. En conditions hypoxiques, le NADH s'accumule d'autant plus qu'il ne peut plus être utilisé pour les phosphorylation oxydatives en raison du déficit en oxygène. Cet environnement est donc favorable à la bioréduction des palladacycles dans les cellules tumorales hypoxiques.

### 10.1. Détermination des longueurs d'onde d'excitation-émission

D'abord, les longueurs d'onde d'excitation/émission maximales ont été déterminées. Il ressort que le ligand **130** présente une longueur d'onde d'excitation vers 490 à 500 nm et l'émission de 530 à 540 nm. Cependant, le palladacycle **183** présenterait des excitations et émissions à 480-490 nm et 690-700 nm respectivement. Le complexe **190** présente également un spectre décalé avec des excitations maximales à 420-430 nm et émissions maximales à 680-690 nm. Il est clair que la complexation du ligand **130** au palladium a conduit à un shift de la longueur d'onde d'émission vers l'infrarouge. Les images sont représentées en annexe 2.

---

<sup>2</sup> Manipulations réalisées par Laurene PETIT

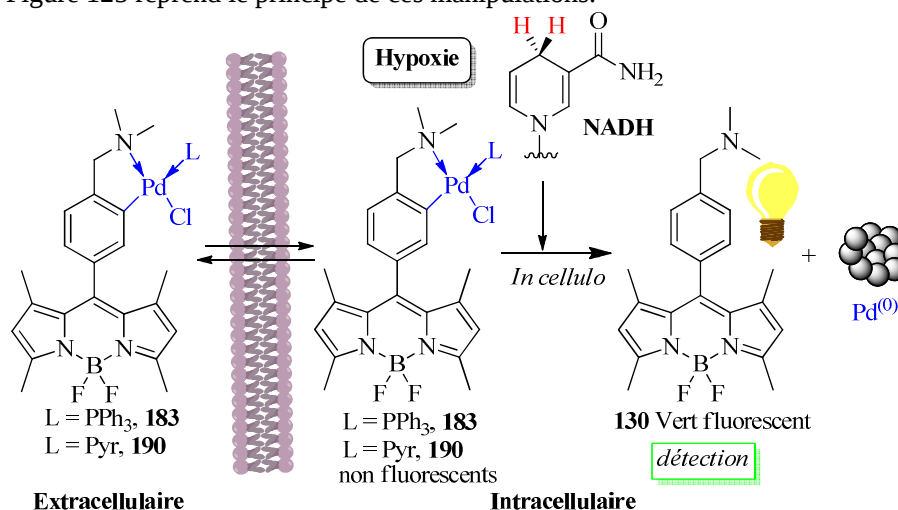
## 10.2. Principe de bioréduction

Les complexes de palladium sont solubilisés dans le DMSO et ensuite dilués dans l'eau (DMSO/H<sub>2</sub>O<1/99) à une concentration de 1 mM. Les complexes dilués dans le milieu de culture cellulaire à la concentration choisie sont ensuite incubés avec les cellules cancéreuses en conditions normoxiques ou hypoxiques à 37°C. Après, 30 minutes ou 1 heure, le milieu de culture cellulaire est enlevé et les cellules sont lavées abondamment avec une solution tampon **PBS**. La fluorescence est détectée à l'aide d'un lecteur de plaque multi-puits de type SpectraMax i3 Multi-Mode (Molecular devices). Ce système permet une mesure précise de la fluorescence émise par des cellules en culture (maintenues à 37°C) à une longueur d'onde déterminée avec un débit de criblage suffisant que pour tester différentes conditions expérimentales. Ce lecteur est également doté d'un système optique permettant d'imager les cellules à 3 longueurs d'ondes différentes (émission dans le vert, le rouge et le bleu).

## 10.3. Optimisation des différents paramètres

Nous avons réalisé un premier *screening* en faisant varier les paramètres de concentrations, de temps d'incubation et le type de lignées cellulaires afin de trouver des conditions optimales de libération sélective du ligand fluorescent en condition hypoxique. Les lignées cellulaires tumorales choisies présentent des taux élevés de NADH. Il s'agit des cellules d'origine humaine suivantes : UMC3 (cancer de la vessie), HCT116 (cancer du colon), SiHa (cancer du col de l'utérus) et BT20 (cancer du sein). Ces expériences ont été réalisées en hypoxie et en normoxie. Pour chaque lignée cellulaire, l'intensité de la fluorescence a été mesurée pour chacun des deux complexes **183** et **190** à trois concentrations différentes, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M et 50  $\mu$ M après 30 et 60 minutes. Les résultats de ces manipulations sont consignés dans le tableau en annexe 3. La mesure de changement de l'intensité de fluorescence donne une information sur la cinétique du processus d'internalisation et de libération intracellulaire du

fluorophore. Rappelons que notre but ici est d'observer la fluorescence sélectivement pour les cellules traitées avec les palladacycles en hypoxie. La Figure 125 reprend le principe de ces manipulations.

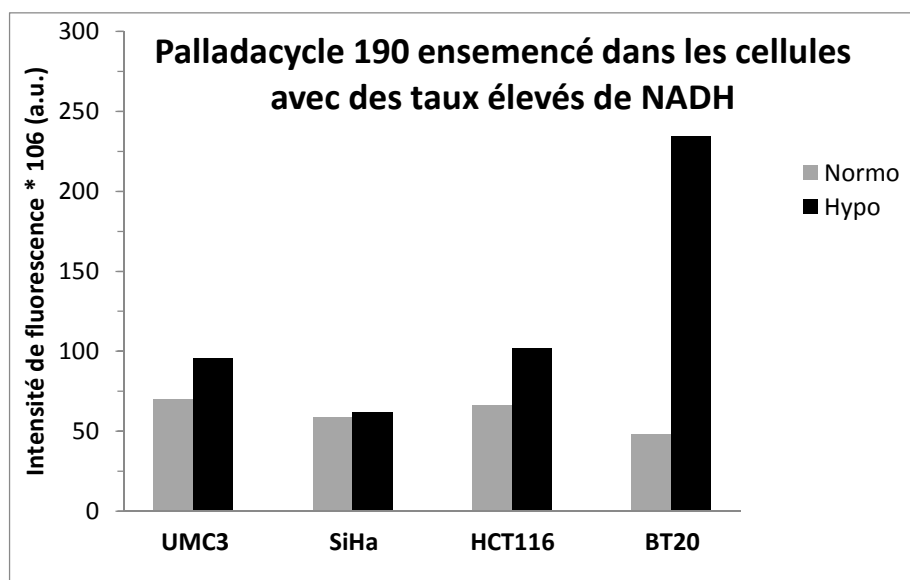


**Figure 125:** Bio-réduction sélective des palladacycles **183** et **190** dans les cellules tumorales présentant des taux élevés de NADH.

La fluorescence observée par incubation de ces produits dans les cellules tumorales montre clairement qu'elle provient du ligand BODIPY **130** libéré au vu du grand niveau de quenching de la fluorescence lorsque le ligand est coordonné au palladium. Deux observations importantes sont à souligner :

Le complexe **183** a montré une très légère sélectivité hypoxique pour les quatre lignées cellulaires évaluées à toutes les concentrations que ce soit après 30 ou 60 minutes.

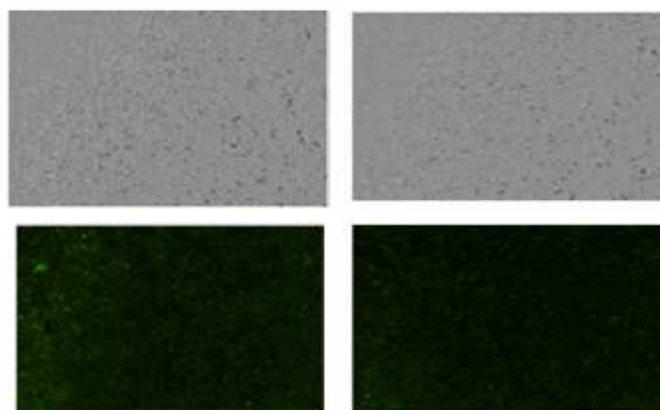
Le complexe **190** a quant à lui montré une meilleure sélectivité hypoxique, en particulier dans les cellules cancéreuses BT20 à une concentration de 50  $\mu\text{M}$  après 30 minutes d'incubation. Dans ces conditions, l'intensité de fluorescence est multipliée par 4.9 en hypoxie (par rapport à la normoxie). L'histogramme illustré à la Figure 126 représente les intensités en fluorescence mesurées lorsque le palladacycle **190** est incubé à 50  $\mu\text{M}$  dans différentes lignées cellulaires.



**Figure 126:** Palladacycle **190** ensemencé dans différentes lignées cellulaires présentant des taux élevés de NADH. Concentration: 50  $\mu$ M pendant 30 minutes.

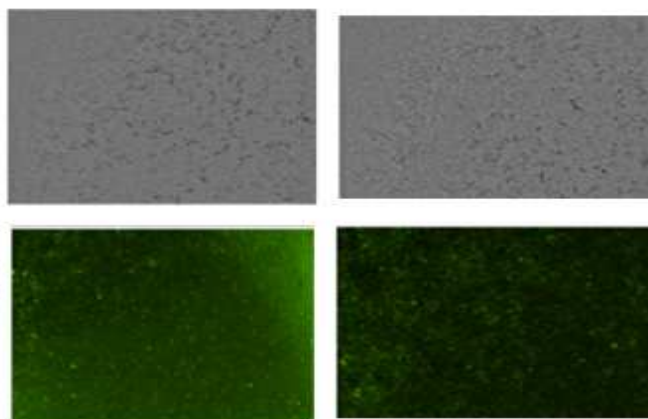
Comparée à l'intensité de fluorescence du ligand libre **130**, l'intensité du palladacycle **190** est d'environ 30% après 30 minutes d'incubation dans les cellules BT20 en hypoxie. De façon surprenante, cette intensité de fluorescence diminue avec le temps pour atteindre 38 (u.a.) et 113 (u.a.) respectivement en normoxie et hypoxie, ce qui suggère probablement une atténuation de la fluorescence en raison d'une excitation prolongée. Ce profil pourrait suggérer une instabilité et donc une décomposition du ligand libre BODIPY **130** dans le milieu de culture cellulaire ou en solution dans le noyau cellulaire. Le lecteur de microplaques Spectramax utilisé pour les mesures de fluorescence permet également de prendre des photos avec une résolution limitée. Les images capturées sont représentées à la Figure 127 ; on y distingue l'accumulation de la fluorescence à l'intérieur des cellules sans pouvoir identifier un éventuel compartiment subcellulaire.

### Normoxie 30 min



---

### Hypoxie 30 min



**Figure 127:** Cellules BT20ensemencées avec le palladacycle **190** à 37°C pendant 30 minutes, (a) en normoxie (21% O<sub>2</sub>) et (b) en hypoxie (1% O<sub>2</sub>), concentration : 50 μM. Photos en champ clair (documentant la présence des cellules) et en fluorescence prises avec les filtres des bandes d'excitation de 470/20 nm et l'émission à 525/50 nm (deux puits représentatifs d'une même condition sont présentés ; la durée d'exposition est la même en conditions normoxiques et hypoxiques).

En parallèle, des expériences de contrôle sur le ligand **130** ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment. Comme pour les complexes **183** et **190**, l'intensité de la fluorescence de **130** dans les cellules cancéreuses diminue avec le temps que ce soit en normoxie ou hypoxie. Pour une concentration de 50  $\mu\text{M}$ , elle chute de moitié entre la mesure à 30 minutes et à 60 minutes pour les cellules BT20.

## 11. Conclusion

Trois classes de complexes de palladium avec un ligand fluorescent BODIPY aux propriétés stéréoélectroniques différentes ont été synthétisées et caractérisés. Ces palladacycles non fluorescents ont alors été utilisés *in cellulo* pour tester leur potentialité à être bioréduits sélectivement en hypoxie, pour être utilisés comme marqueurs de l'hypoxie tumorale. Les acquis sont résumés ici :

- Les complexes de palladium de type palladacycles et portant un ligand pyridine s'internalisent dans les cellules.

- Ces complexes sont bio-réduits par le NADH pour libérer le palladium réduit qui forme des nanoparticules de la taille du nanomètre. L'emploi des cellules tumorales présentant des taux élevés de NADH permet de favoriser cette bio-réduction.

- La bio-réduction est possible quand les concentrations en oxygène sont faibles (milieu hypoxique) et semble inhibée en milieu normoxique.

Il est néanmoins important de noter à ce stade que la nature exacte des espèces de Palladium (0) ne sont pas prouvées car l'identification a été réalisée *in vitro* et que la transposition en milieu cellulaire n'est pas automatique, de par la complexité de ces milieux.

Les perspectives de ce travail peuvent dès lors être résumées comme suit:

- 1-Mettre au point une réaction qui pourra être catalysée *in vitro* par les espèces de palladium (0) générées *in situ*.

- 2-Appliquer cette réaction *in cellulo* et étudier la sélectivité hypoxie/normoxie.

Et donc choisir une réaction de déprotection d'un fluorophore protégé pour ces deux opérations. Ceci permettra d'optimiser les paramètres des réactions *in vitro* et *in cellulo*.

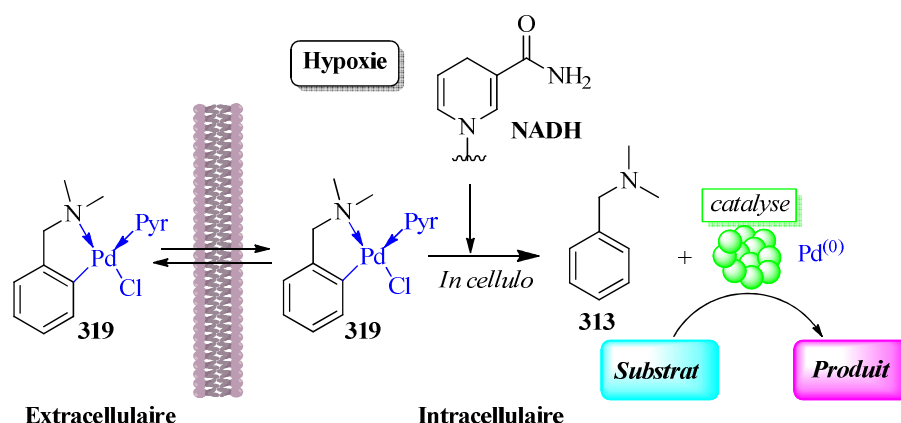
3-Après optimisation, appliquer la réaction pallado-catalysée au déblocage d'une molécule cytotoxique pour générer sélectivement un effet biologique à l'intérieur de la cellule.

Partie III : Application des  
palladacycles en catalyse *in*  
*cellulo*



## 1. Principe et objectif

La sélectivité de bio-réduction du complexe de palladium BODIPY **190** dans les cellules cancéreuses en hypoxie nous a encouragés à tester son activité catalytique pour la délivrance sélective des drogues anti-cancéreuses dans des cellules tumorales hypoxiques. En reprenant la Figure 125, nous pouvons maintenant la modifier pour arriver à l'objectif ultime de ce travail : Pouvoir développer une réaction de catalyse organométallique dans une cellule vivante et réaliser cette réaction sélectivement en milieu hypoxique (Figure 128).



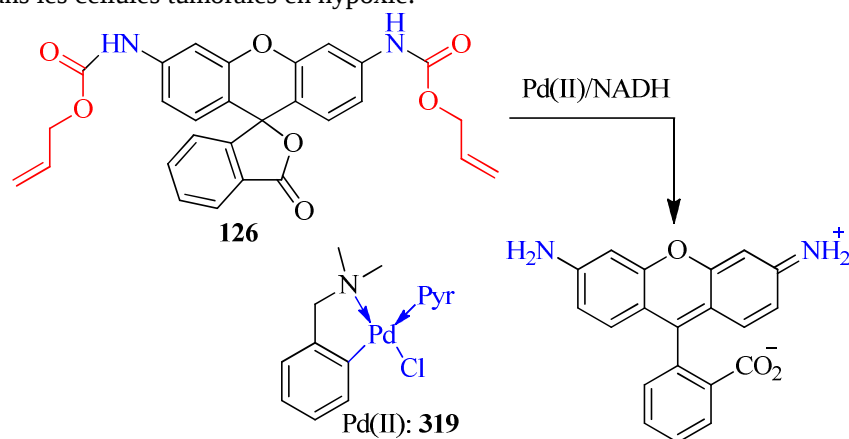
**Figure 128:** Catalyse organométallique d'un substrat cagé.

Dans ces expériences, nous allons utiliser le complexe de palladium **319** sans BODIPY qui est le modèle simple du complexe **190**. Notre but majeur est de montrer que le précatalyseur **319** est capable de libérer l'espèce catalytique active de palladium (0) sélectivement dans des cellules tumorales en conditions hypoxiques *via* le NADH cellulaire. Ensuite, cette espèce catalytique de palladium (0) sera utilisée dans les réactions de catalyse *in cellulo*.

Assez naturellement, nous nous sommes tournés vers la réaction d'allylation de Tsuji-Trost car son efficacité a déjà été prouvée dans quelques études de catalyse *in cellulo*. De plus, elle est très facile à mettre en œuvre, compatible

avec les milieux protiques et très robuste. Enfin, elle a été largement développée en stratégie de groupements protecteurs (groupe Alloc) et c'est sur cette stratégie que nous allons nous tourner pour la mise au point de nos réactions. De plus, ils ont déjà fait preuve de stabilité en milieu biologique mais restent cependant labiles par action d'un métal de transition. Ces applications dans le domaine de la catalyse *in cellulo* ont été revues récemment.<sup>24,173</sup>

Dans un premier temps, nous allons tester cette activité catalytique pour couper sélectivement la Rhodamine-*N* Alloc **126** dans les cellules cancéreuses en hypoxie (Figure 129). La Rhodamine-110 nous servira de rapporteur pour évaluer l'efficacité du système catalytique. Dans la suite, la méthodologie sera appliquée à délivrer sélectivement une drogue anti-cancéreuse cagée à l'Alloc dans les cellules tumorales en hypoxie.



**Figure 129:** Décageage du profluorophore **126** en probe fluorescent Rhod110 par catalyse au palladium.

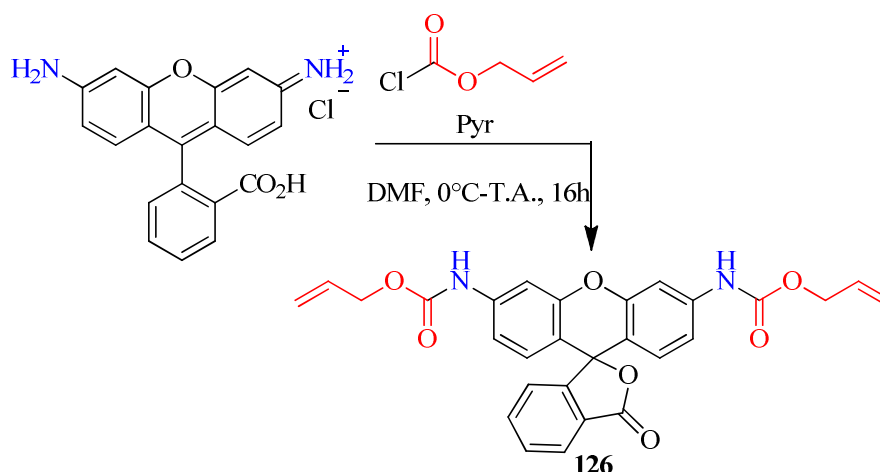
Comme démontré par les études précédentes, cette sonde **126** est pratiquement non-fluorescente jusqu'à sa conversion en **Rhodamine-110**, composé fortement fluorescent *via* le clivage du groupement protecteur Alloc (Figure 129).<sup>25</sup> Ce substrat fluorogénique permet de corrélér le rendement de la déprotection *via* l'intensité de la fluorescence produite, ce qui permet une approche facile pour l'évaluation de l'efficacité de la réaction *in vitro*. L'efficacité de l'élimination

catalysée par le complexe de palladium **319** sera évaluée systématiquement en analysant le retour de la fluorescence *in vitro* avant de passer dans les études sur des cellules tumorales. Contrairement au groupement protecteur de type propargyloxycarbonyl (Proc) qui peut être déprotégé par le palladium à tous ses étages d'oxydation, palladium (0), palladium (II) et palladium (IV), le groupement protecteur allyloxycarbonyl (Alloc) ne peut qu'être clivé par le palladium (0).<sup>28</sup> Ceci nous a menés à choisir l'Alloc comme groupement protecteur afin de s'assurer que c'est réellement le palladium (0) formé *in situ* qui assure la réaction catalytique et non pas le palladium (II) du précatalyseur de départ **319**.

## 2. Test en catalyse *in vitro*

### 2.1. Synthèse du modèle fluorogénique cagé

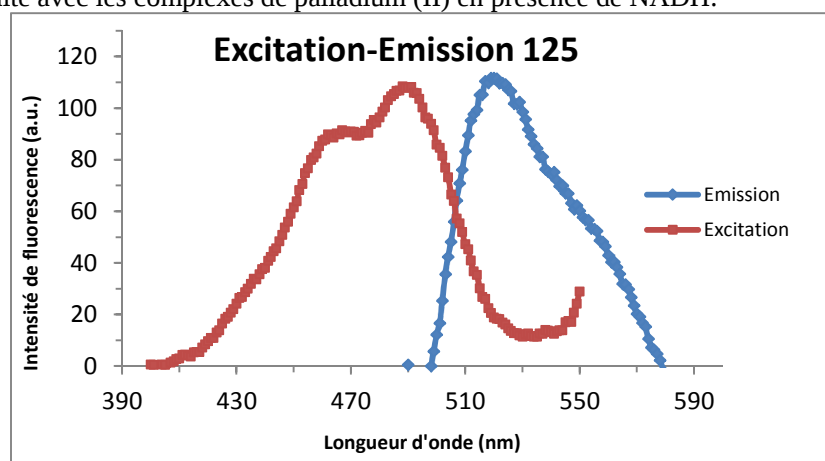
La synthèse du modèle **126** a été effectuée en reproduisant le mode opératoire décrit dans la littérature.<sup>25</sup> La Rhodamine-110 commerciale est traitée avec 2.5 équivalents de chloroformiate d'allyle dans la DMF à température ambiante pendant 16 heures. La Rhodamine bis-Alloc **126** est obtenue sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 50% (Figure 130).



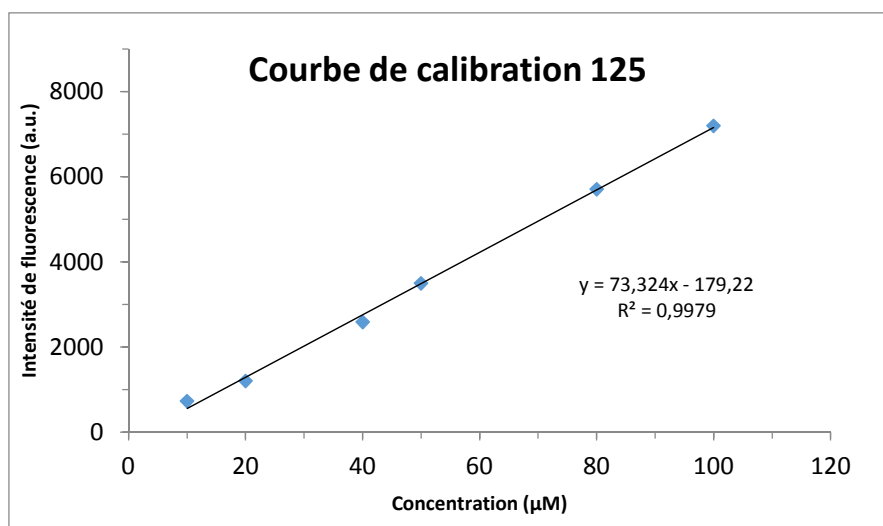
**Figure 130:** Protection de la Rhodamine-110 avec l'Alloc.

## 2.2. Etude du décaage par fluorescence en solution

Les spectres d'excitation-émission de la Rhodamine-110 commerciale sont représentés à la Figure 131. Une courbe de calibration a été réalisée sur la Rhodamine 110 commerciale (Figure 132), qui nous permettra de quantifier le retour de la fluorescence lorsque la Rhodamine 110 cagée à l'Alloc **126** sera traité avec les complexes de palladium (II) en présence de NADH.

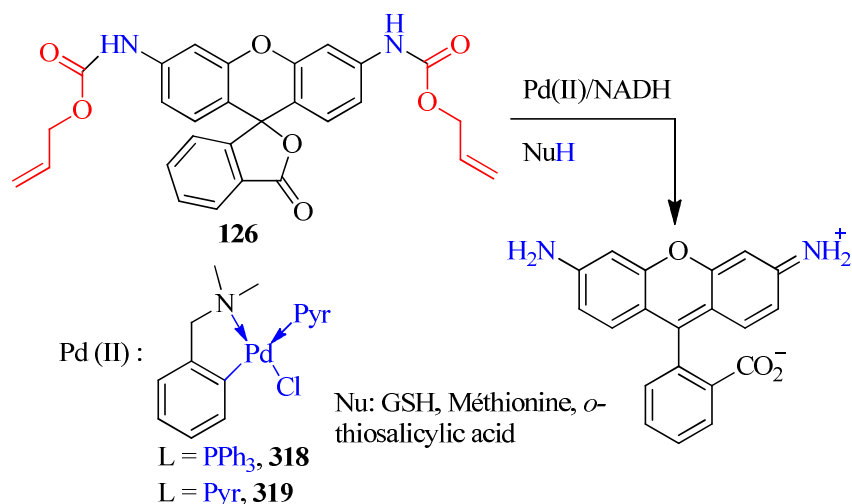


**Figure 131:** Spectres d'excitation-émission de la Rhodamine-110. Concentration : 1.5  $\mu$ M DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100.



**Figure 132:** Courbe de calibration réalisée à partir des solutions aqueuses DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100 de la Rhodamine 110 commerciale par excitation à 450 nm; et en enregistrant les émissions à 520 nm.

Avant de passer aux expériences *in cellulo*, il est alors important de vérifier d'abord par la fluorescence en solution s'il est possible de cliver le groupement Alloc par le palladium (0) généré *in situ* par réduction des precatalyseurs étudiés. Concrètement, il faut vérifier si les complexes de palladium **318** et **319** peuvent induire le retour de la fluorescence résultant de la libération de la Rhodamine libre 110 lorsqu'ils sont traités avec un réducteur tel que le NADH, en utilisant ou non un nucléophile capteur de  $\pi$ -allyle (Figure 133).

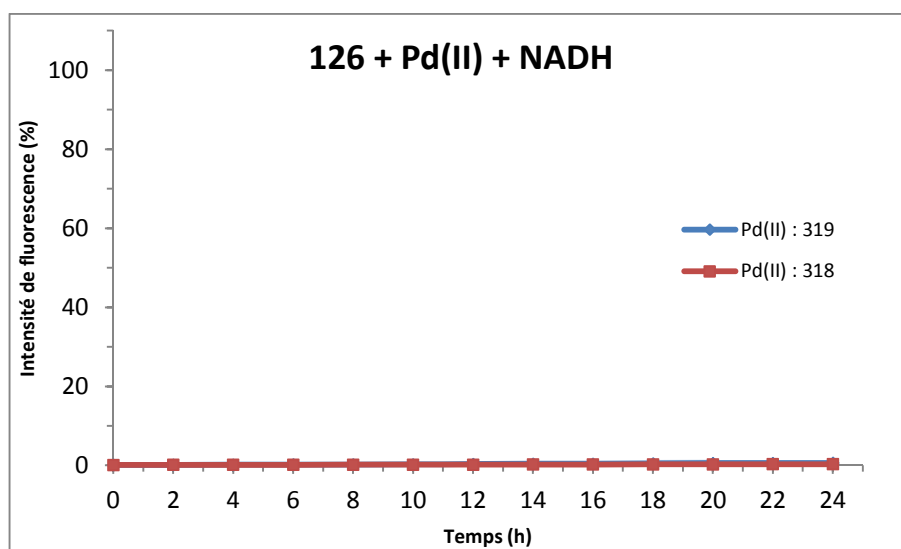


**Figure 133:** Décageage de la N-Rhodamine-Alloc **126** par les complexes de palladium (II) **318** et **319** activés par le NADH.

Pour ce faire, la Rhodamine 110 cagée à l'Alloc **126** en solution aqueuse DMSO 1% a été traitée avec des complexes de palladium **318** et **319** (0.1 équiv.) et un excès de NADH (50 équiv.). La réaction a été suivie par fluorescence par prélèvement d'aliquotes à partir du mélange réactionnel à des intervalles de temps réguliers et analyse de l'intensité de la fluorescence du mélange réactionnel par excitation à 450 nm. La concentration finale en pro-fluorophore **126** est de 45.4  $\mu\text{M}$ .

Dans un premier temps, la réaction a été effectuée sans ajout du nucléophile, capteur de  $\pi$ -allyle. Dans ces conditions, nous avons remarqué que la cinétique de la réaction est très lente et des maxima ne dépassant pas 1% seront alors atteints environ après 24 heures et 10% environ après 7 jours (Figure 134). Le milieu réactionnel, incolore au début de la réaction, commence à tourner au vert fluorescent après 3 jours, ce qui suppose dès lors, une déprotection de la Rhodamine-110. Cette première observation est en accord avec les études de Meggers, qui a remarqué pour la première fois que la déprotection métallo-catalysée de ce profluorophore **126** en milieu biologique nécessite un nucléophile, capteur de  $\pi$ -allyle.<sup>25</sup>

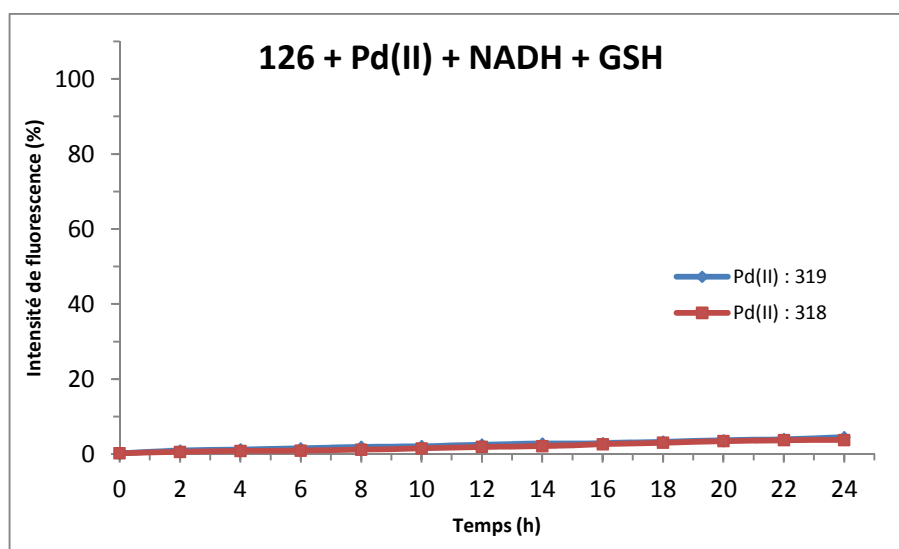
Pour une meilleure expression des résultats, les intensités de fluorescence mesurées sur l'appareil sont exprimées en pourcentage à l'aide de la courbe de calibration réalisée dans les mêmes conditions avec la Rhodamine-110.



**Figure 134:** Décaage de la Rhodamine N-Alloc **126** par les complexes de palladium (II) **318** et **319** (0.1 équiv.) activés par l'excès de NADH (50 équiv.) sous argon. Concentration : 45.4  $\mu$ M dans DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100, par excitation à  $\lambda_{\text{exc}}$  = 450 nm.

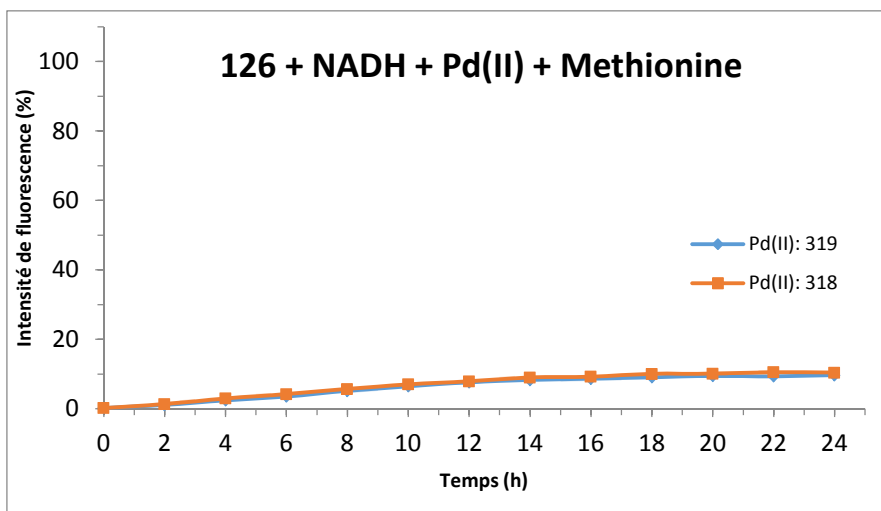
Au vu de cette dernière observation, il semble alors logique d'ajouter un nucléophile capteur de  $\pi$ -allyle pour tenter d'accélérer cette cinétique. Nous avons opté pour les nucléophiles soufrés qui sont habituellement utilisés dans ces genres de réaction de décaage.<sup>25,174</sup> Trois nucléophiles ont alors été utilisés : il s'agit du glutathion, la méthionine et l'acide thiosalicylique. Le thiophénol utilisé par Meggers dans des expériences similaires a été abandonné à cause de sa toxicité et sa mauvaise odeur.<sup>25</sup> L'ajout du nucléophile nous a permis d'obtenir des cinétiques accélérées par rapport au cas précédent. Cependant, la cinétique varie légèrement d'un nucléophile à l'autre pour ces trois exemples. Le premier nucléophile utilisé comme capteur de  $\pi$ -allyle est le

glutathion. Comparé au cas précédent, celui-ci accélère très modérément la réaction (Figure 135). Dans ces conditions, le maximum obtenu est d'environ 4% au bout de 24 heures et de 25 % environ après 7 jours.



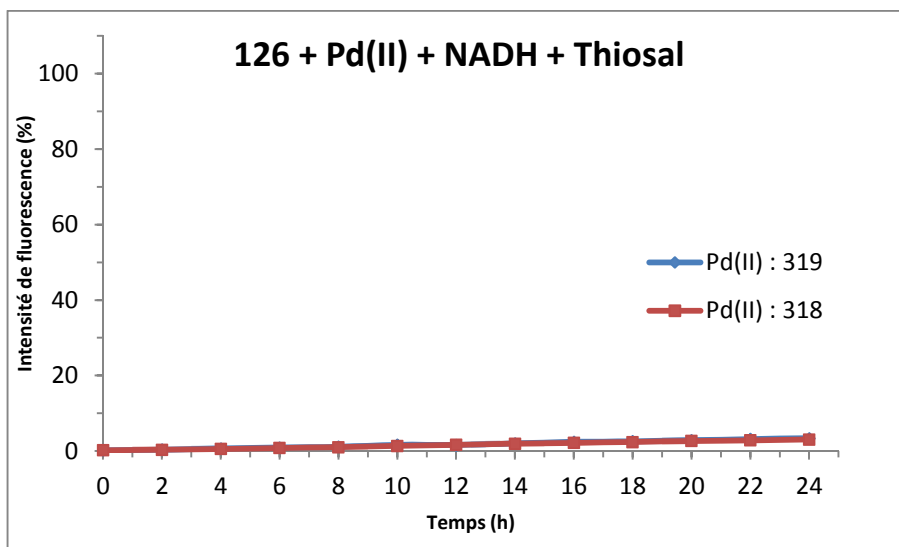
**Figure 135:** Décaageage de la N-Rhodamine-Alloc **126** par les complexes de palladium (II) **318** et **319** (0.1 équiv.) activés par l'excès de NADH (50 équiv.) sous argon en présence du glutathion (2.2 équiv.). Concentration : 45.4  $\mu\text{M}$  dans DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100, par excitation à  $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ .

Nous avons ensuite utilisé la méthionine qui donne des cinétiques un peu plus rapides qu'avec le glutathion avec des maxima d'environ 10% observés après 16 heures (Figure 136) et de 40% environ après 7 jours.



**Figure 136:** Décaageage de la N-Rhodamine-Alloc **126** par les complexes de palladium (II) **318** et **319** (0.1 équiv.) activés par l'excès de NADH (50 équiv.) sous argon en présence de la méthionine (2.2 équiv.). Concentration : 45.4  $\mu\text{M}$  dans  $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O} < 1/100$ , par excitation à  $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ .

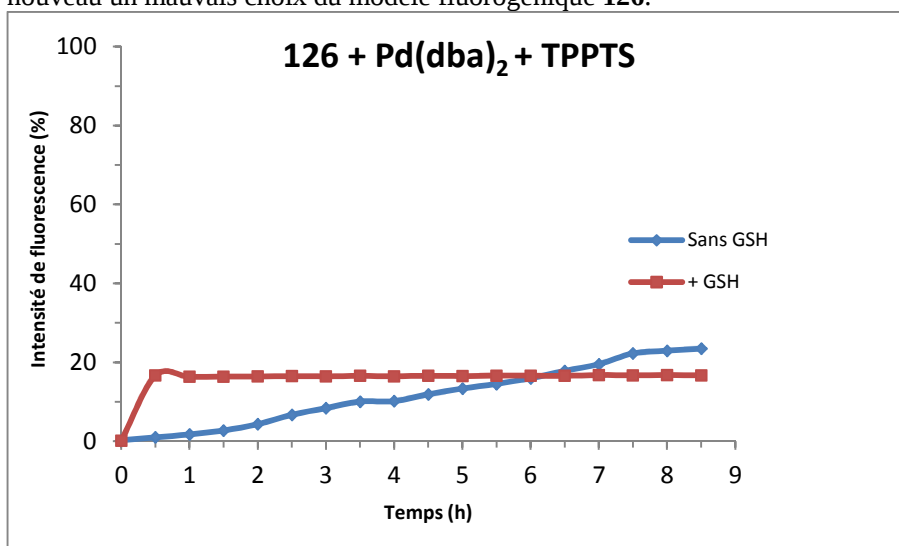
En dernier lieu, nous avons utilisé l'acide *o*-thiosalicylique. Ce dernier donne des résultats similaires à ceux obtenus avec le glutathion avec des maxima d'environ 4% après 24h (Figure 137) et 25% environ après 7 jours. L'acide thiosalicylique a été utilisé par Jean Pierre Genêt pour déprotéger les allylamines protégées à l'Alloc sous forme des carbamates avec du palladium (0).<sup>174</sup> Dans leurs travaux, ils ont trouvé qu'il est facile de déprotéger les allylamines secondaires pendant 15-30 minutes à température ambiante. Cependant les allylamines primaires ne sont déprotégés qu'en conditions fortes soit sous le chauffage de THF 50°C. Ils pouvaient alors réaliser une déprotection sélective. Ainsi, nous pouvons remarquer qu'il est possible de déprotéger la Rhodamine allylcarbamate *in cellulo*. Cependant, ce modèle catalytique n'étant pas efficace, nous ne pouvons pas affirmer ou nier une éventuelle possibilité de décaageage sélectif en milieu hypoxique recherché. De plus, nous remarquons à ce stade une activité catalytique similaire pour les deux precatalyseurs de palladium testés **318** et **319**.



**Figure 137:** Décaage de la N-Rhodamine-Alloc **126** par les complexes de palladium (II) **318** et **319** (0.1 équiv.) activés par l'excès de NADH (50 équiv.) sous argon en présence de l'acide thiosalicylique (2.2 équiv.) Concentration : 45.4  $\mu$ M dans DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100, par excitation à  $\lambda_{exc}$  = 450 nm.

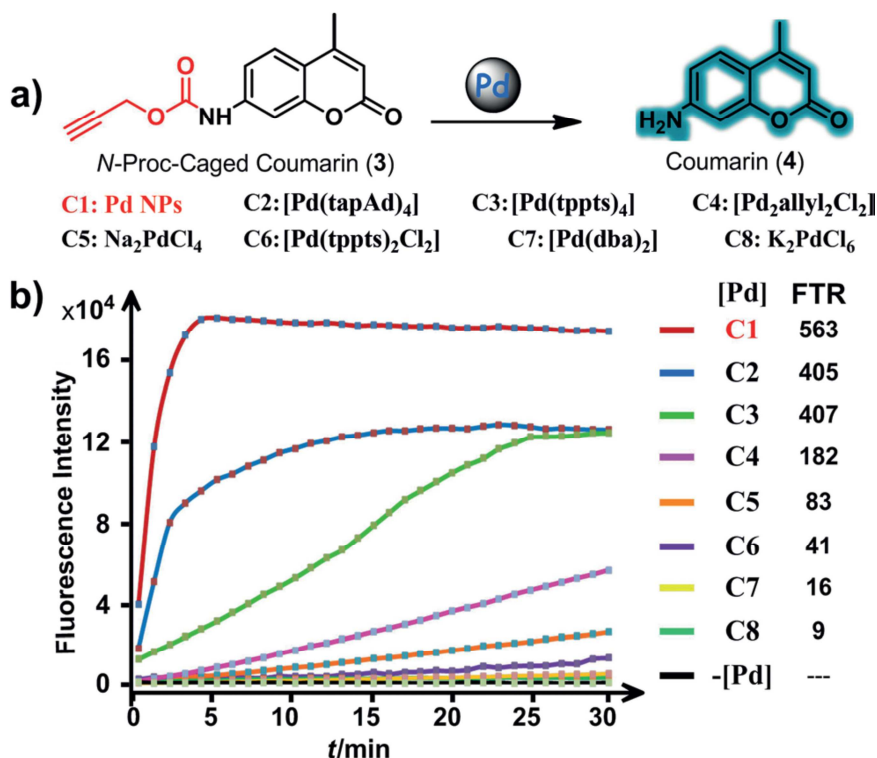
En conclusion, nous observons de très faibles conversions, inférieures à 10% après 24h, peu importe le type de nucléophile soufré utilisé. A ce stade, il est important de déterminer la cause des faibles conversions observées et si elles sont dues à une faible réduction des précatalyseurs de palladium (II) en palladium (0) ou bien à un système catalytique pas assez efficace sur le substrat. Pour vérifier cette hypothèse, les mêmes expériences ont été réalisées en utilisant une source de palladium (0), le Pd(dba)<sub>2</sub> commercial en présence du ligand phosphine la TPPTS hydrosoluble capable de stabiliser le palladium (0) en solution pendant la réaction de décaage (Figure 138). Dans ces dernières conditions, une faible intensité de fluorescence a également été observée et l'allure de la courbe de réaction varie selon que la réaction a été réalisée avec ou sans nucléophile, capteur de  $\pi$ -allyle. Cependant, dans tous les cas, le maximum ne dépassant pas environs 20% est observé après 8 heures. Jusque-là, nous

pouvons affirmer que la déallylation de la Rhodamine-110 cagée à l'Alloc est difficile. De plus, le palladacycle **318** a été synthétisé et utilisé dans la littérature dans la réaction de couplage de Heck et a donné des résultats satisfaisants (conversion, rendements, TOF) au bout de deux heures.<sup>144</sup> Ce complexe, qui a déjà fait preuve de son efficacité en catalyse aurait dû nous permettre d'obtenir des meilleures conversions. Cependant, cela n'a pas été le cas, ce qui montre de nouveau un mauvais choix du modèle fluorogénique **126**.



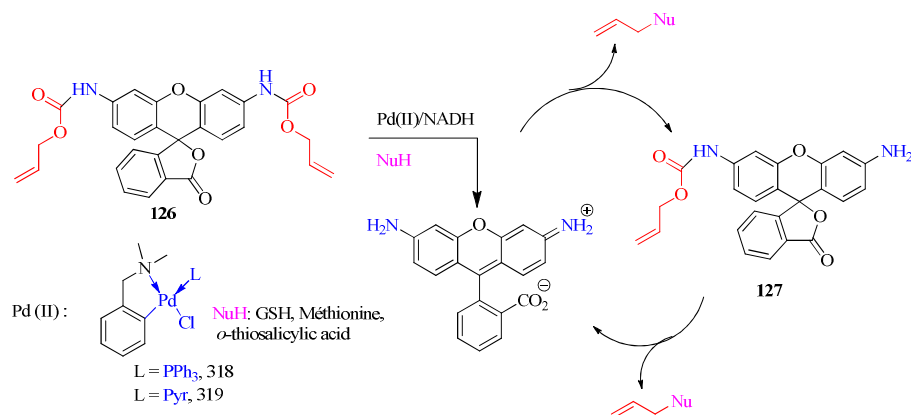
**Figure 138:** Décaageage de la N-Rhodamine-Alloc **126** par le  $\text{Pd}(\text{dba})_2$  (0.1 équiv.) en présence de TPPTS (1 équiv.) sous argon, avec ou sans glutathion (2.2 équiv.). Concentration : 45.4  $\mu\text{M}$  dans  $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O} < 1/100$ , par excitation à  $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ .

Notons que cette source de palladium (0), le  $\text{Pd}(\text{tppts})_4$  a été utilisée très récemment dans la littérature pour le décaageage de l'aminocoumarine cagée au propargyloxycarbonyl (Proc). Des cinétiques très rapides sont observées dans l'ordre des minutes, avec le maximum atteint après 30 minutes (Figure 139).<sup>175</sup> Cependant, ces résultats de la littérature sont exprimés en facteur d'augmentation de la fluorescence et non en % de réapparition de la fluorescence par rapport à la valeur obtenue dans le cas d'une réapparition totale de la fluorescence.



**Figure 139:** Décageage de la proc-amino coumariné par différentes sources de palladium.<sup>175</sup>

Nous avons en fait réalisé à ce stade que le système choisi n'était pas adéquat pour une quantification stricte et une évaluation des vitesses de déprotection. Le dérivé **126** est bis-protégé et la réaction attendue est donc une double déprotection passant par le dérivé mono-alloc **127**. Si la double réaction est assez lente, le principal composé qui va être généré est le dérivé **127** (Figure 140). Hors, la quantification est basée sur la calibration de la rhodamine libre et nous ne connaissons pas l'efficacité d'émission du composé **127** (celui-ci pourrait être beaucoup plus faible que celui de la rhodamine). Nous avons donc deux solutions : préparer le composé **127** et étudier ses propriétés de fluorescence ou travailler sur un fluorophore mono-protégé.<sup>175</sup> Aux vues de résultats récents de la littérature, nous avons décidé de nous orienter vers cette seconde solution.



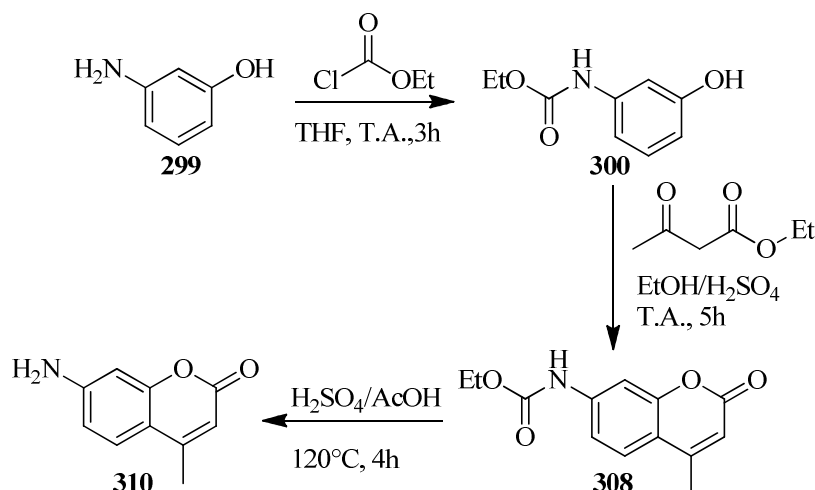
**Figure 140:** Hypothèse de décadeage organométallique partielle de la *N*-bis allyl rhodamine 126 par le palladium.

À la suite des faibles rendements de décadeage observés dans cette étude même en utilisant une source de palladium (0), nous pourrions supposer à présent que ces faibles conversions ne peuvent pas être imputées au système catalytique mis en place mais plutôt du modèle fluorophore utilisé **126**. Cette hypothèse sera vérifiée dans la suite en variant le fluorophore.

### 2.3. Changement du modèle fluorogénique cagé

Un second modèle de fluorophore protégé a donc été envisagé et nous avons sélectionné une coumarine cagée qui a pu être testé dans les mêmes conditions que précédemment. Pendant que nous étions en train de réaliser ces tests, le même modèle a été utilisé indépendamment par une autre équipe pour le criblage de catalyseurs de palladium capables de cliver un groupement protecteur labile, Alloc ou Poc (propargyloxy carbonyl) dans un milieu biologique typique.<sup>173,175</sup>

#### 2.3.1. Synthèse du modèle fluorogénique

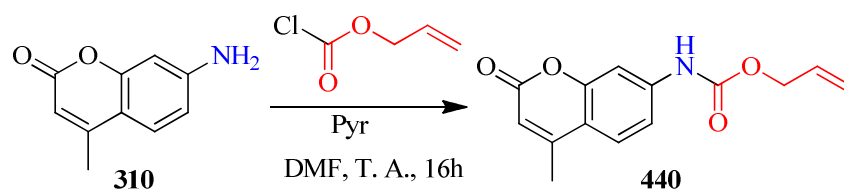


**Figure 141:** Synthèse de l'aminocoumarine **310**.<sup>176</sup>

Le fluorophore **310** a été obtenu selon la méthodologie développée dans la littérature (Figure 141).<sup>176</sup> Dans un premier temps, l'aminophénol **299** est protégé par le chloroformate d'éthyle dans le THF à température ambiante. Le carbamate **300** est obtenu avec un rendement de 79% après 3 heures. Il est ensuite cyclisé par une condensation de Pechmann en coumarine correspondant **308** au moyen d'acétoacétate d'éthyle et d'acide sulfurique à 70% dans l'éthanol. Le dérivé coumarine correspondant **308** est isolé avec un rendement

de 73% après 5 heures. Le composé **308** est ensuite déprotégé pour pouvoir introduire la fonction allyle carbamate, permettant d'obtenir le modèle fluorogénique d'intérêt. La déprotection se fait en conditions fortement acides au moyen de l'acide sulfurique dans l'acide acétique à 120°C pendant 4 h. L'aminocoumarine **310** légèrement soluble dans l'eau est alors isolée avec un rendement de 75%.

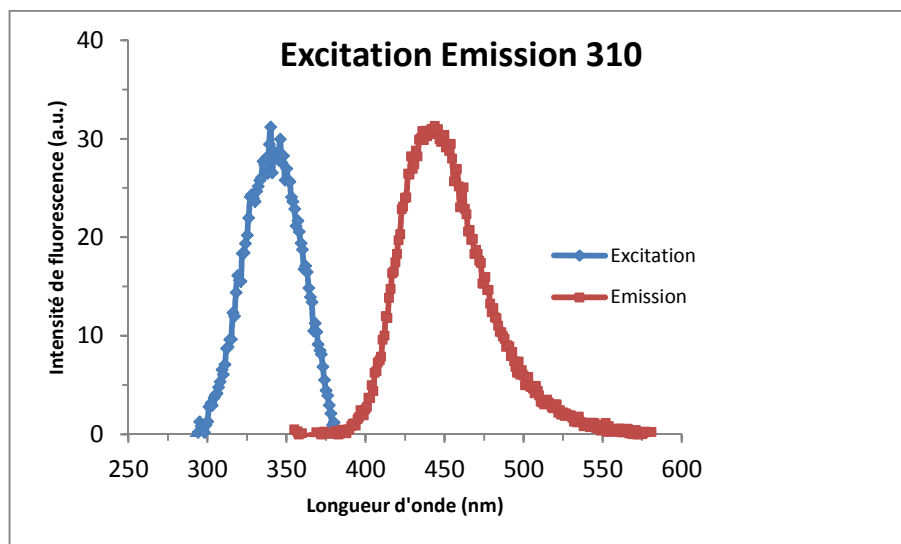
L'introduction de l'Alloc sur la coumarine **310** par le chloroformiate d'allyle a été réalisée dans du diméthylformamide, ce qui nous a permis d'isoler le produit **440** avec un rendement de 95% après 16 heures à température ambiante (Figure 142).



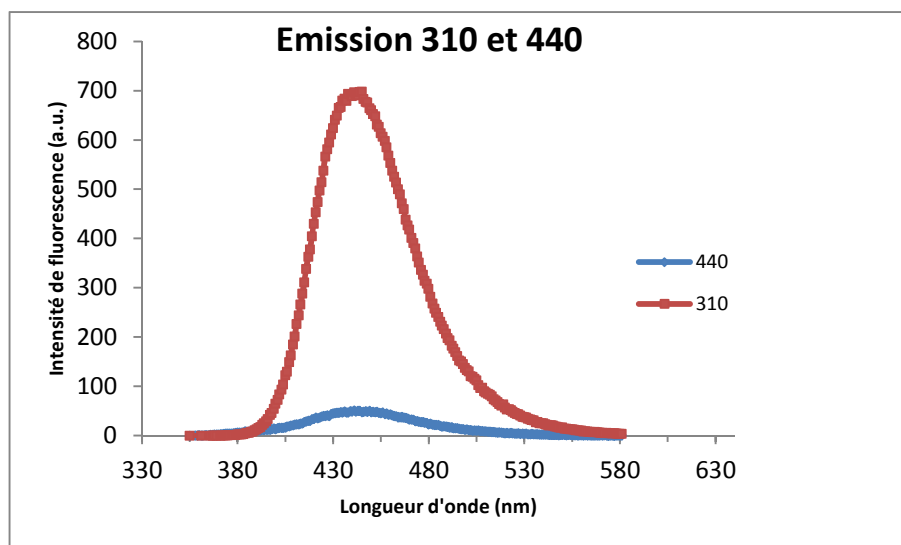
**Figure 142:** Protection de l'amino-coumarine sous forme d'allylcarbamate **440**.

### 2.3.2. Etude de décaageage par fluorescence en solution

La Figure 143 présente les spectres d'excitation-émission du fluorophore **310**. Contrairement au cas précédent, les deux produits **310** et **440** devraient nous permettre de suivre la réduction des palladacycles par le NADH. Les spectres d'émission à 450 nm, réalisées par excitation à 345 nm, montrent que l'aminocoumarine protégée **440** est faiblement fluorescente par rapport à la amino-coumarine libre **310** (Figure 144). Au départ de cette information, il est donc possible de suivre par spectroscopie de fluorescence en solution la déallylation du produit **440** par excitation à 345 nm et en observant l'émission vers 450 nm.



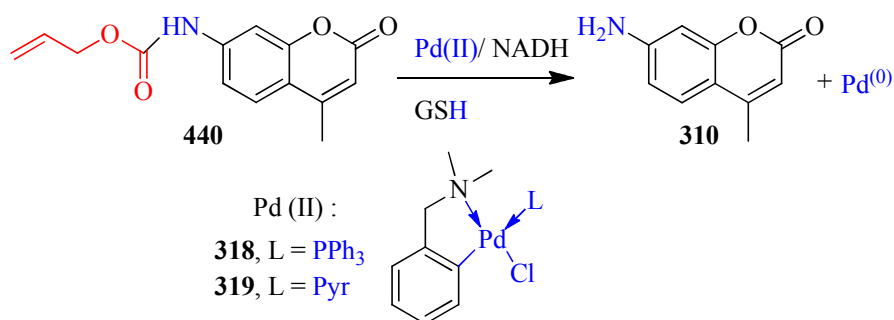
**Figure 143:** Spectre d'excitation-Emission du composé **310** à 1  $\mu\text{M}$  dans DMSO/H<sub>2</sub>O : 1/99.



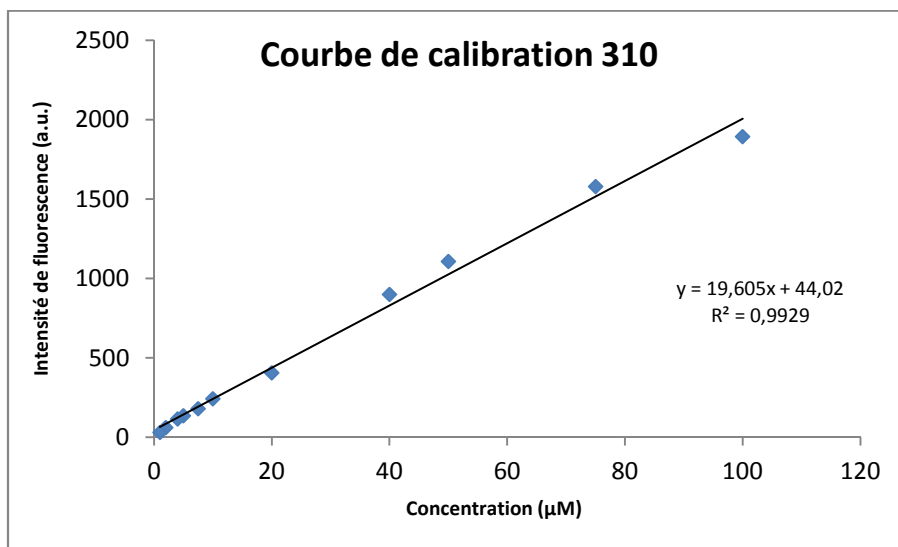
**Figure 144:** Spectre d'émission en fluorescence ( $\lambda_{\text{exc}} = 345 \text{ nm}$ ) des coumarines **310** et **440** dans le DMSO/H<sub>2</sub>O : 1/99, 40  $\mu\text{M}$ .

### 2.3.2.1. Décageage sans ajout du nucléophile capteur de $\pi$ -allyle

Comme précédemment, l'alloc-amino coumarine **440** cagée à l'Alloc en solution aqueuse (DMSO/H<sub>2</sub>O:1/99) 45  $\mu$ M a été traitée par une source de palladium **318** ou **319** (0.1 équivalent) en présence d'un excès d'une solution aqueuse de NADH (50 équivalents). Les solutions ont été dégazées et la réaction a été suivie par mesure de la fluorescence de l'alloc-amino coumarine **310** libérée pendant 8 heures (Figure 145). Une courbe de calibration a été également réalisée tout comme pour la Rhodamine 110 au moyen du fluorophore non protégé **310** (Figure 146).

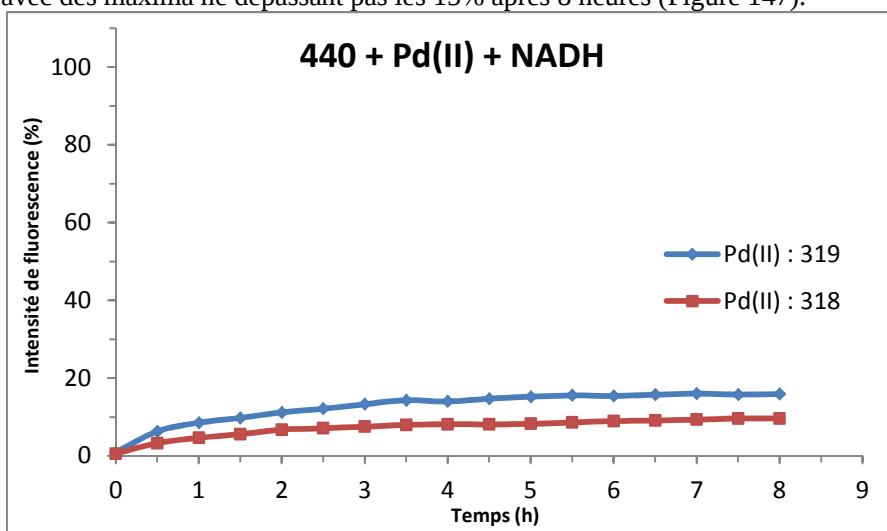


**Figure 145:** Décageage de l'Alloc-amino coumarine **440** par les palladacycles **318** et **319**.



**Figure 146:** Courbe de calibration pour l'aminocoumarine **310** en solution DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/99. Excitation ( $\lambda_{\text{exc}} = 345 \text{ nm}$ ), émission ( $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$ ).

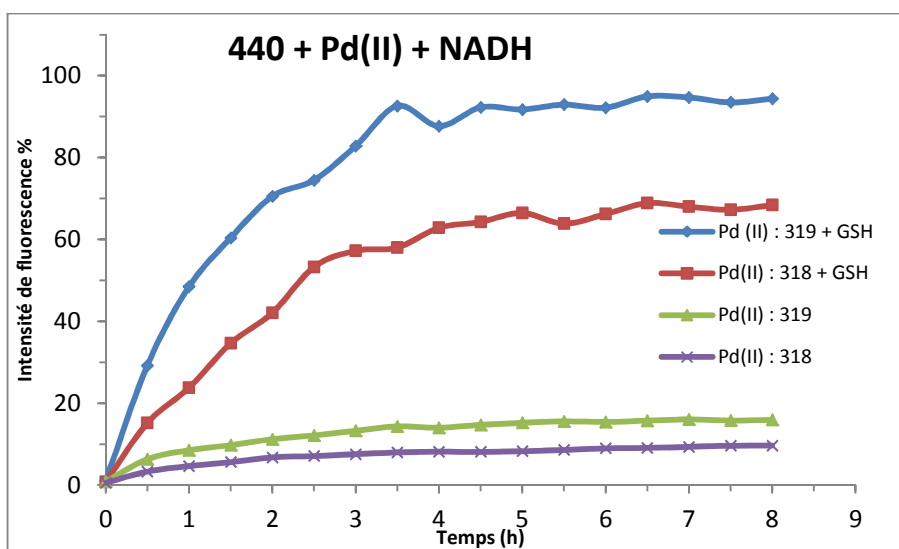
De nouveau, une cinétique lente et de très faibles conversions ont été observées, avec des maxima ne dépassant pas les 15% après 8 heures (Figure 147).



**Figure 147:** Décageage de la *N*-aminocoumarine-Alloc **440** par les palladacycles **318** et **319** activés par l'excès de NADH (50 équiv.). Concentration: 45.4  $\mu\text{M}$  dans DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100, par excitation à  $\lambda_{\text{exc}} = 345 \text{ nm}$ .

### 2.3.2.2. Décageage en présence du nucléophile capteur de $\pi$ -allyle

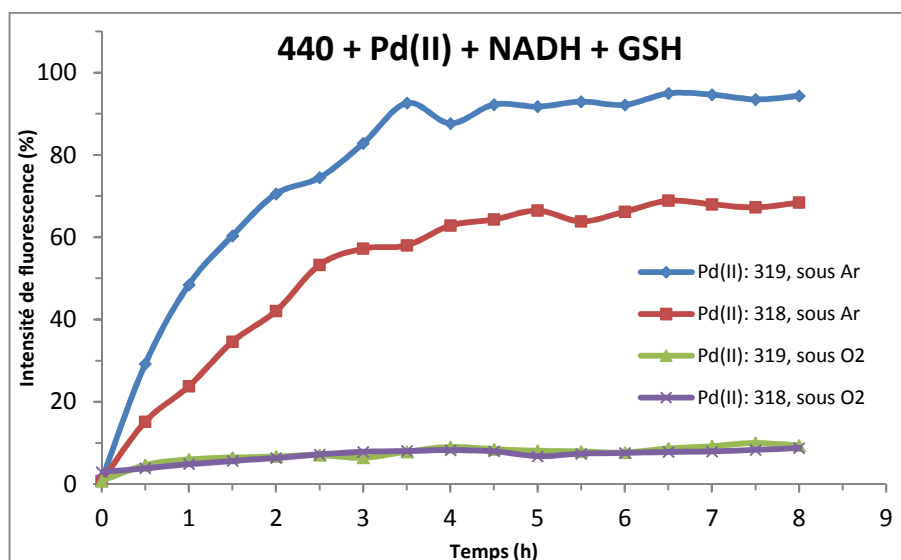
Le décageage étant lent, nous avons décidé d'utiliser des nucléophiles capteurs de  $\pi$ -allyle. Dans un premier temps, du glutathion (1.2 équiv. par rapport à la *N*-aminocoumarine-Alloc **440**) a été employé. Les solutions ont toujours été bien dégazées comme précédemment avec plusieurs cycles vide-argon. Dans ces dernières conditions, des maxima de fluorescence d'environ 65% et 95% ont été observés au bout de 4 heures pour les précatalyseurs **318** et **319** respectivement (Figure 148). Il est clair que l'ajout du nucléophile est bénéfique.



**Figure 148:** Décageage de la *N*-aminocoumarine-**440** par les palladacycles **318** et **319** activés par l'excès de NADH (50 équiv.) avec ou sans glutathion (1.2 équiv.). Concentration: 45.4  $\mu$ M dans DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100, par excitation à  $\lambda_{\text{exc}} = 345$  nm.

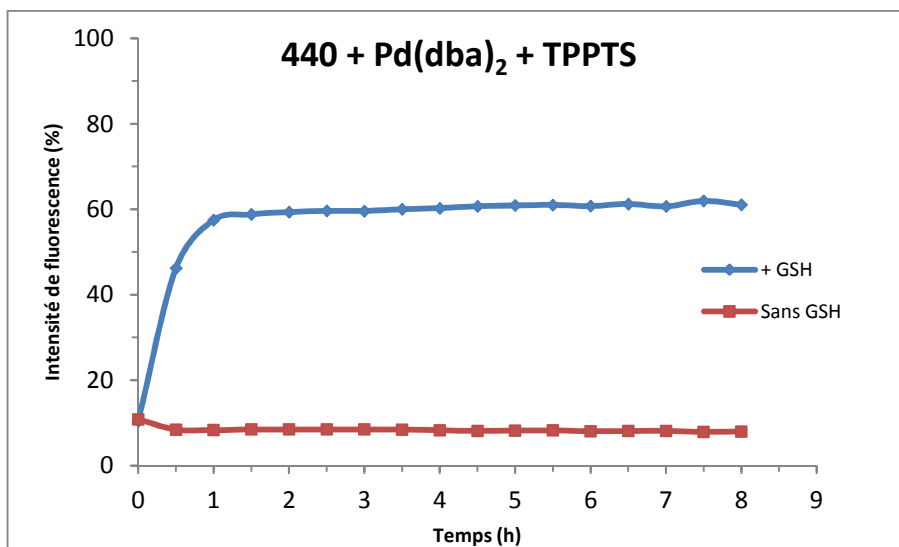
**2.3.2.3. Influence de l'oxygène sur la cinétique de décadeage du fluorophore**

Dans le but d'évaluer l'influence de l'oxygène sur le décadeage de la *N*-aminocoumarine-Alloc **440**, les expériences précédentes ont été reprises sous oxygène. Concrètement, le produit **440** a été traité par 0.1 équivalent du précatalyseur de palladium (II) **318** ou **319** et le NADH (50 équivalent) en présence du glutathion (1.2 équivalent) précédemment utilisé comme capteur de  $\pi$ -allyle. Le décadeage a été suivi par fluorescence à des intervalles de temps régulier. Sans surprise, une très faible et lente cinétique de décadeage a été observée par rapport au cas précédent. Le retour de la fluorescence est d'environ 5% dans les deux cas. Ceci indique très clairement que l'oxygène a une influence notable et laisse présumer une sélectivité pour l'hypoxie tumorale dans les manipulations *in cellulo*. Cependant, comme nous pouvons le remarquer sur la Figure 149, les deux complexes **318** et **319** ont montré une activité catalytique fort similaire. Des temps de réactions prolongés, allant jusqu'à 24 heures, n'ont pas apporté d'amélioration, cependant une certaine fluctuation a été observée avec les deux complexes.



**Figure 149:** Décageage la *N*-aminocoumarine-Alloc **440** par les palladacycles **318** et **319** activés par l'excès de NADH (50 équiv.) avec le glutathion (1.2 équiv.). Concentration: 45.4  $\mu\text{M}$  dans DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100, par excitation à  $\lambda_{\text{exc}} = 345 \text{ nm}$ .

Cette fluctuation de l'intensité de la fluorescence pourrait provenir de la désactivation du catalyseur en milieu suffisamment oxygéné par réoxydation du palladium (0) formé *in situ* en palladium (II).



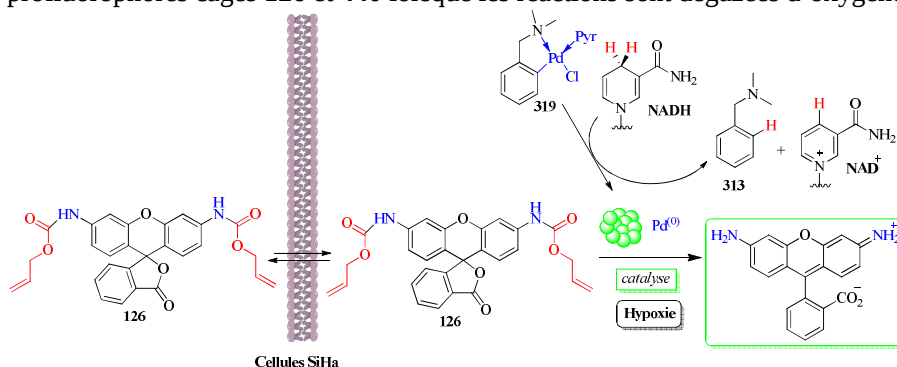
**Figure 150:** Décageage de la *N*-aminocoumarine **440** par le Pd(dba)<sub>2</sub> (0.1 équiv.) en présence de TPPTS (2 équiv.); avec ou sans glutathion. Concentration: 45.4 μM dans DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100, par excitation à λ<sub>exc</sub> = 345 nm.

Dans le but de comparer l'activité catalytique de ces précatalyseurs, nous avons utilisé une autre source de palladium (0), le Pd(dba)<sub>2</sub> stabilisé par la TPPTS pour le décageage de la *N*-aminocoumarine-Alloc **440** dans les mêmes conditions que pour les complexes **318** et **319** (Figure 150). Nous pouvons directement remarquer un effet d'accélération avec un maximum de fluorescence de 60% obtenu en une heure. A part cette observation, nous remarquons également que la réaction s'arrête directement. De plus, une source externe de nucléophile est nécessaire pour une cinétique plus rapide. Les résultats obtenus avec cette source de palladium (0) sont similaires avec ceux obtenus avec les précatalyseurs testés ici qui sont les complexes **318** et **319**. De plus ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans la littérature lorsque ce catalyseur est utilisé pour le décageage de la *N*-aminocoumarine-Proc.<sup>175</sup> Des cinétiques rapides ont été obtenues et un arrêt a été observé directement après une heure.

### 3. Applications en catalyse *in cellulo*

#### 3.1. Décageage du fluorophore<sup>3</sup>

Les résultats précédents nous ont encouragés à utiliser ces palladacycles dans des réactions de catalyse *in cellulo*. Notre but ultime est de faire la réaction de décageage d'un fluorophore cagé par les complexes de palladium (II) réduits *in situ* en palladium (0) par le NADH présent dans les cellules tumorales. Nos investigations *in cellulo* des prodrogues cagées commenceront par l'activation du profluorophore **126**, qui induira un signal de fluorescence facile à suivre en microscopie, avant de passer à l'emploi d'une drogue. Dans la série des manipulations en conditions biologiques décrites précédemment, nous avons remarqué que le complexe de palladium (II) avec le ligand pyridine **190** était le plus sélectif et le plus efficace. Son analogue simple **319** a été sélectionné et il sera utilisé dans cette réaction de décageage *in cellulo*. Rappelons également que le complexe **319** a montré une meilleure sélectivité de décageage des profluorophores cagés **126** et **440** lorsque les réactions sont dégazées d'oxygène.



**Figure 151:** Décageage *in cellulo* d'un fluorophore cagé.

<sup>3</sup> Manipulations réalisées par Laurene PETIT

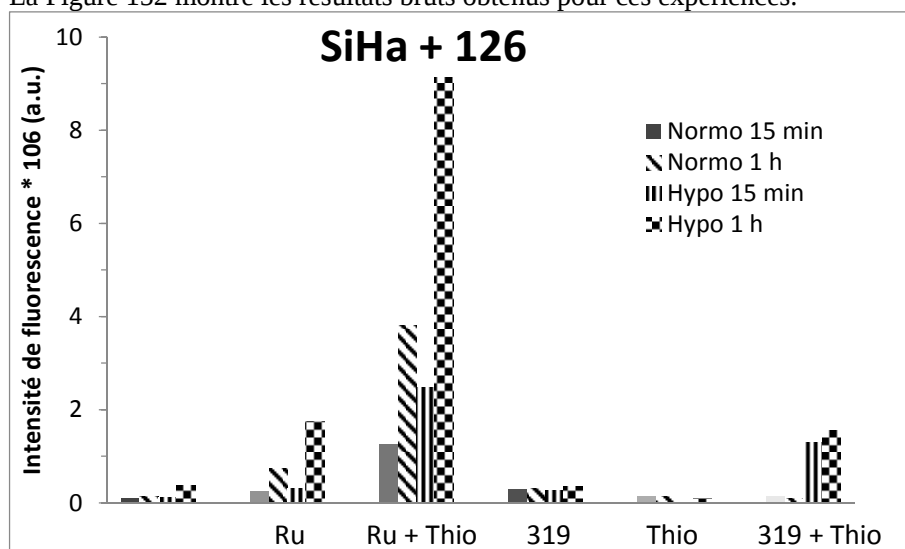
Ces expériences ont été réalisées sur des cellules de cancer du col de l'utérus disponibles au laboratoire au moment du test. Comme la plupart des cellules cancéreuses, les cellules SiHa présentent des taux élevés de NADH aptes à réduire facilement le complexe de palladium (II) **319** en palladium (0). Ces réactions sont illustrées à la Figure 151.

### 3.1.1. Principe de décageage

Les cellules SiHa ont été laissées mises en culture et incubées avec la Rhodamine-Alloc **126** (5  $\mu$ L, 20 mM) pendant 30 minutes. Ensuite, le milieu de culture cellulaire a été aspiré et les cellules lavées abondamment avec une solution tampon phosphate saline (PBS) pour éliminer le produit cagé **126** non internalisé. Le complexe de palladium **319** (4  $\mu$ L, 5 mM) dilué dans le milieu de culture cellulaire frais a ensuite été ajouté ainsi que l'**acide thiosalicylique** (10  $\mu$ L, 100 mM). Les cellules ont ensuite été incubées en normoxie et en hypoxie. L'internalisation du complexe de palladium (II) suivi de sa bio-réduction dans les cellules cancéreuses SiHa devraient induire l'augmentation de l'intensité de la fluorescence là où la sonde fluorogénique cagée (**126**) est présente. Dans un premier temps, ce retour de la fluorescence a été suivie à l'aide du Spectramax et dans un second temps par microscopie pseudoconfocale à fluorescence.

### 3.1.2. Résultats obtenus

La Figure 152 montre les résultats bruts obtenus pour ces expériences.



**Figure 152:** Histogramme montrant l'intensité de fluorescence mesurée lorsque les cellules SiHa sont incubées avec (de gauche à droite) a) le fluorogène **126** seul ou en combinaison b) avec le RuCp\*(COD)Cl, c) avec le RuCp\*(COD)Cl et l'acide orthothiosalicylique, d) avec le palladacycle **319**, e) avec l'acide orthothiosalicylique, f) avec le palladacycle **319** et l'acide thiosalicylique. Deux temps d'incubation, 15 min et 1h ont été considérés, et ce en normoxie et en hypoxie.

Afin de nous assurer de la bioactivation par catalyse au palladium, les expériences de contrôles négatifs ont été réalisées :

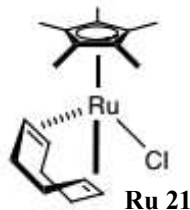
- Premièrement, les cellules SiHa ont été incubées avec le fluorophore cagé **126** seul. Comme attendu, aucune réapparition de fluorescence n'a été observée que ce soit en normoxie ou en hypoxie.
- Deuxièmement, l'incubation des cellules SiHa en combinaison avec le profluorophore **126** et le complexe de palladium **319** n'a pas donné lieu à une réapparition de la fluorescence. Pour un décageage efficace, il

apparaît donc nécessaire d'ajouter le nucléophile capteur de  $\pi$ -allyle.

- Enfin, l'incubation des cellules SiHa avec le profluorophore **126** et le nucléophile seul, l'acide thiosalicylique n'a pas donné lieu à un signal de fluorescence. Ces trois premières observations sont en parfait accord avec les résultats des travaux similaires antérieurs réalisés par d'autres auteurs.<sup>25,27</sup>

Pour les expériences de contrôle positif, nous avons utilisé le complexe de ruthénium décrit par Eric Meggers en 2006 pour le décageage de ce même profluorophore.

- Les contrôles positifs ont donc été l'incubation du profluorophore **126** avec le complexe de ruthénium **21**  $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{COD})\text{Cl}$  repris à la Figure 153 utilisé par Meggers pour le décageage du profluorophore **126** dans les cellules HeLa.<sup>25</sup> Cette expérience n'a pas montré non plus le retour de la fluorescence. Cependant, l'incubation du produit cagé **126** en combinaison avec ce catalyseur de Ru et l'acide thiosalicylique a montré une forte augmentation du signal de fluorescence .

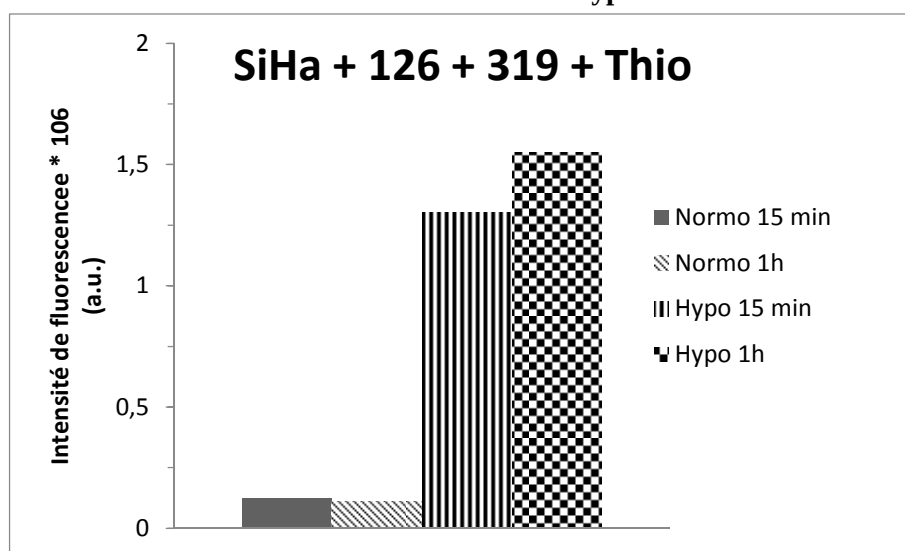


**Figure 153:** Complexe de ruthénium **21** utilisé pour les expériences de contrôle positif du décageage du profluorophore **126** dans les cellules SiHa.

L'expérience proprement dite a quant à elle consisté en l'incubation des cellules SiHa en présence du profluorophore **126**, du précatalyseur de palladium **319** et de l'**acide o-thiosalicylique**. Un retour de la fluorescence a été observé seulement dans les cellules incubées dans la chambre à hypoxie. Comme nous l'avons montré sur les études de fluorescence en solution, également en accord avec les résultats publiés par d'autres auteurs, nous avons remarqué que l'ajout

d'un nucléophile soufré, l'acide *o*-thiosalicylique capteur de  $\pi$ -allyle est bénéfique pour un décaageage efficace.<sup>25,177</sup> Ceci confirme donc que la fluorescence observée après 15 minutes d'incubation provient seulement d'un décaageage organométallique catalysé par le palladium (0) formé *in situ* par bioréduction du précatalyseur de palladium(II) **319**. De plus, ces premières observations ont permis de constater que ces complexes de palladium traversent aisément la membrane cellulaire et s'internalisent dans le cytoplasme, pour catalyser la réaction de déallylation.

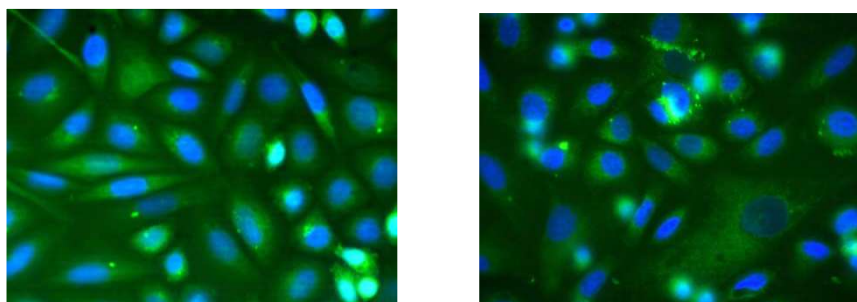
### 3.1.3. Sélectivité normoxie-hypoxie



**Figure 154:** Sélectivité hypoxie vs normoxie du profluorophore **126** incubé dans les cellules SiHa en combinaison avec le palladacycle **319** et l'acide *o*-thiosalicylique pendant 15 minutes et 1 heure.

Après avoir montré que cette déallylation était possible par le biais de la catalyse au palladium (0) réduit *in situ* au départ du précatalyseur de palladium (II) **319**, notre second objectif a été de réaliser cette réaction sélectivement dans les cellules tumorales en hypoxie. Ainsi, nous avons remarqué une sélectivité vis-à-

vis de l'hypoxie de ce système organométallique. Comme nous pouvons le remarquer sur la Figure 154, la sélectivité vis-à-vis de hypoxie est d'environ 10 fois par rapport à la normoxie après 15 min (soit  $1303008/126983 = 10$  fois). Après 1 heure, elle est d'environ 14 fois (soit :  $1551868/110870 = 14$  fois). Le rapport d'intensité de la fluorescence hypoxie/normoxie étant élevé, ceci nous indique que le complexe de palladium 319 est réduit sélectivement en hypoxie. Des photos de cellules SiHa sont présentées à la Figure 155 : l'accumulation du fluorophore décafé est cytosolique comme celle de la rhodamine-110. La Figure 154 montre également que le catalyseur de ruthénium  $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{COD})\text{Cl}$  utilisé par Eric Meggers, qui nous a servi de contrôle positif, bien qu'il induise un retour de la fluorescence, est significativement moins sélectif des conditions hypoxiques ; les ratios de sélectivité s'élèvent à 1.96 après 15 minutes (soit  $2487068/1265586$ ) et de 2.4 après 1 heure (soit :  $9147733/3802230$ ).



**Figure 155:** Images capturées au microscope pseudoconfocal dans les cellules SiHa, après une heure d'incubation en hypoxie. A gauche, Rhodamine-110, à droite **126 + 319 + acide *o*-thiosalicylique**.

#### 3.1.4. Conclusion

Deux objectifs ont été atteints. La bioactivation du précatalyseur de palladium **319** et la bioactivation sélective du profluorophore **126** en hypoxie ont été réalisées avec succès. Ces résultats sont les premiers à montrer la bioactivation sélective d'un fluorophore cagé par le biais de la catalyse organométallique en conditions hypoxiques dans des cellules cancéreuses. Comme la bioorthogonalité de ce groupement Alloc est déjà connue, l'incubation d'une drogue anticancéreuse cagée sous forme de *N*-carbamate–Alloc en combinaison avec le précatalyseur **319** serviront de système biocompatible pour libérer sélectivement la drogue dans les cellules cancéreuses en hypoxie.

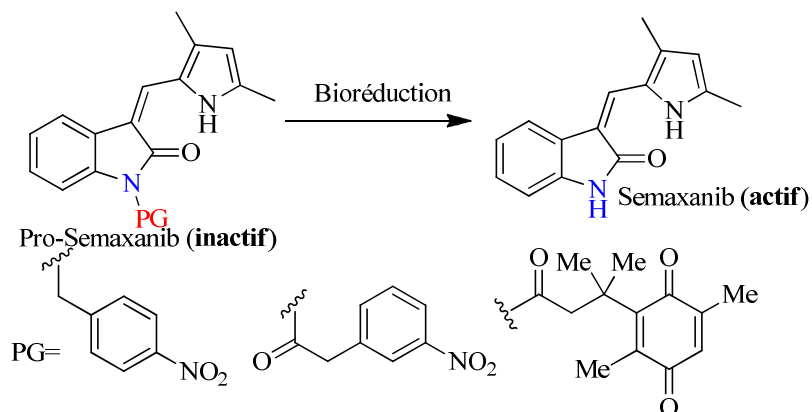
### 3.2. Décageage du prodrogue

#### 3.2.1. Introduction

Pour montrer la potentialité de ce système organométallique bioorthogonal dans des applications de *drug delivery*, nous nous sommes intéressés au catalyseur **319** pour décager un système allylcarbamate au service d'une chimiothérapie. Même si les thérapies ciblées anticancéreuses de nouvelle génération ont été initialement développées pour être plus sélectives que les chimiothérapies conventionnelles, ces médicaments restent sujets à de nombreux effets secondaires liés à des interactions (spécifiques ou non) avec des voies signalétiques des tissus sains. L'activation spatiale et temporelle de ces thérapies ciblées modifiées en prodrogues dans les tissus cancéreux reste donc une stratégie attractive pour limiter leur toxicité. Sur base des résultats obtenus précédemment pour l'activation pallado-catalysée *in vitro* du profluorophore **126** dérivé de la Rhodamine 110, l'activation catalytique d'un agent anticancéreux dans les tumeurs en tirant avantage de l'hypoxie environnante est envisageable au moyen du complexe de palladium **319**.

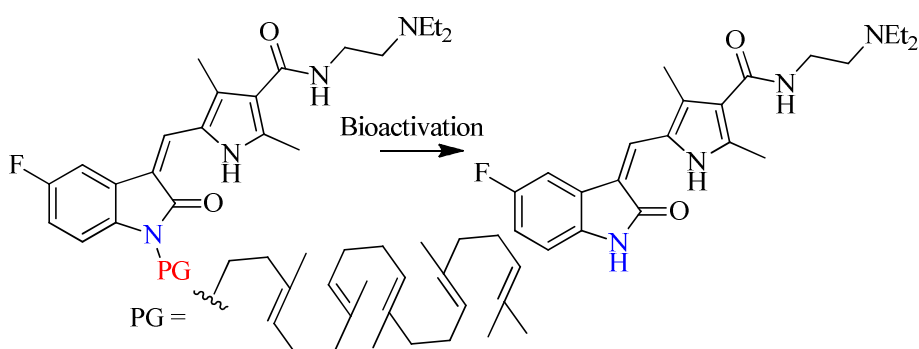
La drogue sélectionnée pour cette preuve de principe est le Sunitinib qui est un inhibiteur des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF). Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) est surexprimé en réponse à l'hypoxie par la plupart des cellules cancéreuses de façon à stimuler l'angiogenèse.<sup>178</sup> En se liant à son récepteur (principalement le VEGFR2) à la surface des cellules endothéliales, le VEGF stimule la prolifération et la migration de ces cellules qui s'organisent pour former de nouveaux vaisseaux sanguins.<sup>179,180</sup> Le sunitinib (comme d'autres inhibiteurs de type oxindole) en bloquant l'activité tyrosine kinase du récepteur VEGFR2 bloque dès lors les effets angiogéniques du VEGF.

Le VEGF n'est toutefois pas aussi spécifique de l'angiogenèse tumorale comme initialement proposé. Le VEGF est nécessaire à l'homéostasie vasculaire dans de nombreux tissus sains et il n'est donc pas étonnant que l'usage du sunitinib soit associé à des toxicités cutanées sévères<sup>181</sup>, hématotoxicité<sup>182</sup> et cardiotoxicité.<sup>183</sup> Des investigateurs ont dès lors développé des prodrogues des oxindoles antiangiogéniques afin de réduire ces effets secondaires. De façon générale, la fonctionnalisation des oxindoles sur leur atome d'azote bloque l'activité pharmacologique de ces composés.<sup>184,185</sup> Il a été décrit par exemple que les propriétés antiangiogéniques du Semaxanib sont bloquées en introduisant des groupements benzyle ou acyle sur l'atome d'azote de l'indole. En conditions réductrices cellulaires, le groupement protecteur peut être clivé par fragmentation réductrice et les propriétés du Semaxanib sont alors rétablies (Figure 156).<sup>185</sup>



**Figure 156:** Bioactivation du Semaxanib cagé avec des groupements protecteurs nitro.<sup>185</sup>

Par une méthodologie similaire, le Sunitinib a été récemment modifié en introduisant sur l'atome d'azote de l'oxindole des groupements protecteurs de type squalenyles exploités comme nanotransporteurs.<sup>186</sup> Cette modification inactive le Sunitinib et favorise la formation de micelles délivrées préférentiellement dans les tumeurs (en raison de la plus grande perméabilité vasculaire). L'internalisation de l'assemblage est suivie d'un clivage intracellulaire libérant le Sunitinib de son groupement protecteur et restaurant ainsi la capacité de la drogue à bloquer le VEGFR2 (Figure 157).



**Figure 157:** Bioactivation du Sunitinib cagé avec des groupements squalenyles.<sup>186</sup>

### 3.2.2. Prodrogues anticancéreuses bioactivées par les métaux de transition

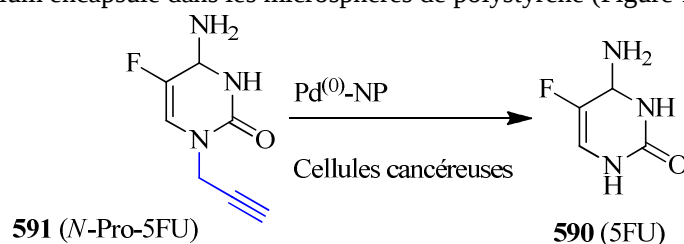
Dans les paragraphes précédents, nous avons montré des exemples des réactions chimiques catalysées par les métaux de transition dans les cellules vivantes. Dans cette section, nous allons présenter les développements récents de la littérature d'activation des prodrogues tumorales par le palladium et le ruthénium directement sur le site de la tumeur. Ces travaux s'inscrivent toujours dans le domaine de la chimie bio-orthogonale décrite dans la partie introductive. Selon le même principe de la bio-orthogonalité, de nouvelles stratégies sont actuellement en cours d'investigation par plusieurs équipes de recherche pour permettre la conversion de prodrogues en drogues cytotoxiques correspondantes en utilisant des catalyseurs métalliques.

Contrairement aux autres prodrogues activées par les processus intra cellulaire enzymatiques, les prodrogues de cette classe sont suffisamment stables avant de rencontrer le catalyseur métallique. Par action du métal libéré, les prodrogues ne sont activées et libérées exclusivement qu'à l'intérieur du tissu cancéreux.

De façon générale, la libération de la drogue directement sur le site de la tumeur devrait maximiser la dose tout en diminuant les effets secondaires aux cellules saines avoisinantes, ce qui serait très utile pour le traitement des tumeurs inaccessibles à la chirurgie. Sur le plan thérapeutique, cette approche des prodrogues impliquant un processus de catalyse métallique doit répondre à un certain nombre de facteurs pour être effective: (i) bloquer l'activité cytotoxique de la drogue, (ii) minimiser toute susceptibilité de clivage enzymatique, et (iii) n'être clivable que par la catalyse métallique en milieux physiologiques.<sup>187</sup>

Quelques exemples des prodrogues anticancéreuses répondant à ces critères ont déjà été décrits dans la littérature. Ces résultats sont toujours de nature purement académique. Aucune de ces études n'a encore donné lieu à des développements cliniques. Le premier exemple dans ce nouveau domaine de la chimie médicinale a été décrit par Bradley, Unciti-Broceta, et leurs collaborateurs.<sup>188</sup>

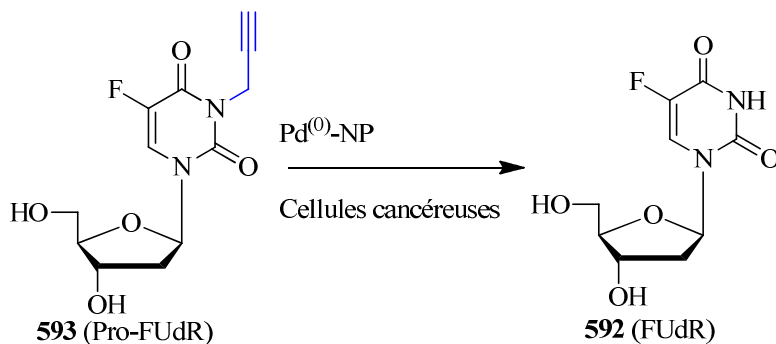
Dans leurs travaux, ils ont préparé la prodrogue 5-fluoro-1-propargyluracile **591** (Pro-5FU) dérivée du 5-fluorouracile **590** (5FU) en protégeant son atome d'azote par le groupement propargyle. Ensuite, ces propriétés thérapeutiques ont été rétablies *in situ* par *N*-déalkylation du groupement protecteur par la catalyse au palladium encapsulé dans les microsphères de polystyrène (Figure 158).



**Figure 158:** Décageage *in cellulo* de la *N*-Propargyl-5-FluoroUracil.<sup>188</sup>

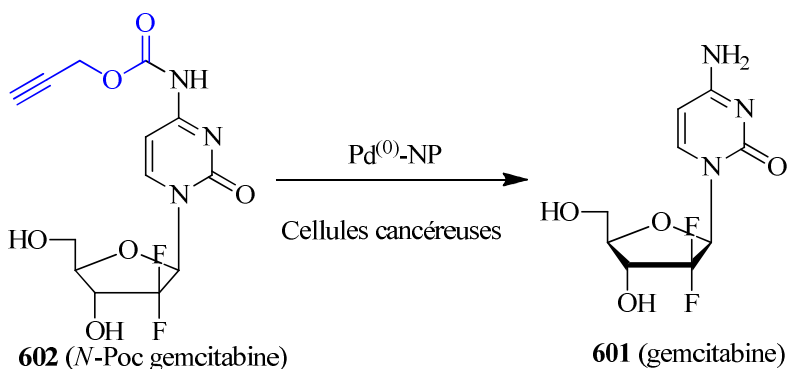
Par clivage rapide du groupement protecteur dans l'espace extracellulaire suivi de l'internalisation subséquente de la 5-fluorouracile, une diminution de la survie cellulaire a été observée pour différentes lignées cellulaires pendant 5 jours. Cependant, comme le 5FU est un nucléobase cytotoxique avec un facteur de prolifération relativement faible, les doses requises du composé pour obtenir une réponse thérapeutique suffisante pourraient devenir un facteur limitant pour des applications cliniques.<sup>188,189</sup>

Par une méthodologie très légèrement modifiée, une nouvelle prodrogue a été conçue en utilisant le même groupement protecteur, le propargyle, pour désactiver les propriétés de la 5-Floxuridine **592**, drogue anticancéreuse utilisée pour traiter les tumeurs solides (Figure 159).<sup>187</sup> La prodrogue *N*-Propargyl-5-Floxuridine **593**, inactive, a été alors activée par catalyse au palladium dans les cellules colorectales (HCT116) et pancréatiques (BxPC-3) avec un rapport 560 fois supérieur à la prodrogue seule. L'incubation de cette prodrogue et le catalyseur dans les cellules cancéreuses en hypoxie a montré une même cytotoxicité avec la même combinaison en normoxie. Ceci a montré que le niveau d'oxygène est sans influence sur cette bio-activation pallado-catalysée.



**Figure 159:** Décageage *in cellulo* de la Pro-FUdR.<sup>187</sup>

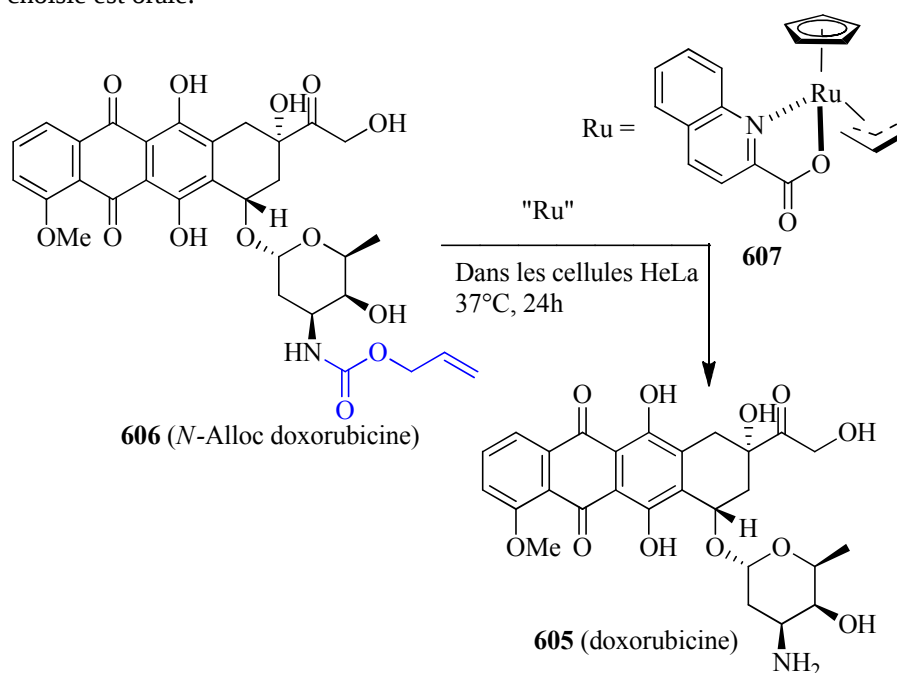
À la suite de ces problèmes, d'autres prodrogues ont été développées suivant le même principe que précédemment. Ainsi Unciti-Broceta a décrit la prodrogue de la *N*-propargyloxycarbonyl (*N*-Poc) gemcitabine (**602**) qui peut surmonter cette difficulté en affichant une génération rapide et efficace de la drogue anticancéreuse avec des  $\text{IC}_{50} < 100 \text{ nM}$  sur certaines lignées cellulaires tumorales (Figure 160).<sup>190</sup> L'avantage de cette prodrogue (**602**) est qu'elle peut être bioactivée à des niveaux satisfaisants pour les études *in cellulo*. La cytotoxicité de la prodrogue est environ 25 fois moins par rapport à celle du gemcitabine **601**.



**Figure 160:** Décageage *in cellulo* de la prodrogue *N*-Poc-gemcitabine.<sup>190</sup>

Bien qu'elle soit efficace, cette stratégie souffre de problèmes de bioorthogonalité pour les applications *in vivo*. En effet, la *N*-Poc Rhodamine a

montré une faible stabilité biochimique dans les intestins du poisson-zèbre.<sup>190</sup> Ainsi, ces problèmes constituent des limitations graves d'expansion de cette stratégie pour les applications cliniques, surtout lorsque la voie d'administration choisie est orale.

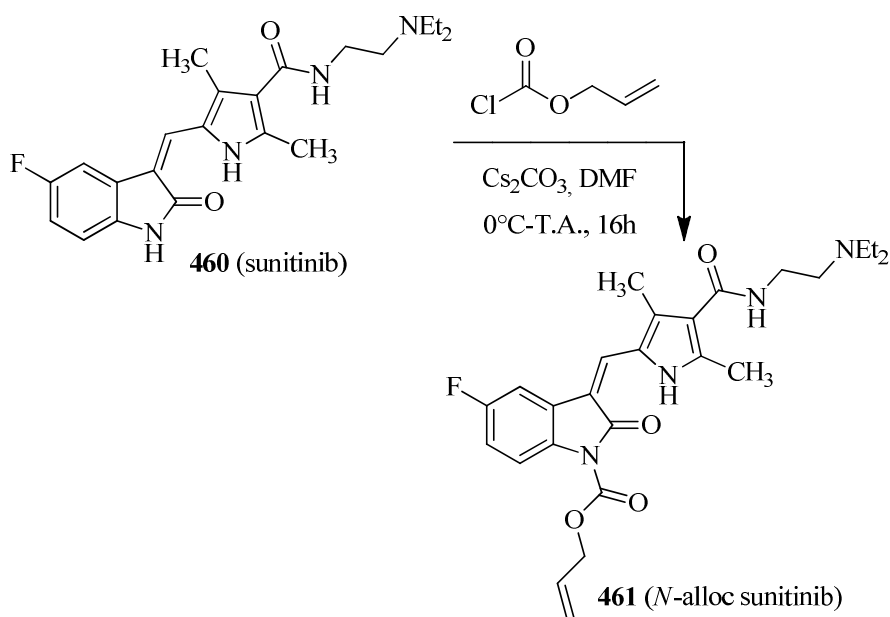


**Figure 161:** Décageage de la *N*-Alloc doxorubicine dans les cellules cancéreuses HeLa.<sup>27</sup>

Un autre exemple a été décrit très récemment, pour l'activation de la doxorubicine cagée à l'Alloc.<sup>27</sup> L'affinité de la doxorubicine à l'ADN a été diminuée en mimant sa charge positive de l'amine primaire avec un groupement protecteur allyl carbamate. Comme attendu, la prodrogue *N*-(allyloxycarbonyl)doxorubicine (**606**) n'a pas montré de toxicité, alors que la drogue libre doxorubicine **605** a induit l'apoptose pendant les heures d'incubation. Comme le catalyseur de ruthénium et la prodrogue ne montrent pas de toxicité, le changement dramatique de la viabilité cellulaire observée est dû au décageage de la prodrogue dans le cytoplasme des cellules HeLa utilisées dans ces travaux (Figure 161).<sup>27</sup>

Ces résultats montrent qu'il reste toujours du travail dans ce domaine en pleine expansion pour concevoir des prodrogues anticancéreuses moins toxiques et activables à l'endroit précis de la tumeur.

### 3.2.3. Synthèse de la prodrogue



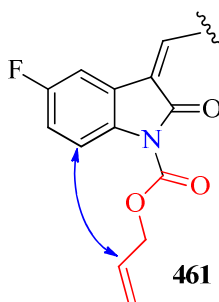
**Figure 162:** Protection du Sunitinib sous forme de *N*-alloc Sunitinib.

Le Sunitinib cagé **461** à l'Alloc a été synthétisé au départ du Sunitinib commercial **460**. Celui-ci est traité avec 1.5 équivalents d'allyl chloroformate dans du diméthylformamide basifié par du  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  à température ambiante. Le *N*-Alloc Sunitinib cagé **461** a été isolé sous forme d'un solide orange avec un rendement de 45% après 16 heures (Figure 162).

### 3.2.4. Analyse structurale de la prodrogue

L'analyse structurale du produit **461** a retenu notre attention. La réaction réalisée pour la protection du sunitinib par l'alloc peut éventuellement conduire à la *O*-allylation sur l'oxygène de l'indolinone. Dans ce dernier cas, le produit de type carbonate formé serait moins intéressant car ces derniers sont connus pour être instables et ils s'hydrolysent facilement en milieu biologique. Dans notre cas, la perte du groupement protecteur alloc serait rapide ce qui conduirait à la libération du sunitinib **460** de départ sans que la réaction organométallique palladocatalysée ait lieu. Afin de vérifier que le produit isolé et caractérisé est le **461** nous avons eu recours à des expériences RMN à deux dimensions grâce aux effets NOE (Nuclear Overhauser Effect) par une expérience NOESY à 2 dimensions. Cet effet se traduit par un transfert de l'aimantation d'un spin  $H_a$  vers un spin  $H_b$  sous l'effet de leur interaction dipolaire magnétique qui se transmet de nucléide à l'autre au travers de l'espace. Cet effet permet donc d'identifier des protons proches l'un de l'autre dans l'espace, pour une distance inférieure à 5 Å.

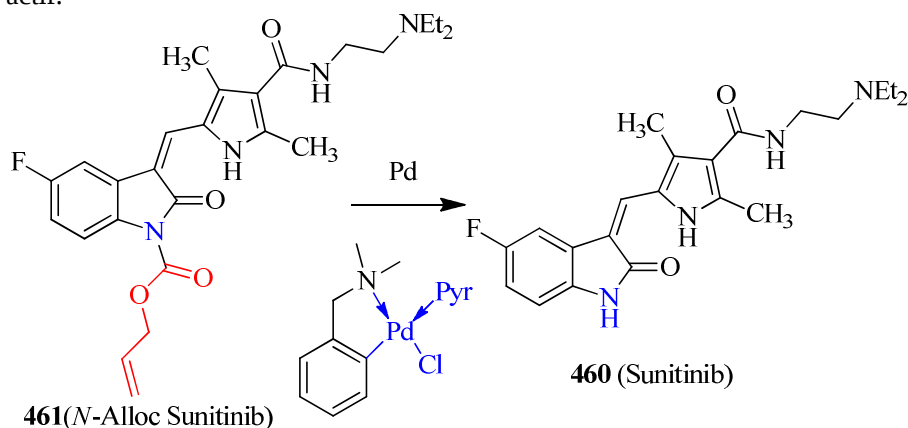
Dans ces expériences, une corrélation NOE a été observée entre le proton aromatique et le proton allylique, comme montré sur la Figure 163; ce qui prouve une interaction au travers l'espace. Un tel effet serait absent si le groupement protecteur alloc était sur l'atome d'oxygène de l'indolinone.



**Figure 163:** Effet NOE observé dans la prodrogue **461**.

### 3.2.5. Résultats obtenus<sup>4</sup>

La réaction souhaitée dans les cellules endothéliales exprimant la cible du Sunitinib, à savoir le VEGFR2, est représentée à la Figure 164. L'activité inhibitrice du RTK est bloquée par l'introduction du groupement allyloxycarbonyl (Alloc) sur l'atome d'azote de l'indole. Par bioactivation pallado-catalysée, le clivage de l'Alloc rend le Sunitinib **460** potentiellement actif.



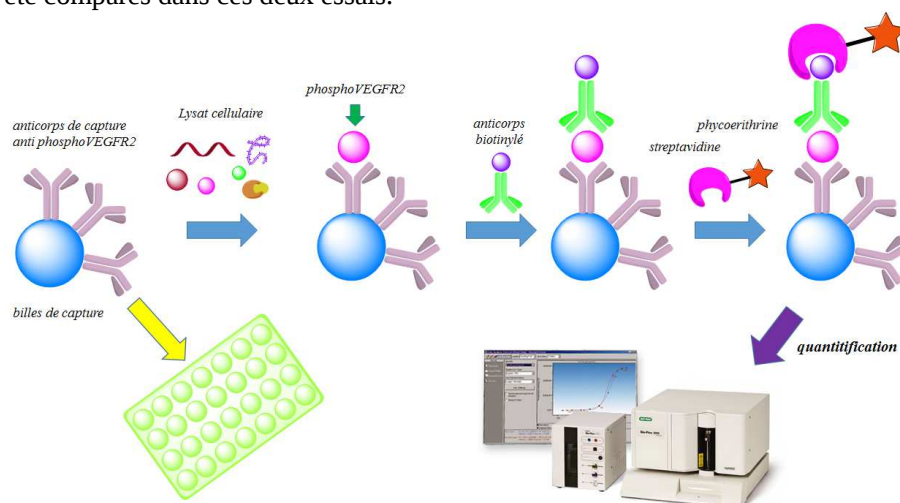
**Figure 164:** Réaction de décageage *in cellulo* du N-Alloc Sunitinib.

#### 3.2.5.1. Tests d'inhibition du récepteur VEGFR2 par la prodrogue

Ces expériences ont été réalisées sur des cellules endothéliales qui expriment le récepteur au VEGF (VEGFR2), cible du Sunitinib. Deux types de tests ont été considérés. Tous deux visaient à évaluer l'inhibition de la phosphorylation du récepteur VEGFR2, soit par Western blotting à l'aide d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de la protéine, soit par un test Bioplex exploitant des billes couvertes de l'anticorps anti-phosphoVEGFR2 et un système sandwich de détection à l'aide d'un second anticorps couplé à un rapporteur

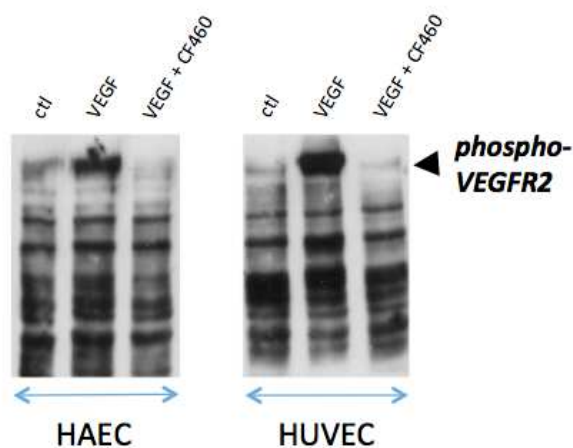
<sup>4</sup> Manipulations réalisées par Laurene PETIT

fluorescent, dont le principe est illustré à la Figure 165. Des extraits cellulaires obtenus après exposition des cellules endothéliales aux différents composés ont été comparés dans ces deux essais.



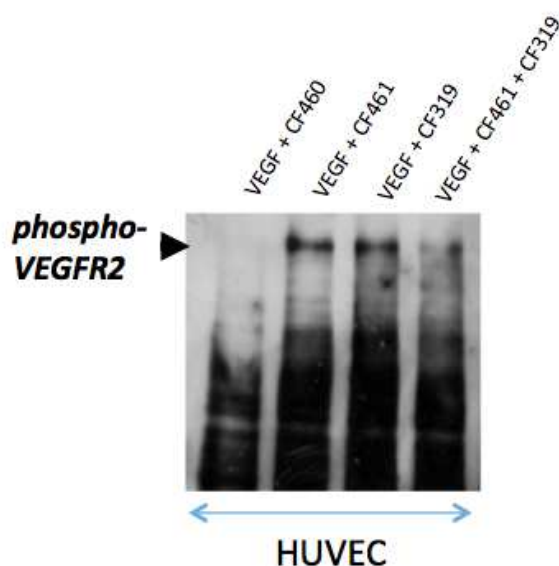
**Figure 165:** Principe d'analyse par la méthode Bioplex.

Une première expérience de Western blot visant à évaluer les effets du Sunitinib **460** a été réalisée (Figure 166). Cette expérience a utilisé des cellules endothéliales humaines d'origines différentes HAEC et HUVEC (respectivement dérivées de l'aorte et de la veine ombilicale). Dans les deux cas, la phosphorylation du VEGFR2 est détectée en réponse au VEGF et le Sunitinib **460** bloque cette phosphorylation en accord avec son mécanisme d'action d'inhibiteur de l'activité tyrosine kinase du récepteur.



**Figure 166:** Western blot représentatif montrant la détection de la forme phosphorylée du récepteur VEGFR2 lorsque les cellules HUVEC et HAEC sont incubées 10 min en présence de VEGF (10 ng/mL). Les effets d’une pré-incubation de 30 min avec 0.1  $\mu$ M Sunitinib **460** inhibe cette phosphorylation.

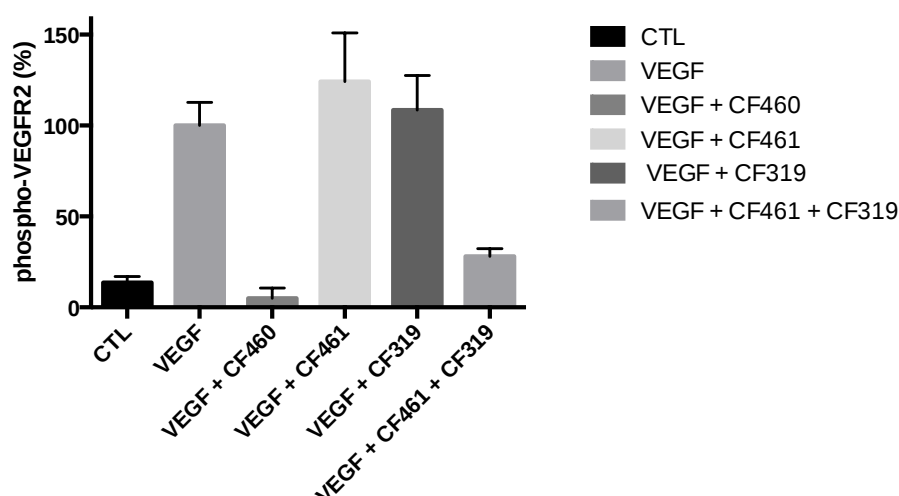
Dans une seconde expérience de Western blot, les effets du produit **461** ont été évalués (Figure 167). Pour rappel, le sunitinib bloque l’autophosphorylation du récepteur VEGFR2 induite par le VEGF. La bioactivation du produit **461** par décageage de la *N*-Sunitinib Alloc devrait également révéler une inhibition au moins partielle de la phosphorylation du récepteur.



**Figure 167:** Western blot représentatif montrant la détection de la forme phosphorylée du récepteur VEGFR2 lorsque les cellules HUVEC sont incubées 10 min en présence de VEGF (10 ng/mL) après une pré-incubation de 30 min avec 0.1  $\mu$ M Sunitinib **460**, 0.1  $\mu$ M produit **461** seul, 20  $\mu$ M palladacycle **319** seul ou la combinaison produit **461** et palladacycle **319**.

- Le contrôle positif avec le Sunitinib **460** a révélé une inhibition complète de la phosphorylation du récepteur VEGFR2 comme obtenu précédemment.
- Deux expériences de contrôle négatif ont été réalisées: incuber les cellules cancéreuses avec le produit **461** seul et le palladacycle **319** seul. Aucun effet significatif sur la phosphorylation du récepteur VEGFR2 n'a été observé dans ces conditions.
- La combinaison du produit **461** et du palladacycle **319** a par contre abouti à une inhibition partielle de la phosphorylation du récepteur VEGFR2, en accord avec la bioactivation du produit 461 et la libération du sunitinib.

Les expériences de Bioplex ont confirmé ces résultats (Figure 168). Les mêmes contrôles positifs et négatifs ont été utilisés. A nouveau, seule la combinaison du produit **461** et du palladacycle **319** a permis d'inhiber la phosphorylation du VEGFR2 de façon similaire au Sunitinib **460**.

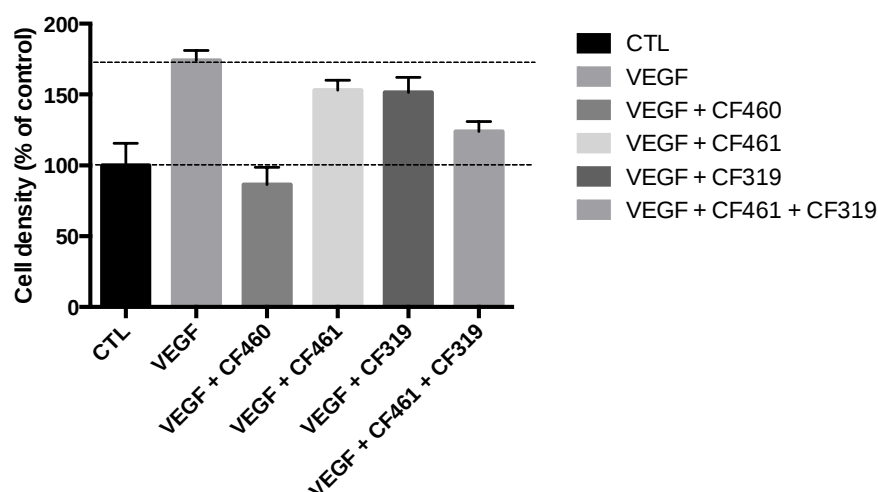


**Figure 168:** Immunodétection en sandwich (Bioplex - set # 171V50023M) montrant la détection de la forme phosphorylée du récepteur VEGFR2 (Tyr 1175) lorsque les cellules HUVEC sont incubées 10 min en absence (CTL) ou en présence de VEGF (10 ng/mL). Les effets d'une pré-incubation de 30 min avec 0.1  $\mu$ M Sunitinib **460**, 0.1  $\mu$ M produit **461** seul, 20  $\mu$ M palladacycle **319** seul ou la combinaison produit **461** et palladacycle **319** sont présentés.

### 3.2.5.2. Evaluation des effets anti-prolifératifs de la prodrogue

Pour valider définitivement un effet fonctionnel de l'inhibition de l'activité du récepteur VEGFR2, l'effet du produit **461** sur la prolifération des cellules endothéliales a été évalué. En parfait adéquation avec les effets inhibiteurs de la phosphorylation du VEGFR2, le Sunitinib 460 bloque complètement la prolifération cellulaire induite par le VEGF et le produit 461 exerce un effet

significatif (bien que moins prononcé) lorsqu'il est combiné au palladacycle **319** (Figure 169).



**Figure 169:** Histogramme de la densité cellulaire correspondant à des cellules HUVEC incubées 24 heures en absence (CTL) ou en présence de VEGF (10 ng/mL) seul ou en combinaison avec 0.1  $\mu$ M Sunitinib **460**, 0.1  $\mu$ M produit **461** seul, 20  $\mu$ M palladacycle **319** seul ou la combinaison produit **461** et palladacycle **319**.

La méthodologie développée pour l'activation du précatalyseur de palladium **319** qui catalyse ensuite l'activation de la prodrogue **461** est innovante et efficace. Les résultats des tests immunologiques obtenus dans cette partie sont très intéressants. A notre connaissance, il n'y a pas d'autre exemple d'activation d'une drogue cytotoxique au moyen de la catalyse métallique dans les cellules cancéreuses sélectivement en hypoxie reporté dans la littérature. Même si cette application est juste notre premier exemple et n'a donc pas été développée, elle est cependant prometteuse et pourrait donner des résultats intéressants dans le futur. En effet, la méthodologie développée peut être appliquée à l'activation d'autres prodrogues actives sur des lignées cellulaires cancéreuses avec des taux élevés de NADH. De plus, cibler d'autres pathologies humaines présentant des rapports NADH/NAD<sup>+</sup> élevés peut être également envisagé.

## 4. Conclusion

Au cours de cette troisième partie, nous avons réalisé une réaction de catalyse organométallique d'un substrat cagé par le palladium (0) généré *in situ* au départ du complexe de palladium (II) **319** réduit par le NADH cellulaire. La réaction testée est la déallylation de Tsuji-Trost. La méthodologie a été d'abord développée *in vitro* en utilisant l'aminocoumarine **310** comme fluorophore modèle. Les études cinétiques ont mis en évidence l'influence importante de l'oxygène pour ces réactions. Pour la réaction réalisée en l'absence de l'oxygène, un rendement de 95% a été obtenu après 4 heures en utilisant le glutathion comme nucléophile capteur de  $\pi$ -allyle. Cependant, un faible rendement d'environ 5% est obtenu pour la réaction réalisée sous oxygène. Ces observations nous ont permis d'orienter les travaux ultérieurs pour des réactions de décageage *in cellulo* d'une drogue anticancéreuse.

Pour des questions de facilité, nous avons d'abord testé ce système par le décageage de la *N*-Rhodamine 110 -Alloc dans les cellules tumorales SiHa. Une sélectivité d'activation hypoxique d'environ 14 fois a été obtenue avec succès.

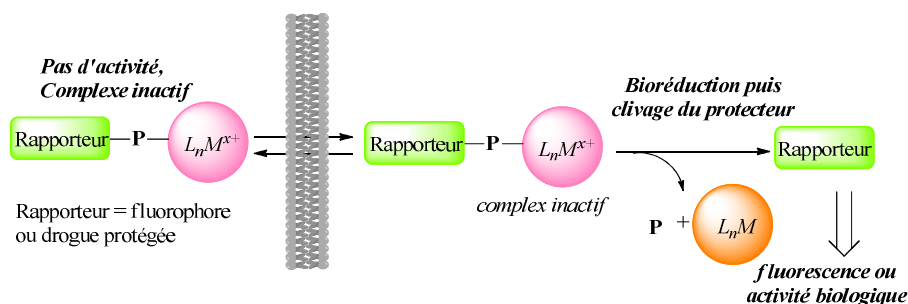
Enfin, pour la validation ultime, nous avons cagé une drogue antiangiogénique, le sunitinib et avons validé une stratégie chimique biocompatible pour décager le Sunitinib-Alloc dans des cellules endothéliales. Les effets fonctionnels attendus ont été observés, à savoir l'inhibition de la phosphorylation du récepteur VEGFR2 cible du sunitinib et l'inhibition de la prolifération cellulaire endothéliale caractéristique des effets anti-angiogéniques.

Partie IV : Prodrogues  
bioréductibles *via* la déallylation  
de Tsuji-Trost



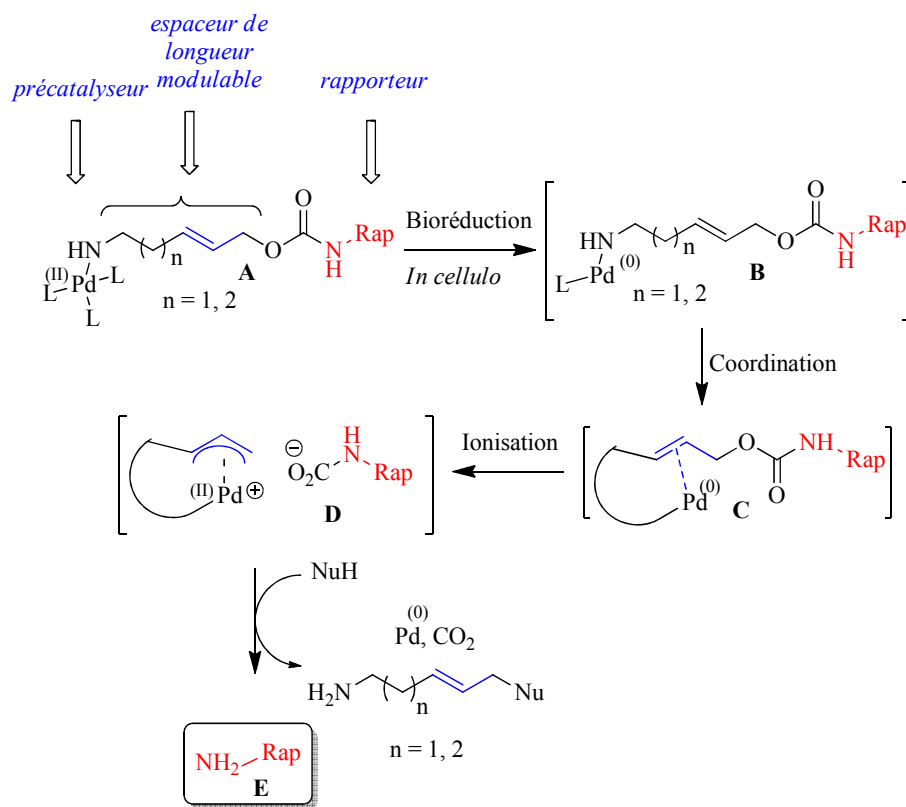
## 1. Introduction et objectifs

Nous avons acquis une expérience dans le domaine de l'activation de prodrogues par des complexes de palladium (II) dotées de potentiels redox accessibles en milieu cellulaire. Dans l'optique de simplifier le système, nous allons coupler de façon judicieuse le rapporteur (désigné dans ce projet comme le fluorophore ou la drogue) à des dérivés de complexes de palladium (II) en un seul système. Le système simplifié serait donc plus facile à étudier et à contrôler pour des applications potentielles *in cellulo* (Figure 170).



**Figure 170:** Schéma simplifié de libération du rapporteur.

Sur base de ce raisonnement, nous avons opté pour la conception novatrice d'une prodrogue capable de libérer le rapporteur *in cellulo* suivant la réaction d'allylation de type *Tsuji-Trost*. Dans cette prodrogue **A**, le rapporteur est attaché au centre métallique palladium (II) par un linker allylique avec un bras espaceur de taille variable. Une fois le palladium (II) réduit *in cellulo* en palladium (0) (l'intermédiaire **B**) celui-ci sera coordonné à la double liaison allylique pour conduire à l'intermédiaire (**C**). Ce dernier se dissociera spontanément pour former un complexe  $\pi$ -allyle palladium et le fragment (**D**). Ce dernier subira enfin une décarboxylation pour libérer le rapporteur (**E**) (Figure 171).



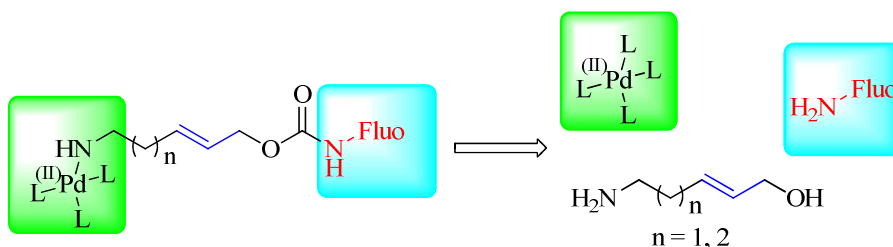
**Figure 171:** Mécanisme d'activation de la prodrogue.

Afin de simplifier la méthodologie, nous avons travaillé d'abord avec un fluorophore facile à suivre par spectroscopie de fluorescence. Une fois le système catalytique optimisé, le fluorophore sera remplacé par des agents antitumoraux classiques. Pour ce nouveau système, nous avons la possibilité de réaliser des modifications autour du centre métallique, ce qui offre l'avantage d'avoir accès à de nombreux complexes de palladium (II) stables à l'air et faciles à isoler. En outre, ces modifications offrent l'avantage de moduler les propriétés redox du complexe et ses propriétés lipophiles pour le passage membranaire.

#### Partie IV : Prodrogues bioréductibles *via* la réaction de Tsuji-Trost

Après leur synthèse, ces complexes seront soumis à la réduction *in vitro* sur des cellules tumorales incubées en normoxie. Ceci nous permettra de trouver le meilleur système catalytique capable de libérer le rapporteur *via* l'allylation de *Tsuji-Trost*. Si cette bioréduction s'avère efficace, le fluorophore sera remplacé par une drogue antitumorale afin d'en faire des prodrogues au palladium bioréductibles. Notre objectif majeur n'est pas ici, dans un premier temps, d'obtenir une sélectivité hypoxie vs normoxie, mais plutôt de viser l'efficacité du système de libération du rapporteur (fluorophore ou drogue) *in cellulo*. Une fois le système mis au point, il sera également possible de faire varier les paramètres stéréoélectroniques du ligand, pour tenter d'obtenir la sélectivité pour l'hypoxie recherchée. Les résultats obtenus dans la première partie de cette thèse ainsi que les mécanismes de bioréduction associés seront déterminants pour obtenir cette sélectivité et seront appliqués ainsi à ce modèle plus élaboré dans lequel la molécule porte à la fois le complexe actif et la molécule d'intérêt. A notre connaissance, il n'y a pas d'exemples de ce type de système décrits dans la littérature.

## 2. Stratégie de synthèse



**Figure 172:** Stratégie de synthèse de la prodrogue.

Comme nous l'avons dit précédemment, le système mis au point se compose d'un rapporteur, d'un espaceur clivable et du centre métallique qui subira la bioréduction (Figure 172). Clairement, la prodrogue à développer peut provenir d'un alcool allylique, d'un rapporteur comme un fluorophore ou une drogue et

d'un précatalyseur de palladium (II) connectés entre eux par des liaisons carbamates, suffisamment stables en milieux biologiques. Ces fonctions seront introduites par des acylations classiques.

### 2.1. Taille de l'espaceur

Le principe est d'attacher le complexe de palladium au rapporteur en les reliant par un bras espaceur capable de permettre facilement l'élimination de la drogue par l'attaque intramoléculaire du palladium (0) sur le fragment allyle de la prodrogue. Dans cette nouvelle prodrogue, deux alcools allyliques de longueur de chaîne différente seront utilisés pour relier le centre métallique du complexe de palladium au rapporteur. Les modèles moléculaires indiquent que les deux longueurs de chaînes avec les atomes de carbone  $n = 2$  et  $3$  seraient les meilleurs pour pouvoir permettre la complexation du palladium (0) sur la double liaison de l'espaceur, et ainsi permettre la formation de l'intermédiaire  $\pi$ -allyle permettant l'élimination du rapporteur.

### 2.2. Choix du fluorophore

Les fluorophores choisis pour ce projet sont des coumarines, composés faciles à synthétiser mais également faciles à coupler sur les modèles développés. Comme nous l'avons remarqué également dans le premier projet, l'avantage principal de ces fluorophores est leur absence de fluorescence lorsqu'ils sont protégés. Ainsi, les prodrogues de ce projet ne seront pas fluorescentes, facilitant ainsi les analyses qualitatives et quantitatives de libération du fluorophore lors des tests biologiques. La méthyl amino coumarine **310** a été sélectionnée comme premier modèle et son utilisation a été développée dans nos travaux.

### 2.3. Choix des ligands

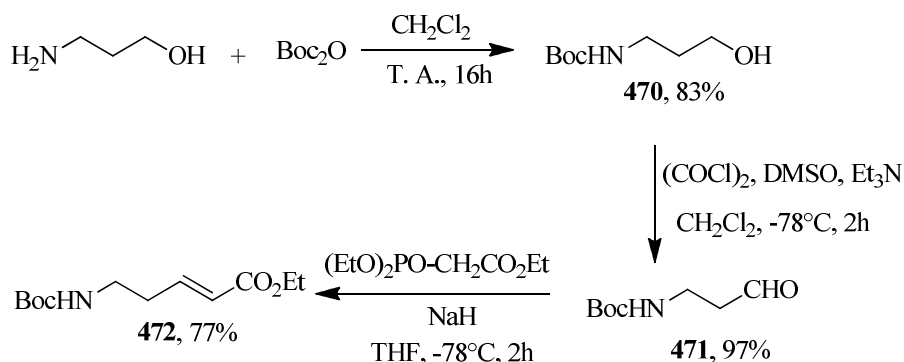
Le choix des ligands a été dicté par le mécanisme d'activation des prodrogues lui-même. Pour ces prodrogues, le palladium (II) sera réduit *in situ* par les réductases cellulaires pour former le palladium (0). Celui-ci est instable thermodynamiquement et nécessite des ligands fort stabilisants, capables d'empêcher sa décomposition ou son agglomération avant de se coordonner sur la double liaison allylique. Ainsi, les prodrogues développées dans ce projet nécessitent l'emploi des ligands multifonctionnels, hémilabiles, capables de stabiliser les espèces catalytiques de Pd(0) et le Pd(II) dans des conditions réactionnelles.<sup>191</sup> Il est possible d'y arriver en utilisant des ligands organiques bidentés qui contiennent des hétéroatomes avec une paire libre. Cependant, ces ligands doivent avoir une certaine flexibilité intrinsèque, également importante pour faciliter la coordination du palladium (0) sur la double liaison allylique. Ainsi, un cycle métallique à 6 chaînons sera formé.

Dans un premier temps, nous avons ciblé des ligands organiques iminophosphines (P, N) contenant deux atomes donneurs, un *diphenylphosphino* et une imine. Ces ligands ont été choisis dans l'objectif d'accroître la capacité  $\pi$ -accepteuse de ce système. Ce pouvoir  $\pi$ -accepteur est une condition requise pour stabiliser des complexes de palladium zérovalents. Cependant, d'autres hétéro-ligands mixtes peuvent être utilisés comme des ligands (N, S), voire même des ligands carbonés.

### 3. Synthèse des prodrogues

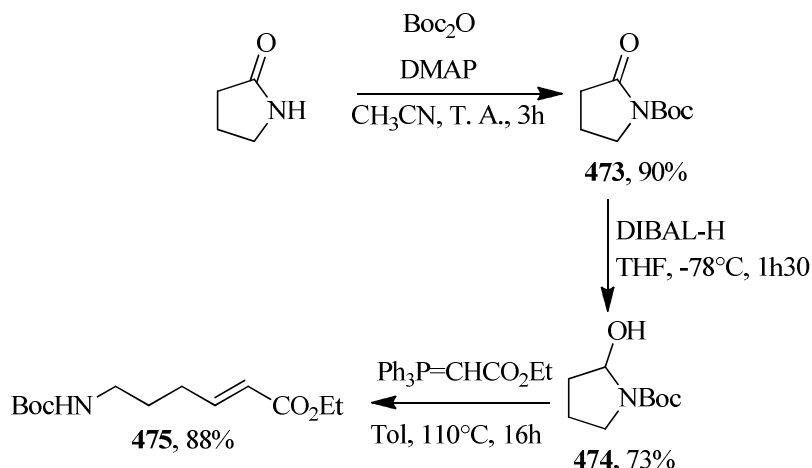
#### 3.1. Synthèse des alcools allyliques

Les deux alcools allyliques **473** et **477** ont été obtenus par réduction des esters correspondants **472** et **475**. Ces esters sont obtenus en reproduisant des protocoles développés dans la littérature.<sup>192,193</sup> Ces deux méthodologies diffèrent légèrement.



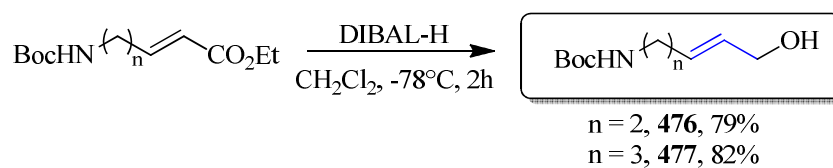
**Figure 173:** Synthèse de l'ester **472**.<sup>192</sup>

La synthèse de l'ester **472** est réalisée en trois étapes (Figure 173). D'abord l'amino-3-propanol est protégé par le  $\text{Boc}_2\text{O}$  dans le dichlorométhane durant 16 h. Le brut **470** est obtenu sous forme d'un liquide incolore après lavage à l'eau. Il est utilisé comme tel sans aucune autre purification. Une oxydation de Swern est ensuite réalisée, conduisant à l'aldéhyde correspondant **471**. Une réaction d'Emmons Wadsworth Horner fournit enfin l'ester désiré **471** sous forme d'une huile incolore.



**Figure 174:** Synthèse de l'ester **475**.<sup>193</sup>

La synthèse de l'ester **476** débute par la protection de la pyrrolidinone au moyen du  $\text{Boc}_2\text{O}$  en présence d'une quantité catalytique de DMAP dans l'acétonitrile. Le produit protégé **473** est obtenu après 3 h avec un rendement de 90% et est utilisé comme tel dans les étapes suivantes. Une réduction est ensuite réalisée par le DIBAL-H (1,2 équiv.) dans le THF à  $-78^\circ\text{C}$  pendant 1h30. L'aminol **474** est obtenu sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 73% après purification sur colonne. Une réaction de Wittig est réalisée, donnant ainsi accès à l'ester **476** avec un rendement de 88% après purification (Figure 174).



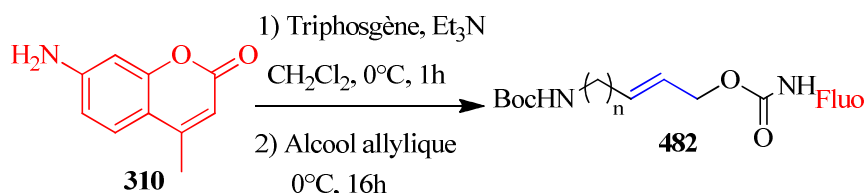
**Figure 175:** Synthèse des alcools allyliques **476** et **477**.

Les esters ont été réduits en alcools allyliques correspondants **476** et **477** avec un excès du DIBAL-H (2,5 équivalents) dans le dichlorométhane à  $-78^\circ\text{C}$  pendant deux heures. Ils ont été isolés sous forme d'huiles avec des bons rendements après purification par chromatographie flash sur gel de silice (Figure 175).

### 3.2. Activation des alcools allyliques

#### 3.2.1. Activation via l'isocyanate

Dans un premier temps, nous avons voulu coupler directement les alcools allyliques en *one pot* par activation de l'aminocoumarine **310** en passant par l'isocyanate correspondant (Figure 176). Celui-ci formé *in situ* en traitant l'aminocoumarine **310** dans le dichlorométhane avec le triphosgène en présence d'Et<sub>3</sub>N. Après 1 heure d'agitation à 0°C, l'alcool est ajouté et la réaction est agitée pendant 16 heures à T.A. Malheureusement, le carbamate désiré n'a pas été obtenu dans ces conditions.

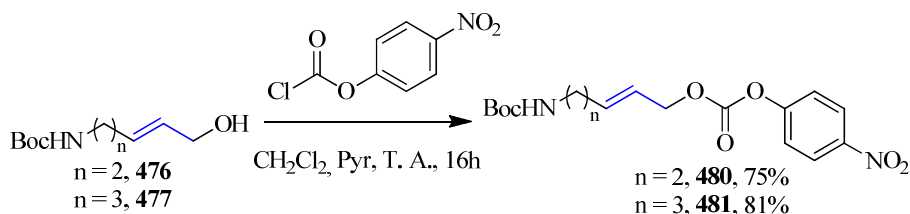


**Figure 176:** Synthèse du carbamate via l'isocyanate.

Pour coupler l'aminocoumarine **310** aux alcools allyliques **476** et **477** nous avons eu recours à d'autres méthodes d'activation classiques. Nous avons d'abord employé le 4-nitrophenylchloroformate, qui possède le groupe 4-nitrophénol, excellent groupe partant pour une réaction de substitution nucléophile dans la prochaine étape.

#### 3.2.2. Acylation par du p-nitrophényl chloroformiate

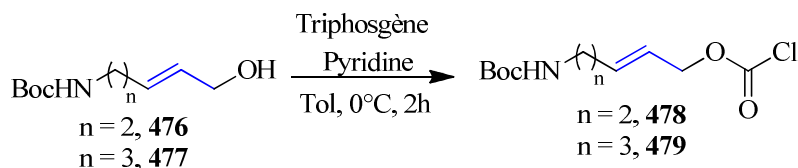
Les alcools allyliques **473** et **477** ont été acylés avec 1 équivalent de *p*-nitrophényl chloroformate dans le dichlorométhane en présence de pyridine pour donner les carbonates correspondants **480** et **481**. Ces carbonates activés sont isolés sous forme des solides blancs avec des bons rendements après purification sur colonne (Figure 177).



**Figure 177:** Acylation des alcools allyliques par du *p*-nitrophényl chloroformate.

### 3.2.3. Acylation par du triphosgène

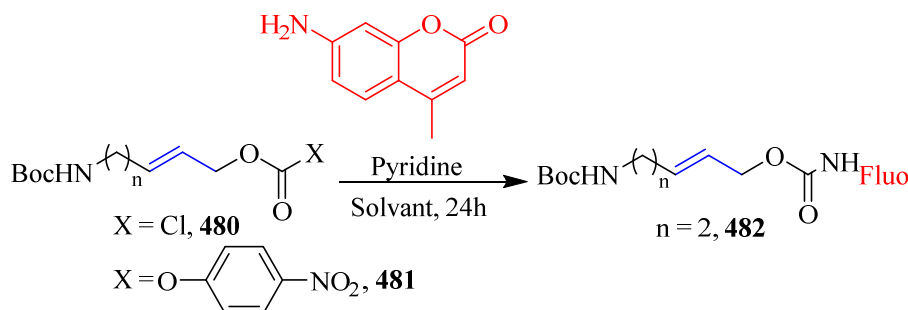
Une autre alternative était d'activer également les alcools sous la forme des chloroformiates **478** et **479** correspondants. Ainsi, ces alcools ont été acylés en utilisant le triphosgène (1 équiv.) en présence de la pyridine (1.5 équiv.) dans le toluène (Figure 178). Après 1 h 30 min d'agitation à 0°C, la réaction a été filtrée et les solvants ont été évaporés. Le brut a été isolé sous forme d'huile incolore et utilisé comme tel sans aucune autre purification.



**Figure 178:** Acylation des alcools allyliques par du triphosgène.

## 3.3. Tentatives de couplage

Les premières tentatives de couplage des alcools allyliques activés au fluorophore ont commencé par les alcools acylés par le 4-nitrophénylchloroformate et ensuite le triphosgène. Ces derniers sont alors traités par 1 équiv. du méthyl amino-coumarine **310** en présence de la base pendant 24 heures pour fournir les carbamates désirés (Figure 179). Différents essais ont été réalisés mais malheureusement les carbamates **482** sont obtenus avec de très faibles rendements (Tableau 2).


**Figure 179:** Couplage des alcools allyliques activés à l'aminocoumarine.

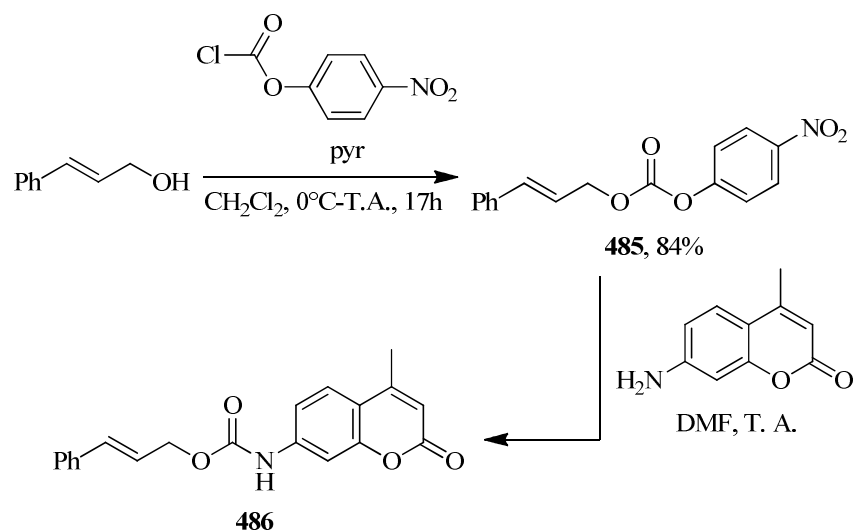
| Entrée | Substrat | Solvant                         | T    | Rdt (isolé) |
|--------|----------|---------------------------------|------|-------------|
| 1      | 481      | DMF                             | 0°C  | Traces      |
| 2      | 480      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 0°C  | Traces      |
| 3      | 480      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | TA   | 15%         |
| 4      | 481      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 40°C | 20%         |
| 5      | 480      | THF                             | 50°C | Dégradation |

**Tableau 2:** Synthèse des carbamates, précurseurs des prodrogues.

Pour toutes les tentatives envisagées, les rendements sont très médiocres. Ces faibles réactivités ont été simplement attribuées au faible caractère nucléophile de la méthyl aminocoumarine **310**, une amine aromatique.

### 3.3.1. Optimisation sur l'alcool allylique modèle

Au vu de ces difficultés inattendues pour former les carbamates, ce couplage a été optimisé sur un alcool allylique modèle : l'alcool cinnamique. Comme expliqué précédemment, les différents essais réalisés pour le coupler avec l'aminocoumarine sous forme de carbamate *via* le chloroformiate ou l'isocyanate ont donné de faibles rendements. Nous avons alors opté pour transformer l'alcool en un carbonate doté d'un bon groupe partant : le *p*-nitrophenol (Figure 180). Ce carbonate **485** a été obtenu selon la procédure de la littérature.<sup>176</sup> Il a été ensuite testé pour la formation du lien carbamate. En raison des problèmes de solubilité de l'aminocoumarine déjà rencontrés, les prochaines manipulations ont été réalisées dans un solvant polaire, le DMF.



**Figure 180:** Couplage de l'aminocoumarine à l'alcool allylique modèle activé.

| Entrée | Agent de couplage      | Temps   | Rdt    | Observation                                                |
|--------|------------------------|---------|--------|------------------------------------------------------------|
| 1      | Aucun                  | 16 h    | 0      | Produits de départ récupérés                               |
| 2      | DMAP (cat.)            | 3 jours | Traces | Produits de départ récupérés                               |
| 3      | HOBt/Pyridine          | 3 jours | Traces | Produits de départ récupérés                               |
| 4      | HOBt/Et <sub>3</sub> N | 3 jours | 0      | Produits de départ récupérés +<br>dégradation du carbonate |
| 5      | DMAP/Et <sub>3</sub> N | 4 jours | 0      | Produits de départ récupérés +<br>dégradation du carbonate |
| 6      | Et <sub>3</sub> N      | 4 jours | 0      | Produits de départ récupérés +<br>dégradation du carbonate |
| 7      | DMAP/60°C              | 2 jours | 0      | Décomposition du carbonate                                 |

**Tableau 3:** Synthèse du carbamate *via* le carbonate.

### 3.3.2. Conclusion

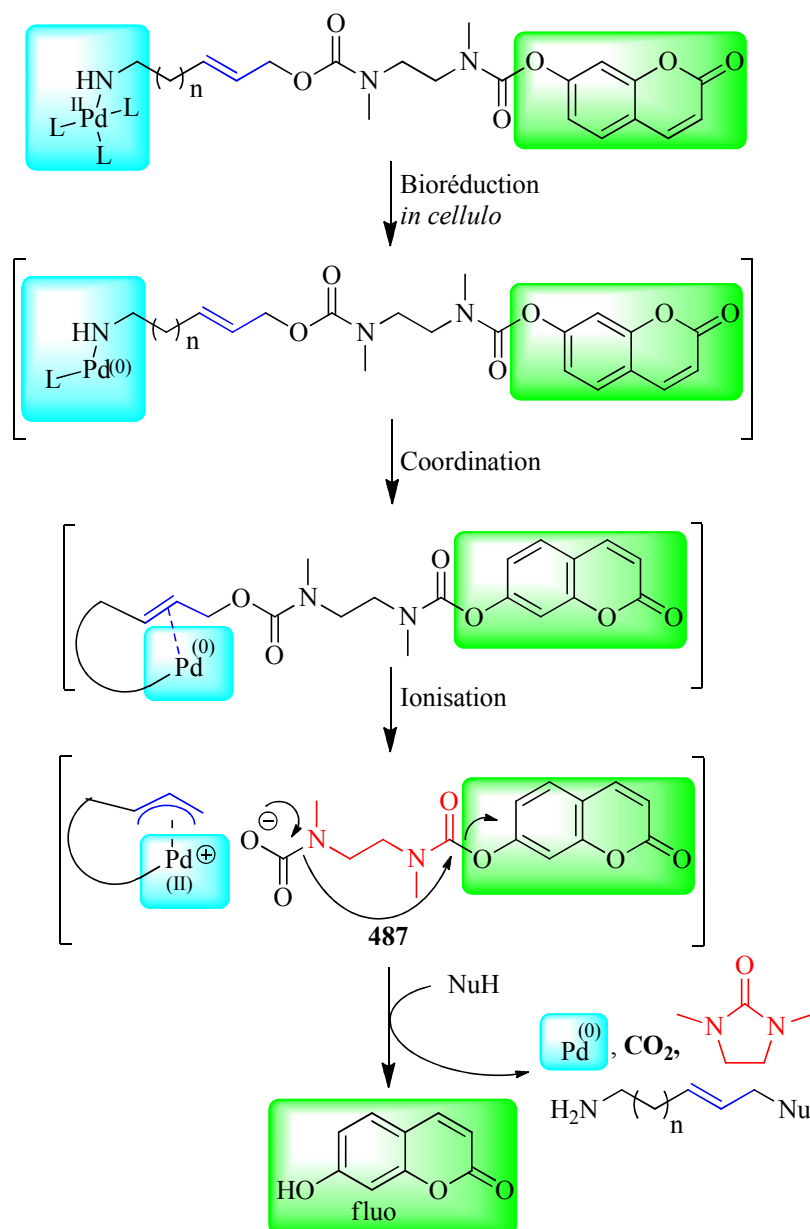
Malgré plusieurs tentatives réalisées, nous avons eu des difficultés de coupler la méthyl aminocoumarine **310** aux alcools allyliques **476** et **477**. D'autre part, des problèmes de caractérisation de ce fluorophore *in cellulo* ont été également observés dans un autre travail en cours dans notre laboratoire (non discuté ici). Dans ce travail, il a été impossible de détecter clairement la fluorescence de ce fluorophore pour les tests réalisés sur des cellules MDA-MB231 (cancer du sein métastatique). Le problème de ce fluorophore est qu'à une longueur d'onde d'absorption de 350 nm, il émet entre 450 et 490 nm, c'est-à-dire dans le bleu, tout comme le DAPI utilisé pour marquer les noyaux cellulaires.

## 4. Stratégie utilisant un linker auto-immolant

Suite à ces problèmes de synthèse et de caractérisation du fluorophore *in cellulo*, une nouvelle stratégie a été entreprise. Tout d'abord, comme fluorophore, l'ombelliférone a été choisie car elle émet dans le vert ce qui permettra sa détection lors des tests *in cellulo* par les microscopes confocaux à fluorescence disponibles au laboratoire. Comme l'ombelliférone ne possède pas de fonction amine, son couplage direct aux alcools allyliques **476** et **477** conduirait alors à des produits de couplage de type carbonate, connus être instables dans le milieu biologique parce qu'ils s'hydrolysent facilement. En deuxième lieu, nous pensons que les problèmes de réactivité rencontrés lors des essais de greffage peuvent être dus à la faible réactivité de l'amine aromatique de la coumarine. Ainsi, un dérivé de l'ombelliférone portant un espaceur comportant une chaîne aliphatique terminée par une fonction amine secondaire libre, plus nucléophile sera utilisé (Figure 181). Pour ce faire, un espaceur de type *N*, *N'*-diméthyléthylènediamine, couramment utilisé dans la synthèse des prodrogues anticancéreuses, a été choisi.<sup>194,195,196,197,198</sup> Il nous permettra également d'attacher l'ombelliférone aux alcools allyliques en créant un lien carbamate, plus stable en milieu biologique.

#### 4.1. Nouvelle structure des prodrogues

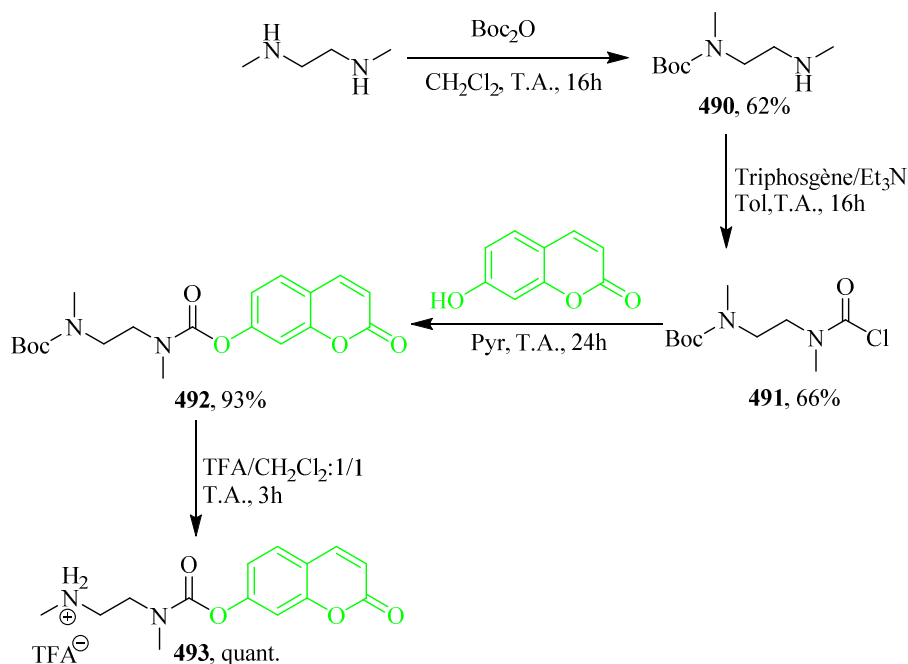
La Figure 181 représente la nouvelle structure des outils développés et leurs mécanismes d'activation pour libérer le rapporteur *in cellulo*.



**Figure 181:** Mécanisme d'activation des nouvelles prodrogues développées.

Après bioréduction du centre métallique et sa coordination sur la double liaison allylique, la dissociation conduira au  $\pi$ -allyle palladium, et au fragment **487**. Ce dernier subira une fragmentation en commençant par la décarboxylation rapide qui élimine le  $\text{CO}_2$ . Elle sera suivie d'une réaction de cyclisation intramoléculaire spontanée de l'intermédiaire amine, pour former le dérivé *N,N'*-diméthylurée et le rapporteur (fluorophore ou drogue).

#### 4.2. Synthèse du rapporteur connecté au linker

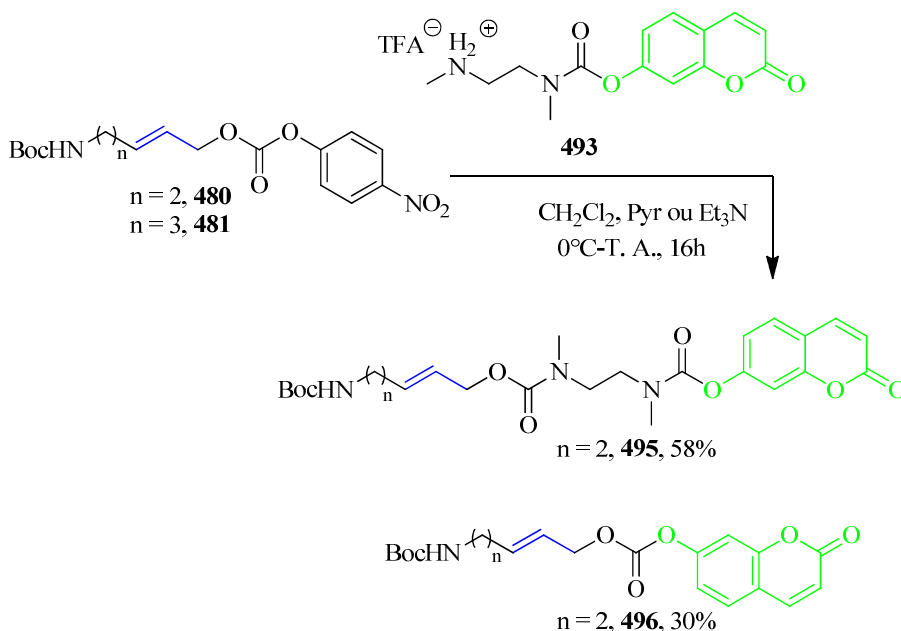


**Figure 182:** Synthèse du rapporteur attaché au linker.

Le nouveau départ consiste à synthétiser le fluorophore connecté au linker *N,N'*-diméthyléthylènediamine. Il a été obtenu en trois étapes selon une méthodologie modifiée de la littérature.<sup>196</sup> La synthèse démarre par la mono-protection de la *N,N'*-diméthyléthylènediamine par addition lente d'un léger

défaut de  $\text{Boc}_2\text{O}$  à  $0^\circ\text{C}$  dans le dichlorométhane. Après 16h d'agitation à T. A. le produit mono-protégé **490** est obtenu avec un rendement de 62% après extraction et lavage aqueux. Le produit **490** est ensuite acylé au moyen du triphosgène dans le toluène pour conduire au produit correspondant **491** avec un rendement de 66%. Ce dernier est directement couplé avec l'ombelliférone commerciale dans la pyridine. Après une nuit d'agitation à T. A., le produit **492** est obtenu sous forme d'une résine incolore avec un rendement de 93%. La déprotection du boc est réalisée en milieu d'acide fort tel que le TFA. Le sel d'ammonium **493** obtenu est utilisé dans l'étape suivante comme tel sans autre purification. La séquence de ces réactions est représentée à la Figure 182.

#### 4.3. Couplage du linker-rapporteur aux alcools allyliques activés

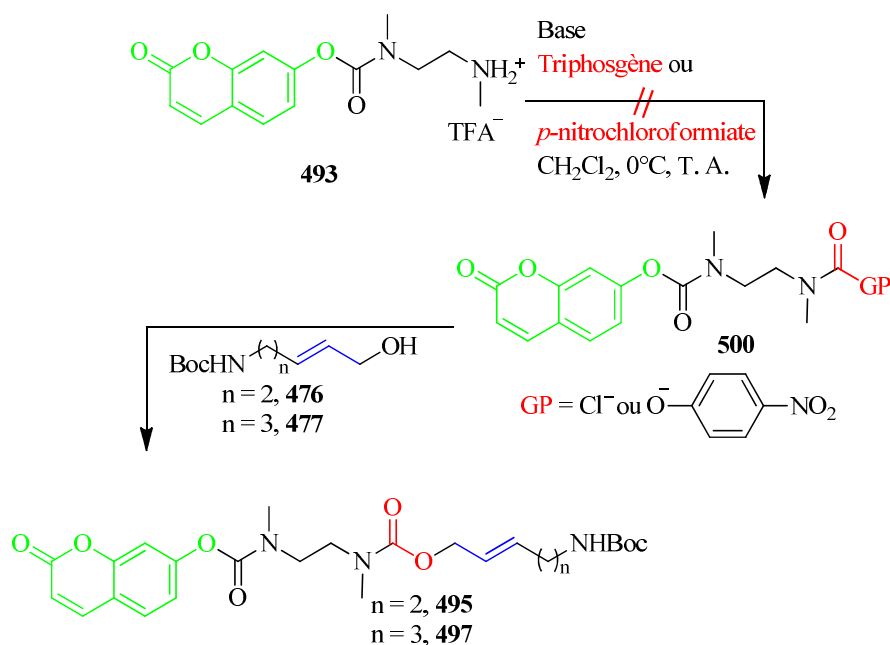


**Figure 183:** Couplage des sels d'ammonium aux alcools allyliques activés.

L'idée est de coupler alors le sel d'ammonium **493** aux carbonates mixtes **480** et **481**. L'addition lente de la base permettrait de déprotonner progressivement ce sel pour libérer une fonction amine libre pour le couplage. Pour ce faire, nous avons d'abord tenté de solubiliser le carbonate mixte **480** dans le dichlorométhane et ajouter le sel de TFA. Placé à 0°C, une base est alors ajoutée goutte à goutte pour déprotoner le sel de TFA (Figure 183). A notre surprise, cette réaction a donné des faibles rendements en produit de couplage lorsque la Et<sub>3</sub>N a été utilisée comme base. Cependant, une réaction secondaire conduisant au produit de couplage de type carbonate après perte du linker auto-immolant (*N,N'*-diméthylethylenediamine) a été observée. Celle-ci proviendrait d'une élimination compétitive et de l'attaque nucléophile sur les alcools activés. Ces conditions réactionnelles se sont donc avérées inefficaces pour ces couplages. Afin de minimiser la formation de ce carbonate, nous avons utilisé la pyridine, une base faible par rapport à la triéthylamine. Dans ces conditions, les meilleurs rendements obtenus sont de l'ordre de 60% lorsque la réaction est conduite à 0°C ; et le carbonate est isolé avec un rendement inférieur à 30%. Ce carbonate étant moins intéressant dans les réactions de déprotection *in cellulo*, une nouvelle stratégie de synthèse linéaire a été adoptée pour améliorer les rendements.

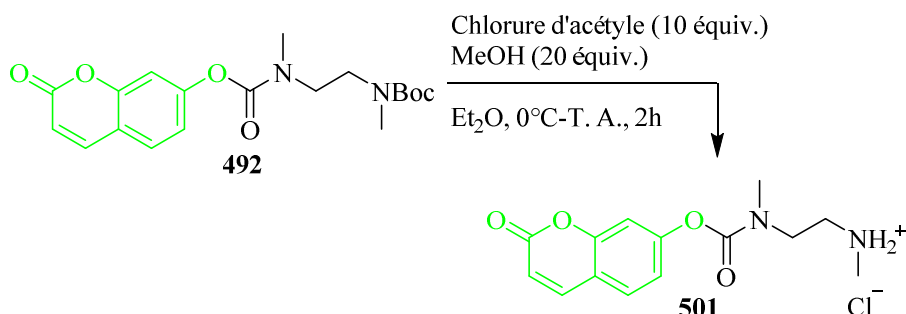
#### 4.4. Synthèse des prodrogues par activation du linker

La nouvelle voie consiste alors à activer le linker par le triphosgène ou le *p*-nitrophénylchloroformiate et à le coupler directement aux alcools **476** et **477**. La voie de synthèse consiste à déprotonner les sels **493** par addition lente de la base et générer l'amine capable de réagir avec les agents d'acylation *in situ*.



**Figure 184:** Synthèse des prodrogues par activation du linker.

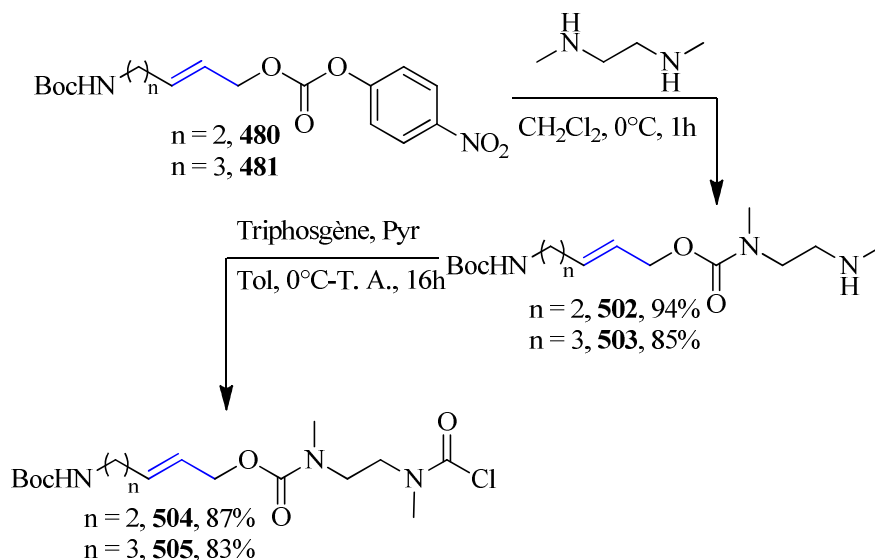
A notre regret, cette acylation n'a pas réussi, le produit **500** n'a pas été isolé. Il semble à ce stade que les échecs rencontrés de couplage proviennent des sels d'ammonium obtenus par déprotection avec le TFA. Une nouvelle voie de déprotection acide pourrait être envisagée pour changer le contre-anion. Il s'agit de la déprotection par du HCl 2M dans l'éther ou alors par du HCl sec généré *in situ*. Cette dernière voie a été testée par Mathieu Soetens plus tard, en générant le HCl au départ du chlorure d'acétyle et le méthanol dans l'éther (Figure 185). Dans ses travaux, le sel d'ammonium **501** a pu être facilement couplé à des électrophiles tels que ceux employés dans ce projet.



**Figure 185:** Déprotection du linker **492** par le HCl généré *in situ*.

#### 4.5. Synthèse linéaire

Cette fois-ci, nous avons tenté une synthèse linéaire. La stratégie consiste d'abord à traiter les alcools allyliques acylés **480** et **481** avec l'excès de la *N,N'*-diméthyléthylènediamine (1,5 équiv.) dans le dichlorométhane à 0°C (Figure 186). Après 1 h, les produits correspondants **502** et **503** ont pu être isolés sous formés d'huiles incolores après une extraction et un lavage aqueux basique. Ces derniers ont été utilisés directement dans l'étape suivante.

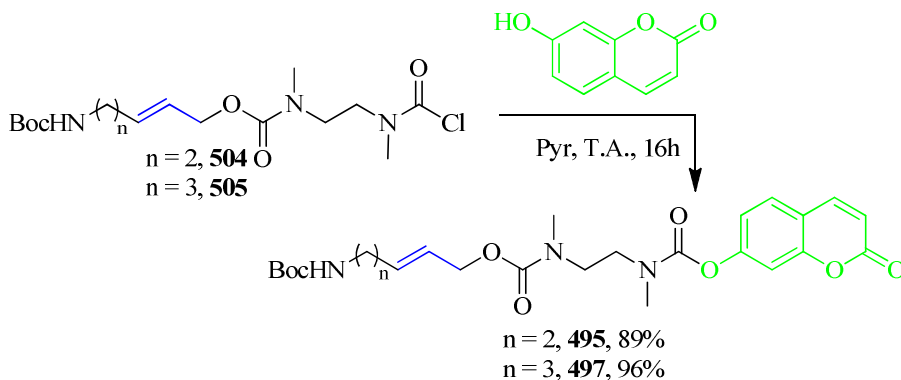


**Figure 186:** Acylation des amines **502** et **503** par le triphosgène.

#### Partie IV : Prodrogues bioréductibles *via* la réaction de Tsuji-Trost

Cette réaction présente plusieurs avantages : elle est rapide car au bout d'une heure, elle est complète. De plus elle donne non seulement d'excellents rendements mais également la purification est très simple au moyen d'un work up basique aqueux. Une fois ces amines **502** et **503** en mains, nous avons entrepris directement leur couplage à l'ombelliférone. D'abord, ces amines ont été traitées avec le triphosgène (1,1 équiv.) en présence de la pyridine. Les chlorures de carbamoyle correspondants **504** et **505** ont été isolés avec des bons rendements après purification sur colonne (Figure 186).

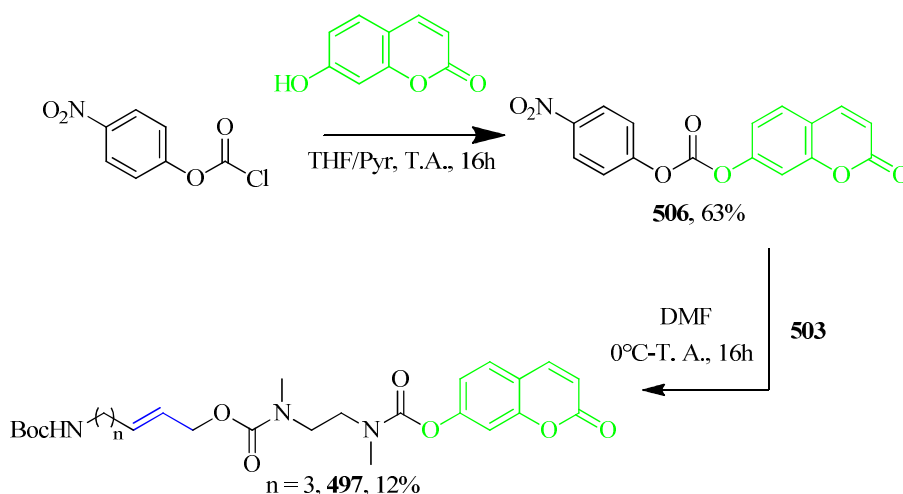
Ces derniers ont été directement couplés à l'ombelliférone pour donner les carbamates correspondants **495** et **497** avec d'excellents rendements. Pour ce faire, les chlorures de carbamoyles **504** et **505** ont été traités avec 0.7 équivalents d'ombelliférone dans la pyridine pendant 16 h à T. A. (Figure 187). Signalons également que ces deux dernières étapes de couplage offrent une purification aisée car il n'y a pas de produits secondaires formés et les conversions sont totales.



**Figure 187:** Couplage des chlorures de carbamoyle **504** et **505** à l'ombelliférone.

Dans le but de ne pas utiliser le triphosgène pour des raisons de toxicité, une autre voie de couplage des amines **502** et **503** à l'ombelliférone a été adoptée. La première étape consiste en l'acylation de l'ombelliférone par du *p*-nitrophenyl chloroformiate. Elle est suivie dans la seconde étape d'une réaction de

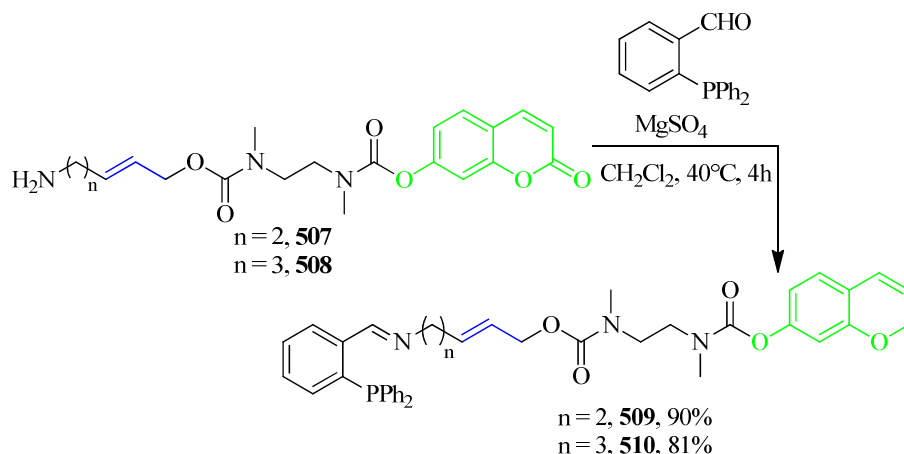
substitution nucléophile par des amines **502** et **503** (Figure 188). Dans un premier temps, le carbonate **506** a été isolé sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 63%. Cependant la réaction de couplage dans la seconde étape a donné le produit attendu **497** avec de très faibles rendements (12% lorsque la DMF est utilisée) et beaucoup de sous-produits de couplage.



**Figure 188:** Couplage du carbonate **506** à l'amine **503**.

#### 4.6. Synthèse des iminophosphines précurseurs des complexes

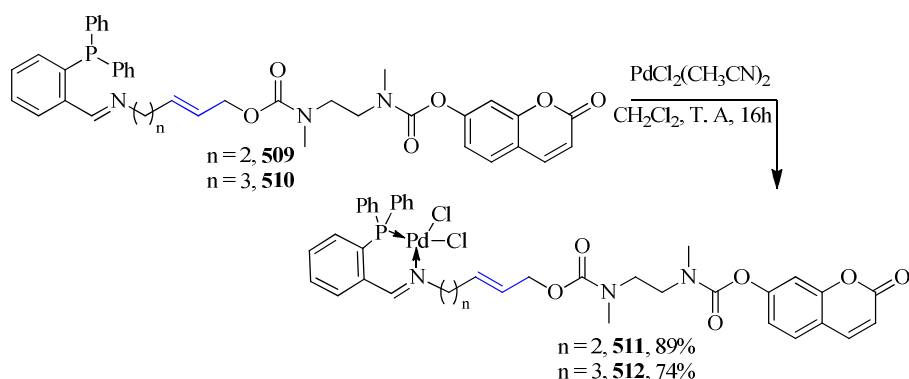
Une fois ces carbamates **495** et **497** en mains, le Boc a été déprotégé en conditions acides par du TFA. Les sels d'ammonium correspondants ont été ensuite repris dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et lavés avec une solution aqueuse saturée en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en contrôlant le pH jusqu'à 10. Les amines primaires libres correspondantes obtenues ont été ensuite utilisées dans l'étape suivante. Les ligands iminophosphines ont été obtenus par condensation de ces amines libres sur le diphenylphosphino benzaldéhyde (Figure 189). Cette condensation est réalisée au reflux du dichlorométhane pendant 4 heures. Les iminophosphines **509** et **510** sont obtenues sous formes des solides jaunes par cristallisation à l'éther avec d'excellents rendements.



**Figure 189:** Synthèse des iminophosphines, précurseurs des prodrogues.

#### 4.7. Complexation des imines au palladium

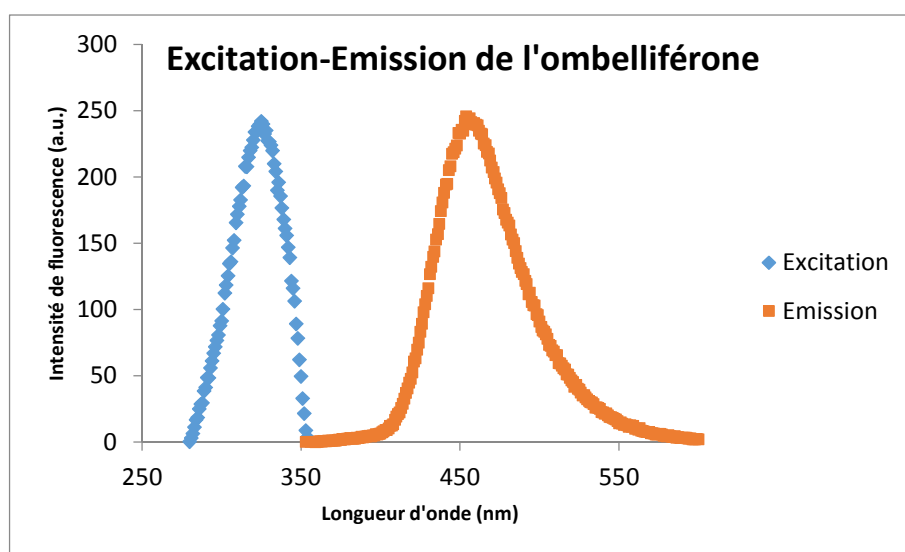
Les iminophosphines **509** et **510** étant les premiers ligands que nous avons obtenus, ils ont été complexés avec 1 équivalent du  $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$  dans le dichlorométhane. Après 16 heures d'agitation à température ambiante, le brut a été filtré sur célite. L'ajout de l'éther a permis de précipiter les complexes **511** et **512** désirés sous forme de solides jaune pâle avec de bons rendements (Figure 190).



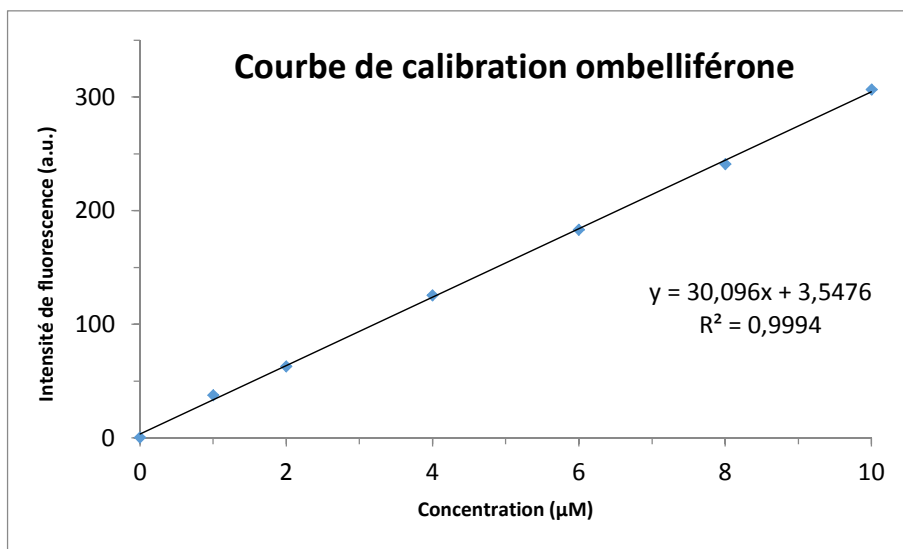
**Figure 190:** Synthèse des prodrogues par complexation des iminophosphines au palladium.

## 5. Vérification de la validité du concept

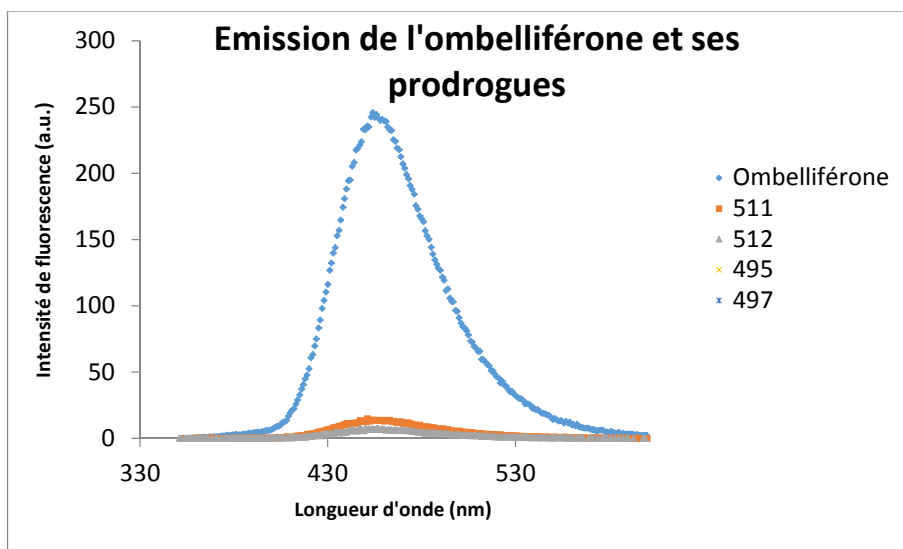
Afin de valider notre hypothèse de départ selon laquelle ces prodrogues pourront libérer la drogue par bioréduction par des réductases cellulaires classiques, nous avons d'abord réalisé la réduction chimiquement afin de suivre la réaction par spectroscopie en fluorescence pour préparer nos outils d'analyse. Comme dans les premiers projets, le réducteur choisi a été l'ascorbate de sodium. Tout d'abord, les spectres d'excitation-émission de l'ombelliférone ont été enregistrés (Figure 191). Ensuite, une courbe de calibration a été établie sur l'ombelliférone afin de pouvoir quantifier le retour de la fluorescence (Figure 192). La courbe de calibration a été réalisée sur des solutions fraîchement préparées dans DMSO/H<sub>2</sub>O <1/100 dans des concentrations diluées de 1  $\mu$ M à 10  $\mu$ M.



**Figure 191:** Spectres d'excitation (bleu), et d'émission (orange) de l'ombelliférone dans le H<sub>2</sub>O/DMSO : 99/1, concentration 10  $\mu$ M.



**Figure 192:** Courbe de calibration par fluorescence réalisée au départ de l'ombelliférone en solution aqueuse de 1 μM à 10 μ M.dans DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/99,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 325 nm.

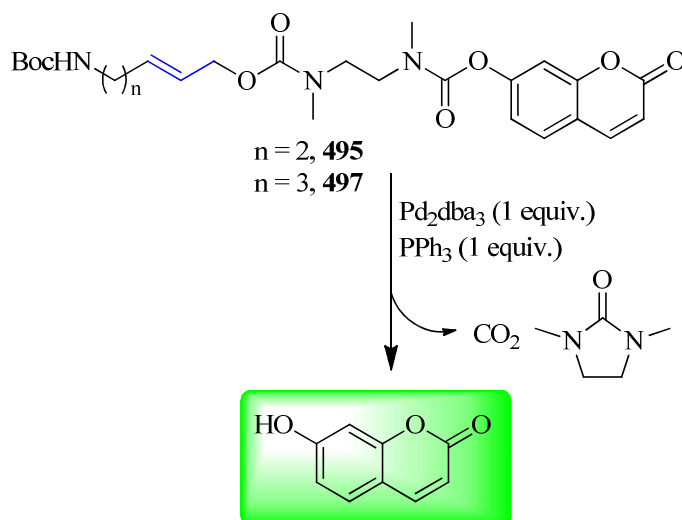


**Figure 193:** Fluorescence de l'ombelliférone et les prodrogues 495, 497, 511 et 512 en solution DMSO/H<sub>2</sub>O : 99/1, concentration 10 μM,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 325 nm.

Avant de commencer les expériences de réduction des palladacycles, nous avons d'abord enregistré les spectres d'émission des carbamates **495**, **497** et des complexes de palladium correspondants **511** et **512** (Figure 193). A la même longueur d'onde d'excitation et à différentes concentrations, nous avons remarqué que tous ces 4 produits ne sont pas fluorescents, ce qui montre que la fonction OH de l'ombelliférone est complètement bloquée. Ceci devrait donc faciliter l'analyse de libération du fluorophore par la spectroscopie en fluorescence. De plus, ceci nous indique également qu'il est possible de détecter l'ombelliférone par rapport à ces produits.

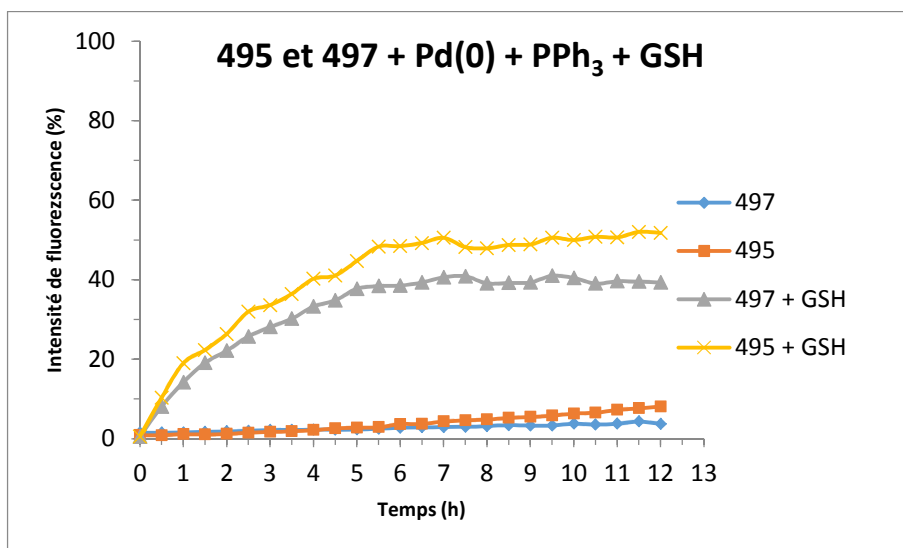
### 5.1. Test sur les carbamates simples

Le retour de la fluorescence a été d'abord testé sur les carbamates **495** et **497** en solution diluées de concentration 5  $\mu$ M. Ces produits ont été traités avec un équivalent de  $\text{Pd}_2\text{dba}_3$ , source de palladium (0) et en présence de deux équivalent de  $\text{PPh}_3$  (Figure 194).



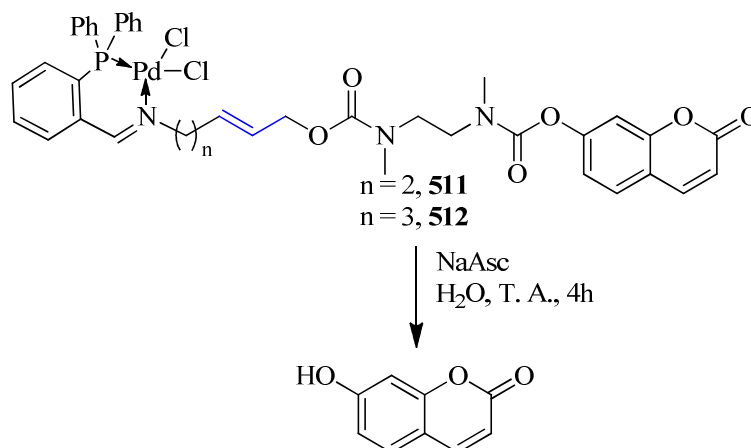
**Figure 194:** Activation réductrice des produits **495** et **497**.

Le retour de la fluorescence est lent et faible pour les deux produits traités. Le rendement maximal observé est inférieur à 10% après 24h, 15% après 30h (Figure 195). Ces mesures ont été effectuées d'abord sous agitation continue dans une cellule UV-vis. Ensuite, nous avons évalué l'influence de la température. Pour ce faire, les réactions ont été réalisées dans le ballon à 37 °C avec des prélèvements à des intervalles de temps réguliers. Dans ces dernières conditions, le retour de la fluorescence a été toujours lent comme précédemment et le maximum observé a été de 28% après 30 h. L'ajout du nucléophile, le glutathion a montré un effet positif.



**Figure 195:** Fluorescence des produits **495** et **497** traités avec le Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (1 équiv.) et en présence de la PPh<sub>3</sub> (2 équiv.), avec ou sans nucléophile glutathion (1.2 équiv.). Concentration finale 5 µM en DMSO/H<sub>2</sub>O : < 1/99, excitation  $\lambda_{\text{exc}}$  = 325 nm.

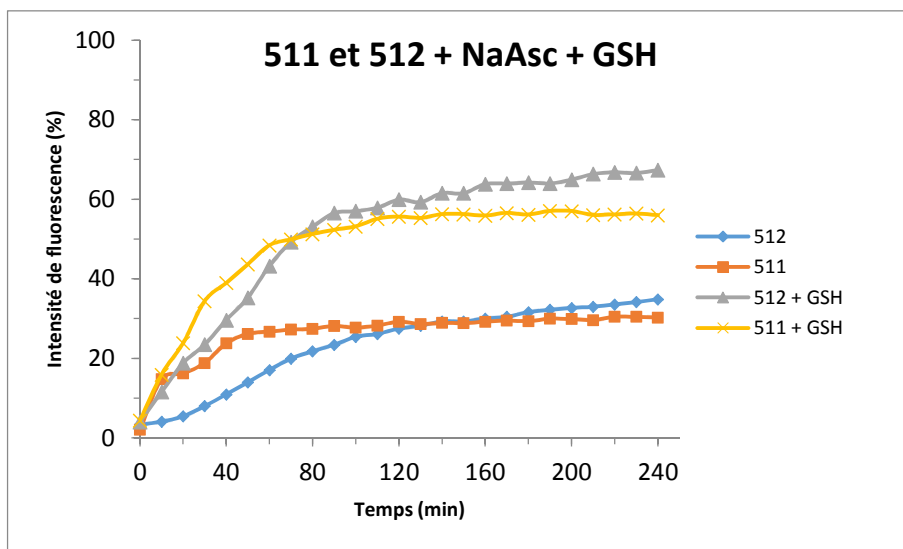
## 5.2. Réduction des prodrogues par l'ascorbate de sodium



**Figure 196:** Réduction des prodrogues **511** et **512** par l'excès d'une solution aqueuse d'ascorbate de sodium (10 équiv.), avec ou sans nucléophile glutathion (1.2 équiv.).

Concentration finale 5  $\mu\text{M}$  en DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$  : < 1/99, excitation  $\lambda_{\text{exc}} = 325 \text{ nm}$ .

Ces tests ont ensuite été réalisés sur deux prodrogues **511** et **512**. Ces palladacycles en solution aqueuse ont été traités par un excès d'une solution d'ascorbate de sodium (10 équiv.) (Figure 196). Cette étude nous a permis de montrer que la cinétique est rapide et que l'équilibre est atteint directement au bout de 4 heures. Le rendement maximal observé dans ces dernières conditions est inférieur à 40 % pour les deux prodrogues, il oscille entre 30 et 35 % (Figure 197). Au vu de ces faibles rendements, nous avons tenté de pousser la cinétique en ajoutant un nucléophile capteur de  $\pi$ -allyle. Nous avons choisi le glutathion dont l'usage a été développé dans nos travaux. Bien que les rendements soient faibles, nous avons remarqué que ces prodrogues sont bien activées par des réducteurs comme nous l'avions supposé au départ. Cependant, à ce stade nous ne pouvons pas tirer conclusion quant à l'effet de la taille de l'espaceur. Concrètement, les prodrogues avec un espaceur du nombre d'atomes de carbone  $n = 2$  et 3 affichent un même profil d'activation.



**Figure 197:** Fluorescence des palladacycle **511** et **512** traités par le NaAsc (10 équiv.) pendant 4 h avec ou sans nucléophile glutathion (1.2 équiv.). Concentration 5  $\mu$ M dans DMSO/H<sub>2</sub>O 1<99,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 325 nm.

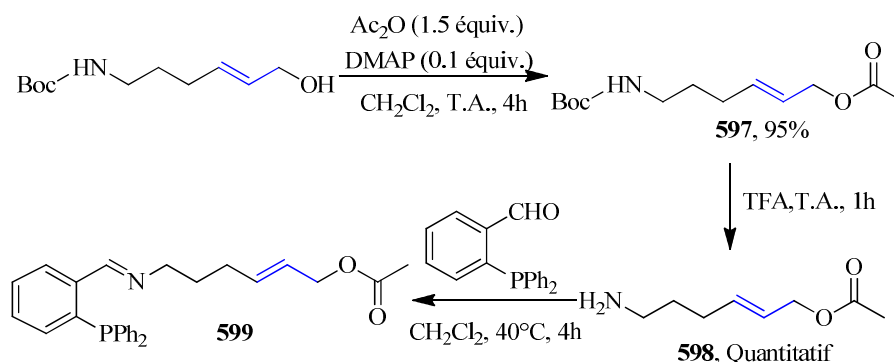
## 6. Conclusion

Deux palladacycles **511** et **512** stables à l'air ont été successivement synthétisés et caractérisés. Les premiers tests de fluorescence en solution nous ont montré qu'ils ne sont pas fluorescents. La réduction de ces palladacycles avec un excès d'ascorbate de sodium a permis libérer le fluorophore qui est le rapporteur. Cette observation est un premier pas vers des tests de libération du rapporteur *in cellulo*.

Au niveau des perspectives à court terme, nous pouvons directement envisager la mise en évidence de la formation du  $\pi$ -allyle et tenter de l'isoler. Nous avons déjà démarré sur ce point. Les alcools allyliques **476** et **477** ont été acylés au moyen de l'anhydride acétique en présence d'une quantité catalytique de la DMAP dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les produits acylés ont été obtenus avec d'excellents rendements 95% après 4 heures d'agitation à température ambiante. Ensuite le

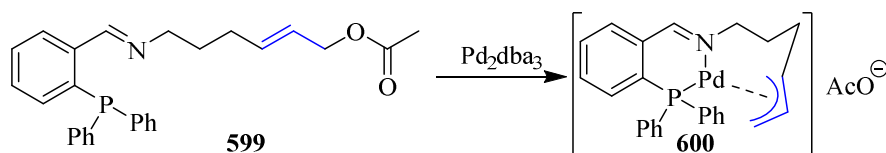
Partie IV : Prodrogues bioréductibles *via* la réaction de Tsuji-Trost

Boc a été déprotégé au moyen du TFA et les sels correspondants obtenus ont été lavés avec une solution aqueuse saturée en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en contrôlant le pH jusqu'à ce qu'il arrive à 10. Les amines libres obtenues ont ensuite réagi avec 1 équivalent de diphenylphosphino benzaldéhyde (Figure 198) pour obtenir le ligand **599**.



**Figure 198:** Synthèse de l'imino-phosphine simple **599**.

Ici nous avons eu des difficultés d'isoler le complexe de palladium  $\pi$ -allyle. Il faudra peut-être traiter le ligand seulement avec un équivalent de  $\text{Pd}_2\text{dba}_3$ ; d'abord en tube RMN pour tenter d'observer le shift des protons allyliques. Si le  $\pi$ -allyle se forme et est observé, nous tenterons d'isoler le complexe (Figure 199). Dans ce cas, nous envisageons jouer sur la nature du contre-anion ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ) pour mieux stabiliser ce complexe et pour pouvoir l'isoler plus facilement.

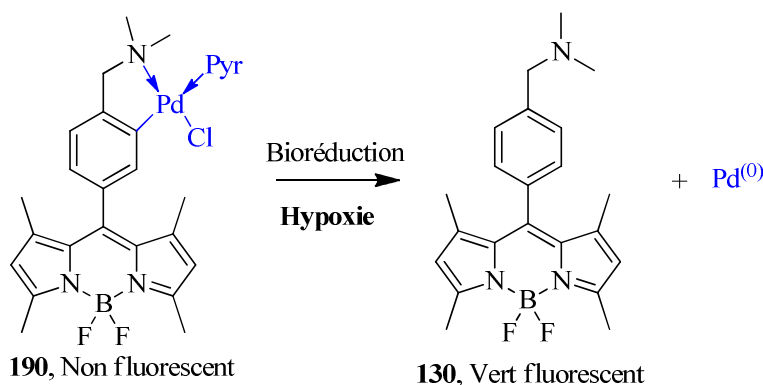


**Figure 199:** Formation du complexe  $\pi$ -allyle palladium.

# Conclusion générale et perspectives

## Conclusion générale

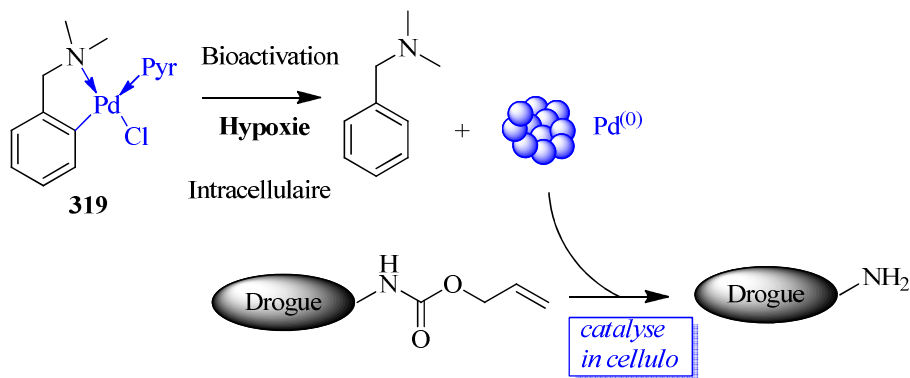
Dans la première partie de cette thèse, nous avons synthétisé trois classes des complexes de palladium (II) complexé à un ligand fluorescent BODIPY. Ces complexes non fluorescents ont été soumis à des réductions dans des cellules cancéreuses. Après un criblage de plusieurs paramètres, nous avons trouvé que seul le complexe **190** avec le ligand pyridine serait un marqueur de l'hypoxie tumorale dans les cellules cancéreuses avec des taux élevés de NADH (Figure 200). Cette étude nous a permis de remarquer que ce complexe s'internalise dans les cellules cancéreuses pour libérer le palladium (0) après réduction.



**Figure 200:** Marqueur potentiel de l'hypoxie tumorale.

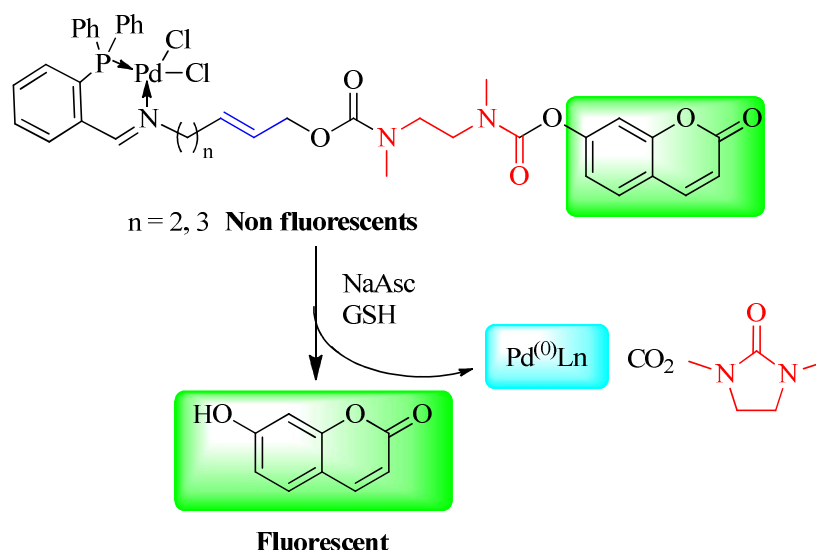
L'étude détaillée du mécanisme de réduction sélective réalisée sur l'analogue simple de ce marqueur **319** nous a permis de montrer que son activation libère du palladium (0) dans des conditions faiblement oxygénées. Celui-ci s'agrège en formant des nanoparticules de palladium. Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons développé une réaction de catalyse organométallique grâce ce palladium (0) généré *in situ* pour activer une prodrogue cytotoxique dans des

cellules cancéreuses (Figure 201).



**Figure 201:** Déprotection d'une drogue cancéreuse par catalyse organométallique.

Dans la troisième partie de cette thèse nous avons développé un modèle simplifié qui porte à la fois la drogue cytotoxique et le précatalyseur de palladium. Ce système sera plus facile à contrôler pour des applications *in cellulo* par rapport au cas précédent. Dans un premier temps, l'ombélliferone a été utilisé comme rapporteur pour des facilités pratiques. Les études préliminaires réalisées par réduction de ces prodrogues non fluorescentes par un excès d'ascorbate de sodium nous a permis de restaurer la fluorescence de l'ombélliferone (Figure 202). Ces premières observations sont encourageantes pour des futurs tests *in cellulo*.

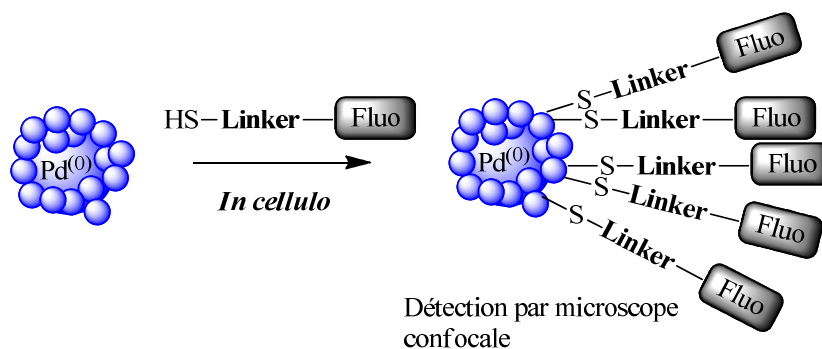


**Figure 202:** Prodrogues bioactivables via la réaction de Tsuji-Trost.

## Perspectives

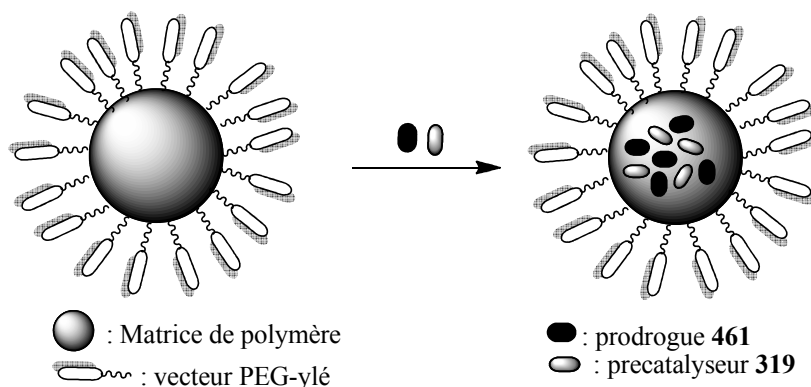
Nous avons acquis de l'expérience qui peut ouvrir plusieurs horizons pour la suite de ces travaux toujours dans le domaine de la catalyse *in cellulo*. Dans un premier temps, il serait intéressant d'analyser la nature et la distribution intratumorale des espèces de palladium libérées dans les cellules lors de l'activation des complexes de palladium utilisés. La même réaction réalisée *in vitro* a mis en évidence la formation des nanoparticules de palladium. Si tel est le cas également dans les cellules tumorales, ces nanoparticules de palladium seraient intéressantes ; elles ont déjà montré bon nombre d'applications dans le traitement du cancer depuis plusieurs années.<sup>199</sup> Bien que cette caractérisation ne soit pas très aisée, les méthodes analytiques couramment utilisées comme la TEM ou la microscopie optique peuvent être envisagées sur des lysats cellulaires.<sup>199</sup> Dans ce dernier cas, nous envisageons d'incuber les cellules avec le palladacycle et la prodrogue puis d'ajouter un agent fluorescent capable de complexer les nanoparticules de palladium générées *in situ* et de réaliser les

caractérisations par microscopie à fluorescence confocale (Figure 203). Un ligand soufré connecté au fluorophore peut être utilisé.



**Figure 203:** Mise en évidence de la formation des nanoparticules par une méthodologie à fluorescence confocale.

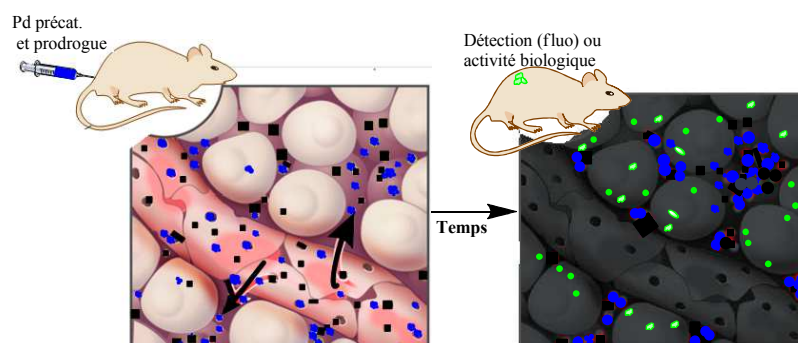
Le deuxième point à envisager consisterait à la quantification du palladium accumulé dans les cellules tumorales. Cette analyse quantitative pourra être réalisée par la spectrométrie de masse à plasma couplé par induction (ICP-MS), une méthode couramment utilisée en analyse élémentaire.<sup>200</sup> Pour ce faire, les cellules seront incubées avec le pré catalyseurs de Pd et la prodrogue dans les mêmes conditions que celles employées dans cette thèse. Enfin, l'ICP-MS sera réalisée sur les cellules lysées.



**Figure 204:** Incapsulation de la prodrogue 461 et précatalyseur de palladium 319 dans la matrice de polymère.

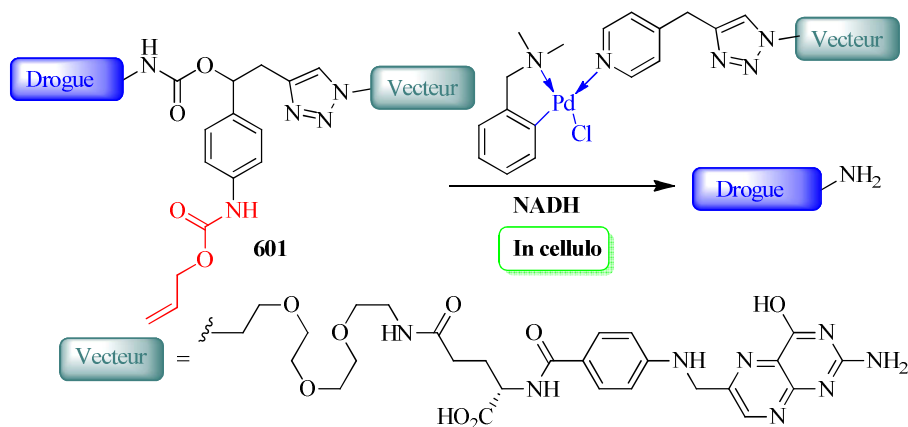
## Conclusion et perspectives

Dans le futur des applications *in vivo* peuvent être envisagées. Dans un premier temps, un choix adéquat des vecteurs capables d'acheminer la prodrogue et le précatalyseur jusque dans les cellules tumorales est nécessaire. Un polymère qui forme des micelles en milieu aqueux peut être utilisé comme vecteur. La prodrogue **461** et le précatalyseur de palladium **319** seront encapsulés dans la matrice polymérique (Figure 204) pour ainsi être délivré *via* un passage passif. Une fois libérés à l'intérieur de la tumeur, la restauration de l'activité à savoir l'inhibition de RTK est attendue après activation du précatalyseur par le NADH cellulaire. Cette vectorisation sera facilitée par l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention Effect) plus marquée dans les cellules tumorales (Figure 205).<sup>201, 202</sup>



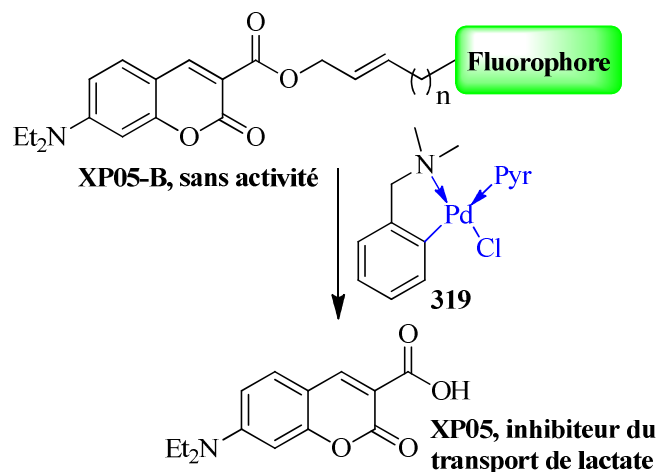
**Figure 205:** Suivi dans le temps de la prodrogue et du précatalyseur de palladium encapsulés dans les micelles pour une meilleure vectorisation.<sup>202</sup>

Un autre moyen de vectorisation consisterait à faire le *design* d'une prodrogue **601** qui porte l'unité centrale, sur laquelle sont attachés en plus la drogue, l'acide folique vecteur reconnaissable par les récepteurs de folate, surexprimés à la surface des cellules cancéreuses et le groupement protecteur de type alloc livable par le biais de la catalyse organométallique. Une méthodologie de vectorisation pareille a été développée par l'équipe du Professeur Sébastien Papot.<sup>203</sup> De la même manière, le précatalyseur peut être légèrement modifié en attachant le vecteur sur la pyridine (Figure 206).



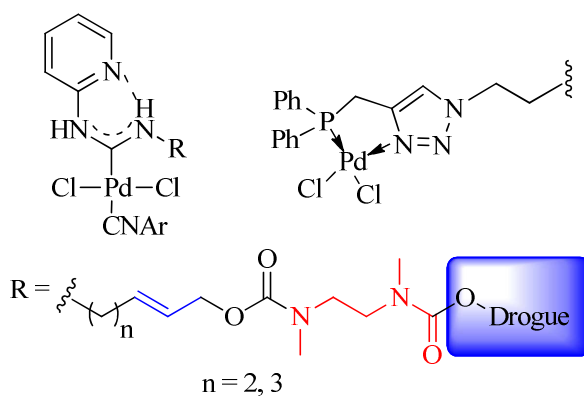
**Figure 206:** Prodrogue modifiée portant l'acide folique, vecteur reconnaissable par les recepteurs cellulaires.

Toujours dans le domaine de la catalyse, la méthodologie développée pour activer la prodrogue **461** peut être testée sur d'autres drogues cytotoxiques. Nous sommes entrain de développer le système **XP05-B** pour être utilisé comme sonde en FRET (Forster Energy Resonance Transfer). Ce système est composé d'une coumarine **XP05** qui est un inhibiteur du transport de lactate dont ses activités biologiques ont été bloquées en la couplant à un autre fluorophore connectés par un linker de type allyle.<sup>204, 205</sup> L'incubation de ce système avec le précatalyseur **319** dans les cellules cancéreuses avec des taux élevés de NADH restaurera l'activité de la coumarine avec perte du FRET (Figure 207).



**Figure 207:** Activation du système **XP05-B** par le précatalyseur de palladium **319**.

Pour le système simplifié **511** et **512**, une fois son efficacité validée, l'ombélliferrone sera remplacé par une drogue cytotoxique. Dans la suite, l'activation sélective en hypoxie sera recherchée en employant le ligand pyridine sur le palladium. D'autre part, des ligands comme les triazoles ou les ADCs (carbènes diamino acyliques) peuvent être envisagés (Figure 208).



**Figure 208:** Ligands pouvant être utilisés pour une prodrogue plus simplifiée.



## Partie V : Experimental section



## 1. Chemistry section

### 1.1. General information

#### 1.1.1. Chemicals, solvents and purifications

Commercial reagents were purchased from Acros, Sigma-Aldrich, ABCR, TCI or Selleckchem and used without further purification unless stated otherwise. Unless otherwise stated, all manipulations were performed under an argon atmosphere using flame dried flasks. Toluene was distilled on sodium under an argon atmosphere. Diethyl ether and THF were distilled on sodium/benzophenone under an argon atmosphere. Dichloromethane and acetonitrile were distilled on  $\text{CaH}_2$  under an argon atmosphere. Solvents used for work-up were of technical grade. **Flash Column Chromatography** was performed on ROCC 60 (40-63  $\mu\text{m}$ ) silica gel. Solvents used are of technical grade. **Thin Layer Chromatography** (TLC) was performed on commercially available MERCK 5179, 250 mesh with fluorescent indicator 60 F<sub>254</sub>; and revealed under UV at 254 nm and with an ethanoic solution of *p*-anisaldehyde (10 % w/v) or with a basic solution of potassium permanganate ( $\text{KMnO}_4$ ).

#### 1.1.2. Equipments

All  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker DPX 300 MHz Fourier Transform Spectrometer operating at 300 MHz for  $^1\text{H}$  and at 75 MHz for  $^{13}\text{C}$  in the deuterated solvents at room temperature. Chemical shifts are reported on the scale in ppm using the residual non-deuterated solvents as the internal standard or the  $^{13}\text{C}$  natural abundance of the deuterated solvent. Spectral features were designed as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet and br = broad. **Infrared** (IR) spectra were recorded as a liquid deposition on a ZnSe crystal on a Shimadzu FTIR 8400 Spectrometer from 4000  $\text{cm}^{-1}$  to 400  $\text{cm}^{-1}$ . All samples were run neat and frequencies are reported in  $\text{cm}^{-1}$ . Only frequencies corresponding to significant functional groups are reported.

**Mass spectra** were obtained using a ThermoFinnigan LCQ Quantum spectrometer for electrospray ionization (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) or using a FinniganMat TSQ7000 for chemical ionization (CI). **High resolution Mass Spectra** (HRMS) were obtained from a Thermo Scientific QExactive, with accurate mass reported for the molecular ion or suitable fragment ions. **Microwave** assisted heating was carried out by irradiating the mixture in a microwave oven. **Fluorescence experiments:** Room temperature spectroscopic experiments were recorded on a Varian Cary Eclipse scanning spectrofluorometer equipped with a Xenon flash lamp. Samples for excitation and emission were contained in 1 cm x 1 cm quartz cuvette (3.5 mL volume). Measurements were performed with appropriate excitation and emission wavelengths for each fluorophore as shown later.

**Dynamic Light Scattering** (DLS) analyses were carried out on a Malvern CGS-3 apparatus equipped with a He-Ne laser. To determine nanoparticle size distribution, a sample (2 mL) was introduced in a glass tube and DLS was performed at 25 °C with a wavelength of emission at 632 nm. The intensity-based z-averaged hydrodynamic diameters were reported based on three scans to improve the accuracy.

**Transmission Electron Microscopy** (TEM) images were observed with a LEO 922 OMEGA Energy Filter Transmission Electron Microscope at 200 kV. The solid samples were suspended in hexane and sonicated for 5 minutes. Thereafter, they were allowed to settle to discard the biggest particles. One drop of the supernatant was deposited on a carbon-coated copper grid, which was firstly dried overnight under vacuum at room temperature, before analyses.

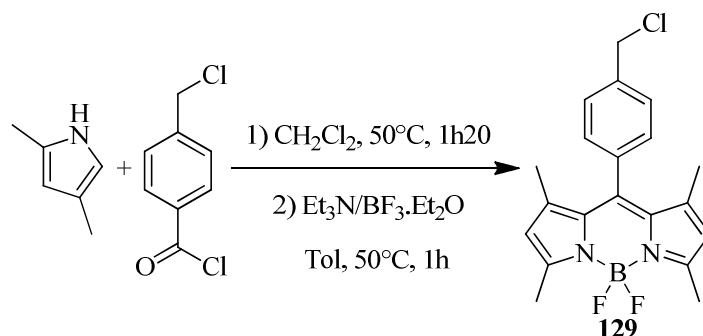
**X-ray Photoelectrons Spectroscopy** (XPS) analyses were performed at room temperature on a SSI-X-probe (SSX-100/206) spectrometer from Fisons connected to a computer running the S-probe software equipped with a monochromatized microfocus Al X-ray source. The samples were fixed on small troughs with a double-face adhesive tape on small brass troughs and placed on a ceramic carousel (Macor®, Switzerland). To avoid charge effects, a nickel grid of

3 mm O-ring was placed above the samples. The created surface charges were neutralized by an 8 eV electron flood gun. The binding energies were calibrated with reference to the C-C, H component of the C 1s peak which was fixed at 284.8 eV. Data interpretation was performed using a CasaXPS software program. The peaks were decomposed using curves with an 85% Gaussian type and a 15% Lorentzian type after subtraction of a Shirley type baseline.

## 1.2. Synthesis of BODIPY palladium complexes

### 1.2.1. Synthesis of BODIPY ligand

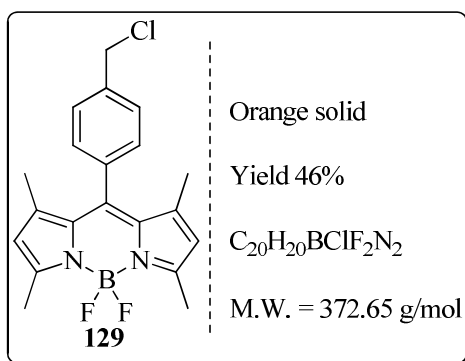
It was obtained by applying the procedure reported in the literature.<sup>139</sup>



A 100 mL round bottom flask was charged dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) followed by 2, 4-dimethylpyrrole (1.03 mL, 0.951 g, 9.998 mmol, 2.1 equiv.). Under inert atmosphere of argon, 4-(chloromethyl) benzoyl chloride (0.9 g, 4.76 mmol, 1 equiv.) was added in small portions. The reaction mixture was then heated in an oil bath at 50°C during 1h20 min and then allowed to warm to room temperature. The solvent was removed *in vacuo* until 3-5 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> remained. Dry toluene (50 mL) was added to the flask and the solution was put under an inert atmosphere of argon. Dry triethylamine (3 mL) was added in one portion and the reaction was allowed to stir at room temperature. After 15 min, BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O was added drop wise. The flask was charged with a water cooled condenser and the reaction was then heated at 50°C for 1 h and subsequently allowed to cool to room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the

## Partie V : Experimental section

residue was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL). The organic layer was washed with water (3 x 15 mL) and then dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated. The crude was purified by flash chromatography on silica gel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : PE (50:50, there after 80:20) to provide 129 as an orange solid.

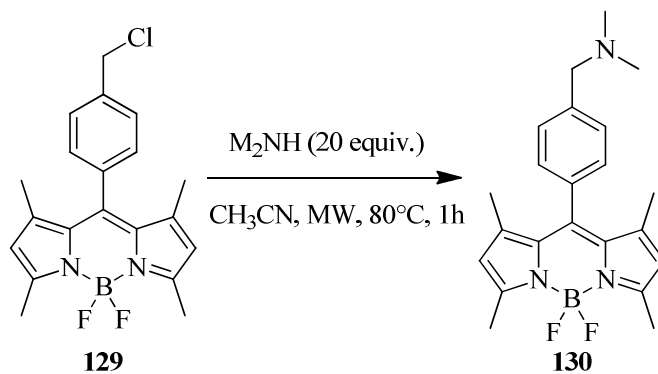


$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.52 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 7.29 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 5.98 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 2.55 (s, 6H), 1.37 (s, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 155.81, 143.16, 141.10, 138.73, 135.23, 131.21, 129.41, 128.56, 121.48, 45.74, 14.73, 14.61

MS ESI (+)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BF}_2\text{N}_2\text{Cl}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  395.64; found 396.18

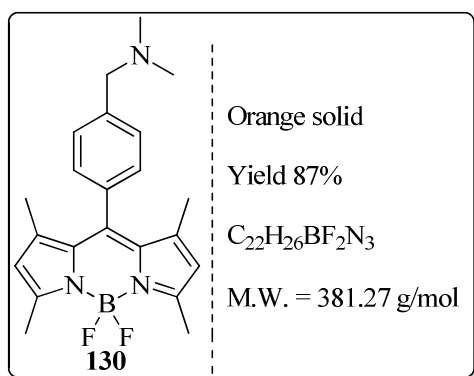
IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2921, 1541, 1504, 1467, 1407, 1303, 1188, 1151, 1064, 1049, 973, 811, 761, 721.



A microwave vial (CEM corp.) was charged with 129 (376 mg, 1.009 mmol, 1 equiv.),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (278 mg, 2.018 mmol, 2 equiv.), and KI (0.335 mg, 2.018 mmol, 2 equiv.). A magnetic stir bar was added and the vial was then charged with  $\text{CH}_3\text{CN}$  (5 mL) and  $\text{Me}_2\text{NH}$  (2.3 mL aq. 40 wt %, 20 mmol, 20 equiv.). The microwave vial cap was fixed onto the vial and the reaction mixture was heated at  $80^\circ\text{C}$  (100 W) for 40 min followed by 20 min at  $100^\circ\text{C}$ . The vessel was cooled back to room temperature and the mixture was diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30

## Partie V : Experimental section

mL). The organic layer was washed with water (2 x 15 mL) and brine (1 x 20 mL). The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo*. The resulting residue was purified by flash chromatograph on silica gel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt/MeOH/Et<sub>3</sub>N (66/30/3/1 and thereafter by 45/45/9/1) to afford 130 as an orange solid.



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.45 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 5.98 (s, 2H), 3.52 (s, 2H), 2.55 (s, 6H), 2.28 (s, 6H), 1.39 (s, 6H).

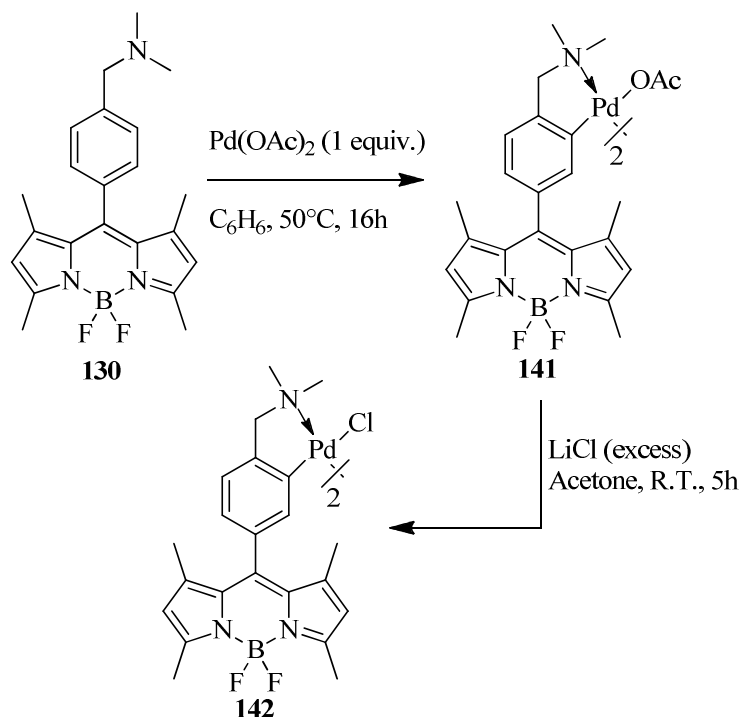
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 155.48, 143.18, 141.86, 139.74, 133.97, 131.76, 130.10, 128.02,

121.33, 64.12, 45.32, 14.69, 14.45

MS ESI (+) *m/z* calcd for C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 404.26; found 404.17

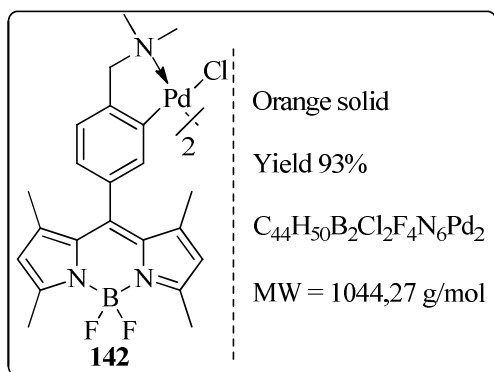
IR (film, cm<sup>-1</sup>): 2927, 2858, 2815, 2769, 1510, 1469, 1407, 1363, 1307, 1261, 1191, 1155, 1081, 979, 813, 756, 709.

### 1.2.2. Complexation of the BODIPY ligand<sup>139</sup>



A round bottom flask was charged with **130** (90 mg, 0.2338 mmol, 1.05 equiv.) and  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (50 mg, 0.2227 mmol, 1 equiv.). A magnetic stir bar was added and benzene (5 mL). The mixture was sonicated for 3 minutes, and then argon atmosphere was established. The flask was wrapped in foil to protect from light and the reaction mixture was stirred overnight in a  $50^\circ\text{C}$  oil bath. The reaction was cooled to room temperature and hexane (3 mL) was added to precipitate **141** as an orange solid. It was collected *via* filtration and washed with a minimum cold hexane to provide the acetate bridged dimer (120 mg) that co-crystallized with benzene. It was dissolved in acetone (5 mL) that had been saturated with LiCl. This mixture was stirred at room temperature protected from light for 5 hours. The solvent was removed *in vacuo* and the resulting solid residue was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) and filtered through a pad of celite. The pad of celite was washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  until it becomes clear. The solvent

was removed to provide the chloride dimer 142 as an orange solid. Yield 109 mg, 0.209 mmol, 93%.



$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 7.02 (s, 1H), 6.95 (d,  $J$  = 7.61 Hz, 2H), 6.86 (d,  $J$  = 7.59 Hz, 2H), 5.96 (s, 2H), 3.97 (s, 2H), 2.83 (s, 6H), 2.53 (s, 6H), 1.46 (s, 6H).

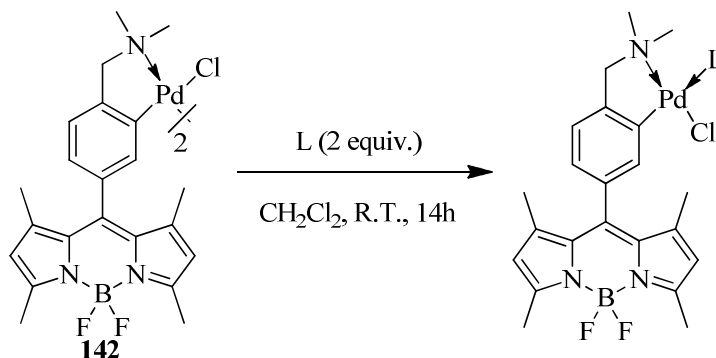
$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 155.03, 147.77, 144.10, 143.48,

131.84, 131.68, 131.47, 124.19, 121.93, 121.08, 73.17, 53.57, 14.68

MS ESI (+)  $m/z$  calcd for  $C_{44}H_{50}B_2Cl_2F_4N_6Pd_2$  [(M-M) $_2$  + Na] $^+$  1067.27; found 1066.88.

IR (film,  $cm^{-1}$ ): 2921, 1541, 1508, 1465, 1305, 1193, 1155, 1072, 981, 815, 756, 703.

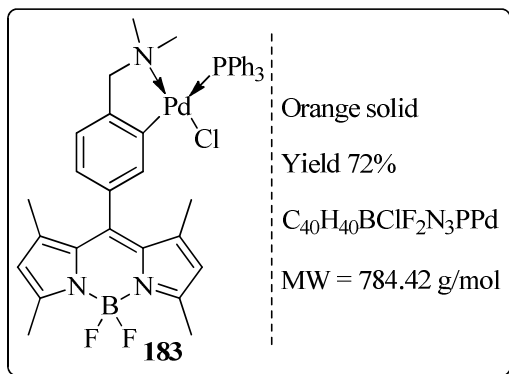
### 1.2.3. Synthesis of complexes of the first class



In a dried round bottomed flask 142 (75 mg; 0.072 mmol; 1 equiv.) was solubilized in  $CH_2Cl_2$  (8 mL) and a monodentate ligand (0.143 mmol; 2 equiv.) was added. The reaction was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere protected from light. It was concentrated to 2 mL under reduced pressure and hexane (5 mL) was added to precipitate the product. The reaction mixture was cooled at 0°C and triturated. The orange solid formed was collected

## Partie V : Experimental section

by filtration and washed with a minimum of cold hexane.



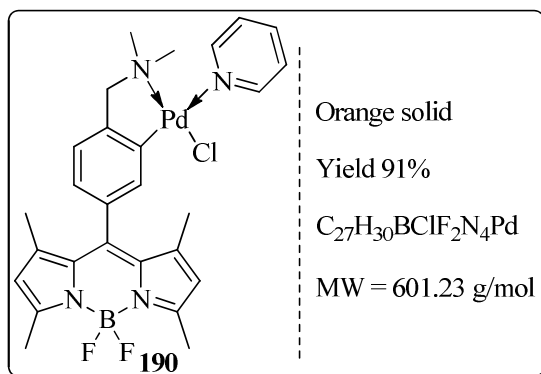
$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 7.67-7.61 (m, 6H), 7.31-7.22 (m, 9 H), 7.08 (s, 1H), 6.72 (d,  $J$  = 7.59 Hz, 1H), 6.08 (d,  $J$  = 7.42 Hz, 1H), 5.84 (s, 2H), 4.11(d,  $J$  = 1.45 Hz, 2H), 2.86 (s, 6H), 2.49 (s, 6H), 1.13 (s, 6H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 154.50, 150.89, 149.62, 142.89, 135.76, 135.21, 135.05, 131.46, 131.25, 131.11, 130.64, 130.46, 128.26, 128.11, 123.42, 122.80, 120.66, 73.09, 50.50, 14.56

$^{31}P$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 42.9

MS ESI (+)  $m/z$  calcd for  $C_{41}H_{40}BClF_2N_2PPd$   $[M + Na]^+$  748.42; found 748.09

IR (film,  $cm^{-1}$ ): 2923, 1541, 1508, 1307, 1193, 1155, 1085, 1074, 1054, 973, 756, 692.



$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 8.76 (d,  $J$  = 5.69 Hz, 2H), 7.77 (d,  $J$  = 7.53 Hz, 1H), 7.31 (dd,  $J$  = 7.64, 5.76 Hz, 2H), 7.08 (d,  $J$  = 7.56 Hz, 1H), 6.86 (d,  $J$  = 7.53 Hz, 1H), 5.93-5.91 (m, 3H), 4.05 (s, 2H), 2.92 (s, 6H), 2.49 (s, 6H), 1.41 (s, 6H).

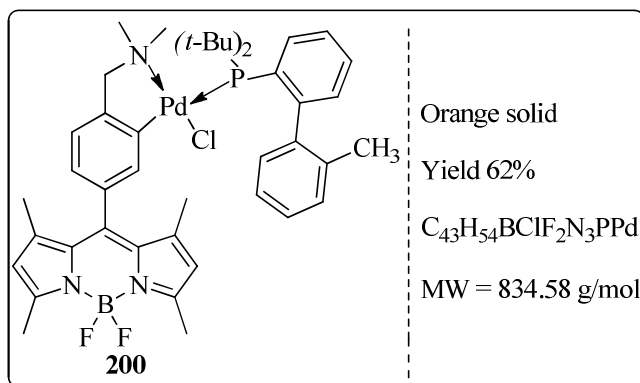
$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  =

155.09, 153.48, 153.34, 150.27, 148.17, 143.03, 142.90, 138.52, 131.95, 131.56, 131.08, 125.58, 125.11, 124.04, 122.12, 121.05, 74.10, 52.83, 14.64, 14.39

MS ESI (+)  $m/z$  calcd for  $C_{28}H_{30}BClF_2N_3Pd$   $[M + Na]^+$  622.24; found 622.02

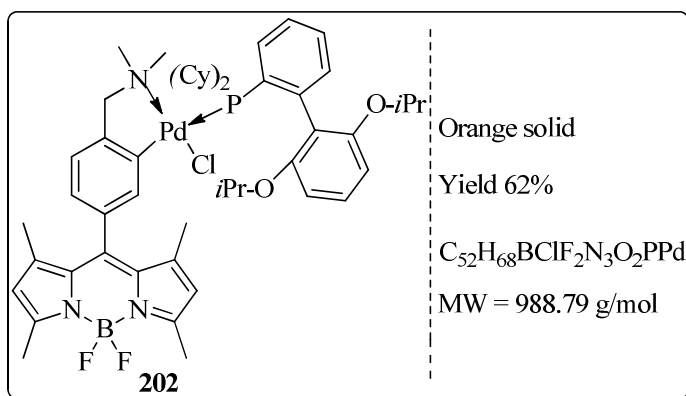
IR (film,  $cm^{-1}$ ): 2956, 2918, 2889, 2854, 1604, 1448, 1409, 1361, 1265, 1242, 1120, 1074, 1049, 856, 837, 810, 732, 694.

Partie V : Experimental section



$^{31}P$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 53.06  
MS APCI (+) m/z calcd for  $C_{43}H_{54}BClF_2N_3PPd$   $[M + H]^+$  835.56; found 835.13  
IR (film,  $cm^{-1}$ ): 2968, 2939, 1542,

1508, 1465, 1409, 1307, 1193, 1155, 1083, 981, 842, 756, 732.

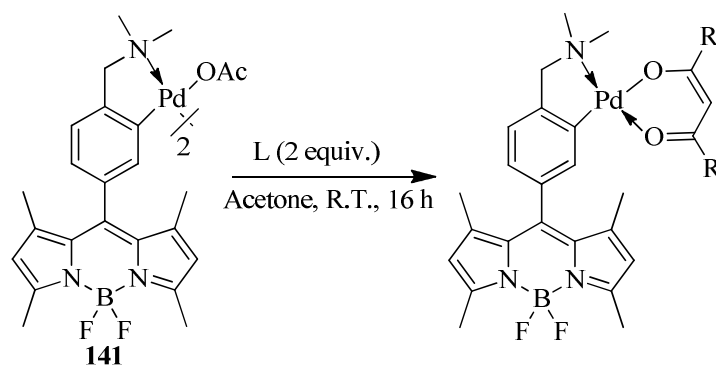


$^{31}P$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 35.93  
MS APCI (+) m/z calcd for

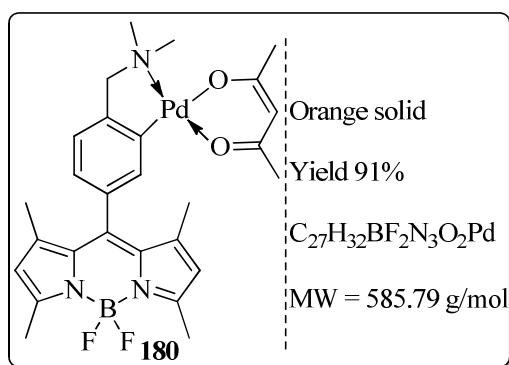
$C_{52}H_{68}BClF_2N_3O_2PPd$   $[M + H]^+$  989.77; found 990.35

IR (film,  $cm^{-1}$ ): 2972, 2921, 2852, 1591, 1542, 1510, 1448, 1371, 1307, 1244, 1193, 1155, 1112, 1056, 983, 850, 759, 730.

### 1.2.4. Synthesis of complexes of the second class



In a dried round bottomed flask, the ambidentate oxygen ligand (0.733 mmol, 5 equiv.) was suspended in anhydrous acetone (8 mL) and the complex 141 (80 mg; 0.1465 mmol; 1 equiv.) was added. The flask was wrapped in foil to protect from light and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction was concentrated under reduced pressure. The orange residue was diluted in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) and filtered through a pad of celite. The filter cake was washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 5 mL) and concentrated under reduced pressure to stay with a minimum solvent. Addition of ether afforded the desired complex as an orange solid complex.



$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.16 (s, 1H), 7.01 (d,  $J$  = 7.47 Hz, 1H), 6.86 (d,  $J$  = 7.50 Hz, 1H), 5.96 (s, 2H), 5.30 (s, 1H), 3.99 (s, 2H), 2.85 (s, 6H), 2.53 (s, 6H), 1.96 (s, 6H), 1.48 (s, 6H).

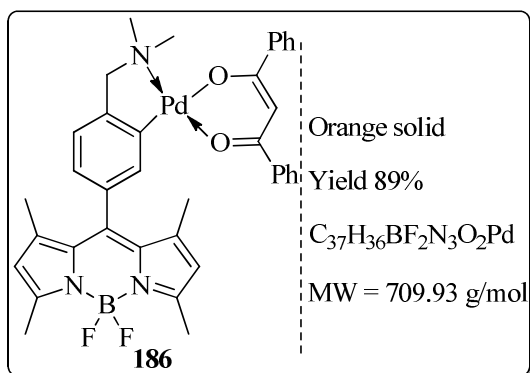
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  =

188.15, 186.87, 154.72, 147.81, 147.28, 144.17, 143.68, 131.86, 131.03, 129.80, 123.66, 121.26, 120.95, 100.35, 73.47, 51.89, 28.21, 27.67, 14.71

MS ESI (+)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{Pd}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  608.79; found 608.03.

Partie V : Experimental section

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2921, 1801, 1683, 1579, 1512, 1467, 1394, 1305, 1191, 1155, 981, 973, 817, 757, 736.



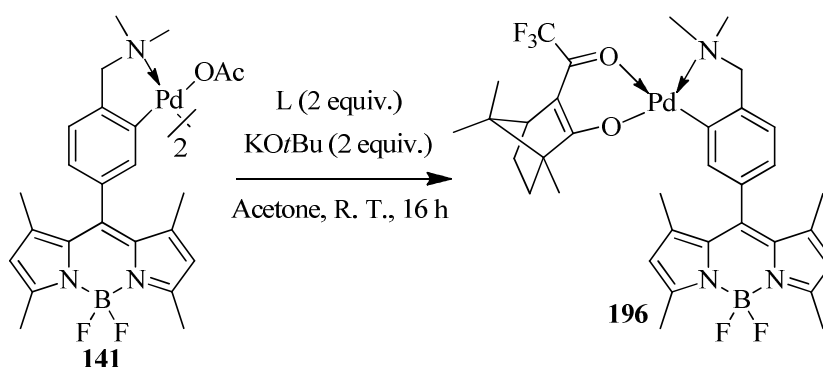
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.91 (d,  $J$  = 6.66 Hz, 1H), 7.83 (d,  $J$  = 6.69 Hz, 1H), 7.42-7.34 (m, 8H), 7.05 (s, 1H), 6.93 (d,  $J$  = 7.47 Hz, 1H), 6.91 (d,  $J$  = 7.59 Hz, 1H), 6.63 (s, 1H), 5.98 (s, 2H), 4.08 (s, 2H), 2.98 (s,

6H), 2.56 (s, 6H), 1.54 (s, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 182.76, 182.45, 154.73, 147.83, 147.24, 144.03, 143.49, 140.47, 139.88, 131.84, 131.14, 130.92, 130.67, 130.08, 128.49, 128.44, 127.26, 124.11, 121.54, 120.96, 95.39, 73.48, 52.11, 14.74

MS ESI (+)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{37}\text{H}_{36}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{Pd}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  732.93; found 732.10

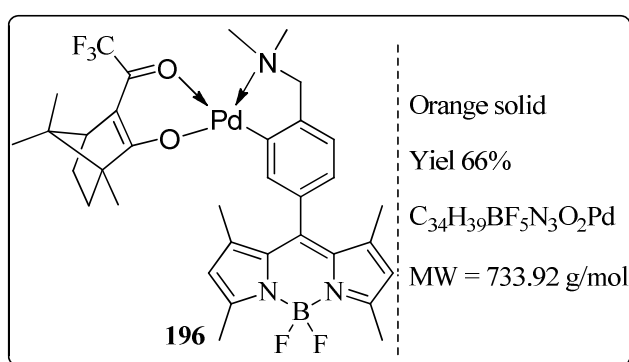
IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2921, 1591, 1440, 1265, 1236, 1122, 1022, 941, 856, 838, 813, 757, 723, 696.



In a round bottomed flask (+)-3-(Trifluoroacetyl)camphor (76.42 mg; 0.3078 mmol; 2.1 equiv.) was solubilized in methanol (1 mL) and sodium methoxide (16.63 mg; 0.3078 mmol; 2.1 equiv.) was added. The mixture was stirred during 1 hour at 40°C. The complex 141 (80 mg; 0.1465 mmol; 1 equiv.) was added

## Partie V : Experimental section

and the reaction was stirred at 40°C overnight protected from light. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). It was filtered through a pad of celite. The filter cake was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL) and concentrated under reduced pressure. Recrystallization of the crude from hexane afforded the desired complex as an orange solid. Yield 71 mg, 0.096 mmol, 66%.



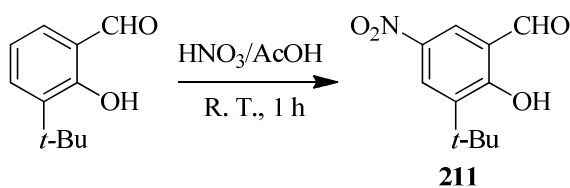
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 7.14 (s, 1H), 7.02 (d,  $J$  = 7.14 Hz, 1H), 6.89 (d,  $J$  = 7.35 Hz, 1H), 5.87 (s, 2H), 4.10-3.92 (m, 2H), 2.89-2.83 (m, 5H), 2.55 (s, 6H),

1.47 (s, 6H), 1.32 (s, 6H), 0.95-0.85 (m, 9H).

MS ESI (+)  $m/z$  calcd for  $C_{34}H_{39}BF_5N_3O_2Pd$   $[M + Na]^+$  756.91; found 756.12

IR (film, cm<sup>-1</sup>): 2958, 2925, 1618, 1465, 1458, 1411, 1388, 1363, 1305, 1296, 1108, 1080, 1058, 921, 856, 810, 736, 696.

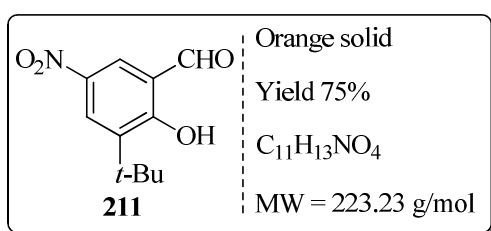
The nitro derivative **211** was synthesized by applying the procedure described in the literature.<sup>144</sup>



In a round bottom flask equipped with a magnetic stir bar, 3-(*tert*-butyl)-2-hydroxybenzaldehyde (1 g, 5.61 mmol, 1 equiv.) was dissolved in glacial acetic acid (8 mL) and cooled at 0°C. Fuming HNO<sub>3</sub> (4 mL, 56.1 mmol, 10 equiv.)

## Partie V : Experimental section

was added drop wise at which rate the temperature did not exceed 10°C. The cooling bath was removed and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The resulting solution was poured into ice/cold water (30 mL) under vigorous stirring. The orange solid formed was filtered and washed with a minimum of cold water (5 mL). Recrystallization from ethanol (5 mL) afforded 211 as an orange solid after filtration. Yield 942 mg, 4.22 mmol, 75%.

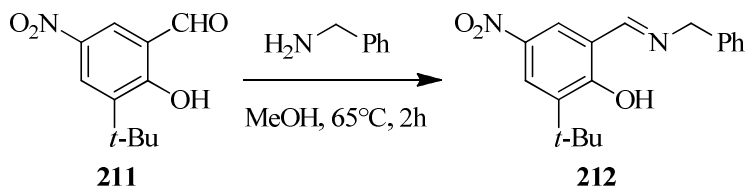


<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 12.36 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 8.42 (s, 2H), 1.48 (s, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 196.01, 163.67, 140.69, 140.07,

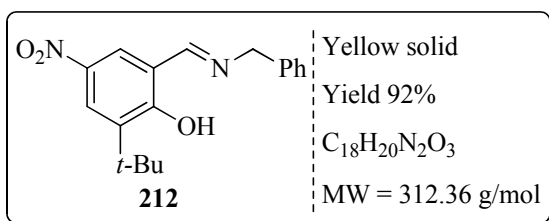
128.76, 127.02, 119.83, 35.39, 31.43

IR (film, cm<sup>-1</sup>): 3074, 3039, 1650, 1625, 1589, 1527, 1429, 1359, 1338, 1284, 1271, 1205, 1003, 956, 916, 751, 736.



In a round bottomed flask, 211 3-(*tert*-butyl)-2-hydroxy-5-nitrobenzaldehyde (200 mg; 0.896 mmol; 1 equiv.) was solubilized in MeOH (4 mL). Benzylamine (96 mg; 0.896 mmol; 1 equiv.) solubilized in MeOH (1 mL) was added dropwise and reaction was refluxed at 65°C for 2 hours. The reaction mixture was cooled to room temperature at which point a yellow solid was formed progressively. It was collected by filtration, and washed with cold water (5 mL) to afford 212 as a yellow solid. Yield 256 mg, 0.819 mmol, 92%.

Partie V : Experimental section



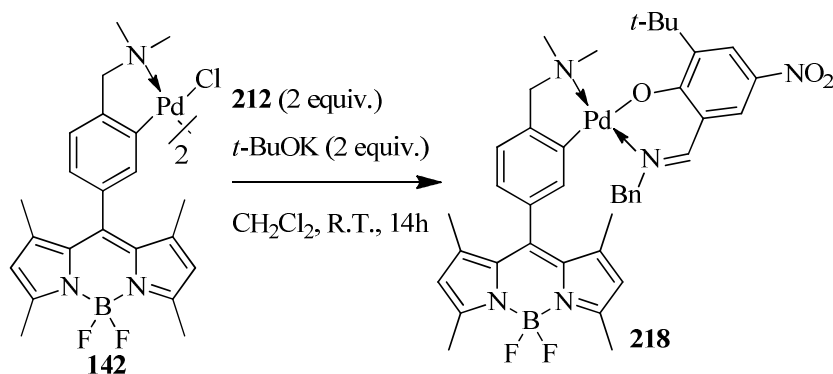
$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  
 $\delta$  = 8.42 (s, 1H), 8.21 (d,  $J$  =  
2.82 Hz, 1H), 8.12 (d,  $J$  =  
2.76 Hz, 1H), 7.41-7.32 (m,  
5H), 4.85 (s, 2H), 1.44 (s,

9H).

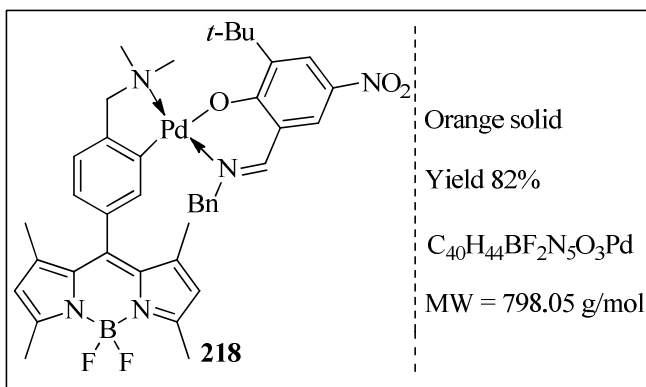
$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 168.40, 165.14, 140.10, 138.49, 136.58, 129.13,  
128.26, 128.15, 126.70, 125.20, 117.02, 61.77, 35.38, 29.08

MS ESI (+)  $m/z$  calcd for  $C_{18}H_{20}N_2O_3$   $[M + H]^+$  313.36; found 313.33

IR (film,  $cm^{-1}$ ): 2956, 2916, 2904, 1635, 1598, 1552, 1487, 1454, 1313, 1271,  
1215, 1108, 1029, 908, 738.



To a solution of the imine 212 (30 mg; 0.0960 mmol, 1 equiv.) in  $CH_2Cl_2$  (4 mL) was added KOtBu (10.8 mg; 0.0960 mmol; 1 equiv.) solubilized in MeOH (1 mL). The mixture was stirred at room temperature during 30 minutes. The bridged dimer complex 142 (50 mg, 0.095 mmol, 1 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight protected from light. The reaction was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in  $CH_2Cl_2$  (10 mL) and filtered over a pad of celite. The filter cake was washed with  $CH_2Cl_2$  (3 x 5) and concentrated under reduced pressure to afford the desired complex as an orange solid. Yield 63 mg, 0.079 mmol, 82%.



$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 8.15 (dd,  $J$  = 2.67 Hz, 1H), 8.13 (dd,  $J$  = 2.67 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.28-7.19 (m, 5H), 7.09 (s, 1H), 6.99 (d,  $J$  = 7.59 Hz,

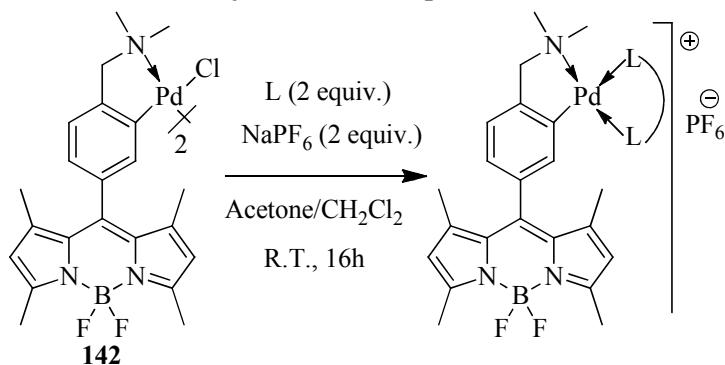
Hz, 1H), 6.91 (d,  $J$  = 7.50 Hz, 1H), 5.96 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 4.08 (s, 2H), 2.76 (s, 6H), 2.55 (s, 6H), 1.46 (s, 6H), 1.42 (s, 9H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 171.95, 166.28, 155.28, 151.10, 148.38, 142.97, 142.76, 141.57, 138.42, 134.28, 133.70, 132.38, 131.63, 129.10, 128.77, 128.23, 128.02, 126.08, 123.61, 122.65, 121.18, 121.02, 73.85, 67.66, 50.87, 35.63, 29.19, 14.70

MS ESI (+)  $m/z$  calcd for  $C_{40}H_{44}BF_2N_5O_3Pd$   $[M + H]^+$  799.04; found 797.03

IR (film,  $cm^{-1}$ ): 2952, 2918, 1618, 1593, 1539, 1463, 1448, 1284, 1191, 981, 970, 910, 813, 757.

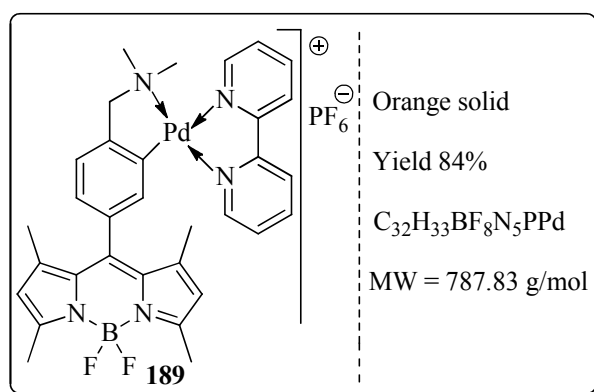
### 1.2.5. Synthesis of complexes of the third class



In a round bottomed flask, the complex **142** (57 mg; 0.109 mmol; 1 equiv.) was solubilized in  $CH_2Cl_2$ /Acetone: 4/2 (6 mL) and the ambidentate nitrogen or phosphine ligand (0.218 mmol; 2 equiv.) was added. The reaction was stirred at room temperature during 1 hour protected from light. Sodium

## Partie V : Experimental section

hexafluorophosphate (36.7 mg; 0.218 mmol; 2 equiv.) solubilized in acetone (2 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solid formed was collected by filtration and washed with a minimum of cold methanol to afford the desired product as an orange solid.



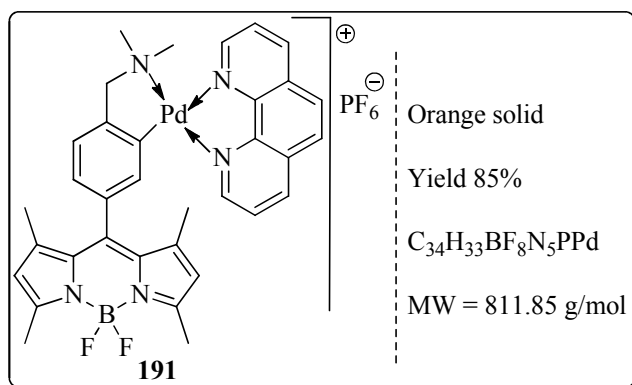
$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.77 (d,  $J$  = 3.54 Hz, 2H), 8.67 (d,  $J$  = 8.01 Hz, 2H), 8.36 (t,  $J$  = 7.05 Hz, 2H), 7.84 (t ou dd,  $J$  = 6.39 Hz, 2H), 7.34 (d,  $J$  = 7.50 Hz, 1H), 7.13 (d,  $J$  = 7.62 Hz, 1H),

7.03 (s, 1H), 6.19 (s, 2H), 4.37 (s, 2H), 2.92 (s, 6H), 2.43 (s, 6H), 1.51 (s, 6H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 154.46, 152.65, 151.08, 148.76, 142.70, 142.44, 140.92, 131.96, 130.82, 127.83, 124.76, 124.10, 122.78, 121.39, 74.42, 51.08, 14.24, 14.00

MS ESI (+)  $m/z$  calcd for  $C_{32}H_{33}BF_2N_5Pd$   $[M + Na]^+$  642.87; found 642.22

IR (film,  $cm^{-1}$ ): 3978, 1541, 1508, 1407, 1303, 1188, 1159, 1078, 977, 835, 756, 732.



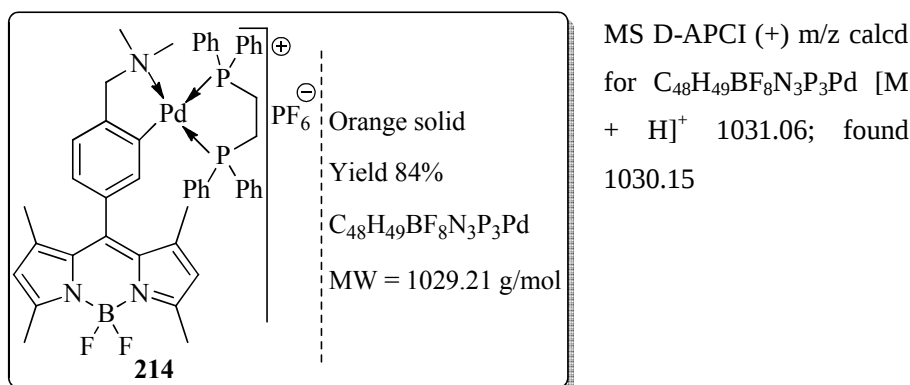
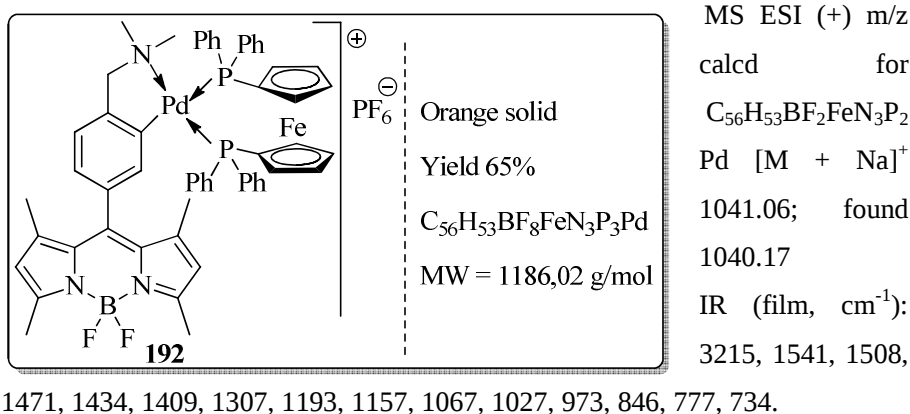
$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.18 (m, 2H), 8.94 (d,  $J$  = 6.99 Hz, 2H), 8.30 (s, 2H), 8.15-8.12 (m, 2H), 7.48-7.45 (m, 2H), 7.16 (d,  $J$  = 7.11 Hz, 2H), 6.18 (s, 2H), 4.45 (m,

2H), 2.99 (s, 6H), 2.43 (s, 6H), 1.53 (s, 6H).

MS ESI (+)  $m/z$  calcd for  $C_{34}H_{33}BF_2N_5Pd$   $[M + Na]^+$  666.89; found 666.26

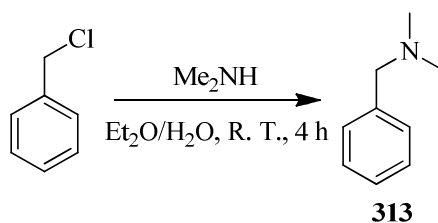
## Partie V : Experimental section

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1541, 1500, 1407, 1305, 1191, 1157, 1074, 1049, 975, 837, 756, 721.



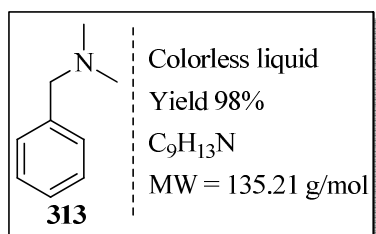
### 1.2.6. Synthesis of simple palladacycles

The ligand **313** was synthesized according to the procedure described in the literature.<sup>162</sup>



To a solution of benzyl chloride (2 g, 15.8 mmol, 1 equiv.) in ether (15 mL) was added a solution of 40% wt. aqueous dimethylamine solution (3.56 g, 79 mmol,

5 equiv.) at room temperature. After stirring for 4 h at the same temperature, the resulting mixture was transferred in a separatory funnel. The organic layer was separated and the organic phase was extracted with 1N aqueous hydrochloric acid solution (15 mL). The aqueous phases were treated with 2N aqueous sodium hydroxide solution (15 mL). The mixture was extracted with ether (2 X 15 mL) and the combined organic extracts were washed with brine (1 x 15 mL). The solution was dried over sodium sulfate and concentrated to obtain *N, N*-dimethyl benzylic amine (2.1 g, 15.53 mmol, 98%) as colorless liquid. This crude product was used in the next step without further purification.



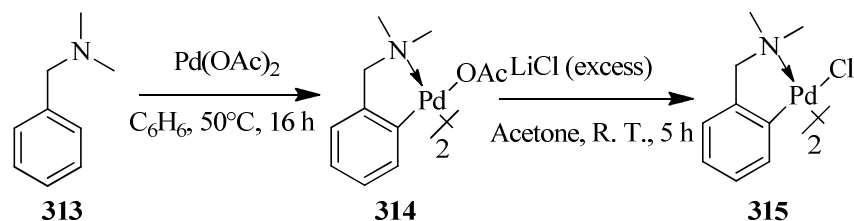
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.32-7.25 (m, 5H), 3.43 (s, 2H), 2.25 (s, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 139.00, 129.26, 128.36, 127.15, 64.55, 45.50.

IR (film, cm<sup>-1</sup>): 1515, 1471, 1421, 1315,

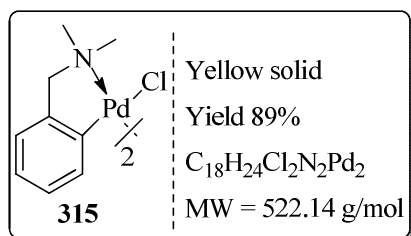
1201, 1155, 1081, 978, 757, 708.

Palladacycle **315** was obtained by the same procedure as for **142**



In a 50 mL round bottomed flask was weighed *N, N*-dimethylbenzylamine, (dmmba), and **313** (87 mg, 0.642 mmol, 1.2 equiv.) was added followed by Pd(OAc)<sub>2</sub> (120 mg, 0.534 mmol, 1 equiv.), a magnetic stir bar and benzene (9 mL). The mixture was sonicated for 3 minutes, and then inert atmosphere of argon was established. The flask was then wrapped in foil to protect from light. The reaction mixture stirred overnight in a 50°C oil bath. The reaction was then cooled to room temperature and concentrated to 3 mL of the solution and hexane (6 mL) was added. The flask was cooled to 0°C and triturated. The yellow solid

formed was collected *via* filtration to provide the acetate bridged dimer 314 (155 mg) as a bright yellow solid. It was dissolved in saturated solution of acetone (5 mL) in LiCl. The mixture was stirred at room temperature protected from light overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) and filtered through a pad of celite. The pad of celite was further washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> until it becomes clear. The solution was concentrated *in vacuo* to provide the chloride dimer 315 [Pd(dmab)(μ-Cl)]<sub>2</sub> (132 mg, 0.478 mmol, 89%) as a yellow solid.



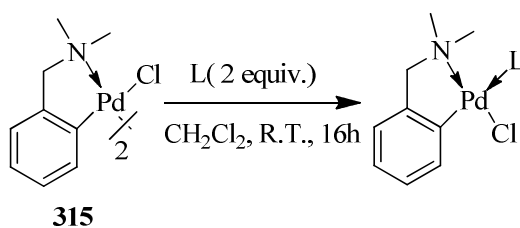
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.16 (d, *J* = 7.71 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 7.14 Hz, 1H), 6.86 (m, 2H), 3.91 (s, 2H), 2.83 (s, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 147.03,

133.46, 125.22, 124.80, 121.64, 73.38, 52.95

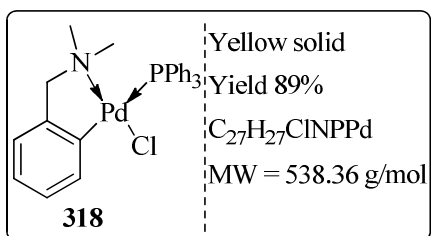
MS ESI (+) *m/z* calcd for C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>Pd<sub>2</sub> [(M-M)<sub>2</sub> + Na]<sup>+</sup> 575.13; found 577.2  
IR (film, cm<sup>-1</sup>): 3055, 2914, 1602, 1577, 1446, 1269, 1209, 1070, 1018, 983, 968, 848, 736.

Palladacycles 318 and 319 were obtained following the same procedure as for their corresponding bearing BODIPY moiety.



To a solution of complex 315 (70 mg; 0.134 mmol; 1 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) was added the ligand (0.27 mmol; 2 equiv.). The reaction mixture was refluxed for 3 hours under argon atmosphere. It was filtered through a pad of celite and washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The solvent was reduced *in vacuo* to 2 mL. Hexane (5 mL) was added to precipitate the product. It was collected by filtration and washed

with a minimum of cold hexane.



$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 7.75-7.60 (m, 6H), 7.41-7.32 (m, 9H), 6.98 (d,  $J$  = 7.35 Hz, 1H), 6.81 (t,  $J$  = 7.23 Hz, 1H), 6.38-6.29 (m, 2H), 4.07 (6,  $J$  = 2.03 Hz, 2H), 2.85 (s,  $J$  = 2.49 Hz, 6H).

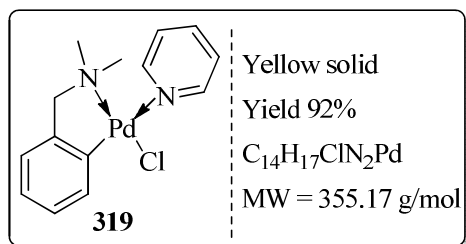
$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 137.87,

135.06, 134.98, 134.80, 131.20, 129.96, 128.23, 125.03, 123.85, 121.75, 73.21, 53.53

$^{31}P$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 42.96

MS ESI (+)  $m/z$  calcd for  $C_{27}H_{27}ClNPPd$   $[M]^+$  538.36; found 538.6

IR (film,  $cm^{-1}$ ): 3049, 1579, 1479, 1433, 1265, 1184, 1093, 1026, 997, 844, 730, 694.



$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 8.87 (d,  $J$  = 5.01 Hz, 2H), 7.81 (t,  $J$  = 7.59 Hz, 1H), 7.37 (t,  $J$  = 7.02 Hz, 2H), 6.98 (d,  $J$  = 4.26 Hz, 2H), 6.79-6.74 (m, 1H), 5.99 (d,  $J$  = 7.62 Hz, 1H), 3.97 (s, 2H), 2.93 (s, 6H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 153.74, 149.06, 147.68, 137.89, 132.31, 125.46, 125.29, 124.65, 121.74, 74.17, 52.87.

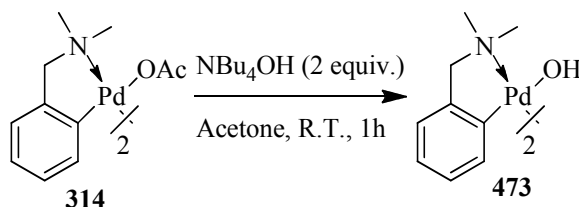
MS ESI (+)  $m/z$  calcd for  $C_{14}H_{17}N_2Pd$   $[M]^+$  319.72; found 319.1

IR (film,  $cm^{-1}$ ): 2914, 2858, 1602, 1577, 1446, 1070, 983, 850, 761, 740, 696

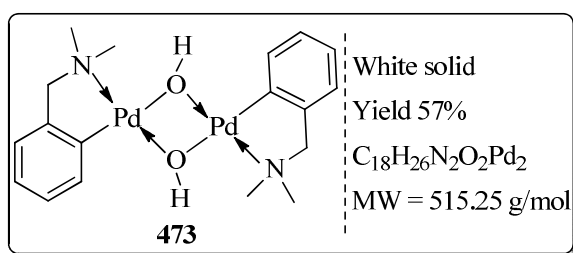
## Partie V : Experimental section

### Synthesis of **473**

It was obtained following a modified procedure reported in the literature.<sup>168</sup>



To a solution of **314** (100 mg, 0.167 mmol, 1 equiv.) in acetone (1 mL) was added  $\text{NBu}_4\text{OH}$  (222  $\mu\text{L}$ , 0.333 mmol, 2 equiv.) solution 1.5 M (40%) in water. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h at which time a bright solid was formed. The reaction was cooled to  $0^\circ\text{C}$  and the solid was collected by filtration, washed with a minimum of acetone and water; and dried on air. Yield: 49mg, 0.095 mmol, 57%.



White solid  
Yield 57%  
 $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2\text{Pd}_2$   
MW = 515.25 g/mol

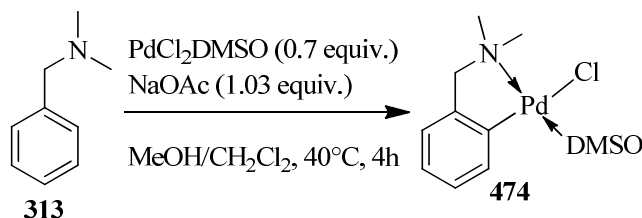
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 6.90 (m, 8H), 3.80 (s, 4H), 2.72 (s, 12H), -2.40 (s, 2H).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3550, 1577, 1448, 1375, 1178,

1107, 987, 848, 736.

### Synthesis of **474**

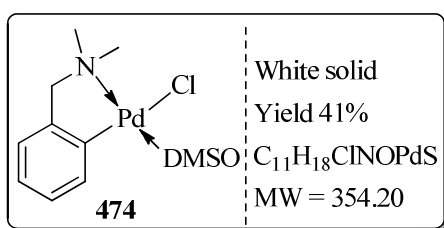
It was obtained following a modified procedure reported in the literature.<sup>163</sup>



To a solution of **313** (100 mg, 0.74 mmol, 1 equiv.) in  $\text{MeOH/CH}_2\text{Cl}_2$ :1/1 (3 mL) was added  $\text{PdCl}_2\text{DMSO}$  (132 mg, 0.518 mmol, 0.7 equiv.) followed by

## Partie V : Experimental section

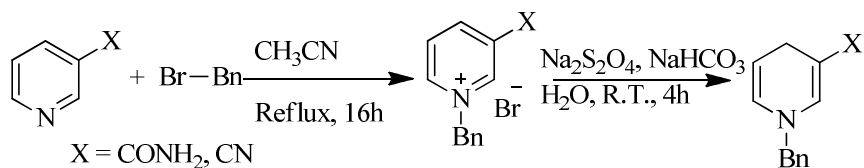
NaOAc (63 mg, 0.76 mmol, 1.03 equiv.) and the mixture was heated at 40°C for 4 hours. It was concentrated. The crude complex was washed successively with MeOH and Et<sub>2</sub>O, dried in vacuo to afford 474 as a white solid. Yield 75 mg, 0.212 mmol, 41%.



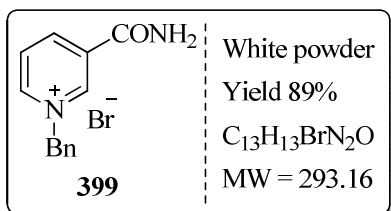
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.91 (t, *J* = 7.59 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 4.26 Hz, 2H), 7.01 (m, 1H), 3.92 (s, 2H), 3.51 (s, 6H), 2.84 (s, 6H).

### 1.2.7. Synthesis of dihydropyridines

The reported procedure was applied.<sup>161</sup>



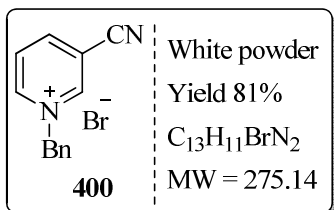
Nicotinamide or 2-pyridinecarbonitrile (17 mmol, 1 equiv.) was solubilized in distilled acetonitrile (20 mL) and benzylbromide (2.06 mL, 17 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was refluxed for 16 hours, and a white solid precipitated. The reaction was cooled to room temperature and diethyl ether (20 mL) was added to further precipitate the final product. It was collected by filtration, washed with diethyl ether (5 mL x 3), and air dried.



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 9.31 (s, 1H), 9.06 (d, *J* = 6.29 Hz, 1H), 8.85 (dt, *J* = 8.29, 1.39, Hz, 1H), 8.19 (dd, *J* = 8.20, 6.30 Hz, 1H), 7.49 (m, 5H), 5.89 (s, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 165.59, 146.21, 144.39, 134.01, 132.19, 130.27, 129.73, 129.34, 128.91, 65.32.

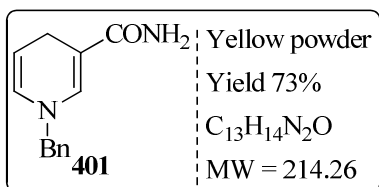
## Partie V : Experimental section



$^1H$  NMR (300 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  = 9.41 (s, 1H), 9.21 (d,  $J$  = 6.27 Hz, 1H), 8.95 (dt,  $J$  = 8.27, 1.41, Hz, 1H), 8.27 (dd,  $J$  = 7.95, 6.48 Hz, 1H), 7.51 (m, 5H), 5.91 (s, 2H).

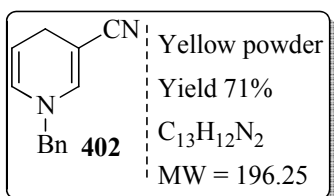
$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  = 149.20, 148.11, 131.29, 130.42, 129.81, 129.70, 129.12, 114.17, 113.27, 65.62.

Pyridinium bromide salts 399 or 400 (5.12 mmol, 1 equiv.) was solubilized in distilled water (30 mL) and  $NaHCO_3$  (2.15 g, 25.58 mmol, 5 equiv.) was added. Sodium dithionite  $Na_2S_2O_4$  85% (5.24 g, 25.58 mmol, 5 equiv.) was then added in small portions. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 hours in the dark. The reaction mixture turned progressively from orange to yellow as the yellow product precipitated. The formed solid was filtered, washed with cold water (5 mL x 3) and dried over  $P_2O_5$  under vacuum to afford the corresponding dihydropyridine.



$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 7.38-7.19 (m, 5H), 7.15 (d,  $J$  = 1.59 Hz, 1H), 5.75 (dq,  $J$  = 7.89, 1.61 Hz, 1H), 5.53 (bs, 2H), 4.75 (dt,  $J$  = 7.98, 3.41 Hz, 1 H), 4.28 (s, 2H), 3.16 (dd,  $J$  = 3.29, 1.58 Hz, 2H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 170.27, 140.41, 137.42, 129.11, 127.91, 127.12, 103.38, 98.68, 57.62, 23.71.

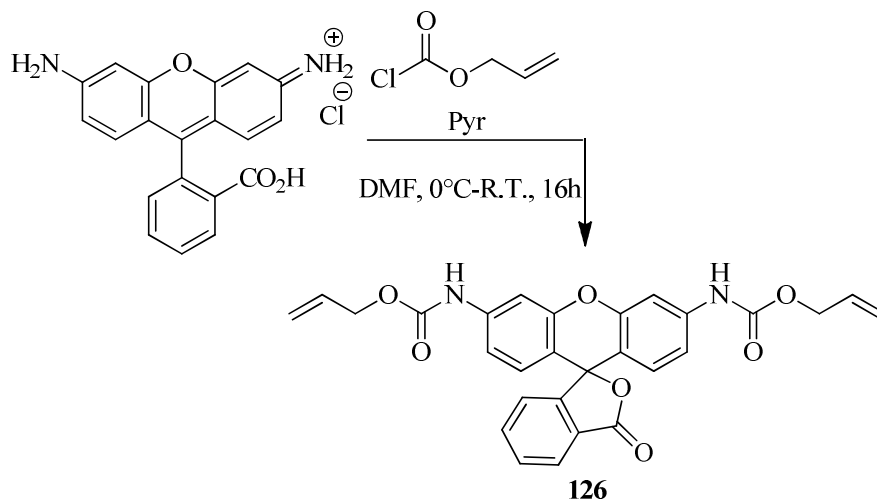


$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 7.51-7.23 (m, 5H), 7.09 (d,  $J$  = 1.32 Hz, 1H), 5.97 (dq,  $J$  = 8.32, 1.59 Hz, 1H), 4.65 (dt,  $J$  = 8.23, 3.41 Hz, 1H), 4.32 (s, 2H), 2.98 (dd,  $J$  = 3.39, 1.61 Hz, 2H).

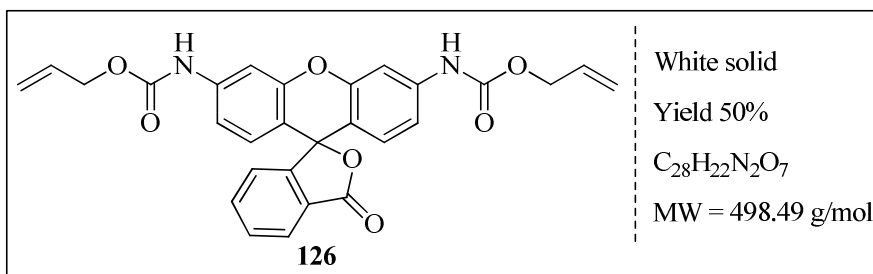
$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 145.12, 137.91, 129.27, 128.97, 127.92, 127.62, 121.72, 101.49, 76.12, 56.21, 22.78.

### 1.3. Synthesis of bis-allyloxycarbonyl-protected rhodamine 110

It was synthesised from rhodamine 110 as previously described.<sup>25</sup>



Rhodamine 110 (200 mg, 0.545 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry DMF (1.5 mL) under argon and cooled to 0°C. In a separate flask, pyridine (154  $\mu$ L, 1.9 mmol, 3.5 equiv.) was dissolved in DMF (0.5 mL). To the solution containing rhodamine 110 were added simultaneously the solutions containing pyridine and allylchloroformate (202  $\mu$ L, 1.9 mmol, 3.5 equiv.) dropwise. The resulting red reaction mixture was allowed to warm to room temperature while stirring overnight. Thereafter, EtOAc (10 mL) was added to the metallic red solution which was transferred to a separatory funnel and washed twice with 5% HCl (8 mL). Small amounts of saturated  $\text{NaHCO}_3$  were used to eliminate emulsion formation. The ethyl acetate layer was collected and combined with two further ethyl acetate washings (10 mL each), washed with saturated  $\text{NaHCO}_3$  (10 mL), dried with anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The resulting oil was subjected to column chromatography on silica gel with PE/EtOAc (2:1). The resulting product 126 was isolated as a white solid (136 mg, 0.273 mmol, 50%).



$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.08 (s, 1H), 8.02 (d,  $J$  = 7.08 Hz, 1H), 7.77 (td,  $J$  = 7.09, 1.26 Hz, 1H), 7.71 (td,  $J$  = 7.09, 1.1 Hz, 2H), 7.56 (d,  $J$  = 2.04 Hz, 2H), 7.26 (d,  $J$  = 7.47 Hz, 1H), 7.14 (dd,  $J$  = 8.7, 2.1 Hz, 2H), 6.69 (d,  $J$  = 8.67 Hz, 2H), 5.97 (m, 2H), 5.36 (ddt,  $J$  = 17.19, 1.65, 1.68 Hz, 2H), 5.23 (ddt,  $J$  = 10.41, 1.53, 1.53 Hz, 2H), 4.62 (dt,  $J$  = 5.43, 1.4 Hz, 4H).

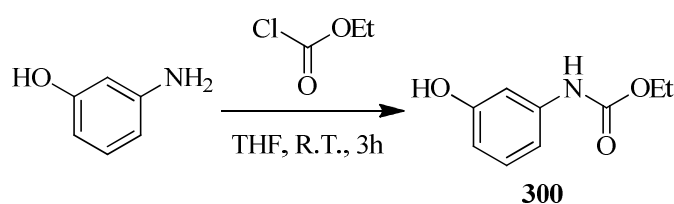
$^{13}C$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 168.70, 153.11, 152.53, 150.96, 141.47, 135.73, 133.06, 130.23, 128.55, 125.75, 124.79, 123.81, 117.84, 114.50, 112.47, 105.13, 81.98, 64.97

MS ESI (+)  $m/z$  calcd for  $C_{28}H_{22}N_2O_7$   $[M + Na]^+$  521.47; found 521.12

IR (film,  $cm^{-1}$ ): 3320, 2940, 1762, 1614, 1529, 1521, 1409, 1288, 1222, 1054, 990, 870, 763.

#### 1.4. Synthesis of *N*-allyloxycarbonyl-protected coumarine

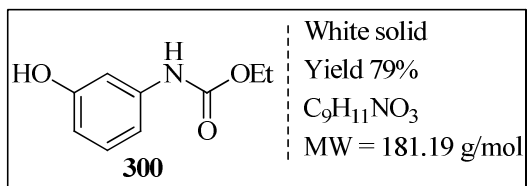
The reported procedure was applied for the synthesis up to 310.<sup>176</sup>



Ethyl chloroformate (1 g, 9.2 mmol, 1 equiv.) was added in one portion to a stirred suspension of *m*-aminophenol (1 g, 9.2 mmol, 1 equiv.) in dry THF (40 mL). A white precipitate (amine hydrochloride) formed after five minutes. The reaction mixture was stirred for 3 hours at room temperature. The reaction progress was monitored by TLC. The hydrochloride was removed by filtration.

## Partie V : Experimental section

The filtrate was then evaporated to give grey colored solid. Further crystallization from petroleum ether (20 mL) gave upon cooling (0°C) 300 as a white solid. Yield 1.316 g, 7.26 mmol, 79%.

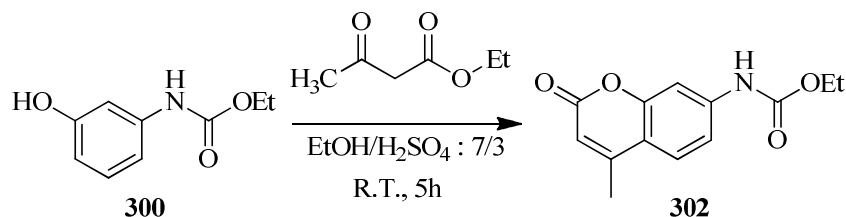


$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 7.37 (s, 1H), 7.12 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 1 H), 6.91 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.63-6.55 (m, 2H),

4.22 (q,  $J$  = 7.14 Hz, 2H), 1.31 (t,  $J$  = 7.14 Hz, 3H).

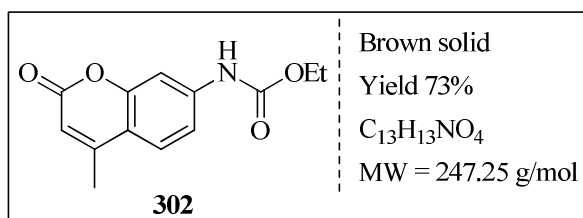
$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 157.05, 154.16, 138.97, 130.07, 110.81, 110.50, 106.01, 61.80, 14.58.

IR (film,  $cm^{-1}$ ): 3392, 3218, 1693, 1602, 1552, 1532, 1452, 1369, 1284, 1226, 1157, 1093, 1060, 975, 864, 773.



3-hydroxyphenylurethane 300 (750 mg, 4.14 mmol, 1 equiv.) was suspended in ethanol (14 mL) and cooled to 0°C. Sulfuric acid (6 mL) was added and the cooler bath was removed. Ethyl acetoacetate (647 mg, 633  $\mu$ L, 4.97 mmol, 1.2 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 5h. The reaction progress was monitored by TLC. The clear yellow solution was poured into ice cold water (50 mL). A voluminous brown crystalline precipitate was directly formed. It was filtered and crystallized from ethanol to give 7-carbethoxy aminocoumarin 302 as a light brown color solid. Yield 746 mg, 3.017 mmol, 73%.

Partie V : Experimental section

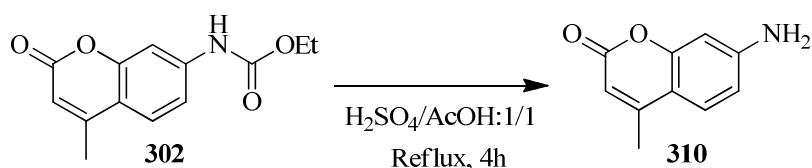


$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.12 (s, 1H), 7.66 (d,  $J$  = 8.67 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.39 (d,  $J$  = 8.67 Hz, 1H), 6.20 (s,

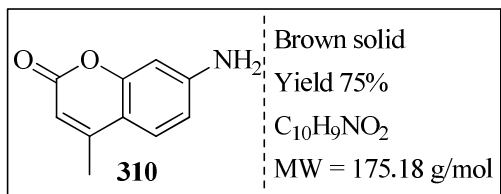
1H), 4.16 (q,  $J$  = 7.08 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.26 (t,  $J$  = 7.08 Hz, 3H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 160.17, 153.92, 153.43, 153.30, 142.96, 126.05, 114.34, 114.32, 111.90, 104.43, 60.79, 18.06, 14.47.

IR (film,  $cm^{-1}$ ): 3245, 1716, 1681, 1616, 1599, 1533, 1421, 1232, 1060, 848, 721.



7-carboethoxy aminocoumarin 302 (500 mg, 2.022 mmol) was refluxed for 4h in a mixture of concentrated  $H_2SO_4$  and glacial acetic acid (1:1, 4 mL). On cooling, a yellow precipitate was deposited. The reaction mixture was poured into ice cold water (15 mL) and allowed to stand overnight. The resulting suspension was made slightly alkaline with 50% aqueous NaOH under cold conditions. The brown precipitate formed was then filtered and washed with ice cold water (3 x 5 mL). Crystallization from ethanol yielded 310 as a brown colored solid. Yield 265 mg, 1.511 mmol, 75%.



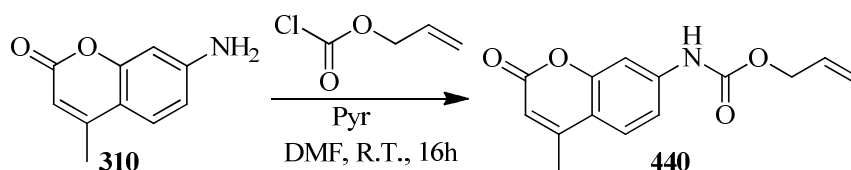
$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.39 (d,  $J$  = 8.55 Hz, 1H), 6.55 (d,  $J$  = 8.49 Hz, 1H), 6.39 (s, 1H), 6.11 (s, 2H), 5.89 (s, 1H), 2.29 (s, 3H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 160.75, 155.46, 153.77, 153.09, 126.22, 111.17, 108.83, 107.46, 98.50, 18.02.

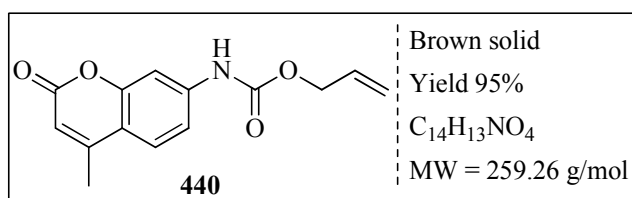
MS APCI (+)  $m/z$   $[M + H]^+$  176.3.

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3438, 1695, 1681, 1604, 1542, 1396, 1147, 1062, 854, 829

Synthesis of *N*-allyloxycarbonyl-protected coumarin



7-amino coumarin 310 (500 mg, 2.854 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry DMF (3 mL) and pyridine (575  $\mu\text{L}$ , 7.13 mmol, 2.5 equiv.) was added. The mixture was cooled to  $0^\circ\text{C}$  and allylchloroformate (454  $\mu\text{L}$ , 4.282 mmol, 1.5 equiv.) was added drop wise. The cooler bath was removed and the reaction was stirred for 16 h under argon atmosphere at room temperature. DMF was evaporated *in vacuo* and the residue was diluted with ethyl acetate (10 mL). The organic layer was washed with 1M HCl (1x 10 mL), dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated to yield the allyl coumarin 440 as a brown solid. Yield 707 mg, 2.727 mmol, 95%.

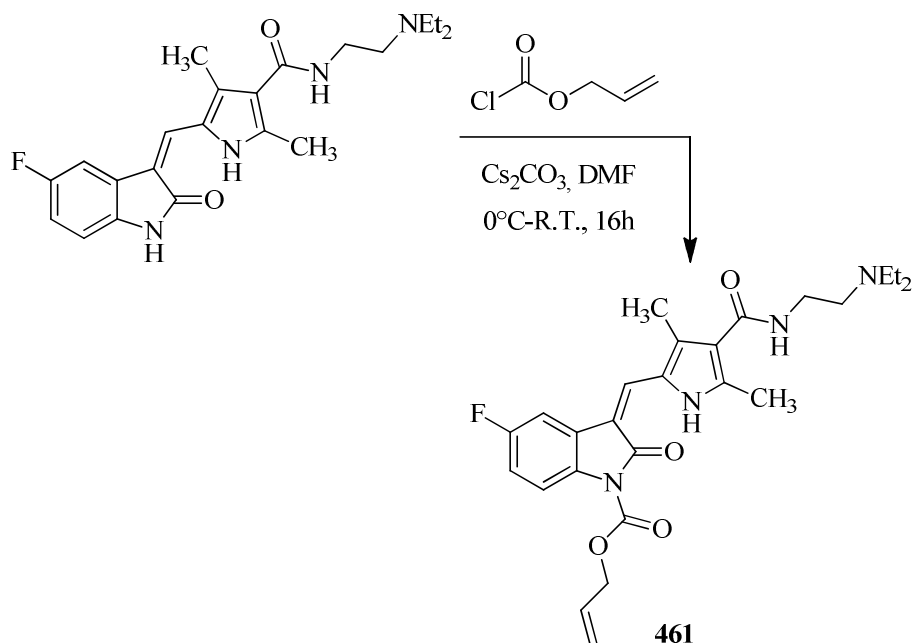


$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  = 10.23 (s, 1H), 7.65 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 7.52 (d,  $J$  = 2.04 Hz, 1H), 7.38 (dd,  $J$  = 8.7, 2.13 Hz, 1H), 6.21 (d,  $J$  = 1.2 Hz, 1H), 5.99 (ddt,  $J$  = 17.19, 10.41, 5.53 Hz, 1H), 5.37 (dd,  $J$  = 17.19, 1.68 Hz, 1H), 5.25 (dd,  $J$  = 10.38, 1.62 Hz, 1H), 4.64 (dt,  $J$  = 5.52, 1.36, 2H), 2.36 (d,  $J$  = 1.17 Hz, 3H).

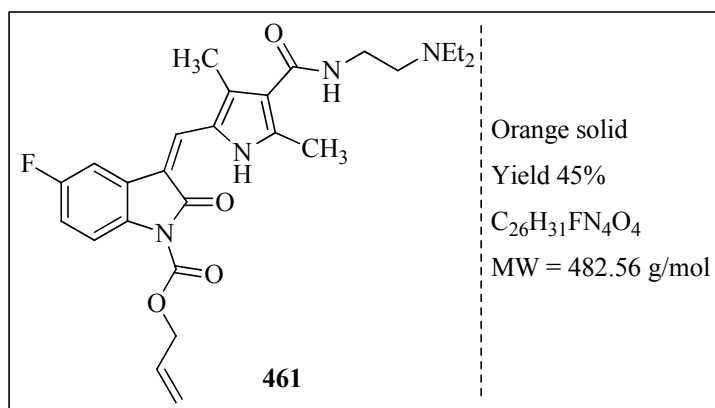
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  = 160.01, 153.79, 153.11, 152.98, 142.69, 132.95, 125.95, 117.95, 114.33, 114.20, 111.89, 104.39, 65.10, 17.96.

MS ESI (+)  $m/z$   $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_4$   $[M + \text{Na}]^+$ , 282.1.

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3263, 1724, 1687, 1616, 1537, 1421, 1353, 1163, 937, 844, 709.

**1.5. Synthesis of *N*-allyloxycarbonyl-protected sunitinib**

In a dried round bottomed flask, sunitinib (100 mg, 0.251 mmol, 1 equiv.) was solubilized in dry DMF (3 mL). An argon atmosphere was established and  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (204 mg, 0.627 mmol, 2.5 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 15 min. It was cooled to  $0^\circ\text{C}$  and allyl chloroformate (40  $\mu\text{L}$ , 0.376 mmol, 1.5 equiv.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 30 minutes. It was allowed to stir at room temperature overnight. DMF was removed *in vacuo* and the residue was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 9/1 (10 mL) and saturated aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (8 mL) was added. The aqueous layer was extracted with a mixture of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 9/1 (2 x 10 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated. The orange residue was purified over flash column chromatograph  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95/5) to give 461 as an orange solid. Yield 54 mg, 0.112 mmol, 45%.



$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
 $\delta$  = 12.81 (s, 1H), 7.92 (t,  $J$  = 5.46 Hz, 1H), 7.72 (dd,  $J$  = 8.94, 4.56 Hz, 1H), 7.10 (dd,  $J$  = 8.43,

2.58 Hz, 1H), 6.86 (td,  $J$  = 8.97, 2.58 Hz, 1H), 6.09 (ddt,  $J$  = 17.19, 10.44, 5.82 Hz, 1H), 5.53 (dq,  $J$  = 17.19, 1.41 Hz, 1H), 5.37 (dq,  $J$  = 10.44, 1.17 Hz, 1H), 4.93 (dt,  $J$  = 5.82, 1.32, 2H), 3.86-3.81 (m, 2H), 3.24 (t,  $J$  = 5.55 Hz, 2H), 3.12 (q,  $J$  = 7.29 Hz, 4H), 2.56 (s, 3H), 2.49 (s, 3H), 1.37 (t,  $J$  = 7.29 Hz, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 167.46, 165.65, 158.80, 150.80, 140.21, 132.77, 131.80, 131.29, 126.41, 124.78, 120.21, 116.51, 113.42, 113.01, 111.93, 104.27, 103.93, 67.88, 52.00, 47.50, 36.29, 14.45, 11.60, 10.51.

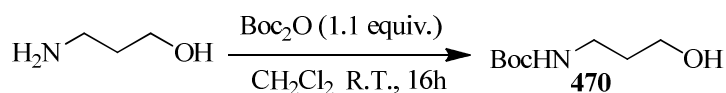
MS ESI (+)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{FN}_4\text{O}_4$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  483.56; found 483.24.

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3369, 2927, 1768, 1569, 1475, 1315, 1272, 1099, 771.

## 1.6. Synthesis of bioactivables prodrugs *via* the Tsuji-Trost reaction

### 1.6.1. Synthesis of allylic esters

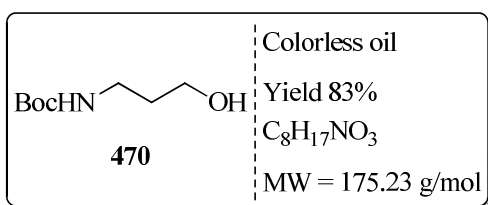
The product 470 was synthesized following the reported procedure.<sup>192</sup>



In a dried round bottomed flask, 3-amino-propan-1-ol (2 g, 26.62 mmol, 1 equiv.) was solubilized in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (35 mL) under an argon atmosphere and di-*tert*-butyl dicarbonate (6.4 g, 29.29 mmol, 1.1 equiv.) was added at room temperature. Triethylamine (5.55 mL, 39.94 mmol, 1.5 equiv.) was added and

## Partie V : Experimental section

the mixture was stirred at room temperature for 16h. The reaction mixture was quenched with 3M aqueous HCl (15 mL) and the two phases were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (2 x 20 mL). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> (1 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (PE/AcOEt: 4/1) to afford 3-[*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-propan-1-ol **3 470** as colorless oil. Yield 3.87 g, 22.1 mmol, 83%.



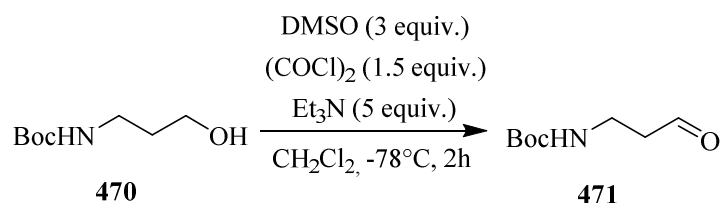
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 3.59 (t, *J* = 5.79 Hz, 2H), 3.20 (t, *J* = 6.12 Hz, 2H), 1.62 (tt, *J* = 6.15, 5.70 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ =

157.11, 79.51, 59.34, 32.73, 28.40, 27.41.

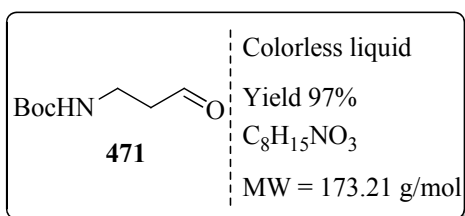
IR (film, cm<sup>-1</sup>): 3434, 3413, 3371, 3359, 3301, 3290, 3093, 2975, 2937, 1687, 1519, 1392, 1365, 1249, 1120, 1043.

The aldehyde **471** was synthesized following the reported procedure.<sup>192</sup>



In a round bottomed flask, dimethyl sulfoxide (3.15 mL, 42.0 mmol, 3 equiv.) was diluted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70 mL) under argon atmosphere and the flask was cooled at -78°C. Oxalyl chloride (1.94 mL, 21.0 mmol, 1.5 equiv.) was added dropwise and the resultant mixture was stirred for 20 min at the same temperature. 3-[*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-propan-1-ol **3 470** (2.6 g, 14.8 mmol, 1 equiv.) in a solution of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL) was added in a dropwise fashion. The reaction mixture was stirred at -78°C for 1h30 min and triethylamine (9.67 mL, 70.0

mmol, 5 equiv.) was added. The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred for 30 minutes. It was quenched with 3M aqueous HCl (10 mL) and the two phases were separated. The aqueous layer was extracted with ethylacetate (2 x 20 mL). The combined organic layers were washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> (1 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to afford the corresponding 3-[*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-propanal **471** (2.531 g, 14.61 mmol, 97%) as a colorless liquid. It was used in the next step without further purification.



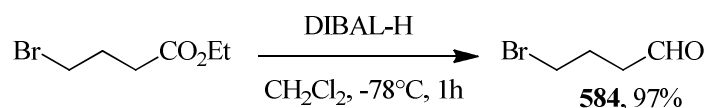
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 9.73 (t, *J* = 6.07 Hz, 1H), 3.38 (td, *J* = 6.00, 5.94 Hz, 2H), 2.67 (t, *J* = 5.85 Hz, 2H), 1.39 (s, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ =

199.35, 154.81, 79.41, 44.07, 33.45, 28.26.

IR (film, cm<sup>-1</sup>): 3348, 2977, 1699, 1685, 1517, 1392, 1363, 1350, 1313, 1274, 1247, 1145, 995, 860, 767, 651.

The aldehyde **584** was obtained from the methodology of the literature.<sup>206</sup>

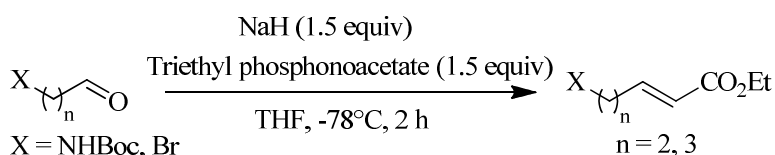


In a round bottomed flask the ester (1.5 g, 7.69 mmol, 1 equiv.) was solubilized in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (24 mL) and cooled at -78°C. The DIBAL-H (7.77 mmol, 1.01 equiv.) was added in a drop wise fashion. The reaction was stirred at the same temperature for 1 h. aqueous solution 3M HCl (20 mL) was added and the reaction mixture was allowed to warm at room temperature and stirred for 1 h. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL x 3). Organic layers were washed with saturated solution NaCl (15 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtrated and concentrated to afford the **584** aldehyde as a colorless liquid. Yield 1.124 g, 7.44 mmol, 97%.

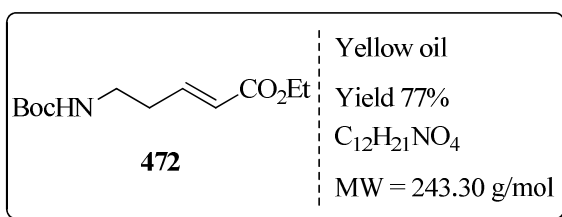
Partie V : Experimental section

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 9.81 (s, 1H), 3.45 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H), 2.68 (dq,  $J$  = 7.03, 1.03 Hz, 2H), 2.19 (m, 2H).

Reported procedures were applied for the synthesis of esters 472 and 585.<sup>192,207</sup>



In a dried round bottomed flask, NaH 60% dispersion in mineral oil (859 mg, 21.47 mmol, 1.5 equiv.) was suspended in THF (90 mL) under an argon atmosphere and cooled to 0°C. Triethyl phosphonoacetate (4.26 mL, 21.47 mmol, 1.5 equiv.) was added and the mixture was stirred at the same temperature for 10 minutes. The Wittig mixture was cooled to -78°C and a solution of aldehyde 471 or 584 (14.3 mmol, 1 equiv.) in THF (5 mL) was added. The reaction mixture was stirred at -78°C for 1 h and warmed to room temperature for an additional 1 h. It was quenched with saturated aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mL) and the two phases were separated. The aqueous layer was extracted with diethyl ether (2 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (1 x 20 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel column chromatography (PE/AcOEt: 9/1) to afford the corresponding esters.



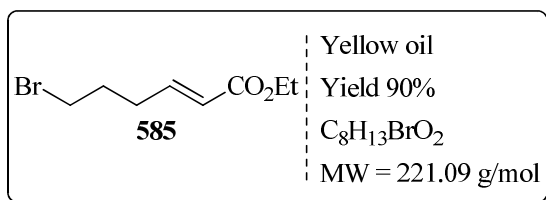
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 6.89 (dt,  $J$  = 15.72, 7.11 Hz, 1H), 5.87 (dt,  $J$  = 15.69, 7.12 Hz, 1H), 4.23 (q,  $J$  = 7.11 Hz,

2H), 3.26-3.23 (m, 2H), 2.43-2.37 (m, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.27 (t,  $J$  = 7.11 Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 163.37, 155.89, 145.46, 123.51, 79.51, 60.44, 39.15, 32.90, 28.47, 14.35.

Partie V : Experimental section

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3369, 2977, 1710, 1654, 1521, 1392, 1369, 1311, 1269, 1247, 1110, 1041, 975, 854, 705.



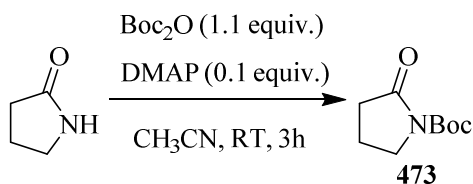
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 6.91 (dt,  $J$  = 15.47, 7.05 Hz, 1H), 5.88 (dt,  $J$  = 15.62, 1.58 Hz, 1H), 4.19 (q,  $J$  = 7.35 Hz, 2H),

3.43 (t,  $J$  = 6.46 Hz, 2H), 2.39 (dq,  $J$  = 7.02, 1.63 Hz, 2H), 2.02 (q,  $J$  = 7.14 Hz, 2H), 1.29 (t,  $J$  = 7.23 Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 166.56, 146.87, 122.75, 60.46, 32.71, 30.94, 30.56, 14.40.

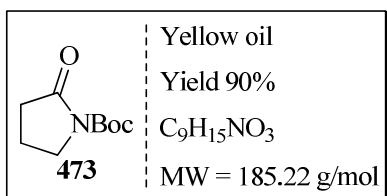
MS APCI (+)  $m/z$   $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{BrO}_2$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 223.0.

The product 473 was obtained as described in the literature.<sup>193</sup>



In a round bottomed flask, pyrrolidinone (2 g, 23.5 mmol, 1 equiv.) was solubilized in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (45 mL) under an argon atmosphere. Di-*tert*-butyl dicarbonate (5.64 g, 25.85 mmol, 1.1 equiv.) was added followed by DMAP (287 mg, 2.35 mmol, 0.1 equiv.). The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. All volatiles were removed under reduced pressure and the residue was diluted with EtOAc (30 mL). The solution was washed with  $\text{H}_2\text{O}$  (1 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL). The organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (EP/AcOEt: 2/1) to afford *N*-*tert*-butoxycarbonylpyrrolidinone 473 as a yellow oil. Yield 3.92 g, 21.1 mmol, 90%.

Partie V : Experimental section

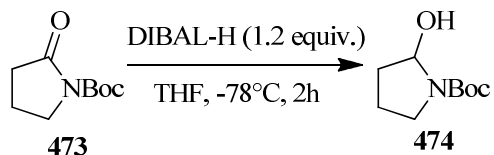


<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 3.70 (m, 2H), 2.49 (m, 2H), 1.98 (m, 2H), 1.49 (s, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 174.40, 150.33, 82.84, 46.56, 33.05, 28.11, 17.49.

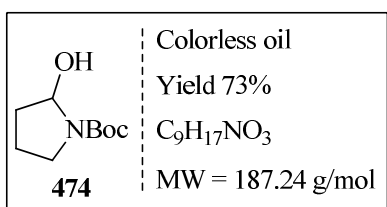
IR (film, cm<sup>-1</sup>): 2977, 1778, 1747, 1706, 1458, 1365, 1290, 1251, 1228, 1137, 1043, 1016, 939, 846, 777, 700.

The product 474 was synthesized following the procedure described.<sup>193</sup>



In a round bottomed flask, 473 (3.8 g, 20.51 mmol, 1 equiv.) was solubilized in anhydrous THF (50 mL) under an argon atmosphere and cooled at -78°C. A solution of DIBAL-H 1M in toluene (24.6 mL, 24.612 mmol, 1.2 equiv.) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 2 h at the same temperature. The reaction was quenched with saturated potassium carbonate solution (5 mL) at -78°C. The mixture was transferred to the flask containing saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl (30 mL) and ether (30 mL). The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred until thick white gel was formed. Thereafter, the mixture was filtered through a celite pad of ether. The mixture was separated and the aqueous layer was extracted with ether (2 x 30 mL). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl (1 x 20 mL), H<sub>2</sub>O (1 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc: 2/1) to afford 474 as a colorless oil. Yield 2.96 g, 1.58 mmol, 73%.

Partie V : Experimental section

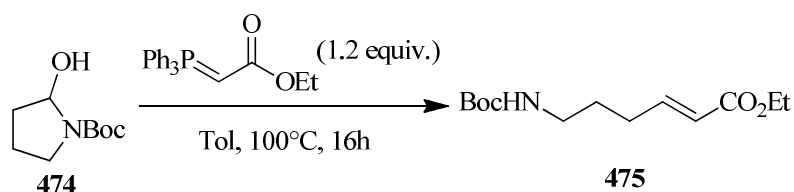


<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 5.47 (1H, s), 3.51-3.43 (m, 2H), 2.06-1.76 (m, 4H), 1.44 (s, 9H).

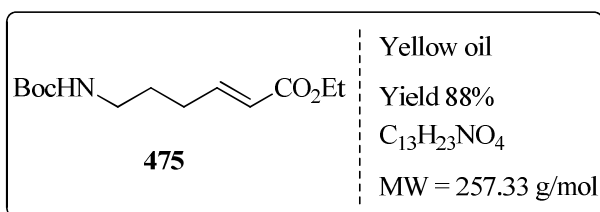
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 155.20, 81.65, 80.10, 45.92, 33.21, 28.54, 22.47.

IR (film, cm<sup>-1</sup>): 2980, 1710, 1428, 1375, 1293, 1187, 1045, 1027, 937, 850, 780, 709.

The 475 ester was synthesized following the procedure in the literature.<sup>193</sup>



In a round bottomed flask, 474 (2 g, 10.68 mmol, 1 equiv.) was solubilized in toluene (25 mL). Ethoxycarbonylmethylenephosphorane (4.46 g, 12.81 mmol, 1.2 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred at 100°C for 16 h. The reaction was allowed to cool to room temperature and diluted with EtOAc (20 mL), washed with H<sub>2</sub>O (1 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc: 1/1) to afford 475 as a yellow oil. Yield 2.415 g, 9.38 mmol, 88%.



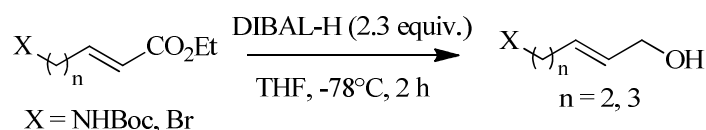
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 6.94 (dt, *J* = 15.63, 6.93 Hz, 1H), 5.83 (dt, *J* = 15.66, 1.7 Hz, 1H), 4.18 (q, *J* =

7.11 Hz, 2H), 3.15-3.12 (m, 2H), 2.23 (dt, *J* = 8.40, 8.1 Hz, 2H), 1.65 (tt, *J* = 7.38, 7.17 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.28 (t, *J* = 7.14 Hz, 3H).

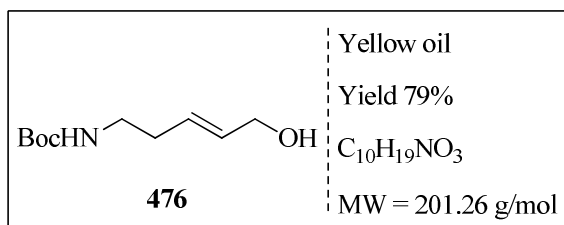
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 166.62, 156.03, 148.09, 121.96, 79.37, 60.32, 40.11, 29.54, 28.63, 28.49, 14.35.

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3379, 2975, 2933, 1689, 1654, 1519, 1390, 1365, 1265, 1249, 1159, 1118, 1097, 1039.

### 1.6.2. Reduction of allylic esters to their corresponding alcohols



In a dried round bottomed flask, allylic ester 474, 475 or 585 (10 mmol, 1 equiv.) was solubilized in THF (15 mL) under an argon atmosphere. The flask was cooled to  $-78^\circ\text{C}$  and 1 M solution of diisobutylaluminium hydride (23 mL, 23.0 mmol, 2.3 equiv.) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at the same temperature for 2h. The reaction was quenched with saturated aqueous potassium carbonate (5 mL) at  $-78^\circ\text{C}$ . The mixture was transferred to a flask containing saturated aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mL) and ether (20 mL). The resulting mixture was allowed to warm to room temperature and stirred until thick white gel was formed. The mixture was filtered through a Celite pad of ether. The filtrate was separated and the aqueous layer was extracted with ether (2 x 25 mL). The combined organic layers were washed with saturated aqueous  $\text{H}_2\text{O}$  (1 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL), dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc: 1/1) to afford the corresponding allylic alcohols.



$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 5.69 (tq,  $J$  = 6.62, 5.43 Hz, 2H), 4.11 (d,  $J$  = 5.43 Hz, 2H), 3.18 (t,  $J$  = 6.62 Hz, 2H), 2.24 (dt,  $J$

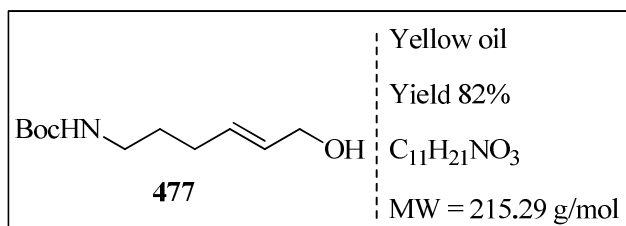
= 6.48, 6.12 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 156.13, 131.73, 129.15, 79.43, 63.47, 60.54,

Partie V : Experimental section

32.94, 28.53.

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3369, 3346, 3294, 2975, 2927, 1749, 1741, 1733, 1527, 1392, 1363, 1334, 1087, 1000.

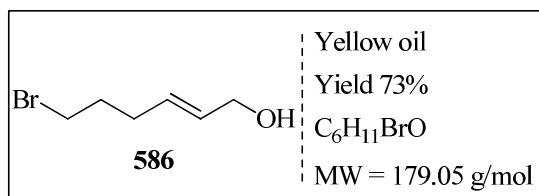


$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 5.72-5.62 (m, 2H), 4.08 (d,  $J$  = 4.23 Hz, 2H), 3.14-3.10 (m, 2H), 2.10 (dt,  $J$  = 7.57, 5.73 Hz,

2H), 1.57 (tt,  $J$  = 7.20, 7.08 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 156.13, 131.91, 130.00, 79.37, 63.60, 40.17, 39.6, 29.47, 28.52.

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3321, 3303, 3292, 2975, 2931, 1687, 1681, 1525, 1517, 1392, 1365, 1271, 1249, 1164, 1087, 999.



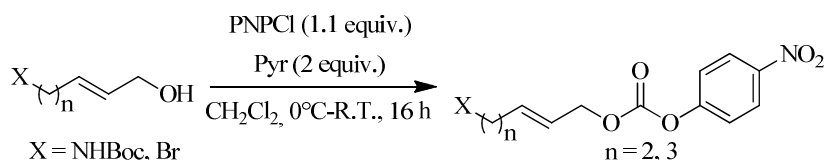
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 5.70-5.64 (m, 2H), 4.09 (d,  $J$  = 4.51 Hz, 2H), 3.40 (t,  $J$  = 6.72 Hz, 2H), 2.20 (dd,  $J$  = 6.94, 5.68 Hz, 2H), 1.94

(quintet,  $J$  = 6.74 Hz, 2H), 1.51 (s, 1H).

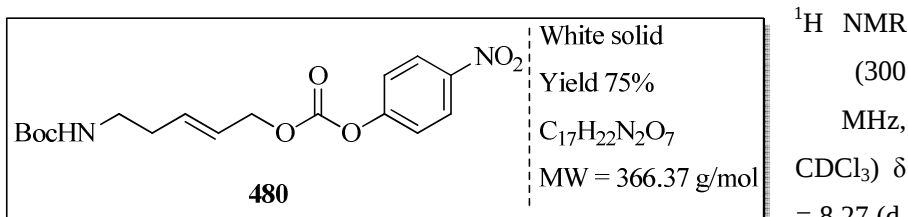
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 130.81, 130.59, 63.63, 33.22, 32.05, 30.62.

MS APCI (+)  $m/z$   $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{BrO}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 181.0.

### 1.6.3. Activation of allylic alcohols



In a round bottomed flask, allylic alcohols 476, 477 or 586 (2.09 mmol, 1 equiv.) were solubilized in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) under an argon atmosphere. The flask was cooled to  $0^\circ\text{C}$  and *p*-nitrophenyl chloroformate (410 mg, 2.3 mmol, 1.1 equiv.) was added followed by pyridine (340  $\mu\text{L}$ , 4.18 mmol, 2 equiv.) dropwise. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 40 minutes, warmed and stirred at room temperature for 16 h. The mixture was transferred in a separatory funnel containing EtOAc (30 mL) and saturated aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (15 mL). The phases were separated and the aqueous layer was washed with saturated aqueous solution of  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1 x 15 mL),  $\text{H}_2\text{O}$  (1 x 15 mL) and brine (1 x 15 mL), dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 90/5/5) to afford the corresponding carbonates.



$J = 8.88$  Hz, 2H), 7.37 (d,  $J = 8.91$  Hz, 2H), 5.90-5.81 (m, 2H), 5.78-5.67 (m, 2H), 4.74 (d,  $J = 6.33$  Hz, 2H), 4.68 (bs, 1H), 3.21 (dt,  $J = 6.42, 1.59$  Hz, 2H), 2.29 (dt,  $J = 6.72, 6.66$  Hz, 2H), 1.43 (s, 9H).

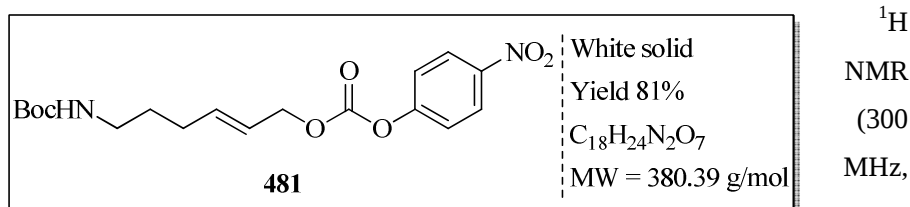
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 155.96, 152.44, 134.93, 125.66, 125.42, 124.86, 121.92, 121.79, 79.81, 69.68, 39.67, 33.06, 28.51$ .

MS ESI (+)  $m/z$   $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 389.13.

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3427, 2977, 1766, 1693, 1616, 1593, 1519, 1494, 1452, 1392,

Partie V : Experimental section

1365, 1338, 1247, 1201, 1163, 1110, 1039, 1012, 972, 919, 862, 775, 754.

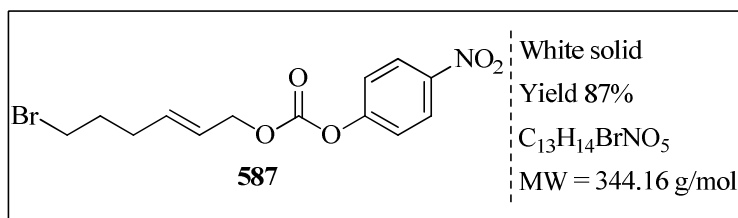


$CDCl_3$ )  $\delta$  = 8.25 (d,  $J$  = 9.21 Hz, 2H), 7.36 (d,  $J$  = 9.21 Hz, 2H), 5.91-5.83 (m, 1H), 5.70-5.63 (m, 1H), 4.69 (d,  $J$  = 5.79 Hz, 2H), 4.67 (bs, 1H), 3.13-3.08 (m, 2H), 2.10 (dt,  $J$  = 7.17, 5.67, 2H), 1.58 (tt,  $J$  = 7.26, 7.23 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 155.66, 152.41, 137.57, 126.22, 125.37, 123.15, 121.91, 115.70, 79.85, 65.38, 40.08, 29.51, 29.34, 28.44.

MS ESI (+)  $m/z$   $C_{18}H_{24}N_2O_7$   $[M + Na]^+$ , 403.2.

IR (film,  $cm^{-1}$ ): 3411, 2933, 1766, 1685, 1616, 1593, 1517, 1504, 1494, 1450, 1392, 1365, 1338, 1288, 1247, 1205, 1197, 1166, 1161, 1110, 1039, 1012, 972, 918, 860, 775.



$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 8.27 (d,  $J$  = 9.33 Hz, 2H), 7.38 (d,  $J$  = 9.33 Hz, 2H), 5.85 (dt,  $J$  = 15.32, 6.66 Hz, 1H), 5.78 (dt,  $J$  = 15.43, 1.57 Hz, 1H), 4.72 (dd,  $J$  = 6.39, 1.05 Hz, 2H), 3.41 (t,  $J$  = 6.66 Hz, 2H), 2.26 (q,  $J$  = 7.11 Hz, 2H), 1.98 (quintet,  $J$  = 6.69 Hz, 2H).

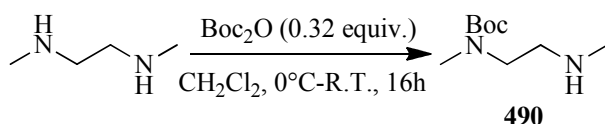
$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 155.68, 152.46, 145.52, 136.47, 125.46, 123.97, 121.93, 69.78, 32.95, 31.59, 30.65.

HRMS (ESI): Calctd for  $C_{13}H_{14}NO_5BrNa$ : 366.01, found 365.99.

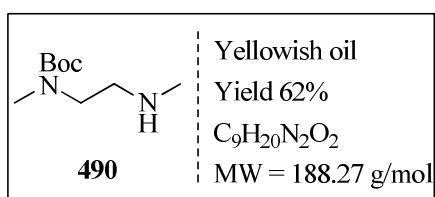
#### 1.6.4. Synthesis of the prodrug through linker strategy

##### 1.6.4.1. Synthesis of the ligand connected to the fluorophore

The product 490 was obtained following the procedure of the literature.<sup>196</sup>



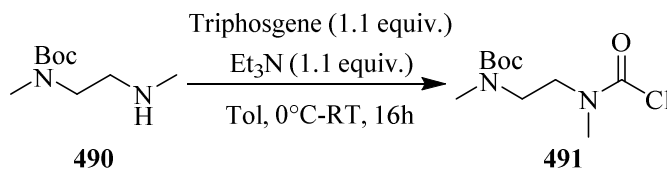
In a dried round bottomed flask, the commercially available *N*, *N'*-dimethylethylenediamine (1 g, 11.34 mmol, 3 equiv.) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) and the solution was cooled to 0°C by ice water. A solution of di-*tert*-butylcarbonate (830 mg, 3.77 mmol, 1 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9 mL) was added dropwise under an argon atmosphere. As the addition ended, the reaction was allowed to warm to room temperature and was stirred for 16 h. The reaction was quenched by the addition of H<sub>2</sub>O (15 mL) and the aqueous layer was extracted by EtOAc (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (1 x 20 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was removed under reduced pressure to afford the mono-Boc- *N*, *N'*-dimethyl-ethylenediamine compound 490 as a pale yellowish oil. Yield 615 mg, 2.266 mmol, 62%.



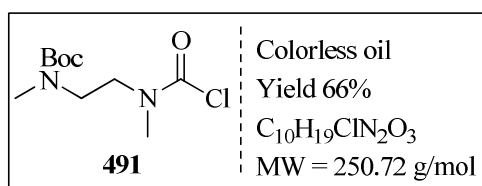
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 3.30 (t, *J* = 6.62 Hz, 2H), 2.85 (s, 3H), 2.70 (t, *J* = 6.59 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H), 1.43 (s, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 156.09, 79.55, 49.78, 48.26, 36.38, 34.75, 28.54.

IR (film, cm<sup>-1</sup>): 2974, 2931, 1780, 1689, 1479, 1456, 1427, 1392, 1365, 1249, 1157, 1130.



In a dried round bottomed flask, triphosgene (901 mg, 3.038 mmol, 1.1 equiv.) was solubilized in toluene (8 mL) under an argon atmosphere and the solution was cooled to 0°C. A solution of 490 (520 mg, 2.76 mmol, 1 equiv.) and triethylamine (422  $\mu\text{L}$ , 3.038 mmol, 1.1 equiv.) dissolved in toluene (5 mL) were added dropwise. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 1 h and allowed to warm to room temperature. The reaction was stirred at room temperature for 16 h. The suspension was filtered off and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc: 6/4) to afford 491 as a colorless oil. Yield 460 mg, 1.83 mmol, 66%. It was quickly used in the next step.



$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 3.65-3.40 (m, 4H), 3.14 (s, 2H), 3.06 (s, 1H), 2.89-2.80 (m, 3H), 1.45 (s, 9H).

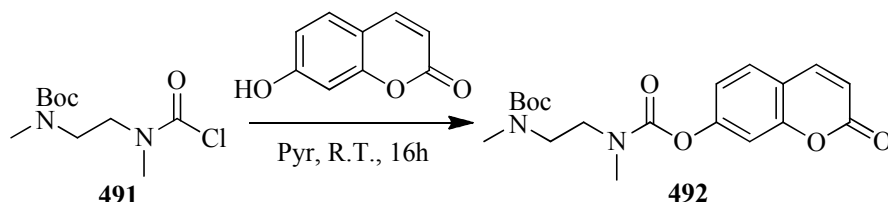
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 154.83, 145.17, 79.71, 50.49, 48.41, 46.11, 45.26.

MS ESI (+)  $m/z$   $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_3$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 273.1.

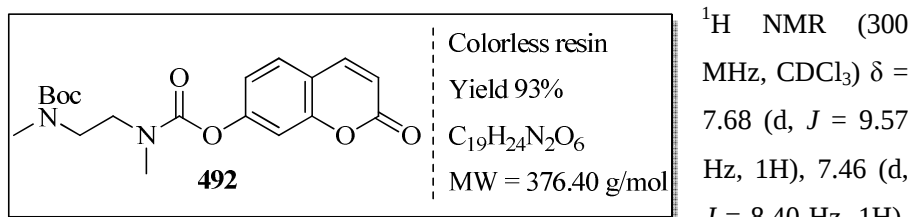
IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2975, 1730, 1677, 1479, 1452, 1423, 1392, 1361, 1298, 1251, 1209, 1139, 1078, 1054, 1043, 939, 869, 819.

## Partie V : Experimental section

The product **492** was obtained as described in the literature.<sup>196</sup>



In a round bottomed flask, **491** (400 mg, 1.6 mmol, 1 equiv.) was solubilized in dry pyridine (1 mL) under an argon atmosphere and umbelliferone (198 mg, 1.22 mmol, 0.77 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred for 16 h at room temperature. The mixture was then diluted with EtOAc (15 mL) and quenched with aqueous solution of 1M HCl (10 mL). After separation, the aqueous layer was washed successively with another portion of aqueous 1M HCl (10 mL) and brine (10 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc: 7:3) to afford **492** as a colorless resin. Yield (430 mg, 1.14 mmol, 93%).



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.68 (d, *J* = 9.57 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.40 Hz, 1H),

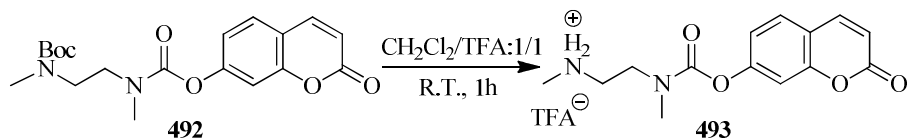
7.12-7.07 (m, 2H), 6.37 (d, *J* = 9.54 Hz, 1H), 3.57-3.47 (m, 4H), 3.14-3.05 (m, 3H), 2.92-2.89 (m, 3H), 1.44 (s, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 170.85, 160.32, 154.41, 153.43, 142.98, 128.40, 118.34, 115.36, 115.30, 109.98, 79.68, 60.14, 35.04, 34.24, 28.4, 20.84, 14.02.

MS ESI (+) *m/z* C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M + Na]<sup>+</sup>, 399.2.

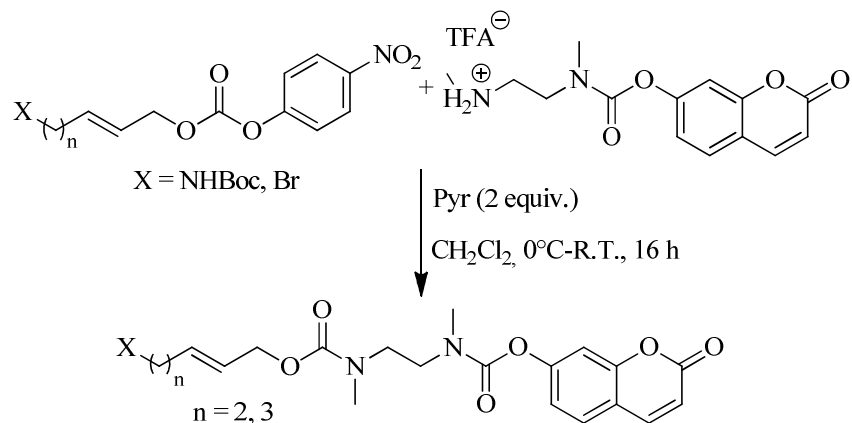
IR (film, cm<sup>-1</sup>): 3298, 2921, 1778, 1695, 1616, 1581, 1510, 1446, 1415, 1352, 11342, 1261, 1188, 1134, 1108, 1095, 1076.

Removal of the Boc protecting group: synthesis of ammonium salts 493



In a round bottomed flask, 492 (380 mg, 1.01 mmol) was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) and trifluoroacetic acid (2 mL) was added. The resulting solution was stirred at room temperature for 3h30 min. The reaction was monitored for completion by TLC and the mixture was concentrated. Trifluoro acetic acid was removed under high vacuum to afford the corresponding TFA salt, *N*-methylamino coumarin 493 in quantitative yield. The crude product was used in the next step without further purification.

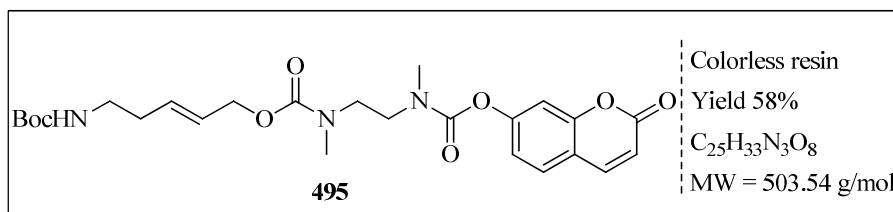
#### 1.6.4.2. Coupling activated allylic alcohols to the fluorophore



In a round bottomed flask, the allylic active carbonate (0.918 mmol, 1 equiv.) was solubilized in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) under an argon atmosphere and the flask was cooled to  $0^\circ\text{C}$ . The solution of *N*-methylamino coumarin salt 493 (see the last step) (1.01 mmol, 1.1 equiv.) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) and pyridine (150  $\mu\text{L}$ , 1.836 mmol, 2 equiv.) were sequentially added dropwise over a period of 15 min. The reaction mixture was stirred at  $0^\circ\text{C}$  for 1 h and at room temperature for 16h. The

## Partie V : Experimental section

reaction mixture was diluted in EtOAc (20 mL) and washed successively with aqueous saturated solution  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2 x 15 mL), and  $\text{H}_2\text{O}$  (1 x 10 mL). The organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated *in vacuo*. The residues were purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc: 6/4).

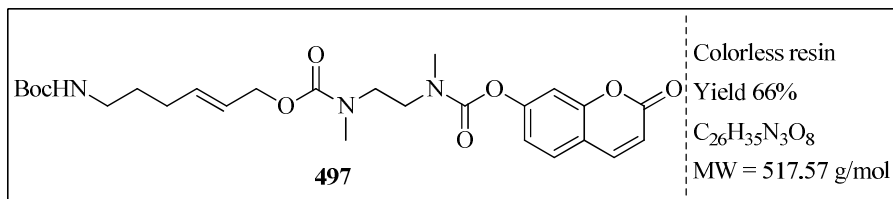


$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.65 (d,  $J$  = 9.57 Hz, 1H), 7.41 (d,  $J$  = 8.40 Hz, 1H), 7.05 (d,  $J$  = 1.59 Hz, 1H), 7.01 (dd,  $J$  = 8.39, 1.67 Hz), 6.30 (d,  $J$  = 9.54 Hz, 1H), 5.70-5.53 (m, 2H), 4.66 (bs, 1H), 4.47 (dd,  $J$  = 6.04, 5.21 Hz, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.45 (m, 2H), 3.07 (d,  $J$  = 7.62 Hz, 3H), 2.98 (m, 2H), 2.91 (d,  $J$  = 4.37 Hz, 3H), 2.17 (dt,  $J$  = 6.57, 4.56 Hz, 2H), 1.36 (s, 9H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 160.46, 155.88, 154.60, 153.92, 153.58, 149.73, 143.05, 142.95, 135.97, 131.88, 126.88, 125.12, 122.61, 122.18, 118.49, 116.14, 115.58, 110.25, 78.98, 65.79, 46.94, 46.62, 39.66, 35.45, 32.76, 29.62, 28.37.

HRMS (ESI): Calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_8$ : 504.54, found 504.23 .

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3361, 2923, 1782, 1697, 1620, 1521, 1396, 1269, 1253, 1163, 1124, 1018, 846, 750.



$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.65 (d,  $J$  = 9.51 Hz, 1H), 7.41 (d,  $J$  = 8.34 Hz, 1 Hz), 7.05-6.99 (m, 2H), 6.30 (d,  $J$  = 9.54 Hz, 1H), 5.68-5.58 (m, 1H), 5.56-5.49 (m, 1H), 4.70 (bs, 1H), 4.46 (dd,  $J$  = 6.13, 5.17 Hz, 2H), 3.48-3.44 (m, 5H), 3.09-2.99 (m, 4H), 2.91 (s, 3H), 2.01-1.97 (m, 2H), 1.50-1.47 (m, 2H), 1.36 (s,

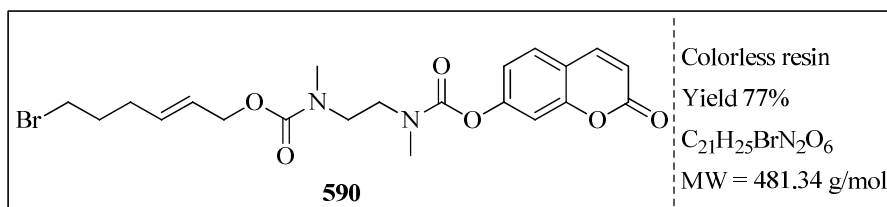
Partie V : Experimental section

9H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 160.47, 155.97, 153.94, 153.57, 143.06, 134.97, 134.58, 134.28, 128.42, 125.24, 118.67, 125.24, 118.67, 116.13, 115.57, 110.43, 78.93, 66.28, 47.40, 47.27, 40.00, 35.40, 35.16, 34.81, 29.41, 29.15, 28.38.

HRMS (ESI): Calctd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_8$ : 518.57, found 518.24.

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3359, 2931, 1726, 1693, 1681, 1620, 1506, 1479, 1456, 1425, 1394, 1363, 1265, 1249, 1213, 1161, 1147, 1124, 1097, 983, 972, 891, 875, 846, 825, 769, 734.

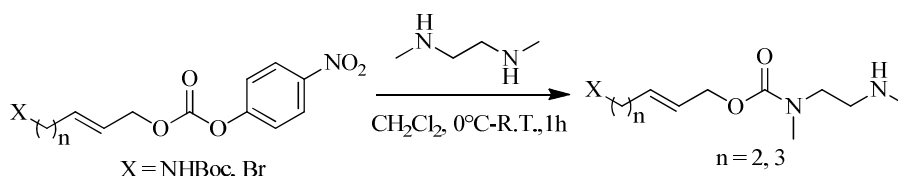


$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.67 (d,  $J$  = 9.76 Hz, 1H), 7.44 (d,  $J$  = 8.55 Hz, 1H), 7.09 (d,  $J$  = 2.10 Hz, 1H), 7.05 (dd,  $J$  = 8.46, 2.10 Hz, 1H), 6.34 (d,  $J$  = 9.50 Hz, 1H), 5.75-5.52 (m, 2H), 4.50 (d,  $J$  = 5.92 Hz, 2H), 3.59-3.43 (m, 6H), 3.06 (dd,  $J$  = 17.68, 8.84 Hz, 3H), 2.9555 (s, 3H), 2.19-2.13 (m, 2H), 1.83-1.77 (m, 2H).

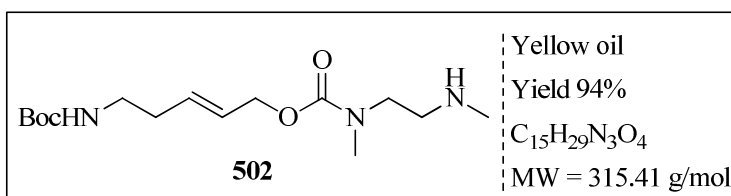
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 160.56, 154.70, 153.65, 143.06, 134.00, 133.59, 128.45, 126.09, 125.94, 118.55, 116.22, 115.71, 110.36, 66.27, 65.95, 47.37, 46.31, 44.33, 35.40, 31.58, 29.31.

HRMS (ESI): Calctd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{Br}$ : 481.34, found 481.09.

### 1.6.4.3. Synthesis of carbamates via a linear strategy



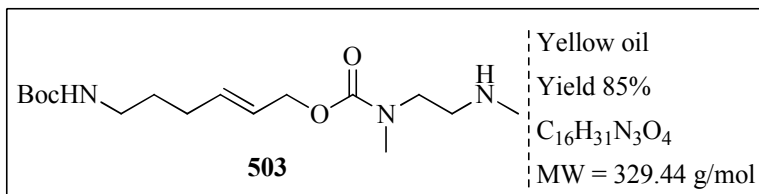
In a round bottomed flask, the *N, N'*-dimethylethylenediamine (188 mg, 2.13 mmol, 1.3 equiv.) was solubilized in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 mL) and cooled to  $0^\circ\text{C}$ . The activated allylic alcohol carbonate (1.6376 mmol, 1 equiv.) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) was added dropwise. The reaction was allowed to warm at room temperature and stirred at the same temperature for 1 h. It was diluted in AcOEt (15 mL) followed by a saturated aqueous solution of  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (15 mL). The aqueous layer was extracted with AcOEt (15 mL x 2). The combined organic layers were washed with  $\text{H}_2\text{O}$  (15 mL) and brine (15 mL), dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrated and concentrated to afford the corresponding secondary amines which were used directly in the next steps.



$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 5.66-5.64 (m, 2H), 4.62 (bs, 1H), 4.52 (d,  $J$  = 4.11 Hz, 2H), 3.39 (m, 2H), 3.17 (q,  $J$  = Hz, 2H), 2.92 (s, 3H), 2.76 (q,  $J$  = Hz, 2H), 2.44 (s, 3H), 2.26-2.20 (q,  $J$  = Hz, 2H), 1.42 (s, 9H).

MS ESI (+)  $m/z$   $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 316.2.

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3332, 2960, 1674, 1517, 1404, 1392, 1272, 1249, 1045, 968, 769.



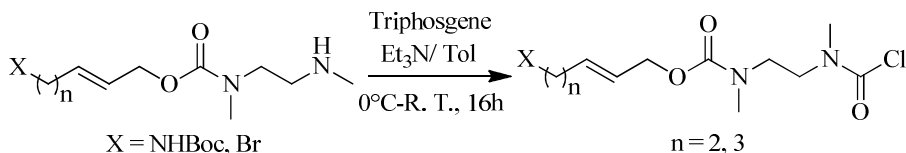
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 5.71-5.60 (m, 1H), 5.56-5.47 (m, 1H), 4.80 (bs, 1H), 4.40 (d,  $J$  = 5.85 Hz, 2H), 3.28 (t,  $J$  = Hz, 2H), 3.00 (q,  $J$  = Hz, 2H), 2.82 (s, 3H), 2.64 (q,  $J$  = Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.96 (q,  $J$  = Hz, 2H), 1.51-1.43 (m, 2H), 1.33 (s, 9H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 156.47, 155.95, 134.04, 125.39, 78.84, 65.79, 60.97, 49.44, 48.22, 39.96, 36.22, 29.41, 29.23, 28.34.

MS ESI (+)  $m/z$   $C_{16}H_{31}N_3O_4$   $[M + \text{Na}]^+$ , 352.3.

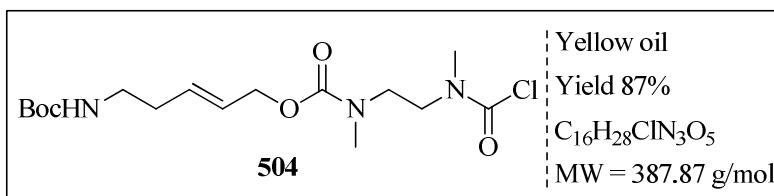
IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2920, 1778, 1693, 1396, 1253, 1178.

#### Synthesis of carbamoyl chlorides



To a solution of secondary amines (1.43 mmol, 1 equiv.) in toluene (8 mL) was added trimethylamine (218  $\mu\text{L}$ , 1.57 mmol, 1.1 equiv.), and the mixture was added dropwise to a solution of triphosgene (445 mg, 1.498 mmol, 1.05 equiv.) in toluene (3 mL) cooled at  $0^\circ\text{C}$ . The reaction was stirred at the same temperature for 30 minutes and overnight at room temperature. It was filtrated, washed with AcOEt (15 mL) and concentrated. The crude was purified by column chromatograph PE/ACOEt: 6/4 to afford the corresponding carbamoyl chlorides.

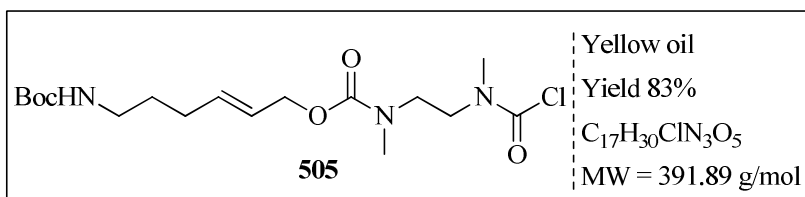
Partie V : Experimental section



$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 5.71-5.59 (m, 2H), 4.71 (bs, 1H), 4.52 (d,  $J$  = 4.74 Hz, 2H), 3.62-3.51 (m, 2H), 3.48 (d,  $J$  = 4.95 Hz, 2H), 3.18-3.07 (m, 5H), 2.93 (d,  $J$  = 8.34 Hz, 3H), 2.26-2.20 (m, 2H), 1.41 (s, 9H).

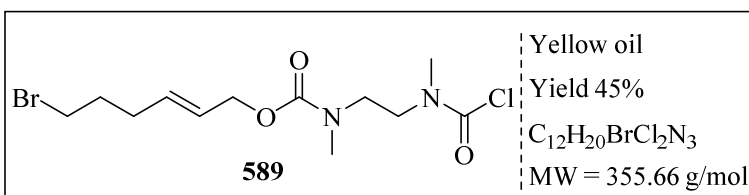
MS ESI (+)  $m/z$   $C_{16}H_{28}ClN_3O_5$   $[M + Na]^+$ , 400.2.

IR (film,  $cm^{-1}$ ): 3363, 2933, 1697, 1477, 1456, 1402, 1363, 1267, 1249, 1191, 1080, 972, 865, 769.



$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 5.71-5.59 (m, 1H), 5.53-5.46 (m, 1H), 4.73 (bs, 1H), 4.42 (d,  $J$  = Hz, 2H), 3.57-3.49 (m, 2H), 3.41 (d,  $J$  = 2H), 3.09-3.01 (m, 5H), 2.85 (d,  $J$  = Hz, 3H), 1.97 (dd ( $J$  = Hz, 2H), 1.48 (dt,  $J$  = Hz, 2H), 1.33 (s, 9H).

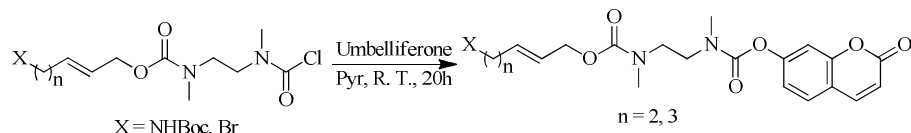
IR (film,  $cm^{-1}$ ): 3344, 2925, 1728, 1677, 1479, 1454, 1402, 1363, 1363, 1247, 1193, 972, 1078, 972, 867, 769.



$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 5.72-5.58 (m, 2H), 4.53 (d,  $J$  = 5.35 Hz, 2H), 3.63-3.38 (m, 6H), 3.12 (dd,  $J$  = 13.33, 11.30 Hz, 3H), 2.94 (d,  $J$  = 8.70 Hz, 3H), 2.22 (q,  $J$  = 6.60 Hz, 2H), 1.99-1.81 (m, 2H).

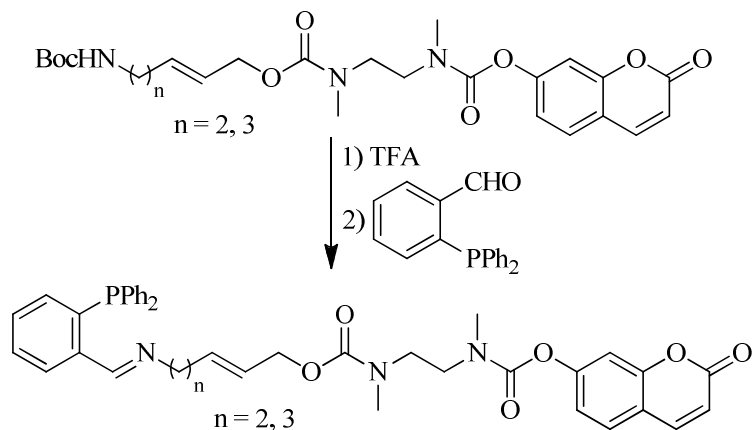
HRMS (ESI): Calcd for  $C_{12}H_{20}N_2O_3BrCl$ : 355.60, found 355.04.

### Coupling carbamoyl chlorides with umbelliferone



To a solution of carbamoyl chloride (1.16 mmol, 1 equiv.) in dry pyridine (3 mL) was added umbelliferone (189 mg, 1.16 mmol, 1 equiv.) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. It was diluted in AcOEt (15 mL) and quenched by the addition of 1N HCl (15 mL). The aqueous layer was extracted with AcOEt (15 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatograph PE/AcOEt:3/7 to afford the desired coupling carbamates.

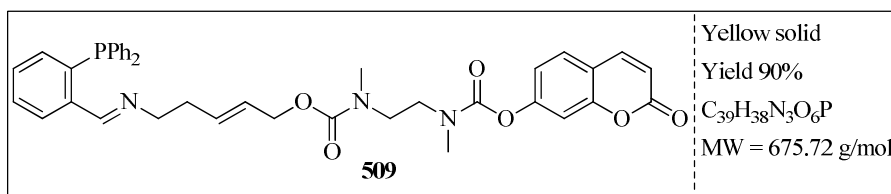
#### 1.6.4.4. Synthesis of imines



A solution of carbamates 495 or 497 (0.3 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) was cooled to 0°C and TFA (3 mL) was added drop wise. The mixture was stirred at the same temperature for 10 min and warmed at room temperature for 1 hour. It was quenched by adding 3M NaOH (aq.) until the pH > 9 at 0°C. The reaction mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, washed with saturated NaCl, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrated and concentrated *in vacuo* to afford the corresponding free

## Partie V : Experimental section

amine. To a solution of the last amine in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 mL) was added 2-(diphenylphosphino)-benzaldehyde (78 mg, 0.27 mmol, 0.9 equiv.) and  $\text{MgSO}_4$  (100 mg) was added. The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 16h. It was filtrated and concentrated. The crude product was solubilized in AcOEt (2 mL) and ether (5 mL) was added. It was cooled to  $0^\circ\text{C}$  and triturated. The product was collected by filtration and washed with ether to afford the corresponding imine.



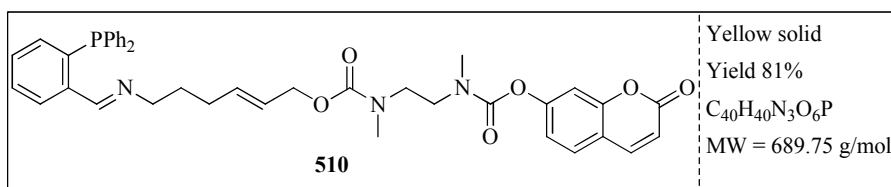
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8.87 (s, 1H), 7.96 (dd,  $J$  = 6.99, 3.9 Hz, 1H), 7.67 (d,  $J$  = 9.57 Hz, 2H), 7.47 (d,  $J$  = 8.46 Hz, 2H), 7.35-7.24 (m, 9H), 7.16-7.09 (m, 2H), 6.91 (td,  $J$  = 6.66, 3.72 Hz, 1H), 6.35 (d,  $J$  = 9.54 Hz, 1H), 5.71-5.61 (m, 2H), 4.57-4.48 (m, 2H), 3.57-3.52 (m, 6H), 3.17 (s, 3H), 3.08-2.96 (m, 4H), 2.29-2.25 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 160.40, 160.10, 159.83, 154.57, 142.97, 139.46, 139.23, 137.35, 137.09, 136.51, 136.39, 134.00, 133.74, 133.31, 130.15, 128.81, 128.78, 128.57, 128.48, 127.63, 125.98, 118.45, 116.08, 115.52, 110.19, 66.22, 60.56, 53.45, 46.88, 35.31, 33.51, 29.60.

$^{31}\text{P}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = -13.17.

MS APCI (+)  $m/z$   $\text{C}_{39}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 676.4

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2925, 1726, 1693, 1620, 1460, 1434, 1396, 1267, 1153, 1122, 983, 748, 732.



---

Partie V : Experimental section

---

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8.89 (d,  $J$  = 4.75 Hz, 1H), 7.99 (m, 1H), 7.67 (dd,  $J$  = 9.62, 2.81 Hz, 2H), 7.48 (d,  $J$  = 8.46 Hz, 1H), 7.38-7.26 (m, 10H), 7.16 (t,  $J$  = 2.96 Hz, 1H), 6.90 (ddd,  $J$  = 7.6, 4.7, 1.0, 1H), 6.36 (d,  $J$  = 9.54 Hz, 1H), 5.75-5.65 (m, 1H), 5.58-5.47 (m, 1H), 4.54 (d,  $J$  = 6.41 Hz, 2H), 3.63-3.49 (m, 7H), 3.15 (d,  $J$  = 13.24 Hz, 2H), 3.07 (d,  $J$  = 12.30 Hz, 2H), 3.01 (s, 3H), 1.91 (dd,  $J$  = 14.56, 7.35 Hz, 2H), 1.62 (dd,  $J$  = 14.41, 7.65 Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 160.39, 160.01, 159.59, 154.06, 153.52, 142.65, 139.76, 139.28, 137.35, 137.04, 136.60, 136.48, 134.19, 133.92, 133.39, 132.03, 130.25, 128.91, 128.71, 128.62, 118.34, 115.72, 110.40, 66.36, 60.76, 53.54, 47.48, 47.05, 46.38, 35.51, 29.72.

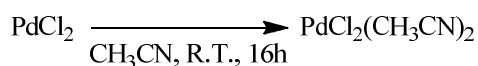
$^{31}\text{P}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = -13.28.

MS ESI (+)  $m/z$   $\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 713.5.

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2921, 1776, 1724, 1697, 1396, 1267, 1159, 1122, 983, 730.

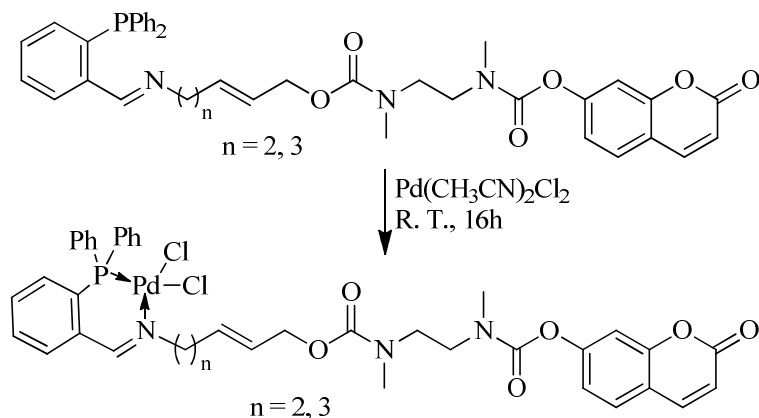
#### 1.6.4.5. *Synthesis of palladium complexes*

Synthesis of  $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$  complex

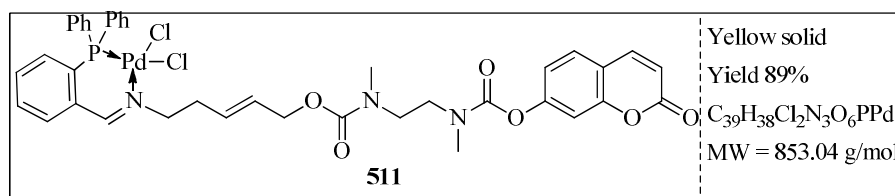


$\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$   $\text{C}_4\text{H}_6\text{Cl}_2\text{N}_2\text{Pd}$ . MW = 259.43 g/mol

Palladium dichloride (124 mg, 0.7 mmol) was suspended in acetonitrile (4 mL) and the mixture was stirred for 12 h at room temperature. The yellow precipitate formed was filtered and dried. Yield 167 mg, 0.643 mmol, 91%.



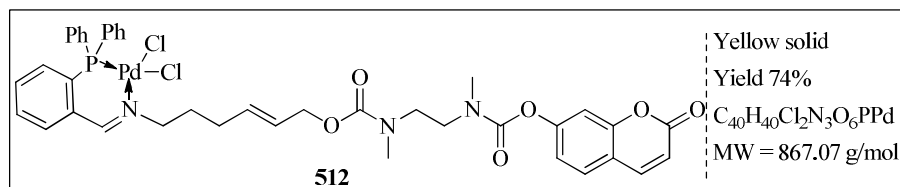
In a round bottomed flask the imine (0.207 mmol, 1 equiv.) was solubilized in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL) under an inert atmosphere of argon.  $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$  (53 mg, 0.207 mmol, 1 equiv.) was added and the mixture was stirred at room temperature for 16 h. The crude was filtrated over celite of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The volume was reduced to 2 mL and ether (5 mL) was added to precipitate the desired complex. The corresponding yellow solid was collected by filtration, and washed several times by ether and dried over air.



$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8.14 (d,  $J$  = 10.41 Hz, 1H), 7.79-7.65 (m, 3H), 7.56-7.52 (m, 4H), 7.46-7.42 (m, 7H), 7.07-7.05 (m, 3H), 6.94 (t,  $J$  = 9.71 Hz, 1H), 6.33 (d,  $J$  = 9.48 Hz, 1H), 5.71-5.59 (m, 1H), 5.24-5.11 (m, 1H), 4.51-4.39 (m, 2H), 4.23 (d,  $J$  = 5.19 Hz, 2H), 3.56-3.43 (m, 3H), 3.13-2.88 (m, 7H), 2.53-2.35 (m, 2H).

$^{31}\text{P}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 31.59

MS ESI (+)  $m/z$   $\text{C}_{39}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_6\text{PPd}$   $[\text{M} - \text{Cl}]^+$ , 813.8



$^{31}P$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 31.62

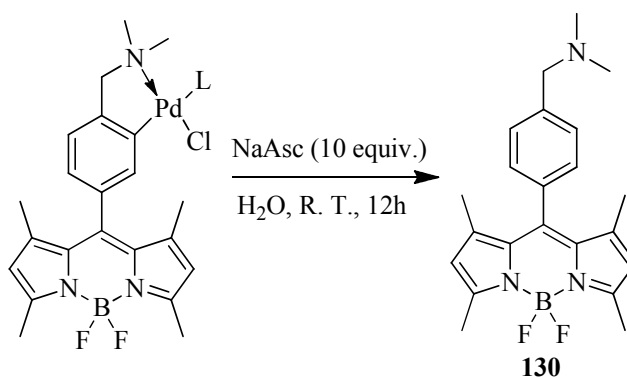
MS ESI (+)  $m/z$   $C_{40}H_{40}Cl_2N_3O_6PPd$   $[M - Cl]^+$ , 830.3

## 1.7. *In vitro* reduction of BODIPY palladium complexes

### 1.7.1. Calibration curve

A calibration curve was established by recording the fluorescence intensity emission at 510 nm, of the free BODIPY ligand 130 in solution DMSO/ $H_2O$  < 1/99 at different concentrations (0.25  $\mu M$  to 5  $\mu M$ ), and excitation at 475 nm. This obtained linear equation  $y = 41.241 x + 3.8736$ ,  $R^2 = 0.9963$  ( $y$  = fluorescence intensity at emission and  $x$  = the concentration of BODIPY ligand) 130 will be used to quantify the amount of released BODIPY ligand 130.

### 1.7.2. Reduction using NaAsc



BODIPY palladium complexes were prepared as 50  $\mu M$  solutions in  $H_2O$ /DMSO (95/5), and diluted later to 2.5  $\mu M$  in water. In another flask, NaAsc was diluted in water to 10%.

For reactions carried out under air: To a solution of BODIPY palladium complex (3 mL, 2.5  $\mu$ M) in a UV cell was added sodium ascorbate (0.1 mL, 10%) and allowed to stir to R. T. The progress of the reaction was monitored by fluorescence directly by excitation at 475 nm and emission detected at 510 nm.

For reactions carried out under an argon atmosphere: All the reactions were carried out by mixing in a round bottomed flask degassed solutions. Small aliquots samples were taken from the reaction mixture and analyzed at regular intervals of time as previously done.

#### **Degassing solutions**

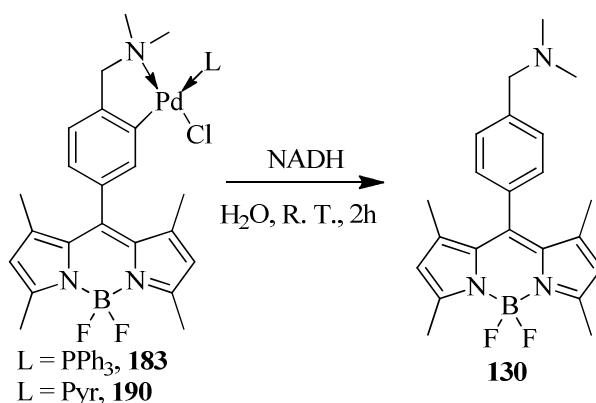
Separately solutions of BODIPY complexes and reducing agent (sodium ascorbate) were freezed and degassed with three freeze-pump-thaw cycles under argon gas (without oxygen). They were allowed to warm to room temperature under inert atmosphere of argon. Later on, they were freezed and degassed as previously done. This procedure was repeated three times.

### **1.7.3. Reduction using NADH**

#### ***1.7.3.1. Test of quenching of the fluorescence by treating BODIPY ligand with NADH, GSH and NAD<sup>+</sup>***

BODIPY ligand 130 was initially solubilized in DMSO and later on diluted in water to 2  $\mu$ M (DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/99). Commercial NADH, NAD<sup>+</sup> or GSH was solubilized in water to a concentration of 20  $\mu$ M. To a solution of the BODIPY ligand 130 (1.5 mL, 1 equiv.) in a UV cell was added a solution of NADH, NAD<sup>+</sup> or GSH (1.5 mL, 10 equiv.) and the mixture was allowed to stir at room temperature. The final concentration of 130 in the mixture was 1  $\mu$ M. Fluorescence measurements were made continuously at regular intervals of time 30 minutes by excitation at 475 nm and emission collected at 510 nm for 435 minutes.

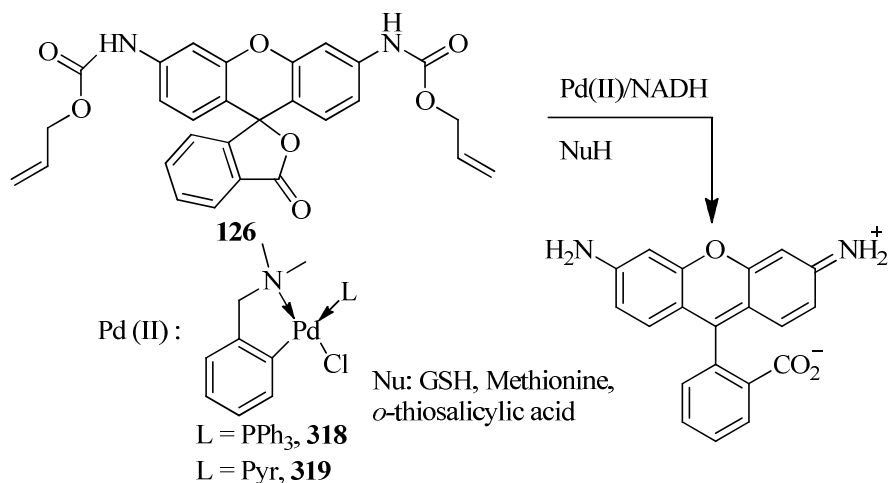
**1.7.3.2. Reduction of BODIPY palladium complexes using NADH**



BODIPY palladium complexes (**183** or **190**) were prepared as 10 mM stock in dimethyl sulfoxide solution, and diluted later to 2.5  $\mu$ M in water. In another flask, NADH or GSH was diluted in water as 8 mM. All these materials were prepared right before usage and degassed as previously done. These reactions were performed by mixing reagents in a round bottomed flask.

To a solution of BODIPY complex **183** or **190** (60 mL) was added NADH or GSH (2 mL) and the mixture was flushed with argon and allowed to stir at room temperature. The progress of the reaction was monitored by fluorescence with aliquots of 2 mL from the mixture analyzed by excitation at 475 nm and emission detected at 510 nm. As a control sample, a solution of BODIPY complex **183** or **190** was stirred and analyzed in a similar manner. All fluorescence intensities recorded were expressed in % according to the fluorescence intensity of BODIPY ligand **130** at the same concentration. All experiments were performed in triplicates and the mean value is reported. To highlight the influence of oxygen, the same experiments were performed in triplicates by using non-degassed solutions.

### 1.8. *In vitro* deprotection of *N, N'*-alloc rhodamine 110



#### 1.8.1. Calibration curve

Commercially available rhodamine 110 was solubilized in DMSO and diluted in water; the ratio was DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/99. The calibration curve was established for 0.1  $\mu$ M to 10  $\mu$ M aqueous solutions with excitation at 450 nm, collecting emission at 520 nm. The linear equation  $y = 76.726x + 5.7992$ ,  $R^2 = 0.9988$  was used for quantification of released rhodamine-110 for uncaging rhodamine-alloc 126.

#### 1.8.2. Cleavage with palladium (II) precursors and NADH

All experiments were performed in triplicates and the mean value is reported. The manipulations were performed under air and under an argon atmosphere to highlight the influence of the oxygen. For manipulations performed under an argon atmosphere, all solutions in separate round bottomed flasks were degassed before use as previously done with three pump-thaw cycles under argon gas (without oxygen).

*Preparation of solutions*

The caged rhodamine-alloc 126 was initially solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted in water to a concentration of 100  $\mu\text{M}$  (DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/99).

Palladium complexes 318 or 319 were initially solubilized in DMSO and later on diluted in water to a concentration of 50  $\mu\text{M}$  (DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/99).

Commercial available NADH was solubilized in water to a concentration of 500  $\mu\text{M}$  or 0.75 mM.

The commercial available nucleophile, glutathione, thiosalicylic acid or methionine was diluted in water to a concentration of 0.6 mM.

*Procedure A without a nucleophile*

To a solution of palladium complex 318 or 319 50  $\mu\text{M}$  (3 mL, 1 equiv.) was added a solution of NADH 0.5 mM (15 mL, 50 equiv.) and the reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 2 hours. The caged rhodamine-alloc 126 in solution 0.1 mM (15 mL, 10 equiv.) was added to the mixture and the reaction was allowed to stir at room temperature. Aliquots samples were taken from the reaction mixture and analyzed by fluorescence spectrophotometry at regular intervals of time; excitation 450 nm and emission at 520 nm. The final volume of the solution was 33 mL and the concentration of the caged fluorophore-alloc 126 in the mixture was 45.4  $\mu\text{M}$ .

*Procedure B with a nucleophile*

To a solution of palladium (II) complex 318 or 319 50  $\mu\text{M}$  (3 mL, 1 equiv.) was added NADH in solution 0.75 mM (10 mL, 50 equiv.) and the mixture was stirred at room temperature for 2 hours. In a separate flask, a mixture of rhodamine-alloc in solution 0.1 mM (15 mL, 10 equiv.) and the nucleophile in solution 0.6 mM (5 mL, 20 equiv.); was added to the reaction mixture. The reaction was stirred at room temperature and monitored by fluorescence spectrophotometry at regular intervals of time during 24 hours. Aliquots were

taken from the reaction mixture and analyzed by excitation at 450 nm and emission at 520 nm. As previously, the final concentration of the caged rhodamine-alloc was 45.4  $\mu\text{M}$ .

### 1.8.3. Cleavage with palladium (0) complex

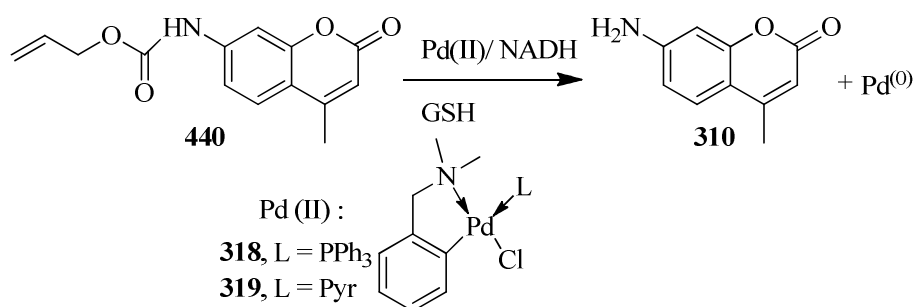
#### *Procedure C without a nucleophile*

To a solution of caged rhodamine-alloc 126 0.1 mM (22.5 mL, 10 equiv.) was added  $\text{Pd}(\text{dba})_2$  in solution 50  $\mu\text{M}$  (4.5 mL, 1 equiv.) followed by a solution of TPPTS 50  $\mu\text{M}$  (22.5 mL, 5 equiv.) and the reaction mixture was allowed to stir at room temperature. The reaction was monitored by fluorescence spectrophotometry at regular intervals of time. Aliquots were taken from the reaction mixture and analyzed by excitation at 450 nm and emission at 520 nm. As previously, the final concentration of the caged rhodamine-alloc was 45.4  $\mu\text{M}$ .

#### *Procedure D with a nucleophile*

To a solution of caged rhodamine-alloc 126 0.1 mM (22.5 mL, 10 equiv.) was added  $\text{Pd}(\text{dba})_2$  in solution 50  $\mu\text{M}$  (4.5 mL, 1 equiv.) followed by a solution of TPPTS 75  $\mu\text{M}$  (15 mL, 5 equiv.) and the nucleophile in solution 0.6 mM (7.5 mL, 20 equiv.). The reaction mixture was allowed to stir at room temperature and monitored by fluorescence spectroscopy at regular intervals of time. Aliquots were taken from the reaction mixture and analyzed by excitation at 450 nm and emission collected at 520 nm. As previously, the final concentration of the caged rhodamine-alloc was 45.4  $\mu\text{M}$ .

### 1.9. *In vitro* deprotection of *N*-alloc coumarin



All solutions were prepared by diluting solid compounds in water to appropriate concentration. For non-soluble water compounds, they were firstly solubilized in DMSO and diluted later in water at a ratio of DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/99. All solutions were prepared before use. For manipulations performed under an argon atmosphere, solutions were degassed as previously done.

#### 1.9.1. Calibration curve

A calibration curve was established by recording the fluorescence intensity emission at 425 nm, of the free aminocoumarin 310 in solution DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/99 at different concentrations (1  $\mu$ M to 50  $\mu$ M), and excitation at 345 nm. For uncaging the aminocoumarin-caged 440 with palladium, the amount of released free aminocoumarin 310 was quantified by using the linear equation  $y = 16.469x + 48.361$ ,  $R^2 = 0.9947$   $y$  = fluorescence intensity at emission and  $x$  = the concentration of aminocoumarin 310 from this calibration curve. All manipulations were done in triplicates and the mean value is reported.

#### 1.9.2. Cleavage with palladium (II) precursors and NADH

##### *Procedure without a nucleophile*

Procedure A was applied by using the caged aminocoumarin-alloc 440 in solution 0.1 mM (15 mL, 10 equiv.), palladium complex 318 or 319 50  $\mu$ M (3 mL, 1 equiv.) and NADH 0.5 mM (15 mL, 50 equiv.). The progress of the

reaction was monitored by fluorescence spectrophotometry with excitation 345 nm, and emission collected at 425 nm from aliquots samples taken from the reaction mixture every 30 minutes during 8 hours.

*Procedure with a nucleophile*

Procedure B was applied by using caged aminocoumarin-alloc 440 in solution 0.1 mM (15 mL, 10 equiv.), palladium complex 50  $\mu$ M (3 mL, 1 equiv.), NADH 0.75 mM (10 mL, 50 equiv.) and the nucleophile in solution 0.3 mM (5 mL, 10 equiv.). Aliquots samples were taken from the reaction mixture and analyzed by fluorescence spectrophotometry with excitation at 345 nm and emission collected at 425 nm every 30 minutes during 8 hours.

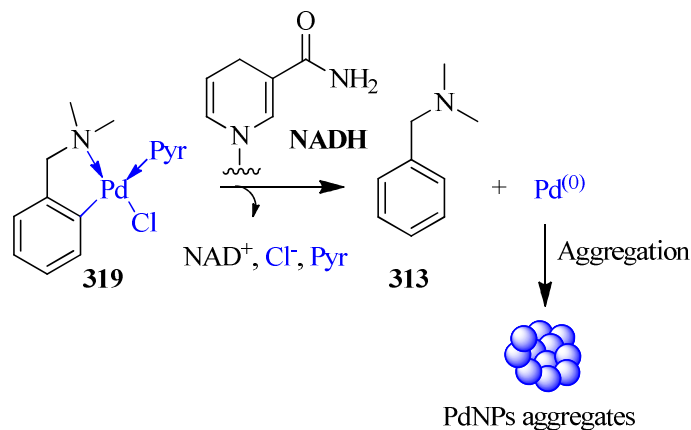
**1.9.3. Cleavage with palladium (0) complex**

*Procedure without a nucleophile*

Procedure C was applied by using aminocoumarin-alloc 440 in solution 0.1 mM (22.5 mL, 10 equiv.), Pd(dba)<sub>2</sub> in solution 50  $\mu$ M (4.5 mL, 1 equiv.) and a solution of TPPTS 50  $\mu$ M (22.5 mL, 5 equiv.). The reaction was monitored by fluorescence spectrophotometry. Aliquots samples were taken from the reaction mixture and analyzed by excitation at 345 nm, and emission collected at 425 nm every 30 minutes during 8 hours.

*Procedure with a nucleophile*

Procedure D was applied by using caged aminocoumarin-alloc 440 in solution 0.1 mM (15 mL, 10 equiv.), Pd(dba)<sub>2</sub> in solution 50  $\mu$ M (3 mL, 1 equiv.), TPPTS in solution 0.75 mM (10 mL, 5 equiv.) and the nucleophile in solution 0.3 mM (5 mL, 10 equiv.). Aliquots samples were taken from the reaction mixture and analyzed by fluorescence spectrophotometry; excitation at 345 nm and emission collected at 425 nm every 30 minutes during 8 hours.

**1.10. Nature of palladium species generated *in situ***

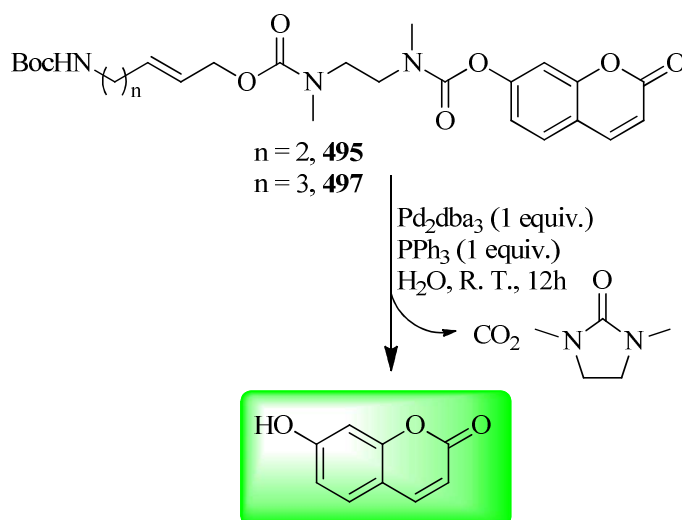
Palladium complex **319** (4 mg, 0.01126 mmoles) was diluted in H<sub>2</sub>O (100 mL) (some drops of DMSO were used to solubilize the complex) to make a  $1.12 \cdot 10^{-4}$  M solution. In another flask, NADH (21 mg, 0.027 mmoles) was diluted in H<sub>2</sub>O (5 mL) to a concentration of 5.5 mM solution. Thereafter, NADH (1 mL, 50 equiv.) was added to the solution of palladium complex **319** (1 mL, 1 equiv.) in a glass tube to make a final palladium solution concentration of 0.56  $\mu$ M. The reaction was stirred at RT and analyzed directly by DLS in solution. For TEM and XPS analyses, after 30 minutes of stirring at RT., the absorbing agent, the carbon black (20 mg) was added. The reaction was further allowed to stir 30 minutes, filtrated, washed with water and ethanol. The metallic palladium adsorbed was analyzed by TEM and XPS techniques.

## 1.11. *In vitro* decoupling activable prodrugs via the Tsuji-Trost deallylation

### 1.11.1. Calibration curve on umbelliferone

The standard curve for umbelliferone was established following the same procedure as described for methyl amino coumarin **310** was established (see section 1.9.1) with excitation at 325 nm.

### 1.11.2. Activation of allylic carbamates with Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> and PPh<sub>3</sub>



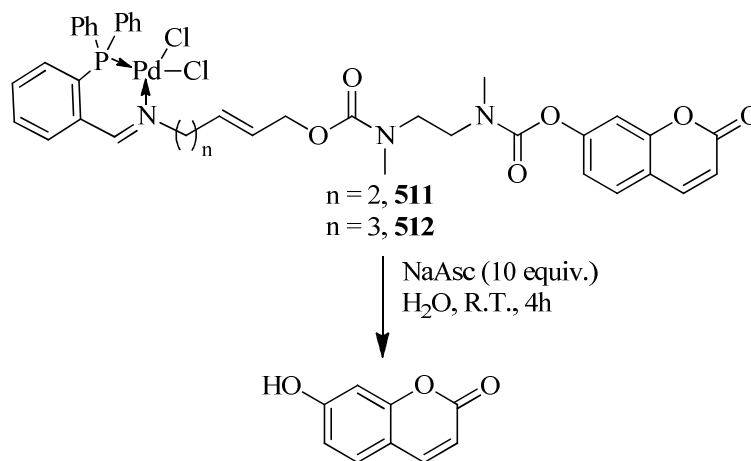
#### *Procedure without a nucleophile*

Allylic carbamates **495** or **497** were solubilized in DMSO and diluted in H<sub>2</sub>O to 15 μM (DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100). Triphenylphosphine was solubilized in DMSO and diluted in H<sub>2</sub>O as 3\* 10<sup>-5</sup>M solution, and Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> was solubilized in a minimum DMSO and diluted in H<sub>2</sub>O as 15 μM. To a solution of **495** or **497** (1 mL, 1 equiv.) in a UV cell was added Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (1 mL, 1 equiv.) followed by PPh<sub>3</sub> (1 mL, 2 equiv.) and the reaction was stirred at room temperature for 4 hours. The final concentration of the allylic carbamate was 5 μM. The reaction was monitored by fluorescence spectrophotometer by excitation at 325 nm, every 10 minutes for 4 hours.

*Procedure with a nucleophile*

Allylic carbamates 495 or 497 were solubilized in DMSO and diluted in H<sub>2</sub>O to 10  $\mu$ M (DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100). Triphenylphosphine was solubilized in DMSO and diluted in H<sub>2</sub>O as 10  $\mu$ M solution, and Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> was solubilized in a minimum DMSO and diluted in H<sub>2</sub>O as 10  $\mu$ M. Glutathione was diluted in H<sub>2</sub>O as 4 \* 10<sup>-5</sup>M. To a solution of 495 or 497 (1.5 mL, 1 equiv.) in a UV cell was added Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (150  $\mu$ L, 1 equiv.) followed by PPh<sub>3</sub> (750  $\mu$ L, 5 equiv.) and glutathione (900  $\mu$ L, 25 equiv.). The reaction was stirred at room temperature for 4 hours. The final concentration of the allylic carbamate was 5  $\mu$ M. The reaction was monitored by fluorescence spectrophotometer by excitation at 325 nm, every 10 minutes for 4 hours.

**1.11.3. Activation of palladium prodrugs with sodium ascorbate**



*Procedure without a nucleophile*

Palladium prodrugs were solubilized in DMSO and diluted in H<sub>2</sub>O to 1\* 10<sup>-5</sup>M (DMSO/H<sub>2</sub>O < 1/100) and sodium ascorbate was diluted in H<sub>2</sub>O as 1 10<sup>-4</sup>M solution. To a solution of palladium prodrug 511 or 512 (1.5 mL, 1 equiv.) in a UV cell was added sodium ascorbate (1.5 mL, 10 equiv.) and the reaction was

## Partie V : Experimental section

---

stirred at room temperature for 4 hours. The finale concentration of the prodrug was 5  $\mu\text{M}$ . The reaction was monitored by fluorescence spectrophotometer by excitation at 325 nm, every 10 minutes for 4 hours.

### *Procedure with a nucleophile*

Palladium prodrugs were solubilized in DMSO and diluted in  $\text{H}_2\text{O}$  to 15  $\mu\text{M}$  ( $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O} < 1/100$ ). Sodium ascorbate was diluted in  $\text{H}_2\text{O}$  as  $15 \times 10^{-5} \text{M}$  solution and glutathione was diluted in  $\text{H}_2\text{O}$  as 18  $\mu\text{M}$  solution. To a solution of palladium prodrug 511 or 512 (1 mL, 1 equiv.) in a UV cell was added sodium ascorbate (1.5 mL, 10 equiv.) followed by glutathione (1 mL, 1.2 equiv.) and the reaction was stirred at room temperature for 4 hours. The finale concentration of the prodrug was 5  $\mu\text{M}$ . The reaction was monitored by fluorescence spectrophotometer by excitation at 325 nm, every 10 minutes for 4 hours.

## **2. Biology section**

### **2.1. General information**

Media, Sera and antibiotics were purchased from Gibco or Sigma-Aldrich. Cell cultures were performed in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C in a SteriCult 200 (Hucoa-Erloss) incubator. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle media (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FPB), glutamine (4 mM), sodium pyruvate (50 mM) and antibiotics (penicillin and streptomycin, 100 units/mL). The day before the assay, media were removed and the cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS). To remove the cells from the flask, trypsin/EDTA 0.25% (3 mL) was added and then incubated for 3 minutes. The cells were counted, and diluted with media to appropriate concentration.

### **2.2. Bioreduction of BODIPY palladium complexes**

#### **2.2.1. Determination of excitation-emission maximum wavelengths**

To determine the optimal combinations of excitation and emission wavelengths for BODIPY palladium complexes, the BODIPY ligand 130 and palladium complexes 183 and 190 were solubilized in a minimum of DMSO and sonicated if necessary for a better dissolution. Thereafter, they were diluted in water to a concentration of 0.1 mM. Later on, this solution was diluted in cell culture medium to a concentration of 0.1  $\mu$ M. For each compound, the optimum excitation-emission combination was performed with the SpectraMax microplate reader in a range of wavelength from 300 to 700 nm.

#### **2.2.2. Bio reduction-Monitoring fluorescence intensity**

BODIPY palladium complexes were solubilized in DMSO and diluted in water as 0.1 mM solution. They were further diluted to 0.1  $\mu$ M using cell culture media. The final concentration of DMSO was less than 1/10 000. Cells were maintained in culture in multi-well microplates (coated with 1% gelatin for

endothelial cells) at a density of about 40 000 cells per plate. After 3 days, the culture medium was removed and BODIPY ligand 130, palladium complexes 183 or 190 in hypoxia and normoxia were added. They were further incubated in hypoxia and normoxia in the dark. After 30 minutes half of the microplates were washed with PBS solution while the other half was left untouched and treated after one hour. Fluorescence intensity was detected in each case by using a microplate reader, SpectraMaxi3 Multi-Mode (Molecular devices).

### **2.2.3. Bio reduction-imaging cells**

Palladium complexes (500  $\mu$ L) in culture medium (diluted as previously) were added to cancer cells grown in microplates. The suspension was incubated in the dark in the hypoxic chamber flushed with (1% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) or in conventional (normoxic) incubator (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) at 37°C. After a specific period of incubation, cell samples were removed from the chamber/incubator, culture medium was discarded and fresh PFA 2% (500  $\mu$ L) was added. After 5 minutes, PFA was removed and cells were intensively washed with PBS (500  $\mu$ L x 3) and stained with a DAPI solution (500  $\mu$ L). After 5 minutes, cells were washed again with PBS (500  $\mu$ L x 3). Cells were imaged by using APOTOME (Zeiss) pseudoconfocal microscopy with excitation filters of 470/40 nm and emission wavelength of 525/50 nm.

## **2.3. Uncoupling *N*-alloc rhodamine 110 inside cancer cells**

The bis-caged rhodamine-alloc **126** was initially solubilized in DMSO and diluted in water to a concentration of  $1 \times 10^{-2}$  M. This solution was later on diluted in cell culture medium to reach 50  $\mu$ M. The final concentration of DMSO was less than 1/10 000. The caged rhodamine **126** in cell culture medium was added into plates containing SiHa cancer cells, followed by incubation at 37°C for 30 min. Thereafter, the culture media was removed, and cells were washed extensively by PBS (3 times). Palladium precatalyst **319** (5  $\mu$ M) and

## Partie V : Experimental section

---

thiosalicylic acid (5  $\mu$ M) in culture media were added to the dish containing cells and incubated under hypoxia or normoxia for 15 min and 1 h. The culture media was discarded and the cells were washed twice with PBS.

The fluorescence intensity of uncaged rhodamine-110 released was detected with SpectraMaxi3 Multi-Mode (Molecular devices). In another experiments, cells containing deprotected rhodamine were imaged with pseudoconfocal fluorescence microscopy, APOTOME (Zeiss).

The above procedure was applied for negative and positive controls as outlined below.

Negative control: SiHa cancer cells incubated with *N*-rhodamine-alloc 126 alone

Negative control: SiHa cancer cells incubated with *N*-rhodamine-alloc 126 and thiosalicylic acid

Negative control: SiHa cancer cells incubated with *N*-rhodamine-alloc 126 and palladium precatalyst 319

Negative control: SiHa cancer cells incubated with *N*-rhodamine-alloc 126 and  $\text{Cp}^*\text{RhCODCl}_2$

Positive control: SiHa cancer cells incubated with *N*-rhodamine-alloc 126 and  $\text{Cp}^*\text{RhCODCl}_2$  and thiosalicylic acid.

## 2.4. Deprotection of *N*-alloc sunitinib inside cancer cells

### 2.4.1. VEGFR2 phosphorylation assay

**Western blotting:** HAEC or HUVEC cells were incubated with *N*-caged sunitinib 461 (0.1  $\mu$ M) and palladium precatalyst 319 (20  $\mu$ M) for 30 minutes. They were washed 3 times with PBS and VEGF (10 ng/ $\mu$ L) was added. They were further incubated for 10 min and washed 3 times with PBS. Cell lysates were analyzed by Western blotting. The same procedure was applied for negative and positive controls.

Negative control: HUVEC cells treated with *N*-sunitinib-alloc 461 alone,

Negative control: HUVEC cells treated with palladium precatalyst 319 alone

Positive control: HUVEC cells treated with uncaged commercial sunitinib inhibitor 460.

**Bioplex test:** HUVEC cells were incubated with *N*-alloc sunitinib 461 (0.1  $\mu$ M) and palladium precatalyst 319 (20  $\mu$ M) for 30 min and washed 3 times with PBS. The VEGF (10 ng/  $\mu$ L) was added and the cells further incubated for 10 min. They were then washed 3 times with PBS and lysed in dedicated Bioplex lysis buffer. Capture magnetic beads coated with an anti-phosphoVEGFR2 antibody (set # 171V50023M) were incubated with cell lysates and a second biotymylated anti-phospho-VEGFR2 antibody was then added (sandwich assay). After washing the beads with lysis buffer, streptavidin-phycoerithrin (PE) reporter dye was added, and after a new washing, fluorescent sorting was performed in the Bioplex apparatus. The same procedure was applied for negative and positive controls as previously done.

### 2.4.2. Cell proliferation assays

HUVEC cells were incubated 24 h with *N*-caged sunitinib 461 (0.1  $\mu$ M) and palladium precatalyst 319 (20  $\mu$ M). They were washed 3 times with PBS and treated with VEGF (10 ng/ $\mu$ L). After 10 minutes of incubation, they were washed 3 times with PBS and the cell density was determined. Negative and positive controls were performed as previously by applying the same procedure.

# Références

- <sup>1</sup> Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
- <sup>2</sup> Talekar, M.; Tran, T. H.; Amiji, M. *AAPS J.* **2015**, *17*, 813-827.
- <sup>3</sup> <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/> (visité le 11 février 2016).
- <sup>4</sup> Volm, M. *Anticancer Res.* **1998**, *18*, 2905-2917.
- <sup>5</sup> Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Prescher, J. A. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592-605.
- <sup>6</sup> Ramil, C. P.; Lin, Q. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11007-11022.
- <sup>7</sup> Lang, K.; Chin, J. W. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4764-4806.
- <sup>8</sup> Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998.
- <sup>9</sup> Zheng, M.; Zheng, L.; Zhang, P.; Li, J.; Zhang, Y. *Macromolecules* **2015**, *20*, 3190-3205.
- <sup>10</sup> Yusop, R. M.; Unciti-Broceta, A.; Johansson, E. M. V.; Sánchez-Martín, R. M.; Bradley, M. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 239-243.
- <sup>11</sup> Shaughnessy, K. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1827-1835.
- <sup>12</sup> Lin, Y. A.; Chalker, J. M.; Floyd, N.; Bernades, G. J. L.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9642-9643.
- <sup>13</sup> Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Gray, B. L.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8168-8179.
- <sup>14</sup> Lin, Y. A.; Boutureira, O.; Lercher, L.; Bhushan, B.; Paton, R. S.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12156-12159.
- <sup>15</sup> Gong, Y.; Pan, L. *Tet. Lett.* **2015**, *56*, 2123-2132.
- <sup>16</sup> Kodama, K.; Fukuzawa, S.; Nakayama, H.; Sakamoto, K.; Kigawa, T.; Yabuki, T.; Matsuda, N.; Shirouzu, M.; Takio, K.; Yokoyama, S.; Tachibana, K. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 232-238.
- <sup>17</sup> Brustad, E.; Bushey, M. L.; Lee, J. W.; Groff, D.; Liu, W.; Schultz, P. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8220-8223.

- <sup>18</sup> Kodama, K.; Fukuzawa, S.; Nakayama, H.; Kigawa, T.; Sakamoto, K.; Yabuki, T.; Matsuda, N.; Shirouzu, M.; Takio, K.; Tachibana, K.; Yokoyama, S. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 134-139.
- <sup>19</sup> Chalker, J. M.; Wood, C. S. C.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16346-16347.
- <sup>20</sup> Spicer, C. D.; Triemer, T.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 800-803.
- <sup>21</sup> Li, N.; Lim, R. K.V.; Edwardraja, S.; Lin, Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15316-15319.
- <sup>22</sup> Sasmal, P. K.; Streu, C. N.; Meggers, E. *Chem. Commun* **2013**, *49*, 1581-1587.
- <sup>23</sup> Li, J.; Lin, S.; Wang, J.; Jia, S.; Yang, M.; Hao, Z.; Zhang, X.; Chen, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7330-7338.
- <sup>24</sup> Völker, T.; Meggers, E. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 48-54.
- <sup>25</sup> Streu, C.; Meggers, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5645-5648.
- <sup>26</sup> Sasmal, P. K.; Carregal-Romero, S.; Parak, W. J.; Meggers, E. *Organometallics* **2012**, *31*, 5968-5970.
- <sup>27</sup> Völker, T.; Dempwolff, F.; Graumann, P. L.; Meggers, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10536-10540.
- <sup>28</sup> Li, J.; Yu, J.; Zhao, J.; Wang, J.; Zheng, S.; Lin, S.; Chen, L.; Yang, M.; Jia, S.; Zhang, X.; Chen, P. R. *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 352-361.
- <sup>29</sup> Spicer, C. D.; Davis, B. G. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1698-1700.
- <sup>30</sup> Sasmal, P. K.; Carregal-Romero, S.; Han, A. A.; Streu, C. N.; Lin, Z.; Namikawa, K.; Elliott, S. L.; Köster, R. W.; Parak, W. J.; Meggers, E. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1116-1120.
- <sup>31</sup> Huttunen, K. M.; Raunio, H.; Rautio, J. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 750-771.
- <sup>32</sup> Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2008**, *7*, 255-270.

- <sup>33</sup> Stella, V. J. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 4755-4765.
- <sup>34</sup> Azoulay, M.; Tuffin, G.; Sallem, W.; Florent, J. -C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3147-3149.
- <sup>35</sup> van Brakel, R.; Vulders, R. C. M.; Bokdam, R. J.; Grull, H.; Robillard, M. S. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 714-718.
- <sup>36</sup> Matikonda, S. S.; Orsi, D. L.; Staudacher, V.; Jenkins, I. A.; Fiedler, F.; Chen, J.; Gamble, A. B. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1212-1218.
- <sup>37</sup> Versteegen, R. M.; Rossin, R.; ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; Robillard, M. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14112-14116.
- <sup>38</sup> Papot, S.; Tranoy, I.; Tillequin, F.; Florent, J.-C.; Gesson, J.-P. *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents* **2002**, *2*, 155-185.
- <sup>39</sup> Alouane, A.; Labruère, R.; Le Saux, T.; Schmidt, F.; Jullien, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7492-7509.
- <sup>40</sup> Legigan, T.; Clarhaut, J.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Renoux, B.; Thomas, M.; Le Pape, A.; Lerondel S.; Papot, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11606-11610.
- <sup>41</sup> Kratz, F.; Müller, A. I.; Ryppa, C.; Warnecke, A. *ChemMedChem.* **2008**, *3*, 20-53.
- <sup>42</sup> Roth, E. M.; Green, O.; Gnaim, S.; Shabat, D. *Chem. Rev.* **2016**, DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00372.
- <sup>43</sup> Gianferrara, T.; Bratsos, I.; Alessio, E. *Dalton Trans.* **2009**, 7558-7598.
- <sup>44</sup> Choy, H.; Park, C. Yao, M. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1633-1638.
- <sup>45</sup> Wheate, N. J.; Walker, S.; Craig, G. E.; Oun, R. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 8113-8127.
- <sup>46</sup> Reisner, E.; Arion, V. B.; Keppler, B. K.; Pombeiro, A. J. L. *Inorg. Chim. Acta* **2008**, *361*, 1569-1583.
- <sup>47</sup> Kaluderović, G. N.; Kommera, H.; Schwieger, S.; Paethanom, A.; Kunze, M.; Schmidt, H.; Paschke, R.; Steinborn, D. *Dalton Trans.* **2009**, 10720-10726.

- <sup>48</sup> Bergamo, A.; Gava, B.; Alessio, E.; Mestroni, G.; Serli, B.; Cocchietto, M.; Zorzet, S.; Sava, G. *Int. J. Oncol.* **2002**, *21*, 1331-1338.
- <sup>49</sup> Pluim, D.; van Waardenburg, R. C. A. M.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2004**, *54*, 71-78.
- <sup>50</sup> Harris, T. V.; Szilagyi, R. K.; McFarlane Holman, K. L. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 891-898.
- <sup>51</sup> Groessl, M.; Zava, O.; Dyson, J. P. *Metallomics* **2011**, *3*, 591-599.
- <sup>52</sup> Anderson, C. M.; Jain, S. S.; Silber, L.; Chen, K.; Guha, S.; Zhang, W.; McLaughlin, E. C.; Hu, Y.; Tanski, J. M. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *145*, 41-50.
- <sup>53</sup> Mu, C.; Chang, S. W.; Prosser, K. E.; Leung, A. W. Y.; Santacruz, S.; Jang, T.; Thompson, J. R.; Yapp, D. T. T.; Warren, J. J.; Bally, M. B.; Beischlag, T. V.; Walsby, C. J. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 177-190.
- <sup>54</sup> van Staveren, D. R.; Metzler-Nolte, N. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5931-5985.
- <sup>55</sup> Jaouen, G.; Vessièrès, A.; Top, S. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8802-8817.
- <sup>56</sup> Top, S.; Vessièrès, A.; Cabestaing, C.; Laios, I.; Leclercq, G.; Provot, C.; Jaouen, G. *J. Organomet. Chem.* **2001**, 637-639, 500-506.
- <sup>57</sup> Failes, T. W.; Hambley, T. W. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 396-403.
- <sup>58</sup> Brown, M. J.; Giaccia, A. J. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1408-1416.
- <sup>59</sup> Hockel, M.; Vaupel, P. *J. Natl. Cancer Inst.* **2001**, *93*, 266-276.
- <sup>60</sup> Hoogsten, I. J.; Marres, H. A. M.; van der Kogel, A. J. N.; Kanders, J. H. A. M. *Clin. Oncology* **2007**, *19*, 385-396.
- <sup>61</sup> Lee, K.; Roth, R. A.; LaPres, J. J. *Pharmacol. Therapeutics* **2007**, *113*, 229-246.
- <sup>62</sup> Coleman, C. N.; Mitchell, J. B.; Camphausen, K. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 610-615.
- <sup>63</sup> Cairns, R. A.; Hill, R. P. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 2054-2061.
- <sup>64</sup> Semenza, G. L.; Roth, P. H.; Fang, H. M.; Wang, G. L. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 23757-23763.

- <sup>65</sup> Bennewith, K. L.; Durand, R. E. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6183-6189.
- <sup>66</sup> Heddlestone, J. M.; Li, Z.; Lathia, J. D.; Bao, S.; Hjelmeland, A. B.; Rich, J. N. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 789-795.
- <sup>67</sup> Wigfield, S. M.; Winter, S. C.; Giatromanolaki, A.; Taylor, J.; Koukourakis, M. L.; Harris, A. L. *Br. J. Cancer* **2008**, *98*, 1975-1984.
- <sup>68</sup> Craig, P. R.; Brothers, P. J.; Clark, G. R.; Wilson, W. R.; Denny, W. A.; Ware, D. C. *Dalton Trans.* **2004**, 611-618.
- <sup>69</sup> Brown, M. J.; Wilson, W. R. *Nature Rev. Cancer* **2004**, *4*, 437-447.
- <sup>70</sup> Teicher, B. A. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* **1995**, *9*, 475-506.
- <sup>71</sup> Primeau, A. J.; Rendon, A.; Hedley, D.; Lilge, L.; Tannock, I. F. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 8782-8788.
- <sup>72</sup> Al-Abd, A. M.; Aljehani, Z. K.; Gazzaz, R. W.; Fakhri, S. H.; Jabbad, A. H.; Alahdal, A. M.; Torchilin, V. P. *J. Control. Release* **2015**, *219*, 269-277.
- <sup>73</sup> Denny, W. A.; Wilson, W. R. *Cancer Metast. Rev.* **1993**, *12*, 135-151.
- <sup>74</sup> Chen, Y.; Hu, L. *Mod. Res. Rev.* **2009**, *29*, 29-64.
- <sup>75</sup> Stratford, I. J.; Workman, P. *Anticancer Drug Des.* **1998**, *13*, 519-528.
- <sup>76</sup> Patterson, A. V.; Ferry, D. M.; Edmunds, S. J.; Gu, Y.; Singleton, R. S.; Patel, K.; Pullen, S. M.; Hicks, K. O.; Syddall, S. P.; Atwell, G. J.; Yang, S.; Denny, W. A.; Wilson, W. R. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 3922-3932.
- <sup>77</sup> Singleton, R. S.; Guise, C. P.; Ferry, D. M.; Pullen, S. M.; Dorie, M. J.; Brown, J. M.; Patterson, A. V.; Wilson, W. R. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 3884-3891.
- <sup>78</sup> Guise, C. P.; Abbattista, M. R.; Tipparaju, S. R.; Lambie, N. K.; Su, J.; Li, D.; Wilson, W. R.; Dachs, G. U.; Patterson, A. V. *Mol. Pharmacol.* **2012**, *81*, 31-40.
- <sup>79</sup> Guise, C. P.; Wang, A. T.; Theil, A.; Bridewell, D. J.; Wilson, W. R.; Patterson, A. V. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 810-820.
- <sup>80</sup> Guise, C. P.; Abbattista, M. R.; Singleton, R. S.; Holford, S. D.; Connolly, J.; Dachs, G. U.; Fox, S. B.; Pollock, R.; Harvey, J.; Guilford, P.; Doñate, F.

Wilson, W. R.; Patterson, A. V. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1573-1584.

<sup>81</sup> Duan, J. X.; Jiao, H.; Kaizerman, J.; Stanton, T.; Evans, J. W.; Lan, L.; Lorente, G.; Banica, M.; Jung, D.; Wang, J.; Ma, H.; Li, X.; Yang, Z.; Hoffman, R. M.; Ammons, W. S.; Hart, C. P.; Matteucci, M. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2412-2420.

<sup>82</sup> Meng, F.; Evans, J. W.; Bhupathi, D.; Banica, M.; Lan, L.; Lorente, G.; Duan, J. X.; Cai, X.; Mowday, A. M.; Guise, C. P.; Maroz, A.; Anderson, R. F.; Patterson, A. V.; Stachelek, G. C.; Glazer, P. M.; Matteucci, M. D.; Hart, C. P. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 740-751.

<sup>83</sup> Kennedy, K. A.; Rockwell, S.; Sartorelli, A. C. *Cancer Res.* **1980**, *40*, 2356-2360.

<sup>84</sup> Haffty, B. G.; Wilson, L. D.; Son, Y. H.; Cho, E. I.; Papac, R. J.; Fischer, D. B.; Rockwell, S.; Sartorelli, A. C.; Ross, D. A.; Sasaki, C. T.; Fischer, J. J. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2005**, *61*, 119-128.

<sup>85</sup> Phillips, R. M.; Hendriks, H. R.; Peters, G. J. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *168*, 11-18.

<sup>86</sup> Cowen, R. L.; Patterson, A. V.; Telfer, B. A.; Airley, R. E.; Hobbs, S.; Phillips, R. M.; Jaffar, M.; Stratford, I. J.; Williams, K. J. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2*, 901-909.

<sup>87</sup> Saunders, M. P.; Jaffar, M.; Patterson, A. V.; Nolan, J.; Naylor, M. A.; Phillips, R. M.; Harris, A. L.; Stratford, I. J. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 993-996.

<sup>88</sup> Gutierrez, P. L. *Front Biosci* **2000**, *5*, D629-D638.

<sup>89</sup> Beall, H. D.; Winski, S. L. *Front Sci Ser* **2000**, *5*, D639-648.

<sup>90</sup> Plumb, J. A.; Workman, P. *Int. J. Cancer* **1994**, *56*, 134-139.

<sup>91</sup> Plumb, J. A.; Gerritsen, M.; Milroy, R.; Thomson, P.; Workman, P. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1994**, *29*, 295-299.

<sup>92</sup> Robertson, N.; Haigh, A.; Adams, G. E.; Stratford, I. J. *Eur. J. Cancer* **1994**,

30A, 1013-1019.

<sup>93</sup> Hendricksen, K.; Cornel, E. B.; de Reijke, T. M.; Arentsen, H. C.; Chawla, S.; Witjes, J. A. *J. Urol.* **2012**, *187*, 1195-1199.

<sup>94</sup> Tanabe, K.; Makimura, Y.; Tachi, Y.; Imagawa-Sato, A.; Nishimoto, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2321-2324.

<sup>95</sup> Zhang, Z.; Tanabe, K.; Hatta, H.; Nishimoto, S. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1905-1910.

<sup>96</sup> McKeown, S. R.; Cowent, R. L.; Williams, K. J. *Clin. Oncol.* **2007**, *19*, 427-442.

<sup>97</sup> von Pawel, J.; von Roemeling, R.; Gatzemeier, U.; Boyer, M.; Elisson, L. O.; Clark, P.; Talbot, D.; Rey, A.; Butler, T. W.; Hirsh, V.; Olver, I.; Bergman, B.; Ayoub, J.; Richardson, G.; Dunlop, D.; Arcenas, A.; Vescio, R.; Viallet, J.; Treat, J. *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 1351-1359.

<sup>98</sup> Daniels, J. S.; Gates, K. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3380-3385.

<sup>99</sup> Chowdhury, G.; Junnotula, V.; Daniels, J. S.; Greenberg, M. M.; Gates, K. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12870-12877.

<sup>100</sup> Shinde, S. S.; Anderson, R. F.; Hay, M. P.; Gamage, S. A.; Denny, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7865-7874.

<sup>101</sup> Anderson, R. F.; Shinde, S. S.; Hay, M. P.; Gamage, S. A.; Denny, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 748-756.

<sup>102</sup> Marcu, L.; Olver, I. *Curr. Clin. Pharmacol.* **2006**, *1*, 71-79.

<sup>103</sup> Rischin, D.; Peters, L.; Fisher, R.; Macann, A.; Denham, J.; Poulsen, M.; Jackson, M.; Kenny, L.; Penniment, M.; Corry, J.; Lamb, D.; McClure, B. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 79-87.

<sup>104</sup> Miller, V. A.; Ng, K. K.; Grant, S. C.; Kindler, H.; Pizzo, B.; Heelan, R. T.; von Roemeling, R.; Kris, M. G. *Ann. Oncol.* **1997**, *8*, 1269-1271.

<sup>105</sup> Treat, J.; Johnson, E.; Langer, C.; Belani, C.; Haynes, B.; Greenberg, R.; Rodriquez, R.; Drobins, P.; Miller Jr, W.; Meehan, L.; McKeon, A.; Devin, J.

- von Roemeling, R.; Viallet, J. *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 3524-3527.
- <sup>106</sup> Rischin, D.; Peters, L. J.; O'Sullivan, B.; Giralt, J.; Fisher, R.; Yuen, K.; Trotti, A.; Bernier, J.; Bourhis, J.; Ringash, J.; Henke, M.; Kenny, L. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 2989-2995.
- <sup>107</sup> Williamson, S. K.; Crowley, J. J.; Lara Jr, P. N.; McCoy, J.; Lau, D. H. M.; Tucker, R. W.; Mills, G. M.; Gandara, D. R. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 9097-9104.
- <sup>108</sup> Smith, P. J.; Blunt, N. J.; Desnoyers, R.; Giles, Y.; Patterson, L. H. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1997**, *39*, 455-461.
- <sup>109</sup> Denny, W. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 577-595.
- <sup>110</sup> Munteanu, C. R.; Suntharalingam, K. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 13796-13808.
- <sup>111</sup> Hall, M. D.; Failes, T. W.; Yamamoto, N.; Hambley, T. W. *Dalton Trans.* **2007**, 3983-3990.
- <sup>112</sup> Mattes, W. B.; Hartley, J. A.; Kohn, K. W. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 2971-2987.
- <sup>113</sup> Teicher, B. A.; Abrams, M. J.; Rosbe, K. W.; Herman, T. S. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 6971-6975.
- <sup>114</sup> Ware, D. C.; Brothers, P. J.; Clark, G. R.; Denny, W. A.; Palmer, B. D.; Wilson, W. R. *J. Chem. Soc.; Dalton Trans.* **2000**, 925-932.
- <sup>115</sup> Failes, T. W.; Cullinane, C.; Diakos, C. I.; Yamamoto, N.; Lyons, J. G.; Hambley, T. W. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2974-2982.
- <sup>116</sup> Milbank, J. B.; Stevenson, R. J.; Ware, D. C.; Chang, J. Y.; Tercel, M.; Ahn, G. O.; Wilson, W. R.; Denny, W. A. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6822-6834.
- <sup>117</sup> Blower, P. J.; Dilworth, J. R.; Maurer, R. I.; Mullen, D. G.; Reynolds, C. A.; Zheng, Y. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *85*, 15-22.
- <sup>118</sup> Santini, C.; Pellei, M.; Gandin, V.; Porchia, M.; Tisato, F.; Marzano, C. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 815-862.
- <sup>119</sup> Lin, P. S.; Ho, K. C. *J. Nucl. Med.* **1998**, *39*, 677-678.

- <sup>120</sup> Dearling, J. L. J.; Lewis, J. S.; Mullen, G. E. D.; Rae, M. T.; Zweit, J.; Blower, P. J. *Eur. J. Nucl. Med.* **1998**, *25*, 788-792.
- <sup>121</sup> Graf, N.; Lippard, S. J. *Adv. Drug Del. Rev.* **2012**, *64*, 993-1004.
- <sup>122</sup> Torre, M. H.; Gambino, D.; Araujo, J.; Cerecetto, H.; González, B.; Lavaggi, M. L.; Azqueta, A.; de Cerain, A. L.; Vega, A. M.; Abram, U.; Costa-Filho, A. *J. Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 473-480.
- <sup>123</sup> Urquiola, C.; Gambino, D.; Cabrera, M.; Lavaggi, M. L.; Cerecetto, H.; González, M.; de Cerain, A. L.; Monge, A.; Costa-Filho, A. J.; Torre, M. H. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 119-126.
- <sup>124</sup> Treibs, A.; Kreuzer, F. H. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1968**, *718*, 208-223.
- <sup>125</sup> Falk, H.; Hofer, O.; Lehner, H. *Monatshefte für* **1974**, *105*, 169-178.
- <sup>126</sup> Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932.
- <sup>127</sup> Mula, S.; Ray, A. K.; Banerjee, M.; Chaudhuri, T.; Dasgupta, K.; Chattopadhyay, S. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2146-2154.
- <sup>128</sup> Wu, L.; Burgess, K. *Chem. Commun.* **2008**, 4933-4935.
- <sup>129</sup> Crawford, S. M.; Thompson, A. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1424-1427.
- <sup>130</sup> Sobenina, L. N.; Vasil'tsov, A. M.; Petrova, O. V.; Petrushenko, K. B.; Ushakov, I. A.; Clavier, G.; Meallet-Renault, R.; Mikhaleva, A. I.; Trofimov, B. A. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2524-2527.
- <sup>131</sup> Boyer, J. H.; Haag, A. M.; Sathyamoorthi, G.; Soong, M. L.; Thangaraj, K. *Heteroatom. Chem.* **1993**, *4*, 39-49.
- <sup>132</sup> Burghart, A.; Thoresen, L. H.; Chen, J. *Chem. Commun.* **2000**, 2203-2204.
- <sup>133</sup> Karolin, J.; Johansson, L. B. A.; Strandberg, L.; Ny, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7801-7806.
- <sup>134</sup> Tan, K.; Jaquinod, L.; Paolesse, R.; Nardis, S.; Di Natale, C.; Di Carlo, A.; Prodi, L.; Montalti, M.; Zaccheroni, N.; Smith, K. M. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 1099-1106.
- <sup>135</sup> Bergström, F.; Hägglof, P.; Karolin, J.; Ny, T.; Johansson, L. B.-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 12477-12481.

- <sup>136</sup> Wagner, R. W.; Lindsey, J. S. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1373-1380.
- <sup>137</sup> Metzker, M. L. WO Patent WO/2003/066812, 2003.
- <sup>138</sup> Xiao, S.; Cao, Q.; Dan, F. *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 2970-2981.
- <sup>139</sup> Michel, B. W.; Lippert, A. R.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15668-15671.
- <sup>140</sup> Cao, Y.; Li, D.-W.; Zhao, L.-J.; Liu, Z.-Y.; Cao, X.-M.; Long, Y.-T. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9696-9701.
- <sup>141</sup> Reddy, U. G.; Ali, F.; Taye, N.; Chattopadhyay, S.; Das, A. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3649-3652.
- <sup>142</sup> Waghorn, P. A.; Jones, M. W.; McIntyre, A.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Harris, A. L.; Supuran, C.T.; Dilworth, J.R. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 2898-2907.
- <sup>143</sup> Menten, A.; Kemmitt, R. D. W.; Fawcett, J.; Russell, D. R. *J. Mol. Struct.* **2004**, *693*, 241-246.
- <sup>144</sup> Atla, S. B.; Kelkar, A. A.; Puranik, V. G.; Bensch, W.; Chaudhari, A.V. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 683-690.
- <sup>145</sup> Chien-Tien, C.; Jun-Qi, K.; Santos, B. S.; Ya-Hui, L. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 26-29.
- <sup>146</sup> Zhu, X.-Q.; Mu, Y.-Y.; Li, X.-T. *J. Phys. Chem. B.* **2011**, *115*, 14794-14811.
- <sup>147</sup> Clarke, A. J.; Yamamoto, N.; Jensen, P.; Hambley, T. W. *Dalton Trans.* **2009**, 10787-10798.
- <sup>148</sup> Yu, W.; Xie, H.; Chen, L.; Li, Y.; Zhang, C. *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, *4*, 465-470.
- <sup>149</sup> Veerakumar, P.; Velayudham, M.; Lu, K.-L.; Rajagopal, S. *Applied Catalysis A: General.* **2013**, *455*, 247-260.
- <sup>150</sup> Lee, H.; Habas, S. E.; Kweskin, S.; Butcher, D.; Somorjai, G. A.; Yang, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7824-7828.
- <sup>151</sup> Lim, B.; Jiang, M.; Tao, J.; Camargo, P. H. C.; Zhu, Y.; Xia, Y. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 189-200.
- <sup>152</sup> Yamamoto, N.; Danos, S.; Bonnichs, P. D.; Failes, T. W.; New, E. J.; Hambley,

- T. W. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 861-871.
- <sup>153</sup> Panda, S.; Acharya, S.; Mohanty, P. *J. Indian. Chem. Soc.* **2007**, *84*, 813-815.
- <sup>154</sup> Paz, M. M.; Tomasz, M. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2789-2792.
- <sup>155</sup> Wolkenberg, S. E.; Boger, D. L. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2477-2495.
- <sup>156</sup> Betanzos-Lara, S.; Liu, Z.; Habtemariam, A.; Pizarro, A. M.; Qamar, B.; Sadler P. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3897-3900.
- <sup>157</sup> Soldevila-Barreda, J. J.; Romero-Canelón, I.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J. *Nat. Comm.* **2015**, *6*, 6582.
- <sup>158</sup> Soetens, M. *Mémoire de Master UCL*. 2013-2014.
- <sup>159</sup> Chiarugi, A.; Dölle, C.; Felici, R.; Ziegler, M. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 741-752.
- <sup>160</sup> Cui, L.; Zhong, Y.; Zhu, W.; Xu, Y.; Du, Q.; Wang, X.; Qian, X.; Xiao, Y. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 928-931.
- <sup>161</sup> Paul, C. E.; Gargiulo, S.; Opperman, D. J.; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V.; Taglieber, A.; Arends, I. W. C. E.; Hollmann, F. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 180-183.
- <sup>162</sup> Tayama, E.; Kimura, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8869-8871.
- <sup>163</sup> Meijer, M. D.; Kleij, A. W.; Williams, B. S.; Ellis, D.; Lutz, M.; Spek, A. L.; van Klink, G. P. M.; van Koten, G. *Organometallics* **2002**, *21*, 264-271.
- <sup>164</sup> Denney, M. C.; Smythe, N. A.; Cetto, K. L.; Kemp, R. A.; Goldberg, K. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2508-2509.
- <sup>165</sup> Konnick, M. M.; Gandhi, B. A.; Guzei, I. A.; Stahl, S. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2904-2907.
- <sup>166</sup> Schlangen, M.; Schwarz, H. *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 379-386.
- <sup>167</sup> Ruiz, J.; Cutillas, N.; Rodríguez, V.; Sampedro, J.; López, G.; Chaloner, P. A.; Hitchcock, P. B. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1999**, 2939-2946.
- <sup>168</sup> Serrano, J. L.; García, L.; Pérez, J.; Pérez, E.; Galiana, J. M.; García, J.; Martínez, M.; Sánchez, G.; da Silva, I. *Dalton Trans.*, **2011**, *40*, 156-168.

- <sup>169</sup> Caughey, W. S.; Schellenberg, K. A. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1978-1982.
- <sup>170</sup> Dittmer, D.C.; Kolyer J. M. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2288-2294.
- <sup>171</sup> Ohno, A.; Ishikawa, Y.; Yamazaki, N.; Okamura, M.; Kawai, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 1186-1192.
- <sup>172</sup> Serpell, C. J.; Cookson, J.; Ozkaya, D.; Beer, B. D. *Nature Chem.* **2011**, *3*, 478-483.
- <sup>173</sup> Hsu, H.-T.; Trantow, B. M.; Waymouth, R. M.; Wender, P. A. *Bioconjugate Chem.* **2016**, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00469.
- <sup>174</sup> Lemaire-Audoire, S.; Savignac, M.; Genêt, J. P.; Bernard, J. M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1267-1270.
- <sup>175</sup> Wang, J.; Cheng, B.; Li, J.; Zhang, Z.; Hong, W.; Chen, X.; Chen, P. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5364-5368.
- <sup>176</sup> Kathuria, A.; Priya, N.; Chand, K.; Singh, P.; Gupta, A.; Jalal, S.; Gupta, S.; Raj, G. H.; Sharma, K. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1624-1638.
- <sup>177</sup> Sánchez, M. I.; Penas, C.; Vázquez, M. E.; Mascareñas, J. L. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1901-1907.
- <sup>178</sup> Carmeliet, P. *Oncology.* **2005**, *69*, 4-10.
- <sup>179</sup> Glück, A. A.; Aebersold, D. M.; Zimmer, Y.; Medová, M. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2015**, *62*, 101-114.
- <sup>180</sup> Karakashev, S. V.; Reginato, M. J. *Cancer Manag. Res.* **2015**, *7*, 253-264.
- <sup>181</sup> Iacovelli, R.; Mancini, M. L.; Risi, E.; Palazzo, A.; Cortesi, E. *Int. J. Dermatol.* **2012**, *51*, 221-222.
- <sup>182</sup> Funakoshi, T.; Latif, A.; Galsky, M. D. *Cancer Treat. Rev.* **2013**, *39*, 818-830.
- <sup>183</sup> Di Lorenzo, G.; Autorino, R.; Bruni, G.; Cartenì, G.; Ricevuto, E.; Tudini, M.; Ficorella, C.; Romano, C.; Aieta, M.; Giordano, A.; Giuliano, M.; Gonnella, A.; De Nunzio, C.; Rizzo, M.; Montesarchio, V.; Ewer, M.; De Placido, S. *Annals Oncol.* **2009**, *20*, 1535-1542.
- <sup>184</sup> Maskell, L.; Blanche E. A.; Colucci, M. A.; Whatmore, J. L.; Moody, C. J.

*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1575-1578.

<sup>185</sup> Blanche, E. A.; Maskell, L.; Colucci, M. A.; Whatmore, J. L.; Moody, C. J. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 4894-4903.

<sup>186</sup> Buchy, E.; Valetti, S.; Mura, S.; Mougin, J.; Troufflard, C.; Couvreur, P.; Desmaële, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 202-212.

<sup>187</sup> Weiss, J. T.; Carragher, N. O.; Unciti-Broceta, A. *Scientific Reports*. **2015**, *5*, 9329.

<sup>188</sup> Weiss, J.; Dawson, J.; Macleod, K.; Rybsko, W.; Fraser, C.; Torres- Sánchez, C.; Patton, E.; Bradley, M.; Carragher, N.; Unciti- Broceta, A. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3277.

<sup>189</sup> Weiss, J. T.; Fraser, C.; Rubio-Ruiz, B.; Myers, S. H.; Crispin, R.; Dawson, J. C.; Brunton, V. G.; Patton, E. E.; Carragher, N. O.; Unciti-Broceta, A. *Front. Chem.*, **2014**, *2*, 56.

<sup>190</sup> Weiss, J. T.; Dawson, J. C.; Fraser, C.; Rybski, W.; Torres-Sánchez, C.; Bradley, M.; Patton, E. E.; Carragher, N. O.; Unciti-Broceta, A. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5395-5404.

<sup>191</sup> Rülke, R. E.; Kaasjager, V. E.; Wehman, P.; Elsevier, C. J.; van Leeuwen, P. W. N. M.; Vrieze, K. *Organometallics* **1996**, *15*, 3022-3031.

<sup>192</sup> Yokoyama, H.; Ejiri, H.; Miyazawa, M.; Yamaguchi, S.; Hirai, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 852-856.

<sup>193</sup> Yoshitomi, Y.; Arai, H.; Makino, K.; Hamada, Y. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11568-11579.

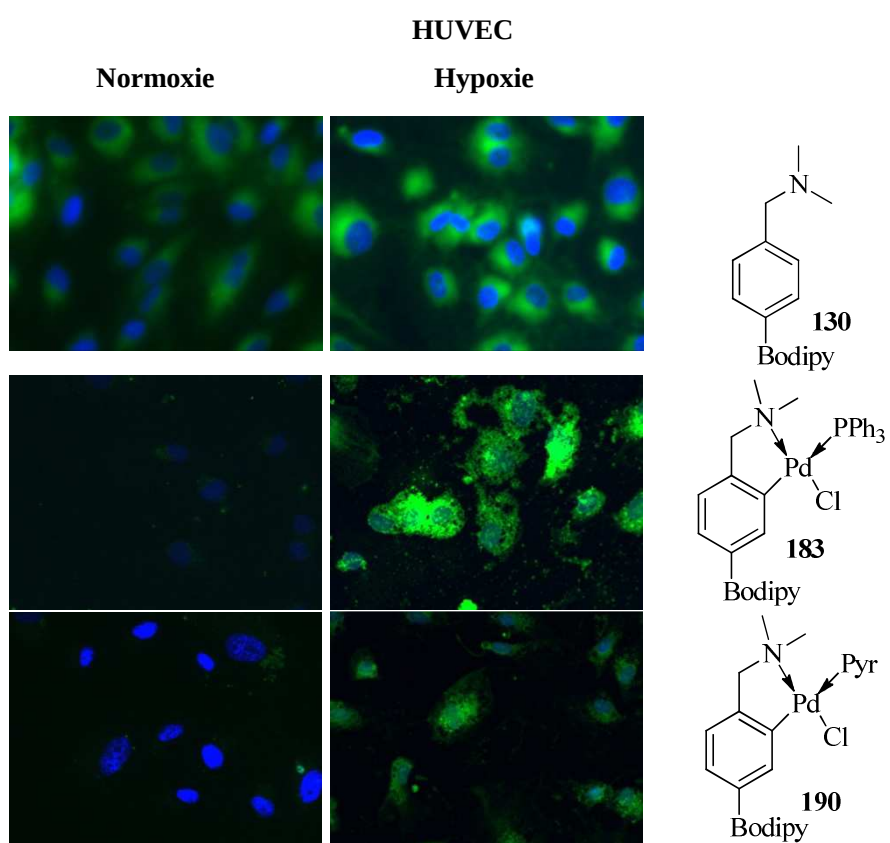
<sup>194</sup> Shamis, M.; Lode, H. N.; Shabat, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1726-1731.

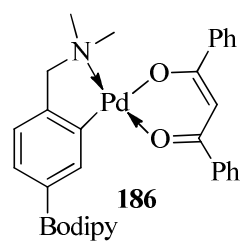
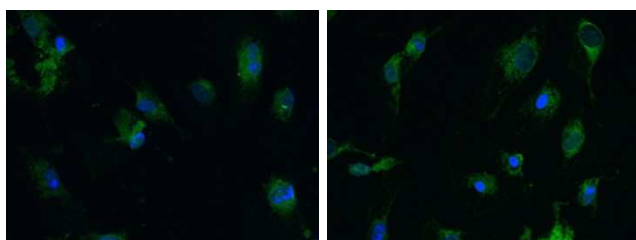
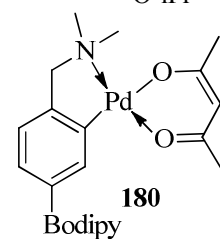
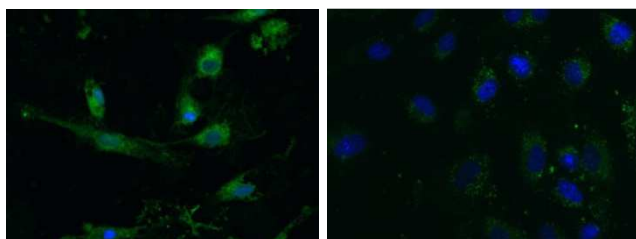
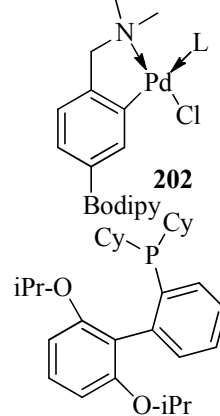
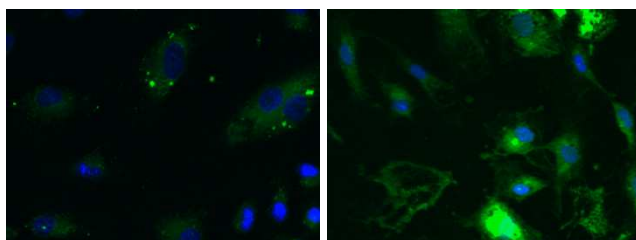
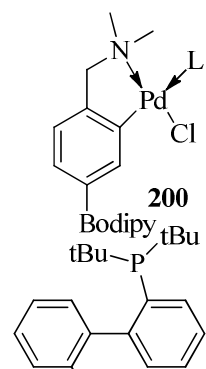
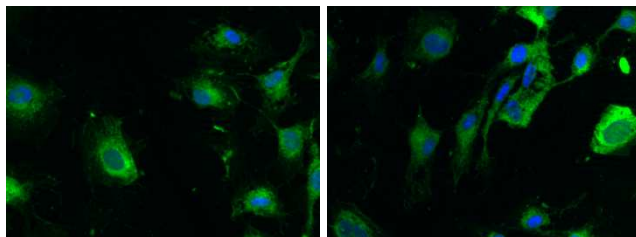
<sup>195</sup> Amir, R. J.; Pessah, N.; Shamis, M.; Shabat, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4494-4499.

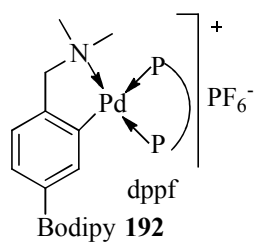
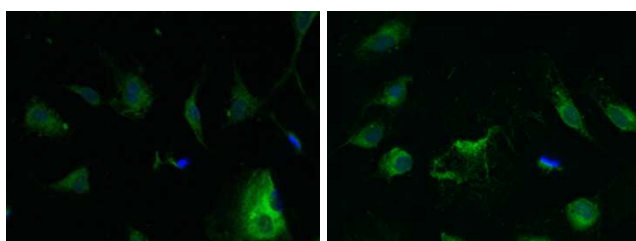
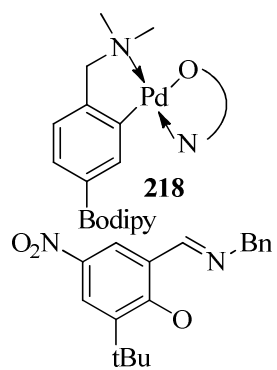
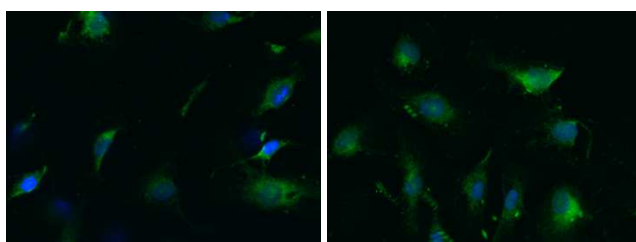
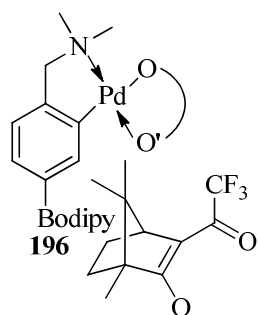
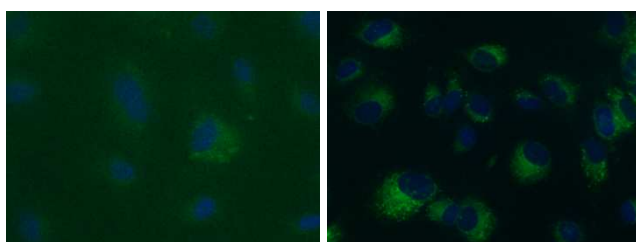
<sup>196</sup> Meyer, Y.; Richard, J.-A.; Delest, B.; Noack, P.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1777-1780.

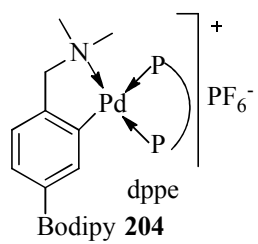
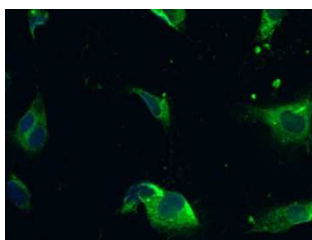
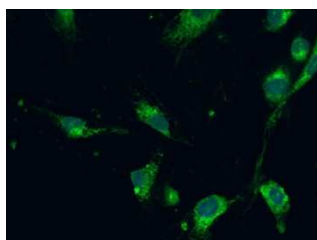
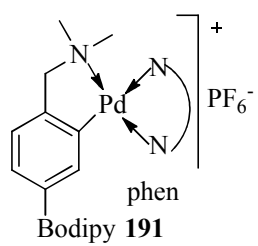
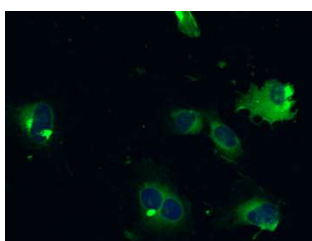
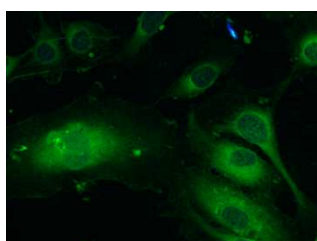
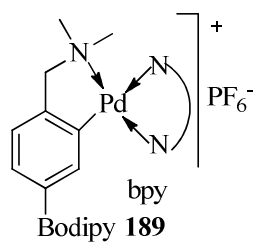
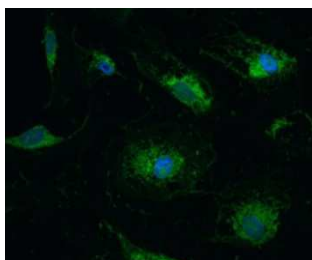
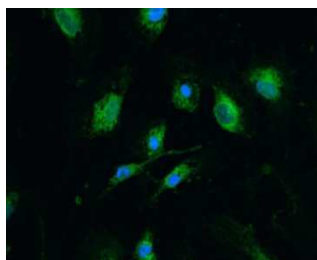
- <sup>197</sup> Shabat, D.; Rader, C.; List, B.; Lerner, R. A.; Barbas C. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6925-6930.
- <sup>198</sup> Gopin, A.; Pessah, N.; Shamis, M.; Rader, C.; Shabat, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 327-332.
- <sup>199</sup> Gurunathan, S.; Kim, E.; Han, J. W.; Park, J. H.; Kim, J. H. *Molecules* **2015**, *20*, 22476-22498.
- <sup>200</sup> Rosen, A. L.; Hieftje, G. M. *Spectrochim. Acta, Part B* **2004**, *59*, 135-146.
- <sup>201</sup> Gravel, E.; Ogier, J.; Arnauld, T.; Mackiewicz, N.; Ducongé, F.; Doris, E. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 400-408.
- <sup>202</sup> Perrault, S. D.; Chan, W. C. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11194-11199.
- <sup>203</sup> Alsarraf, J.; Péraudeau, E.; Poinot, P.; Tranoy-Opalinski, I.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Papot, S. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 15792-15795.
- <sup>204</sup> Draoui, N.; Schicke, O.; Fernandes, A.; Drozak, X.; Nahra, F.; Dumont, A.; Doux fils, J.; Hermans, E.; Dogné, J.-M.; Corbau, R.; Marchand, A.; Chaltin, P.; Sonveaux, P.; Feron, O.; Riant, O. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7107-7117.
- <sup>205</sup> Draoui, N.; Schicke, O.; Seront, E.; Bouzin, C.; Sonveaux, P.; Riant, O.; Feron, O. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 1410-1418.
- <sup>206</sup> Koch, S. S. C.; Chamberlin, A. R. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2725-2737.
- <sup>207</sup> Hunt, J. A.; Roush, W. R. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1112-1124.

# Annexes

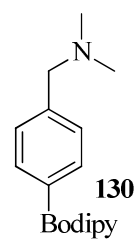
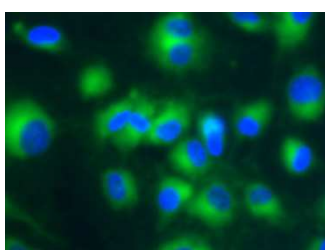
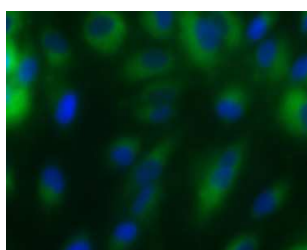


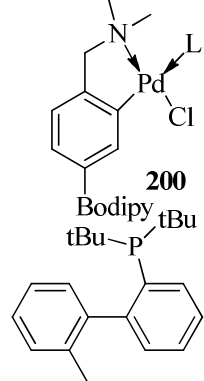
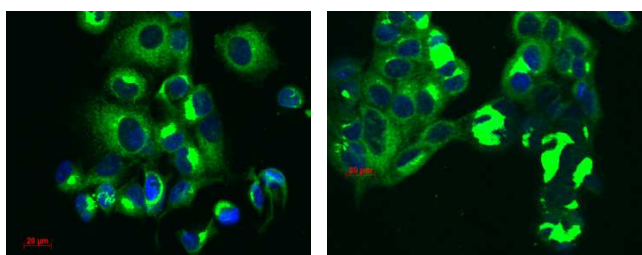
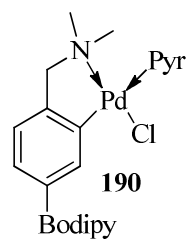
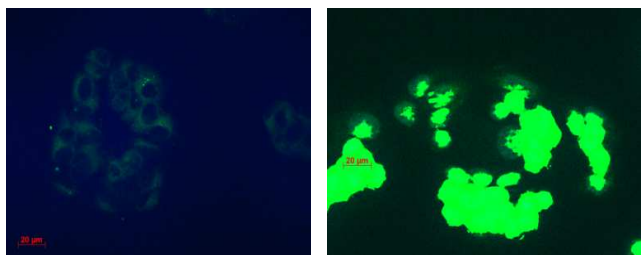
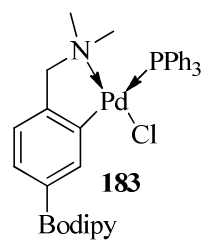
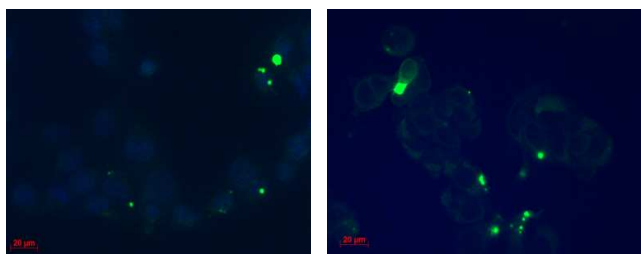
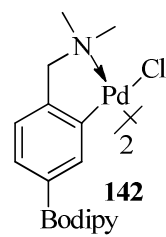
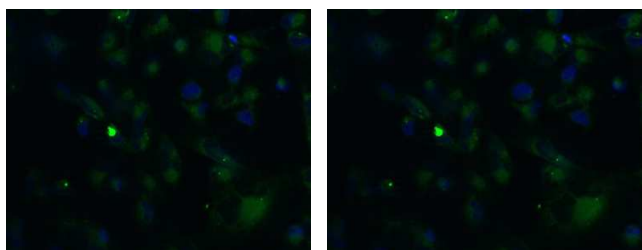


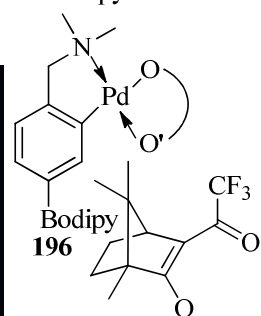
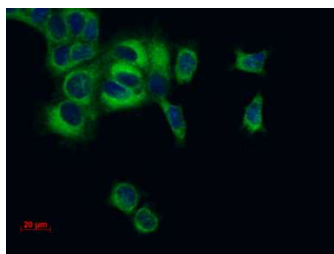
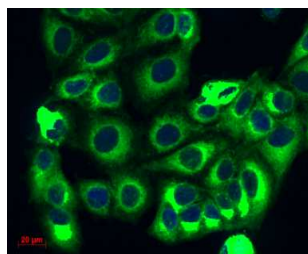
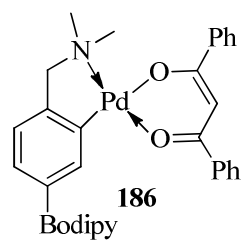
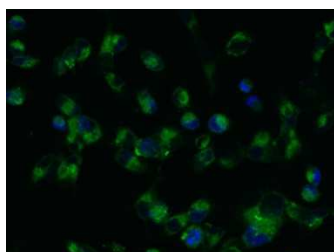
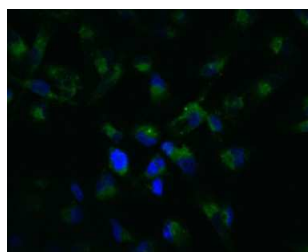
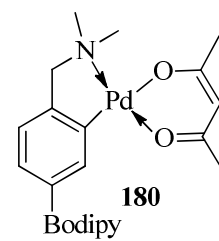
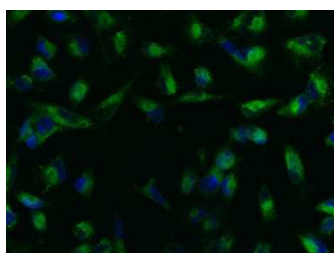
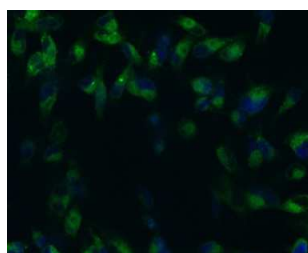
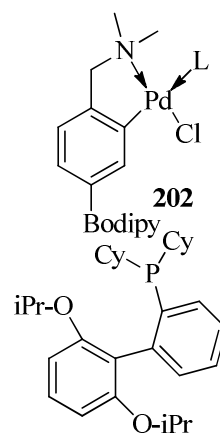
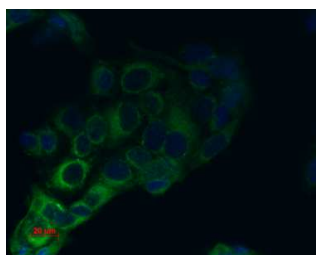
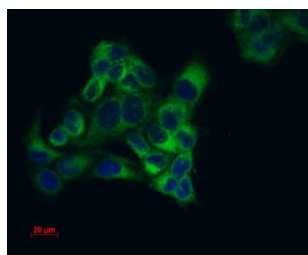


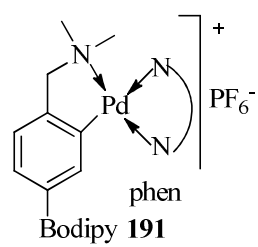
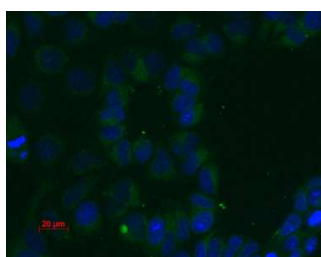
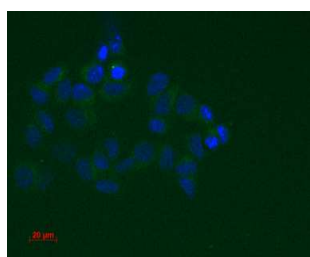
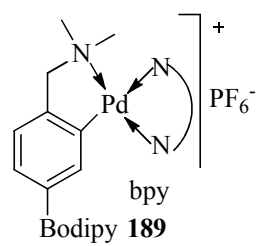
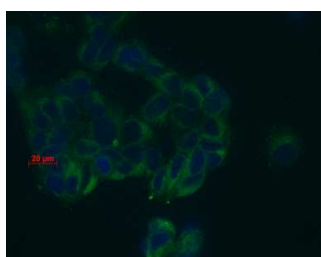
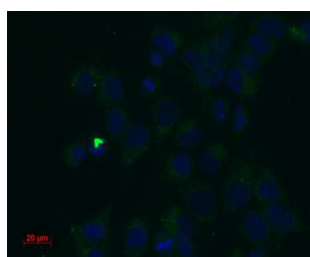
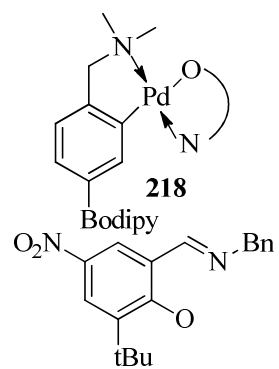
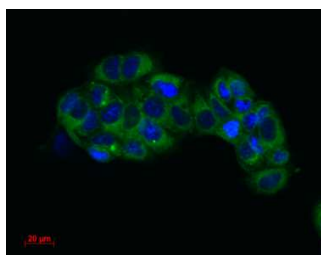
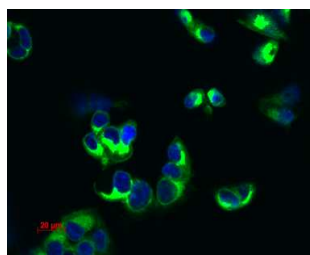


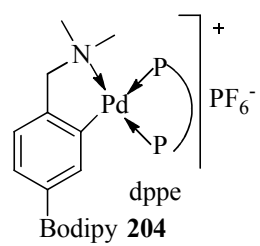
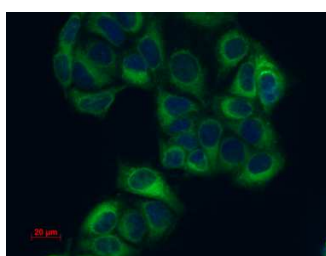
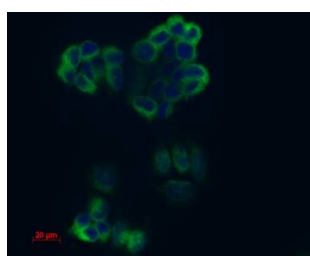
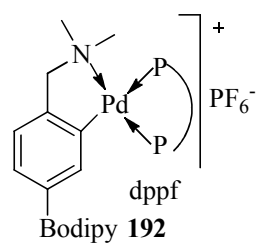
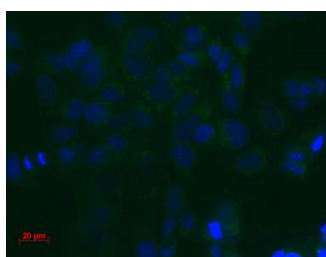
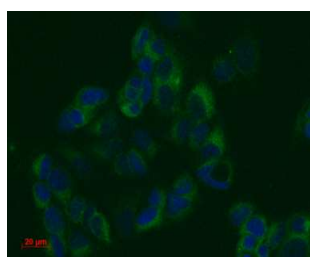
# MDA-MB231



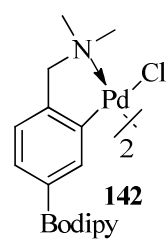
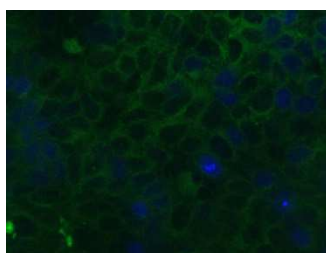
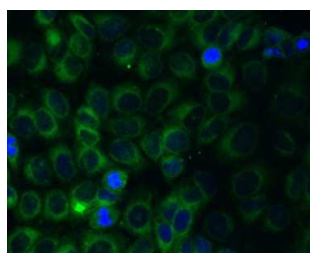
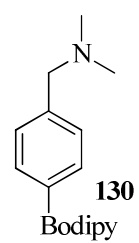
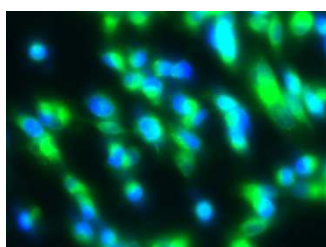
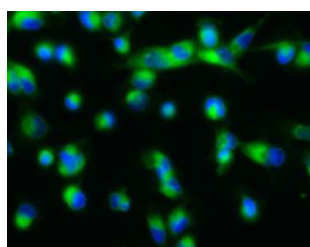


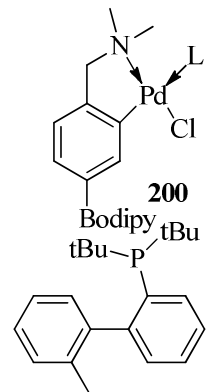
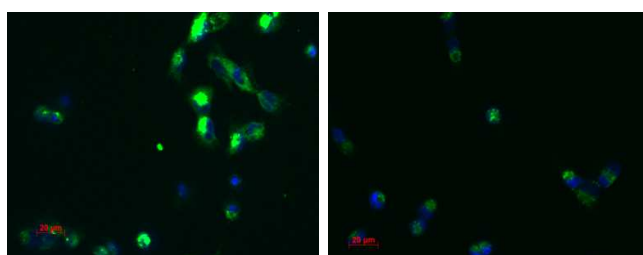
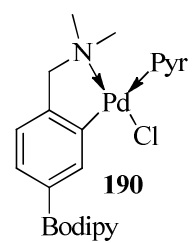
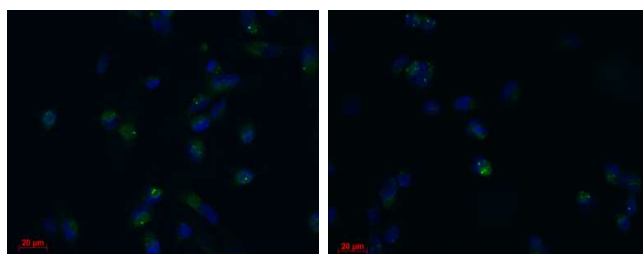
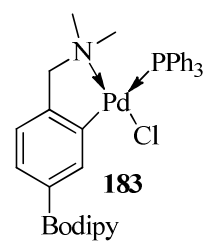
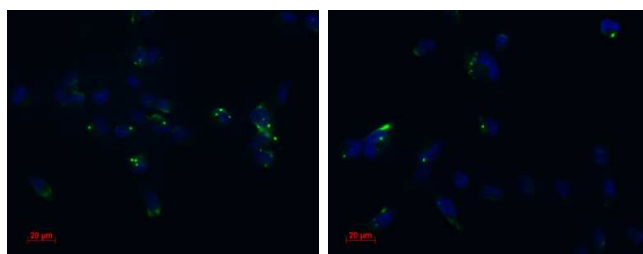


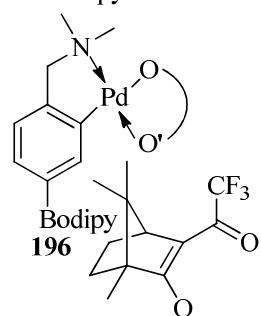
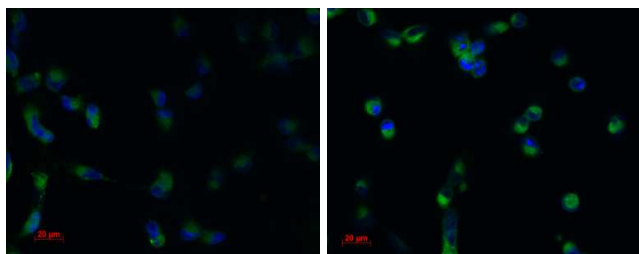
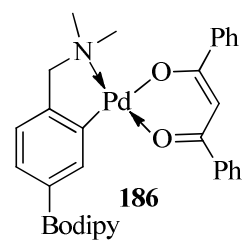
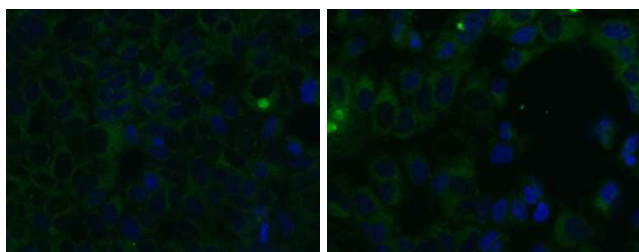
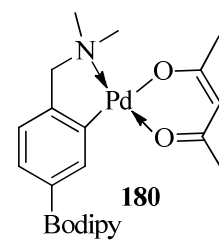
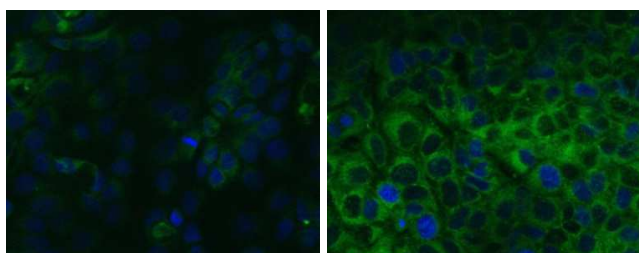
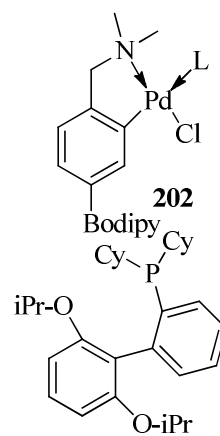
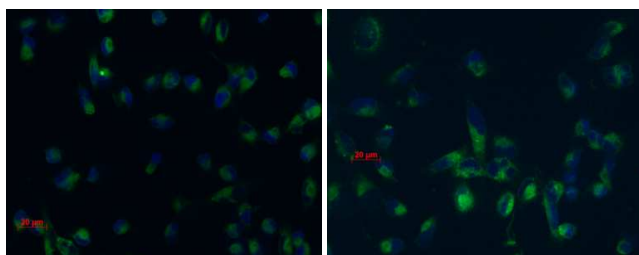


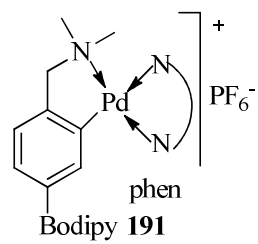
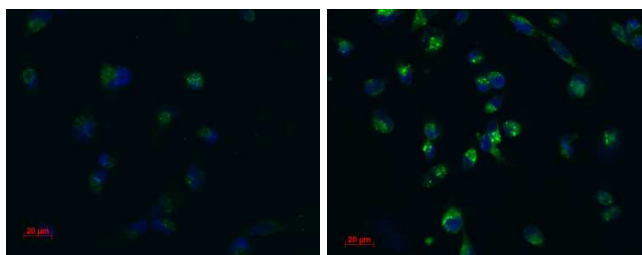
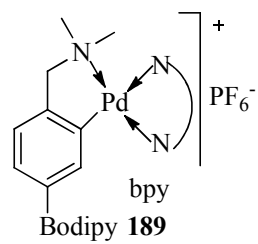
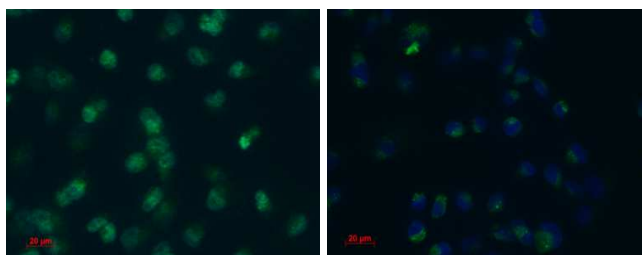
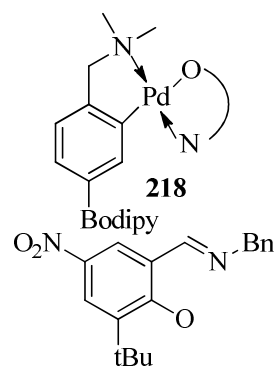
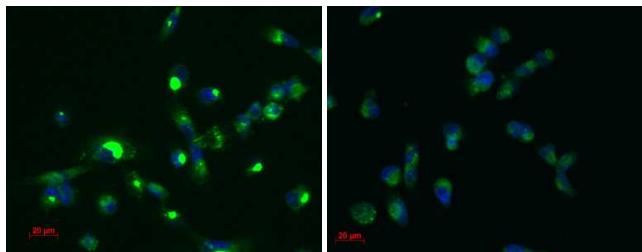


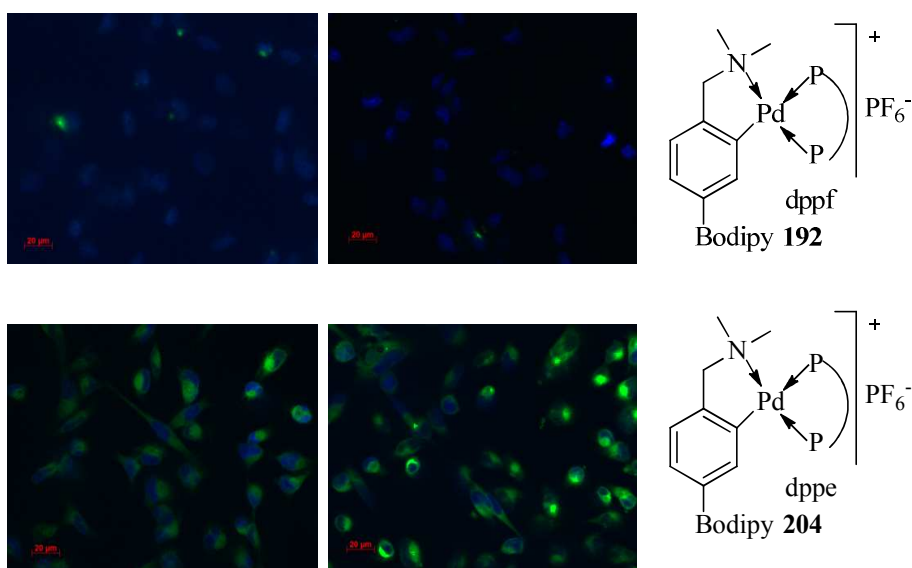
### MCF7



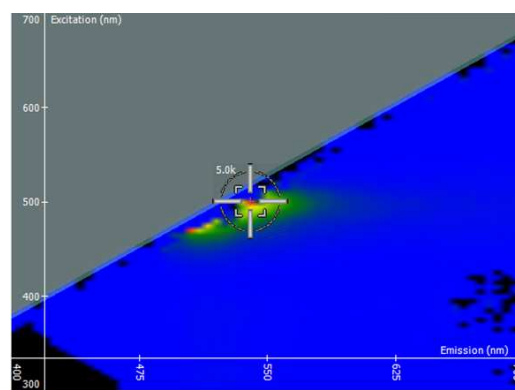




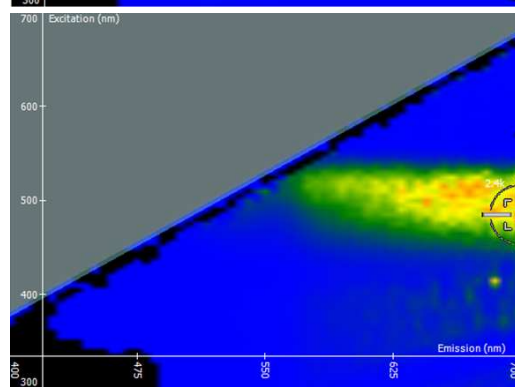




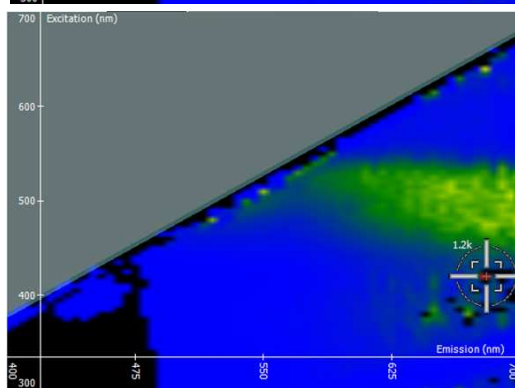
**Annexe 1:** Cellules HUVEC, MDA-MB231 et MCF7ensemencées avec le ligand BODIPY 130 et les palladacycles correspondants à 37°C pendant deux heures ; en normoxie (à gauche) et en hypoxie (à droite) ; concentration : 0.1 μM. Photos prises avec les filtres des bandes d'excitation de 470/20 nm et l'émission à 525/50 nm.



(130, Exc/Em: 500/540)



(183, Exc/Em: 485/700)



(190, Exc/Em: 420/680 )

**Annexe 2:** Détermination des longueurs d'onde d'excitation-émission maximale pour les produits **130**, **183** et **190**.

|                 |         | sans cellules |            |             |           |            |            |            |             |             |            |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
|-----------------|---------|---------------|------------|-------------|-----------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                 |         | UMC3          |            | CF190       |           | CF183      |            | CF190      |             | CF183       |            | CF190       |             | CF183       |             | CF190       |             | CF183       |             | CF190       |             |             |
|                 |         | 1             | 50         | 1           | 50        | 1          | 50         | 1          | 50          | 1           | 50         | 1           | 50          | 1           | 50          | 1           | 50          | 1           | 50          | 1           | 50          |             |
| normoxie 30 min | 112.858 | 3.866.273     | 1.765.771  | 22.349.404  | 342.253   | 4.764.450  | 41.601.672 | 70.110.976 | 2.161.316   | 14.858.680  | 37.111.130 | 67.656.680  | 196.081.536 | 480.688.672 | 83.136.792  | 232.996.624 | 498.362.560 | 63.432.772  | 148.028.832 | 321.562.400 | 63.432.772  | 148.028.832 |
| normoxie + 1h   | 69.820  | 3.226.618     | 1.641.850  | 20.642.878  | 17.719    | 4.073.160  | 36.993.148 | 53.193.808 | 2.226.220   | 16.297.461  | 39.844.124 | 83.136.792  | 232.996.624 | 498.362.560 | 63.432.772  | 148.028.832 | 321.562.400 | 63.432.772  | 148.028.832 | 321.562.400 | 63.432.772  | 148.028.832 |
| hypoxie 30 min  | 184.655 | 2.903.806     | 1.130.079  | 20.212.496  | 59.148    | 4.178.023  | 23.403.554 | 49.018.628 | 1.985.157   | 13.228.302  | 40.334.508 | 73.970.728  | 165.538.720 | 314.234.432 | 198.517     | 13.228.302  | 40.334.508  | 73.970.728  | 165.538.720 | 314.234.432 | 198.517     | 13.228.302  |
| hypoxie + 1h    | 292.224 | 2.983.067     | 1.678.423  | 19.410.300  | 259.120   | 3.945.362  | 26.357.546 | 95.800.472 | 1.925.806   | 12.196.323  | 44.251.048 | 121.038.000 | 244.546.096 | 664.520.832 | 1.925.806   | 12.196.323  | 44.251.048  | 121.038.000 | 244.546.096 | 664.520.832 | 1.925.806   | 12.196.323  |
| normoxie 30 min | 117.613 | 3.036.599     | 1.447.781  | 20.799.716  | 181.781   | 4.002.487  | 27.923.266 | 60.002.400 | 1.820.039   | 15.639.199  | 37.517.808 | 103.470.600 | 190.239.364 | 375.576.736 | 1.820.039   | 15.639.199  | 37.517.808  | 103.470.600 | 190.239.364 | 375.576.736 | 1.820.039   | 15.639.199  |
| normoxie + 1h   | 117.064 | 2.312.934     | 1.056.645  | 18.308.152  | 160.460   | 3.688.151  | 21.087.008 | 53.895.608 | 1.911.184   | 15.907.375  | 35.781.380 | 84.477.232  | 196.000.784 | 327.657.632 | 1.911.184   | 15.907.375  | 35.781.380  | 84.477.232  | 196.000.784 | 327.657.632 | 1.911.184   | 15.907.375  |
| normoxie 30 min | 347.971 | 4.498.155     | 22.245.662 | 58.968.924  | 1.792.294 | 21.729.452 | 40.034.348 | 72.032.640 | 245.511.664 | 572.269.888 | 66.111.232 | 338.581.504 | 579.829.632 | 66.111.232  | 338.581.504 | 579.829.632 | 66.111.232  | 338.581.504 | 579.829.632 | 66.111.232  | 338.581.504 |             |
| normoxie + 1h   | 221.880 | 3.569.455     | 24.509.466 | 59.294.436  | 2.920.365 | 16.731.635 | 35.678.376 | 66.111.232 | 338.581.504 | 579.829.632 | 66.111.232 | 338.581.504 | 579.829.632 | 66.111.232  | 338.581.504 | 579.829.632 | 66.111.232  | 338.581.504 | 579.829.632 | 66.111.232  | 338.581.504 |             |
| hypoxie 30 min  | 243.560 | 2.978.930     | 1.772.688  | 50.086.896  | 1.680.716 | 14.830.500 | 33.127.506 | 62.368.180 | 200.072.340 | 386.372.864 | 62.368.180 | 200.072.340 | 386.372.864 | 62.368.180  | 200.072.340 | 386.372.864 | 62.368.180  | 200.072.340 | 386.372.864 | 62.368.180  | 200.072.340 |             |
| hypoxie + 1h    | 124.177 | 3.105.118     | 21.369.864 | 61.524.434  | 1.675.548 | 20.693.700 | 40.597.252 | 79.767.868 | 260.833.648 | 581.967.296 | 79.767.868 | 260.833.648 | 581.967.296 | 79.767.868  | 260.833.648 | 581.967.296 | 79.767.868  | 260.833.648 | 581.967.296 | 79.767.868  | 260.833.648 |             |
| normoxie 30 min | 254.140 | 3.032.370     | 20.760.286 | 61.691.692  | 1.785.182 | 19.951.588 | 36.179.536 | 63.074.300 | 207.576.144 | 353.284.656 | 63.074.300 | 207.576.144 | 353.284.656 | 63.074.300  | 207.576.144 | 353.284.656 | 63.074.300  | 207.576.144 | 353.284.656 | 63.074.300  | 207.576.144 |             |
| normoxie + 1h   | 102.868 | 2.596.366     | 13.469.761 | 47.894.380  | 1.407.953 | 14.826.918 | 33.467.472 | 61.043.300 | 207.576.144 | 353.284.656 | 61.043.300 | 207.576.144 | 353.284.656 | 61.043.300  | 207.576.144 | 353.284.656 | 61.043.300  | 207.576.144 | 353.284.656 | 61.043.300  | 207.576.144 |             |
| hypoxie 30 min  | 149.038 | 2.560.136     | 13.783.752 | 43.891.464  | 1.886.530 | 14.338.036 | 29.000.836 | 67.465.752 | 195.496.344 | 337.666.048 | 67.465.752 | 195.496.344 | 337.666.048 | 67.465.752  | 195.496.344 | 337.666.048 | 67.465.752  | 195.496.344 | 337.666.048 | 67.465.752  | 195.496.344 |             |
| hypoxie + 1h    | 248.530 | 3.766.480     | 21.443.938 | 66.180.316  | 1.696.903 | 12.484.630 | 50.888.104 | 58.146.644 | 216.845.072 | 566.987.648 | 58.146.644 | 216.845.072 | 566.987.648 | 58.146.644  | 216.845.072 | 566.987.648 | 58.146.644  | 216.845.072 | 566.987.648 | 58.146.644  | 216.845.072 |             |
| normoxie 30 min | 456.759 | 4.687.371     | 23.121.386 | 79.598.152  | 2.361.542 | 13.267.234 | 27.570.214 | 79.595.328 | 251.985.648 | 617.587.584 | 79.595.328 | 251.985.648 | 617.587.584 | 79.595.328  | 251.985.648 | 617.587.584 | 79.595.328  | 251.985.648 | 617.587.584 | 79.595.328  | 251.985.648 |             |
| normoxie + 1h   | 119.908 | 3.469.558     | 14.546.580 | 47.335.008  | 1.395.456 | 12.485.025 | 27.454.042 | 55.925.288 | 186.432.966 | 374.026.688 | 55.925.288 | 186.432.966 | 374.026.688 | 55.925.288  | 186.432.966 | 374.026.688 | 55.925.288  | 186.432.966 | 374.026.688 | 55.925.288  | 186.432.966 |             |
| hypoxie 30 min  | 184.971 | 3.217.410     | 15.461.451 | 52.216.800  | 1.970.760 | 10.760.693 | 23.378.404 | 73.700.016 | 188.667.552 | 374.572.256 | 73.700.016 | 188.667.552 | 374.572.256 | 73.700.016  | 188.667.552 | 374.572.256 | 73.700.016  | 188.667.552 | 374.572.256 | 73.700.016  | 188.667.552 |             |
| hypoxie + 1h    | 141.928 | 3.399.094     | 18.944.416 | 102.010.240 | 1.704.099 | 17.864.494 | 48.082.912 | 27.596.582 | 100.476.192 | 378.868.768 | 27.596.582 | 100.476.192 | 378.868.768 | 27.596.582  | 100.476.192 | 378.868.768 | 27.596.582  | 100.476.192 | 378.868.768 | 27.596.582  | 100.476.192 |             |
| normoxie 30 min | 158.596 | 2.997.537     | 24.355.538 | 81.427.048  | 1.855.534 | 13.473.330 | 40.693.358 | 38.750.908 | 209.736.128 | 609.915.712 | 38.750.908 | 209.736.128 | 609.915.712 | 38.750.908  | 209.736.128 | 609.915.712 | 38.750.908  | 209.736.128 | 609.915.712 | 38.750.908  | 209.736.128 |             |
| normoxie + 1h   | 140.173 | 3.575.155     | 15.512.880 | 73.571.824  | 1.563.481 | 13.931.747 | 31.372.160 | 23.434.566 | 67.851.960  | 216.827.856 | 23.434.566 | 67.851.960  | 216.827.856 | 23.434.566  | 67.851.960  | 216.827.856 | 23.434.566  | 67.851.960  | 216.827.856 | 23.434.566  | 67.851.960  |             |
| hypoxie 30 min  | 133.169 | 3.542.808     | 17.348.862 | 60.809.968  | 1.703.801 | 11.821.846 | 29.614.628 | 33.748.172 | 153.023.760 | 356.150.816 | 33.748.172 | 153.023.760 | 356.150.816 | 33.748.172  | 153.023.760 | 356.150.816 | 33.748.172  | 153.023.760 | 356.150.816 | 33.748.172  | 153.023.760 |             |
| hypoxie + 1h    | 250.709 | 2.240.169     | 25.191.628 | 48.268.036  | 2.422.322 | 19.938.480 | 31.593.548 | 82.081.272 | 252.459.088 | 677.790.272 | 82.081.272 | 252.459.088 | 677.790.272 | 82.081.272  | 252.459.088 | 677.790.272 | 82.081.272  | 252.459.088 | 677.790.272 | 82.081.272  | 252.459.088 |             |
| normoxie 30 min | 184.696 | 3.108.192     | 20.051.220 | 38.002.788  | 2.481.992 | 15.880.703 | 38.674.396 | 75.715.600 | 260.709.712 | 630.099.648 | 75.715.600 | 260.709.712 | 630.099.648 | 75.715.600  | 260.709.712 | 630.099.648 | 75.715.600  | 260.709.712 | 630.099.648 | 75.715.600  | 260.709.712 |             |
| normoxie + 1h   | 159.368 | 2.212.363     | 18.002.146 | 39.071.136  | 1.688.734 | 16.178.684 | 25.518.684 | 83.718.688 | 244.420.576 | 438.776.352 | 83.718.688 | 244.420.576 | 438.776.352 | 83.718.688  | 244.420.576 | 438.776.352 | 83.718.688  | 244.420.576 | 438.776.352 | 83.718.688  | 244.420.576 |             |
| hypoxie 30 min  | 124.136 | 2.853.124     | 14.218.888 | 27.777.372  | 1.935.258 | 14.248.332 | 33.091.856 | 76.879.240 | 226.452.720 | 425.434.176 | 76.879.240 | 226.452.720 | 425.434.176 | 76.879.240  | 226.452.720 | 425.434.176 | 76.879.240  | 226.452.720 | 425.434.176 | 76.879.240  | 226.452.720 |             |
| hypoxie + 1h    | 204.145 | 2.855.138     | 19.066.990 | 234.634.544 | 2.181.158 | 20.322.684 | 39.436.280 | 79.914.608 | 302.462.144 | 805.493.632 | 79.914.608 | 302.462.144 | 805.493.632 | 79.914.608  | 302.462.144 | 805.493.632 | 79.914.608  | 302.462.144 | 805.493.632 | 79.914.608  | 302.462.144 |             |
| normoxie 30 min | 235.332 | 2.825.742     | 17.390.648 | 50.076.548  | 2.608.838 | 13.038.912 | 47.529.156 | 83.414.448 | 307.004.608 | 847.882.688 | 83.414.448 | 307.004.608 | 847.882.688 | 83.414.448  | 307.004.608 | 847.882.688 | 83.414.448  | 307.004.608 | 847.882.688 | 83.414.448  | 307.004.608 |             |
| normoxie + 1h   | 155.489 | 3.006.452     | 15.301.191 | 113.128.672 | 1.848.573 | 15.127.572 | 28.838.656 | 73.161.776 | 238.011.728 | 457.107.424 | 73.161.776 | 238.011.728 | 457.107.424 | 73.161.776  | 238.011.728 | 457.107.424 | 73.161.776  | 238.011.728 | 457.107.424 | 73.161.776  | 238.011.728 |             |
| hypoxie 30 min  | 159.115 | 2.322.716     | 12.325.019 | 33.597.492  | 1.669.174 | 17.462.094 | 37.478.394 | 69.410.824 | 235.167.680 | 422.439.680 | 69.410.824 | 235.167.680 | 422.439.680 | 69.410.824  | 235.167.680 | 422.439.680 | 69.410.824  | 235.167.680 | 422.439.680 | 69.410.824  | 235.167.680 |             |
| hypoxie + 1h    | 159.115 | 2.322.716     | 12.325.019 | 33.597.492  | 1.669.174 | 17.462.094 | 37.478.394 | 69.410.824 | 235.167.680 | 422.439.680 | 69.410.824 | 235.167.680 | 422.439.680 | 69.410.824  | 235.167.680 | 422.439.680 | 69.410.824  | 235.167.680 | 422.439.680 | 69.410.824  | 235.167.680 |             |

**Annexe 3: Intensités en fluorescence des produits 130, 183 et 190 incubés avec ou sans cellules, en normoxie et en hypoxie, pendant 30 minutes et 1 heure.**