Recherche de nouvelles molécules trypanocides

Clotilde Boudot

▶ **To cite this version:**

Clotilde Boudot. Recherche de nouvelles molécules trypanocides. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2019. Français. NNT : 2019LIMO0078 . tel-02885898v2

HAL Id: tel-02885898

https://theses.hal.science/tel-02885898v2

Submitted on 3 Jul 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat

Université de Limoges

Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

UMR INSERM 1094 Neuro-Epidémiologie Tropicale

Institut d'Epidémiologie neurologique et de Neurologie Tropicale

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Pharmacologie, infectiologie et sciences du médicament

Présentée et soutenue par

Clotilde BOUDOT

Le 19 décembre 2019

Recherche de nouvelles molécules trypanocides

Thèse dirigée par le Dr Bertrand COURTIOUX

Rapporteurs

M. Philippe LOISEAU, Professeur (PhD, HDR), UMR 8076 CNRS Antiparasitic Chemotherapy PARACHEM, BioCIS, LabEx LERMIT, Chatenay-Malabry, France

M. Renaud PIARROUX, Professeur (PhD, HDR), IPLESP INSERM U1136 Sorbonne Université, Campus Saint-Antoine, Paris, France

Examinateurs

M. Bertrand COURTIOUX, Maître de Conférences (PhD, HDR), UMR INSERM 1094 NET Institut d'Epidémiologie neurologique et de Neurologie Tropicale, Limoges, France

M. Jean-Robert IOSET, Docteur (PharmD), DND*i*, Genève, Suisse

M. Pierre-Marie PREUX, Professeur (PhD, HDR), UMR INSERM 1094 NET Institut d'Epidémiologie neurologique et de Neurologie Tropicale, Limoges, France

M. Alexis VALENTIN, Professeur (PhD, HDR), UMR 152 IRD-UPS Pharma-DEV, Toulouse, France

M. Pierre VERHAEGHE, Professeur (PhD, HDR), CNRS Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) - UPR 8241, Toulouse, France

Thèse de doctorat

Université de Limoges

Université de Limoges
ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)
UMR INSERM 1094 Neuro-Epidémiologie Tropicale
Institut d'Epidémiologie neurologique et de Neurologie Tropicale

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Pharmacologie, infectiologie et sciences du médicament

Présentée et soutenue par
Clotilde BOUDOT

Le 19 décembre 2019

Recherche de nouvelles molécules trypanocides

Thèse dirigée par le Dr Bertrand COURTIOUX

Rapporteurs
M. Philippe LOISEAU, Professeur (PhD, HDR), UMR 8076 CNRS Antiparasitic Chemotherapy PARACHEM, BioCIS, LabEx LERMIT, Chatenay-Malabry, France

M. Renaud PIARROUX, Professeur (PhD, HDR), IPLESP INSERM U1136 Sorbonne Université, Campus Saint-Antoine, Paris, France

Examinateurs
M. Bertrand COURTIOUX, Maître de Conférences (PhD, HDR), UMR INSERM 1094 NET Institut d'Epidémiologie neurologique et de Neurologie Tropicale, Limoges, France

M. Jean-Robert IOSET, Docteur (PharmD), DND*i*, Genève, Suisse

M. Pierre-Marie PREUX, Professeur (PhD, HDR), UMR INSERM 1094 NET Institut d'Epidémiologie neurologique et de Neurologie Tropicale, Limoges, France

M. Alexis VALENTIN, Professeur (PhD, HDR), UMR 152 IRD-UPS Pharma-DEV, Toulouse, France

M. Pierre VERHAEGHE, Professeur (PhD, HDR), CNRS Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) - UPR 8241, Toulouse, France

BY-NC-ND

Le hasard ne favorise que les esprits préparés.

Louis Pasteur

BY-NC-ND

Remerciements

Mes premiers remerciements vont naturellement à mon directeur de thèse, le docteur Bertrand COURTIOUX. Les mots me manquent pour vous témoigner toute ma gratitude. Vous avez toujours su trouver les mots juste pour me motiver, me pousser au-delà de mes retranchements avec une gentillesse et une écoute indéfectibles. La relation que nous avons établie a été d'une grande importance pour moi et j'espère qu'elle perdurera au-delà de ce travail qui est certes le mien (comme vous me le faites souvent remarquer) mais aussi le vôtre (on ne compte plus les relectures, et les conseils fournis avec bienveillance et taquinerie ☺). Et je réitère ce que j'ai dit : je ne peux rien souhaiter de mieux à tout nouveau thésard que de vous avoir en tant que directeur de thèse. Nombreuses sont les personnes se disant disponibles et à l'écoute, rares sont celles qui le sont vraiment.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Philippe LOISEAU, pour l'honneur que vous me faites de juger mon travail en tant que rapporteur. Et merci pour nos échanges toujours très enrichissants.

Je remercie également Monsieur le Professeur Renaud PIARROUX, pour avoir accepté de juger mon travail et de siéger comme rapporteur. Je vous suis reconnaissante et très honorée.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Docteur Jean-Robert IOSET, pour avoir accepté mon invitation à ce jury de thèse et, de faire le déplacement jusqu'à Limoges. Notre rencontre au congrès de Daegu a été un honneur. Merci.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN pour l'honneur que vous me faites de participer (encore ☺) à mon jury de thèse. Après la thèse de Pharmacie, il était évident que vous deviez assister à la thèse d'Université. Si on m'avait dit que moi, étudiante assise en haut des amphis en P1 en arriverai là…. Merci de m'avoir donné le goût de la parasitologie.

J'ai l'immense plaisir d'adresser ma profonde reconnaissance et mes plus sincères remerciements à Monsieur le Professeur Pierre VERHAEGHE, qui a accepté de participer à mon jury de thèse, et qui a toujours su être présent pour répondre à mes questions, mes doutes, et cela avec une gentillesse et une disponibilité sans faille. Avoir eu le plaisir de collaborer avec vous fut un immense honneur. Merci mille fois.

J'adresse ma gratitude et mon plus profond respect à Monsieur le Professeur Pierre-Marie PREUX, directeur de l'UMR INSERM 1094 NET, pour avoir accepté de siéger dans mon jury, mais surtout pour votre soutien ô combien précieux durant ces années de thèse.

Je remercie chaleureusement chaque membre de l'équipe UMR INSERM 1094 NET et plus particulièrement Elisabeth et Pascale pour leur bonne humeur et leur disponibilité, mais aussi tous les thésards que j'ai eu la chance de côtoyer et qui apportent avec eux la sympathie et le soleil de leur pays.

Gracias, Schokran, Hvala, Khob chai, A wà nǔ, Merci ☺

BY-NC-ND

Je remercie bien évidemment avec la plus grande affection Roselyne MOUZET et Martine GATET, nos mamans du labo qui ont toujours su être présentes et apporter tendresse et gentillesse durant ces années de thèse. Vous allez me manquer !

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur Alain CELERIER, Président de l'Université de Limoges, pour avoir su répondre présent au moment où j'en avais besoin.

Je témoigne ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean-Luc DUROUX pour avoir accepté (2 fois !!) de me confier un poste d'ATER au sein de la Faculté de Pharmacie de Limoges. Et j'adresse naturellement mes sincères remerciements au Professeur Bertrand LIAGRE pour m'avoir fait confiance comme ATER, au Docteur Dominique CLEDAT, au Professeur Sylvie ROGEZ, au Docteur Jeanne COOK-MOREAU, au Docteur Sylvie DELEBASSEE pour m'avoir acceptée au sein de la Faculté et d'avoir cru en moi en me permettant d'assurer vos enseignements. J'ai beaucoup appris et je me suis épanouie durant ces heures. Merci

J'adresse donc un clin d'œil à tous les étudiants que j'ai eu la chance de côtoyer. J'espère avoir su vous transmettre un semblant d'intérêt pour la parasitologie ☺.

Je remercie bien évidemment tout le personnel de l'animalerie, et notamment Sylvie DESFORGES qui a su être à l'écoute dans les moments de doute comme dans les bons moments, qui a toujours répondu présente pour me montrer des techniques et m'aider avec mes souris. Te les confier se fait sans crainte car tu es avant tout, attentive à leur bien-être. Merci mille fois.

Je remercie Anne DRUILHE et Magali SAGE pour leur conseil et le temps qu'elles ont su m'accorder durant ma thèse. Merci

Les remerciements ne seront pas suffisants pour dire tout ce que je ressens, car cette thèse n'aurait pas été la même sans toi, madame Emilie PINAULT. Le temps, l'énergie que tu as consacré à l'ensemble de nos travaux, et cela avec une disponibilité et une gentillesse constante vont me faire te regretter ! Merci merci merci !

Je remercie bien évidemment, l'équipe UMR 1092 pour leur bonne humeur. Nos discussions étaient toujours un plaisir. Et merci Lucie, Linda, Yohann, et Cécile d'avoir pris le temps de montrer votre travail à tous les stagiaires que j'ai pu vous envoyer ☺.

Un grand merci à l'équipe UMR 1248 et plus particulièrement au Professeur Nicolas PICARD pour avoir su répondre à mes questions avec beaucoup de gentillesse. Un merci particulier à James JAVELLAUD pour son temps, Ferdinand, Sherlock et Eustache te saluent ☺.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Jean-Baptiste WOILLARD et le futur docteur Alexandre DESTERE pour le temps que vous m'avez consacré. Alexandre, en gérant mon stress de dernière minute tu as montré que tu étais fin prêt pour la thèse, BRAVO, maintenant à toi de jouer ☺.

BY-NC-ND

Je ne peux écrire des remerciements sans parler des équipes qui ont permis que ce travail se concrétise.

A Monsieur le Professeur Jean GUILLON, de l'équipe UMR INSERM U1212 / CNRS 5320 - Laboratoire ARNA de Bordeaux, je vous remercie pour votre bienveillance et pour m'avoir fait confiance pour tester vos molécules. Je souhaite que cette collaboration continue.

A Monsieur le Docteur Didier BUISSON, de l'équipe « Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes UMR 7245 CNRS/MNHN » à Paris, je vous remercie d'avoir accepté ma venue et cela plusieurs fois dans votre équipe, pour me montrer votre travail et démarrer un beau projet qui j'espère aboutira ☺. Votre gentillesse est sans égal et a permis de rendre chacun de mes séjours parisiens des plus agréables. Je tiens également à remercier Cécile et Stéphane pour leur conseil et leur disponibilité dans une bonne humeur constante.

Aux jeunes docteurs Julien PEDRON et Cyril FERSING des équipes LCC, UPR CNRS 8241 de Toulouse, et LPCR - UMR 7273 de Marseille respectivement, je vous remercie pour votre dynamisme et votre réactivité dans la synthèse de vos molécules qui nous ont permis de belles collaborations. Malgré votre acharnement à vouloir me rendre la tâche difficile avec des molécules si peu coopératives dans l'eau ah ah ah. Je me vengerai ☺ !

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé à ces collaborations et notamment le Professeur Elisa BOUTET-ROBINET, le Docteur Caroline CASTERA-DUCROS et le Docteur Nicolas PRIMAS pour votre implication et vos réponses toujours précises et bienveillantes à mon égard que ça soit pour la thèse, les congrès ou les manips.

J'adresse également mes remerciements à l'équipe EA 7500, laboratoire PEREINE et notamment le Professeur Vincent SOL, le Docteur Gautier Mark Arthur NDONG NTOUTOUME et Monsieur Robert GRANET, pour le temps que vous avez consacré à un projet qui j'espère verra le jour prochainement.

Un grand merci à tous les stagiaires Marianne, Valentin, Cédric, Eden, Valère, Charline, Amélia et Anne que j'ai eu la chance d'encadrer et qui ont participé et contribué à l'ensemble de ce travail de thèse.

Je remercie toutes les personnes que j'ai eu l'occasion de côtoyer durant ma thèse et qui ont eu des mots gentils et des attentions à mon égard. Merci Madame le Professeur Rachida ZERROUKI, Laetitia GAILLARD, Emmanuelle IZORCHE, Véronique BOULESTEX, Philippe VIGNOLE, Jean-François SAUVAGE, Yves CHAMPAVIER… (et pardon à ceux que j'oublie).

Pour finir, cette thèse n'aurait jamais été la même sans les personnes exceptionnelles qui ont composé le bureau 340. Azra mon baby kitten, Lokman, le docteur au carré et Julien le grand docteur, ces 4 ans sont passés si vite grâce à vous. Nos discussions toujours très riches, nos fous rires, nos battles de baskets, nos coloriages, nos gouters, les ateliers power point (d'ailleurs Azra à jamais placée sur un piédestal), RuPaul !!!!! et la garde de Tryxo vont me manquer. Mais je sais que nous continuerons à nous voir. Je vous souhaite plein de bonheur et de toujours croire en vos rêves (HAHAHA j'ai osé ☺).

Je ne peux pas non plus oublier Noudy (notre nouvelle colocataire ☺), Jaime et Inès, nos voisins de bureau. Merci à vous pour vos sourires et les bons repas préparés ☺. La soupe Pho n'a plus aucun secret pour moi !

BY-NC-ND

Enfin je terminerai mes remerciements, par les personnes qui m'ont vu évoluer depuis XXX années (on ne les compte plus) et qui répondent toujours présentes.

Mes AMIS d'ici et d'ailleurs, Claire, Sophie T, Caroline, Alexandra, Sophie B, Pierre-Jean, Panos, Benjamin, Anaé, Sabine, Clément, Nadège, Nina, toute ma bande Ganache : Alice, Manon, Eugénie, Julien, Arthur, Alex, Poups, Benoit, Rémi, et tous les autres. Merci d'être toujours là et bien plus encore.

Ma FAMILLE, sans qui je ne serais rien. Chacun d'entre vous a fait de moi ce que je suis et je vous en remercie infiniment. Vos conseils, votre écoute et votre amour sont ce que j'ai de plus chers. Et merci à ma mère qui n'a jamais arrêté de croire en moi malgré mon caractère… affirmé dirons-nous ☺.

BY-NC-ND

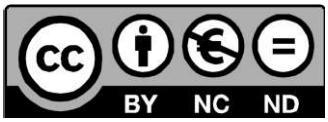
A Alexandre,

Parce que sans toi rien ne serait possible…

BY-NC-ND

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : *http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/*



BY-NC-ND

Table des matières

Introduction 22
Chapitre I. Contexte bibliographique....23
I.1. Les maladies tropicales négligées 23
I.2. La Trypanosomose Africaine 27
I.2.1. Epidémiologie de la Trypanosomose Africaine....27
I.2.2. Le vecteur de la maladie 31
I.2.2.1. Classification 31
I.2.2.2. Morphologie....33
I.2.3. Le parasite 35
I.2.3.1. Classification 35
I.2.3.2. Morphologie....37
I.2.4. Clinique, diagnostic et traitements de la Trypanosomose Humaine Africaine 39
I.2.4.1. Cycle parasitaire....39
I.2.4.2. Evolution de la maladie....40
I.2.4.2.1. Stade hémolymphatique ou stade 1 41
I.2.4.2.1.1. La clinique de la THA en stade 1 41
I.2.4.2.1.2. L'immuno-physiopathologie de la THA au stade 1 42
I.2.4.2.2. Stade nerveux ou stade 2 44
I.2.4.2.2.1. La clinique de la THA au stade 2 44
I.2.4.2.2.2. L'immuno-physiopathologie de la THA au stade 2 45
I.2.4.3. Diagnostic de la THA....47
I.2.4.3.1. Diagnostic de la maladie 48
I.2.4.3.2. Diagnostic de stade....49
I.2.4.4. Thérapeutique humaine....50
I.2.4.4.1. Les médicaments actuels....50
I.2.4.4.1.1. Traitement stade hémolymphatique....53
I.2.4.4.1.2. Traitement stade nerveux 57
I.2.4.4.2. Dernières molécules testées et proposées....61
I.2.4.4.3. Vaccination 65
I.2.5. Clinique, diagnostic et traitements de la Trypanosomose Animale Africaine 66
I.2.5.1. Evolution de la maladie....66
I.2.5.2. Diagnostic de la TAA 69
I.2.5.3. Thérapeutique vétérinaire....71
I.2.5.3.1. Les médicaments actuels....71
I.2.5.3.2. Médicament à l'étude 79

BY-NC-ND

I.2.6. La lutte anti-vectorielle 79
Objectifs 82
Chapitre II. Les nitroaromatiques 83
II.1. Nitroquinoléinones 84
II.1.1. Etude des 35 molécules dérivant de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one (partie 1) 85
II.1.1.1. Tests *in vitro* 85
II.1.2. Etude des 26 molécules issues de la pharmacomodulation en position 3 de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one (partie 2) 111
II.1.2.1. Tests *in vitro* 111
II.1.3. Etude des 19 molécules issues de la pharmacomodulation en position 6 de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one (partie 3) 131
II.1.3.1. Tests *in vitro* 131
II.1.3.2. Tests *in vivo* 140
II.2. Nitroimidazopyridines 160
II.2.1. Etude des 42 molécules dérivées de la 8-bromo-6-chloro-3-nitro-2-(phénylsulfonylméthyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (partie 1) 161
II.2.1.1. Tests *in vitro* (réaction de Suzuki-Miyaura) 161
II.2.1.2. Tests *in vitro* (réaction de Sonogashira) 179
II.2.1.3. Tests *in vivo* (réaction de Sonogashira) 185
II.2.2. Etude des 28 molécules dérivées de la 8-(phénylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridines (partie 2) 192
II.2.2.1. Tests *in vitro* 192
II.2.2.2. Tests *in vivo* 208
II.2.3. Etude des 25 molécules issues de la rétro-analyse du pharmacophore anti-kinétoplastidés (partie 3) 213
II.2.3.1. Tests *in vitro* 213
II.2.3.2. Tests *in vivo* 217
II.3. Le mégazol 227
Chapitre III. Les hétérocycles azotés de type phénanthrolinique 242
III.1. Série A : Dérivés phénanthrolines 245
III.2. Série B : Dérivés Quinoléines, Isoquinoléines et Quinazolines 269
III.3. Autres séries 300
Discussion 301
Conclusion générale 313
Références bibliographiques 315
Annexes 341

BY-NC-ND

Liste des abréviations

µM	Micromolaire
ABT	Aminobenzotriazole
Ac	Anticorps
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADME	Administration, Distribution, Métabolisation, Excrétion
ADN	Acide Désoxyribonucléique
APOL1	Apolipoprotéine 1
AQP	Aquaglycéroporine
ARN	Acide Ribonucléique
ASPT1	Adenosine Sentive Pentamidine transporter 1
ATP	Adenosine triphosphate
AUC	Aire sous la courbe
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BISCEm	Biologie Intégrative Santé Chimie Environnement
CATT	Card Agglutination Test for Trypanosomiasis
CC_{50}	Concentration cytotoxique 50
CCM	Chromatographie sur couche mince
CERMN	Centre d'Etudes et de Recherche sur le médicament de Normandie
CH_2Cl_2	Dichlorométhane
CI_{50}	Concentration inhibitrice 50
Cl	Clairance
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
Cmax	Concentration maximale
CMC	Carboxyméthylcellulose
CNRS	Centre Nationale de la Recherche Scientifique
CPSF3	Cleavage and polyadenylation specificity factor 3
CXCL	Chemokine ligand (C-X-C motif)
CYP450	Cytochrome P450
DFMO	Difluoromethylornithine
DMSET	Dose maximale sans effet toxique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMT	Dose maximale tolérée
DND*i*	Drugs for Neglected Diseases *initiative*

BY-NC-ND

ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GUS	General Unknown screening
H_2N+	Ion nitrénium (formule brute)
H_2O	Eau (formule brute)
HAPT1	High affinity pentamidine transporter 1
HCT	Technique de centrifugation de l'hématocrite
Hpr	Haptoglobuline
IC	Intervalle de confiance
ICH	International conference of harmonization
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IM	Intramusculaire
INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale
IP	Intrapéritonéale
IRD	Institut de recherche pour le développement
IS	Indice de sélectivité
IV	Intraveineuse
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LAPT1	Low affinity pentamidine transporter 1
LCC	Laboratoire de chimie de coordination
LC-MS	Chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse
LCQ	Loci de caractères quantitatifs
LCR	Liquide céphalorachidien
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LPCR	Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire
mAECT	mini Anion Exchange Centrifugation Technique
MeOH	Méthanol
MMP	Matrix Metalloprotease
MMS	Méthaneméthylsulfonate
MNHN	Museum National d'Histoire Naturelle
MPXP	Melarsoprol/pentamidine cross-resistance
MRM	Multiple Reaction Monitoring

BY-NC-ND

MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
MTNs	Maladies tropicales négligées
NaCl	Chlorure de sodium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NECT	Nifurtimox-eflornithine combination therapy
NET	Neuroépidémiologie Tropicale
NH_2-	Amine- (groupement)
NHOH-	Hydroxylamine- (groupement)
nM	nanoMolaire
NO	Oxyde nitrique
NO-	Nitroso- (groupement)
NO_2-	Nitro- (groupement)
NTD	Neglected tropical diseases
NTR	Nitroréductases
OCV	Organes circumventriculaires
ODC	Ornithine décarboxylase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAMPA	Parallel artificial membrane permeability assay
PAMPA-GIT	Parallel artificial membrane permeability assay gastrointestinal tract
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PGD2	Prostaglandine 2
PO	*Per Os*
PRR	Pattern recognition receptor
QBC	Quantitative Buffy Coat
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RDC	République Démocratique du Congo
RFU	Unité relative de fluorescence
SC	Sous cutanée
SNC	Système nerveux central
SRA	Serum Resistance Associated protein
T.b.	*Trypanosoma brucei*
$T_{1/2}$	Temps de demi-vie
TAA	Trypanosomose Animale Africaine
TgsGP	Tbg-specific glycoprotein
THA	Trypanosomose Humaine Africaine

BY-NC-ND

TLF	Trypanolytic factor
TLR	Toll Like Receptor
TLTF	Trypanosome lymphocyte triggering factor
Tmax	Temps maximal
TNF	Tumor Necrosis Factor
UMR	Unité mixte de recherche
VAT	Type variant antigénique
VIH	Virus de l'Immunodéficience humaine
VSG	Glycoprotéine de surface variable

BY-NC-ND

Table des illustrations

Figure 1. Exemples de Maladies Tropicales Négligées 24
Figure 2. Leishmaniose cutanée 25
Figure 3. Leishmaniose viscérale avec importante hépatosplénomégalie 25
Figure 4. Signe de Romaña 27
Figure 5. Nombre de nouveaux de cas de THA en 2018 28
Figure 6. Nombre total de cas de THA à *T.b.g.* et *T.b.r.* par an depuis 2000, avec l'estimation de l'élimination de la THA fixée par l'OMS pour 2020 30
Figure 7. Distribution de la TAA dans le monde 31
Figure 8. Liste des 33 espèces de glossine 33
Figure 9. *Glossina morsitans morsitans* 35
Figure 10. Classification des trypanosomes 35
Figure 11. Schéma d'un trypanosome (forme trypomastigote) 37
Figure 12. Hypothèse du mécanisme d'action de la NTR de type 1 chez les trypanosomes africains 39
Figure 13. Cycle parasitaire de la Trypanosomose Humaine Africaine. 39
Figure 14. Observation d'un trypanome 41
Figure 15. Œdème de la face chez un enfant 42
Figure 16. Adénopathie palpable caractéristique de la THA 42
Figure 17. Représentation de la variation de l'infection par les trypanosomes 44
Figure 18. Arbre décisionnel de la THA 48
Figure 19. Ponction lombaire 50
Figure 20. Structure moléculaire de la pentamidine 53
Figure 21. Structure moléculaire de la suramine. 56
Figure 22. Structure moléculaire de l'éflornithine. 57
Figure 23. Structure du nifurtimox 59
Figure 24. Structure moléculaire du mélarsoprol 59
Figure 25. Voies et cibles thérapeutiques chez le trypanosome 61
Figure 26. Structure du fexinidazole 61
Figure 27. Structures chimiques du fexinidazole et de ses métabolites sulfoxyde et sulfone 62
Figure 28. Structure de l'acoziborole 63
Figure 29. Structure de la pafuramidine 64
Figure 30. Vache N'Dama 68
Figure 31. Mouton Djallonké 68
Figure 32. Frottis sanguin de *Trypanosoma brucei brucei* 70

BY-NC-ND

Figure 33. Structure de l'acéturate de diminazène 72
Figure 34. Structure de l'isométamidium 74
Figure 35. Structure du bromure d'homidium 75
Figure 36. Structure du chlorure d'homidium 75
Figure 37. Structure du sulfate de quinapyramine 77
Figure 38. Structure du mélarsomine 78
Figure 39. Structure de l'AN11736 79
Figure 40. Piège biconique (gauche) et piège Vavoua (droite) 81
Figure 41. Structure de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one 84
Figure 42. Plan des synthèses de pharmacochimie à partir de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one 85
Figure 43. Principe de l'Alamar Blue® 88
Figure 44. Plaque de culture après ajout de l'Alamar Blue® 88
Figure 45. Résultats du test des comètes pour la molécule 24 92
Figure 46. Résultats de la stabilité microsomale de la molécule 24 93
Figure 47. Structure des précurseurs des molécules de cette série 111
Figure 48. Principe du test PAMPA 115
Figure 49. Structures mères des 19 nouveaux composés de cette série 131
Figure 50. Résultats de la stabilité microsomale des molécules 76 et 78 137
Figure 51. Chromatogramme MRM représentatif de la molécule 76 et du standard interne le mégazol 144
Figure 52. Résultats des concentrations plasmatiques de la molécule 76 pour les 4 souris 145
Figure 53. Suivi de la parasitémie chez les souris traitées avec la molécule 76 et avec les témoins 146
Figure 54. Suivi de la parasitémie après traitement à l'ABT + molécule 76 148
Figure 55. Superposition massifs isotopiques expérimental (bleu) / théorique (rose) de la molécule 76 149
Figure 56.Histogrammes de présence dans les fluides biologiques de la molécule 76 et de son métabolite 150
Figure 57. Structure de la molécule hit 6,8-dibromo-3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine 160
Figure 58. Plan des synthèses de pharmacochimie à partir de la 8-bromo-6-chloro-3-nitro-2-(phénylsulfonylméthyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine 161
Figure 59. Résultats du test des comètes pour la molécule 41 182
Figure 60. Résultats de la stabilité microsomale de la molécule 41 184
Figure 61. Résultats des concentrations plasmatiques de la molécule 41 pour les 3 souris 187
Figure 62. Suivi de la parasitémie chez les souris traitées avec la molécule 41 et avec les témoins 188

BY-NC-ND

Figure 63. Suivi de la parasitémie après traitement à l'ABT + molécule 41 189

Figure 64. Histogrammes de présence dans les fluides biologiques de la molécule 41 et de ses métabolites 190

Figure 65. Chromatogrammes MRM pour la molécule 41 et ses métabolites dans 3 fluides biologiques 191

Figure 66. Structure mère des 28 molécules 192

Figure 67. Résultats du test des comètes pour la molécule 50 196

Figure 68. Résultats de la stabilité microsomale de la molécule 50 197

Figure 69. Résultats des concentrations plasmatiques de la molécule 50 pour les 4 souris 209

Figure 70. Suivi de la parasitémie chez les souris traitées avec la molécule 50 et avec les témoins 210

Figure 71. Chromatogrammes MRM pour la molécule 50 et ses métabolites dans 3 fluides biologiques 211

Figure 72. Histogrammes de présence dans les fluides biologiques de la molécule 50 et de ses métabolites 212

Figure 73. Résultats de la stabilité microsomale des molécules 120 et 123 217

Figure 74. Résultats des concentrations plasmatiques de la molécule 120 pour les 4 souris 219

Figure 75. Suivi de la parasitémie chez les souris traitées avec la molécule 120 et avec les témoins 220

Figure 76. Suivi de la parasitémie après traitement à l'ABT + molécule 120 221

Figure 77. Résultats des concentrations plasmatiques de la molécule 120 + ABT pour les 3 souris 223

Figure 78. Histogrammes de présence dans les fluides biologiques de la molécule 120 et de ses métabolites 224

Figure 79. Chromatogrammes MRM pour la molécule 120 et ses métabolites dans 3 fluides biologiques 225

Figure 80. Structure du mégazol 227

Figure 81. Plan du protocole de l'étude de bioconversion du mégazol 231

Figure 82. Résultats LC-MRM de l'erlenmeyer E 232

Figure 83. Résultats LC-MRM de l'erlenmeyer H 233

Figure 84. Résultats LC-MRM des urines de souris 233

Figure 85. Structures envisagées pour les métabolites du mégazol 234

Figure 86. Principe de l'étude du fermenteur d'*A. terreus* 235

Figure 87. Chromatogramme de l'extrait méthanolique *A.terreus* 235

Figure 88. Chromatogramme de l'extrait lyophilisé *A. terreus* 236

Figure 89. Chromatogramme de l'extrait lyophilisé *A. terreus* 236

Figure 90. Chromatogramme de la fraction « Lavage MeOH colonne 1 » 238

BY-NC-ND

Figure 91. Chromatogramme des fractions « 15 à 19 de la colonne 3 » 238

Figure 92. Chromatogramme de la CLHP préparative de la fraction C1 lavage MeOH 240

Figure 93. Chromatogramme correspondant au pic 1 de la CLHP préparative de la fraction « C1 lavage MeOH » 240

Figure 94. Chromatogramme correspondant au pic 14 de la CLHP préparative de la fraction « C1 lavage MeOH » 241

Figure 95. Structures des composés hétérocycles azotés 243

Figure 96. Mécanismes des ligands de G-quadruplex 244

BY-NC-ND

Table des tableaux

Tableau 1. Liste des 20 Maladies Tropicales Négligées....23

Tableau 2. Les traitements utilisés contre la THA avant 2018....52

Tableau 3. Les traitements utilisés contre la TAA....72

Tableau 4. Résultats de l'évaluation de la cytotoxicité des 35 molécules....87

Tableau 5. Résultats de l'évaluation de l'activité trypanocide des 35 dérivés de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one....89

Tableau 6. Tests d'activité de la molécule 24 vis-à-vis d'une souche de *T.b.b* sauvage et une surexprimant la NTR1....90

Tableau 7. Résultats du test d'Ames pour la molécule 24....91

Tableau 8. Résultats du test des comètes pour la molécule 24....92

Tableau 9. Résultats du test de fixation à l'albumine pour la molécule 24....94

Tableau 10. Résultats de l'évaluation de la cytotoxicité des 26 molécules....112

Tableau 11. Résultats de l'évaluation de l'activité trypanocide des 12 molécules dérivant de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one....113

Tableau 12. Tests d'activité de la molécule 56 vis-à-vis d'une souche de *T.b.b.* sauvage et une surexprimant la NTR1....114

Tableau 13. Résultats de l'évaluation du test PAMPA pour la molécule 56....115

Tableau 14. Résultats de l'évaluation de la cytotoxicité des 19 molécules....132

Tableau 15. Résultats de l'évaluation de l'activité trypanocide des 14 molécules issues de la pharmacomodulation en position 6 de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one....133

Tableau 16. Bilan des profils biologiques des meilleures molécules issues des 3 séries ...135

Tableau 17. Tests d'activité des molécules 76 et 78 vis-à-vis d'une souche de *T.b.b* sauvage et d'une surexprimant la NTR1....136

Tableau 18. Résultats du test des comètes pour la molécule 76....137

Tableau 19. Résultats du test de fixation à l'albumine pour les molécules 76 et 78....138

Tableau 20. Résultats de l'évaluation du test PAMPA pour les molécules 76 et 78....139

Tableau 21. Bilan des tests menés sur les dérivés nitroquinoléinones....140

Tableau 22. Suivi des signes cliniques observés sur les souris pour déterminer la DMT et la DMSET....142

Tableau 23. Résultats des paramètres pharmacocinétiques de la molécules 76 après une administration PO....145

Tableau 24. Détermination *in vivo* de l'efficacité de la molécule 76 sur la souche *T.b.b.* AnTat 1.9....147

Tableau 25. Résultats de l'évaluation de la cytotoxicité des 21 molécules issues de la réaction de Suzuki-Miyaura....162

Tableau 26. Résultats de l'évaluation de l'activité trypanocide des 13 molécules....163

Tableau 27. Tests d'activité des molécules 14 et 20 vis-à-vis d'une souche de *T.b.b.* sauvage et une surexprimant la NTR1....164

BY-NC-ND

Tableau 28. Résultats du test d'Ames à l'encontre de la molécule 23 165

Tableau 29. Résultats de l'évaluation de la cytotoxicité des 21 molécules issues de la réaction de Sonogashira 179

Tableau 30. Résultats de l'évaluation de l'activité trypanocide des 10 molécules.....180

Tableau 31. Tests d'activité des molécules 41 et 44 vis-à-vis d'une souche de *T.b.b.* sauvage et une surexprimant la NTR1 181

Tableau 32. Résultats du test d'Ames à l'encontre de la molécule 41 182

Tableau 33. Résultats de l'évaluation du test PAMPA à l'encontre de la molécule 41 183

Tableau 34. Résultats du test de fixation à l'albumine pour la molécule 41 183

Tableau 35. Bilan des tests menés sur cette première série de molécules 185

Tableau 36. Suivi des signes cliniques observés sur les souris pour déterminer la DMSET 186

Tableau 37. Résultats des paramètres pharmacocinétiques de la molécules 41 après une administration PO.....187

Tableau 38. Détermination *in vivo* de l'efficacité de la molécule 41 sur la souche *T.b.b.* AnTat 1.9 188

Tableau 39. Résultats de l'évaluation de la cytotoxicité des 28 molécules 193

Tableau 40. Résultats de l'évaluation de l'activité trypanocide des 4 molécules 194

Tableau 41. Résultats du test d'Ames à l'encontre de la molécule 50 195

Tableau 42. Résultats du test des comètes pour la molécule hit et pour la molécule 50 196

Tableau 43. Résultats du test de fixation à l'albumine pour la molécule 50 197

Tableau 44. Evaluation de l'activité trypanocide et de la cytotoxicité des composés 99 et 100 dérivant de la molécule 50.....198

Tableau 45. Résultats de l'évaluation du test PAMPA-GIT pour la molécule 50.....199

Tableau 46. Suivi des signes cliniques observés sur les souris pour déterminer la DMSET 208

Tableau 47. Résultats des paramètres pharmacocinétiques de la molécules 50 après une administration PO.....209

Tableau 48. Détermination *in vivo* de l'efficacité de la molécule 50 sur la souche *T.b.b.* AnTat 1.9 210

Tableau 49. Résultats de l'évaluation de la cytotoxicité des 25 molécules 214

Tableau 50. Résultats de l'évaluation de l'activité trypanocide des 18 molécules.....215

Tableau 51. Résultats du test de fixation à l'albumine pour la molécule 120 217

Tableau 52. Suivi des signes cliniques observés sur les souris pour déterminer la DMSET 218

Tableau 53. Résultats des paramètres pharmacocinétiques de la molécules 120 après une administration PO.....219

Tableau 54. Détermination *in vivo* de l'efficacité de la molécule 120 sur la souche *T.b.b.* AnTat 1.9 220

BY-NC-ND

Tableau 55. Résultats des paramètres pharmacocinétiques de la molécules 120 + ABT après une administration PO 223

Tableau 56. Bilan général des 4 molécules d'intérêt 226

Tableau 57. Criblage analytique des microorganismes 230

BY-NC-ND

Introduction

La Trypanosomose Africaine est une parasitose vectorielle zoonotique. Chez l'Homme, classée parmi les Maladies Tropicales Négligées, elle est responsable de la Trypanosomose Humaine Africaine, et est à l'origine de nombreux décès. Dans le règne animal, elle est capable de toucher toutes les espèces sauvages comme domestiques et engendre de nombreuses pertes affectant l'économie des pays. Due à un protozoaire flagellé sanguicole du genre *Trypanosoma*, elle est transmise aux populations par la piqûre d'une glossine, ou mouche Tsé-tsé. Cette dernière lors de son repas sanguin, va injecter de la salive contenant des parasites qui vont se développer dans un premier temps, au niveau du chancre d'inoculation. Par la suite, les trypanosomes envahissent le système sanguin et lymphatique de l'hôte, constituant le stade 1 ou stade hémolymphatique de la maladie. Les signes cliniques de ce stade étant peu spécifiques, la prise en charge est rare, permettant au parasite de franchir la barrière hémato-encéphalique pour se retrouver dans le système nerveux central. Il s'agit alors du stade 2 ou stade nerveux caractérisé par des désordres neurologiques et psychiatriques, avec un dérèglement du cycle nycthéméral. En l'absence d'une thérapeutique adaptée, la maladie est mortelle. Chez l'Homme, cette prise en charge est contraignant car les traitements actuels sont « stades et espèces dépendants ». En effet, les deux sous-espèces pathogènes pour l'Homme sévissent dans des régions différentes et provoquent des infections aigues pour *Trypanosoma brucei rhodesiense*, et chronique pour *Trypanosoma brucei gambiense*. Cette particularité oblige donc à diagnostiquer obligatoirement le stade infectieux pour administrer le traitement adéquate. Dans le règne animal, la prise en charge est loin d'être plus facile du fait de la diversité des espèces animales atteintes et la diversité des espèces de trypanosomes. De plus les mésusages ont entrainé l'émergence de résistances limitant l'efficacité des traitements.
Actuellement, seul le fexinidazole, un nitroimidazolé, est proposé depuis 2018 aux populations humaines comme traitement des 2 stades d'une infection à *Trypanosoma brucei gambiense*. Ce composé administré par voie orale facilite l'observance des populations malgré une durée de traitement relativement longue (10 jours). Pour les animaux, aucune nouvelle molécule n'est proposée, obligeant les éleveurs à combiner avec les traitements préexistants.

Il est donc urgent de trouver des solutions thérapeutiques fiables, à un faible coût et actives sur les 2 stades de la maladie afin de donner un nouveau souffle aux populations. C'est dans ce contexte, que notre travail de thèse s'inscrit, cherchant à découvrir de nouveaux composés trypanocides issus de diverses familles de molécules pouvant alors agir sur des cibles spécifiques du parasite, sans différence d'espèces ou de stade.

BY-NC-ND

Chapitre I. Contexte bibliographique

I.1. Les maladies tropicales négligées

Il n'est pas possible de parler de la Trypanosomose Humaine Africaine sans parler des Maladies Tropicales Négligées (MTNs). Ces MTNs ou NTDs (pour Neglected Tropical Diseases) ont été nommées ainsi par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) afin de mettre en lumière la nécessité de définir les stratégies de leurs prises en charge à l'échelle mondiale. Retrouvées dans plus de 149 pays, les MTNs affectent un milliard de personnes à faible revenu, vivant essentiellement dans des zones de grande pauvreté dépourvue de structures sanitaires adéquates, ou dans des zones de conflits. Ces conditions provoquent ainsi une exclusion sociale, et un obstacle majeur au développement socio-économique de ces populations. Bien que de nombreux programmes de lutte aient vu le jour, ces MTNs pouvant être d'origines bactériennes, parasitaires, virales ou même fongiques sont encore trop nombreuses (Strategic and Technical Advisory Group on NTDs (STAG), 2017). Elles sont responsables de la mort de 500 000 à 1 million de personnes chaque année (Ioset, et al., 2009) (tableau 1).

En contact étroit avec la faune et les vecteurs responsables de la transmission de ces pathologies les MTNs sont d'autant plus à risque (WHO, 2018).

Infections bactériennes	Infections parasitaires	Infections virales	Infections fongiques	Autres
Ulcère de Buruli Trachome Lèpre Tréponématose	Maladie de Chagas Dracunculose Echinococcose Trématodose Trypanosomose Humaine Africaine Leishmaniose Filariose Onchocercose Schistosomose GeoHelminthose Taeniasis / Cysticercose Gale et ectoparasites	Dengue et Chikungunya Rage	Mycétome, Chromoblastomycose	Morsure de serpents

Tableau 1. Liste des 20 Maladies Tropicales Négligées
(WHO, 2018)

Les moyens mis à disposition des populations reposent pour la plupart sur des dons médicamenteux faits par les industries pharmaceutiques, et les fondations telle Bill and Melinda Gates. Ces partenariats avec l'OMS s'inscrivent dans des plans de lutte dont le but

BY-NC-ND

est l'éradication des maladies. Pour certaines d'entre elles, les premiers constats sont encourageants, comme pour la lèpre où 116 des 122 pays touchés ont vu une disparition progressive des cas, ou encore l'onchocercose ou la dracunculose où le nombre de cas décroit (Mackey et al., 2014). Pour d'autres, le constat n'est pas aussi positif. Les leishmanioses et la maladie de Chagas en font parties, avec des incidences qui ne décroient pas et qui tendent à augmenter dans certaines régions du monde sujettes à diverses tensions (politiques, économiques et sanitaires) (Ioset JR, et al., 2009; Hotez and Aksoy, 2017). En 2010, G-Finder révélait que moins de 5 % du financement de la Recherche et Développement (R&D) était allouée aux MTNs comme la THA, la leishmaniose viscérale ou encore la maladie de Chagas. Huit ans plus tard, ce chiffre ne change pas, avec seulement 4 % du financement global de la R&D consacré aux MTNs à kinétoplastidés (Chapman et al., 2018).

L'accès aux solutions semble toujours complexe dans certaines régions, et outre les nombreux décès, les MTNs sont à l'origine de graves séquelles qui peuvent être d'ordres neurologiques, moteurs, sensorielles voire esthétiques provoquant un isolement des malades et leur stigmatisation (figure 1).

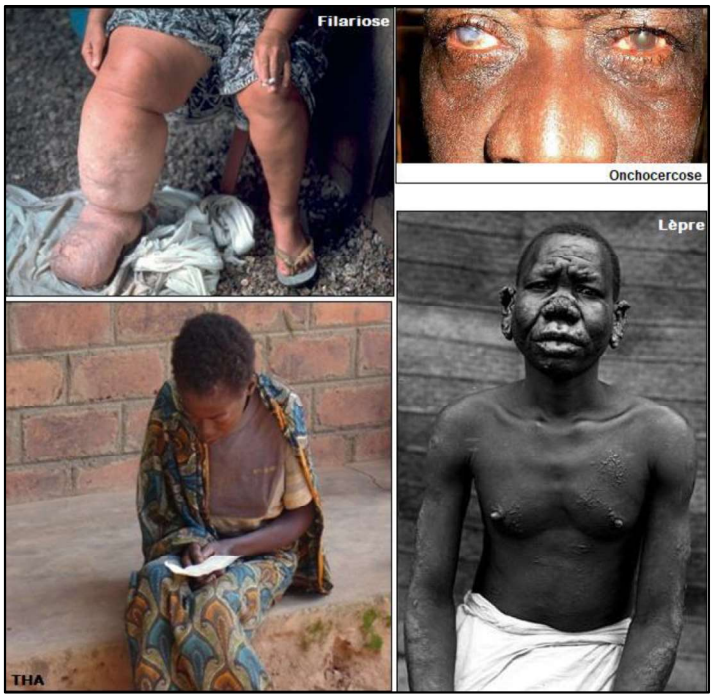


Figure 1. Exemples de Maladies Tropicales Négligées
(Filariose: ANOFEL, Onchocercose: WHO, THA: photo B. Courtioux, Lèpre: W. Dobbertin, Leprakranker, 1906)

Parmi ces MTNs, près de 20 millions de cas dans le monde sont dus à des kinétoplastidés du genre *Leishmania* et *Trypanosoma* avec approximativement 45 000 décès par an (Okwor and Uzonna, 2016; Moncayo and Silveira, 2017; Franco et al., 2018). La particularité de ces

BY-NC-ND

protozoaires flagellés repose sur la présence d'un organite spécifique du nom de kinétoplaste. Ce dernier constitue un réseau d'ADN circulaire localisé au sein d'une importante mitochondrie le plus souvent à la base du flagelle. Il joue un rôle dans la production énergétique et la motilité de ces parasites. Les protozoaires du genre *Leishmania* et *Trypanosoma* sont aussi liés par cet élément génétique pouvant constitué une cible d'action.

Comme dit précédemment, 2 espèces de kinétoplastidés sont responsables de MTNs dont l'élimination semble illusoire à l'heure actuelle. Les leishmanioses, dues au genre *Leishmania*, représentent plus de 1,5 millions de nouveaux cas par an et près de 350 millions de personnes à risque à travers le monde (Alvar et al., 2012; "WHO | Leishmaniasis,"). Cette pathologie essentiellement retrouvée en zone intertropicale a vu sa démographie s'étendre à l'Europe du Sud et notamment au pourtour méditerranéen provoquant une prise de conscience de l'urgence sanitaire. Transmise par la piqûre d'un diptère hématophage appelée phlébotome, la maladie est dite dixène. Le vecteur va au cours de son repas sanguin transmettre des promastigotes (forme extracellulaire flagellée) qui vont être phagocytés par les premières cellules de l'immunité, les macrophages. Ils vont alors se transformer en amastigotes (forme intracellulaire non flagellée) et se multiplier jusqu'à éclatement de la cellule. La destruction des macrophages va alors entrainer des lésions particulières en fonction de leur localisation et de l'espèce de parasites. Il existe 4 formes de leishmanioses réparties entre l'Ancien monde (Afrique, Asie et Europe) et le Nouveau Monde (Amériques) : la forme cutanée localisée (*Leishmania major*…) (figure 2), la forme cutanée diffuse (*L. amazonensis*…), la forme cutanéomuqueuse (*L. braziliensis*) et la forme viscérale (*L. donovani* et *L. infantum*) (figure 3) ("WHO | Leishmaniasis,").

Figure 2. Leishmaniose cutanée (WHO)

Figure 3. Leishmaniose viscérale avec importante hépatosplénomégalie (WHO)

Comme beaucoup de MTNs, la leishmaniose est une zoonose dont le principal réservoir est le chien (Reguera et al., 2016). Ce dernier peut présenter des atteintes similaires à l'Homme avec des caractéristiques bien spécifiques comme une onychogriffose, une dépilation autour

BY-NC-ND

du museau et des yeux, et une maigreur pouvant être extrême. Réservoir majeur pour les formes humaines, sa prise en charge reste un enjeu majeur de santé publique dans les différents pays touchés (Otranto and Dantas-Torres, 2013). Pour l'Homme, les traitements sont indispensables dans les cas de leishmaniose viscérale, et reposent principalement sur plusieurs molécules (Amphotéricine B, Antimoniés pentavalents, Miltéfosine, ou Pentamidine). Concernant les formes cutanées ou cutanéomuqueuses, l'abstention de traitement ou des traitements locaux peuvent suffire. La mauvaise utilisation de ces thérapeutiques, notamment pour la leishmaniose viscérale, ont vu l'émergence de résistance limitant l'efficacité des traitements, et obligeant la recherche de nouveaux composés (Sundar et al., 2000; Loiseau and Bories, 2006; Rijal et al., 2013).

La deuxième parasitose à kinétoplastidés est la Trypanosomose Américaine ou maladie de Chagas découverte en 1908 par un bactériologiste du nom d'Oswado Cruz (Steverding, 2014). Son élimination reste encore un enjeu majeur avec plus de 12 000 décès par an, un peu plus de 6 millions d'individus infectés et près de 70 millions de personnes à risque ("WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis),"). A la différence de la Leishmaniose ou de la Trypanosomose Africaine, les parasites sont ici transmis dans les déjections du vecteur, un hémiptère de la famille des réduvidés. Les formes trypomastigotes contenus dans les déjections vont être capables de franchir les muqueuses et se différencier en amastigotes intracellulaires infectant alors des cellules hôtes. En se multipliant les amastigotes vont alors faire exploser les cellules hôtes et vont se disséminer au sein de l'organisme envahissant de nouvelles cellules (Rassi et al., 2010; Bern, 2015). La maladie évolue en 2 phases. Une première phase dite aiguë le plus souvent non détectable, présentant une charge parasitaire élevée qui va tendre à se stabiliser. La patient se retrouve donc en phase 2 dite phase chronique. Le signe marquant de la phase aiguë est le signe de Romaña, qui correspond à un œdème palpétral unilatéral le plus souvent accompagné d'une adénopathie locale (figure 4). Lors de la phase chronique, la parasitémie étant au plus bas, elle est souvent asymptomatique. Il y a alors un risque élevé de complications pouvant aller de la colopathie chagasique (dilatation du colon avec constipation allant jusqu'au fécalome) à l'oesophagopathie chagasique (dilatation de l'œsophage avec risque inflammatoire et dysphagie) en passant par la myocardite chagasique entrainant alors des défaillances cardiaques, des troubles du rythme et des cardiomégalies (Pérez-Molina and Molina, 2018). Deux molécules seulement sont proposées pour la prise en charge des patients, il s'agit du nifurtimox et du benznidazole. Ces deux composés, anciens et présentant des effets indésirables, font l'objet de cas de résistance signant l'urgence de trouver de nouvelles molécules thérapeutiques (Coura and Castro, 2002).

BY-NC-ND

Seul le fexinidazole est en cours d'essai clinique soutenu par le Dndi (Drugs for Neglected Diseases *initiative*) ("About Chagas Disease | DNDi,").

Figure 4. Signe de Romaña
(WHO)

La troisième des pathologies à kinétoplastidés appelée Trypanosomose Africaine fera l'objet de notre travail de thèse.

I.2. La Trypanosomose Africaine

I.2.1. Epidémiologie de la Trypanosomose Africaine

❖ Trypanosomose Humaine Africaine

Classée parmi les MTNs depuis de nombreuses années avec une estimation comprise entre 57 et 65 millions de personnes à risque en Afrique sub-saharienne, l'histoire de la THA remonte au quatorzième siècle. Ibn Khaldoun rapporte la mort du sultan Mari Djata II des suites d'une maladie qui endort ("About Sleeping Sickness | DNDi,"; "WHO | Human African trypanosomiasis,"). Par la suite, de nombreux chercheurs ont été capables de mettre en évidence des trypanosomes dans les fluides biologiques humains.

L'Afrique a connu 3 grandes épidémies ravageant des villages entiers. La première épidémie s'est déroulée durant la colonisation européenne et la traite négrière à la fin du XIX^{ème} siècle. La deuxième épidémie a eu lieu entre les années 1920 et 1950, suite aux guerres mondiales stoppant l'accès aux soins des populations. Par la suite, les colons décidèrent d'investir pour la prise en charge des populations locales et notamment dans la lutte anti-vectorielle afin d'éradiquer ce fléau. Cette mesure permit une quasi éradication de la maladie dans les années 60. Malheureusement, l'émergence des conflits sociaux, économiques et politiques des différents pays d'Afrique pour leur indépendance a engendré le relâchement des moyens de lutte provoquant l'augmentation progressive des cas de Trypanosomose jusqu'à atteindre son apogée dans les années 1990 en République Démocratique du Congo, en Angola, en République Centrafricaine, dans le Sud du Soudan et en Ouganda.

BY-NC-ND

Depuis, ces pays peinent à faire diminuer le nombre de cas. Les conflits des pays voisins à l'origine de migrations de populations conduisent à la « réapparition » de la maladie dans des régions, jusqu'à là, exempt de sujet (Ekwanzala et al., 1996; Smith et al., 1998; Stanghellini and Josenando, 2001). Toutefois, depuis le début du XXI^{ème} siècle, les organismes de santé enregistrent un recul du nombre de nouveaux cas, en raison de la fin des conflits dans certaines régions et la prise en charge des malades avec un accès aux soins facilité (Franco et al., 2014; "WHO | Human African trypanosomiasis,").

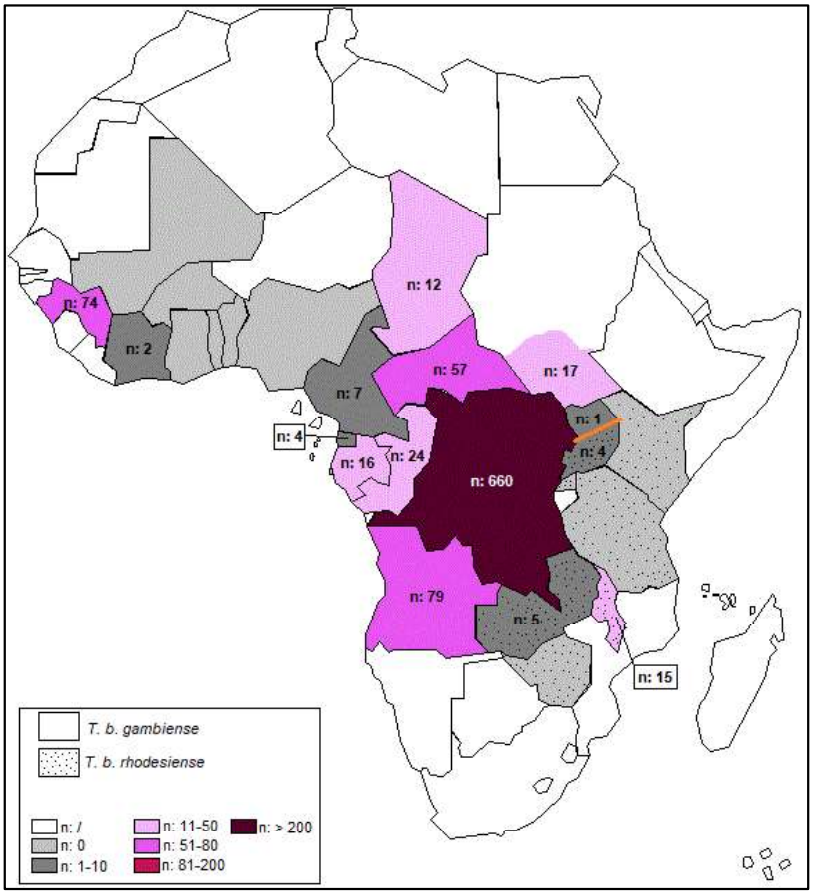


Figure 5. Nombre de nouveaux de cas de THA en 2018
(WHO 2019, Franco 2018)

Actuellement, 24 pays d'Afrique de l'Ouest et Centrale et 13 pays d'Afrique de l'Est et du Sud sont sujets à la présence de *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b.g.*) et *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T.b.r.*) respectivement. Ainsi, près de 53 millions de personnes sont à risque de contracter une THA à *T.b.g.*, et plus de 4 millions de personnes pour *T.b.r.* (Franco et al., 2018; "WHO | Human African trypanosomiasis,"). Seul un pays, l'Ouganda voit la présence des 2 parasites sur son territoire, rendant particulièrement complexe la prise en charge des patients (Simarro et al., 2011). D'après l'OMS, seulement 1 447 nouveaux cas ont été reportés en

BY-NC-ND

2017, en comparaison des 9 875 cas déclarés en 2009 (figure 5) (“WHO | Human African trypanosomiasis,”). Ce chiffre est en dessous des 2 000 cas annuels fixés par l’OMS pour 2020 d’après son programme de lutte.

L’OMS a en effet estimé que les mesures de prise en charge et d’éducation des populations dans les pays endémiques depuis des années ont permis une diminution suffisamment importante du nombre de cas pour envisager une élimination de la THA en 2020 (figure 6) (Franco et al., 2018; “WHO | Human African trypanosomiasis,”). En estimant cette élimination, l’OMS considère également qu’il sera possible d’ici 2030 d’avoir une élimination durable de la transmission de *T.b.g.* dans les pays touchés grâce aux actions menées par le NSSCPs (National Sleeping Sickness Control Programmes ou PNLTHA pour Programme National de Lutte contre la Trypanosomiase Humaine Africaine) qui réalise au sein des pays endémiques des campagnes d’éducation des populations, et cela avec le support d’organisations non-gouvernementales (NGOs) (“WHO | Human African trypanosomiasis,”). Or, de nombreux facteurs extérieurs peuvent venir contrecarrer une telle élimination. L’exemple le plus marquant est celui de la Guinée, qui a vu son nombre de nouveaux cas augmenter passant de 29 cas en 2015 à 140 cas en 2017, et cela suite à l’épidémie d’Ebola qui a mobilisé l’attention et donc limiter le contrôle de la THA (Camara et al., 2017). De telles données obtenues en Guinée peuvent être valables dans d’autres pays (actuellement en RDC ou au Rwanda sujets à de nouvelles épidémies de cas d’Ebola) rendant le nombre de cas recensé approximatif.

Il ne faut pas non plus oublier les pays pour lesquels les données ne sont pas communiquées, ce qui biaise les données épidémiologiques présentées.

BY-NC-ND

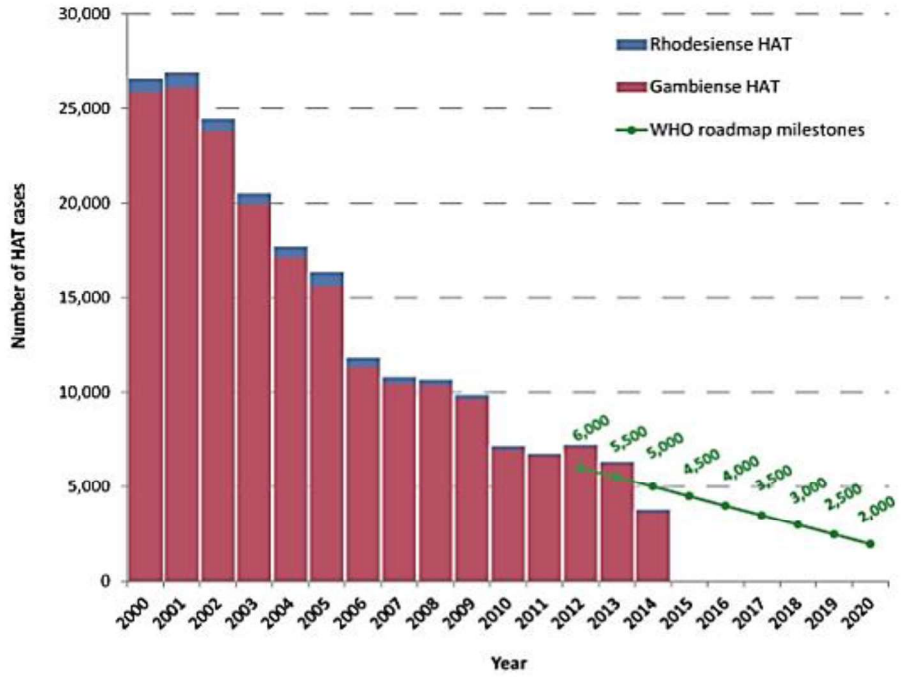


Figure 6. Nombre total de cas de THA à *T.b.g.* et *T.b.r.* par an depuis 2000, avec l'estimation de l'élimination de la THA fixée par l'OMS pour 2020
(Franco, 2017)

Ainsi, pour atteindre l'objectif d'éradication de la maladie, il est nécessaire que les gouvernements locaux continuent la sensibilisation et l'éducation des populations mais également prennent conscience du rôle de certains porteurs dits asymptomatiques, de l'importance des réservoirs animaux et de la nécessité de la prise en charge vétérinaire.

❖ Trypanosomose Animale Africaine

Pour ce qui est de la Trypanosomose Animale Africaine (TAA), les chiffres sont beaucoup plus imprécis et les données sont rares. Il est cependant estimé que les pertes agricoles annuelles dues à la TAA représentent 4,5 milliards de dollars en Afrique sub-Saharienne plaçant cette pathologie en tête des maladies vétérinaires ayant le plus gros impact sur la production agricole en Afrique (Shaw et al., 2014; Ebhodaghe et al., 2018). La TAA est due à une multitude d'espèces et souches de trypanosomes, dont les plus importants sur le plan économique sont *T. congolense* et *T. vivax* qui peuvent aussi se retrouver sur d'autres continents comme l'Amérique du Sud (Morrison et al., 2016) (figure 7). Le plus grand enjeu porte sur les animaux de rente qui représentent une importante source de bénéfices socio-économiques via les ventes de viande ou de lait, mais également dans l'industrie de la tannerie, ou dans l'industrie agricole par la vente du fumier. La prévalence pour les ovins, caprins et porcins n'est que peu connue dans les pays endémiques, seuls l'Ethiopie et le Nigéria ont fourni des chiffres (16,1% avec un intervalle de confiance (IC) de 12,3-20,3% pour

BY-NC-ND

l'Ethiopie, et 3,7% avec un IC de 2,8-4,9% pour le Nigéria) (Odeniran and Ademola, 2018). Toutefois les données étant si rares que les études de prévalence ne se risquent pas à donner des chiffres exacts, mais plutôt à indiquer les risques liés à cette pathologie. En effet, les animaux sont un important réservoir autant pour les autres espèces animales que pour les sous-espèces pathogènes de l'Homme (Ng'ayo et al., 2005; N'Djetchi et al., 2017). Concernant la Trypanosomose bovine, les études estiment que plus de 50 millions de vaches sont à risque de contracter la TAA dans les régions endémiques avec près de 3 millions susceptibles d'en mourir (Holt et al., 2016; Ebhodaghe et al., 2018). Ces données encore trop faibles ne permettent pas d'estimer correctement l'ampleur de la pathologie. De plus, il ne faut pas oublier que le règne animal sauvage est également touché, et que les données sont inexistantes.

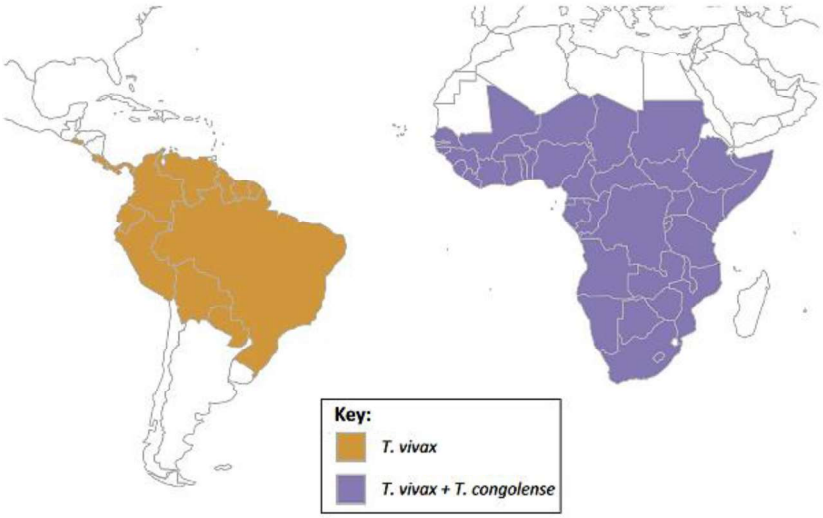


Figure 7. Distribution de la TAA dans le monde
(Morrison, 2016)

I.2.2. Le vecteur de la maladie

I.2.2.1. Classification

La Glossine ou mouche tsé-tsé signifiant « qui tue le bétail », est une mouche appartenant à l'ordre des Diptères, à la sous-famille des *Glossinidae* et au seul genre *Glossina*. Elle est restreinte à l'Afrique sub-saharienne, entre le désert du Sahel et les déserts namibiens et de Kalahari.

Il existe trois sous-genres regroupant les 33 espèces de glossine retrouvées sur le continent africain (figure 8).

BY-NC-ND

- Sous-genre *Nemorhina* (Robineau-Desvoidy, 1830), groupe *palpalis*. Les espèces de glossines vivent au niveau de la ripisylve préférentiellement en Afrique de l'Ouest et Centrale. Certaines d'entre elles comme *G. palpalis* et *G. fuscipes* sont capables d'étendre leur habitat jusqu'aux zones anthropisées comme des plantations et aux grandes villes (Tshimungu et al., 2010). *Trypanosoma brucei gambiense* est principalement transmis par ces espèces (Wamwiri and Changasi, 2016).
- Sous-genre *Glossina sensus* stricto (Zumpt, 1935), groupe *morsitans*. Les espèces de ce groupe vivent au niveau des savanes boisées, lieux de vie de nombreuses espèces animales (sauvages comme domestiques) d'où leur important rôle dans le développement de la TAA. Par exemple, *G. m. longipalpis*, est capable de transmettre *T. congolense* ou *T. vivax*, espèces responsables de formes animales. Certaines d'entre elles telles que *G. pallidipes* et *G. morsitans* interviennent dans la transmission de *T.b.r.* notamment (Gooding and Krafsur, 2005).
- Sous-genre *Austenina* (Townsend, 1921), groupe *fusca*. Les espèces de ce groupe se retrouvent principalement au niveau des forêts. Bien qu'aucune des espèces de ce groupe ne soient responsables de THA, certaines, comme *G. tabaniformis,* sont capables de transmettre un pathogène au bétail dans certaines zones boisées du Gabon ou de République Démocratique du Congo (Leak et al., 1991). Malheureusement les changements climatiques et l'activité humaine tendent à changer cette distribution.

BY-NC-ND

	Sous-genre	Groupe	Espèces	Sous-espèces
mouches riveraines	*Nemorhina* (Robineau-Desvoidy, 1830)	*Palpalis*	*Glossina*	*palpalis palpalis*
			Glossina	*palpalis gambiensis*
			Glossina	*tachinoides*
			Glossina	*pallicera pallicera*
			Glossina	*pallicera newsteadi*
			Glossina	*fuscipes fuscipes*
			Glossina	*fuscipes martinii*
			Glossina	*fuscipes quanzensis*
			Glossina	*caliginea*
mouches des savanes	*Glossina s.* (Zumpt, 1935)	*Morsitans*	*Glossina*	*morsitans morsitans*
			Glossina	*morsitans centralis*
			Glossina	*morsitans submorsitans*
			Glossina	*longipalpis*
			Glossina	*pallidipes*
			Glossina	*austeni*
			Glossina	*swynnertoni*
			Glossina	*lefevroni*
			Glossina	*josephussdelbentazie*
mouches des forêts	*Austenina* (Townsend, 1921)	*Fusca*	*Glossina*	*fusca fusca*
			Glossina	*fusca congolensis*
			Glossina	*nigrofusca nigrofusca*
			Glossina	*nigrofusca hopkinsi*
			Glossina	*fuscipleuris*
			Glossina	*severini*
			Glossina	*vanhoofi*
			Glossina	*nashi*
			Glossina	*tabaniformis*
			Glossina	*longipennis*
			Glossina	*brevipalpis*
			Glossina	*medicorum*
			Glossina	*schwetzi*
			Glossina	*haningtoni*
			Glossina	*frezili*

Figure 8. Liste des 33 espèces de glossine

Il est à noter que la liste des glossines est exhaustive et est sujette à discussions et modifications (Gooding and Krafsur, 2005).

I.2.2.2. Morphologie

La glossine est une mouche de 6 à 16 mm de long, généralement de couleur brune ou sombre souvent terne, variant selon les espèces (Kohagne Tongue, 2014). Elle possède une trompe horizontale en prolongement du corps et ses ailes sont repliées l'une sur l'autre au niveau de son dos lorsqu'elle est au repos. Sur les ailes, elle possède un espace formant une hache appelé « cellule en hache » permettant sa différenciation vis-à-vis des tabanidés et stomoxes (Gentilini et al., 2012).

BY-NC-ND

La glossine est telmophile, et les deux sexes hématophages sont capables de transmettre la maladie lors de leur repas sanguin (Brun et al., 2010). Essentiellement diurne, elle passe de nombreuses heures à se reposer dans des sites ombragés aux heures les plus chaudes de la journée, pour ne piquer que les individus passant à sa portée tôt le matin ou tard le soir. La glossine a besoin de conditions particulières pour survivre et se reproduire comme une température de 16 à 38°C, un taux d'humidité relatif de 50 à 80 %, des sites abrités et de la nourriture. Cela peut toutefois varier en fonction des différentes espèces (Rogers, 1985). Une des particularités de cette mouche est le mode de reproduction. Il s'agit en effet d'une reproduction par viviparité adénotrophique (Krafsur, 2009). La femelle n'est fécondée qu'une seule fois au cours de sa vie, et ne donne naissance qu'à une larve à la fois soit pas plus de 5 descendants dans toute sa vie. La femelle stocke les spermatozoïdes dans une spermathèque et peut alors « s'autoféconder » (WHO, 2013) (figure 9). Les spermatozoïdes ont un temps de survie de 200 jours, plus que la vie de la mouche elle-même. En effet, l'espérance de vie des glossines est fonction du milieu naturel (nourriture, prédation et climat) et varie entre 3 mois pour la femelle et 2 mois pour le mâle (WHO, 2013; Lisette Kohagne Tongue, 2014). La mouche femelle est larvipare, elle va conserver la larve jusqu'à sa maturité dans une « poche » analogue à un utérus, puis va déposer cette larve dans un sol humide, propice au développement de la pupe. Après un laps de temps variant entre 20 et 80 jours, la jeune mouche émerge pour s'envoler à la recherche d'un hôte pouvant lui donner son premier repas sanguin. C'est durant cette période, que la jeune mouche est la plus réceptive à l'infection par *Trypanosoma*. De plus, l'accouplement peut s'effectuer dès la sortie du puparium soit quelques heures après l'émergence de cet imago (WHO, 2013; Krafsur, 2009). Les mouches ne se contaminent qu'une fois en piquant un trypanosomé ou animal parasité. Ce repas n'est pas sans risque pour les mouches qui peuvent être tuées par des mouvements de défense des hôtes. Pour éviter cela, elles choisissent préférentiellement des zones peu accessibles comme l'abdomen ou l'intérieur des pattes chez les animaux notamment pour se nourrir.

BY-NC-ND

Figure 9. *Glossina morsitans morsitans*
(www.raywilsonbirdphotography.co)

La glossine est majoritairement responsable de la transmission des parasites humains comme animaux en Afrique. Il existe d'autres vecteurs comme *Tabanus* spp., ou *Stomoxys* spp., qui sont responsables de la transmission de *T. evansi* notamment et qui peuvent être retrouvés en Asie ou Amérique du Sud (Brun et al., 1998; Krafsur, 2009).

I.2.3. Le parasite

I.2.3.1. Classification

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés sanguicoles de l'ordre des *Kinétoplastida*, de la famille des *Trypanosomatidae* et du genre *Trypanosoma* (figure 10).

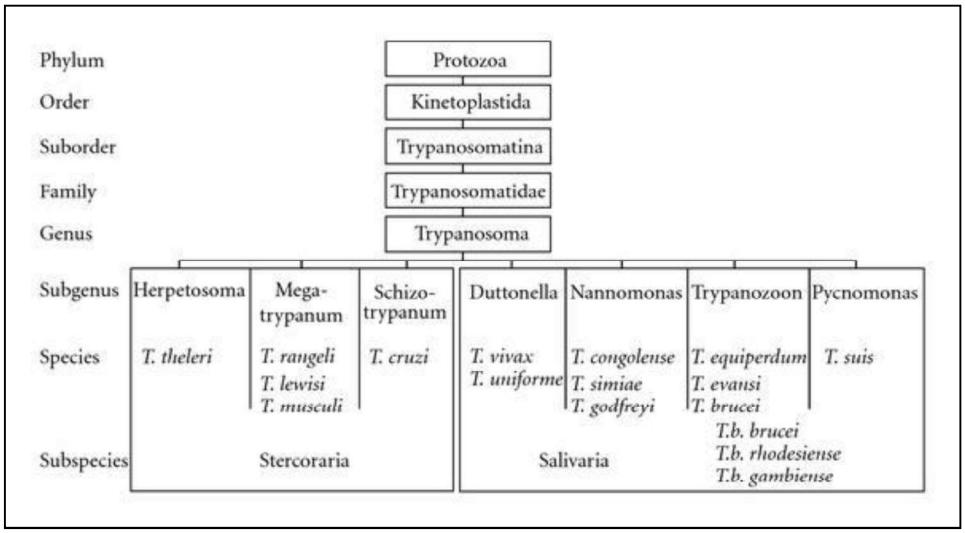


Figure 10. Classification des trypanosomes
(Baral, 2010)

BY-NC-ND

Il existe deux grands groupes capables de parasiter de nombreux vertébrés, poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères (Overath et al., 1998; Njagu et al., 1999):

- Les *Stercoraria*, sont transmis par déjections de leur vecteur. *Trypanosoma cruzi*, retrouvé dans la maladie de Chagas, est véhiculé par des réduves dont les plus connues sont *Triatoma infestans* et *Rhodnius prolixus*. On y retrouve des formes extracellulaires mobiles au niveau du sang et des formes intracellulaires immobiles (Stevens and Brisse, 2004). Un autre parasite est *Trypanosoma lewisi.* Il fait l'objet de nombreuses recherches, car bien que peu pathogène, il est retrouvé chez les rongeurs et peut être transmis par son vecteur *Nosopsyllus fasciatus*, ou puce du rat nordique, et a déjà été retrouvé chez des humains (Verma et al., 2011; Truc et al., 2014).

- Les *Salivaria*, sont transmis par des mouches piqueuses dont les glossines en Afrique. On retrouve différentes espèces de trypanosomes africains pathogènes dont ceux de l'espèce *T. brucei* spp., parasite extracellulaire d'hôtes vertébrés, regroupant différentes sous-espèces pathogènes ou non chez l'Homme (Stevens and Brisse, 2004).

  - *Trypanosoma brucei brucei* (*T.b.b.*), sous-espèce non pathogène chez l'Homme par la présence d'un complexe lytique appelé TrypanoLytic Factor (TLF) composé d'haptoglobuline (Hpr) et d'apolipoprotéine L1 (APOL1) capable de lyser le parasite, est responsable dans le règne animal, de la « Nagana », nom donné par les africains pour désigner une forme de TAA (Thomson et al., 2009). *Trypanosoma brucei brucei* est la sous-espèce la plus utilisée dans la recherche expérimentale.

  - *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T.b.r.*), sous-espèce essentiellement localisée en Afrique de l'Est et en Afrique australe mais qui tend à se déplacer par les migrations de son vecteur, est responsable d'une forme aigüe de la maladie chez l'Homme. Il est considéré comme zoonotique car retrouvé chez les animaux (Welburn et al., 2001).

  - *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b.g.*), sous-espèce considérée comme anthroponotique, elle se localise principalement en Afrique Centrale et de l'Ouest, et est l'agent responsable de la forme chronique de la maladie chez l'Homme. L'animal contaminé ne pouvant jouer que le rôle de réservoir, même si ce dernier point semble remis en question ces dernières années (Büscher et al., 2018).

Les autres espèces de trypanosomes existants ne sont actuellement présentes que dans le règne animal. *Trypanosoma congolense* est essentiellement retrouvé chez les ruminants, certains carnivores et équidés, *T. simiae* est spécifique des porcins, *T. vivax* retrouvé chez les ruminants et les équidés, *T. evansi* responsable du «Surra», infecte principalement les

BY-NC-ND

camélidés, mais aussi les équidés et les carnivores, quant à *T. equiperdum*, il s'observe exclusivement chez les équidés et est responsable de la «Dourine» qui n'est pas transmise par un vecteur mais directement d'un animal à l'autre lors de la saillie (Finelle, 1969). Ce dernier est présent dans les sécrétions séminales et les membranes génitales de son hôte (Brun et al., 1998). Il est à noter que *T. vivax* circulant aussi sur le continent sud-américain est transmis de façon mécanique par l'intermédiaire d'insectes hématophages (Desquesnes, 2004).

I.2.3.2. Morphologie

Les trois sous-espèces de *T. brucei* présentent les mêmes caractéristiques d'un point de vue morphologique et ne différent que selon le stade du cycle de développement dans lequel elles se trouvent. Les trypanosomes apparaissent fusiformes et mobiles au stade sanguicole. Ils mesurent environ 20 µm de longueur pour 5 µm de largeur et possèdent une anatomie relativement simple composée d'un noyau contenant le matériel génétique, d'un kinétoplaste constituant le génome mitochondrial, d'un flagelle rattaché à la membrane cytoplasmique formant ainsi une membrane ondulante, des organites divers comme le glycosome (organelle spécifique de la glycolyse pour l'apport énergétique), les acidocalcisomes (organites acides riches en calcium et polyphosphate) et enfin des antigènes de « couvertures » composés de glycoprotéines VSG (Variant Surface Glycoprotéin) (figure 11) (Vickerman et al., 1988; Vercesi et al., 1994; Barry, 1997; Cayla et al., 2019).

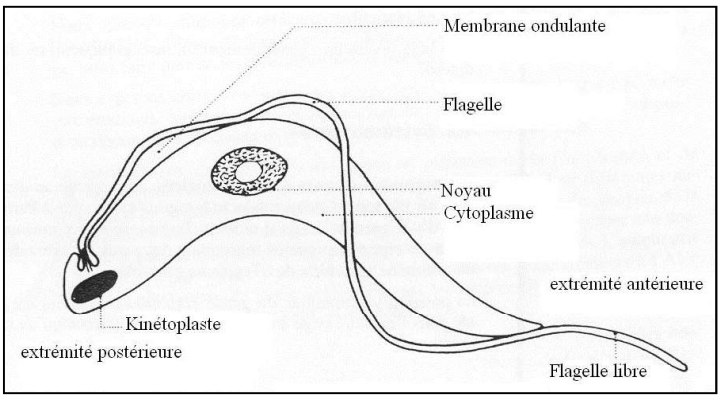


Figure 11. Schéma d'un trypanosome (forme trypomastigote)

Le nombre important de gènes codant pour les VSG et la capacité qu'ont les trypanosomes à changer leur manteau glycoprotéique plus d'une centaine de fois chez l'hôte, montrent l'aptitude de ces parasites à échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Morrison et al., 2009).

BY-NC-ND

Au cours de son cycle biologique, le parasite a la capacité de se transformer pour s'adapter aux hôtes successifs qu'il rencontre. On retrouve la forme épimastigote chez la glossine, forme dépourvue de son manteau antigénique et non pathogène pour son vecteur, et la forme trypomastigotes (trapue et longue) chez les hôtes intermédiaires (mammifères…) (Matthews et al., 2015).

Les trypanosomes font partie des seuls eucaryotes possédant des enzymes spécifiques appelées nitroréductases (NTR). Ces NTRs identifiées en premier chez les bactéries, sont absentes des cellules des mammifères, et sont donc devenues une cible intéressante en thérapeutique anti-infectieuse. En effet, bien que le rôle exact des NTRs ne soit pas encore bien connu, il semblerait qu'elles interviennent dans le métabolisme de détoxification du microorganisme en réduisant différents types de substrats, en jouant un rôle de défense contre le stress oxydant ou encore en participant à une voie métabolique d'équilibre d'oxydo-réduction dans certaines situations (Somerville et al., 1995; Liochev et al., 1999; Rau and Stolz, 2003). Mais la présence de plus en plus fréquente de composés nitroaroamatiques dans l'environnement a pu modifier les propriétés des NTRs les amenant à interagir avec ces molécules pour les dégrader. Les NTRs sont capables de catalyser des réactions de réduction des composés nitroaromatiques en utilisant alors différents cofacteurs et groupements prosthétiques. Il existe 2 types de NTRs qui sont alors classées en fonction de leur sensibilité à l'oxygène. Les NTRs de type 1, insensibles à l'oxygène, catalysent des réductions à 2 électrons et utilisent alors une flavine mononucléotide (FMN) comme agent prosthétique avec du NAD(P)H en cofacteur ; alors que les NTRs de type 2, sensibles à l'oxygène utilisent soit la flavine adénine dinucléotide (FAD) soit du FMN et catalysent alors des réactions de réductions à 1 électron (Hall et al., 2012; Oliveira et al., 2010; Wilkinson et al., 2008; Wyllie et al., 2016).

Les trypanosomes africains comme américains possèdent un gène unique codant pour la NTR de type 1 (NTR1) utilisant donc le NADH et la FMN comme source d'énergie. Cette NTR1 leur est essentielle pour le développement de l'infection en leur permettant notamment de se transformer en forme infestante (Wilkinson et al., 2008). Lors de la présence de composés nitroaromatiques, la NTR1 va alors jouer un rôle dans la bioactivation de ces molécules. Elle va catalyser la réduction du groupement NO_2^- pour former des intermédiaires nitroso (NO^-), puis hydroxylamine ($NHOH^-$) donnant pour finir une amine (NH_2^-) ou un radical nitrénium (figure 12) (Hall et al., 2011). Il est à noter que le métabolite NO^- est très rarement décelé car il est rapidement réduit en $NHOH^-$. L'activité toxique des composés nitroaromatiques repose essentiellement sur ces intermédiaires de synthèse et notamment le $NHOH^-$ qui est capable d'interagir avec des macromolécules de l'organisme du trypanosome et ainsi entrainer des

BY-NC-ND

dommages cellulaires, mais également de former des adduits covalents avec les bases azotées entrainant des cassures de l'ADN et donc la mort du parasite.

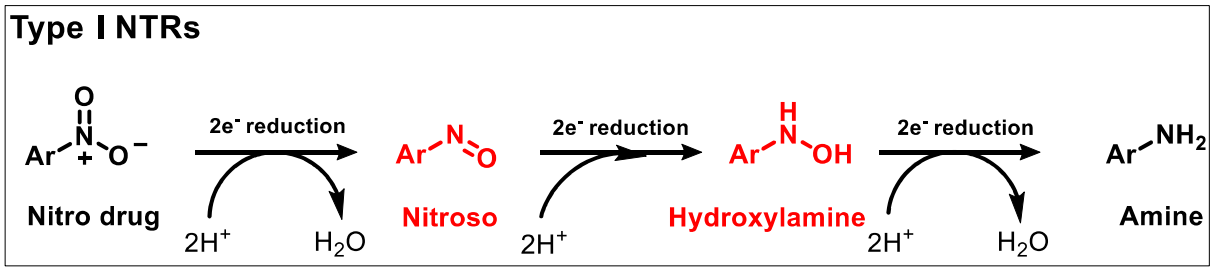


Figure 12. Hypothèse du mécanisme d'action de la NTR de type 1 chez les trypanosomes africains

I.2.4. Clinique, diagnostic et traitements de la Trypanosomose Humaine Africaine

I.2.4.1. Cycle parasitaire

La clinique de la THA dépend de la transmission du trypanosome par la mouche à l'Homme. Cette transmission est incluse dans un cycle présentant différents stades biologiques du parasite à la fois chez le vecteur, la glossine et chez son hôte humain (figure 13) (Franco et al., 2014; Bonnet et al., 2015).

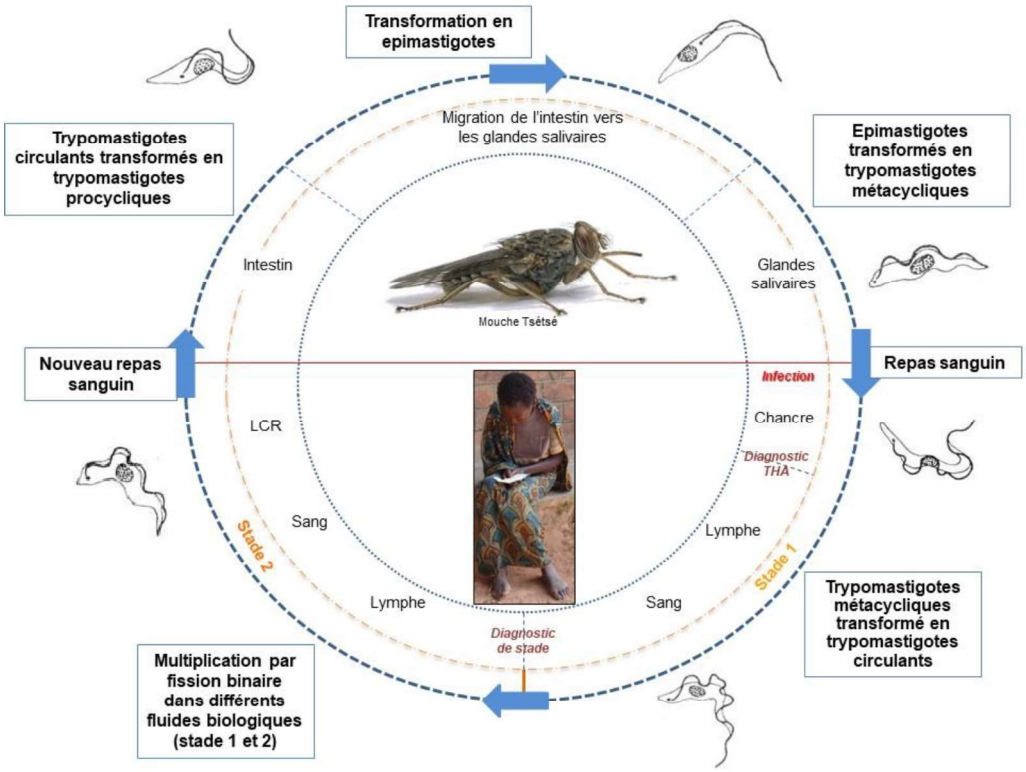


Figure 13. Cycle parasitaire de la Trypanosomose Humaine Africaine.
(d'après Bonnet et *al*. 2015)

BY-NC-ND

- Afin de se nourrir, la mouche telmophage va piquer l'individu en créant un micro hématome au niveau d'un capillaire afin d'aspirer le sang. Pour éviter la coagulation sanguine, la glossine injecte sa salive. Cette dernière peut alors contenir des trypanosomes sous forme trypomastigote métacylique qui vont se retrouver au niveau d'un chancre d'inoculation où ils vont pouvoir se multiplier et se transformer en trypomastigotes circulants. Cette forme leur permet alors d'envahir la circulation sanguine et lymphatique tout en continuant leur multiplication par fission binaire. La prolifération des trypanosomes au niveau de ces fluides biologiques marque le stade 1 de la maladie ou stade hémolymphatique. Si la personne infectée n'est pas prise en charge à ce stade, les trypanosomes qui continuent leur multiplication sont capables de franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour se localiser au niveau du système nerveux central (SNC). Ce franchissement est variable suivant l'espèce de parasite, il peut aller de quelques semaines pour *T.b.r.* à plusieurs années pour *T.b.g.* Lorsque les trypanosomes se multiplient dans du liquide céphalo-rachidien (LCR), l'individu est alors en stade 2, le stade nerveux.
- L'Homme, ainsi parasité, devient un réservoir pour de nouvelles mouches. En effet, si l'individu se fait piquer par une mouche qui n'était pas parasitée, elle ingérera des trypanosomes circulants, qui une fois dans son intestin subiront une maturation pour donner des formes procycliques acquérant un manteau protéique composé de procyclines, les protégeant des protéases intestinales de la mouche (Acosta-Serrano et al., 2001). Ces formes quitteront le système digestif pour migrer vers les glandes salivaires en passant du stade épimastigote au stade trypomastigote métacyclique pour ainsi attendre une nouvelle infestation. Une mouche infestée l'est pour le reste de sa vie.

I.2.4.2. Evolution de la maladie

Les patients atteints de THA vont présenter des signes cliniques dépendant du développement de leur réponse immunitaire en mettant en jeu différents acteurs en fonction de la progression de la maladie. L'évolution du stade hémolymphatique vers le stade nerveux varie et est fonction du parasite. Lors d'une infection à *T.b.r.*, cette évolution dite aiguë peut être de quelques semaines alors que pour *T.b.g.,* elle peut aller jusqu'à plus d'un an marquant une infection chronique. Les symptômes qui évoluent en fonction du stade sont relativement semblables pour les deux atteintes.

Dès lors qu'une mouche infectée pique un individu, il devient alors porteur. Son système immunitaire s'active au niveau local et provoque l'apparition d'un chancre d'inoculation

BY-NC-ND

renfermant les trypanosomes avant leur dissémination dans l'organisme (Gentilini et al., 2012). Ce dernier nommé trypanome passe régulièrement inaperçu sur les peaux sombres. Lorsqu'il est visible il prend l'aspect d'un nodule rouge-violacé (figure 14) pouvant atteindre jusqu'à 10 cm de diamètre, et est fréquemment accompagné d'adénopathies satellites.

Figure 14. Observation d'un trypanome (ANOFEL)

De récentes études ont fait état d'une nouvelle étape de vie du trypanosome au niveau de la matrice cutanée. En effet, une sous-population de trypanosomes est capable de proliférer au niveau du derme à proximité du point d'inoculation (Caljon et al., 2016; Capewell et al., 2016). Les trypanosomes sont alors « stockés », tout comme ils le sont déjà au niveau hépatique ou cérébral, et jouent ainsi un rôle précoce de réservoir pour l'hôte et constituent une zone propice à l'infection d'une nouvelle mouche (Trindade et al., 2016).

I.2.4.2.1. Stade hémolymphatique ou stade 1

I.2.4.2.1.1. La clinique de la THA en stade 1

Le stade 1 appelé stade hémolymphatique se caractérise par la présence dans le sang et la lymphe des trypanosomes ayant migrer du chancre jusqu'à ces fluides biologiques. Les signes cliniques sont peu spécifiques, variables et souvent imputables à d'autres pathologies. On retrouve notamment des fièvres intermittentes pouvant être anarchiques, des céphalées, une asthénie non franche, une anémie, une hépatosplénomégalie et des atteintes cutanées comme un prurit, des œdèmes de la face donnant au patient un visage dit lunaire (figure 15), ou des trypanides difficiles à observer sur des peaux noires. Le signe le plus caractéristique de ce stade est le signe de Winterbottom qui correspond à la présence d'adénopathies palpables, indolores, mobiles et non suppuratives principalement au niveau de la chaine ganglionnaire sus-claviculaire et cervicale (figure 16). Ces adénopathies sont recherchées lors du diagnostic de la maladie (Duggan and Hutchinson, 1966; Brun et al., 2010).

BY-NC-ND

Figure 15. Œdème de la face chez un enfant
(Photo médecine tropicale)

Figure 16. Adénopathie palpable caractéristique de la THA
(Photo ANOFEL)

I.2.4.2.1.2. L'immuno-physiopathologie de la THA au stade 1

Dès le début de l'infection, l'organisme de l'hôte tente de se défendre. Le système immunitaire inné avec les cellules à fonction de phagocytose comme les macrophages et les polynucléaires s'activent. L'Homme, comme certains grands primates, possède un complexe trypanolytique (TLF), composé d'une APOL1 et d'une Hpr, qui une fois internalisé par le trypanosome va provoquer sa lyse par formation de pores au niveau de son lysosome (Harrington et al., 2009; Kuriakose et al., 2016; Molina-Portela et al., 2005). Toutefois ce TLF n'est actif que sur certaines sous-espèces et malheureusement *T.b.g.* et *T.b.r.* ont acquis une résistance rendant inefficace l'action de ce complexe (Vanhamme and Pays, 2004). En effet, *T.b.r.* exprime un gène de résistance appelé SRA (Serum Resistance Associated protein) codant pour une protéine tronquée VSG-like qui est en mesure de neutraliser l'effet toxique de l'APOL1 (Pays, 2006), quant à *T.b.g.* il s'agit là d'une tactique d'évitement grâce à la protéine TgsGP (*T.b.g*-specific glycoprotein) qui possède une conformation spécifique empêchant l'effet toxique de l'APOL1 (Uzureau et al., 2013).

Les sous-espèces pathogènes pour l'Homme ayant réussi à contourner l'action du TLF, se heurtent donc aux cellules de l'immunité innée. Ces dernières présentent à leur surface des récepteurs membranaires appelés PRR (Pattern recognition receptor) avec notamment un type particulier appelé TLR pour Toll Like Receptor qui sont donc capables de reconnaitre des motifs moléculaires spécifiques appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) à la surface des antigènes dans le but de l'éliminer. Dans le cas des trypanosomes, il semblerait

BY-NC-ND

que le motif PAMP reconnu soit l'ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) au niveau de la membrane du parasite. A la suite de cette reconnaissance, il y a activation des cellules de l'immunité et notamment des macrophages qui vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires (IL1, IL6 IL12 ou le TNFα) capables d'activer les lymphocytes, augmenter l'apport de cellules effectrices et augmenter la perméabilité vasculaire en jouant un rôle sur la fièvre intermittente. Cette activation est médiée par une protéine adaptatrice MyD88 qui est là pour activer et amplifier le signal en se liant à des protéines kinases qui par des cascades de signalisation conduisent à la production des cytokines pro-inflammatoires (Kuriakose et al., 2016).

La fièvre intermittente retrouvée est due à la réaction inflammatoire de type 1 avec libération d'IFNγ, de TNFα, de radicaux libres tels que de l'oxyde nitrique (NO) et ses métabolites. Ces composés peuvent malheureusement devenir néfastes pour le patient à long terme et entrainer des dommages tissulaires. Pour limiter ses atteintes, une réaction immunitaire de type 2 se met en place avec libération de nouvelles interleukines IL10, IL4 et IL1β possédant des propriétés anti-inflammatoires, immunosuppressives et inhibitrices de la synthèse de NO (Stijlemans et al., 2007). Les macrophages et cellules dendritiques activés par le parasite peuvent aussi sécréter des IL12 et IL18, cytokines pro-inflammatoires activant par cascade les lymphocytes T helper (Th1), qui vont alors produire de l'IFNγ (Mansfield and Paulnock, 2005, 2008). Dans le même temps, cette libération de cytokines peut être associée à une érythrophagocytose essentiellement au niveau hépatique entrainant une anémie que l'individu a du mal à compenser parfois. Les macrophages possèdent également un potentiel de cytotoxicité à médiation cellulaire. Les parasites ont également acquis la capacité à détourner certains éléments du système immunitaire innée de l'hôte en leur faveur. Par exemple, l'IFNγ qui est libéré lors de l'activation des macrophages va être utilisé par le trypanosome pour son propre développement et sa propre multiplication (Hill et al., 2000). Ils sont capables également de détourner à leur avantage la voie de L-arginine qui conduit notamment à la synthèse du NO, afin de produire divers facteurs de croissance comme l'ornithine ou divers polyamines nécessaires à leur développement (Vincendeau et al., 2003).

Le trypanosome possède un manteau antigénique composé de différentes glycoprotéines appelées VSG jouant un rôle dans la variation antigénique. Ce manteau antigénique, qui protège le parasite des défenses spécifiques et non spécifiques de l'hôte, recouvre plus de 90% de la surface du parasite rendant inefficaces les tentatives d'élimination par les anticorps (Vickerman, 1985). En effet, ce manteau change régulièrement ses VSG. Dix pourcent du génome parasitaire est utilisé pour l'encodage d'approximativement 1 000 formes de VSG différentes. Ces variations de VSG provoquent l'exposition d'un nouvel antigène à la surface du parasite, or, les anticorps de l'hôte produits sont eux dirigés contre les anciens antigènes,

BY-NC-ND

ce qui permet aux « nouveaux » parasites de se multiplier plus rapidement en échappant au système immunitaire de l'hôte (Manna et al., 2013). Ce phénomène ainsi répété, facilite la survie du parasite dans l'organisme. Toutefois, la réponse immunitaire humorale va avoir une action sur l'élimination des trypanosomes qui n'auront pas changé leurs VSG (figure 17).

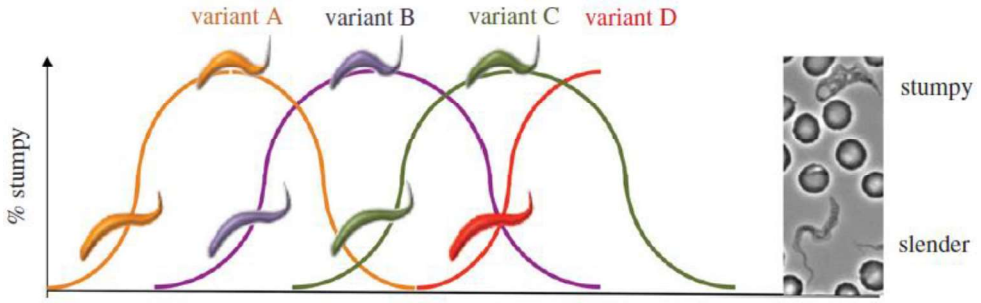


Figure 17. Représentation de la variation de l'infection par les trypanosomes (Matthews et al., 2015)

Les trypanosomes possèdent au sein de leur cytosquelette flagellaire une protéine appelée trypanine (Trypanosome Lymphocyte-Triggering Factor, TLTF), jouant un rôle dans la mobilité cellulaire (Hutchings et al., 2002). La trypanine, une fois libérée au sein de l'organisme de l'hôte, a la capacité d'interagir avec les cellules de l'immunité et d'induire une stimulation des lymphocytes T CD8+ sécrétant de l'IFNγ. Ce dernier favorable aux parasites et à leur développement a donc un impact sur la parasitémie (Vaidya et al., 1997).

En l'absence d'une prise en charge adaptée du patient au stade hémolymphatique, les trypanosomes continuent leur multiplication et sont capables d'envahir le système nerveux central par passage au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Ce franchissement marque l'entrée en stade nerveux de la maladie.

I.2.4.2.2. Stade nerveux ou stade 2

I.2.4.2.2.1. La clinique de la THA au stade 2

Au niveau du système nerveux, les trypanosomes induisent une neuro-inflammation marquée dont les symptômes sont essentiellement d'ordre neurologique comme des céphalées, des tremblements, des paresthésies, des troubles de l'équilibre et d'ordre psychiatrique comme une irritabilité, une agressivité et des psychoses plus ou moins importantes (Blum et al., 2001). Ces troubles qui augmentent au cours de la maladie peuvent provoquer un isolement du patient.

BY-NC-ND

L'inversion du nycthémère, signe marquant de cette pathologie, provoque un fractionnement de la période de sommeil du malade sur la journée mais sans altérer sa durée totale, du moins en début de stade 2 (Buguet et al., 2001). Le malade va présenter des phases d'endormissement plus ou moins profondes qui vont se succéder au cours de la journée. Le malade présente une dérégulation importante des phases de sommeil évoluant vers une phase de coma, où en l'absence de traitement la mort est inéluctable (Blum et al., 2001). Parallèlement, cette perturbation du rythme circadien est accompagnée d'une disparition de la sécrétion circadienne de prolactine, de rénine, d'hormones de croissance et de cortisol. Seul le cycle de la mélatonine est encore conservé (Lundkvist et al., 2004).

Des troubles métaboliques de type endocrinien, thyroïdien notamment, font leur apparition et impactent sur la santé des patients.

I.2.4.2.2.2. L'immuno-physiopathologie de la THA au stade 2

Franchissement de la BHE

Les trypanosomes pour atteindre le LCR doivent traverser la BHE, or cette dernière dans des conditions physiologiques normales, est imperméable et sélective. En effet, la BHE est une barrière protégeant le SNC des variations de pH, des neuromédiateurs, des agents infectieux et peut être un élément limitant le passage de certains médicaments. Cette BHE est composée de cellules endothéliales liées entre elles par des jonctions serrées formant la paroi des capillaires cérébraux. Les cellules endothéliales reposent sur une membrane basale et sont entourées de pieds astrocytaires formant un bouclier. Des péricytes complètent cette architecture et permettent de rendre plus sélectif et restrictif le passage au travers de la BHE (Cecchelli, 2001). La capacité des trypanosomes à traverser la BHE n'est pas totalement élucidée, mais des études ont montré différentes hypothèses. L'une d'entre elles serait la présence de protéases capables de favoriser le franchissement de la BHE, comme la brucipaïne, protéase sécrétée par le parasite, qui joue un rôle sur les flux calciques au niveau des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (Nikolskaia et al., 2006; Bonnet et al., 2017). Mais il existerait d'autres mécanismes, comme la production de protéines à la surface du trypanosome, capables d'induire l'apoptose des cellules endothéliales cérébrales pour favoriser le passage du parasite (Nikolskaia et al., 2006; Grab et al., 2009).

L'altération de la BHE provoque l'infiltration de cellules inflammatoires par extravasation au niveau des veinules post capillaires (Owens et al., 2008). Ces veinules sont entourées de 2 membranes basales, l'une endothéliale et l'autre parenchymateuse formée d'astrocytes

BY-NC-ND

constituant la *glia limitans*. Entre ces 2 membranes se trouve l'espace périvasculaire. Les leucocytes vont avoir la faculté de traverser ces membranes. Des études ont ainsi montré que les trypanosomes pouvaient utiliser les mêmes mécanismes de pénétration que celui des lymphocytes. Les parasites pourraient aussi profiter de l'altération des membranes créée par le passage des lymphocytes (Masocha et al., 2007). Au niveau de la *glia limitans*, les pieds astrocytaires sont pourvus d'une protéine, la dystroglycane-β, qui peut être clivée par des protéases appelées MMP-2 et MMP-9 (Matrix MetalloProtease) qui sont activées lors d'une inflammation (Agrawal et al., 2006). Ce clivage va alors créer un accès localisé permettant le passage des leucocytes et donc des trypanosomes.

De plus, l'IFNγ pourrait à son tour jouer un rôle prépondérant dans la pénétration des trypanosomes au travers de la membrane parenchymateuse, par l'induction de chimiokines, ou en favorisant les propriétés chimiotaxiques des leucocytes. En effet, une étude menée sur un modèle murin a montré que des souris déficientes en IFNγ ou en son récepteur, pouvaient réduire la pénétration des trypanosomes au niveau cérébral et cela par rapport à des souris de type sauvage (Masocha et al., 2004).

Les trypanosomes sont capables de passer au niveau du SNC en choisissant des zones dépourvues de BHE, comme les organes circumventriculaires (OCVs) (hypothalamus, hypophyse, glande pinéale) qui sont composés de capillaires fenestrés permettant une plus grande ouverture et donc un meilleur passage au niveau du cerveau.

Pour l'heure, il n'existe aucune certitude concernant le franchissement de la BHE par les parasites. Soit le trypanosome est capable de franchir les jonctions serrées en suivant les leucocytes ou en sécrétant des protéines, soit il serait potentiellement capable de passer au niveau transcellulaire. Or cette dernière idée remet en question le fait d'avoir un parasite exclusivement extracellulaire. Nikolskaia en 2006, a notamment étudié la capacité qu'ont les trypanosomes à envahir des cellules endothéliales (Nikolskaia et al., 2006), et cela a été à nouveau réalisé au sein de notre laboratoire avec des cellules microgliales humaines (lignée CMH5). La conclusion est que les parasites ont bien la faculté d'envahir des cellules humaines, ce qui permettrait de répondre à certaines interrogations concernant la perméabilité de la BHE et ouvrirait donc de nouvelles voies de recherche (Bonnet et al., 2017).

Au niveau du SNC

A la suite du franchissement de la BHE, les trypanosomes se retrouvent au niveau du SNC et vont être capables de se disséminer dans les différents tissus cérébraux. Cette atteinte va entrainer des altérations des fonctions vitales cérébrales provoquant ainsi les symptômes

BY-NC-ND

connus dits du « stade nerveux ». Ainsi, les premiers troubles perçus, comme les nausées et vomissements, sont dus à l'altération de l'*area prostrema* qui contrôle les réflexes émétiques. Plus tardivement, les signes de somnolence ou la fragmentation du sommeil sont dus à une dérégulation de la mélatonine, appelée hormone du sommeil, produite au niveau de la glande pinéale qui fait partie des OCVs et est donc un lieu propice aux trypanosomes (Mogk et al., 2017). Ces derniers sont également capables de sécréter de la prostaglandine D2 (PGD2), prostanoïde qui lorsqu'il est produit va interagir avec son récepteur DP1 pour l'activer et ainsi réguler le sommeil. De ce fait, l'augmentation des quantités de PGD2 va induire le sommeil, et va donc avoir un impact sur la régulation du cycle nycthéméral (Figarella et al., 2005; Urade and Hayaishi, 2011). Les signes psychiatriques également retrouvés au cours du stade 2 tels les changements de personnalité, les hallucinations ou encore les états paranoïaques sont le résultat de l'encéphalite. Par la suite et sans traitement, le patient va sombrer dans le coma (MacLean et al., 2012).

Ces effets indésirables sont la résultante de variations de certaines hormones comme le cortisol, la prolactine ou encore la mélatonine. Concernant le place des cytokines dans l'atteinte nerveuse, Kristensson et *al*., ont montré le rôle prépondérant du TNFα et de l'IFNγ, cytokines pro-inflammatoires, qui vont être capables d'induire la production d'oxyde nitrique NO, qui va alors favoriser la multiplication de *T. brucei* mais également la survenue des troubles nerveux précédemment cités (Kristensson et al., 2010). Les chimiokines, cytokines chimioattractantes, libérées lors d'une infection, participent au recrutement de différentes populations de leucocytes par l'intermédiaire de leurs récepteurs. Lors de la THA, certaines comme la CXCL10, exprimée en réponse à la production d'IFNγ au niveau des astrocytes périvasculaires, vont faciliter le franchissement de la BHE à la fois pour les lymphocytes T mais également pour les trypanosomes (Amin et al., 2009; Kristensson et al., 2010; Mogk et al., 2016; Bonnet et al., 2018).

I.2.4.3. Diagnostic de la THA

Le diagnostic précoce de la THA permet de prévenir le franchissement de la BHE par le parasite et ainsi limiter le développement du stade nerveux. Cela repose sur des examens de laboratoire devant être facilement réalisables sur le terrain, le moins contraignant possible pour les populations comme pour les équipes médicales. De plus, les outils utilisés doivent être suffisamment sensibles, rapides, et peu couteux. Actuellement, les équipes de recherche se basent sur un arbre décisionnel conduisant en une prise en charge thérapeutique du patient (figure 18). Classiquement il débute par une recherche des signes cliniques. Les symptômes

BY-NC-ND

du stade 1 peu spécifiques de la THA, rendent difficile le diagnostic en tant que tel. Des outils indirects permettent dans un premier temps de diagnostiquer la maladie. Ils peuvent être confirmés par des examens directs ou par des techniques de biologie moléculaire. Puis lorsque la maladie est confirmée, des examens de stade de la maladie sont nécessaires pour adapter le traitement.

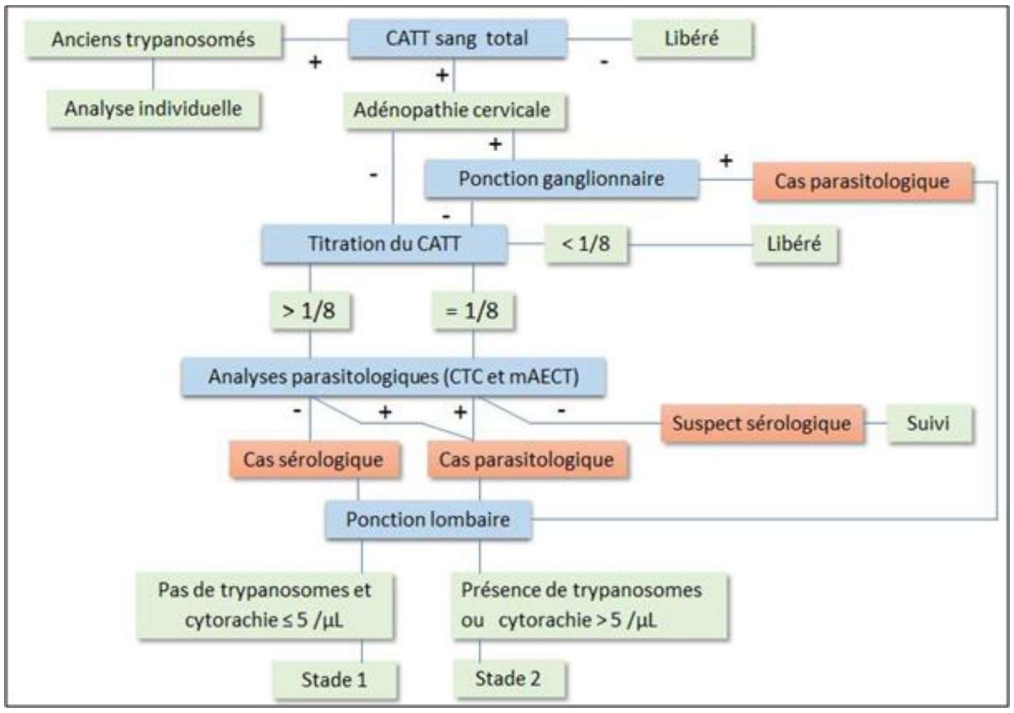


Figure 18. Arbre décisionnel de la THA
(Simarro et al., 2003)

I.2.4.3.1. Diagnostic de la maladie

A la suite du dépistage actif d'une population, chaque individu interrogé, est examiné pour vérifier la présence de signes cliniques comme des adénopathies cervicales. Le premier examen réalisé, est appelé CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis) (Zillmann and Albiez, 1986) et se base sur la recherches d'anticorps (Ac) dirigés contre le trypanosome. Ce test, rapide, simple, sensible et peu couteux permet de détecter des Ac de l'hôte produit en réponse à l'infection à *T.b.g*. Ces Ac utilisés sont essentiellement dirigés contre des VSGs, dont certaines parties antigéniques sont capables de changer pour se différencier plusieurs fois pour obtenir différents variants antigéniques (VAT). Le CATT utilise du sang total de l'individu auquel on mélange un réactif contenant l'antigène. Si l'individu a été en contact avec des trypanosomes, une agglutination se forme, visible à l'œil nu, traduisant un test positif. Sensible à 91% et spécifique à 97%, le CATT est considéré comme le mieux adapté et le plus efficace sur le terrain au contact des populations (Jamonneau et al., 2000; Penchenier et al., 2003; Chappuis et al., 2005). Toutefois ce test ne peut s'appliquer aux infections à *T.b.r.*

BY-NC-ND

D'autres tests comme le test d'immuno-trypanolyse, le test d'immunofluorescence indirect ou encore le test immuno-enzymatique peuvent être utilisés pour détecter la maladie, sous réserve d'avoir le matériel adéquat sur le terrain ce qui est très souvent compliqué.

La confirmation d'une infection à THA repose sur la mise en évidence du parasite. Pour cela, un prélèvement de sang voire de suc ganglionnaire lors de la présence d'adénopathies est réalisé. L'examen du prélèvement ne doit pas excéder une heure au risque de lyser les trypanosomes et de perdre le résultat. Sur le terrain, le prélèvement est directement analysé entre lame et lamelle afin de mettre en évidence le parasite. Dans des conditions de laboratoire, d'autres tests peuvent être réalisés comme une coloration de la lame et une observation au microscope. Le trypanosome se colore en bleu avec son noyau et son kinétoplaste en rouge (Laveissière and Penchenier, 2017). Cependant cette technique possède une sensibilité relativement basse du fait d'une charge parasitaire parfois trop faible. Pour remédier à cela, une technique de concentration par centrifugation en tube capillaire peut être envisagé afin de concentrer les trypanosomes avec les leucocytes pour une meilleure détection (Lutumba et al., 2006). Il existe d'autres techniques de concentration comme la mini-colonne échangeuse d'anions (mAECT) ou encore la technique de la couche leuco-parasitaire (QBC) qui sont malheureusement trop couteuses et trop contraignantes sur le terrain. Des techniques d'amplification d'ADN ou d'ARN peuvent parfois être envisagées mais tout comme les techniques précédentes, elles sont couteuses et nécessitent une logistique trop complexe pour être menées sur le terrain.

I.2.4.3.2. Diagnostic de stade

Dès lors que l'infection à THA est confirmée, il est obligatoire de déterminer le stade de l'infection afin d'adapter le traitement et permettre à l'individu la meilleure prise en charge possible. Pour cela, la ponction lombaire reste aujourd'hui le seul acte médical possible. En effet cette technique va permettre de prélever du LCR qui sera analysé pour mettre en évidence des cellules ou directement des trypanosomes (figure 19). Toutefois, cet acte délicat, invasif et douloureux est réalisé dans des conditions autres que celles des pays industrialisés.

BY-NC-ND

Figure 19. Ponction lombaire
(www.congoactuel.com)

L'OMS stipule qu'un individu est en stade nerveux dès lors qu'au moins un trypanosome est retrouvé dans son LCR, ou qu'il présente une cytorachie supérieure à 5 cellules/µL de LCR (WHO, 2013). Cette dernière donnée est variable et sujet à controverse dans certains pays qui choisissent eux-mêmes la valeur limite (Lejon and Büscher, 2005; Kennedy, 2010).

Une technique de dosage de protéines totales dans le LCR était utilisée et recommandée par l'OMS. En effet, une augmentation de la protéinorachie marque un dysfonctionnement au niveau cérébral avec une perméabilisation de la BHE. L'OMS établit qu'un patient est en stade nerveux lorsqu'il présente une protéinorachie supérieure à 370 mg/L de LCR. Or des études ont montré que cette valeur pouvait être extrêmement variable en fonction des individus infectés (Bisser et al., 2002). De plus étant trop complexe à réaliser, cette technique n'est actuellement plus utilisée sur le terrain.

Depuis quelques années, de nouvelles techniques de diagnostic de la maladie ou de stade sont en cours d'études pour répondre aux besoins des populations et améliorer la sensibilité et la spécificité de détection des trypanosomes. Pour cela on peut citer, le LAMP (Loop-mediated isothermal amplification), qui permet donc de s'affranchir des cycles de chaleur pour amplifier l'ADN parasitaire, ou encore la recherche de biomarqueurs de stade comme la néoptérine ou la chimiokine CXCL13, protéines ayant des rôles dans la signalisation de la réponse immunitaire (Bonnet et al., 2015).

I.2.4.4. Thérapeutique humaine

I.2.4.4.1. Les médicaments actuels

Cinq molécules sont employées pour lutter contre la THA (tableau 2). Elles sont "stades et espèces dépendants". La pentamidine et la suramine vont servir à traiter le stade 1 de la maladie à *T.b.g.* et *T.b.r.* respectivement, alors que l'éflornithine ou le NECT (nifurtimox

BY-NC-ND

eflornithine combinaison therapy) et le mélarsoprol vont servir au traitement du stade 2 pour *T.b.g.* et *T.b.r* respectivement. Ces molécules, développées depuis presque 100 ans pour la plus ancienne, sont actuellement fournies par l'OMS *via* un partenariat public-privé avec les industries pharmaceutiques permettant une mise à disposition à moindre coût pour les populations (WHO, 2013).

BY-NC-ND

	Stade 1		Stade 2		
Produit	**Pentamidine**	**Suramine**	**Mélarsoprol**	**Eflornithine**	**Eflornithine / Nifurtimox**
Dénomination commerciale	Pentacarinat®, Lomidine®*, Pentam®, Nepubent®	Germanin®, 205 Bayer® Fourneau 309®, Moranyl®	Mel B®, Arsorbal®	Ornidyl®	NECT
Souche	*T. b. gambiense*	*T. b. rhodesiense*	*T. b. gambiense/ T. b. rhodesiense*	*T. b. gambiense*	*T. b. gambiense*
Posologie	4 mg/kg/jour pendant 7 jours IM	100-200 mg 1er jour, puis 1g max par jour pendant 7 jours IV	2,2 mg/kg/jour pendant 10 jours IV	100 mg/kg/6heures pendant 14 jours IV	200 mg/kg/12heures pendant 7 jours (eflornithine) IV +5 mg/kg/3xjour pendant 10 jours (nifurtimox) PO
Mécanismes d'action	Inhibition de la S-adénosylmethionine décarboxylase	Inhibition des enzymes de la glycolyse	Inhibition trypanothione reductase et pyruvate kinase	Inhibition de l'ornithine décarboxylase	Libération de radicaux oxygénés et inhibition de la croissance parasitaire par stress oxydatif
Effets indésirables	Hypotension, diarrhées, nausées, vomissements, douleurs au site d'injection, leucopénie	Eruption cutanées, prurit, vomissements, hématurie, neuropathie périphérique, néphrotoxicité, fièvre	Encéphalopathie arsenicale, neuropathie, paresthésie, réactions cutanées	Diarrhées, nausées, vomissements, leucopénie, anémie	Idem éflornithine + anorexie, douleurs abdominales, hépatite

*Plus commercialisé ; IM : Intra-musculaire ; IV : Intra-veineuse ; PO : Prise orale

Tableau 2. Les traitements utilisés contre la THA avant 2018

BY-NC-ND

I.2.4.4.1.1. Traitement stade hémolymphatique

La prise au charge au stade 1 de la maladie est fondamentale pour éviter l'entrée en stade 2 et donc les effets indésirables imputables à la fois aux parasites mais aussi aux traitements plus lourds. Deux molécules ont été développées afin de lutter contre les trypanosomes.

❖ **La pentamidine**

Diamine aromatique, découverte dans les années 30 par les laboratoires Rhône-Poulenc, la pentamidine a été utilisée dès 1935 comme agent antiprotozoaire notamment contre *L. donovani* ou *T. brucei* (figure 20). On lui connait également une action contre *Pneumocystis jirovecii*, pour lequel elle est utilisée en seconde intention lors d'intolérance ou de contre-indication au sulfaméthoxazole-triméthoprime (Damper and Patton, 1976).

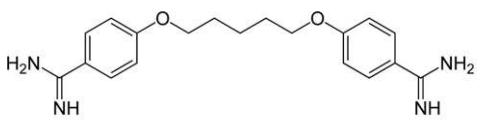


Figure 20. Structure moléculaire de la pentamidine

Actuellement commercialisée sous forme de sel de Diisethionate (Pentacarinat®, Nepubent®, Pentam®), elle fut à l'époque coloniale, commercialisée sous forme de sel de dimesylate (Lomidine®), mais des mauvais usages provoquant la mort de nombreuses personnes, ont conduit à un immense scandale sanitaire, obligeant l'arrêt de sa commercialisation sous cette forme (Lachenal, 2014). Très soluble dans l'eau, elle est instable en solution et est mal absorbée au niveau intestinal ce qui limite sa prise orale. Elle est de ce fait administrée par voie parentérale. Sa grande hydrophilie lui empêche de passer correctement la BHE. La pentamidine est également le substrat de certaines protéines d'efflux (comme la P-gp) en raison de sa nature cationique, ce qui bloque son passage au niveau du SNC (Fairlamb, 2003; Sanderson et al., 2009).

Le mode d'action de cette molécule n'est pas entièrement élucidé. Il semblerait que son action repose sur l'inhibition de la synthèse d'ADN par liaison aux acides nucléiques (Kappagoda et al., 2011), ou sur sa fixation à de l'ARN de transfert (tARN) du parasite, limitant ainsi les phénomènes de transcription et de traduction (Sun and Zhang, 2008). Il est également possible que son action soit due à une interférence avec la transformation des folates. Cette liaison à l'ADN se retrouve également au niveau du kinétoplaste. La pentamidine peut également réduire le potentiel de membrane mitochondriale et inhiber sélectivement la pompe calcique ATPase (Benaim et al., 1993). Des études menées chez *Leishmania* ont montré une

BY-NC-ND

accumulation de la pentamidine au niveau mitochondrial avec des dommages conséquents (Croft and Brazil, 1982; Barrett et al., 2007). Plusieurs hypothèses ont été émises à la suite de ces travaux sans trouver de réelles confirmations.

Mais pour pouvoir agir, la pentamidine a besoin d'être absorber par le parasite, et une des premières portes d'entrée découverte par Carter et *al.*, a été le transporteur d'amino-purines de type 2 appelé P2 capable de transporter l'adénine et l'adénosine (Carter and Fairlamb, 1993; Carter et al., 1995). La pentamidine est alors capable d'être assimilée par le transporteur P2. En 1999, Mäser découvre la présence d'un gène TbAT1 exprimé chez la levure et présentant une activité similaire à celle du transporteur P2 semblant expliquer qu'il s'agit du gène codant pour ce transporteur (Mäser et al., 1999). Pour confirmer cela, Matovu en 2003 initie une étude *in vitro* avec une souche de trypanosomes n'exprimant plus le gène TbAT1. Les résultats indiquent alors que les parasites ne sont plus capables, une fois dénués de ce gène, de transporter certains nucléosides tout comme la pentamidine. Il y a donc absence de transporteur P2. Cette découverte indique que la perte de ce gène et donc du transporteur P2 est liée aux phénomènes de résistance pouvant être rencontrés avec des diamidines et des dérivés arsenicaux (Matovu et al., 2003). En effet, le transporteur P2 est également impliqué dans le transport de dérivés arsenicaux, ce qui implique les phénomènes de résistances croisées pouvant être rencontrés avec ces 2 classes de molécules appelés MPXP pour « Melarsoprol/pentamidine cross-resistance ». Toutefois, la pentamidine à l'inverse d'autres diamidines (diminazène notamment) est capable de se retrouver à plus grande concentration au sein des parasites, présentant une plus faible résistance. Il a donc été émis l'hypothèse que la pentamidine possédait plusieurs voies d'accès, et que ces dernières présentaient des affinités différentes pour les diamidines expliquant ainsi les difficultés des cas de résistances à la pentamidine (Bray et al., 2003; Matovu et al., 2003). Au sein des trypanosomes, un premier transporteur appelé ASPT1 pour « adénosine-sensitive pentamidine transporter 1 », présent uniquement chez les formes circulantes de trypanosomes, s'est révélé être identique au transporteur P2 (De Koning et al., 2000). En 2001, De Koning et *al*., met en évidence deux nouveaux transporteurs impliqués dans le transport de la pentamidine, appelés HAPT1 et LAPT1 pour « High-affinity pentamidine transporter 1 » et « Low-affinity pentamidine transporter 1 » respectivement (De Koning, 2001a; De Koning, 2001b). HAPT1 est impliqué également dans le transport des dérivés arsenicaux. La présence de ces transporteurs explique donc le fait que la pentamidine est moins sujette aux résistances par rapport à d'autres diamidines ou aux dérivés arsenicaux substrats uniquement du transporteur P2. Au regard de ces résultats, il est évident que pour présenter un taux élevé de résistance à la pentamidine, il est nécessaire de « perdre » à la fois le transporteur P2 mais

BY-NC-ND

aussi le transporteur HAPT1, et dans une moindre mesure LAPT1 (Barrett et al., 2011). Les gènes codant pour ces transporteurs restent encore de nos jours inconnus.

Pour assurer leur survie, les trypanosomes ont besoin d'une production d'énergie issue de la glycolyse, du métabolisme du glucose voire du glycérol. Cette production s'effectue au niveau du glycosome, avec des échanges au niveau des membranes. Ces échanges ne peuvent se faire qu'au niveau de protéines de transports et plus spécifiquement la famille des aquaporines. *Trypanosoma brucei*, notamment, code pour 3 aquaglycéroporines TbAQP1, TbAQP2, et TbAQP3 capables de transporter l'eau, le glycérol, l'urée ou encore l'ammoniac ou des dérivés de l'acétone (Uzcategui et al., 2004). Ces aquaglycéroporines ont des localisations différentes pour des actions variées. TbAQP1 se situe au niveau de la membrane du flagelle pour assurer l'osmotaxie, TbAQP3 se situe au niveau de la membrane plasmique afin d'assurer le bon fonctionnement de la cellule. Pour TbAQP2 sa localisation semble plus floue. En 2009, Field et *al.*, qui étudie la poche flagellaire des trypanosomes désigne cette dernière comme le lieu de localisation de TbAQP2, où en effet, il y a une grande activité de renouvellement membranaire indispensable au parasite pour assurer sa survie (Field and Carrington, 2009). Mais Bassarak et *al*., suggère une présence au niveau des membranes intracellulaires (Bassarak et al., 2011). Toutefois Baker et *al*., en 2012 confirme l'hypothèse de Field, qui montre que la présence de TbAQP2 au niveau de la poche flagellaire des formes circulantes, joue un rôle dans les MPXR. En effet, lorsque TbAQP2 semble défectueux, des cas de résistances innées ou acquises apparaissent autant pour la pentamidine que pour le mélarsoprol, ceci explique donc bien le fait que TbAQP2 est un des transporteurs essentiels de la pentamidine au sein du trypanosome (Baker et al., 2012). En 2014, Munday et al, confirme ces résultats en spécifiant que la perte seule de TbAQP2 suffit pour avoir une forte résistance à l'encontre de la pentamidine (Munday et al., 2014). De plus, il est clairement établi que la perte simultanée de TbAQP2 et TbAT1 augmentent les risques de résistances croisées MPXR.

❖ La suramine

Synthétisée pour la première fois en 1916 chez IG Farben, elle ne sera publiée qu'en 1924 par l'institut Pasteur. La suramine appartient à la famille des naphtylamines sulfonylées polyanioniques (figure 21).

Molécule de poids moléculaire très élevé et de haute polarité, la suramine est incapable de franchir les membranes biologiques et notamment la BHE, et est donc utilisée comme médicament de première intention dans le traitement de la THA au stade hémolymphatique à

BY-NC-ND

T.b.r. Malgré des effets indésirables non négligeables, elle fait partie de la liste des médicaments essentiels définie par l'OMS (WHO, 2013). Autrefois utilisée en Afrique de l'Ouest contre *T.b.g.* elle est délaissée au profit de la pentamidine. En effet, la suramine est capable d'agir sur *Onchocerca volvulus*, parasite responsable de l'Onchocercose. Cette action entraine une forte libération d'Ag pouvant être à l'origine d'une réaction allergique impressionnante de type anaphylactique (Brun et al., 2010).

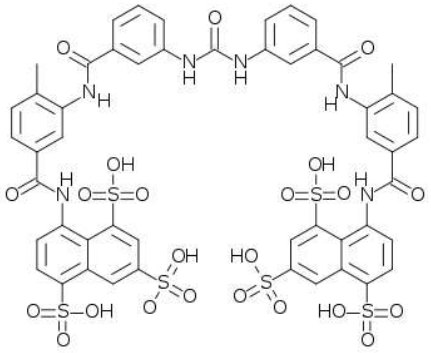


Figure 21. Structure moléculaire de la suramine.

Elle est administrée sous forme injectable dans une solution aqueuse et de manière extemporanée car instable.

Bien que le mécanisme d'entrée de la suramine reste encore controversé, il avait été émis l'hypothèse que cette molécule chargée négativement soit prise en charge par un mécanisme d'endocytose à médiation par liaison à des protéines comme des lipoprotéines LDL (Fairlamb and Bowman, 1977; Vansterkenburg et al., 1993; Nok, 2003). Toutefois en 2011, cette hypothèse a été remise en question, et il semblerait que la suramine puisse toujours pénétrer par un mécanisme d'endocytose mais plutôt par le biais de récepteurs non identifiés (Morgan et al., 2011). Une fois à l'intérieur du parasite, la suramine va s'accumuler préférentiellement dans des compartiments acides et va agir comme inhibiteur des enzymes de la glycolyse et notamment de la pyruvate kinase. La suramine ne tue pas les trypanosomes immédiatement, elle va avoir une action plus lente et cela, par interaction avec les enzymes de la glycolyse au niveau du cytoplasme (phosphoglycerate mutase, enolase, pyruvate kinase) et non directement au niveau du glycosome (Sekhar et al., 2014). Elle est également capable d'inhiber la production d'ATP par interaction à la fois avec l'oxydase du glycérol-3-phosphate

BY-NC-ND

et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase NAD+ dépendant, entrainant ainsi la mort du trypanosome (Fairlamb and Bowman, 1980).

Parallèlement, la suramine est étudiée pour son action inhibitrice dans la lutte de divers cancers, ou encore vis-à-vis de la reverse transcriptase du VIH (Take et al., 1989; Barrett and Barrett, 2000).

I.2.4.4.1.2. Traitement stade nerveux

En raison de leur trop faible lipophilie, de leur haut poids moléculaire ou encore de leur incapacité à se lier à des protéines, la pentamidine et la suramine sont incapables de franchir la BHE pour traiter le stade nerveux. Pour ce stade, des molécules ont spécifiquement été développées.

Tout comme pour le stade 1, les molécules du stade 2 sont espèces-dépendantes, et nécessitent une hospitalisation plus ou moins longue.

- **L'éflornithine**

Connue sous le nom de DFMO (pour α-difluoromethylornithine), l'éflornithine est une molécule relativement récente apparue en 1981, développée comme anti-cancéreux, mais qui a présenté un intérêt pour traiter le stade nerveux à *T.b.g* (figure 22).

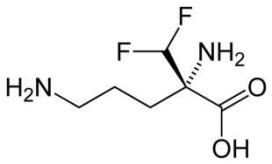


Figure 22. Structure moléculaire de l'éflornithine.

Poudre blanche, soluble dans l'eau, elle est préparée pour être administrée aux patients sous forme injectable. Très chère, d'administration compliquée, elle reste toutefois le traitement de première intention pour *T.b.g*.

En 1978, Metcalf et *al.*, ont étudié cette molécule et ont montré qu'elle était capable d'agir comme inhibiteur d'une enzyme, l'ornithine décarboxylase (ODC). Cette enzyme est retrouvée chez les cellules des mammifères notamment, mais également chez *T. brucei* ou encore *Saccharomyces cerevisiae.* Elle joue un rôle dans la production de putrescine, précurseur de polyamine comme la spermidine (Metcalf et al., 1978; Bacchi et al., 1990). Ces polyamines sont essentielles à la croissance cellulaire par une action sur la synthèse des acides nucléiques et par leur contribution à la régulation de la synthèse protéique. De ce fait, toute

BY-NC-ND

inhibition va alors entrainer un arrêt de la division cellulaire par diminution de la synthèse de polyamines pour conduire à la mort de la cellule par effet cytostatique. La présence de cette ODC à la fois chez les cellules des mammifères et des trypanosomes pourraient rendre difficile l'action de l'eflornithine à l'encontre des trypanosomes exclusivement. Toutefois, Phillips et *al*., en 1987, ont montré que malgré une forte ressemblance de près de 64% (entre 61,5-63,6%) entre l'ODC de *Trypanosoma brucei* et l'ODC de souris, celle des rongeurs possède au niveau C-terminale une région appelée PEST (Proline, Acide glutamique (E), Sérine et Thréonine) impliquée dans le turnover intracellulaire des ODC. A l'inverse l'ODC du parasite étant dénuée de cette région, le turnover ne s'effectue pas aussi rapidement provoquant alors la mort du parasite (Phillips et al., 1987, 1988).

Le DMFO, est donc capable d'interagir de manière sélective et irréversible avec l'ODC, entrainant la mort du parasite et non de l'hôte par renouvellement de l'ODC de ce dernier. De plus, cette même inhibition va entrainer une diminution de la synthèse de macromolécules retrouvées au niveau des glycoprotéines de surface (VSG). L'absence de renouvellement du manteau protéique permet donc au système immunitaire de cibler et détruire les trypanosomes de manière efficace sans risque que ce dernier ne lui échappe (Bitonti et al., 1986c; Laveissière and Penchenier, 2017). Toutefois, l'éflornithine n'est pas active sur *T.b.r.* car ce dernier possède un important turn-over pour l'ornithine décarboxylase, ainsi l'enzyme se régénère beaucoup plus vite suite à l'inhibition et cela en comparaison avec *T.b.g.* (Iten et al., 1997).

Bien que le mécanisme d'action ne soit pas totalement élucidé, en 2010 Vincent et *al*., ont montré qu'il existait un gène transporteur d'acides aminés chez *T.b.b.* nommé TbAAT6, capable de transporter l'éflornithine à l'intérieur du parasite, et que l'absence de ce gène signait des cas de résistances (Vincent et al., 2010). Cette découverte a remis en question la diffusion passive que l'on attribuait à l'éflornithine (Bitonti et al., 1986a). En effet, étant un analogue d'acides aminés, elle est capable d'être reconnue par un transporteur et ainsi agir au sein du parasite. Ce dernier a été identifié comme étant un transporteur faiblement sélectif et à faible affinité pour les acides aminés neutres (Mathieu et al., 2014).

❖ Le nifurtimox

Dérivé du 5-nitrofurane, le nifurtimox fut développé dans les années 60 pour traiter la Trypanosomose Américaine ou maladie de Chagas (figure 23). Cette molécule fut par la suite proposée en association avec l'éflornithine dans le traitement de la THA (Priotto et al., 2009). Cette association appelée NECT (Nifurtimox-Eflornithine Combinaison Therapy) est exclusivement réservée pour lutter contre *T.b.g*. La mise en place de cette association a

BY-NC-ND

permis de réduire de moitié la durée de traitement de l'éflornithine ainsi que sa posologie. Quant au nifurtimox, sa prise *Per Os* facilite l'observance du traitement par les patients. En 2013, l'OMS préconise le NECT en première intention, l'éflornithine n'étant utilisée seule que lors de contre-indications (patients épileptiques), ou d'intolérance au nifurtimox (WHO, 2013).

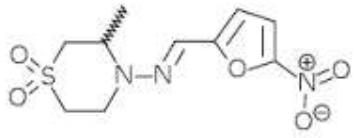


Figure 23. Structure du nifurtimox

Molécule comportant un groupement -NO_2, son mécanisme d'action repose sur son interaction avec la NTR1 retrouvée au niveau des trypanosomes. Bien que mal compris, il a été constaté que le nifurtimox provoquait un stress oxydatif au niveau des cellules cibles (Hall et al., 2011). En effet, la NTR1 va catalyser la réduction du nifurtimox au niveau du groupement NO_2, en passant par l'intermédiaire hydroxylamine. Ce dernier peut être transformé pour générer des intermédiaires cytotoxiques soit par formation d'un cation de nitrénium entrainant la cassure de l'ADN, soit par production d'adduits de réticulation de l'ADN, soit encore par le clivage du noyau aromatique du nifurtimox conduisant à un composé nitrile à chaînes ouvertes actifs à l'encontre des trypanosomes. Cette réduction va entrainer la libération de radicaux libres oxygénés, aboutissant à la cassure de l'ADN, et donc à une inhibition de la croissance parasitaire (Wilkinson et al., 2011; Patterson and Wyllie, 2014). Le nifurtimox est alors considéré comme génotoxique.

❖ Le mélarsoprol

Cette molécule utilisée pour la première fois en 1949 est un dérivé de l'arsenic associé à un chélateur de métaux lourds (2,3 dimercaptopropanol) (figure 24).

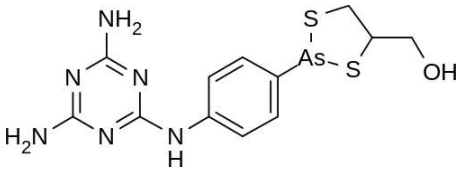


Figure 24. Structure moléculaire du mélarsoprol

Insoluble dans l'eau, le mélarsoprol a besoin d'être injecté par voie parentérale dans une solution de propylène glycol à 3,6% avec une seringue en verre (le composé interagit avec le

BY-NC-ND

plastique) et lentement du fait de la causticité du solvant pouvant détruire les tissus au niveau du site d'administration (Lutje et al., 2013).

Longtemps considéré comme l'unique traitement du stade nerveux à la fois pour une THA à *T.b.g.* ou *T.b.r.*, il présente de nombreux effets indésirables dont le plus grave, l'encéphalopathie arsenicale, pouvant être développée chez 5 à 10% des patients, est mortelle chez la moitié de ces derniers. La présence de ces effets indésirables et l'apparition des phénomènes de résistances ont obligé la recherche d'alternatives thérapeutiques notamment dans le cas d'une infection à *T.b.g.* (Pépin and Méda, 2001). Il reste néanmoins le traitement de première intention lors des infections à *T.b.r.*

Prodrogue, il est rapidement métabolisé pour donner des métabolites dont un métabolite actif, l'oxyde de mélarsen (Mel Ox). Ce dernier formé par diverses réactions enzymatiques, est rapidement éliminé du plasma, avec une demi-vie de 3,8 heures sous forme libre (Bronner et al., 1998; Keiser et al., 2000). Le mélarsoprol agit au niveau du SNC et est donc capable de franchir la BHE, mais n'est pourtant pas retrouvé dans le LCR lors de différents dosages (Bronner et al., 1998). Cela suggère donc en effet la transformation du mélarsoprol en des composés trypanocides. Toutefois, le mécanisme d'action n'est pas clair. Il semblerait que le mélarsoprol subisse des hydrolyses non-enzymatiques ou des N-oxydation, ou encore des conjugaisons (Bronner et al., 1998).

Pour franchir les barrières, le Mel Ox est pris en charge par des transporteurs identiques à ceux de la pentamidine. Il s'agit du transporteur TbAT1/P2, mais également de l'AQP2 et même de l'HAPT1. Une fois au sein du parasite, le Mel Ox va réagir avec la trypanothione (enzyme composée de résidus glutathion conjugués à un résidu de spermidine) en se liant irréversiblement pour former un composé appelé Mel T qui inhibe alors de façon compétitive la trypanothione réductase, entrainant la mort du trypanosome (Fairlamb et al., 1989; Cunningham et al., 1994). En effet, les parasites perdent de leur mobilité en l'absence d'apport énergétique, conduisant à leur mort (Fairlamb and Horn, 2018).

Il a été montré par des études conjointes à celles de la pentamidine, qu'une perte ou une défaillance de ces transporteurs P2 et AQP2 entrainait l'apparition de résistances appelées MPXR (De Koning et al., 2000; Baker et al., 2012).

Pour résumer les voies d'entrées des différentes molécules et donc ainsi comprendre et anticiper les résistances associées, voici un schéma récapitulatif (figure 25).

BY-NC-ND

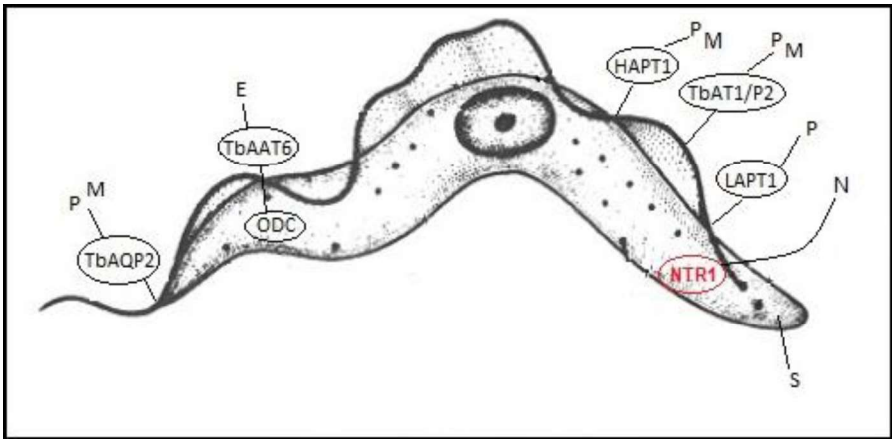


Figure 25. Voies et cibles thérapeutiques chez le trypanosome
(P : Pentamidine, M : Mélarsoprol, E : Eflornithine, N : Nifurtimox, S : Suramine)

L'ensemble de ces traitements, dont les limites d'utilisation non négligeables ont été exposées précédemment, oblige la recherche de nouvelles molécules sûres, efficaces, d'administration facilitée comme la voie *Per Os,* actives sur les deux stades et les deux sous-espèces, et pour réduire les coûts de traitement.

Depuis une dizaine d'années, l'OMS s'est donné comme objectif de répondre à cette problématique en recherchant de nouvelles molécules d'intérêt.

I.2.4.4.2. Dernières molécules testées et proposées

❖ Le fexinidazole

Dérivé nitroimidazolé (5-nitroimidazole), il est mis en évidence dans les années 80 par le DND*i* (Drugs for Neglected Diseases initiative), et est développé conjointement avec Sanofi-Aventis (Eperon et al., 2014) (figure 26). Molécule d'intérêt majeur pour son action sur les deux stades de la maladie, et par sa prise par voie orale, le fexinidazole a terminé en 2018 les essais cliniques de phase III en République Démocratique du Congo (RDC) pour lutter contre la THA à *T.b.g.* ("About Sleeping Sickness | DNDi,"; Torreele et al., 2010; Tweats et al., 2012; Tarral et al., 2014) mais est toujours en cours d'étude pour lutter contre *T.b.r.* Sa posologie est d'un comprimé par jour sur 10 jours de traitements.

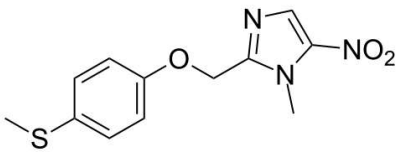


Figure 26. Structure du fexinidazole

BY-NC-ND

Bien que mal connu, son mécanisme d'action fait intervenir *à minima* les nitroréductases comme cela a été décrit avec pour le nifurtimox notamment.

Le fexinidazole est substrat de différentes enzymes hépatiques, tels que des cytochromes P450 (CYP450). Des études ont montré que sa rapide métabolisation permettait de donner deux métabolites le fexinidazole-sulfoxyde et le fexinidazole-sulfone, tous les 2 présentant une activité trypanocide supérieure ou égale à celle de la molécule mère (figure 27). Ces derniers présentent une moindre fixation aux protéines plasmatiques (20 % pour le sulfoxyde, et 42 % pour le sulfone) en comparaison avec la molécule mère liée à plus de 95 %, permettant une plus grande exposition au sein des fluides et tissus de l'organisme pour une meilleure efficacité (Torreele et al., 2010).

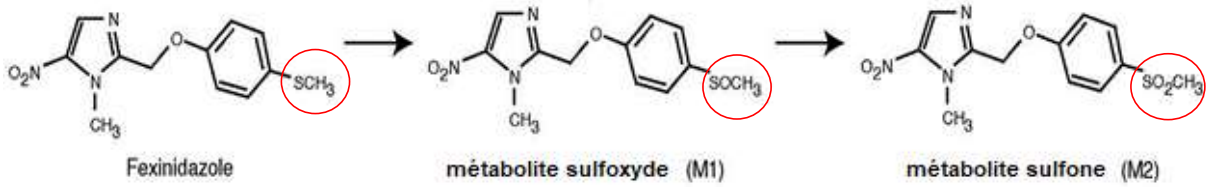


Figure 27. Structures chimiques du fexinidazole et de ses métabolites sulfoxyde et sulfone

Une très faible cytotoxicité a été retrouvée pour le fexinidazole ou ses métabolites lors des tests *in vitro*. Etant un nitroimidazolé, le fexinidazole répond positivement au test d'Ames. Des analyses avec des souches déficientes en cette enzyme ont montré la non-mutagénicité des composés fexinidazole et sulfone. Le fexinidazole et ses métabolites ont également subi un test des micronoyaux montrant une absence de génotoxicité (Tweats et al., 2012). *In vivo*, la NOAEL (No Observable Adverse Effect Level) a été fixée à 200 mg/kg sur le rat et le chien.

Les différentes études cliniques réalisées en RDC et en République Centrafricaine sur près de 750 patients ont permis de montrer l'efficacité du fexinidazole à une dose bien tolérée (entre 1 200 et 1 800 mg/jour) avec des effets indésirables tels que des vomissements, des céphalées d'intensité acceptable et spontanément résolutifs en le comparant au NECT dans les mêmes conditions (Tarral et al., 2014; Mesu et al., 2018). Le fexinidazole présente de meilleures propriétés (posologie, voie d'administration et tolérance) que le NECT. Ces caractéristiques permettent ainsi d'éliminer les hospitalisations et de réduire voire de supprimer la nécessité de la ponction lombaire pour déterminer le stade ("About Sleeping Sickness | DNDi,"; Chappuis, 2018).

Il est actif à la fois sur *T.b.g.* et *T.b.r.* lors des études *in vitro* et *in vivo*.

Des craintes ont été émises quant à la possible résistance croisée avec le nifurtimox. En effet, des études ont montré que des souches résistantes au fexinidazole, sont 10 fois plus

BY-NC-ND

résistantes au nifurtimox. La réciproque est vrai, à savoir, que des souches résistantes au nifurtimox sont également résistantes au fexinidazole (13 à 29 fois plus que des souches sauvages). Cela serait dû à la présence de la NTR et au phénomène de bioactivation des composés par cette NTR. En effet, les NTR jouent un rôle crucial dans l'activation des trypanosomes, et leur sous-expression est un des mécanismes possibles de résistances aux médicaments nitro. Il est donc fortement recommandé d'associé le fexinidazole avec d'autres composés pour essayer de limiter le développement des résistance (Sokolova et al., 2010; Wyllie et al., 2016).

En novembre 2018, le comité des médicaments à usage humain (appelé Agence européenne des médicaments (AEM)) a rendu un avis favorable concernant le fexinidazole permettant ainsi sa distribution aux populations dans les zones endémiques touchées par *T.b.g.*, ce qui est une grande avancée dans la lutte contre la maladie du sommeil ("About Sleeping Sickness | DNDi,"). Les essais cliniques pour lutter contre *T.b.r.* sont toujours en cours en Ouganda et au Malawi.

Initialement, le fexinidazole avait été développé pour traiter des infections aux kinétoplastidés et devait donc présenter une efficacité sur des souches de *T. cruzi* et de *Leishmania* spp. Pour *T. cruzi* l'efficacité *in vitro* puis *in vivo* a conduit à la mise en place d'essais cliniques. En effet, l'absence d'effets indésirables et son activité satisfaisante ont permis d'envisager des essais de phase II. Or, les essais cliniques ont montré qu'au bout de 3 jours de traitement, les patients n'arrivent plus à supporter le fexinidazole qui doit donc être interrompu (communication personnelle). Concernant les tests réalisés pour la leishmaniose, les résultats ont été moins encourageants. Les résultats obtenus *in vitro* ont permis d'envisager des essais cliniques, mais malheureusement, les essais ont été stoppés en phase II/III suite à des rechutes et une éventuelle toxicité rénale ("About Sleeping Sickness | DNDi,").

❖ L'acoziborole

Faisant parti des oxaboroles et connu sous le nom SCYX-7158, l'acoziborole fut développé en 2009 par Anacor Phamaceuticals (figure 28).

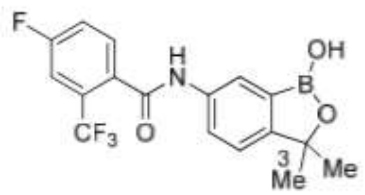


Figure 28. Structure de l'acoziborole

BY-NC-ND

Les premiers essais précliniques ont montré une activité trypanocide intéressante avec une action sur les deux stades de la maladie et un passage au niveau de la BHE à la suite d'études *in vivo* sur modèle murin permettant des essais cliniques (Jacobs et al., 2011). Actuellement en phase II/III des essais cliniques en RDC, l'efficacité et la sécurité de l'acoziborole sont évaluées sur des patients en stade 1 et en stade 2 d'une THA à *T.b.g.* ("About Sleeping Sickness | DNDi,"). Le seul effet indésirable notable de l'acoziborole est une augmentation transitoire et de faible intensité des marqueurs de la fonction thyroïdienne (Jacobs et al., 2011; Eperon et al., 2014). De plus, les essais cliniques se basent sur une dose unique facilitant ainsi la prise en charge et l'observance des patients.

Il y a peu, il semblait que l'acoziborole soit capable d'agir par l'inhibition de méthyltranférases entrainant alors une modification au niveau du métabolisme de la méthionine, ou par la modulation de plus d'une cible moléculaire lui conférant un caractère polypharmacologique (Jones et al., 2015). En 2018, Wall et *al.*, ont révélé que le mode d'action des benzoxaboroles reposait sur l'inhibition de la maturation de l'ARNm en identifiant une cible d'intérêt, l'endonucléase CPSF3 (Wall et al., 2018).

❖ La pafuramidine

La pafuramidine, prodrogue employée par voie orale, est une diamidine arrivée jusqu'en phase III des essais cliniques avant de voir son développement stoppé net à la suite de la découverte d'effets indésirables retardées au niveau hépatique et rénal (figure 29) (Mdachi et al., 2009; Wenzler et al., 2009; Jacobs et al., 2011).

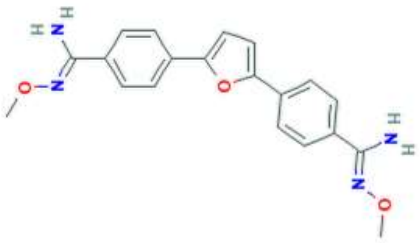


Figure 29. Structure de la pafuramidine

Ainsi, outre le fexinidazole et l'acoziborole, aucune autre alternative n'est proposée. La recherche de nouveaux composés ne semble pas être envisagée malgré les nombreux cas de résistance qui apparaissent.

BY-NC-ND

I.2.4.4.3. Vaccination

Le trypanosome est recouvert d'un manteau antigénique composé de VSG qui sont capables de se réarranger un grand nombre de fois, lui permettant ainsi d'échapper au système immunitaire de l'hôte. En effet, alors que les Ac seront dirigés vers un type de VSG, les trypanosomes auront alors « mutés » et un nouveau manteau se sera formé, insensible à l'action des Ac produits. Cette capacité de réarrangements lui confère la propriété de survie au sein de l'organisme. Toutefois, au niveau de la poche flagellaire du parasite, il existe des récepteurs dits invariants et qui pourraient être une cible thérapeutique intéressante (La Greca and Magez, 2011).

Des premières études menées en 1995 par Mkunza et *al.*, faisaient état d'une protection contre les trypanosomes (*T. congolense* et *T. vivax*) lorsque des chèvres recevaient une administration de dérivés antigéniques issus de la poche flagellaire (Fp) de *T.b.r*. Cette immunité non totale était toutefois plus élevée qu'avec l'isométamidium (Mkunza et al., 1995). Par la suite, le même type d'étude a été initié sur des souris et a montré que 60% d'entre elles survivaient à l'infection et que les 40% restantes avaient leur temps de vie allongé et une charge parasitaire diminuée. Toutefois, il ne semble pas que cette voie d'action soit la plus prometteuse (Radwanska et al., 2000). De plus, les études complémentaires ont montré la nécessité d'avoir une charge parasitaire faible afin d'obtenir des résultats satisfaisants.

Des essais ont par la suite été menés sur des protéines du cytosquelette comme l'actine et la tubuline. Ces protéines jouent un rôle crucial dans la division cellulaire, la morphologie ou encore la mobilité des parasites, mais également dans la formation de vésicules membranaires de la poche flagellaire. Les résultats montraient une protection encourageante mais non totale à l'encontre de certains trypanosomes responsables de la TAA lorsque les souris étaient immunisées avec de l'actine trypanosomale et de la β-tubuline de *T. evansi*. Toutefois ces résultats étaient dépendants d'une charge parasitaire initiale faible (Lubega et al., 2002; Li et al., 2009). Malgré ces résultats encourageants, ces cibles ne permettaient pas une réponse totale de protection, et aucune étude de suivi n'a été réalisée.

D'autres cibles ont alors été étudiées comme les sialidases, les pompes cationiques, l'ancre GPI retrouvée au niveau des VSG, ou encore la congopaïne, une cystéine protéase impliquée dans la réponse IgG des individus trypanotolérants mais sans résultat suffisamment prometteur pour envisager une poursuite des études (La Greca and Magez, 2011).

Il existe donc de nombreuses cibles potentielles, mais aucune n'offre une protection totale ni une guérison de la maladie. Actuellement, aucune nouvelle cible n'a été découverte et aucun vaccin n'est développé, et il se pourrait que ce projet soit utopiste face aux pouvoirs

BY-NC-ND

d'échappement des trypanosomes vis-à-vis du système immunitaire (Black and Mansfield, 2016).

I.2.5. Clinique, diagnostic et traitements de la Trypanosomose Animale Africaine

I.2.5.1. Evolution de la maladie

Il n'existe pas de Trypanosomose Animale Africaine typique du fait de la diversité des parasites et des hôtes. La TAA est une pathologie chronique dont l'issue est fatale en l'absence de traitement approprié (Lefèvre et al., 2010; Matovu et al., 2001). Les formes de TAA dépendent principalement de l'espèce de parasite mis en cause.

- La Nagana, est la forme la plus répandue en Afrique. Elle est principalement due à *T. vivax*, *T. congolense*, *T. simia*, *T.b.b.* ou *T. suis* qui sont véhiculés par des glossines. Toutes les espèces animales peuvent être infectées. Le cycle parasitaire est semblable à l'Homme; une mouche infectée vient piquer un animal pour se nourrir, lui transmet des parasites qui vont se multiplier et atteindre les différents fluides biologiques entrainant des lésions plus ou moins importantes. Tout comme pour l'Homme, le chancre d'inoculation passe souvent inaperçu, et peut disparaitre après quelques temps, dès lors que les trypanosomes ont gagné la circulation sanguine. Les formes aiguës, dont la mort peut survenir en l'espace de 2 mois, sont caractérisées par une importante anémie entrainant donc une faiblesse et des problèmes cardiaques. Des phases de rémissions sont présentes entre chaque crise, aggravant l'état de l'animal jusqu'à sa mort. Les formes chroniques, beaucoup plus fréquentes, sont caractérisées par des crises modérées qui alternent avec des périodes asymptomatiques. L'anémie, signe clinique important, devient de plus en plus prononcée au cours de l'infection. Une cachexie s'installe, les animaux vont alors présenter un affaiblissement important avec une baisse de la productivité laitière, voire une immunodépression. Certaines espèces animales comme les chiens et les dromadaires peuvent présenter des pertes de poils, des plaques œdémateuses, une urticaire voire des pétéchies au niveau des conjonctives (Boyt, 1998; Chartier, 2000). La sévérité de l'infection dépend du parasite mis en cause. Pour *T.b.b.*, l'infection est rarement aiguë et se développe lentement avec une phase terminale caractérisée par une paralysie totale conduisant à la mort de l'animal, alors que pour *T. congolense* qui est le plus virulent chez les bovins, les symptômes sont beaucoup plus impressionnants avec une détérioration de l'état général beaucoup plus rapide. Chez les petits ruminants, les infections à *T. vivax* sont les plus fréquentes avec des infections parasitaires massives, alors que les infections à *T.b.b.* sont moins fréquentes et plus modérée. Chez les équidés, *T.b.b.* est particulièrement pathogène provoquant des infections aiguës voire subaiguës avec des hyperthermies

BY-NC-ND

prononcées, une rapide émaciation, des œdèmes et autres signes cliniques qui conduisent à une paralysie générale de l'animal et où la mort peut survenir en moins d'un mois. *Trypanosoma suis* est un parasite spécifique des porcs, provoquant une infection aiguë entrainant la mort des animaux en quelques mois. *Trypanosoma simiae*, quant à lui, est généralement retrouvé chez les porcs sauvages comme domestiques voire les dromadaires. Les autres animaux (équidés, ruminants…) semblent moins sensibles à l'infection (Lefèvre et al., 2010).

Tous les animaux infectés présentent une hypersensibilité au stress environnemental et aux diverses infections potentielles, aggravant leur état de santé (Desquesnes, 2004). En l'absence de traitement, l'animal meurt.

- La Surra est due à *T. evansi* retrouvé aussi bien en Afrique, qu'en Amérique du Sud et en Asie. Sa transmission est exclusivement mécanique. Ce parasite infecte aussi bien les camélidés, les équidés, les petits ruminants, les porcs, les félidés, les chiens et certaines espèces d'éléphants d'Asie (Brun et al., 1998). Toutefois les animaux les plus sensibles sont les camélidés, les équidés et les chiens, qui présentent lors des formes aiguës voire subaiguës, des fièvres importantes, une anémie marquée, une opacité de la cornée, des œdèmes de la face, des pertes d'équilibre allant jusqu'à un état léthargique proche du coma. Cette pathologie est un véritable fléau pour les populations possédant des camélidés, car une fois infectés plus de 50% des animaux peuvent mourir rapidement.
- La Dourine, maladie vénérienne, affecte uniquement les équidés. Extrêmement contagieuse, elle est très surveillée et fait l'objet de mesures appropriées lors de sa découverte dans un troupeau. Elle est due à *T. equiperdum*. La dourine peut évoluer en 3 formes : aiguë, chronique et atypique. La forme aiguë est relativement rare et provoque la mort des chevaux en moins de 3 mois. La forme chronique, qui est la forme la plus retrouvée évolue entre 8 mois et 2 ans. Les signes cliniques débutent par une phase appelée phase œdémateuse, à la suite de la phase d'incubation. Comme son nom l'indique, cette phase est caractérisée par des œdèmes au niveau du fourreau et du scrotum des étalons, et de la vulve, du périnée et des glandes mammaires chez les femelles. Des ulcérations peuvent apparaitre au niveau des muqueuses. Les animaux présentent une hyperthermie, et un prurit marqué au niveau des organes génitaux. Par la suite, une deuxième phase apparait 1 mois après, avec une hyperthermie modérée mais des signes d'amaigrissement beaucoup plus marqués. Les animaux présentent des troubles nerveux tels que des paralysies, des pertes d'équilibre, et des signes cutanés. Cette phase est suivie en l'absence de traitement, d'une phase 3 appelée phase paralysante caractérisée par une aggravation importante de l'état général de l'animal associée à une extrême émaciation, des signes nerveux et des œdèmes. Les paralysies des

BY-NC-ND

membres obligent l'animal à se coucher sans jamais se relever. La mort survient alors en l'espace d'un mois (Chartier, 2000). Il existe une forme dite atypique retrouvée chez les ânes qui constituent alors un important réservoir pour cette maladie. Les œdèmes et les atteintes cutanées ne sont pas toujours présentes rendant difficile le diagnostic. Dans tous les cas, les femelles infectées par *T. equiperdum* peuvent avorter, ou donner naissance à des prématurés fragiles qui ne survivent pas toujours (Desquesnes et al., 2013).

Toutefois, tous les animaux ne sont pas sujets à ces signes cliniques. Certaines espèces vont être génétiquement résistantes au développement de la TAA. Parmi ces espèces on retrouve les chèvres Taurine, les moutons Djallonke, ou encore les bovins N'Dama ou Muturu (figures 30 et 31). Ces animaux qualifiés de trypanotolérants ont développé une tolérance innée vis-à-vis du parasite.

Figure 30. Vache N'Dama
(Wikimedia)

Figure 31. Mouton Djallonké
(Cirad)

Différentes études, réalisant des croisements d'animaux tolérants avec des animaux sensibles, ont permis de montrer la présence d'allèles fixes chez les espèces trypanotolérantes (Orenge et al., 2012). Une étude utilisant des marqueurs microsatellites du génome de ces animaux a permis de mettre en évidence la présence de loci de caractères quantitatifs (LCQ) qui correspondent à des régions d'ADN où vont être localisées des gènes à l'origine du caractère X. Un allèle polymorphe dans l'une de ces régions serait associé au contrôle de l'anémie notamment (Dayo et al., 2012; Yaro et al., 2016). Il est nécessaire de continuer à identifier l'ensemble des variations génomiques responsables de la trypanotolérance chez le bétail pour mieux comprendre le phénomène et anticiper les changements génomiques. Toutefois, il apparait que ce phénomène de trypanotolérance

BY-NC-ND

pourrait être un trait multigénique complexe, contrôlé possiblement par de nombreux LCQ à travers le génome (Berthier et al., 2003; Yaro et al., 2016). De plus, le système immunitaire joue un rôle important dans ce phénomène de tolérance. Une première étude avait émis l'hypothèse que la réponse adaptative par les lymphocytes B et T spécifiques de VSG, était impliquée dans cette trypanotolérance (Taylor, 1998), mais plus récemment il a été montré que la réponse innée avec la présence de macrophages activés était essentielle à cette immunotolérance (Mansfield et al., 2014; Liu et al., 2015). Ceci reste encore à confirmer, car des travaux ont montré que les changements répétés des VSG détruisaient les lymphocytes B induisant un échec de la réponse adaptative, provoquant alors une augmentation de la parasitémie sanguine et une anémie pouvant conduire à la mort de l'animal (La Greca and Magez, 2011). Les animaux trypanotolérants ont trouvé, eux, la capacité de contrôler cette anémie et cette parasitémie, assurant ainsi leur survie (Murray et al., 1982; Naessens, 2006). Cette capacité à maitriser ces signes cliniques, est à l'origine de la recherche d'un vaccin capable de neutraliser les facteurs pathogènes relargués par le parasite à l'origine de la maladie. Ainsi les animaux « immunisés » seraient plus productifs et présenteraient un meilleur aspect (Authié et al., 2001).

I.2.5.2. Diagnostic de la TAA

Chez les animaux, la mise en place d'un diagnostic est plus complexe devant la rareté des parasites, les fluctuations des parasitémies, et les espèces hôtes infectées. Il repose essentiellement sur la mise en évidence du trypanosome par différentes examens parasitologiques.

Le diagnostic clinique repose sur la détection de l'anémie et de l'hyperthermie pour des animaux localisés en zone d'endémie. Il faut toutefois faire attention aux diagnostics différentiels pouvant être retrouvés en Afrique (babebioses, helminthoses…). Afin de déterminer la présence des trypanosomes, les examens parasitologiques restent la meilleure option.

Des examens directs, semblables à ceux employés pour le diagnostic de la THA, permettent de mettre en évidence le parasite. L'examen à l'état frais d'un prélèvement de fluides (sang, lymphe, LCR ou encore sécrétions génitales dans le cas de *T. equiperdum*) permet d'apprécier rapidement la présence du parasite. Toutefois la sensibilité de cette technique est limitée et dépend de la charge parasitaire qui peut parfois être faible. L'utilisation d'un frotti sanguin, qui est un procédé facile à réaliser sur le terrain, peu coûteux et qui permet la reconnaissance des espèces de trypanosomes, est souvent une alternative voire un complément pour les cas

BY-NC-ND

positifs à confirmer (figure 32). La goutte épaisse, qui va venir en complément du frotti sanguin pour améliorer le résultat, est plus sensible mais présente toujours une limite de détection et en aucun cas ne permet de diagnostiquer précisément l'espèce incriminée (Lefèvre et al., 2010).

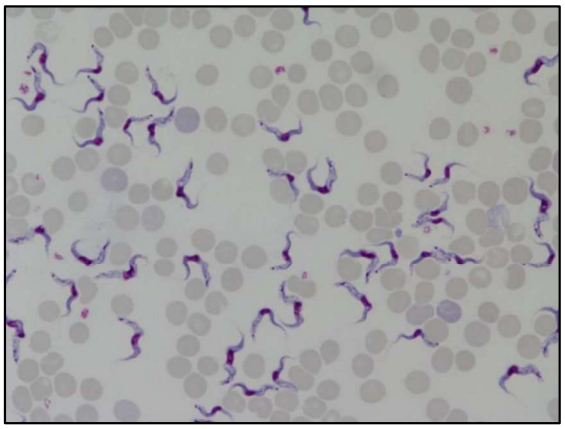


Figure 32. Frottis sanguin de *Trypanosoma brucei brucei*
(Photo personnelle J. Bonnet)

Afin de mettre en évidence plus précisément le parasite, des techniques de concentration peuvent être proposées. La plus connue est la technique de centrifugation de l'hématocrite (HCT) aussi appelée test de Woo, qui consiste en une centrifugation du sang en tube à hématocrite, afin de concentrer et de retrouver les trypanosomes à l'interface entre les leucocytes (« buffy coat ») et le plasma. Cette technique, rapide et peu coûteuse, permet parfois l'identification de l'espèce mais surtout une appréciation de l'anémie de l'animal (Desquesnes and Tresse, 1996). Une variante de l'HCT est la méthode de la couche leucocytaire (« buffy coat method », BCM), ou Test de Murray, qui est plus sensible que l'HCT mais permet la même appréciation de l'anémie. Des techniques semblables à celles utilisées chez l'Homme peuvent être employées comme la technique QBC, ou la mAECT, mais restent exceptionnelles car plus longues et plus couteuses que la technique HCT.

Parallèlement à ces tests, des recherches d'anticorps, par des tests ELISA notamment vont permettre de donner certaines réponses intéressantes d'un point de vue épidémiologique mais ne permettent pas de distinguer une affection active d'une infection traitée. On retrouve notamment des tests d'agglutination, ou des CATT qui sont basés sur la détection des IgM. Tout comme pour l'Homme, dès lors qu'une agglutination apparait, il y a présence d'Ac et donc l'animal est considéré comme infecté. Toutefois, ces tests ne sont pas aussi performants avec tous les parasites, pour *T. vivax*, la détection est nulle, par rapport à *T. evansi* ou *T.*

BY-NC-ND

congolense. La recherche d'antigènes quant à elle va permettre de distinguer une affection active (Desquesnes et al., 2001).

Une des dernières techniques pouvant être utilisée est la PCR, qui va permettre l'amplification en chaine de l'ADN parasitaire. Cette technique d'une grande sensibilité peut être réalisée sur place, mais elle reste néanmoins coûteuse ("African Animal Trypanosomiasis," 2018).

Un grand nombre de ces techniques n'est généralement pas utilisé sur le terrain en raison du prix, du délai d'attente des résultats et parfois de la faible sensibilité des résultats dans certaines régions d'Afrique. Les populations vont préférer traiter leur bétail directement pour éviter les pertes bouchères entrainant des pertes économiques bien trop importantes.

I.2.5.3. Thérapeutique vétérinaire

I.2.5.3.1. Les médicaments actuels

La prise en charge thérapeutique reste le meilleur moyen de lutter contre la TAA. Toutefois malgré les demandes urgentes et les besoins des populations, les molécules utilisées n'ont pas évolué depuis plus de 40 ans. En effet, les industriels pharmaceutiques ne voient pas là, un marché prometteur.

Actuellement, 5 principales molécules sont proposées aux éleveurs pour traiter leur bétail (tableau 3). Certaines vont avoir une action curative, alors que d'autres auront plutôt un caractère prophylactique. Pour la faune sauvage, la prise en charge thérapeutique est beaucoup trop complexe et à coût trop important pour être mise en place. Des moyens de prévention pourraient voir le jour mais restent encore aujourd'hui trop limités.

BY-NC-ND

	Souches	Indication	Posologie	Effets indésirables
Acéturate de Diminazène	*T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. evansi*	Curatif	5 mL pour 100 kg de poids vif (IM)	Coloration résiduelle des tissus Toxique à forte dose chez le chien et les camélidés
Isométamidium	*T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei,* *T. evansi*	Curatif et prophylactique	Doses variables : 0,25 à 1 mg/kg (IM)	IV mortelle chez la chèvre
Homidium (bromure, chlorure)	*T. congolense*, *T. vivax*	Curatif	1 mg/kg d'une solution à 2% (IM profonde)	Irritant au point d'injection
Sulfate de Quinapyramine	*T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. evansi* *T. simiae*	Curatif et prophylactique	5 mg/kg d'une solution 10% (SC)	Tremblements, salivation, diarrhées
Suramine	*T. brucei*, *T. evansi*	Curatif et prophylactique	10 mg/kg d'une solution à 10% (IV lente)	Possibles réactions générales
Chlorhydrate de Mélarsomine	*T. evansi*	Curatif	0,25 mg/kg de poids vif (IM profonde, SC)	Œdème local léger

Tableau 3. Les traitements utilisés contre la TAA

❖ **Acéturate de Diminazène**

Le diminazène est une diamidine aromatique constituée de deux fragments phényl-amidine relié par un triazène de nom 4,4'-(1-Triazene-1,3-diyl) bis (benzenecarboximidamide) (figure 33). Il est représenté sous forme de sel de diacéturate (Peregrine and Mamman, 1993).

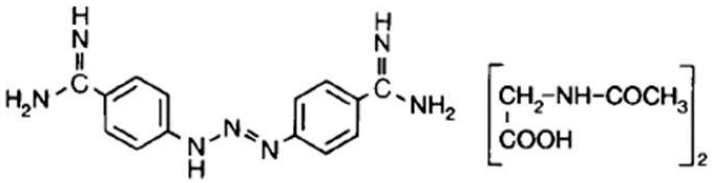


Figure 33. Structure de l'acéturate de diminazène

BY-NC-ND

Il est développé à partir de 1955 comme trypanocide et babesiacide pour le bétail. Il s'agit de la molécule la plus utilisée dans un premier temps car elle présente un haut index thérapeutique, une activité contre des trypanosomes résistants à d'autres trypanocides, une activité étendue à plusieurs espèces animales, et une faible toxicité (Williamson, 1976). Il est rapidement excrété de l'organisme, et se retrouve sous forme inchangé dans les fèces, les urines, le lait et le foie des bovins. Il est actif au stade 1 de la maladie bien qu'il puisse être dosé au niveau du LCR.

Poudre jaune, facilement soluble dans l'eau, et relativement stable, le diminazène peut se conserver 2 à 3 jours en solution à l'abri de la lumière. Pouvant être injectée en sous cutanée, l'administration par voie intramusculaire est la plus rapide et la plus recommandée (Lefèvre et al., 2010). Il n'est pas recommandé chez les équins, les camélidés, et est contre-indiqué chez les chiens qui sont beaucoup plus sensibles et peuvent développer des hémorragies cérébrales, ou des lésions hépatiques et rénales, souvent espèces dépendantes (Losos and Crockett, 1969).

Malgré son utilisation connue et reconnue depuis de nombreuses années, le mécanisme d'action du diminazène reste encore de nos jours trop peu compris. Le diminazène se lie vite et de façon irréversible aux trypanosomes et a la capacité de se fixer plus particulièrement à l'ADN du kinétoplaste (kADN), par une interaction spécifique au niveau des sites riches en adénine-thymine (A-T) (Newton, 1972; González et al., 1997). De là, une inhibition de la synthèse des amorces d'ARN, engendrant une accumulation d'intermédiaires de réplication et donc l'inhibition de la réplication du kADN est possible. De plus, il est capable d'interférer dans la liaison de l'ADN aux topoisomérases, altérant ainsi la configuration de l'ADN et donc sa réplication (Poot et al., 1990). Mais se liant ainsi aux structures d'acides nucléiques, les risques de mutagénicité et de carcinogénèse ne doivent pas être oubliés. Le diminazène module la réponse immunitaire de l'hôte, par inhibition de molécules de signalisation, et des facteurs de transcriptions associés avec une production de cytokines proinflammatoires (Kuriakose and Uzonna, 2014). Une deuxième hypothèse est que le diminazène serait capable d'inhiber de façon irréversible une enzyme, l'AdoMet décarboxylase, impliquée dans la synthèse de polyamines (Bitonti et al., 1986b).

Toutefois, le diminazène est surement le médicament le plus utilisé pour traiter la TAA, et ceci n'est pas sans conséquence. En effet, depuis quelques années des cas de résistances sont apparus et ont été décrits (Mungube et al., 2012). Le diminazène, comme la pentamidine, est transporté au sein de *T. brucei* par le transporteur TbAT1, qui peut présenter des mutations entrainant l'apparition de résistances au sein des souches de *T. brucei*. Toutefois pour les

BY-NC-ND

autres espèces comme *T. congolense* ou *T. vivax*, il n'a pour l'instant pas été retrouvé au sein de leur génome (Munday et al., 2015).

❖ Isométamidium

L'isométamidium, ou 3-amino-8-[3-[3-(aminoiminométhyl) phényl]-1-triazényl]-5-éthyl-6-phénylphénanthridinium chloride isochloride, est issu des phénanthridines cationiques (figure 34).

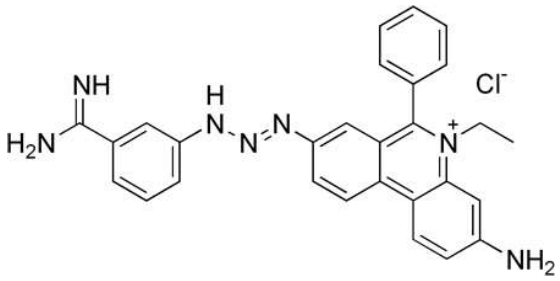


Figure 34. Structure de l'isométamidium

L'isométamidium correspond au couplage des molécules de diminazène et d'homidium dont la réalisation a été initiée en 1958 par Wragg, puis en 1960 par Berg (Berg, 1960; Brown et al., 1961). Sa première utilisation en tant que trypanocide remonte à 1963. Toutefois, dès l'année 1938, tout comme pour le diminazène, Browning et *al.*, a montré ses effets trypanocides sur différentes espèces de trypanosomes et différentes espèces animales (Browning et al., 1938; Kinabo, 1993).

Il s'agit d'une poudre rouge soluble dans l'eau. Elle est administrée à 1 ou 2 % de solution aqueuse en intramusculaire (IM). Les doses varient en fonction des zones infectées et des risques de chimiorésistance. L'injection IM à dose lente est relativement bien tolérée, mais peut causer quelques symptômes généraux transitoires chez les herbivores. L'injection sous-cutanée n'est pas utilisée car elle engendre de graves réactions chez les animaux. Quant à l'injection intraveineuse elle peut être utilisée chez certaines espèces mais ne doit pas dépasser la dose de 0,5 mg/kg (Schillinger et al., 1985).

L'isométamidium est également utilisé en prophylaxie. Son action dépend alors de la quantité présente dans les tissus, due à la dose administrée, au site d'administration et à la réaction des tissus mais également aux conditions physiques de l'individu (Kinabo and Bogan, 1988; Lefèvre et al., 2010). L'utilisation d'implants sous-cutanés à libération progressive permet une efficacité du médicament sur plus de 18 mois comparativement à l'utilisation de la voie intramusculaire (Lefèvre et al., 2010).

BY-NC-ND

Bien que la consommation des viandes soit possible 30 jours après administration, l'isométamidium est susceptible de présenter des propriétés mutagènes et carcinogènes, d'où la nécessité de correctement surveiller son utilisation.

Des hypothèses concernant son mécanisme d'action ont été proposées, comme, le blocage de la synthèse d'acides nucléiques par son intercalation entre les paires de bases de l'ADN, l'inhibition de l'ARN polymérase, l'inhibition de l'ADN polymérase, ou encore son action au niveau des précurseurs des acides nucléiques de l'ADN et de l'ARN (Wagner, 1971; Marcus et al., 1982). D'autres études ont émis l'idée que l'isométamidium pouvait interagir avec la synthèse des glycoprotéines, avec le métabolisme lipidique, ou encore le transport membranaire (Girgis-Takla and James, 1974). Toutefois, rien n'a vraiment pu être confirmé laissant donc son mécanisme d'action non élucidé. Une dernière hypothèse était l'action au niveau du clivage sélectif de minicercles d'ADN du kinétoplaste (Shapiro and Englund, 1990).

Un des problèmes majeurs réside dans l'augmentation accrue de la chimiorésistance notamment en Afrique de l'Ouest. Ceci est en partie causé par les mauvais usages et la vente de « faux médicaments » directement aux éleveurs soignant leurs bêtes avec des produits où les concentrations en substances actives sont en dessous des normes, ou totalement absentes et remplacées par d'autres moélcules (Bengaly et al., 2018).

❖ Homidium

Connu sous la forme de deux sels, sel de chlorure et sel de bromure, l'homidium ou éthidium est, comme l'isométamidium, un composé issu des phénanthridines cationiques, de nom 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide, ou 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium chloride (figures 35 et 36).

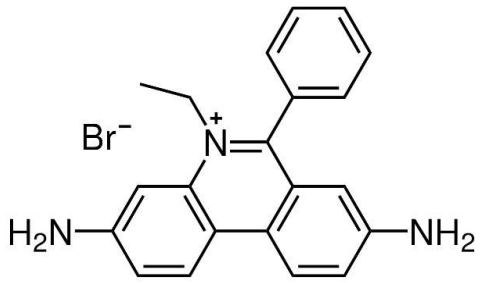


Figure 35. Structure du bromure d'homidium

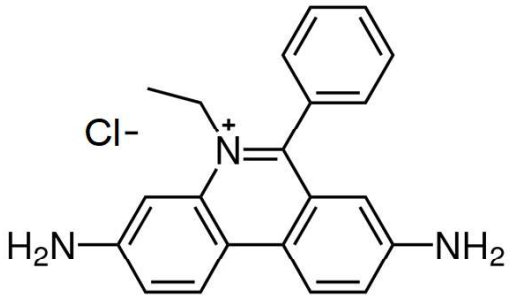


Figure 36. Structure du chlorure d'homidium

Poudre soluble dans l'eau, l'éthidium, est utilisé notamment en biologie moléculaire mais présente une forte toxicité obligeant une surveillance accrue des manipulateurs, et nécessitant

BY-NC-ND

des mesures de protection vis-à-vis de l'environnement. Il est pourtant employé chez le bétail et est facilement administrable à la dose de 1 mg/kg par voie IM (la voie SC étant trop irritative pour une dose bolus) sous forme de solution stable pour 3 mois. Introduites en 1952, ces molécules sont très efficaces à l'encontre de *T. vivax*, et *T. congolense* pour traiter le bétail bovin, caprin et ovin. Utilisées à des fins curatives, elles possèdent néanmoins des propriétés préventives intéressantes sur de courtes durées et dans des zones à faible risque (Lefèvre et al., 2010). L'homidium se distribue largement en extracellulaire et possède un tropisme pour le foie et les reins où il a tendance à s'accumuler. Ceci présente des risques lorsque les animaux sont destinés à la consommation humaine (Murilla et al., 1996).

Tout comme pour l'isométamidium, un implant SC a été développé permettant une diffusion progressive du principe actif avec une durée de protection de 5 à 10 mois (supérieure à la protection offerte par la voie IM). Toutefois, l'usage abusif de ces composés entre 1960 et 1970 a conduit à l'émergence de résistances obligeant la limitation de leur utilisation ou leur substitution par d'autres composés tel le diminazène (Kinabo, 1993).

Le mode d'action est semblable à celui de l'isométamidium et consiste donc en un blocage de la synthèse d'acides nucléiques par l'inhibition de l'ARN polymérase, par l'insertion entre les paires de base de l'ADN (Richardson, 1973). Intercalant de l'ADN, l'homidium est qualifié de mutagène voire de carcinogène, et oblige donc à une précaution d'emploi rigoureuse voire une totale substitution (Waring, 1965; Sutcliffe et al., 2014). Connu pour interagir et dégrader le génome mitochondrial présent au niveau du kinétoplaste, des études plus récentes ont étudié les effets des molécules sur les composants même de ce génome tels les minicercles de réplication en montrant que l'homidium était capable de bloquer l'initiation de la réplication en agissant sur la double hélice du génome, et que l'ADN kinétoplastique était essentiel à la survie des parasites (Roy Chowdhury et al., 2010). Lors d'une augmentation de la dose, l'homidium est capable d'affecter également l'ADN nucléaire, permettant ainsi de lutter contre les trypanosomes dyskinétoplastiques (Roy Chowdhury et al., 2010). Le choix de ces molécules pour le kinétoplaste dans un premier temps s'explique par l'accumulation préférentielle de molécules cationiques lipophiles tels l'homidium pour la mitochondrie (Lanteri et al., 2008).

❖ Sulfate de Quinapyramine

Le sulfate de quinapyramine, ou 6-N-(2-amino-1,6-dimethylpyrimidin-1-ium-4-yl)-1,2-dimethylquinolin-1-ium-4,6-diamine;hydrogen sulfate, est une quinoline pyrimidine sous forme dicationique à pH physiologique (figure 37).

BY-NC-ND

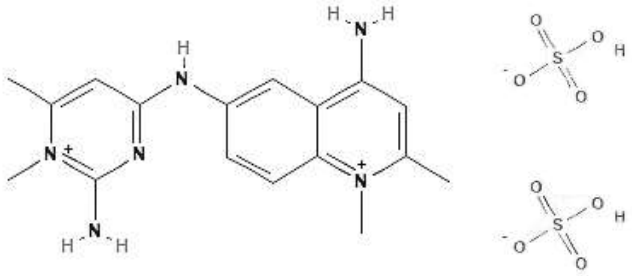


Figure 37. Structure du sulfate de quinapyramine

Introduit comme trypanocide dans les années 50 par Curd et Darvey, avec une action curative et prophylactique, il fut le médicament de choix pour traiter les infections à *T. evansi*, *T. equiperdum* dans les années 70 (Curd and Davey, 1950; Leach and Roberts, 1981).

Poudre blanche facilement dissoute dans l'eau, il est administré par voie sous-cutanée pour traiter des infections à *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei*, *T. evansi* ou encore *T. simiae* chez les camélidés, les chevaux, les chiens et les porcs, mais est contre-indiqué pour le bétail car, il existe un fort risque de résistance (Lefèvre et al., 2010).

S'accumulant au niveau du foie et des reins, il existe un risque important de toxicité spécifique d'organes, nécessitant une précaution d'emploi. Des effets indésirables à type d'intenses salivations, de dyspnées voire d'effondrements peuvent être retrouvés chez les chevaux et chiens, alors que chez les autres animaux, on peut retrouver des œdèmes au site d'injection qui disparaissent rapidement. Cette molécule est majoritairement éliminée par voie rénale (Spinks, 1950a, 1950b).

Comme pour la majorité des molécules citées précédemment, le mécanisme d'action du sulfate de quinapyramine reste inconnu. Plusieurs hypothèses ont été émises concernant son rôle d'interférent dans la synthèse d'acides nucléiques, mais également dans l'inhibition des ribosomes cytoplasmiques (Giordani et al., 2016). De plus, comme d'autres molécules (homidium, diminazène), sa structure dicationique suggère une accumulation mitochondriale et donc un rôle au niveau du kinétoplaste. Les données concernant le mécanisme d'action exact sont rares, seuls quelques résultats semblent indiquer que cette molécule agirait directement à l'intérieur du trypanosome au niveau cytoplasmique. En effet, aucun résultat n'indique une action directe de la molécule sur le noyau. Ces changements nucléaires seraient la conséquence de modifications cytoplasmiques. Le sulfate de quinapyramine agirait vraisemblablement plus comme un inhibiteur de croissance que comme un trypanocide direct.

BY-NC-ND

Ainsi le trypanosome est toujours capable de se mouvoir mais ne peut plus se multiplier et ainsi proliférer (Ormerod, 1951).

❖ **Chlorhydrate de mélarsomine**

L'hydrochloride de mélarsomine est un mélamino-phénylarsine, synthétisé à la suite de la combinaison de l'oxyde de mélarsen et de 2 équivalent de cysteamine (Berger and Fairlamb, 1994). Son nom est le suivant : Dichlorhydrate de bis (aminoéthylthio) 4 mélamino-phénylarsine (figure 38). Il a été développé en 1985 par le laboratoire Mérial et commercialisé pour la première fois en 1992 comme trypanocide sous le nom de Cymelarsan® ou Mel Cy.

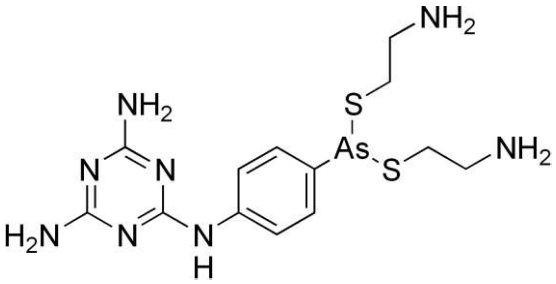


Figure 38. Structure du mélarsomine

Poudre blanche soluble dans l'eau, il doit être administré directement à la suite de la mise en solution. Pouvant être injecté par voie sous-cutanée, la voie IM profonde lui est préféré à hauteur de 0,25 mg/kg de poids vif. Cette molécule a montré une efficacité importante contre *T. evansi* chez les camélidés, mais également chez les vaches, les chevaux et les buffles (Kinabo, 1993). Il peut également être employé pour lutter contre *T.b.b.*, ou *T. equiperdum*. Il existe peu d'effets indésirables, la plupart étant bénins (salivation, œdème au point d'injection lors d'une administration SC, tremblements musculaires…) et qui disparaissent rapidement. Un délai d'attente est toutefois nécessaire avant une quelconque consommation de viande (en moyenne 15 jours) par l'Homme (Giordani et al., 2016).

Son mode d'action reste encore inconnu, mais comme pour les autres molécules arsenicales (mélarsoprol), il semblerait qu'il agisse par interférence avec les procédés de production d'énergie par inhibition de la pyruvate kinase, ou par interaction avec la trypanothione réductase (Flynn and Bowman, 1974; Fairlamb, 1990). En effet, il semblerait que le Cymerlasan® pénètre au sein du trypanosome par les mêmes transporteurs que pour la pentamidine ou le mélarsoprol, nommés P2/TbAT1 et TbAQP2 (Carter and Fairlamb, 1993; De Koning and Jarvis, 1999; Munday et al., 2014). Connaissant donc les transporteurs qu'il utilise, il n'est pas sans risque de voir apparaitre une chimiorésistance limitant son utilisation.

BY-NC-ND

Tout comme pour la THA, la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques devient urgente pour lutter contre les résistances de plus en plus présentes et ainsi limiter les pertes animales (Geerts et al., 2001). Or, aucune molécule n'a été développée depuis plusieurs années.

I.2.5.3.2. Médicament à l'étude

Une molécule de la famille des benzoxaboroles, appelée AN11736, est actuellement à l'étude pour lutter efficacement contre la TAA (figure 39). Elle serait efficace vis-à-vis de *T. congolense* et *T. vivax*. En effet, les premiers tests *in vivo* menés sur des vaches, ont permis de montrer une efficacité de 100% sur 100 jours lors d'une administration en IM à la dose de 10 mg/kg, à l'encontre de ces deux mêmes pathogènes (Akama et al., 2018).

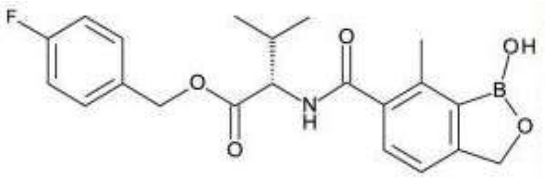


Figure 39. Structure de l'AN11736

Concernant le mode d'action de cette molécule, il est semblable à celui des oxaboroles. En effet, la cible de ces molécules semble être au niveau nucléaire, avec l'inhibition d'une endonucléase de traitement de l'ARNm parasitaire appelée CPSF3 (Cleavage and polyadenylation specificity factor 3). L'oxaborole serait capable d'interagir avec CPSF3 et ainsi d'inhiber son action au niveau du trypanosome, empêchant son développement (Wall et al., 2018). Cette découverte permettrait de comprendre le rôle de cette protéine chez de nombreux kinetoplastidés.

I.2.6. La lutte anti-vectorielle

La Trypanosomose Africaine résulte de facteurs, que sont l'hôte, humain comme animal, jouant alors le rôle de réservoir, le vecteur qui transmet le parasite et le parasite lui-même responsable de la maladie. Sans l'association de ces trois entités, la maladie n'existe pas. C'est la glossine qui joue le rôle d'intermédiaire entre le pathogène et l'hôte. C'est pourquoi une action de lutte anti-vectorielle est nécessaire en complément des mesures thérapeutiques des diverses populations.

Cette lutte utilise différents outils et différentes stratégies en fonction des localisations, des espèces cibles et des populations atteintes dans le but de réduire considérablement la densité des glossines et cela pour que le risque de transmission soit à un niveau le plus bas possible.

BY-NC-ND

Elle doit également prendre en considération la validité des techniques, le coût et l'impact qu'auront ces dernières sur l'environnement (WHO, 2013).

Différentes méthodes de lutte peuvent être citées avec des résultats dépendants des facteurs géographiques, économiques et de protection de l'environnement. On retrouve le débroussaillage qui consiste en l'élimination de la végétation, lieu où les mouches vivent. Cette technique est réalisable localement mais ne peut être pratiquée à grande échelle. Il y a plusieurs années, une technique consistait en l'élimination des hôtes sauvages de manière drastique. Or outre le fait que ces massacres pouvaient conduire en l'élimination de populations d'animaux, elle n'était pas concluante car dès que les animaux se reproduisaient, les glossines réapparaissaient. Cette technique a été depuis longtemps arrêtée.

Les méthodes les plus utilisées, sont la pulvérisation terrestre et aérienne d'insecticides qui présentent des résultats satisfaisants mais qui est sujette à controverse en raison des effets collatéraux retrouvés sur les espèces non visées telles que les reptiles, insectes ou petits mammifères. L'épandage d'insecticide directement sur le bétail, présente une efficacité d'action, malheureusement les risques pour les animaux et l'apparition de résistances freinent cette technique. L'utilisation d'appâts placés à proximité des lieux de vie des glossines, mais aussi des populations, a montré un fort intérêt par la réduction des populations de mouches et par le moindre coût de cette technique. Le premier piège a été mis au moins en 1970 par Challier et Laveissière, et consiste en un piège biconique permettant la capture des glossines (Laveissière and Penchenier, 2017). Depuis d'autres pièges ont vu le jour et s'inspire de ce premier en s'adaptant au terrain et aux espèces vectorielles ciblées. Ces pièges sont très précis et se basent sur diverses observations, comme le fait qu'ils doivent être bleu et noir car le bleu va attirer la mouche et le noir va l'inciter à se poser. Certains des pièges vont être imprégnés d'insecticide ce qui neutralise d'autant plus la glossine. Le cône supérieur est formé d'une tulle à moustiquaire blanc afin de laisser passer la lumière et montrer le chemin de fuite (figure 40).

BY-NC-ND

Figure 40. Piège biconique (gauche) et piège Vavoua (droite)
(Photo M. Desquesnes, Cirad)

Une dernière technique plus coûteuse et donc moins utilisée est le lâché de mâles stériles. Cette méthode se base sur le fait que seul le premier accouplement n'est fécond et que les femelles qui se seront accouplées avec des mâles stériles ne donneront aucune descendance entrainant ainsi le déclin des populations sauvages de glossine.

Toutes ces techniques ne peuvent suffire à éliminer les populations de mouches et à réduire la transmission de la maladie. Elles doivent être associées entre elles et à la thérapeutique. De plus, elles nécessitent l'implication des populations et la rigueur d'utilisation qui malheureusement ne sont pas toujours retrouvées dans certains pays africains souvent sujets à des conflits.

BY-NC-ND

Objectifs

La nécessité de développer de nouvelles molécules thérapeutiques, en santé humaine et vétérinaire pour lutter contre la Trypanosomose Africaine, reste un enjeu majeur. Pour cela l'UMR INSERM 1094 NeuroEpidémiologie Tropicale a initié plusieurs collaborations avec des équipes spécialisées dans le développement d'anti-infectieux (l'équipe K du LCC « UPR CNRS 8241 » de Toulouse, sous la direction du Pr. P. Verhaeghe, l'équipe UMR IRD 156 de Toulouse sous la direction du Pr. N. Fabre, l'équipe LPCR - UMR 7273 de Marseille sous la direction du Pr. P. Vanelle, l'équipe VITROME de Marseille sous la direction du Pr. N. Azas, l'équipe UMR INSERM U1212 / CNRS 5320 de Bordeaux sous la direction de Pr. Mergny et l'équipe UMR 7245 CNRS/MNHN de Paris sous la direction du Pr. P. Grellier).

Notre travail de thèse a donc pour objectif de rechercher de nouvelles molécules efficaces sur un modèle de souche à *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.9, en partenariat avec ces équipes.

Pour répondre à cet objectif, nous avons ciblé 2 familles de composés chimiques capables d'interagir avec des enzymes parasitaires :

- Les nitroaromatiques agissant comme substrats des NTRs avec plus précisément:
  - Les nitroquinoléinones et nitroimidazopyridines qui ont été testées *in vitro* et *in vivo* pour évaluer leur activité antiparasitaire
  - Un nitroimidazolé, le mégazol qui a été étudié *in vitro* et *in vivo* afin de comprendre sa métabolisation et identifier ses métabolites.

- Les hétérocycles azotés agissant sur les télomérases:
  - Ces molécules de nouvelle génération ont été testées *in vitro* pour mesurer leur efficacité trypanocide.

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont une compilation des différents résultats obtenus et qui sont en cours de publications ou bien qui sont déjà publiés. A ce jour, 5 articles originaux sont publiés, 2 soumis et 2 en cours de rédaction. Pour simplifier la lecture de ce mémoire de thèse, les aspects matériels et méthodes des travaux sont présentés dans les publications, et ne sont détaillés ici que les principaux résultats. Une discussion et une conclusion synthétisant ces travaux clôtureront ce travail.

BY-NC-ND

Chapitre II. Les nitroaromatiques

Il existe une grande diversité de molécules nitroaromatiques utilisées dans plusieurs domaines de la santé comme en cardiologie, neurologie, oncologie ou encore infectiologie. Une des plus connue le métronidazole, appartenant à la famille des 5-nitroimidazolés de synthèse, est employé notamment dans le traitement de la trichomonose, l'amœbose ou encore la giardiose. Plusieurs autres familles de composés ont également vu le jour avec toujours la présence du groupement nitro $–NO_2$. On retrouve ainsi en fonction de la position du nitro, les 5-nitroimidazolés avec de nombreuses molécules déjà commercialisées autre que le métronidazole, comme le secnidazole, l'ornidazole, et plus récemment le fexinidazole ou le mégazol, molécule non commercialisée mais ayant toutes des propriétés antiparasitaires intéressantes (Sköld et al., 1977; Videau et al., 1978; Marie-Daragon et al., 1994; "About Sleeping Sickness | DNDi," n.d.). Concernant les 2-nitroimidazolés, seul le benznidazole est actuellement utilisé dans le traitement de la maladie de Chagas (Polak and Richle, 1978). Un autre 2-nitroimidazolé appelé azomycine, molécule naturelle, développée dans les années 60, a vu ses essais stoppés à la suite d'effets indésirables trop importants (Beaman et al., 1965). Les 4-nitroimidazolés, avec notamment le délamanide, un anti-tuberculeux qui a montré une absence de génotoxicité permettant de concevoir de nouveaux composés dérivés de cette molécule d'intérêt. Il existe aussi les 5-nitrofuranes, utilisés dans le traitement de la THA et de la maladie de Chagas avec son composé phare, le nifurtimox, et le nifuroxazide, utilisé lors de diarrhées et colites infectieuses sans gravité (Begovic et al., 2016). La dernière famille est celle les 5-nitrothiazoles, avec le nitazoxanide utilisé dans de nombreux domaines infectieux parasitaires et bactériens pour lutter contre la cryptosporidiose et la giardiose ou encore contre *Clostridium difficile* (Rossignol et al., 1984; McVay and Rolfe, 2000).

Ces composés ont un intérêt majeur en infectiologie de par leur capacité à être activés par les nitroréductases. Ces enzymes NTRs décrites précédemment sont très importantes pour le trypanosome et constituent donc une cible intéressante. Toutefois, les nitroaromatiques ont longtemps eu mauvaise presse. En cause, le groupement nitro pouvant être à l'origine d'effets mutagènes et génotoxiques (Mullin et al., 1987; Kovacic and Somanathan, 2014). De ce fait, peu d'études ont été menées sur ces nitrohétérocycles pourtant si prometteurs.

Le laboratoire de Chimie de Coordination (LCC, UPR CNRS 8241) de Toulouse, et plus particulièrement l'équipe K « Agents anti-infectieux moléculaires et macromoléculaires » sous la direction du Pr Pierre Verhaeghe et le laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire (LPCR) - UMR 7273 à Marseille dirigé par le Pr Patrice Vanelle, travaillent à la synthèse de dérivés nitrohétérocycles pouvant présenter une action antiparasitaire sélective due à leur

BY-NC-ND

bioactivation par les NTRs parasitaires et bactériennes. Des nombreuses molécules produites en série ont été testées sur des souches de kinétoplastidés dont *T.b.b.* dans le cadre de ce travail de thèse.

Afin de présenter les principaux résultats, il est nécessaire de les resituer dans le contexte du développement de potentiels candidats médicaments. Nous partons de la synthèse chimique initiale effectuée par les docteurs Julien Pedron et Cyril Fersing au cours de leurs thèses de doctorat pour aller jusqu'aux tests *in vivo* effectués dans notre laboratoire, en passant par les tests *in vitro* nécessaires réalisés dans les différentes équipes du projet.

II.1. Nitroquinoléinones

Au sein du LCC, les chimistes s'intéressent depuis de nombreuses années aux molécules nitrohétérocycles présentant des propriétés antiparasitaires et notamment antileishmaniennes. Une collaboration a été initiée avec le Pr N. Azas, de l'équipe Vitrome de Marseille, travaillant alors sur des souches de leishmanies. La première série de molécules étudiées a porté sur des dérivés quinoléines, dont les travaux ont permis de mettre en évidence un « hit » anti-leishmanien, la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one (figure 41) (Paloque et al., 2012). Cette molécule qualifiée de « hit » a été le point de départ de synthèses conduisant à des composés actifs ou inactifs permettant de conclure sur la nécessité d'avoir le groupement nitro en position 8 et la présence d'un groupement lactame en position 2 pour garder l'activité antiparasitaire (Kieffer et al., 2015b, 2015a). Un « hit » est une molécule découverte à la suite d'un criblage sur un pathogène et mettant ainsi en avant ses propriétés anti-infectieuses. Le but étant à partir de ce « hit » de mettre en évidence un « lead » qui est alors une molécule tête de série pour d'autres molécules d'intérêt (Katsuno et al., 2015).

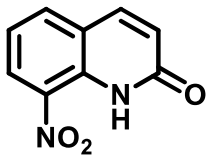


Figure 41. Structure de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one

A partir des critères spécifiques et des caractéristiques de ce « hit », l'équipe du LCC a travaillé à la synthèse de différents composés nitroaromatiques. Ainsi, 35 premières molécules ont vu le jour, dérivant directement de ce pharmacophore. Par la suite, 26 molécules issues d'un travail portant spécifiquement sur la pharmacomodulation en position 3 de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one selon des réactions de couplage pallado-catalysés de Suzuki-Miyaura et de Sonogashira ont été synthétisées. Pour finir, 19 molécules ont été synthétisées en se

BY-NC-ND

focalisant ici sur la pharmacomodulation en position 3 et 6 de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one, avec notamment l'ajout de groupements électroattracteurs en position 6 et d'atomes d'halogènes ou groupements *para*-carboxyphényl en position 3 (figure 42) (Pedron, 2018).

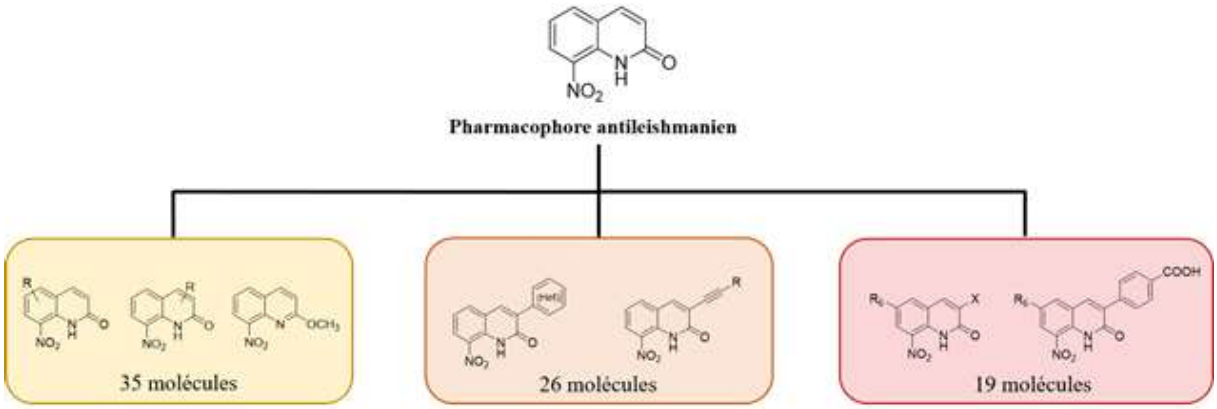


Figure 42. Plan des synthèses de pharmacochimie à partir de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one

II.1.1. Etude des 35 molécules dérivant de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one (partie 1)

Ainsi, l'équipe du LCC est partie de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one pour étudier l'importance de la position et des substituants envisageables, et a synthétisé 35 premières molécules en jouant sur la présence ou non du groupement lactame en position 2, et le type de substituants sur les 2 hétérocycles. Afin de sélectionner les meilleurs candidats, ces 35 molécules ont subi un criblage permettant d'étudier leur relation structure-activité.

II.1.1.1. Tests *in vitro*

a) Mesure de la cytotoxicité

En premier lieu, une évaluation de la cytotoxicité des 35 molécules a été réalisée par le Dr Julien Pedron de l'équipe UMR IRD 152 lors de tests *in vitro*. Cette évaluation se base sur l'utilisation d'une lignée cellulaire humaine HepG2, capable de métaboliser certains composés par l'intermédiaire d'enzymes hépatiques et ainsi obtenir les informations nécessaires sur la toxicité de la molécule mère voire de ses métabolites (Diamond et al., 1980; Roe et al., 1993). Pour cela, suivant le protocole de Mosmann, une incubation de ces cellules avec les 35 molécules a été réalisée, puis du sel de tétrazolium est ajouté. Ce dernier est capable de s'oxyder au contact des cellules viables pour former du sel de formazan émettant un couleur violette. L'UMR IRD 152 a par la suite, mesurer l'absorbance de chaque puits afin de connaitre le pourcentage de cellules viables dans les puits et de calculer la concentration cytotoxique 50 (CC_{50}) (Mosmann, 1983).

BY-NC-ND

Les premiers résultats ont mis en évidence les molécules les moins cytotoxiques avec des CC_{50} > 60 µM, et avec pour les meilleures des CC_{50} > 100 µM (22 molécules). A l'inverse la molécule 26 ne présente plus d'intérêt pour la poursuite des analyses car sa CC_{50} est < 10 µM, (tableau 4). La molécule 22, qui correspond au « pharmacophore » 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one, présente la meilleure des CC_{50} avec une valeur de 164 µM. Cinq autres molécules (15, 25, 24, 8, et 2) présentent des CC_{50} fixes allant respectivement de 60 à 125 µM.

BY-NC-ND

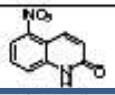
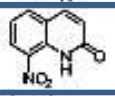
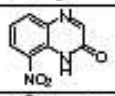
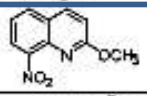
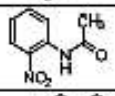
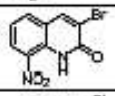
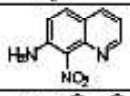
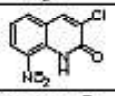
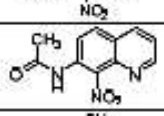
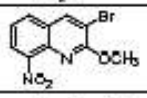
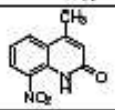
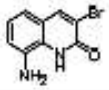
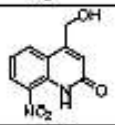
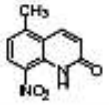
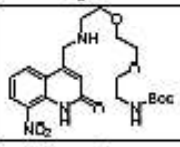
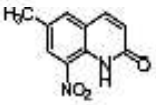
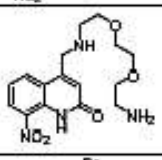
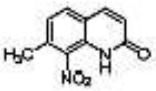
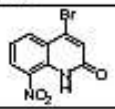
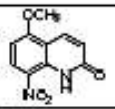
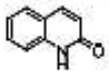
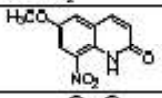
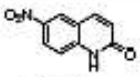
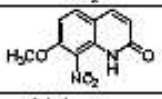
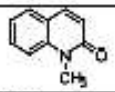
Numéro	Structure	CC50 HepG2 (µM)	Numéro	Structure	CC50 HepG2 (µM)
NB		> 100	21		> 100
1		> 100	22		164 ± 28
2		125 ± 19	23		> 100
3		> 100	24		92 ± 13
4		> 100	25		85 ± 4
5		> 100	26		> 6,2
8		110 ± 9	27		> 100
10		> 100	30		> 100
12		> 100	31		> 100
13		> 100	32		> 100
15		60 ± 2	33		> 100
16		> 100	34		> 100
17		> 100	35		> 100
18		> 100	Doxorubicine		0,2 ± 0,02
			Suramine		>100
Amphotéricine B		5,5 ± 0,25	Eflornithine		>100
Miltéfosine		85 ± 8,8	Fexinidazole		>200

Tableau 4. Résultats de l'évaluation de la cytotoxicité des 35 molécules
(Thèse Julien Pedron, 2019)

BY-NC-ND

b) Mesure de l'activité antiparasitaire

A la suite de ces analyses, les premières mesures concernant les concentrations inhibitrices 50 (CI_{50}) ont été menées sur la souche de *L. infantum* forme amastigote axénique par l'UMR IRD 152 suivant un test à la luciférase (Navizet et al., 2011; Pedron et al., 2018b). Cette même détermination a été réalisée au sein de notre laboratoire sur la souche de *T.b.b.* AnTat 1.9.

La souche de *T.b.b.* AnTat 1.9 nous a été fournie par l'institut de Médecine Tropicale d'Anvers, et est cultivée au sein de notre laboratoire selon le protocole établi par Baltz et *al*. (Baltz et al., 1985).

La détermination de la CI_{50} sur la souche de *T.b.b.* AnTat 1.9 est réalisée avec de l'Alamar Blue® selon le protocole de Räz. L'Alamar Blue® ou résazurine, est un révélateur coloré de couleur bleue, qui lors d'un contact avec des cellules vivantes, est capable d'être réduit en résorufine de couleur rouge qui émet alors en fluorescence aux longueurs d'onde d'émission entre 530 et 560 nm et d'excitation de 590 nm (figure 43) (Räz et al., 1997).

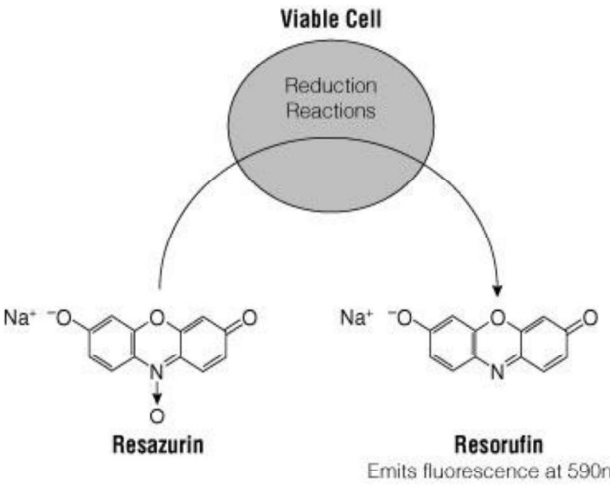


Figure 43. Principe de l'Alamar Blue®

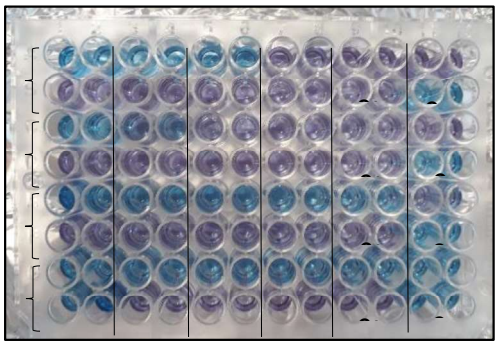


Figure 44. Plaque de culture après ajout de l'Alamar Blue®

Ainsi, les trypanosomes sont mis incubés avec des concentrations décroissantes de molécules pendant 69 h, puis 10 % du volume final est ajouté en résazurine pendant 5 h avant une lecture au fluoromètre (figure 44). Les résultats obtenus donnés en RFU ou unité de fluorescence relative sont analysés grâce au logiciel Graphpad Prism® pour obtenir par régression non linéaire les données de CI_{50} de chacune des 35 molécules (tableau 5).

BY-NC-ND

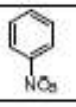
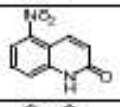
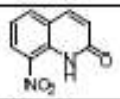
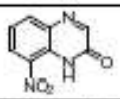
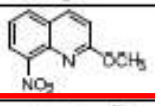
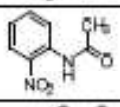
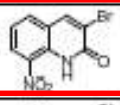
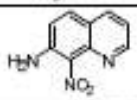
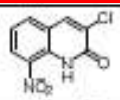
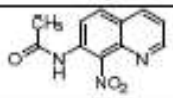
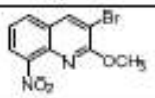
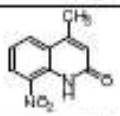
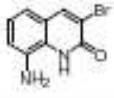
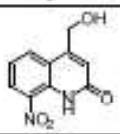
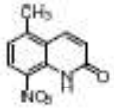
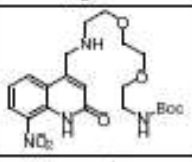
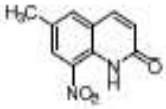
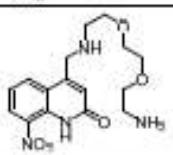
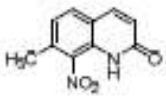
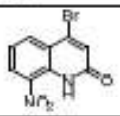
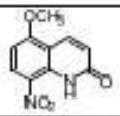
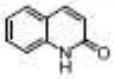
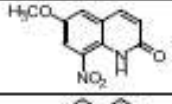
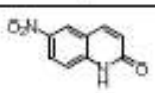
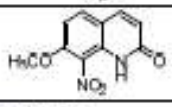
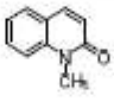
Numéro	Structure	CI50 *T. b. brucei* trypoma. (µM)	Numéro	Structure	CI50 *T. b. brucei* trypoma. (µM)
NB		> 50	21		> 50
1		17,9 ± 1,8	22		23,4 ± 5,7
2		7,3 ± 0,8	23		28,5 ± 8,1
3		> 50	24		1,9 ± 0,4
4		> 50	25		1,2 ± 0,2
5		10,8 ± 1,4	26		0,4 ± 0,1
8		20,9 ± 8,9	27		> 50
10		38,3 ± 6,1	30		29,1 ± 4,7
12		2,5 ± 1,8	31		2,1 ± 0,8
13		7,6 ± 1,8	32		> 50
15		5,5 ± 1,3	33		> 50
16		> 50	34		> 50
17		2,3 ± 0,6	35		> 50
18		> 50	**Eflornithine**		15,8 ± 2,1
			Suramine		0,02 ± 0,009
			Fexinidazole		0,4 ± 0,2

Tableau 5. Résultats de l'évaluation de l'activité trypanocide des 35 dérivés de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one

BY-NC-ND

Les résultats de CC_{50} et de CI_{50} sur la souche de *T.b.b.* AnTat 1.9 présentés dans le tableau permettent de constater que le hit antileshmanien (molécule 22) présente une CI_{50} de 23 µM. Par contre, 13 molécules (1, 2, 5, 8, 12, 13, 15, 17, 22, 24, 25, 26, et 31) (présentées en bleu et rouge) ont une CI_{50} comprise entre 0,4 et 23,5 µM. Parmi ces 13 molécules, la molécule 24 (en rouge) ou 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one, présente le meilleur profil avec une CC_{50} de 92 µM et une CI_{50} de 1,9 µM. Sans groupement -NO_2, on constate la disparition de l'activité trypanocide, comme en atteste les résultats des molécules 16, 18 et 27 ayant une CI_{50} > 50 µM. Toutefois la position du –NO_2 ne joue que peu d'intérêt dans l'activité trypanocide, par exemple la molécule 17 a une activité 10 fois supérieure au hit initial avec une position en 6 du nitro. La fonction lactame présente sur le « hit », ne semble pas indispensable à l'activité trypanocide comme le montrent les molécules 1, 5 et 26 qui ont perdu cette fonction mais présentent une activité trypanocide intéressante (comprise entre 0,4 et 18 µM). Pour la molécule 24 (en rouge) qui est la plus intéressante d'un point de vue activité et cytotoxicité, son indice de sélectivité (IS), correspondant au ratio CC_{50} sur CI_{50}, est de 48, ce qui est supérieur au IS du « hit » de l'ordre de 7. En comparaison avec les molécules de référence, la molécule 24 semble plus efficace que l'eflornithine avec une CI_{50} de 15,9 µM, mais moins que la suramine ou le fexinidazole avec respectivement des CI_{50} de 0,02 et 0,4 µM.

Ainsi il a été montré que la molécule 24 pouvait être considérée comme un nouveau « hit » pour de futures séries de molécules. Partant de ce constat, de nouvelles manipulations ont été réalisées par l'équipe du LCC afin d'évaluer la relation entre l'activité trypanocide et le potentiel de réduction des molécules. De plus, il a été nécessaire de vérifier que les molécules synthétisées et potentiellement substrats de la NTR1, répondaient correctement face à une souche surexprimant cette nitroréductase. Pour cela, le Dr S. Wyllie de l'équipe du Pr A. Fairlamb à Dundee (UK), a mené une étude sur une souche de *T.b.b.* sauvage 'single marker' S427 (T7RPOL TETR NEO), qui a également été modifiée génétiquement pour surexprimer la NTR1, afin de vérifier la potentialisation de l'activité trypanocide (tableau 6).

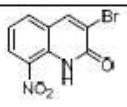
N°	Structure	CI_{50} *T. b. brucei* trypoma. sauvage (µM)	CI_{50} *T. b. brucei* trypoma. NTR^{SE} (µM)
24		17,7 ± 1,0	3,9 ± 0,1
Nifurtimox		1,87 ± 0,05	0,6 ± 0,05

Tableau 6. Tests d'activité de la molécule 24 vis-à-vis d'une souche de *T.b.b* sauvage et une surexprimant la NTR1
(thèse Pedron, 2018)

BY-NC-ND

Les résultats montrent que la molécule 24 présente une meilleure activité trypanocide contre la souche surexprimant la NTR1 par rapport à la souche sauvage. La molécule 24 est substrat de cette enzyme. Son mécanisme d'action passe donc probablement par cette voie de métabolisation.

c) Evaluation de la mutagénicité et de la génotoxicité

Lors du développement d'une nouvelle molécule à visée thérapeutique, les tests d'activité doivent être complétés par des tests de mutagénicité et de génotoxicité *in vitro*, ainsi que par des analyses de pharmacocinétique *in vitro* afin de connaitre le profil toxicologique de la molécule et son profil ADME (Administration, Distribution, Métabolisation et Elimination). Pour cela, l'équipe Vitrome de Marseille sous la direction du Pr N. Azas a utilisé des tests d'Ames, tests de référence au niveau international pour l'évaluation de la mutagénicité. Ce test développé en 1970 par Ames, permet d'évaluer la capacité de molécules à provoquer des dommages génétiques à la suite de mutation (Ames et al., 1973). Ce test repose sur l'emploi de souches de *Salmonella typhimurium* génétiquement modifiées afin de ne pas synthétiser de l'histidine, un acide aminé essentiel à leur croissance et développement. Cette bactérie n'ayant pas l'équipement pour métaboliser les molécules, un mélange appelé S9 mix, composé de microsomes hépatiques incluant des cytochromes P450 et différentes enzymes nécessaires à la métabolisation, a été utilisé. Il permet d'évaluer si le caractère mutagène provient de la molécule mère, de son ou ses métabolites ou des deux. Ainsi la molécule 24 a été mise en contact avec ces souches de bactéries, afin d'observer si les bactéries sont à nouveau capables de croitre sur leur milieu pauvre en histidine, signant là une mutation induite par la molécule (tableau 7).

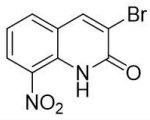
Test d'Ames Positif		
	5 mM	50 mM
TA097a + S9 mix	+	+
TA098 + S9 mix	+	+
TA100 + S9 mix	+	+
TA102 + S9 mix	-	+
Benzo[*a*]pyrene	+	+

Tableau 7. Résultats du test d'Ames pour la molécule 24

BY-NC-ND

Les résultats obtenus montrent que la molécule 24 ou ses métabolites répondent positivement au test d'Ames et sont donc mutagènes. Or il a été démontré que les souches de *S. typhimurium*, possèdent des nitroréductases, et donc que les molécules nitroaromatiques peuvent être substrats de ces NTRs et ainsi être à l'origine de faux positifs (Speck et al., 1981; Yanto et al., 2010).

Il a donc été nécessaire d'évaluer sa génotoxicité par un test plus récent appelé test des comètes, utilisant cette fois-ci des cellules eucaryotes. Ce test développé dans les années 80, permet de mettre en évidence des dommages de l'ADN induits par un agent génotoxique (Ostling and Johanson, 1984; Collins, 2015; Singh, 2016). Cette évaluation a été menée par le Pr E. Boutet-Robinet de l'équipe Toxalim de Toulouse. Il a consisté à incuber des cellules HepG2 avec la molécule 24 pendant 2 h et 72 h, puis de les inclure dans un gel d'agarose pour les déposer sur des films de polyester afin de pouvoir par la suite lyser les cellules et libérer les noyaux. Les films de polyester sont par la suite placés dans des bains électrophorétiques permettant la dénaturation des noyaux d'ADN. Ces derniers seront capables de migrer. Une coloration sera réalisée afin d'observer sous microscope à fluorescence, les éventuels dégâts causés par la molécule (tableau 8) (Glei et al., 2016).

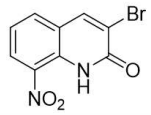
Test des comètes Négatif		
	t= 2 h	72 h
1 µM	-	-
10 µM	-	-
20 µM	-	-
40 µM	-	-
Methane Methylsulfonate	+	+

Tableau 8. Résultats du test des comètes pour la molécule 24

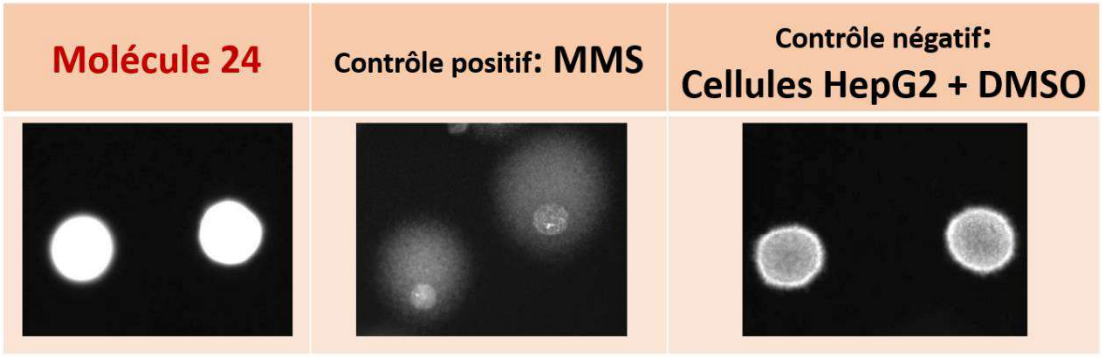


Figure 45. Résultats du test des comètes pour la molécule 24
(Grossissement x200) (MMS : MethaneMéthylSulfonate)

BY-NC-ND

Les résultats obtenus permettent de dire que la molécule 24 n'est pas génotoxique au bout de 2 h ou 72 h d'incubation et cela quel que soit la concentration utilisée (1, 10, 20 et 40 µM). Nous pouvons en effet constater que la molécule 24 n'entraine aucune lésion de l'ADN et que ce dernier est capable de migrer sans former de « comètes », à l'inverse du MMS, agent alkylant utilisé comme témoin négatif provoquant des lésions de l'ADN (figure 45).

d) Etudes de pharmacocinétique

Afin de compléter les données sur la molécule 24, des études de pharmacocinétique ont été menées par Mme C. Piveteau de l'équipe U1177 « Drugs and molecules for living systems » à l'Institut Pasteur de Lille, pour connaitre son comportement au sein d'un organisme et plus particulièrement lors du contact avec les cellules responsables de sa métabolisation et de son élimination. Pour cela une étude de la stabilité microsomale et une étude de la fixation aux protéines plasmatiques ont été initiées.

L'étude de la stabilité microsomale a consisté à incuber la molécule 24 avec des microsomes hépatiques murins capables grâce aux différentes enzymes et cytochrome P450 présents de métaboliser le composé et de suivre sa dégradation au cours du temps.

Les analyses par LC-MS ont permis de montrer que la molécule 24 était stable avec une demi-vie supérieure à 40 min, comparativement au propranolol (contrôle positif) qui lui est métabolisé au bout de 40 min à plus de 80% (figure 46).

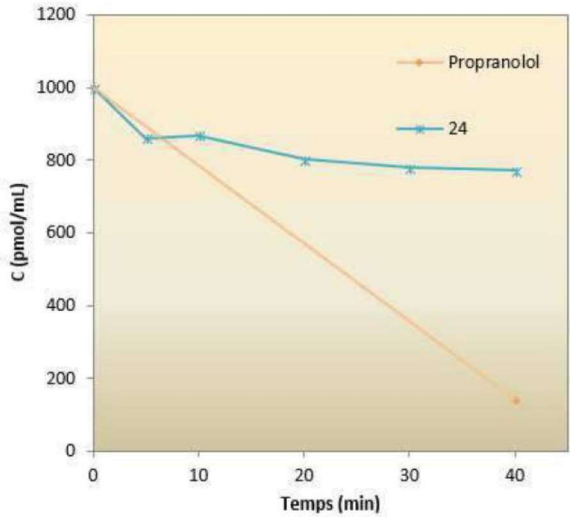


Figure 46. Résultats de la stabilité microsomale de la molécule 24

Nous avons évalué la fixation de la molécule 24 aux protéines plasmatiques et plus spécifiquement à l'albumine. En effet, le devenir d'une molécule dans l'organisme et plus

BY-NC-ND

particulièrement dans la circulation sanguine va dépendre de sa capacité à se lier ou non aux protéines plasmatiques dont l'albumine. Il existe en effet, 2 catégories de molécules, celles qui vont se lier aux protéines plasmatiques, et celles qui seront libres et vont donc pouvoir directement diffuser dans le milieu aqueux. Or, seule cette fraction libre de la molécule est capable d'agir et d'exercer son activité biologique. Il est donc primordial pour les molécules se liant aux protéines plasmatiques de trouver un équilibre entre la fraction libre et la fraction liée (Smith et al., 2010).

Pour évaluer cela, un test *in vitro* de fixation à l'albumine a été initié. La molécule 24 a été incubée en présence de plasma humain, puis une analyse est faite par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Les résultats sont présentés dans le tableau 9.

Molécule	% lié	Fraction libre (fu)	Log (fu)
24	**92,2**	0,078	-1,11
Warfarine	99,16	0,008	-2,074
Diclofénac	99,76	0,002	-2,614

Tableau 9. Résultats du test de fixation à l'albumine pour la molécule 24

Nous constatons que la molécule 24 présente une importante affinité pour l'albumine avec 92,2 % de fixation.

Les résultats de la molécule 24 ont permis de répondre à de nombreuses interrogations concernant sa structure, son activité associée sur des souches sauvages surexprimant la NTR1 pour les trypanosomes, son éventuelle toxicité et son comportement possible au sein d'un organisme. Mais il reste encore à améliorer certains points qui ont conduit les chimistes du LCC à synthétiser des dérivés de ce nouveau « hit » en effectuant des pharmacomodulations sur les positions 3 et 6 de la molécule mère.

Ce premier travail a permis la publication d'un article en 2018 intitulé « Novel 8-nitroquinolin-2(1*H*)-ones as NTR-bioactivated antikinetoplastid molecules: Synthesis, electrochemical and SAR study » (Pedron et al., 2018b).

BY-NC-ND

Novel 8-nitroquinolin-2(1*H*)-ones as NTR-bioactivated antikinetoplastid molecules: Synthesis, electrochemical and SAR study

Julien Pedron, **Clotilde Boudot**, Sébastien Hutter, Sandra Bourgeade-Delmas, Jean-Luc Stigliani, Alix Sournia-Saquet, Alain Moreau, Elisa Boutet-Robinet, Lucie Paloque, Emmanuelle Mothes, Michèle Laget, Laure Vendier, Geneviève Pratviel, Susan Wyllie, Alan Fairlamb, Nadine Azas, Bertrand Courtioux, Alexis Valentin, et Pierre Verhaeghe

Publié en juillet 2018

Résumé :

Pour étudier le pharmacophore antiparasitaire 8-nitroquinoléine-2(1H)-one, une série de 31 dérivés a été synthétisée en 1 à 5 étapes et évaluée *in vitro* contre *Leishmania infantum* et *Trypanosoma brucei brucei*. Parallèlement, le potentiel de réduction de toutes les molécules a été mesuré par voltampérométrie cyclique. Les relations structure-activité ont d'abord montré que l'activité antileishmanienne dépend d'une liaison hydrogène intramoléculaire (décrite par diffraction des rayons X) entre la fonction lactame et le groupement nitro, qui est responsable d'un déplacement important du potentiel redox (+0,3 V en comparaison avec la 8-nitroquinoléine). A l'aide de la chimie informatique, un ensemble de dérivés présentant une large gamme de potentiels rédox (de -1,1 à -0,45 V) a été obtenu et a fourni un ensemble de molécules appropriées à synthétiser et à tester. Cette approche a mis en évidence que, dans cette série, seuls les substrats ayant un potentiel rédox supérieur à -0,6 V présentent une activité contre *L. infantum*. Néanmoins, une telle relation entre les potentiels rédox et les activités antiparasitaires *in vitro* n'a pas été observée chez *T. b. brucei*. Ainsi, le composé 22, un nouveau composé de la série, présente une activité antileishmanienne et antitrypanosomale ainsi qu'une faible cytotoxicité sur la lignée cellulaire humaine HepG2. Ce composé est sélectivement bioactivé par les nitroréductases de type 1 (NTR1) de *L. donovani* et *T. brucei brucei*. De plus, bien que mutagène lors du test d'Ames, comme la plupart des dérivés nitroaromatiques, le composé 22 n'est pas génotoxique. Les paramètres pharmacocinétiques *in vitro* ont été déterminés et ont mis en évidence une bonne stabilité microsomale *in vitro* (demi-vie > 40 min) et une liaison de 92 % à l'abumine humaine.

BY-NC-ND

European Journal of Medicinal Chemistry 155 (2018) 135–152

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ejmech

Research paper

Novel 8-nitroquinolin-2(1*H*)-ones as NTR-bioactivated antikinetoplastid molecules: Synthesis, electrochemical and SAR study

Julien Pedron [a], Clotilde Boudot [b], Sébastien Hutter [c], Sandra Bourgeade-Delmas [d], Jean-Luc Stigliani [a], Alix Sournia-Saquet [a], Alain Moreau [a], Elisa Boutet-Robinet [e], Lucie Paloque [a], Emmanuelle Mothes [a], Michèle Laget [f], Laure Vendier [a], Geneviève Pratviel [a], Susan Wyllie [g], Alan Fairlamb [g], Nadine Azas [c], Bertrand Courtioux [b], Alexis Valentin [d], Pierre Verhaeghe [a, *]

[a] LCC-CNRS Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France
[b] Université de Limoges, UMR INSERM 1094, Neuroépidémiologie Tropicale, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Dr Marcland, 87025, Limoges, France
[c] IHU Méditerranée Infection, équipe VITROME « Vecteurs, Infections Tropicales et Méditerranéennes, 19-21 boulevard Jean Moulin, 13385, Marseille Cedex 05, France
[d] UMR 152 PharmaDev, Université de Toulouse, IRD, UPS, Toulouse, France
[e] Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France
[f] UMR MD1, U1261, AMU, INSERM, SSA, IRBA, MCT, Marseille, France
[g] University of Dundee, School of Life Sciences, Division of Biological Chemistry and Drug Discovery, Dow Street, Dundee, DD1 5EH, Scotland, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 March 2018
Received in revised form
31 May 2018
Accepted 1 June 2018
Available online 5 June 2018

Keywords:
Anti-kinetoplastids
Leishmania
Trypanosoma
8-Nitroquinolin-2(1*H*)-one
Nitroreductases
Electrochemistry

ABSTRACT

To study the antiparasitic 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one pharmacophore, a series of 31 derivatives was synthesized in 1–5 steps and evaluated *in vitro* against both *Leishmania infantum* and *Trypanosoma brucei brucei*. In parallel, the reduction potential of all molecules was measured by cyclic voltammetry. Structure-activity relationships first indicated that antileishmanial activity depends on an intramolecular hydrogen bond (described by X-ray diffraction) between the lactam function and the nitro group, which is responsible for an important shift of the redox potential (+0.3 V in comparison with 8-nitroquinoline). With the assistance of computational chemistry, a set of derivatives presenting a large range of redox potentials (from −1.1 to −0.45 V) was designed and provided a list of suitable molecules to be synthesized and tested. This approach highlighted that, in this series, only substrates with a redox potential above −0.6 V display activity toward *L. infantum*. Nevertheless, such relation between redox potentials and *in vitro* antiparasitic activities was not observed in *T. b. brucei*. Compound **22** is a new hit compound in the series, displaying both antileishmanial and antitrypanosomal activity along with a low cytotoxicity on the human HepG2 cell line. Compound **22** is selectively bioactivated by the type 1 nitroreductases (NTR1) of *L. donovani* and *T. brucei brucei*. Moreover, despite being mutagenic in the Ames test, as most of nitroaromatic derivatives, compound **22** was not genotoxic in the comet assay. Preliminary *in vitro* pharmacokinetic parameters were finally determined and pointed out a good *in vitro* microsomal stability (half-life > 40 min) and a 92% binding to human albumin.

Crown Copyright © 2018 Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Kinetoplastids are protozoan parasites responsible for deadly mammalian infections; *Leishmania* spp and *Trypanosoma* spp being the two main genera encountered in human pathology. These parasites are transmitted to their mammalian hosts by the bite of specific insect vectors. Among the *Leishmania* genus, *L. donovani* and *L. infantum* are the two most important species responsible for visceral leishmaniasis (VL), the most severe and often lethal clinical form of the disease. Briefly, VL occurs in humans after the bite of a sandfly (*Phlebotominae*) which injects the metacyclic flagellated

* Corresponding author.
E-mail addresses: pierre.verhaeghe@lcc-toulouse.fr, pierre.verhaeghe@univ-tlse3.fr (P. Verhaeghe).

https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.001
0223-5234/Crown Copyright © 2018 Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

promastigote stage of the parasite into the skin. Parasites are then phagocytized by macrophages and other types of mononuclear phagocytic cells where they transform into the amastigote stage and multiply, bypassing the immune system of the host. Infected cells disseminate in many tissues and organs such as lymph nodes, liver, spleen and bone marrow, leading to death [1]. In the *Trypanosoma* genus, in addition to *T. cruzi* species, causing Chagas disease in South and Central America, the *T. brucei* species (*T. brucei gambiense* or *T. brucei rhodesiense*) are responsible for Human African Trypanosomiasis (HAT), also called "sleeping sickness". During HAT, the flagellated trypomastigote stage of the parasites penetrates into the blood stream *via* the bite of a "tsetse fly" and disseminates into the whole organism. In a first step of the disease, headaches, anemia, joint pain and various organ damage occur. Then, in a second step, the parasites invade the central nervous system, causing various neurological changes such as sleeping disorders (responsible for the name of the disease), abnormal tone and mobility, ataxia, psychiatric disorders, seizures, coma and finally, death [2].

It is important to note that all these kinetoplastid infections are lethal if untreated and that very few efficient, safe and affordable drugs are available on the market for the low-income infected patients living in developing countries, which makes these parasitic infections belong to the group of "Neglected Tropical Diseases" [3]. Regarding recent epidemiologic data, the WHO indicates that more than 1 billion people are at risk of contracting VL and that 300.000 new cases occur every year, responsible for about 20.000 deaths [4]. Concerning HAT, 61 million people would be at risk of contracting the disease, no clear data being available about HAT mortality [5]. Approved drugs against VL are amphotericin B, miltefosine, antimony V derivatives and pentamidine. The liposomal form of amphotericin B, although being quite efficient, is also very expensive and requires parenteral administration, which makes it unsuitable for treating most of infected patients [6]. Pentamidine and pentavalent antimony derivatives are toxic agents which use is limited by parasitic resistances and poor efficacy [7]. Miltefosine (Fig. 1) remains the only orally available drug, but it is a teratogenic molecule, preventing its use in women of child-bearing age [6]. The context of anti-HAT drugs is quite similar with only one orally available drug [8]. In addition to pentamidine, suramin is used in the treatment of the first stage of the disease, with nifurtimox in combination with eflornithine (NECT, Fig. 1) for treatment of the second (cerebral) stage of HAT. NECT has largely replaced the use of melarsoprol, a highly toxic arsenic-containing drug [2].

Unfortunately, there are very few new chemical entities under clinical trial in 2018 against both VL and HAT [8]. In this worrying context, there is a critical need to identify new active molecules and, as observed in the field of tuberculosis, various nitroheterocycles such as delamanid and fexinidazole are re-emerging as key anti-infective molecules [9,10]. Fexinidazole (Fig. 1) is a 5-nitroimidazole derivative that was first evaluated against visceral leishmaniasis in a phase II clinical trial. Although not sufficiently efficient for use as a monotherapy for VL, fexinidazole has now demonstrated efficacy against early and late stages of HAT in a pivotal Phase III clinical trial [11,12]. Fexinidazole is part of these nitroaromatic molecules which are selectively activated by parasitic nitroreductases (NTRs) to generate electrophilic cytotoxic metabolites [13,14]. Unfortunately, no parasitic NTR X-ray structure is available and most classical rational medicinal chemistry approaches cannot be used for the design of new synthetic substrates of these key enzymes. In this context, our group initiated a research around a class of 8-nitroquinoline derivatives with antiparasitic potential [15] and identified an antileishmanial pharmacophore in 2012, corresponding to the 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one scaffold (Fig. 1) [16]. Some more recent modulations of the position 4 of this pharmacophore failed to achieve more active derivatives [17,18]. Here, we present a comprehensive study of the structure-activity relationships of this pharmacophore, especially focusing on the modulation of the redox potentials. Thirty one pharmacophore derivatives, substituted at positions 3, 4, 5, 6 and 7, were synthesized and their *in vitro* cytotoxicity and activities against *L. infantum* (axenic amastigotes), and *T. brucei brucei* (trypomastigotes) were first determined. The original pharmacophore possessed poor antitrypanosomal activity, whereas a new derivative (compound **22**) was identified, active against all tested kinetoplastids (*L. donovani* promastigotes, *L donovani* intramacrophage amastigotes, *L. infantum* axenic amastigotes and *T. brucei brucei* trypomastigotes). The antileishmanial mechanism of action of this new hit-compound will be discussed along with its mutagenicity and genotoxicity, a key aspect concerning nitroaromatic compounds. Finally, two preliminary *in vitro* pharmacokinetic properties were measured and appear favorable for further development of this anti-kinetoplastid pharmacophore.

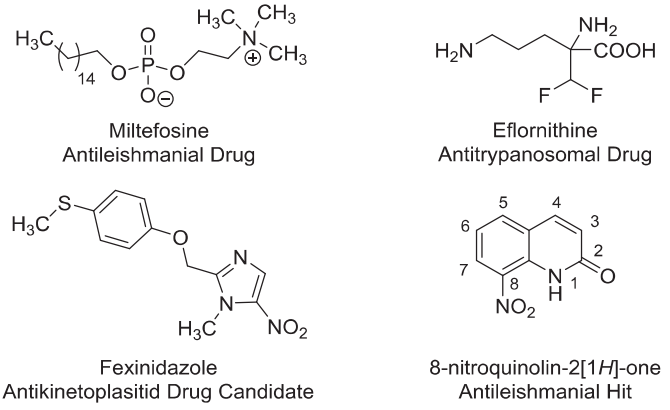


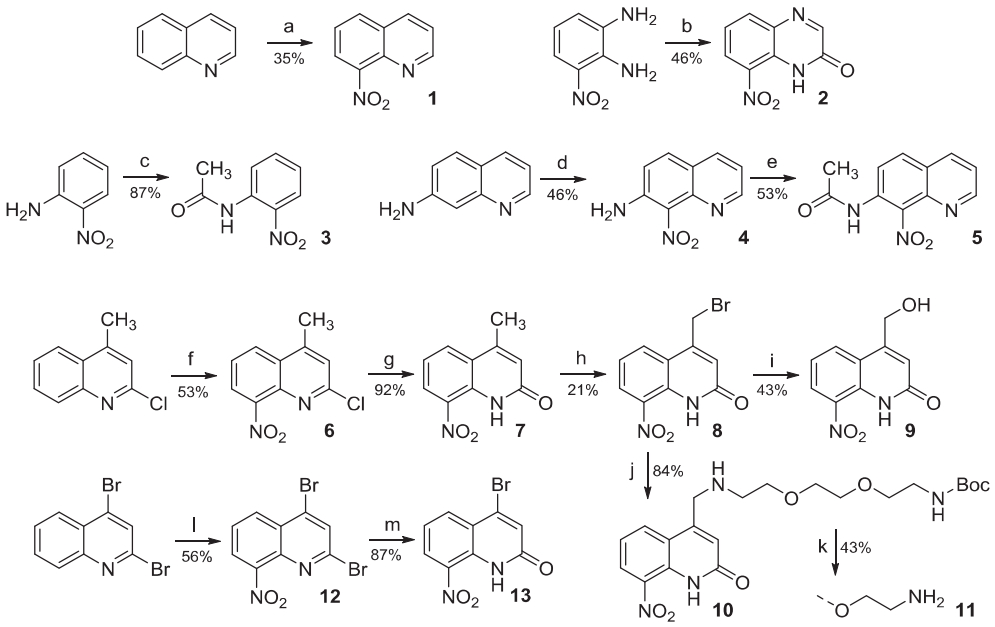
Fig. 1. Structures of the antikinetoplastid drugs miltefosine and eflornithine, drug-candidate fexinidazole and antileishmanial hit 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one.

2. Results and discussion

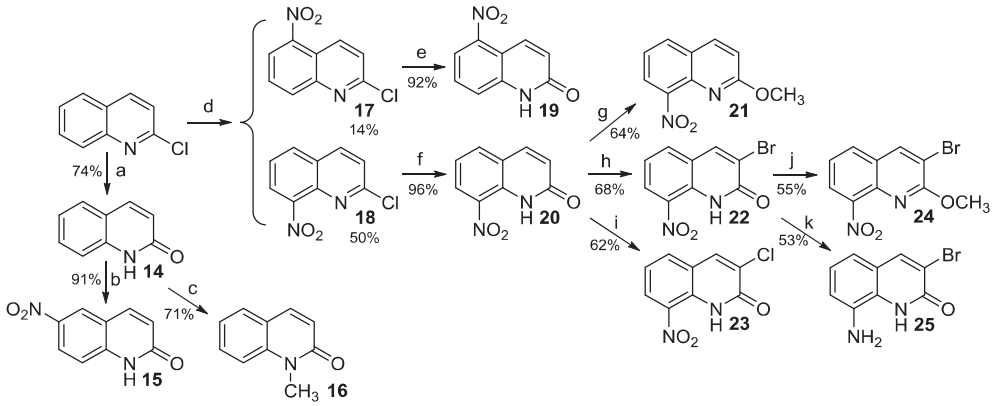
2.1. Chemistry

Thirty one derivatives of the initial 8-nitroquinolin-2-(1*H*)-one pharmacophore, including 14 original ones, were prepared. As presented in Scheme 1, compounds **1**–**5** were obtained by classical nitration, cyclo-condensation or *N*-acetylation reactions. Nitration at position 8 of 2-chloro-4-methylquinoline afforded **6** whose chloroimine moiety reacted with perchloric acid to generate the corresponding lactam **7**, according to a simple and efficient previously reported procedure [19]. Bromination of **7** with *N*-bromosuccinimide led to the bromomethyl derivative **8** which was reacted with sodium hydroxide to generate hydroxymethyl derivative **9**. From bromomethyl **8**, by reacting with an amine, it was also possible to access to **10** and its deprotected counterpart **11**. From 2,4-dibromoquinoline, by a sequential nitration/lactamisation procedure, **12** and **13** were obtained in good yields.

As presented in Scheme 2, the 2-chloroquinoline was the main substrate used in this work. It was first reacted with perchloric acid to generate lactam 14 which was either nitrated at position 6, to afford compound **15** or *N*-methylated with methyl iodide, to afford 16 in good yields. The nitration of 2-chloroquinoline mainly leaded to the 2 position isomers 17 and 18 which were transformed into the corresponding lactams 19 and 20. Compound 20 was either *O*-methylated with methyl iodide, forming 21, or selectively halogenated at position 3 by refluxing in HBr or HCl in the presence of sodium bromate or sodium chlorate, to generate derivatives 22 and



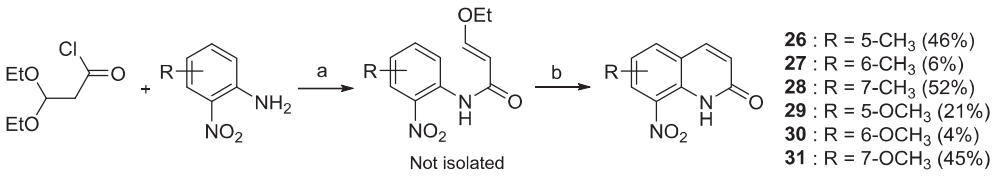
Scheme 1. Synthetic routes for the preparation of compounds 1–13. (a) H_2SO_4, HNO_3, rt, 1 h; (b) glyoxylic acid, EtOH, 80 °C, 6 h; (c) CH_3COOH, Ac_2O, 120 °C, 3 h; (d) H_2SO_4, HNO_3, rt, 4 h; (e) CH_3COOH, Ac_2O, 120 °C, 24 h; (f) H_2SO_4, HNO_3, rt, 3 h; (g) CH_3CN, $HClO_4$, 100 °C, 24 h; (h) NBS, AIBN, CCl_4, 80 °C, 24 h; (i) NaOH, H_2O/THF, 50 °C, 24 h; (j) $NH_2(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2NHBoc$, THF, 50 °C, 24 h; (k) HCl (5 N in isopropanol), rt, 4 h; (l) H_2SO_4, HNO_3, rt, 2 h; (m) CH_3CN, $HClO_4$, MW, 100 °C, 1 h.



Scheme 2. Preparation of compounds 14–25 from 2-chloroquinoline. (a) CH_3CN, $HClO_4$, 100 °C, 72 h; (b) H_2SO_4, HNO_3, rt, 1 h; (c) DMF, K_2CO_3, CH_3I, 80 °C, 48 h; (d) H_2SO_4, HNO_3, rt, 2 h; (e) CH_3CN, $HClO_4$, 100 °C, 72 h; (f) CH_3CN, $HClO_4$, 100 °C, 72 h; (g) Ar., DMF, NaH, CH_3I, rt, 24 h; (h) $NaBrO_3$, HBr, 100 °C, 5 h; (i) $NaClO_3$, HCl, 100 °C, 45 min; (j) Ar., DMF, NaH, CH_3I, rt, 24 h; (k) EtOH, $SnCl_2$, 80 °C, 3 h.

23. Note that this specific halogenation procedure (*in situ* Br_2 or Cl_2 formation and reaction in refluxing aqueous medium), reported by O'Brien and co-workers [20], is the only one allowing selective halogenation at position 3 among many others that were tested. The 3-brominated derivative **22** reacted with methyl iodide to form *O*-methylated derivative **24** or was reduced into the amino-derivative **25** b y using $SnCl_2$.

Finally, as presented in Scheme 3, we also used another synthetic pathway allowing the preparation of 8-nitroquinolinone derivatives bearing substituents on the benzene moiety. This strategy was reported by Zaragoza and co-workers [21]. First, commercial 3,3′-diethoxyethylpropionate was saponified into the corresponding carboxylic acid which was then reacted with $SOCl_2$ to form the acyl chloride. This acyl chloride was then reacted with various *ortho*-nitroanilines, to give the corresponding *N*-acylated products which were not isolated. In a final step, cyclization was



Scheme 3. Preparation of compounds 26–31 from nitroanilines subtrates. (a) CH_2Cl_2, Pyridine, rt, 24 h; (b) H_2SO_4, rt, 3–4 h.

operated in 98% H_2SO_4, giving the expected products 26–31. The reaction yields are moderate when using 2-nitroanilines substituted at position 3 or 5 by electron donating groups but turn to be very low when using 2-nitroanilines substituted at position 4 by the same groups.

3. Compound evaluation

3.1. In vitro activity against L. infantum and T. brucei brucei: importance of the redox potential

All synthesized molecules were screened *in vitro* toward both *L. infantum* axenic amastigotes and *T. brucei brucei* trypomastigotes and compared with commercial reference drugs (amphotericin B and miltefosine against *L. infantum*, suramin and eflornithine against *T. brucei*) along with drug-candidate fexinidazole (Table 1). To assess antiparasitic selectivity, the cytotoxicity of all compounds was also measured on the HepG2 human cell line, using doxorubicin as control. In parallel the LogP of all compounds were calculated and the reduction potentials were measured by cyclic voltammetry in DMSO. The redox potentials measured correspond to a one electron reduction/oxidation regarding the redox couple nitro group/anion radical. Only one new hit compound (**22**) was evaluated in greater depth, as the best compound in the series regarding both activity and selectivity.

Globally, apart from molecule **24**, all synthesized compounds were soluble in aqueous medium and could be evaluated *in vitro*. Out of the 31 tested compounds, none appeared cytotoxic on the HepG2 cell line, nine were active toward *L. infantum* axenic amastigotes ($7\ \mu M \leq IC_{50} \leq 25\ \mu M$) and thirteen were active against *T. brucei brucei* trypomastigotes ($2\ \mu M \leq IC_{50} \leq 25\ \mu M$), molecule **24** being excluded from the analysis because of its lack of solubility. As a first approach, we wanted to see if there was a relationship between activity and lipophilicity. Computed LogP, ranging from 1.15 to 2.5 did not show any correlation, active molecules presenting either low (compound 2) or high (compound 22) LogP values.

We then explored the structure-activity relationships (SARs) of the pharmacophore by focusing on the influence of the redox potentials toward the activity against *L. infantum*. Indeed, on the basis that this nitroaromatic pharmacophore could be the substrate of parasitic nitroreductases, it first appeared important to understand which chemical criteria would make this pharmacophore suitable for being efficiently reduced into cytotoxic metabolites. The basic redox potential value of 8-nitroquinoline 1 (−0.84 V) and nitrobenzene (−0.85 V) are quite low and do not seem suitable for the catalytic capabilities of the parasitic nitroreductases (Fig. 2). On the contrary, when the lactam function is combined with the presence of a nitro group at position 8 (initial hit), a significant increase in the value of the redox potential, up to −0.54 V, is observed and the molecule turns active. When keeping the lactam function while moving the nitro group at position 6 or 5 (compounds **15** and **19**), redox potentials become lower and the IC_{50} values of the molecules increased, resulting in a loss of activity against *L. infantum*. The same effect is noted with inactive *O*-methylated analog (compound **21**), which redox potential drastically fell to −0.93 V (Fig. 2). Finally, adding an amide function in the *ortho* position of the nitrogroup (compounds **3** and **5**) did not provide an optimal value of redox potential (−0.68 V and −0.86 V, respectively) resulting in poor antileishmanial activity of the compounds. Thus the 8-nitroquinolin-2-(1*H*)-one scaffold definitely appears to be the antileishmanial pharmacophore. Besides, as presented in the X-ray diffraction structures (Fig. 3), this pharmacophore presents a noticeable intramolecular hydrogen bond between the lactam function and the nitro group at position 8, responsible for a +0.3 V increase in redox potentials, allowing antileishmanial activity. Nevertheless, molecules 26 and 30, which present the same redox potential, do not have the same antileishmanial activity (26 being moderately active and 30 being inactive). By examining their LogP values (respectively 2.05 and 1.38) it could be hypothesized that antileishmanial activity depends on a compromise between redox potential values and lipophilicity.

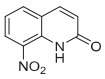
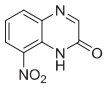
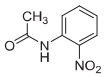
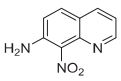
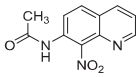
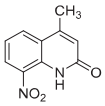
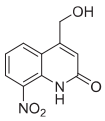
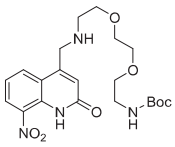
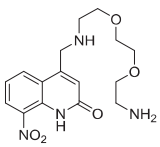
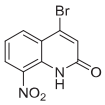
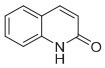
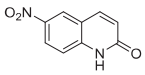
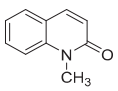
Contrary to what was observed in *Leishmania*, the antitrypanosomal activity did not depend on the redox potential values in the studied series, active molecules presenting either low (compound **15**) or high (compound **22**) redox potential values. It could be hypothesized that the enzymatic capabilities of the *T. brucei* NTR may be compatible with a broader spectrum of redox potentials than the ones of *L. donovani* NTR.

Optimization of redox potentials: computational and *in vitro* studies.

From this point, we investigated the antileishmanial pharmacomodulation of 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one by introducing various substituents (or heteroatoms) at all positions of the scaffold and compared the effect of electron-donating and electron withdrawing groups, to gain access to new optimized derivatives. Our goal was to synthesize a series of derivatives presenting a large spectrum of redox potentials, not only to gain a better understanding of the electrochemical process, but also to define as precisely as possible the lowest redox potential value compatible with activity in the series. For that purpose instead of synthesizing molecules randomly, we used ab initio calculations to estimate the redox potential values of many hypothetical derivatives. Previous studies about the computation of reduction potentials of nitroaromatic derivatives showed that the results are very sensitive to the basis set applied. Diffuse s and p-type functions, combined with polarization functions were shown to be important for electron affinity calculations of nitrobenzenes [22,23]. Because accurate results were obtained with the Pople's 6–311++G basis set on several molecules for which computed potentials were compared to experimental ones, the 6–311++G (2 d, 2p) basis set was selected as a good compromise between accuracy and computational cost for reduction potential calculations. The hybrid M06-2x density functional was chosen for its accuracy to compute thermochemical parameters. The standard redox potentials were computed with the Faraday's law (see equation (1) in the experimental section) from the free energy of the one-electron reduction. Fig. 4 shows the correlation between the experimental and theoretical redox potentials. It can be seen that the slope of the correlation is close to 1.00 and the correlation coefficient (r) is 0.97. Therefore, this model was very efficient for predicting the standard redox potentials and was used to select the most appropriate compounds to be synthesized and evaluated.

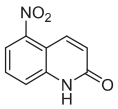
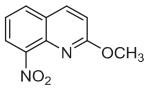
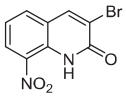
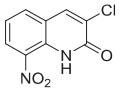
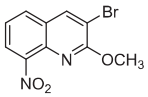
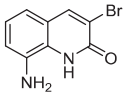
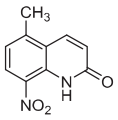
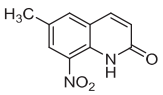
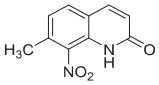
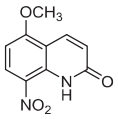
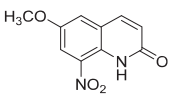
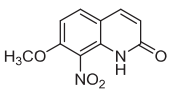
The studied series was completed with 11 derivatives of the pharmacophore presenting redox potentials ranging from −0.75 V to −0.45 V. Fig. 5 shows that introducing a heteroatom at position 4 of the scaffold (quinoxaline analog 2) or a halogen atom at position 3 (compounds 22 and 23) increased the redox potential values by about +0.1 V, the corresponding molecules being active against *L. infantum*. When modifying the pyridinone moiety by introducing a methyl group or a bromine atom at position 4 (compounds 7 and 13, respectively), the redox potential almost remained unchanged and the molecules were active. By substituting the benzene moiety with a methyl group at position 5 or 6 (compounds 26 and 27), the redox potentials decreased slightly (down to −0.58 V) and the molecules, were less efficient ($IC_{50} \approx 25\ \mu M$). Compounds bearing a methoxy group at positions 5, 6 or 7 (compounds **29–31**) or a methyl group at position 7 (compound **28**) showed lower redox potentials, varying from −0.58 V to −0.75 V, and were totally inactive ($IC_{50} > 100\ \mu M$). Thus, in this series, it can be noted that the optimal redox potential value to target in order to obtain

Table 1
Reduction potentials, calculated LogP, anti-kinetoplastid activity and cytotoxicity of the synthesized nitroaromatic compounds **1**–**31**.

Molecule	Structure	E° (V/NHE)[a]	LogP[b]	*L. infantum* axenic amastigote IC_{50} (μM)	*T. brucei brucei* trypomastigote IC_{50} (μM)	HepG2 *Cytotoxicity* CC_{50} (μM)
Initial hit		- 0.54	1.54	15.5 ± 0.5	23.4 ± 5.7	164 ± 28
Nitro-benzene (NB)		- 0.85	1.91	>100[d]	>50[d]	>100[d]
1		- 0.84	2.07	>100[d]	17.9 ± 1.8	>100[d]
2		- 0.46	1.2	11.0 ± 2.1	7.3 ± 0.8	125 ± 19
3		- 0.68	1.15	>100[d]	>50[d]	>100[d]
4		- 1.1	1.89	>100[d]	>50[d]	>100[d]
5		- 0.86[c]	1.31	>100[d]	10.8 ± 1.4	>100[d]
7		- 0.53	2.05	10.2 ± 1.0	20.9 ± 8.9	110 ± 9
9		–	–	23.4 ± 4.8	38.3 ± 6.1	>100[d]
10		–	–	>100[d]	2.5 ± 1.8	>100[d]
11		–	–	>100[d]	7.6 ± 1.8	>100[d]
13		- 0.51	1.86	20.3 ± 5.0	5.5 ± 1.3	60 ± 2
14		- 1.86[b]	–	>100[d]	>50[d]	>100[d]
15		- 0.82	1.54	>100[d]	2.3 ± 0.6	>100[d]
16		–	–	>100[d]	>50[d]	>100[d]

(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

Molecule	Structure	E° (V/NHE)[a]	LogP[b]	*L. infantum* axenic amastigote IC_{50} (μM)	*T. brucei brucei* trypomastigote IC_{50} (μM)	HepG2 *Cytotoxicity* CC_{50} (μM)
19		- 0.67	1.54	>100[d]	>50[d]	>100[d]
21		- 0.93	2.51	88.8 ± 13.0	28.5 ± 8.1	>100[d]
22		**- 0.45**	**2.36**	**7.1 ± 1.5**	**1.9 ± 0.4**	**92 ± 13**
23		- 0.47	2.2	16.0 ± 0.9	1.2 ± 0.2	85 ± 4
24		- 0.86	–	>6.2[e]	0.4 ± 0.1	>6.2[e]
25		–	–	>50[d]	>50[d]	>100[d]
26		- 0.58	2.05	25.2 ± 3.7	29.1 ± 4.7	>100[d]
27		- 0.56	2.05	23.0 ± 5.0	2.1 ± 0.8	>100[d]
28		- 0.71	2.05	>100[d]	>50[d]	>100[d]
29		- 0.65	1.38	>100[d]	>50[d]	>100[d]
30		- 0.58	1.38	>100[d]	>50[d]	>100[d]
31		- 0.75	1.38	>100[d]	>50[d]	>100[d]
Doxorubicin[f]		–	–	–	–	0.2 ± 0.02
Amphotericin B[g]		–	–	0.06 ± 0.001	–	5.5 ± 0.25
Miltefosine[g]		–	–	0.8 ± 0.2	–	85 ± 8.8
Fexinidazole[g,h]		–	–	3.4 ± 0.8	0.4 ± 0.2	>200[c]
Suramin[h]		–	–	–	0.02 ± 0.009	>100[c]
Eflornithine[h]		–	–	–	15.8 ± 2.1	>100[c]

[a] Cyclic voltammetry conditions: DMSO/$TBAPF_6$, SCE/GC, 1 electron reversible reduction, values are given in V versus NHE.
[b] Weighted logP were computed with Marvin® (ChemAxon).
[c] Irreversible reduction.
[d] The IC_{50} or CC_{50} value was not reached at the highest tested concentration.
[e] The product could not be tested at higher concentrations due to a poor solubility in aqueous medium.
[f] Doxorubicin was used as a cytotoxic reference drug.
[g] Amphotericin B, Miltefosine and Fexinidazole were used as antileishmanial reference drugs.
[h] Fexinidazole, Suramin and Eflornithine were used as anti-*Trypanosoma brucei* reference drugs.

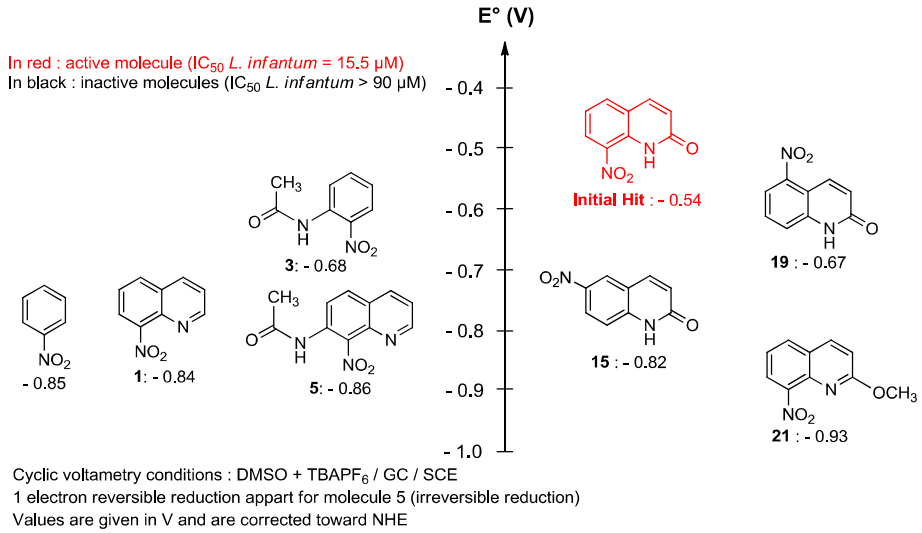


Fig. 2. The 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one pharmacophore presented a characteristic high redox potential value.

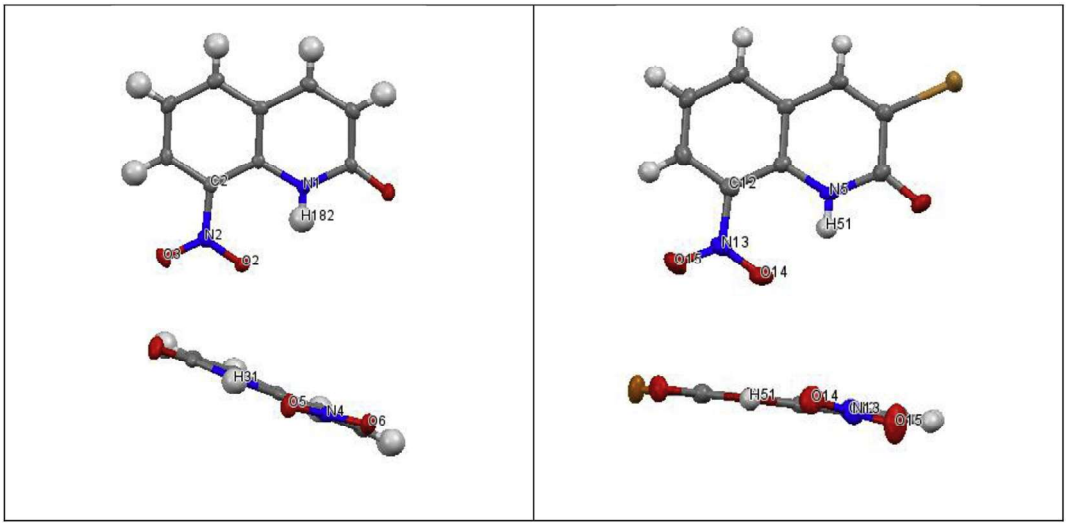


Fig. 3. X-ray structures of initial hit and new hit **22** presenting an intramolecular hydrogen bond between the lactam function and the nitro group (Initial hit: N-H distance = 0.89 Å, H-O distance = 2.01 Å, N-H-O angle = 129°; Hit **22**: N-H distance = 0.84 Å, H-O distance = 2.01 Å, N-H-O angle = 131°).

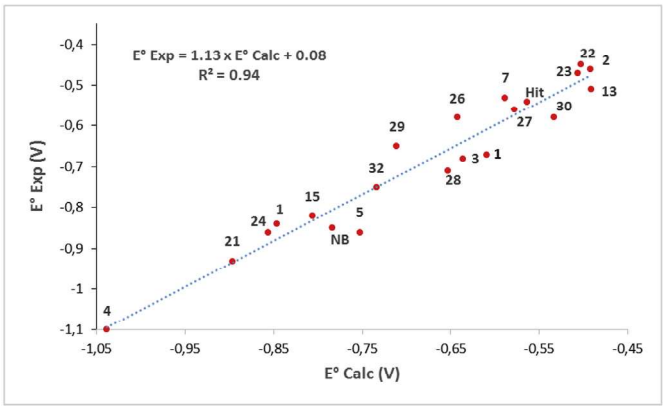


Fig. 4. Correlation between theoretical and experimental standard redox potential of nitroquinolines.

antileishmanial activity is −0.5 V and that molecules whose redox potential is positioned below −0.6 V lost all activity.

Among all synthesized compounds, derivative **22** was highlighted as a new hit (Table 1). It is not only active against *L. infantum* (IC_{50} = 7.1 µM), but also against *T. brucei brucei* (IC_{50} = 1.9 µM), which was not the case of the initial hit, displaying modest activity (IC_{50} = 23.4 µM) toward the latter parasite. For comparison with the anti-leishmanial reference drugs, hit compound **22** appears much less active than amphotericin B and about 10 times less active than miltefosine (with equivalent cytotoxicity). Regarding anti-HAT drugs, hit compound **22** appears much less active than suramin, but more active than eflornithine. It is also important to compare hit molecule **22** with drug candidate fexinidazole, as they both belong to the nitroaromatic family: **22** is about 2 times more cytotoxic and, depending on the parasite, between 2 and 5 times less active than this drug candidate, which remains interesting for a hit-compound. It was then necessary to evaluate the *in vitro* activity of **22** against the amastigote stage of *Leishmania* in an intra-macrophage model, closer to the *in vivo* situation. As presented in

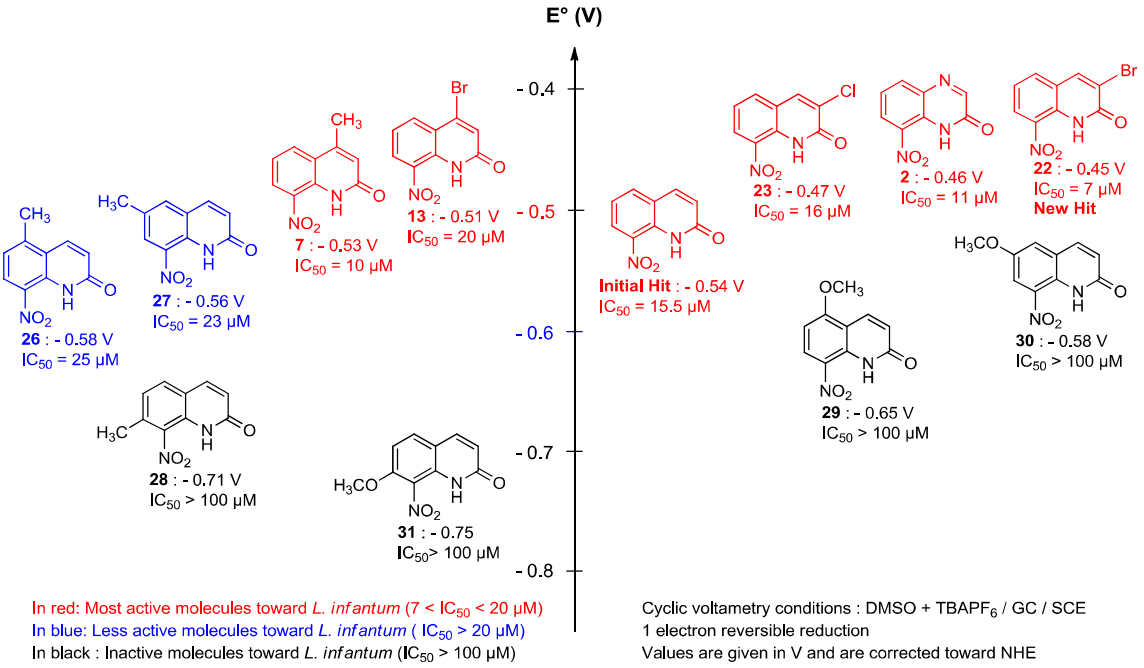
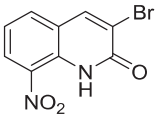


Fig. 5. Modulation of the redox potential of the 8-nitroquinolin-2 [1H]-one pharmacophore. Mode of action studies, genotoxicity evaluation and preliminary pharmacokinetic properties of **22**.

Table 2, the test was done on *L. donovani*, the other species responsible for VL. Hit molecule **22**, displays a low cytotoxicity on the THP1 macrophage cell line ($CC_{50} = 72\ \mu M$) and is about 3 times less active ($IC_{50} = 18\ \mu M$) on this intramacrophage amastigote *in vitro* model than miltefosine ($IC_{50} = 5.4\ \mu M$). Fexinidazole is not active on the intramacrophage amastigote stage ($IC_{50} > 50\ \mu M$) as it first needs to be metabolized into a sulfone derivative [24]. Finally, as expected, compound 14 (non nitrated) and **25** (8-amino derivative), negative controls deriving from hit **22**, did not display any antiparasitic activity.

In order to assess whether this compound series was a substrate of parasitic NTRs, the hit compound **22** was assayed against a wild type strain of *L. donovani* promastigotes and two strains overexpressing NTR1 [25] and NTR2 [26], respectively (Table 2). Compound **22** was ten times more effective against the strain overexpressing NTR1 ($IC_{50} = 0.47\ \mu M$) vs WT and NTR2 strains, indicating that it is selectively bioactivated by NTR1 of *L. donovani*. Interestingly, this is the same type 1 nitroreductase that bioactivates fexinidazole and its metabolites [25]. Following the same approach in *T. brucei brucei*, it was also demonstrated that type 1 NTR, the unique NTR enzyme expressed in this parasite, was responsible for the bioactivation of **22** (Table 2).

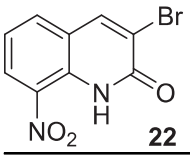
Table 2
Complementary *in vitro* biological evaluations done on hit compound **22**.

In vitro studies	 Compound **22**
Cytotoxicity: CC_{50} THP1 (µM)[a]	72 ± 6
IC_{50} *L. donovani* intramacrophagic amastigotes (µM)[b]	18 ± 2
IC_{50} *L. donovani* promastigotes wild type strain (µM)	5.9 ± 0.12
IC_{50} *L. donovani* promastigotes NTR1 over-expressing strain (µM)	0.47 ± 0.02
IC_{50} *L. donovani* promastigotes NTR2 over-expressing strain (µM)	4.6 ± 0.12
IC_{50} *T. b. brucei* trypomastigotes wild type strain (µM)	17.7 ± 1.0
IC_{50} *T. b. brucei* trypomastigotes NTR1 over-expressing strain (µM)	3.9 ± 0.1
Microsomal stability: $T_{1/2}$ (min)	>40
Binding % to human albumin	92

[a] Reference compounds: Amphotericin B $CC_{50} = 3.6 \pm 0.7\ \mu M$; Miltefosine $CC_{50} > 40\ \mu M$; Fexinidazole $CC_{50} > 62.5\ \mu M$.
[b] Reference compounds: Amphotericin B $IC_{50} = 0.4\ \mu M$; Miltefosine $IC_{50} = 5.4\ \mu M$; Fexinidazole $IC_{50} > 50\ \mu M$.

Nitroaromatic drugs are often suspected to be mutagenic or genotoxic, which has considerably limited the development of such derivatives in the past decades [27]. The most famous *in vitro* test used for evaluating mutagenicity is the Ames test, using *Salmonella typhimurium* strains. Nevertheless, considering that *Salmonella* bacteria possess nitroreductases [28], the Ames test is usually positive when evaluating nitroaromatics, with no real predicting character for humans, considering that there are no NTRs in mammalian cells and that most of nitroaromatic derivatives only exert a genotoxic character after being bioactivated into reduced metabolites [27]. For that reason, it is nowadays accepted that the comet assay or the micronucleus assay are better *in vitro* tools for evaluating the potential genotoxicity of nitroaromatics [27]. Indeed, metronidazole, one of the most famous anti-infective nitroheterocycles on the market, is mutagenic in the Ames test, but not genotoxic in the comet assay [29] and fexinidazole is not genotoxic in the micronucleus assay despite being mutagenic in the Ames test [24]. Regarding compound **22**, the Ames test (in metabolizing conditions) and the comet assay were done in parallel and revealed that, although being mutagenic in the Ames test (Table 3) at 0.25 or 2.5 mM, compound **22** was not genotoxic in the comet assay after 2 or 72 h of exposure, at 1, 10, 20 or 40 µM (Fig. 6), concentrations chosen from the HepG2 $CC_{10\%}$ (40 µM). This lack of genotoxicity is a key point when thinking about further development of this pharmacophore. Finally, preliminary *in vitro* pharmacokinetic evaluations were done with compound **22** (Table 2). It presented a very

Table 3
Ames test results for hit compound **22**.



22

	0.25 mM	2.5 mM
TA97a + S9 mix	Positive	Positive
TA98 + S9 mix	Positive	Positive
TA100 + S9 mix	Positive	Positive
TA102 + S9 mix	Negative	Positive

Benzo [*a*]pyrene was used as a positive control.

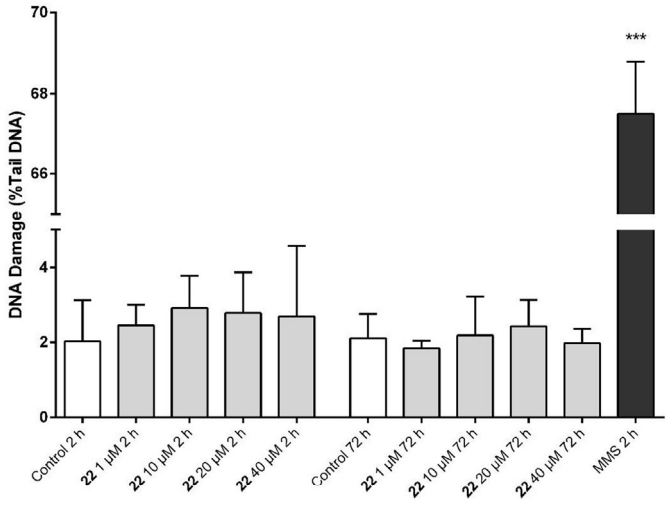


Fig. 6. Results of the comet assay for hit compound **22**.
Positive control = MMS = 1 mM methylmethanesulfonate.

good microsomal stability ($T_{1/2} > 40$ min) and had a strong, but not extreme binding to human albumin (92%), in relation with the relatively high value of its calculated logP (= 2.36).

4. Conclusion

Starting from the previously identified 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one antileishmanial pharmacophore, an electrochemistry-guided SAR study revealed that an intramolecular hydrogen bond between the lactam ring and the nitro group is responsible for a +0.3 V increase in the redox potential value (compared with 8-nitroquinoline) resulting in improved antileishmanial activity. A computational model allowed the prediction of the redox potential values of any derivative belonging to this series, and we synthesized a set of derivatives presenting a large range of redox potential values. Then, it was highlighted that, to be active, molecules belonging to this series must display a redox potential value of about −0.5 V and that molecules with a redox potential below −0.6 V were inactive. By introducing electron-withdrawing groups on the pyridone moiety of the scaffold, a new original hit compound was found: 22. Presenting a low cytotoxicity on the human HepG2 cell line ($CC_{50} = 92$ µM), it displays activity toward *L. infantum* axenic amastigotes ($IC_{50} = 7.1$ µM), *L. donovani* promastigotes ($IC_{50} = 5.9$ µM) and *L. donovani* intramacrophagic amastigotes ($IC_{50} = 18$ µM), but also toward *T. brucei brucei* ($IC_{50} = 1.9$ µM). Moreover, we demonstrated that 22 was not genotoxic in the comet assay and that it was selectively bioactivated by the mitochondrial NTR1 of *L. donovani* and *T. brucei brucei*. This whole study, completed with two encouraging preliminary *in vitro* pharmacokinetic parameters (good microsomal stability and 92% binding to human albumin) now opens the way to the rational conception, guided with E° values, of new efficient, selective and safe NTR1 bioactivated 8-nitroquinolin-2(1*H*)-ones against VL and HAT.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgments

A. Fairlamb and S. Wyllie are supported by funding from the Wellcome Trust (WT105021). J. Pedron thanks the Université Paul Sabatier de Toulouse and the Région Occitanie/Pyrénées-Méditerranée for PhD funding. C. Piveteau from Institut Pasteur de Lille, C. Bijani from Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse and the mass spectrometry team of the Institut de Chimie de Toulouse are also acknowledged for their support, respectively for pharmacokinetics, NMR and HRMS experiments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.001.

Abbreviations

NTR	Nitroreductase
SAR	Structure-Activity Relationship
rt	room temperature
NBS	N-bromosuccinimide
AIBN	Azobisisobutyronitrile
THF	Tetrahydrofuran
MW	Microwaves
DMF	N,N-Dimethylformamide
Ar.	Argon
NHE	Normal Hydrogen Electrode
IC50	half maximal inhibitory concentration
CC50	half maximal cytotoxic concentration
TBAPF6	Tetrabutylammonium hexafluorophosphate;
SCE	Saturated Calomel Electrode
GC	Glassy Carbon
E°	standard redox potential
E°exp	standard experimental redox potential
E°calc	standard calculated redox potential
HRMS	High-resolution mass spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
VL	Visceral leishmaniasis
HAT	Human African Trypanosomiasis.

Experimental section

Chemistry

All reagents and solvents were obtained from commercial sources (Fluorochem®, Sigma-Aldrich® or Alfa Aesar®) and used as received. The progress of the reactions was monitored by pre-coated thin layer chromatography (TLC) sheets ALUGRAM® SIL G/UV_{254} from Macherey-Nagel and were visualized by ultraviolet light at 254 nm. The NMR ^{1}H and ^{13}C spectra were recorded on a Bruker UltraShield 300 MHz, a Bruker IconNMR 400 MHz, or a Bruker Avance NEO 600 MHz instrument, at the Laboratoire de

Chimie de Coordination and data are presented as follows: chemical shifts in parts per million (δ) using tetramethylsilane (TMS) as reference, coupling constant in Hertz (Hz), multiplicity by abbreviations: (s) singlet, (d) doublet, (t) triplet, (q) quartet, (dd) doublets of doublets, (m) multiplet and (br s) broad singlet. Melting points are uncorrected and were measured on a Stuart Melting Point SMP3 instrument. HRMS measurements were done on a GCT Premier Spectrometer (DCI, CH_4, HRMS) or Xevo G2 QTOF (Waters, ESI+, HRMS) instrument at the Université Paul Sabatier, Toulouse. Microwave reactions were realized in a CEM Discover® microwave reactor. All products were purified by chromatography columns and then recrystallized. Purity of the products was determined by ^{1}H NMR.

General procedure for the preparation of 8-nitroquinoline 1 [30], 7-amino-8-nitroquinoline 4 [31], 2-chloro-4-methyl-8-nitroquinoline 6 [32], 2,4-dibromo-8-nitroquinoline 12 [17], 6-nitroquinolin-2 (1*H*)-one 15 [16], 2-chloro-5-nitroquinoline 17 [16] and 2-chloro-8-nitroquinoline 18 [16]:

H_2SO_4 (98%) was added onto 1 equiv. of the quinoline derivatives, cooled with an ice bath. 5 equiv. of 65% HNO_3 were then added dropwise at 0 °C and the reaction mixture was stirred at rt for 1–4 h. The reaction mixture was successively poured into ice, neutralized with NaOH and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using adapted eluent and recrystallized if necessary to give compounds 1, 4, 6, 12, 15, 17 and 18.

8-nitroquinoline 1 ($C_9H_6N_2O_2$) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane as an eluent, separated from its 5-nitro isomer and isolated to yield a pale yellow solid (35%, 2.7 mmol, 470 mg), mp 90 °C (Lit: 90 °C), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.53–7.66 (m, 2H), 8.04 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 8.27 (dd, J = 1.6 and 8.4 Hz, 1H, H7), 9.70 (dd, J = 1.7 and 4.2 Hz, 1H, H2). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 122.8 (CH), 123.8 (CH), 125.3 (CH), 129.0 (C), 132.0 (CH), 136.1 (CH), 139.5 (C), 148.2 (C), 152.6 (CH).

7-amino-8-nitroquinoline 4 ($C_9H_7N_3O_2$) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (80/20) as an eluent and isolated to yield an orange solid (46%, 0.16 mmol, 30 mg), mp 193 °C (Lit: 194 °C), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.61 (br s, 2H, NH_2); 7.00 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H6), 7.28 (dd, 1H, J = 4.4 and 8.1 Hz, H3), 7.69 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H5), 8.00 (dd, 1H, J = 1.8 and 8.1 Hz, H4), 8.92 (dd, 1H, J = 1.8 and 4.4 Hz, H2). ^{13}C NMR (100 MHz, Acetone d6): 118.90 (CH), 119.8 (CH), 120.9 (C), 131.8 (CH), 135.7 (CH), 139.7 (C), 142.8 (C), 143.1 (C), 151.2 (CH).

2-chloro-4-methyl-8-nitroquinoline 6 ($C_{10}H_7ClN_2O_2$) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/acetone (70/30) as an eluent, separated from its 6-nitro isomer, isolated and recrystallized in isopropanol to yield a white solid in (53%, 14.8 mmol, 3.3 g), mp 143 °C (Lit: 142–143 °C), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 2.74 (d, J = 1.0 Hz, 3H, CH_3), 7.35 (d, J = 1.0 Hz, 1H, H3), 7.62–7.66 (m, 1H, H6), 8.00 (dd, J = 7.6 and 1.3 Hz, 1H, H5), 8.18 (dd, J = 8.4 and 1.3 Hz, 1H, H7). ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 18.9 (CH_3), 124.2 (CH), 124.5 (CH), 125.4 (CH), 127.8 (CH), 127.9 (C), 138.9 (C), 147.8 (C), 147.9 (C), 153.2 (C).

2,4-dibromo-8-nitroquinoline 12 ($C_9H_4Br_2N_2O_2$) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/acetone (9/1) as an eluent and isolated to yield a white solid (56%, 6 mmol, 2 g), mp 129 °C (Lit: 129 °C), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.72–7.76 (m, 1H, H6), 8.00 (s, 1H, H3), 8.08 (dd, J = 7.6 et 1.4 Hz, 1H, H5), 8.39 (dd, J = 8.5 et 1.4 Hz 1H, H7). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ: 125.3 (CH), 126.9 (CH), 127.5 (C), 130.9 (CH), 131.0 (CH), 135.0 (C), 139.7 (C), 143.6 (C), 147.5 (C).

6-nitroquinolin-2(1*H*)-one 15 ($C_9H_6N_2O_3$) was recrystallized in isopropanol to yield a yellow solid (91%, 6.3 mmol, 1.2 g), mp 279 °C (Lit: 279 °C), ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ: 6.68 (d, J = 9.8 Hz, 1H, H3), 7.43 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H8), 8.12 (d, J = 9.8 Hz, 1H, H4), 8.33 (dd, J = 2.6 and 9.0 Hz, 1H, H7), 8.70 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H5), 12,3 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ: 116.3 (CH), 118.7 (C), 124.0 (CH), 124.5 (CH), 125.3 (CH), 140.3 (CH), 141.7 (C), 143.5 (C), 162.1 (C).

2-chloro-5-nitroquinoline 17 ($C_9H_5ClN_2O_2$) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/acetone (8/2) as an eluent, isolated and recrystallized in isopropanol to yield a yellow solid (14%, 4.3 mmol, 0.9 g), mp 134 °C (Lit: 133–134 °C), ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.63 (d, J = 9,1 Hz, 1H, H4), 7.82–7.87 (m, 1H, H7), 8.34 (dd, J = 8,6 and 0,7 Hz, 1H, H8), 8.40 (dd, J = 7.6 and 1.2 Hz, 1H, H6), 8.99 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 120.1 (C), 125.0 (CH), 125.6 (CH), 129.0 (CH), 135.1 (CH), 135.7 (CH), 145.6 (C), 148.2 (C), 152.6 (C).

2-chloro-8-nitroquinoline 18 ($C_9H_5ClN_2O_2$) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/acetone (8/2) as an eluent, isolated and recrystallized in isopropanol to yield a yellow solid (50%, 15.3 mmol, 3.2 g), mp 152 °C (Lit: 152 °C), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.56 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H4), 7.65–7.69 (m, 1H, H6), 8.07 (dd, J = 8.3 and 1.4 Hz, 1H, H5), 8.11 (dd, J = 7.6 and 1.4 Hz, 1H, H7), 8.23 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H3). ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 124.6 (CH), 124.9 (CH), 125.8 (CH), 127.6 (C), 131.8 (CH), 138.6 (CH), 139.0 (C), 147.1 (C), 153.6 (C).

Preparation of 8-nitroquinoxalin-2(1H)-one ***2***

Ethanol (25 mL) was added onto 1 g of 3-nitro-1,2-phenylenediamine (6.53 mmol, 1 equiv.). 0.6 g of glyoxylic acid monohydrate (6.53 mmol, 1 equiv.) was then added at rt and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 6 h. The reaction mixture was poured into water and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/diethyl ether (80/20) as an eluent. 8-nitroquinoxalin-2 (1*H*)-one 2 was isolated and recrystallized in acetonitrile to yield an orange solid (46%, 2.98 mmol, 570 mg).

Compound 2 ($C_8H_5N_3O_3$): mp 162 °C, ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.45–7.50 (m, 1H, H6), 8.25 (dd, J = 1.5 and 8.2 Hz, 1H, H5), 8.39 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H3), 8.55 (dd, J = 1.5 and 8.2 Hz, 1H, H7), 11.37 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 122.6 (CH), 127.8 (C), 128.0 (CH), 133.1 (C), 133.8 (C), 137.4 (CH), 152.6 (CH), 153.6 (C). HRMS (DCI CH_4) calcd for $C_8H_6N_3O_3$ $[M+H]^+$ 192.0409, found 192.0412.

Preparation of N-(2-Nitrophenyl)-acetamide ***3*** *[33]*

Acetic acid (25 mL) was added onto 525 mg of 2-nitroaniline (3.8 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was then stirred at 120 °C and 720 μL of acetic anhydride (7.6 mmol, 2 equiv.) were added dropwise. After 3 h under reflux, the reaction mixture was poured into ice, neutralized with Na_2CO_3 and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated *in vacuo*. *N*-(2-Nitrophenyl)-acetamide 3 was isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (87%, 3.3 mmol, 604 mg).

Compound 3 ($C_8H_8N_2O_3$): mp 93 °C (Lit: 92–94 °C), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 2.29 (s, 3H, CH_3), 7.16–7.20 (m, 1H, H4), 7.63–7.67 (m, 1H, H5), 8.21 (dd, J = 8.5 and 1.3 Hz, 1H, H6), 8,77 (dd, J = 8.6 and 1.3 Hz, 1H, H3), 10.33 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 25.60 (CH_3), 122.2 (CH), 123.2 (CH), 125.7 (CH), 134.8 (C), 135.9 (CH), 136.3 (C), 169.0 (C).

Preparation of 7-acetylamino-8-nitroquinoline ***5***

Glacial acetic acid (20 mL) was added onto 60 mg of 7-amino-8-nitroquinoline (0.32 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was then stirred at 120 °C and 180 μL of acetic anhydride (1.6 mmol, 6 equiv.) were added dropwise. After 24 h under reflux, the reaction mixture was poured into ice, neutralized with K_2CO_3 and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (90/10) as an eluent. 7-acetylamino-8-nitroquinoline 5 was isolated and recrystallized in isopropanol to yield a yellow solid (53%, 0.17 mmol, 39 mg).

Compound 5 ($C_{11}H_9N_3O_2$): mp 189 °C, ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 2.28 (s, 3H, CH_3), 7.49 (dd, $J = 4.3$ et 8.3 Hz, 1H, H3), 7.96 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, H 6), 8.19 (dd, $J = 1.7$ et 8.3 Hz, 1H, H4), 8.35 (br s, 1H, NH), 8.54 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, H5), 8.99 (dd, $J = 1.7$ et 4.3 Hz, 1H, H2). ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 25.0 (CH_3), 121.7 (CH), 121.9 (CH), 125.2 (C), 127.8 (C), 131.4 (CH), 131.8 (C), 135.8 (CH), 140.3 (C), 152.6 (CH), 168.7 (C). HRMS (DCI CH_4) calcd for $C_{11}H_{10}N_3O_2$ $[M+H]^+$ 232.0722, found 232.0719.

General procedure for the preparation of 4-methyl-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one 7 [34], quinolin-2(1*H*)-one 14 [35], 5-nitroquinolin-2 (1*H*)-one 19 [16] and 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one 20 [16].

Acetonitrile (25 mL) and 70% perchloric acid solution (25 mL) were added onto 1 equiv. of the quinoline derivatives. The reaction mixture was stirred at 100 °C overnight. The reaction mixture was then poured into ice, neutralized with KOH and extracted twice with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated *in vacuo*. The crude residues were purified by chromatography on silica gel using adapted eluent and recrystallized if necessary to give compounds 7, 14, 19, 20.

4-methyl-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one 7 ($C_{10}H_8N_2O_3$) was isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (92%, 11 mmol, 2.2 g), mp 203 °C (Lit: 196 °C), ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ: 3.33 (s, 3H, CH_3), 6.63 (s, 1H, H3), 7.39–7.44 (m, 1H, H6), 8.19 (dd, $J = 8.0$ and 1.3 Hz, 1H, H5), 8.42 (dd, $J = 8.4$ and 1.6 Hz, 1H, H7), 10.98 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO, 100 MHz) δ: 19.6 (CH_3), 121.6 (CH), 122.0 (CH), 122.6 (C), 127.9 (CH), 133.1 (CH), 133.6 (C) 134.6 (C), 148.9 (C), 161.0 (C). quinolin-2(1*H*)-one 14 (C_9H_7NO) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (8/2) as an eluent and isolated to yield a white solid (74%, 22.7 mmol, 3.3 g), mp 198 °C (Lit: 193 °C), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.72 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, H3), 7.20–7.25 (m, 1H, H6), 7.40–7,42 (m, 1H, H5), 7.50–7.54 (m, 1H, H7), 7.56–7.58 (m, 1H, H8), 7.82 (d, $J = 9.5$ Hz,1H, H4), 11.97 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 116.3 (CH), 119.9 (C), 121.3 (CH), 122.7 (CH), 127.7 (CH), 130.7 (CH), 138.5 (C), 141.1 (CH), 164.7 (C).

5-nitroquinolin-2(1*H*)-one 19 ($C_9H_6N_2O_3$) was isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (92%, 2.2 mmol, 418 mg), mp 302 °C (Lit: 302 °C), ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 6.76 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H3), 7.65–7.73 (m, 2H, H7 H8), 7.88 (dd, $J = 7.7$ and 1.3 Hz, 1H, H6), 8.25 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H4), 12.3 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ: 111.9 (C), 118.9 (CH), 121.5 (CH), 125.8 (CH), 130.6 (CH), 134.7 (CH), 140.7 (C), 146.7 (C), 161.3 (C).

8-nitroquinolin-2(1*H*)-one 20 ($C_9H_6N_2O_3$) was isolated and recrystallized in isopropanol to yield a yellow solid (96%, 10.6 mmol, 2.02 g), mp 163 °C (Lit: 163 °C), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.79 (dd, $J = 9.7$ and 2.0 Hz, 1H, H3), 7.32–7.36 (m, 1H, H6), 7.82 (d, $J = 9.7$ and 1.4 Hz, 1H, H4), 7.91 (dd, $J = 7.6$ Hz, 1H, H5), 8.53 (dd, $J = 8.4$ and 1.4 Hz, 1H, H7), 11.3 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ: 121.4 (CH), 122.1 (C), 123.8 (CH), 127.9 (CH), 133.1 (C), 133.9 (C), 135.6 (CH), 139.9 (CH), 161.6 (C).

Preparation of 4-bromomethyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one ***8***

Carbon tetrachloride (15 mL) was added onto 400 mg of 4-methyl-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (1.9 mmol, 1 equiv.) and 1.7 g of *N*-bromosuccinimide (9.7 mmol, 5 equiv.). The reaction mixture was heated at 80 °C. Thent 31 mg of AIBN (0.24 mmol, 0.1 equiv.) were added, and stirred overnight. The reaction mixture was poured into water, extracted twice with dichloromethane and once with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using ethyl acetate as an eluent. 4-bromomethyl-8-nitroquinolin-2 (1*H*)-one 8 was isolated to yield a yellow solid (21%, 0.42 mmol, 120 mg).

Compound **8** ($C_{10}H_7BrN_2O_3$): mp 161 °C, ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.60 (s, 2H, CH_2), 6.87 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H3), 7.40–7.44 (m, 1H, H6), 8.18 (dd, $J = 1.3$ and 8.8 Hz, 1H, H5), 8.57 (dd, $J = 1.3$ and 8.3 Hz, 1H, H7), 11.44 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 27.9 (CH_2), 120.2 (C), 121.3 (CH), 123.7 (CH), 128.4 (CH), 132.4 (CH), 133.6 (C), 134.4 (C), 146.1 (C), 160.7 (C). HRMS (DCI CH_4) calcd for $C_{10}H_8BrN_2O_3$ $[M+H]^+$ 282.9718, found 282.9723.

Preparation of 4-hydroxymethyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one ***9***

Fifty milliliters of a mixture H_2O/THF (1/1) were added onto 150 mg of 4-bromomethyl-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (0.53 mmol, 1 equiv). 106 mg of NaOH (2.6 mmol, 5 equiv.) were added and the reaction mixture was stirred at 50 °C for 24 h. The reaction mixture was then poured into water, extracted twice with dichloromethane and twice with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using ethyl acetate as an eluent. 4-hydroxymethyl-8-nitroquinolin-2 (1*H*)-one 9 was isolated to yield a yellow solid (43%, 0.23 mmol, 50 mg).

Compound **9** ($C_{10}H_8N_2O_4$): mp 211 °C, ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ: 4.80 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H, CH_2), 5.67 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, OH), 6.73 (s, 1H, H3), 7.37–7.42 (m, 1H, H6), 8,13 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H5), 8.42 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H7), 11,01 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO) δ: 39.5 (CH_2), 122.0 (CH), 122.1 (C), 123.0 (CH), 128.2 (CH), 133.3 (CH), 133.8 (CH), 136.5 (C), 141.3 (C), 161.6 (C). HRMS (DCI CH_4) calcd for $C_{10}H_9N_2O_4$ $[M+H]^+$ 221.0562, found 221.0558.

Preparation of 4-{[2-(N-boc-2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl} aminomethyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one 10

THF (50 mL) was added onto 500 mg of 4-bromomethyl-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (1.8 mmol, 1 equiv.) and 1.3 g of *N*-Boc-2,2′-(ethylenedioxy)-diethylamine (5.3 mmol, 3 equiv.). Triethylamine (375 μL, 2.7 mmol, 1.5 equiv.) were then added and the reaction mixture was stirred at 50 °C overnight. The reaction mixture was evaporated *in vacuo*. The crude product was then resolubilized in ethyl acetate, washed three times with water, dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using diethyl ether/methanol/20% aqueous ammonia solution (8.9/1/0.1) as an eluent. 4-{[2-(*N*-boc-2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl}aminomethyl-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one 10 was isolated to yield an orange oil (84%, 1.5 mmol, 680 mg).

Compound **10** ($C_{21}H_{30}N_4O_7$): ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ: 1.36 (s, 9H, *t*Bu), 2.5 (s, 1H, NH amine), 2.75–2.77 (m, 2H, CH_2 3′), 3.03–3.06 (m, 2H, CH_2 10′), 3.36–3.39 (m, 2H, CH_2 4′), 3.51–3.54 (m, 6H, 3xCH_2 6′ 7′ 9′), 4.02 (s, 2H, CH_2 1′), 6.73 (br s, 1H, NH carbamate), 6.76 (s, 1H, H3), 7.38–7.42 (m, 1H, H6), 8.31 (dd, $J = 8.1$

and 1.3 Hz, 1H, H5), 8.42 (dd, $J = 8.1$ and 1.3 Hz, 1H, H7), 11.03 (br s, 1H, NH).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO) δ: 28.7 (3 CH_3, *t*Bu), 40.1 (CH_2), 48.7 (CH_2), 49.9 (CH_2), 69.6 (CH_2), 70.0 (CH_2), 70.1 (CH_2), 70.5 (CH_2), 78.0 (C), 120.5 (CH), 121.4 (C), 121.6 (CH), 127.8 (CH), 132.9 (CH), 133.6 (C), 134.5 (C), 150.6 (C), 156.0 (C), 161.1 (C). HRMS (ESI) calcd for $C_{21}H_{31}N_4O_7$ $[M+H]^+$ 450.2114, found 450.2118.

Preparation of 4-{[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl}aminomethyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one 11

Hydrochloric acid (15 mL of 5 N HCL in isopropanol) was added onto 600 mg of 4-{[2-(*N*-boc-2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl}aminomethyl-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (1.33 mmol, 1 equiv.) and the reaction mixture was then stirred at rt for 4 h. The reaction mixture was successively poured into water, neutralized with K_2CO_3 and extracted several times with dichloromethane. The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated *in vacuo*. 4-{[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl}aminomethyl-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one 11 was isolated to yield an oil in (43%, 0.57 mmol, 200 mg).

Compound **11** ($C_{16}H_{22}N_4O_5$): ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ: 2.5 (s, 1H, NH amine), 2.63–2.66 (m, 2H, CH_2 10′), 2.74–2.77 (m, 2H, CH_2 3′), 3.35–3.38 (m, 2H, CH_2 9′), 3.49–3.55 (m, 6H, 3xCH_2 4′ 6′ 7′), 4.01 (d, $J = 1.9$ Hz, 2H, CH_2 1′), 6.76 (br s, 1H, H3), 7.38–7.42 (m, 1H, H6), 8.30 (dd, $J = 8.1$ and 1.3 Hz, 1H, H5), 8.40 (dd, $J = 8.1$ and 1.3 Hz, 1H, H7), 11.0 (br s, 1H, NH lactame). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO) δ: 41.7 (CH_2), 48.7 (CH_2), 50.0 (CH_2), 70.0 (CH_2), 70.1 (CH_2), 70.6 (CH_2), 73.2 (CH_2), 120.4 (CH), 121.4 (C), 121.5 (CH), 127.7 (CH), 132.8 (CH), 133.7 (C), 134.6 (C), 150.7 (C), 161.2 (C). HRMS (ESI) calcd for $C_{16}H_{23}N_4O_5$ $[M+H]^+$ 351.1668, found 351.1674.

Preparation of 4-bromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one ***13*** *[17]*

Acetonitrile (10 mL) and 500 μL of a 70% perchloric acid solution (5.4 mmol, 6 equiv.) were added onto 300 mg of 2,4-dibromo-8-nitroquinoline (0.90 mmol, 1 equiv.) in a sealed tube. The reaction mixture was then heated at 100 °C in a microwave reactor during 1 h. The reaction mixture was poured into ice, neutralized with K_2CO_3 and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated *in vacuo*. 4-bromo-8-nitroquinolin-2 (1*H*)-one 13 was isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (87%, 0.78 mmol, 211 mg).

Compound **13** ($C_9H_5BrN_2O_3$): mp 239 °C (Lit: 240 °C), ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.20 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H3), 7.37–7.42 (m, 1H, H6), 8.36 (dd, $J = 8.0$ and 1.4 Hz, 1H, H5), 8.58 (dd, $J = 8.3$ and 1.4 Hz, 1H, H7), 11.42 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ: 121.0 (C), 122.6 (CH), 126.9 (CH), 129.4 (CH), 132.7 (C), 134.8 (C), 135.5 (CH), 136.5 (C), 159.5 (C).

Preparation of N-methylquinolin-2(1H)-one 16 [36]

DMF (30 mL) was added onto 1 g of quinoline-2(1*H*)-one (6.9 mmol, 1 equiv.), 1.43 g of K_2CO_3 (10.3 mmol, 1.5 equiv.). The reaction mixture was heated at 80 °C and 430 μL of methane iodide (6.9 mmol, 1 equiv.) were added dropwise. After 48 h, the reaction mixture was poured into water and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed 5 times with water, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (7.5/2.5) as eluent. *N*-methylquinolin-2(1H)-one 16 was isolated and recrystallized in isopropanol to yield a white solid (71%, 4.90 mmol, 780 mg).

Compound **16** ($C_{10}H_9NO$): mp 76 °C (Lit: 74 °C), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.73 (s, 3H, CH_3), 6.71 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H3), 7.21–7.25 (m, 1H, H6), 7.37 (dd, $J = 8.1$ and 1.0 Hz, 1H, H5), 7.55–7.59 (m, 2H, H7 - H8), 7.67 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, H4). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 29.4 (CH3), 114.1 (CH), 120.6 (C), 121.7 (CH), 122.1 (CH), 128.7 (CH), 130.6 (CH), 138.9 (CH), 140.0 (C), 162.3 (C).

Preparation of 2-methoxy-8-nitroquinoline ***21*** *[16]*

Under Argon atmosphere, 100 mg of 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (0.53 mmol, 1 equiv.) were solubilized in 5 mL of DMF and were added onto a DMF solution (5 mL) of 42 mg of 60% sodium hydride (1.05 mmol, 2 equiv.). After 10 min of stirring at rt, 65 μL of methyl iodide (1.05 mmol, 2 equiv.) were added dropwise. After one night stirring at rt, the reaction mixture was poured into ice. The resulting precipitate was filtered and dried *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using diethyl ether as eluent. 2-methoxy-8-nitroquinoline 21 was isolated and recrystallized in cyclohexane to yield a pale white solid (64%, 0.34 mmol, 70 mg).

Compound **21** ($C_{10}H_8N_2O_3$): mp 125 °C (Lit: 114 °C), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.09 (s, 3H, CH_3), 7.05 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H3), 7.42–7.46 (m, 1H, H6), 7.93 (dd, $J = 8.1$ and 1.4 Hz, 1H, H5), 7.99 (dd, $J = 7.6$ and 1.4 Hz, 1H, H7), 8.07 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H4). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 54.1 (CH_3), 115.1 (CH), 122.6 (CH), 124.0 (CH), 126.2 (C), 131.5 (CH), 138.2 (C), 138.5 (CH), 146.6 (C), 163.7 (C).

Preparation of 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one ***22***

Fifty milliliters of a 48% hydrobromic acid solution were added onto 1.34 g of 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (7.05 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was then stirred at 100 °C. Then 3.2 g of sodium bromate (21.1 mmol, 3 equiv.) were added with precaution (Br_2 formation). After 5 h under reflux, the reaction mixture was left for 2 h under the hood to evacuate remaining Br_2 vapors, and then poured into ice, neutralized with K_2CO_3 and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated *in vacuo*.

The crude residue was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (1/1) as an eluent. 3-bromo-8-nitroquinolin-2 (1*H*)-one 22 was isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (68%, 4.8 mmol, 1.3 g).

Compound **22** ($C_9H_5BrN_2O_3$): mp 216 °C, ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.36–7.40 (m, 1H, H6), 7.89 (dd, $J = 8.4$ and 1,4 Hz, 1H, H5), 8.6 (s, 1H, H4), 8.56 (dd, $J = 7,7$ and 1,6 Hz, 1H, H7), 11.51 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 119.9 (C), 122.1 (CH), 122.3 (C), 128.0 (CH), 132.9 (C), 133.2 (C), 134.8 (CH), 141.0 (CH), 157.5 (C). HRMS (DCI CH_4) calcd for $C_9H_6BrN_2O_3$ $[M+H]^+$ 268.9562, found 268.9554.

Preparation of 3-chloro-8-nitroquinolin-2(1H)-one ***23***

Fifty milliliters of a 37% hydrochloric acid solution were added onto 1 g of 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (5.3 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was then stirred at 100 °C before 1.7 g of sodium chlorate (15.8 mmol, 3 equiv.) were added with precaution (Cl_2 formation). After 45 min under reflux, the reaction mixture was left for 2 h under the hood to evacuate remaining Cl_2 vapors, and then was poured into ice, neutralized with K_2CO_3 and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using diethyl ether as an eluent. 3-chloro-8-nitroquinolin-2 (1*H*)-one 23 was isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (62%, 3.3 mmol, 738 mg).

Compound **23** ($C_9H_5ClN_2O_3$): mp 195 °C, ^{1}H NMR (400 MHz,

$CDCl_3$) δ: 7.37–7.41 (m, 1H, H6), 7.88 (dd, $J = 7.7$ and 1.4 Hz, 1H, H5), 8.04 (s, 1H, H4), 8.55 (dd, $J = 8.4$ and 1.4 Hz, 1H, H7), 11.56 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 121.8 (C), 122.2 (CH), 127.9 (CH), 129.2 (C), 132.3 (C), 133.1 (C), 134.9 (CH), 137.0 (CH), 157.5 (C). HRMS (DCI CH_4) calcd for $C_9H_6ClN_2O_3$ $[M+H]^+$ 225.0067, found 225.0070.

Preparation of 3-bromo-2-methoxy-8-nitroquinoline ***24***

Under Argon atmosphere, 250 mg of 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (0.93 mmol, 1 equiv.) were solubilized in 5 mL of dry DMF and were added onto a DMF solution (5 mL) of 74 mg of 60% sodium hydride (1.86 mmol, 2 equiv.). After 10 min of stirring at rt, 115 μL of methyl iodide (1.86 mmol, 2 equiv.) were added dropwise. The reaction mixture was stirred at rt overnight, before being poured into ice. The resulting precipitate was filtered and dried *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/acetone (9/1) as eluent. 3-bromo-2-methoxy-8-nitroquinoline 24 was isolated to yield a pale white solid (55%, 0.51 mmol, 146 mg).

Compound **24** ($C_{10}H_7BrN_2O_3$): mp 208 °C, ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.15 (s, 3H, CH_3), 7.43–7.49 (m, 1H, H6), 7.86 (dd, $J = 8.1$ and 1.4 Hz, 1H, H5), 8.02 (dd, $J = 7.7$ and 1.4 Hz, 1H, H7), 8.35 (s, 1H, H4). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 55.4 (CH_3), 110.4 (C), 123.5 (CH), 124.4 (CH), 127.1 (C), 130.6 (CH), 136.7 (C), 140.6 (CH), 146.2 (C), 159.2 (C). HRMS (DCI CH_4) calcd for $C_{10}H_7BrN_2O_3$ $[M+H]^+$ 282.9718, found 282.9722.

Preparation of 8-amino-3-bromoquinolin-2(1H)-one ***25***

Ethanol (20 mL) was added onto 300 mg of 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (1.11 mmol, 1 equiv.) and 1.1 g of tin (II) chloride (5.55 mmol, 5 equiv.). The reaction mixture was refluxed for 3 h. The reaction mixture was then neutralized into an aqueous solution of Na_2CO_3, filtered on celite, extracted three times with dichloromethane and once with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/methanol (95/5) as eluent. 8-amino-3-bromoquinolin-2 (1*H*)-one 25 was isolated to yield a pale brown solid (53%, 0.59 mmol, 140 mg).

Compound **25** ($C_9H_7BrN_2O$): Dec. 248 °C, ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 5.60 (br s, 2H, NH_2), 6.84 (dd, $J = 7.5$ and 1.5 Hz, 1H, H7), 6.90 (dd, $J = 7.7$ and 1.5 Hz, 1H, H5), 6.95–6.99 (m, 1H, H6), 8.40 (s, 1H, H4), 11.35 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ: 115.2 (CH), 115.5 (CH), 116.6 (C), 120.6 (C), 123.5 (CH), 125.6 (C), 135.4 (C), 143.2 (CH), 158.3 (C). HRMS (DCI CH_4) calcd for $C_{10}H_7BrN_2O_3$ $[M+H]^+$ 238.9820, found 238.9820.

General procedure for the preparation of 5-methyl-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one 26, 6-methyl-8-nitroquinolin-2 (1*H*)-one 27 [37], 7-methyl-8-nitroquinolin-2 (1*H*)-one 28, 5-methoxy-8-nitroquinolin-2 (1*H*)-one 29, 6-methoxy-8-nitroquinolin-2 (1*H*)-one 30 [38] and 7-methoxy-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one 31.

In a first step, according to a previously reported procedure [21], 1.2 equiv. of 3,3′-diethoxyacryloyl chloride (prepared from ethyl 3,3′-diethoxypropionate by successive saponification and reaction with $SOCl_2$) was reacted at rt with 1 equiv. of the appropriate nitroaniline derivative in dichloromethane, in the presence of 2 equiv. of pyridine. The reaction mixtures were then poured into water and extracted three times with dichloromethane. The organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated *in vacuo*. In a second step, each crude residue was reacted with 98% sulfuric acid and stirred at rt for 3–4 h (monitored by TLC). The reaction mixtures were then poured into ice, neutralized with K_2CO_3 and extracted three times with dichloromethane. The organic layers were washed with water, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated *in vacuo*. The final crude residues were purified by chromatography on silica gel.

5-methyl-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one 26 ($C_{10}H_8N_2O_3$) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (90/10) as eluent, isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a pale brown solid (46%, 2.39 mmol, 490 mg), mp 213 °C, ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 2.67 (s, 3H, CH_3), 6.78 (dd, $J = 10.0$ and 2.2 Hz, 1H, H3), 7.15 (dd, $J = 8.5$ and 0.6 Hz, 1H, H6), 7.99 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H4), 8.40 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H7), 11.5 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ: 19.8 (CH_3), 120.1 (C), 123.1 (CH), 123.3 (CH), 127.8 (CH), 131.7 (C), 134.1 (C) 136.6 (CH), 145.4 (C), 161.3 (C). HRMS (DCI CH_4) calcd for $C_{10}H_9N_2O_3$ $[M+H]^+$ 205.0613, found 205.0608.

6-methyl-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one 27 ($C_{10}H_8N_2O_3$) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (90/10) as eluent and isolated to yield a brown solid (6%, 0.34 mmol, 70 mg), mp 200 °C (Lit: 199–200), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 2.50 (s, 3H, CH_3), 6.74 (dd, $J = 9.7$ and 2.0 Hz, 1H, H3), 7.69 (s, 1H, H5), 7.74 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, H4), 8.33 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H7), 11.22 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 20.5 (CH_3), 122.0 (C), 123.7 (CH), 128.4 (CH), 131.7 (C), 131.8 (C), 132.8 (C), 135.9 (CH) 139.7 (CH), 161.6 (C).

7-methyl-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one 28 ($C_{10}H_8N_2O_3$) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (90/10) as eluent, isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (52%, 3.42 mmol, 700 mg), mp 233 °C, ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 2.64 (s, 3H, CH_3), 6.69 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H6), 7.15 (dd, $J = 8.0$ and 0.6 Hz, 1H, H3), 7.64 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H4), 7.74 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H5), 10.12 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 21.2 (CH_3), 119.7 (C), 122.7 (CH), 125.5 (CH), 132.2 (CH), 132.6 (C), 135.6 (C) 137.6 (C), 139.9 (CH), 161.7 (C). HRMS (DCI CH_4) calcd for $C_{10}H_9N_2O_3$ $[M+H]^+$ 205.0613, found 205.0615.

5-methoxy-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one 29 ($C_{10}H_8N_2O_4$) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (90/10) as eluent, isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a dark orange solid (21%, 0.61 mmol, 135 mg), mp 246 °C, ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.09 (s, 3H, OCH_3), 6.68 (dd, $J = 10.0$ and 2.1 Hz, 1H, H3), 6.73 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H6), 8.17 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H4), 8.52 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H7), 11.45 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 56.8 (OCH_3), 102.8 (CH), 110.7 (C), 121.8 (CH), 127.0 (C), 130.6 (CH), 134.6 (CH) 135.6 (C), 161.7 (C), 161.8 (C). HRMS (DCI CH_4) calcd for $C_{10}H_9N_2O_3$ $[M+H]^+$ 221.0562, found 221.0561.

6-methoxy-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one 30 ($C_{10}H_8N_2O_4$) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (90/10) as eluent and isolated to yield a pale brown solid (4%, 0.05 mmol, 12 mg), mp 210 °C (Lit: 210–211 °C), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.93 (s, 3H, OCH_3), 6.76 (dd, $J = 9.7$ and 1.8 Hz, 1H, H3), 7.42 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H, H5), 7.73 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, H4), 8.07 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H, H7), 11.15 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 56.3 (OCH_3), 113.5 (CH), 113.9 (C), 120.7 (CH), 122.9 (C), 124.4 (CH), 128.3 (C) 139.4 (CH), 153.5 (C), 161.4 (C).

7-methoxy-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one 31 ($C_{10}H_8N_2O_4$) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (90/10) as eluent, isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (45%, 0.79 mmol, 175 mg), mp 244 °C, ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.04 (s, 3H, OCH_3), 6.57 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H3), 6.93 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H6), 7.68 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H, H4 H5), 9.9 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 57.2 (OCH_3), 105.0 (C), 106.9 (CH), 114.3 (C), 120.6 (CH), 133.5 (CH), 133.7 (C) 139.9 (CH), 155.9 (C), 161.8 (C). HRMS (DCI CH_4) calcd for $C_{10}H_9N_2O_3$ $[M+H]^+$ 221.0562, found 221.0556.

Electrochemistry

Voltammetric measurements were carried out with a

potentiostat Autolab PGSTAT100 (ECO Chemie, The Netherlands) controlled by GPES 4.09 software. Experiments were performed at room temperature in a homemade airtight three–electrode cell connected to a vacuum/argon line. The reference electrode consisted of a saturated calomel electrode (SCE) separated from the solution by a bridge compartment. The counter electrode was a platinum wire of approximately 1 cm [2] apparent surface. The working electrode was GC microdisk (1.0 mm of diameter — Biologic SAS). The supporting electrolyte (nBu_4N)[PF_6] (Fluka, 99% puriss electrochemical grade) and the solvent DMSO (Sigma-Aldrich puriss p. a. dried<0.02% water) were used as received and simply degassed under argon. The solutions used during the electrochemical studies were typically 10^{-3} M in compound and 0.1 M in supporting electrolyte. Before each measurement, the solutions were degassed by bubbling Ar and the working electrode was polished with a polishing machine (Presi P230). Under these experimental conditions employed in this work, the half-wave potential ($E_{1/2}$) of the ferrocene Fc+/Fc couple in DMSO was $E_{1/2} = 0.45$ V vs SCE. Experimental peak potentials have been measured versus SCE and converted to NHE by adding 0.241 V.

Computational studies

All the calculations were carried out with the GAUSSIAN 09 suite [39]. Geometry optimizations were performed with the M06-2x [40] density functional and the 6–311++G (2 d, 2p) basis set. Previous studies have indicated that extended basis sets, with diffuse s- and p-type functions and polarization functions were important for the description of the electronic affinity of nitrobenzene derivatives [22,23]. The effect of solvation were described with the self-consistent reaction field (SCRF) method using the integral equation formalism polarizable continuum Model (IEFPCM) with DMSO as solvent [41]. Vibrational frequency calculation were used to confirm the convergence to local minima and to calculate the unscaled zero-point-energy (ZPE) and the entropy corrections at 298 K. The standard variation of the Gibb's free energies were calculated as the energy difference between anion-radical and neutral forms after full geometry optimization according to the following equation: $R\text{-}NO_2 + 1\ e^- \rightarrow .\ R\text{-}NO_2^-$. Reduction potentials of the nitro-compounds were calculated using the equation based on Faraday's law:

$$E^\circ = -\frac{\Delta G_{red}}{nF} + E_H^0 \quad (1)$$

where ΔG_{red} is the Gibbs free energy of reduction, n is the number of electrons transferred (i.e. one electron), *F* is the Faraday constant which equals 23.06 kcaL mol^{-1}. V^{-1} and E_H^0 is the absolute potential of the normal hydrogen electrode. The E_H^0 value was taken as −4.28 V [42].

Biology

Antileishmanial activity on L. infantum axenic amastigotes. [43]

L. infantum promastigotes (MHOM/MA/67/ITMAP-263, CNR Leishmania, Montpellier, France, expressing luciferase activity) in logarithmic phase cultivated in RPMI 1640 medium supplemented with 5% foetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin), were centrifuged at 900 g for 10 min. The supernatant was removed carefully and was replaced by the same volume of RPMI 1640 complete medium at pH 5.4 and incubated for 24 h at 24 °C. The acidified promastigotes were incubated for 24 h at 37 °C in a ventilated flask. Promastigotes were then transformed into axenic amastigotes. The effects of the tested compounds on the growth of *L. infantum* axenic amastigotes were assessed as follows. *L. infantum* amastigotes were incubated at a density of 2.10^6 parasites/mL in sterile 96-well plates with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v), in duplicate. Appropriate controls DMSO, amphotericin B, miltefosine and fexinidazole (reference drugs purchased from Sigma Aldrich) were added to each set of experiments. After a 48 h incubation period at 37 °C, each plate-well was then microscope-examined for detecting any precipitate formation. To estimate the luciferase activity of axenic amastigotes, 80 μL of each well are transferred to white 96-well plates, Steady Glow® reagent (Promega) was added according to manufacturer's instructions, and plates were incubated for 2 min. The luminescence was measured in Microbeta Luminescence Counter (PerkinElmer). Inhibitory concentration 50% (IC_{50}) was defined as the concentration of drug required to inhibit by 50% the metabolic activity of *L. infantum* amastigotes compared to control. IC_{50} values were calculated by non-linear regression analysis processed on dose response curves, using TableCurve 2D V5 software. IC_{50} values represent the mean of three independent experiments.

Antileishmanial activity on L. donovani promastigotes

The effects of the tested compounds on the growth of *L. donovani* promastigotes (MHOM/IN/00/DEVI) were assessed by MTT assay [44]. Briefly, promastigotes in logarithmic phase in Schneider's medium supplemented with 20% foetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin), were incubated at an average density of 10^6 parasites/mL in sterile 96-well plates with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v), in duplicate. Appropriate controls treated by DMSO, miltefosine or amphotericin B (reference drugs purchased from Sigma Aldrich) were added to each set of experiments. After a 72 h incubation period at 27 °C, parasite metabolic activity was determined. Each plate-well was then microscope-examined for detecting possible precipitate formation. 10 μL of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution (10 mg/mL in PBS) were added to each well followed by incubation for another 4 h. The enzyme reaction was then stopped by addition of 100 μL of 50% isopropanol–10% sodium dodecyl sulfate. Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 10 min. The absorbance was finally measured at 570 nm in a BIO-TEK ELx808 Absorbance Microplate Reader. Inhibitory concentration 50% (IC_{50}) was defined as the concentration of drug required to inhibit by 50% the metabolic activity of *L. donovani* and promastigotes compared to the control. IC_{50} were calculated by nonlinear regression analysis processed on dose–response curves, using TableCurve 2D V5.0 software. IC_{50} values represent the mean value calculated from three independent experiments.

Antileishmanial activity on L. donovani intracellular amastigotes

The effects of the tested compounds on the growth of *Leishmania donovani* intracellular amastigotes (MHOM/IN/00/DEVI) were assessed according to the method of Da Luz et al. [45] 400 μL of THP-1 cells activated with Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (final concentration: 50 ng/mL) were seeded in sterile chamber-slides at an average density of 10^5 cells/mL and incubated for 48 h at 37 °C and 6% CO_2. *L. donovani* promastigotes were centrifuged at 900 g for 10 min and the supernatant replaced by the same volume of Schneider 20% FCS pH 5.4 and incubated for 24 h at 27 °C. THP-1 cells were then infected by acidified promastigotes at an average density of 10^6 cells/mL (10:1 ratio) and chamber-slides incubated for 24 h at 37 °C. Then, in duplicate, the medium containing various

concentrations of tested-compounds was added (final DMSO concentration being inferior to 0.5% v/v). Appropriate controls treated with or without solvent (DMSO), and various concentrations of miltefosine and amphotericin B (reference drugs purchased from Sigma Aldrich) were added to each set of experiments. After 120 h incubation at 37 °C and 6% CO_2, well supernatant was removed. Cells were fixed with analytical grade methanol and stained with 10% Giemsa. The percentage of infected macrophages in each assay was determined microscopically by counting at least 200 cells in each sample. IC_{50} was defined as the concentration of drug necessary to produce a 50% decrease of infected macrophages compared to the control. IC_{50} were calculated by non-linear regression analysis processed on dose–response curves, using TableCurve 2D V5.0 software. IC_{50} values represent the mean value calculated from three independent experiments.

Antileishmanial activity on L. donovani promastigotes NTR1 and NTR2 over-expressing strain

Cell lines and culture conditions: The clonal *Leishmania donovani* cell line LdBOB (derived from MHOM/SD/62/1 S-CL2D) was grown as promastigotes at 26 °C in modified M199 media, as previously described [46]. LdBOB promastigotes overexpressing NTR1 (LinJ.05.0660) [47] and NTR2 (LinJ.12.0730) [48] were grown in the presence of nourseothricin (100 μg ml^{-1}). *In vitro* drug sensitivity assays: To examine the effects of test compounds on growth, triplicate promastigote cultures were seeded with 5×10^4 parasites ml^{-1}. Parasites were grown in 10 mL cultures in the presence of drug for 72 h, after which 200 μL aliquots of each culture were added to 96-well plates, 50 μM resazurin was added to each well and fluorescence (excitation of 528 nm and emission of 590 nm) measured after a further 4 h incubation [49]. Data were processed using GRAFIT (version 5.0.4; Erithacus software) and fitted to a 2-parameter equation, where the data are corrected for background fluorescence, to obtain the effective concentration inhibiting growth by 50% (EC_{50}): $y = \frac{100}{1+\left(\frac{[I]}{EC_{50}}\right)^m}$. In this equation [I] represents inhibitor concentration and m is the slope factor. Experiments were repeated at least two times and the data is presented as the mean plus standard deviation.

Antitrypanosomal activity on T. brucei brucei trypomastigotes

Assays were performed on *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.9 strain (IMTA, Antwerpen, Belgium). It was cultured in MEM with Earle's salts, supplemented according to the protocol of Baltz et *al.* [50] with the following modifications, 0.5 mM mercaptoethanol (Sigma Aldrich®, France), 1.5 mM L-cysteine (Sigma Aldrich®), 0.05 mM bathocuproïne sulfate (Sigma Aldrich®) and 20% heat-inactivated horse serum (Gibco®, France), at 37 °C in an atmosphere of 5% CO_2. The parasites were incubated at an average density of 2000 parasites/well in sterile 96-wells plates (Mc2®, France) with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (Sigma Aldrich®), in duplicate. Reference drugs suramin, pentamidine, eflornithine, and fexinidazole (purchased from Sigma Aldrich, France and Fluorochem, UK) suspended in NaCl 0.9% or DMSO, were added to each set of experiments. The effects of the tested compounds were assessed by the viability marker Alamar Blue® (Fisher, France) assay described by Räz et *al.* [51] After a 69 h incubation period at 37 °C, 10 μL of Alamar Blue® was then added to each well, and the plates were incubated for 5 h [52]. The plates were read in a PerkinElmer ENSPIRE (Germany) microplate reader using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. IC_{50} were calculated by nonlinear regression analysis processed on dose-response curves, using GraphPad Prism software (USA). IC_{50} was defined as the concentration of drug necessary to inhibit by 50% the viability of *T. brucei brucei* compared to the control. IC_{50} values were calculated from three independent experiments in duplicate.

Antitrypanosomal activity on T. b. brucei trypomastigotes NTR1 over-expressing strain

Trypanosoma brucei bloodstream-form 'single marker' S427 (T7RPOL TETR NEO) and drug-resistant cell lines were cultured at 37 °C in HMI9-T medium [53] supplemented with 2.5 μg.mL^{-1} G418 to maintain expression of T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor protein. Bloodstream trypanosomes overexpressing the *T. brucei* nitroreductase (NTR1) [54] were grown in medium supplemented with 2.5 μg.mL^{-1} phleomycin and expression of NTR was induced by the addition of 1 μg.mL^{-1} tetracycline. Cultures were initiated with 1×10^5 cells. mL^{-1} and sub-cultured when cell densities approached 1–2 ($\times 10^6$). mL^{-1}.

In order to examine the effects of inhibitors on the growth of these parasites, triplicate cultures containing the inhibitor were seeded at 1×10^5 trypanosomes. mL^{-1}. Cells overexpressing NTR were induced with tetracycline 48 h prior to EC_{50} analysis. Cell densities were determined after culture for 72 h, as previously described [55]. EC_{50} values were determined using the following two-parameter equation by non-linear regression using GraFit:

$$y = \frac{100}{1 + \left(\frac{[I]}{EC_{50}}\right)^m}$$

where the experimental data were corrected for background cell density and expressed as a percentage of the uninhibited control cell density. In this equation [I] represents inhibitor concentration and m is the slope factor.

Cytotoxic evaluation on HepG2 cell line

The evaluation of the tested molecules cytotoxicity on the HepG2 (hepatocarcinoma cell line from ECACC purchased from Sigma-Aldrich, ref 85011430-1 V L certificated without mycoplasma) was done according to the method of Mosman with slight modifications [44]. Briefly, cells (5 x 10^4 cells/mL) in 100 μL of complete medium, [Alpha MEM Eagle from PAN BIOTECH supplemented with 10% foetal bovine serum, 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin)] were seeded into each well of 96-well plates and incubated at 37 °C and 5% CO_2. After a 24 h incubation, 100 μL of medium with various product concentrations and appropriate controls were added and the plates were incubated for 72 h at 37 °C and 5% CO_2. Each plate-well was then microscope-examined for detecting possible precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. 100 μL of MTT solution (0.5 mg/mL in Alpha MEM Eagle) were then added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO_2. After this time, the MTT solution was removed and DMSO (100 μL) was added to dissolve the resulting formazan crystals. Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 5 min. The absorbance was measured at 570 nm with a microplate spectrophotometer (Eon BioTek). DMSO was used as blank and doxorubicin (purchased from Sigma Aldrich) as positive control. CC_{50} were calculated by non-linear regression analysis processed on dosee response curves, using TableCurve 2D V5 software. CC_{50} values represent the mean value calculated from three independent experiments.

Cytotoxic evaluation on THP1 cell line

The evaluation of the tested molecules cytotoxicity on the

differentiated THP-1 cell line (acute monocytic leukemia cell line purchased from ATCC, ref TIB-202) was performed according to the method of Mosman with slight modifications [44]. Briefly, cells in 100 μL of complete RPMI medium with Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (final concentration: 50 ng/mL) were incubated at an average density of 10^6 cells/mL and in sterile 96-well plates. After 48 h incubation, 100 μL of medium with various product concentrations dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v) were added and the plates were incubated for 72 h at 37 °C. Each plate-well was then microscope-examined for detecting possible precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. 100 μL of MTT solution (0.5 mg/mL in medium without FCS) were then added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C. After this time, the MTT solution was removed and DMSO (100 μL) was added to dissolve the resulting blue formazan crystals. Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 10 min. The absorbance was measured at 570 nm with 630 nm as reference wavelength spectrophotometer using a BIO-TEK ELx808 Absorbance Microplate Reader. DMSO was used as blank and doxorubicin (purchased from Sigma Aldrich) as positive control. Cell viability was calculated as percentage of control (cells incubated without compound). The 50% cytotoxic concentration was determined from the dose–response curve by using the TableCurve 2D V5.0 software.

Ames test method

Mutagenicity test was carried out by using a modified version [56] of the liquid incubation assay of the classical Ames test. *S. typhimurium* tester strains (TA97a, TA98, TA100 and TA102) were grown overnight in a Nutrient Broth n°2 (Oxoid, France). After this period, 5–50 mM DMSO solutions of the tested drugs were added to 0.1 mL of culture and incubated with 4% S9 mix for 1 h at 37 °C with shaking. Each sample was assayed in duplicate. After incubation, 2 mL of molten top agar were mixed gently with the pre-incubated solution and poured onto Vogel-Bonner minimal agar plates. After 48 h at 37 °C in the dark, the number of spontaneous and drug induced revertants per plate was determined for each dose with a laser bacterial colony counter. A product was considered mutagenic when it induces a two-fold increase of the number of revertants, compared with the spontaneous frequency (negative control). Benzo [a]pyrene was used as a positive control with all *Salmonella* strains in presence of S9 mix.

Comet assay

The alkaline comet assay was used to detect DNA strand breaks and alkali-labile sites. Trypsinized HepG2 cells were embedded in 0.7% low-melting point agarose (Sigma "Low Gelling Temperature") and laid on pre-cut sheets of polyester film (Gelbond® film) to perform minigel deposits as previously described [57]. Film were then placed in lysis solution (NaCl 2.5 M, Na_2EDTA 0.1 M, Tris 10 mM, 1% Triton X-100, 10% DMSO pH 10) for 18 h at 4 °C. Electrophoresis (with a solution which contained 0.3 M NaOH, 1 mM Na_2EDTA, pH > 13) was processed for 24 min in a tank with a power supply giving 28 V (resulting in 0.8 V/cm). After electrophoresis, films were immersed 2 × 5 min in PBS for neutralization, followed by fixation in 100% ethanol for 1.5 h and drying. After staining with SYBR® Gold (Life Technologies) at 10 000 X dilution for 20 min, films were observed at 20× magnification with an epifluorescence microscope equipped with an automated platform (Nikon NiE) and coupled to a camera (DS-Q1Mc) and the software Nikon NiS Element Advanced Research to automatically capture images. In these images, for each cell, the level of DNA damage was evaluated using a semi-automated scoring system, by measurement of the intensity of all tail pixels divided by the total intensity of all pixels in head and tail of comet, by means of the software "Lucia comet assay" (Laboratory Imaging, Prague Czech Republic). Fifty cells per deposit and four deposits per sample were analysed. The median from these 200 values was calculated, and named "% tail DNA".

Microsomal stability and plasma protein binding assays

Microsomal stability assay

The tested product and propranolol, used as reference, are incubated in duplicate (reaction volume of 0.5 mL) with female mouse microsomes (CD-1, 20 mg/mL, BD Gentest™) at 37 °C in a 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, in the presence of $MgCl_2$ (5 mM), NADP (1 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.4 U/mL) and glucose-6-phosphate (5 mM). For the estimation of the intrinsic clearance: 50 μL aliquot at 0, 5, 10, 20, 30 and 40 min are collected and the reaction is stopped with 4 vol of acetonitrile (ACN) containing the internal standard. After centrifugation at 10000*g*, 10 min, 4 °C, the supernatants are kept at 4 °C for immediate analysis or placed at −80 °C in case of postponement of the analysis. Controls (t_0 and t_{final}) in triplicate are prepared by incubation of the internal standard with microsomes denatured by acetonitrile. The LC-MS used for this study is a Waters® Acquity I-Class/Xevo TQD, equipped with a Waters® Acquity BEH C18 column, 50 × 2.1 mm, 1.7 μm. The mobile phases are (A) ammonium acetate 10 mM and (B) acetonitrile with 0.1% formic acid. The injection volume is 1 μL and the flow rate is 600 μL/min. The chromatographic analysis, total duration of 4 min, is made with the following gradient: 0 < t < 0.2 min, 2% (B); 0.2 < t < 2 min, linear increase to 98% (B); 2 < t < 2.5 min, 98% (B); 2.5 < t < 2.6 min, linear decrease to 2% (B); 2.6 < t < 4 min, 2% (B). 8-Bromo-6-chloro-3-nitro-2- (phenylsulfonylmethyl) imidazo [1,2-*a*]pyridine is used as internal standard. The quantification of each compound is obtained by converting the average of the ratios of the analyte/internal standard surfaces to the percentage of consumed product. The ratio of the control at t_0 corresponds to 0% of product consumed. The calculation of the half-life ($t_{1/2}$) of each compound in the presence of microsomes is done according to the equation: $t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2)}{k}$. Where k is the first-order degradation constant (the slope of the logarithm of compound concentration versus incubation time). The intrinsic clearance *in vitro* (Cl_{int} expressed in μL/min/mg) is calculated according to the equation: $Cl_{int} = \frac{dose}{AUC_\infty} \Big/ [microsomes]$. Where dose is the initial concentration of product in the sample, AUC_∞ is the area under the concentration-time curve extrapolated to infinity and [microsomes] is the microsome concentration expressed in mg/μL.

Plasma protein binding procedure

The plasma doped with the tested compound is incubated at 37 °C in triplicate in one of the compartments of the insert, the other compartment containing a phosphate buffer solution at pH 7.2. After stirring for 4 h at 300 rpm, a 25 μL aliquot of each compartment is taken and diluted; the dilution solution is adapted to obtain an identical matrix for all the compartments after dilution. In parallel, the reprocessing of a plasma doped but not incubated will allow to evaluate the recovery of the study. The LC-MS used for this study is a Waters® Acquity I-Class/Xevo TQD, equipped with a Waters® Acquity BEH C18 column, 50 × 2.1 mm, 1.7 μm. The mobile phases are (A) ammonium acetate 10 mM and (B) acetonitrile with 0.1% formic acid. The injection volume is 1 μL and the flow rate is 600 μL/min. The chromatographic analysis, total duration of 4 min, is made with the following gradient: 0 < t < 0.2 min, 2% (B); 0.2 < t < 2 min, linear increase to 98% (B); 2 < t < 2.5 min, 98% (B); 2.5 < t < 2.6 min, linear decrease to 2% (B); 2.6 < t < 4 min, 2% (B). Carbamazepine, oxazepam, warfarine and diclofenac are used as reference drugs and Propranolol is used as internal standard. The unbound fraction (fu) is calculated according to the following

formula: $\mathbf{f_u} = \frac{\mathbf{A_{Plasma,\ 4h}} - \mathbf{A_{PBS,4h}}}{\mathbf{A_{Plasma,\ 4h}}} \times 100$. The percentage of recovery is calculated according to the following formula: $\%\ \mathbf{Recovery} = \frac{(\mathbf{V_{PBS}} \times \mathbf{A_{PBS,4h}}) + (\mathbf{V_{Plasma}} \times \mathbf{A_{Plasma,4h}})}{(\mathbf{V_{Plasma}} \times \mathbf{A_{Plasma,0h}})}$. Where A is the ratio of the area under peak of the studied molecule and the area under peak of the internal standard (propranolol 200 nM). V is the volume of solution present in the compartments (VPBS = 350 μL and Vplasma = 200 μL).

References

[1] D. Pace, Leishmaniasis, J. Infect. 69 (2014) S10–S18, https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016.

[2] P. Büscher, G. Cecchi, V. Jamonneau, G. Priotto, Human African trypanosomiasis, Lancet 390 (2017) 2397–2405, https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31510-6.

[3] http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/.

[4] World Health Organization: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/. updated 04/2017.

[5] World Health Organization: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/. updated 01/2017.

[6] B. Zulfiqar, T.B. Shelper, V.M. Avery, Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development, Drug Discov. Today 22 (2017) 1516–1531, https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.004.

[7] A. Ponte-Sucre, A. Gamarro, J.C. Dujardin, M.P. Barrett, R. Lopez-Vélez, R. Garcia-Hernàndez, A.W. Pountain, R. Mwenechanya, B. Papadopoulou, Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: a 21st century challenge, PLoS Neglected Trop. Dis. 11 (2017), https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052 e0006052.

[8] M.C. Field, D. Horn, A.H. Fairlamb, M.A.J. Ferguson, D.W. Gray, K.D. Read, M. De Rycker, L.S. Torrie, P.G. Wyatt, S. Wyllie, I.H. Gilbert, Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need, Nat. Rev. Microbiol. 15 (2017) 217–231, https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.193.

[9] S. Patterson, S. Wyllie, S. Norval, L. Stojanovski, F.R.C. Simeons, J.L. Auder, M. Osuna-Cabello, K.D. Read, A.H. Fairlamb, The anti-tubercular drug delamanid as a potential oral treatment for visceral leishmaniasis, eLife 5 (2016) e09744, https://doi.org/10.7554/eLife.09744.

[10] W.C. Ang, A.M. Jarrad, M.A. Cooper, M.A.T. Blaskovich, Nitroimidazoles: molecular fireworks that combat a broad spectrum of infectious diseases, J. Med. Chem. 60 (2017) 7636–7657, https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00143.

[11] DNDi: https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/updated 12/2017.

[12] V.K.B.K. Mesu, W.M. Kalonji, C. Bardonneau, O.V. Mordt, S. Blesson, F. Simon, S. Delhomme, S. Bernhard, W. Kuziena, J.F. Lubaki, S.L. Vuvu, P.N. Ngima, H.M. Mbembo, M. Ilunga, A.K. Bonama, J.A. Heradi, J.L.L. Solomo, G. Mandula, L.K. Badibabi, F.R. Dama, P.K. Lukula, D.N. Tete, C. Lumbala, B. Scherrer, N. Strub-Wourgaft, A. Tarral, Oral fexinidazole for late-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a pivotal multicentre, randomised, non-inferiority trial, Lancet (2018) 144–154, https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32758-7.

[13] S. Patterson, S. Wyllie, Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects, Trends Parasitol. 30 (2014) 289–298, https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.003.

[14] S. Wyllie, S. Patterson, L. Stojanovski, F.R.C. Simeons, S. Norval, R. Kime, K.D. Read, A.H. Fairlamb, The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis, Sci. Transl. Med. 4 (2012) 119re1, https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003326.

[15] P. Verhaeghe, P. Rathelot, S. Rault, P. Vanelle, Convenient preparation of original vinylic chlorides with antiparasitic potential in quinoline series, Lett. Org. Chem. 3 (2006) 891–897, https://doi.org/10.2174/157017806779467997.

[16] L. Paloque, P. Verhaeghe, M. Casanova, C. Castera-Ducros, A. Dumètre, L. Mbatchi, S. Hutter, M. Kraiem-M'Rabet, M. Laget, V. Remusat, S. Rault, P. Rathelot, N. Azas, P. Vanelle, Discovery of a new antileishmanial hit in 8-nitroquinoline series, Eur. J. Med. Chem. 54 (2012) 75–86, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.04.029.

[17] C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe, S. Hutter, C. Castera-Ducros, M. Laget, V. Remusat, M. Kraiem M'Rabet, S. Rault, P. Rathelot, N. Azas, P. Vanelle, Looking for new antileishmanial derivatives in 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one series, Eur. J. Med. Chem. 92 (2015) 282–294, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.029.

[18] C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe, L. Paloque, S. Hutter, C. Castera-Ducros, M. Laget, S. Rault, A. Valentin, P. Rathelot, N. Azas, P. Vanelle, Antileishmanial pharmacomodulation in 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one series, Bioorg. Med. Chem. 23 (2015) 2377–2386, https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.064.

[19] V.P. Andreev, Y.P. Nizhnik, Reaction of 2,4-dibromoquinoline with hydrogen chloride, Russ. J. Org. Chem. 38 (2002) 137–138, https://doi.org/10.1023/A:1015331531268.

[20] N.J. O'Brien, M. Brzozowski, D.J.D. Wilson, L.W. Deady, B.M. Abbott, Synthesis and biological evaluation of substituted 3-anilinoquinolin-2(1*H*)-ones as PDK1 inhibitors, Bioorg. Med. Chem. 22 (2014) 3781–3790, https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.04.037.

[21] F. Zaragoza, H. Stephensen, B. Peschke, K. Rimvall, 2-(4-Alkylpiperazin-1-yl) quinolines as a new class of Imidazole-free Histamine H_3 Receptor Antagonists, J. Med. Chem. 48 (2005) 306–311, https://doi.org/10.1021/jm031028z.

[22] R.I. Zubatyuk, L. Gorb, O.V. Shishkin, M. Qasim, J. Leszczynski, Exploration of density functional methods for one-electron reduction potential of nitrobenzenes, J. Comput. Chem. 31 (2010) 144–150, https://doi.org/10.1002/jcc.21301.

[23] M. Uchimiya, L. Gorb, O. Isayev, M.M. Qasim, J. Leszczynski, One-electron standard reduction potentials of nitroaromatic and cyclic nitramine explosives, Environ. Pollut. 158 (2010) 3048–3053, https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.06.033.

[24] E. Torreele, B. Bourdin Trunz, D. Tweats, M. Kaiser, R. Brun, G. Mazué, M.A. Bray, B. Pécoul, Fexinidazole – a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness, PLoS Neglected Trop. Dis. 4 (2010) e923, https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000923.

[25] S. Wyllie, S. Patterson, A.H. Fairlamb, Assessing the essentiality of Leishmania donovani nitroreductase and its role in nitro drug activation, Antimicrob. Agents Chemother. 57 (2013) 901–906, https://doi.org/10.1128/AAC.01788-12.

[26] S. Wyllie, A.J. Roberts, S. Norval, S. Patterson, B.J. Foth, M. Berriman, K.D. Read, A.H. Fairlamb, Activation of bicyclic nitro-drugs by a novel nitroreductase (NTR2) in Leishmania, PLoS Pathog. 12 (2016) e1005971, https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005971.

[27] V. Purohit, A.K. Basu, Mutagenicity of nitroaromatic compounds, Chem. Res. Toxicol. 13 (2000) 673–692, https://doi.org/10.1021/tx000002x.

[28] E.J. Rosenkranz, E.C. McCoy, R. Mermelstein, H.S. Rosenkranz, Evidence for the existence of distinct nitroreductases in Salmonella typhimurium: roles in mutagenesis, Carcinogenesis 3 (1982) 121–123, https://doi.org/10.1093/carcin/3.1.121.

[29] A. Buschini, L. Ferrarini, S. Franzoni, S. Galati, M. Lazzaretti, F. Mussi, C. Northfleet de Albuquerque, T.-M. Araujo Domingues Zucchi, P. Poli, Genotoxicity revaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole and metronidazole, J. Parasitol. Res. 2009 (2009), https://doi.org/10.1155/2009/463575.

[30] F. Misani, N.T. Bogert, The search for superior drugs for tropical diseases; further experiments in the quinolone group, J. Org. Chem. 10 (1945) 458–463, https://doi.org/10.1021/jo01181a012.

[31] I.G. Moores, R.K. Smalley, H. Suschitzky, Alkaline Hydrolysis of 2-(Trifluoromethyl)imidazo[4,5-f] and –[4,5-h] quinolines, J. Fluorine Chem. 20 (1982) 573–580, https://doi.org/10.1016/S0022-1139(00)82282-4.

[32] M. Ishikawa, I. Kikkawa, Studies on quinoline derivatives. IV, Yakugaku Zasshi 75 (1955) 36–39, https://doi.org/10.1248/yakushi1947.75.1_36.

[33] V.V. Patil, G.S. Shankarling, Steric-hindrance-induced Regio- and Chemoselective Oxydation of Aromatic amines, J. Org. Chem. 80 (2015) 7876–7883, https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b00582.

[34] O.H. Johnson, C.S. Hamilton, Syntheses in the quinoline series. III. The nitration of 2-chloro-4-methylquinoline and the preparation of some 2-hydroxy-4-methyl-8-(dialkylaminoalkyl)-aminoquinolines, J. Am. Chem. Soc. 63 (1941) 2867–2869, https://doi.org/10.1021/ja01856a003.

[35] A.R. Todorov, T. Wirtanen, J. Helaja, Photoreductive removal of *O*-Benzyl groups from Oxyarene *N*-Heterocycles assisted by *O*-Pyridine-pyridone Tautomerism, J. Org. Chem. 82 (2017) 13756–13767, https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02775.

[36] E. Rosenhauer, Über Reaktionen von N-Alkyl-α-methylen-chinolanen, I.: Diazo-Kupplung der Methylenbase in neutraler Lösung. (Mitbearbeitet von O. Dannhofer.), Eur. J. Inorg. Chem. 57 (1924) 1291–1294, https://doi.org/10.1002/cber.19240570813.

[37] T. Hashimoto, Amyostatic poisons. VIII. Syntheses of alkyl derivatives of 3-amino-3,4-dihydrocarbostyril and diamino-3,4-dihydrocarbostyril, Yakugaku Zasshi 75 (1955) 340–342, https://doi.org/10.1248/yakushi1947.75.3_340.

[38] K. Mislow, J.B. Koepfli, The synthesis of potential Antimalarials. Some 2-substituted 8-(3-Diethylaminopropylamino)-quinolines, J. Am. Chem. Soc. 68 (1946) 1553–1556, https://doi.org/10.1021/ja01212a050.

[39] Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery Jr, J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Keith, T., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, O., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., Fox, D. J. (2013) Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT.

[40] Y. Zhao, D.G. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals, Thero. Chem. Acc. 120 (2008) 215–241, https://doi.org/10.1007/s00214-007-0310-x.

[41] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, Quantum mechanical continuum solvation models, Chem. Rev. 105 (2005) 2999–3093, https://doi.org/10.1021/cr9904009.

[42] C.P. Kelly, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, Aqueous solvation free energies of Ions and Ion-water Clusters based on an accurate value for the absolute aqueous

solvation free energy of the Proton, J. Phys. Chem. B 110 (2006) 16066–16081, https://doi.org/10.1021/jp063552y.
[43] C. Zhang, S. Bourgeade-Delmas, A.F. Alvarez, A. Valentin, C. Hemmert, H. Gornitzka, Synthesis, characterization, and antileishmanial activity of neutral *N*-heterocyclic carbenes gold(I) complexes, Eur. J. Med. Chem. 143 (2018) 1635–1643, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.060.
[44] T.J. Mosman, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Meth. 65 (1983) 55–63, https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.
[45] R.I. Da Luz, M. Vermeersch, J.C. Dujardin, P. Cos, L. Maes, Vitro sensitivity testing of Leishmania clinical field Isolates: Preconditioning of promastigotes Enhances Infectivity for macrophage host cells, Antimicrob. Agents Chemother. 53 (2009) 5197–5203, https://doi.org/10.1128/AAC.00866-09.
[46] S. Goyard, H. Segawa, J. Gordon, M. Showalter, R. Duncan, S.J. Turco, S.M. Beverley, An in vitro system for developmental and genetic studies of *Leishmania donovani* phosphoglycans, Mol. Biochem. Parasitol. 130 (2003) 31–42, https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00142-7.
[47] S. Wyllie, S. Patterson, A.H. Fairlamb, Assessing the essentiality of Leishmania donovani nitroreductase and its role in nitro drug activation, Antimicrob. Agents Chemother. 57 (2013) 901–906, https://doi.org/10.1128/AAC.01788-12.
[48] S. Wyllie, A.J. Roberts, S. Norval, S. Patterson, B.J. Foth, M. Berriman, K.D. Read, A.H. Fairlamb, Activation of bicyclic nitro-drugs by a novel nitroreductase (NTR2) in Leishmania, PLoS Pathog. 12 (2016) e1005971, https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005971.
[49] S. Wyllie, S. Patterson, L. Stojanovski, F.R.C. Simeons, S. Norval, R. Kime, K.D. Read, A.H. Fairlamb, The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis, Sci. Transl. Med. 4 (2012) 119re1, https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003326.
[50] T. Baltz, D. Baltz, C. Giroud, J. Crockett, Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *T. brucei, T. equiperdum, T. evansi, T. rhodesiense and T. gambiense*, EMBO J. 4 (1985) 1273–1277.
[51] B. Räz, M. Iten, Y. Grether-Bühler, R. Kaminsky, The AlamarBlue® Blue assay to determine drug sensitive of African trypanosome (*T. brucei rhodesiense* and *T. brucei gambiense*) in vitro, Acta Trop. 68 (1997) 139–147, https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00079-X.
[52] J. Guillon, A. Cohen, R. Nath Das, C. Boudot, N. Gueddouda, S. Moreau, L. Ronga, S. Savrimoutou, S. Rubio, S. Amaziane, A. Dassonville-Klimpt, N. Asas, B. Courtioux, J.L. Mergny, C. Mullié, P. Sonnet, Design, synthesis, and anti-protozoal evaluation of new 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline derivatives, Chem. Biol. Drug Des. (2018) 1–22, https://doi.org/10.1111/cbdd.13164.
[53] N. Greig, S. Wyllie, S. Patterson, A.H. Fairlamb, FEBS J. 276 (2009) 376–386.
[54] S. Wyllie, B.J. Foth, A. Kelner, A.Y. Sokolova, M. Berriman, A.H. Fairlamb, J. Antimicrob. Chemother. 71 (2016) 625–634.
[55] D.C. Jones, I. Hallyburton, L. Stojanovski, K.D. Read, J.A. Frearson, A.H. Fairlamb, Biochem. Pharmacol. 80 (2010) 1478–1486.
[56] M. De Méo, M. Laget, C. Di Giorgio, H. Guiraud, A. Botta, M. Castegnaro, G. Duménil, Optimization of the Salmonella/mammalian microsome assay for urine mutagenesis by experimental designs, Mutat. Res. 340 (1996) 51–65.
[57] H. Perdry, K.B. Gutzkow, M. Chevalier, L. Huc, G. Brunborg, E. Boutet-Robinet, Validation of Gelbond® high-throughput alkaline and Fpg-modified comet assay using a linear mixed model, Environ. Mol. Mutagen. (2018), https://doi.org/10.1002/em.22204.

II.1.2. Etude des 26 molécules issues de la pharmacomodulation en position 3 de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one (partie 2)

Partant des résultats obtenus sur la molécule 24 ou 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one, différentes pharmacomodulations ont été initiées en modifiant notamment la position 3 du noyau via des couplages pallado-catalysés suivant les réactions de Suzuki-Miyaura ou de Sonogashira (figure 47).

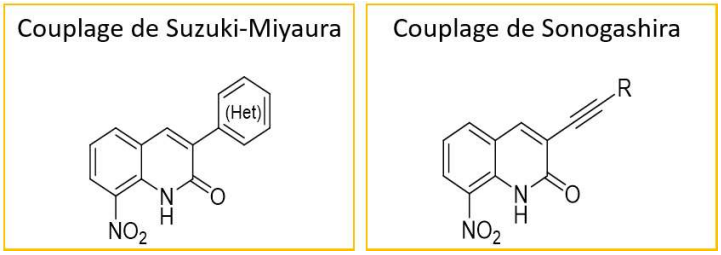


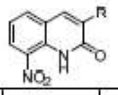
Figure 47. Structure des précurseurs des molécules de cette série

Ainsi l'équipe du LCC a pu synthétiser 26 nouvelles molécules avec l'ajout de différents substituants en position 3 du pharmacophore. Ces 26 composés ont dû subir une évaluation biologique afin de connaitre leur valeur de CC_{50} et de CI_{50}. Puis, une étude *in vitro* de la capacité à franchir la BHE a été menée sur le composé présentant le meilleur profil, condition importante pour le traitement de la Trypanosomose Africaine.

II.1.2.1. Tests *in vitro*

a) Mesure de la cytotoxicité

Comme pour les 35 premières molécules, à la suite de la synthèse chimique, des études de mesure de la cytotoxicité ont été menées sur la souche cellulaire HepG2 pour évaluer le profil de nos nouvelles molécules. Les résultats de CC_{50} sont les suivants (tableau 10) :



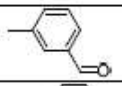
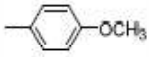
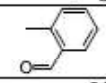
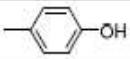
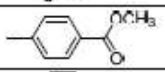
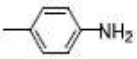
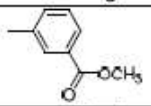
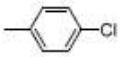
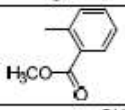
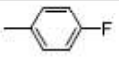
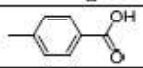
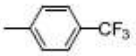
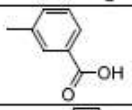
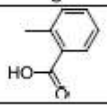
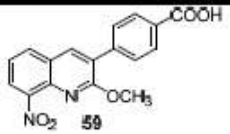
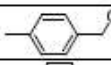
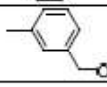
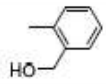
Numéro	R	CC_{50} HepG2 (µM)	Numéro	R	CC_{50} HepG2 (µM)
36		>12	51		> 100
37		>6	52		>50
38		>3	53		>12.5
39		>3	54		NS
40		>3	55		NS
41		>6	56		120 ± 7
42		>6	57		>100
43		>6	58		>100
44		>3	22	H	164 ± 28
45		>25	24	Br	92 ± 13
46		NS	 59		>100
47		>25	Doxorubicine		0,2 ± 0,02
48		>25	Amphotéricine B		7 ± 0,25
			Miltéfosine		84,5 ± 8,8
49		>100	Fexinidazole		>200
			Suramine		>200
50		30 ± 3.7	Eflornithine		>200

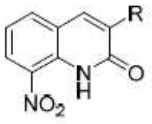
Tableau 10. Résultats de l'évaluation de la cytotoxicité des 26 molécules

Sur les 26 molécules, onze molécules en bleu présentent une CC_{50} intéressante. Parmi ces 26 molécules, six molécules présentent un profil des plus prometteur avec des CC_{50} > 100 µM dont 4 possédant un groupement carboxylique permettant une meilleure solubilité, par rapport à la molécule 24.

BY-NC-ND

b) Mesure de l'activité antiparasitaire

Suivant le même protocole que pour les 35 molécules de la partie 1, les molécules ayant répondu positivement aux tests de cytotoxicité ont été testées sur des formes amastigotes de *L. infantum* par l'UMR IRD 152, puis ont été testées sur la forme trypomastigote de *T.b.b.* à Limoges. Les résultats obtenus sont les suivants (tableau 11).



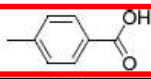
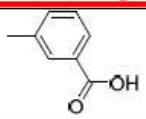
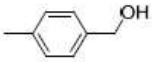
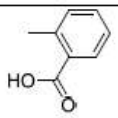
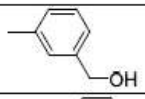
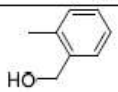
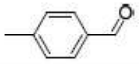
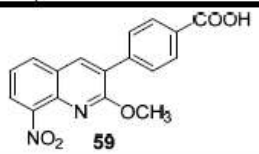
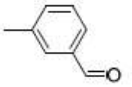
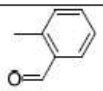
Numéro	R	CI_{50} *T. b. brucei* trypoma. (µM)	Numéro	R	CI_{50} *T. b. brucei* trypoma. (µM)
36		4,7 ± 2,7	56		1,5 ± 0,2
45		2,8 ± 0,8	57		7,5 ± 1,0
47		1,9 ± 0,3	58		>50
48		1,5 ± 0,3	22	H	23,4 ± 5,7
49		7,2 ± 0,6	24	Br	1,9 ± 0,44
50		0,5 ± 0,1	 59		2,2 ± 0,5
51		5,6 ± 0,4	Suramine		0,03 ± 0,009
52		7,5 ± 0,4	Eflornithine		15,8 ± 2,1
			Fexinidazole		0,4 ± 0,18

Tableau 11. Résultats de l'évaluation de l'activité trypanocide des 12 molécules dérivant de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one

Sur les 12 molécules testées, 11 montrent des résultats de CI_{50} prometteurs dont 5 (en bleu) présentent des CI_{50} < 3 µM. Ces molécules ont une meilleure activité que l'eflornithine. Une d'entre elles, la molécule 50 a une valeur extrêmement proche de celle du fexinidazole de l'ordre de 0,5 µM. Une seule, la molécule 58 a une CI_{50} > 50 µM, ce qui n'est pas intéressant pour la poursuite des analyses. Les travaux des chimistes montrent que la position des substituants du phényl en position 3 au niveau du pharmacophore semble être primordiale.

BY-NC-ND

Comme on peut le voir sur le tableau 9, la substitution en para semble la plus active (molécule 56) alors que la position ortho semble la moins efficace (molécule 58) notamment lorsqu'il s'agit d'un groupement carboxylique.

Ainsi il est clairement établi que la molécule 56 présente le meilleur profil car il s'agit de la plus active (CI_{50} de 1,5 µM) et la moins cytotoxique (CC_{50} de 120 µM) et cela par comparaison au « hit » précédemment identifié appelé molécule 24 (cf partie 1). Toutefois, elle n'est pas encore aussi efficace que le fexinidazole.

De ce fait la molécule 56 peut être qualifiée de nouveau « hit » dans cette série de molécules substituées en position 3 du pharmacophore, avec notamment un IS de 80 (la molécule 24 a un IS de 48,4).

Complétant ces évaluations, une analyse par l'équipe de Dundee sur des souches de trypanosomes sauvage 'single marker' S427 (T7RPOL TETR NEO) et surexprimant la NTR1 a été menée comme pour la molécule 24. Suivant le même protocole, les résultats sont les suivants (tableau 12) :

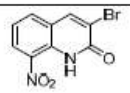
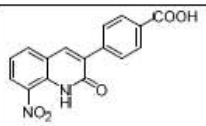
N°	Structure	CI_{50} *T. b. brucei* trypoma. sauvage (µM)	CI_{50} *T. b. brucei* trypoma. NTR^{SE} (µM)
24		17,7 ± 1,0	3,9 ± 0,1 (x4,5)
56		**5,4 ± 0,12**	**4,2 ± 0,2 (x1,3)**
Nifurtimox		1,87 ± 0,05	0,6 ± 0,05 (x3,1)

Tableau 12. Tests d'activité de la molécule 56 vis-à-vis d'une souche de *T.b.b.* sauvage et une surexprimant la NTR1

Les résultats obtenus montrent que la molécule 56 présente une activité trypanocide augmentée d'un facteur 1,3 entre la souche sauvage et la souche surexprimant la NTR1. La molécule 56 est donc moins bioactivée par la NTR1 que la molécule 24 qui présente une activité multipliée par un facteur 4,5.

Or si l'activité de la molécule 56 ne varie que peu entre une souche surexprimant la NTR1 et une souche sauvage, il se pourrait que son action dépende d'une autre cible sur le trypanosome qu'il serait nécessaire de mettre en évidence.

BY-NC-ND

c) Etude du franchissement de la BHE

La molécule 56 qui présente donc une bonne activité trypanocide doit répondre à plusieurs critères afin d'être appréciée comme traitement de la Trypanosomose africaine. Notamment une capacité à franchir la BHE et ainsi pouvoir traiter un stade nerveux. Pour cela, et avant d'envisager une étude *in vivo*, des tests *in vitro* de passage de la BHE ont été réalisée comme le test PAMPA (parallel articifial membrane permeability assay) (Kansy et al., 1998). Il permet de mesurer la capacité d'une molécule à traverser une membrane artificielle constituée de phospholipides séparant 2 compartiments (figure 48).

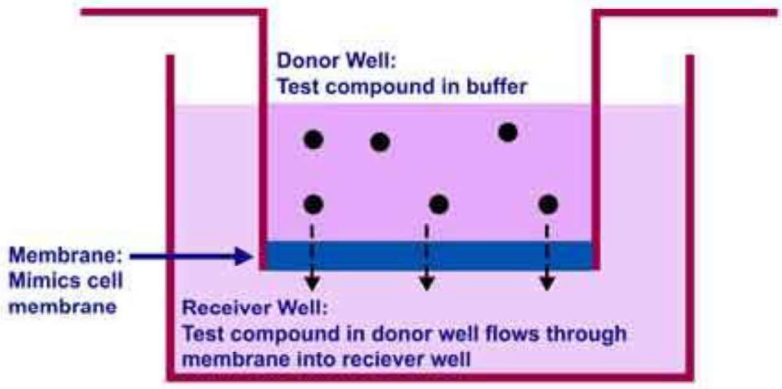


Figure 48. Principe du test PAMPA
(bioassaysys.com)

Le Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN) a réalisé ces tests sur la molécule 56 avec l'utilisation de 2 contrôles connus, la théophylline ne traversant pas les membranes et la corticostérone capable de diffuser. Les résultats obtenus sont présentés ci-après (tableau 13).

Nom	Concentration (µM)	logPe	Pe (10^{-6}cm/s)	Interprétation
Molécule 56	50	-6,41 ± 0,32	0,46 ± 0,23	Ne diffuse pas
Théophylline	250	-6,26 ± 0,03	0,55 ± 0,03	Ne diffuse pas
Corticostérone	100	-4,86 ± 0,07	13,86 ± 2,20	Diffuse

Tableau 13. Résultats de l'évaluation du test PAMPA pour la molécule 56

Pour évaluer la perméabilité membranaire aux différentes molécules, il a été nécessaire de calculer le coefficient de perméabilité (Pe). Ce coefficient représente la différence de

BY-NC-ND

concentration entre le compartiment « donneur » où la molécule est solubilisée en premier lieu, et le compartiment « receveur » où elle doit être présente si passage. On constate que la molécule 56 possède un Pe relativement faible et inférieur à la téophylline, le contrôle négatif. Cela signifie donc que la molécule 56 n'est pas capable de franchir la BHE et ne peut donc traiter un stade nerveux. Les critères que doit posséder une molécule pour franchir une membrane comme la BHE sont : un poids moléculaire pas trop important (inférieur à 400 g/mol), une bonne lipophilie et la présence de peu de groupements donneurs de liaisons hydrogènes. Or la molécule 56 bien que possédant un poids moléculaire faible (310 g/mol), possède un groupement COOH- chargé négativement responsable de cette absence de franchissement.

L'ensemble des tests menés sur les 26 molécules de cette nouvelle série a permis de faire ressortir une molécule d'intérêt, la molécule 56, pouvant être qualifiée de « hit » sélectif anti-*Trypanosoma*. Cette nouvelle molécule dévoile un meilleur profil que la molécule 24 avec une valeur de CC_{50} de 120 µM par rapport à 92 µM, une valeur de CI_{50} légèrement améliorée de l'ordre de 1,5 µM par rapport à 1,9 µM, et un IS de 80 au lieu de 48. Par contre, les résultats obtenus sur la souche surexprimant la NTR1 montre que la molécule 56 ne semble pas substrat de cette enzyme à l'inverse de la molécule 24. Il se pourrait donc qu'elle agisse sur d'autres cibles qu'il reste à identifier. La molécule 56, par sa fonction acide apportant une charge négative en solution, n'est pas capable de franchir la BHE, élément indispensable pour devenir un nouveau traitement contre la Trypanosomose Africaine.

Ces résultats sont prometteurs, et ont permis à l'équipe du LCC de considérer de nouvelles pharmacomodulations en tenant compte de l'importance de la substitution en position 3 du « hit » initial, la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one, mais également d'envisager une substitution en position 6 du pharmacophore.

Ce deuxième travail a été valorisé par une publication en 2018 intitulée « Antitrypanosomatid pharmacomodulation at position 3 of the 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one scaffold using pallado-catalyzed cross coupling reactions » (Pedron et al., 2018a).

BY-NC-ND

Antitrypanosomatid pharmacomodulation at position 3 of the 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one scaffold using palladium-catalyzed cross coupling reactions

Julien Pedron*, **Clotilde Boudot***, Sandra Bourgeade-Delmas, Alix Sournia-Saquet, Lucie Paloque, Maryam Rastegari, Mansour Abdoulaye, Hussein El-Kashef, Colin Bonduelle, Geneviève Pratviel, Susan Wyllie, Alan H. Fairlamb, Bertrand Courtioux, Pierre Verhaeghe, et Alexis Valentin

* Co-premier auteur

Publié en septembre 2018

Résumé:

Une étude de pharmacomodulation anti-kinétoplastidée en position 3 de la molécule 3-bromo-8-nitroquinoléine-2(1*H*)-one, récemment décrite comme un « hit », a été réalisée. Vingt-quatre dérivés ont été synthétisés à l'aide de la réaction de couplage croisé Suzuki-Miyaura puis ont été évalués *in vitro* sur des amastigotes axenic de *Leishmania infantum* et des trypomastigotes de *Trypanosoma brucei brucei*. L'introduction d'un groupement para-carboxyphényle en position 3 a conduit à la molécule hit antitrypanosomale 3-(4-carboxyphényl)-8-nitroquinoléine-2(1*H*)-one (21) avec un potentiel rédox inférieur (-0,56 V) à celui du premier hit (-0,45 V). Le composé 21 présente une activité antitrypanosomale intéressante (IC_{50} = 1,5 µm) et une faible cytotoxicité sur la lignée cellulaire humaine HepG2 (CC_{50}=120 µm), avec un indice de sélectivité plus élevé (SI=80) que la molécule de référence l'éflornithine. Contrairement aux résultats obtenus précédemment dans cette série, le composé « hit » 21 est inactif envers *L. infantum* et n'est pas bioactivé efficacement par la nitroréductase de type I de *T. brucei brucei*. Ceci suggère l'existence d'un mécanisme d'action alternatif.

BY-NC-ND

ChemPubSoc Europe

DOI: 10.1002/cmdc.201800456

CHEMMEDCHEM Full Papers

Antitrypanosomatid Pharmacomodulation at Position 3 of the 8-Nitroquinolin-2(1*H*)-one Scaffold Using Palladium-Catalysed Cross-Coupling Reactions

Julien Pedron[+],[a] Clotilde Boudot[+],[b] Sandra Bourgeade-Delmas,[c] Alix Sournia-Saquet,[a] Lucie Paloque,[a] Maryam Rastegari,[a] Mansour Abdoulaye,[a] Hussein El-Kashef,[d] Colin Bonduelle,[a] Geneviève Pratviel,[a] Susan Wyllie,[e] Alan H. Fairlamb,[e] Bertrand Courtioux,[b] Pierre Verhaeghe,*[a] and Alexis Valentin[c]

An antikinetoplastid pharmacomodulation study at position 3 of the recently described hit molecule 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one was conducted. Twenty-four derivatives were synthesised using the Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction and evaluated in vitro on both *Leishmania infantum* axenic amastigotes and *Trypanosoma brucei brucei* trypomastigotes. Introduction of a *para*-carboxyphenyl group at position 3 of the scaffold led to the selective antitrypanosomal hit molecule 3-(4-carboxyphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (**21**) with a lower reduction potential (−0.56 V) than the initial hit (−0.45 V). Compound **21** displays micromolar antitrypanosomal activity (IC_{50} = 1.5 μM) and low cytotoxicity on the human HepG2 cell line (CC_{50} = 120 μM), having a higher selectivity index (SI = 80) than the reference drug eflornithine. Contrary to results previously obtained in this series, hit compound **21** is inactive toward *L. infantum* and is not efficiently bioactivated by *T. brucei brucei* type I nitroreductase, which suggests the existence of an alternative mechanism of action.

Introduction

Kinetoplastids are flagellated protozoan parasites responsible for lethal neglected tropical diseases such as human African trypanosomiasis (HAT) and visceral leishmaniasis (VL). They are characterised by the presence of a circular piece of DNA, called a kinetoplast, adjacent to the flagellar basal body. *Trypanosoma* parasites are transmitted by the bite of an infected sandfly and are the causative agents of HAT, also known as sleeping sickness. There are many species of *Trypanosoma*, but only *T. brucei gambiense* and *T. brucei rhodesiense* are responsible for HAT.[1] During the process of infection, metacylic trypomastigotes enter the blood circulation from the bite of the tsetse fly and spread throughout the whole organism, where they differentiate into bloodstream trypomastigotes; this is the hemolymphatic stage. After several weeks or months of symptoms such as headaches, anaemia and hepatosplenomegaly, trypomastigotes cross the blood–brain barrier and cause damage to the central nervous system, leading to sleeping disorders, behavioural disorders, seizures, coma and finally death: this is the meningoencephalic stage.[2] *Leishmania*, which is responsible for leishmaniasis, is another protozoan parasite and is transmitted by the bite of an infected sandfly. *L. donovani* and *L. infantum* are the two major species causing the most severe form of the disease: VL.[3] In brief, metacyclic promastigotes penetrate the skin during the blood meal of an infected sandfly. They are internalised by mononuclear phagocytic cells such as macrophages, in which they differentiate into amastigotes. The parasites continue to multiply until the destruction of these cells and disseminate into many organs, such as liver and spleen, leading to death.[4]

It is estimated that more than 1 billion people are at risk of contracting HAT and VL and that each year there are 55000 new cases with more than 25000 deaths from these diseases.[5,6] These numbers are likely underestimated because of the difficulty in accessing rural areas and the unspecific symptoms in the early stages of the diseases. Currently, there are few efficient and safe drugs available on the market against these neglected tropical diseases. Pentamidine and suramin are used for the treatment of the first stage of HAT but these drugs are highly toxic and require the patient to be hospitalised for i.v.

[a] J. Pedron,[+] Dr. A. Sournia-Saquet, Dr. L. Paloque, M. Rastegari, M. Abdoulaye, Dr. C. Bonduelle, Dr. G. Pratviel, Prof. P. Verhaeghe
LCC-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse (France)
E-mail: pierre.verhaeghe@lcc-toulouse.fr

[b] C. Boudot,[+] Dr. B. Courtioux
Université de Limoges, UMR INSERM 1094, Neuroépidémiologie Tropicale, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges (France)

[c] Dr. S. Bourgeade-Delmas, Prof. A. Valentin
UMR 152 PharmaDev, Université de Toulouse, IRD, UPS, 35 Chemin des Maraîchers, 31400 Toulouse (France)

[d] Prof. H. El-Kashef
Assiut University, Faculty of Science, Department of Chemistry, 71516 Assiut (Egypt)

[e] Dr. S. Wyllie, Prof. A. H. Fairlamb
University of Dundee, School of Life Sciences, Division of Biological Chemistry and Drug Discovery, Dow Street, Dundee DD1 5EH (UK)

[+] These authors contributed equally to this work.

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under: https://doi.org/10.1002/cmdc.201800456.

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

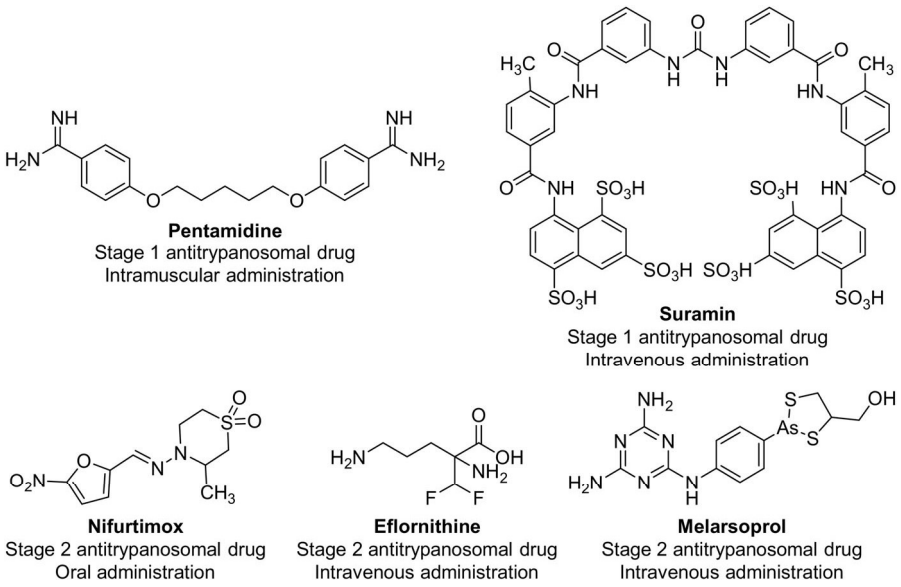


Figure 1. Structure, indication and route of administration of antitrypanosomal drugs on the market.

administration.[7] Melarsoprol, an arsenic-containing drug, and a combination of eflornithine and nifurtimox are suitable for the second stage of HAT (Figure 1).[8] The same is true of VL, for which only amphotericin B, miltefosine, antimonial derivatives, pentamidine and paromomycin are available. Among these drugs, miltefosine is the only orally available drug. These drugs are either expensive (e.g., liposomal amphotericin B), present severe side effects (e.g., the nephrotoxicity of amphotericin B, the teratogenicity of miltefosine) or show an increasing lack of efficacy due to the emergence of resistant parasites (antimony derivatives and miltefosine).[9] This global issue calls for the discovery of new antikinetoplastid molecules.

Unfortunately, today, there are only two new chemical entities in clinical trials against HAT and none against VL (Figure 2).[10] Acoziborole is an orally active benzoxaborole in phase IIb/III of clinical trials; it is active against both stages of HAT.[11] Fexinidazole, a 5-nitroimidazole, was recently in phase II of clinical trials against VL but showed a lack of efficacy, whereas it progressed to a phase IIIb study against HAT.[12,13] This molecule is rapidly metabolised in vivo into two metabolites (a sulfoxide and a sulfone derivative) which are active against the *Trypanosoma* parasites. Fexinidazole is selectively bioactivated by type I parasitic nitroreductases (NTRs) leading, through a successive two-electron reduction, to cytotoxic electrophilic metabolites such as nitroso and hydroxylamine derivatives.[14] Two NTRs have been identified in *Leishmania* (NTR1 and NTR2)[15,16] and only one in *Trypanosoma*.[17] These nitroreductases are absent from mammalian cells. Therefore, substrates of these enzymes could be selective antikinetoplastid candidates. Unfortunately, no X-ray structure of these parasitic NTRs is available, which restricts the use of most classical rational medicinal chemistry approaches, such as docking, for the design of new substrates of these enzymes.

Our research team has been working on the synthesis of new antikinetoplastid molecules for several years. Starting from a chemical study on 2-substituted nitroquinoline derivatives with antiparasitic potential,[18] we identified a new antileishmanial hit: 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one.[19] Pharmacomodulation studies at position 4 of this scaffold were then realised.[20,21] Recently, we described a comprehensive electrochemistry-guided study of this pharmacophore and the development of a computational model able to predict the redox potentials of each molecule in the series.[22] Thus, a new antikinetoplastid hit molecule was identified (Figure 3). This molecule was not genotoxic in a comet assay and was selectively bioactivated by type 1 NTRs of *L. donovani* and *T. brucei brucei*.[22]

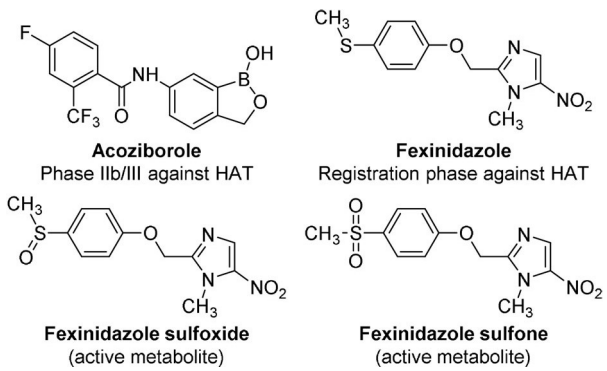


Figure 2. Molecular structure of drug candidates acoziborole and fexinidazole (with its active metabolites).

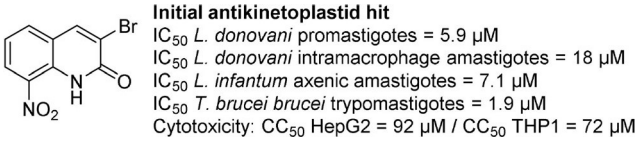


Figure 3. Structure and biological profile of the previously identified antikinetoplastid hit 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one.

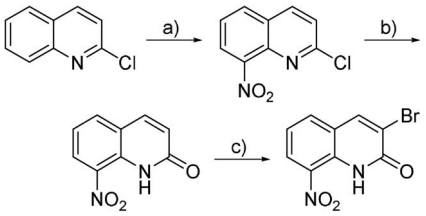
© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Here, we present a pharmacomodulation study at position 3 of the scaffold, using Suzuki–Miyaura or Sonogashira cross-coupling reactions. To explore structure–activity relationships, 26 molecules were synthesised and evaluated on both *L. infantum* axenic amastigotes and *T. brucei brucei* trypomastigotes. These molecules were also assessed for their cytotoxicity on the HepG2 human cell line.

Results and Discussion

Chemistry

3-Bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one was prepared in three steps, as presented in Scheme 1.[22] Nitration of 2-chloroquinoline mainly led to the intermediate 2-chloro-8-nitroquinoline, which was transformed in a second step into the corresponding lactam, according to a previously reported procedure.[23] 8-Nitroquinolin-2(1*H*)-one was finally selectively halogenated at position 3 by heating in HBr (48% aqueous solution) at reflux in the presence of sodium bromate, as reported by O'Brien and co-workers.[24]

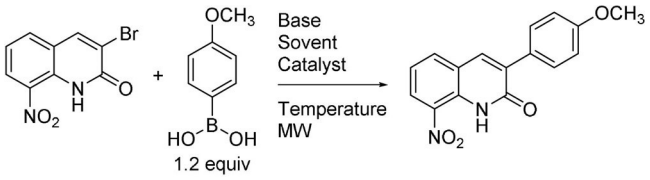


Scheme 1. Synthesis of the initial antikinetoplastid hit. a) H_2SO_4, HNO_3, RT, 2 h, 50%; b) CH_3CN, $HClO_4$, 100 °C, 72 h, 96%; c) $NaBrO_3$, HBr (48% in H_2O), 100 °C, 5 h, 68%.

Then, the microwave-assisted Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction between 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one and *p*-methoxyphenylboronic acid was studied to find optimal conditions (Table 1). Several parameters were investigated such as the nature of the solvent, base, Pd catalyst and the reaction temperature.

The first Suzuki–Miyaura reaction conditions (Table 1, entry 1) were inspired from a previously described protocol for introducing an aryl moiety at position 3 of the quinolinone ring.[25] This reaction was achieved in DMF with microwave (MW) heating, using 3 equivalents of Na_2CO_3 as a base, 0.1 equivalents of $Pd(OAc)_2$ as a catalyst and 1.2 equivalents of *p*-methoxyphenylboronic acid in a sealed tube, to afford the desired compound in 43% yield. The first parameter studied was the solvent (Table 1, entries 1–7). By using toluene, dioxane, THF, 1,2-dimethoxyethane (DME) or DMSO, partial conversion or degradation of the substrate was observed, whereas the use of a DMF/H_2O mixture led to a 46% yield. Then, two others bases were studied (Table 1, entries 8–9) but in each case led to the degradation of the substrate within 1 h. In DMF, the replacement of $Pd(OAc)_2$ with $Pd(PPh_3)_4$ decreased the yield of the reaction from 43% to 26% (Table 1, entry 10). Then, adapting another previously described protocol using DME and $Pd(PPh_3)_4$ (Table 1, entry 11), a slightly better yield was obtained.[26] This result was then improved by replacing Na_2CO_3 with K_2CO_3, which afforded a yield of 84%. The nature of the

Table 1. Optimisation of the Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction between 3-bromo-8-nitroquinolin-2(*1H*)-one and *p*-methoxyphenylboronic acid.



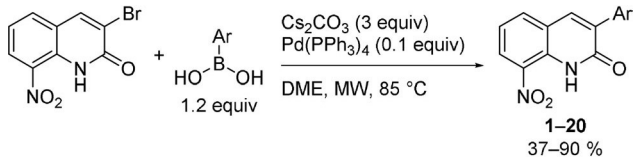
Entry	Solvent	Base, 3 equiv	Catalyst	Temperature [°C]	Time [h]	Yield [%][a]
1	DMF	Na_2CO_3	$Pd(OAc)_2$, 0.1 equiv	150	1	43
2	DMSO	Na_2CO_3	$Pd(OAc)_2$, 0.1 equiv	150	1	–[b]
3	Toluene	Na_2CO_3	$Pd(OAc)_2$, 0.1 equiv	110	8	–[c]
4	Dioxane	Na_2CO_3	Pd(OAc), 0.1 equiv	100	8	–[c]
5	THF	Na_2CO_3	$Pd(OAc)_2$, 0.1 equiv	66	8	–[c]
6	DME	Na_2CO_3	$Pd(OAc)_2$, 0.1 equiv	85	8	–[c]
7	DMF/H_2O (8:2)	Na_2CO_3	$Pd(OAc)_2$, 0.1 equiv	100	1	46
8	DMF/H_2O (8:2)	K_2CO_3	$Pd(OAc)_2$, 0.1 equiv	100	1	–[b]
9	DMF/H_2O (8:2)	Cs_2CO_3	$Pd(OAc)_2$, 0.1 equiv	100	1	–[b]
10	DMF	Na_2CO_3	$Pd(PPh_3)_4$, 0.1 equiv	150	1	26
11	DME	Na_2CO_3	$Pd(PPh_3)_4$, 0.1 equiv	85	3	52
12	DME	K_2CO_3	$Pd(PPh_3)_4$, 0.1 equiv	85	4	84
13	DME	K_2CO_3	$Pd(PPh_2)Cl_2$, 0.1 equiv	85	8	–[c]
14	DME	K_2CO_3	$Pd(dppf)Cl_2$, 0.1 equiv	85	8	–[c]
15	DME	K_2CO_3	$Pd(OAc)_2$, 0.1 equiv	85	8	–[c]
16	**DME**	**Cs_2CO_3**	**$Pd(PPh_3)_4$, 0.1 equiv**	**85**	**2**	**88**
17	DME	CsF	$Pd(PPh_3)_4$, 0.1 equiv	85	2	88
18	DME	Cs_2CO_3	$Pd(PPh_3)_4$, 0.05 equiv	85	4	56

[a] The yield was calculated after purification by chromatography on silica gel. [b] Degradation of the substrate was observed by TLC. [c] Only partial conversion of the substrate was observed by TLC.

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

catalyst was then studied (Table 1, entries 13–15), but none of these reactions led to an improvement in the yield, and only a few percent conversion was observed. Finally, the best results were obtained by using Cs_2CO_3 or CsF as a base (Table 1, entries 16 and 17), which afforded efficient Suzuki–Miyaura cross-coupling reactions of this substrate. Decreasing of the amount of catalyst to 0.05 equivalents led to a lower reaction yield (56% Table 1, entry 18) in comparison with the reaction conditions of entry 16, which were chosen as the most suitable.

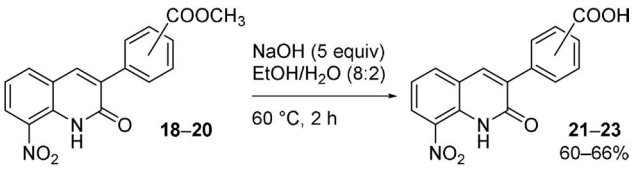
Next, the procedure was extended to 19 other arylboronic acids, to afford new derivatives bearing phenyl, thiophene, furan or pyridine moieties at position 3 of the scaffold (Scheme 2). The reactions yields were generally greater than 65% (for 14 derivatives) but were lower for 4-hydroxyphenylboronic acid and 4-aminophenylboronic acid with 37% and 41% yields, respectively.



Scheme 2. General procedure for the Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction between 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one and various arylboronic acids.

Three additional compounds (**21–23**) were synthesised by the saponification of compounds **18–20** into the carboxylic acid derivatives, using an excess of sodium hydroxide in an ethanol/water mixture (Scheme 3).

In parallel, with the aim of broadening the chemical diversity at position 3 of the scaffold and introduce alkynyl moieties, a Sonogashira cross-coupling reaction was devised. The initial conditions were adapted from a previously described protocol.[27] As presented in Table 2, after brief optimisation of the reaction between 3-bromo-8-nitroquinolinone and phenylacetylene, DME was chosen as the solvent, and the reaction was carried out at 15 °C (Table 2, entry 6). Interestingly, it was noted



Scheme 3. Preparation of compounds **21–23**.

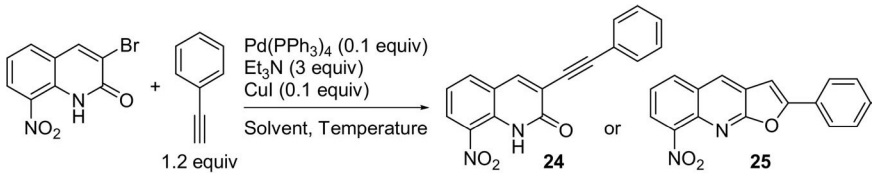
that temperature had a strong influence on the reaction. At 0 °C in DME, the reaction did not take place, whereas it proceeded at 15 and 25 °C, affording compound **24**. Surprisingly, the unexpected 8-nitro-2-phenylfuro[2,3-*b*]quinoline (**25**) formed with heating at 40 °C in DME or DMF. Compound **25** was also obtained upon attempting to recrystallise **24** from acetonitrile, underlining the instability of this product. Such a consecutive Sonogashira coupling and cyclisation reaction, leading to furo[2,3-*b*]pyridine derivatives, has been reported in refs. [28] and [29].

The optimisation of both Suzuki–Miyaura and Sonogashira cross-coupling reactions led to the synthesis of 25 new molecules with either an aryl or an alkynyl group at position 3 of the scaffold. With the exception of compound **24**, which was considered too unstable, all these molecules were evaluated in vitro to determine their antikinetoplastid potential. Compound **25** could not be evaluated because of low aqueous solubility.

Compound evaluation

Initially, the cytotoxicity of these molecules was assessed in vitro on the HepG2 human cell line, and the corresponding CC_{50} values were compared with that of the reference drug doxorubicin (Table 3). The biological results showed that compounds **1–11** were not soluble enough in aqueous medium to be tested. The water solubility was improved with compounds **10**, **12–17** and **21–23** bearing either a pyridin-3-yl or a phenyl moiety at position 3 of the scaffold; the phenyl group being substituted by a hydrophilic group such as hydroxymethyl or aldehyde or an ionised carboxyl group. These compounds dis-

Table 2. Optimisation of the Sonogashira cross-coupling reactions of 3-bromo-8-nitroquinolin-2(*1H*)-one.

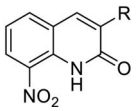


Entry	Solvent	Temperature [°C]	Yield **24** [%][a]	Yield **25** [%][a]	Time [h]
1	DMF	25	–[b]	–[b]	48
2	THF	25	–[b]	–[b]	48
3	Et_3N	25	–[b]	–[b]	48
4	DME	25	**56**	0	0.25
5	DME	0	–[b]	–[b]	48
6	DME	15	**72**	0	1.5
7	DME	40	0	**51**	0.5
8	DMF	40	0	**56**	36

[a] The yield was calculated after purification by chromatography on silica gel. [b] Only partial conversion of the substrate was observed by TLC.

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Table 3. In vitro antileishmanial, antitrypanosomal and cytotoxic activities of compounds **1–25** and reference standards.



Compound	R (% yield)	IC_{50} [μM]		HepG2 CC_{50} [μM]	Antitrypanosomal selectivity index[g]
		L. infantum axenic amastigotes	*T. brucei brucei* trypomastigotes		
1	Phenyl (90)	>12[a]	4.7±2.7	>12[a]	>2
2	4-OCH_3-phenyl (88)	>6[a]	–	>6[a]	–
3	4-OH-phenyl (37)	>3[a]	–	>3[a]	–
4	4-NH_2-phenyl (41)	>3[a]	–	>3[a]	–
5	4-Cl-phenyl (73)	>3[a]	–	>3[a]	–
6	4-F-phenyl (70)	>6[a]	–	>6[a]	–
7	4-CF_3-phenyl (60)	>6[a]	–	>6[a]	–
8	3-thienyl (92)	>6[a]	–	>6[a]	–
9	2-furyl (65)	>3[a]	–	>3[a]	–
10	3-pyridyl (62)	>50[a]	2.8±0.8	>25[a]	>9
11	4-pyridyl (71)	NS[b]	–	NS[b]	–
12	4-CH_2OH-phenyl (77)	>25[a]	1.9±0.3	>25[a]	>13
13	3-CH2OH-phenyl (87)	29.3±4.2	1.5±0.3	>25[a]	>17
14	2-CH_2OH-phenyl (72)	22±2.0	7.2±0.6	>100[c]	>14
15	4-CHO-phenyl (51)	35±1.7	0.5±0.1	30±3.7	60
16	3-CHO-phenyl (55)	10.2±0.6	5.6±0.4	>100[c]	>18
17	2-CHO-phenyl (65)	9.8±1.2	7.5±0.4	>50[a]	>7
18	4-$COOCH_3$-phenyl (72)	>12.5[a]	–	>12.5[a]	–
19	3-$COOCH_3$-phenyl (71)	NS[b]	–	NS[b]	–
20	2-$COOCH_3$-phenyl (71)	NS[b]	–	NS[b]	–
21	**4-COOH-phenyl (65)**	**>100[c]**	**1.5±0.2**	**120±7**	**80**
22	3-COOH-phenyl (60)	>100[c]	7.5±1.0	>100[c]	>13
23	2- COOH-phenyl (66)	>100[c]	>50[a]	>100[c]	-
Initial hit[22]	Br	7.1±1.5	1.9±0.44	92±13.0	48
8-Nitroquinolinone[22]	H	15.5±0.5	23.4±5.7	164±28	7
Doxorubicin[d]		–	–	0.2±0.02	–
Amphotericin B[e]		0.06±0.001	–	7.0±0.25	–
Miltefosine[e]		0.8±0.2	–	84.5±8.8	–
Fexinidazole[e,f]		3.3±0.7	0.4±0.18	>100[c]	>250
Suramin[f]		–	0.03±0.009	>100[c]	>3333
Eflornithine[f]		–	15.8±2.1	>100[c]	>6

[a] The product could not be tested at higher concentrations due to low solubility in aqueous media. [b] The product was not soluble at any test concentration. [c] The IC_{50} or CC_{50} value was not reached at the highest tested concentration. [d] Doxorubicin was used as a cytotoxic reference drug. [e] Amphotericin B, miltefosine and fexinidazole were used as antileishmanial reference drugs or drug candidates. [f] Fexinidazole, suramin and eflornithine were used as antitrypanosomal reference drugs or drug candidates. [g] The antitrypanosomal selectivity index was calculated according to the following formula: SI = CC_{50} HepG2/IC_{50} *T. brucei brucei*.

played low cytotoxicity on the HepG2 human cell line with CC_{50} values >25 μM. The compound bearing an aldehyde group in the *para* position of the phenyl ring (**15**) was the most cytotoxic of this series with a CC_{50} value of 30 μM.

Then, all synthesised compounds were tested in vitro against *L. infantum* axenic amastigotes. Their IC_{50} values were determined and compared with those of two antileishmanial reference drugs (amphotericin B and miltefosine) and to the drug candidate fexinidazole.

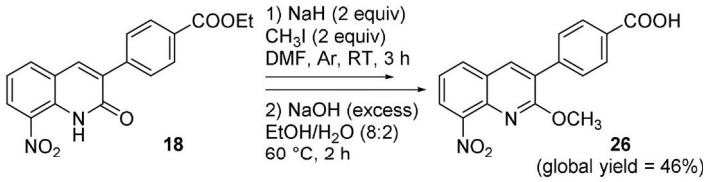
With respect to antileishmanial activity, apart for aldehyde-containing compounds **16** and **17**, the tested series appeared either weakly active (IC_{50} = 22–35 μM) or even inactive (IC_{50} > 100 μM for carboxylic acid derivatives) toward *L. infantum* in comparison with the reference drugs. Thus, introducing an aryl moiety at position 3 of the pharmacophore did not seem to favour antileishmanial activity.

In a second assay, only the compounds with appropriate aqueous solubility were tested in vitro against *T. brucei brucei* trypomastigotes and compared with reference antitrypanosomal drugs (suramin and eflornithine) and the drug candidate fexinidazole. All tested molecules displayed good antitrypanosomal activity (0.5 μM ≤ IC_{50} ≤ 7.5 μM), better than that of eflornithine (IC_{50} = 15.8 μM) and similar to that of fexinidazole (IC_{50} = 0.4 μM). Interestingly, compounds substituted at the *ortho* position of the phenyl ring (**14**, **17**, **23**) displayed higher IC_{50} values than their *meta*- and *para*-substituted analogues. Compounds with a *para*-substituted phenyl ring generally showed lower IC_{50} values than their *meta*-substituted analogues, for example, **15** being 11 times more potent than **16**, and **21** five times more potent than **22**. Compounds **15** and **21** appeared to be the most promising antitrypanosomal molecules in this series with respective IC_{50} values of 0.5 and

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

1.5 μM. Compound **21** emerged as a new antitrypanosomal hit, with an activity against *T. brucei brucei* close to that of the parent compound (IC_{50} = 1.9 μM) but with a better cytotoxicity profile, leading to a better selectivity index (SI = 80 versus 48 for the initial hit). By comparison with reference drugs, **21** appears less active than suramin but more active than eflornithine. With respect to fexinidazole, another nitroheterocycle, compound **21** presents the same cytotoxic profile with CC_{50} = 120 μM, and is three times less active than the drug candidate. Indeed, unlike fexinidazole and 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one, compound **21** displayed a selective antitrypanosomal activity, being inactive (IC_{50} > 100 μM) against *L. infantum*. This is a first indicator that molecule **21** shows a specific antiparasitic profile in the studied series.

Finally, the *O*-methylated analogue of hit compound **21** (**26**) was synthesised in two steps: *O*-methylation of **18**, using methyl iodide in DMF under an inert atmosphere, followed by saponification by the same procedure as described for compounds **21–23** (Scheme 4). Compound **26** was then tested in vitro against both *L. infantum* and *T. brucei brucei* (Figure 4).



Scheme 4. Preparation of compound **26**.

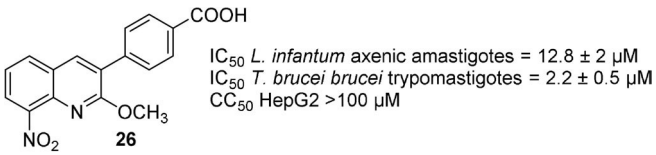


Figure 4. In vitro antiparasitic activities and cytotoxicity of compound **26**.

It was as active against *T. brucei brucei* as **21** (IC_{50} = 2.2 μM). Compound **26** was also active against *L. infantum* (IC_{50} = 12.8 μM), whereas **21** was not (IC_{50} > 100 μM). These results are surprising, considering that the hydrogen bond between the lactam function and the nitro group appeared mandatory for conferring antileishmanial activity on the 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one series by increasing the reduction potential.[22] This is a second indicator that the introduction of an aryl group at position 3 of the 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one scaffold might lead to a new antikinetoplasid mechanism of action, different from that of 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one.

To assess if the antitrypanosomal nitroheterocycle **21** was bioactivated by the NTR of *T. brucei brucei*, its IC_{50} value was measured on both a wild-type *T. brucei brucei* trypomastigote strain and a NTR-overexpressing strain (Table 4). The results were compared with those obtained for the initial hit.[22] The latter is clearly bioactivated by the trypanosomal NTR, being 4.5-fold more active against the strain overexpressing the NTR than the wild type, whereas **21** is only 1.3 times more active on the strain overexpressing the NTR. This result is a third piece of evidence that suggests that **21**, which is less intensively bioactivated by the trypanosomal NTR than the initial hit, could act on another parasite target. This assay also showed that compound **21** presents the same level of activity toward *T. brucei brucei* than the drug nifurtimox, which was used as a bioactivation control.

Table 4. Study of the bioactivation of **21** by trypanosomal nitroreductase.

Compound	*T. brucei brucei* trypomastigotes IC_{50} [μM]		Fold change
	Wild-type strain	NTR-overexpressing strain	
21	5.4 ± 0.12	4.2 ± 0.2	1.3
Initial hit	17.7 ± 1.0	3.9 ± 0.1	4.5
Nifurtimox	1.9 ± 0.05	0.6 ± 0.05	3.1

In parallel, an electrochemistry study was carried out by measuring in DMSO the reduction potentials of five 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one derivatives bearing an aryl group at position 3, using cyclic voltammetry (Table 5). For all compounds, a reversible single-electron reduction was observed (formation of an anion radical). The redox potentials of the new compounds bearing an aryl group at position 3 ranged between −0.53 and −0.59 V, higher than for the initial hit (−0.45 V) but similar to that of 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (−0.54 V). As previously noted in the studied series,[22] the *O*-methylation of compound **21** to give **24**, is responsible for an important decrease in the redox potential value from −0.56 to −0.93 V. This shift is mainly due to the removal of the intramolecular hydrogen bond between the lactam function and the nitro group. It can be concluded that the introduction of a phenyl ring at the position 3 of the scaffold has no significant impact on the redox potential of the studied series but that it allows access to novel antitrypanosomal molecules that display lower reduction potential than the initial hit with the same level of efficacy.

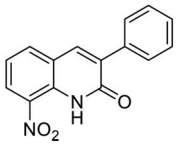
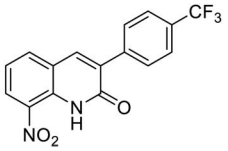
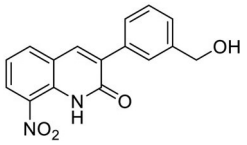
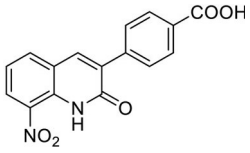
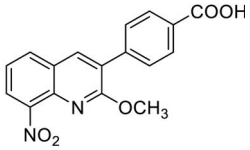
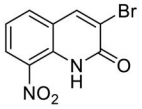
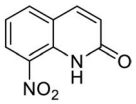
Thus, to understand the selective antitrypanosomal activity of **21**, other parasitic targets should be investigated. Among the parasitic targets that were recently reported in literature concerning the antitrypanosomal activity of new diverse nitroheterocycles, *S*-adenosylmethionine decarboxylase was identified by a high-throughput mass spectrometry-based assay conducted on 400 000 molecules,[30] and should be considered.

Conclusion

An optimised Suzuki–Miyaura reaction at position 3 of 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one led to the synthesis of 24 new derivatives. These molecules were screened in vitro against *L. infantum* and *T. brucei brucei* to evaluate their antikinetoplastid potential. Among these molecules, a new selective antitrypanosomal hit **21**, bearing a *para*-carboxyphenyl group, was identified. Compound **21** was not cytotoxic on the HepG2 human cell line (CC_{50} = 120 μM), displayed good antitrypanoso-

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Table 5. Effects of substitution of the phenyl ring on reduction potentials E° in the Suzuki–Miyaura series.

Compound	Structure	E° [V][a]
1		−0.59
7		−0.53
13		−0.53
21		−0.56
26		−0.93
Initial hit		−0.45
8-Nitroquinolin-2(1*H*)-one		−0.54

[a] Cyclic voltammetry conditions: DMSO/$TBAPF_6$, SCE/GC; one-electron reversible reduction; values are expressed in V versus NHE.

mal activity (IC_{50} = 1.5 μM, SI = 80), which is better than that of the drug eflornithine and similar to that of fexinidazole, a 5-nitroimidazole in phase III of clinical trials against HAT. Interestingly, **21** was inactive against *L. infantum*, showing a parasitic selectivity among kinetoplastids. Unlike fexinidazole and the previously identified hit molecule in the series, this molecule was not efficiently metabolised by the type I trypanosomal NTR, suggesting a probable alternative mechanism of action in this series.

Experimental Section

Chemistry

All reagents and solvents were obtained from commercial sources (Fluorochem, Sigma–Aldrich or Alfa Aesar) and used as received. The progress of the reactions was monitored on ALUGRAM SIL G/UV_{254} (Macherey–Nagel) pre-coated thin layer chromatography (TLC) sheets and were visualised under ultraviolet light at 254 nm. The ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on Bruker UltraShield 300 MHz, Bruker IconNMR 400 MHz or Bruker Avance NEO 600 MHz instruments at the Laboratoire de Chimie de Coordination, and data are presented as follows: chemical shift δ in parts per million (ppm) using tetramethylsilane (TMS) as reference, coupling constant J in Hertz (Hz), and multiplicity: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; dd, doublets of doublets; m, multiplet; brs, broad singlet. Melting points were measured on a Stuart Melting Point SMP3 instrument. High-resolution mass measurements were recorded on a GCT Premier Spectrometer (DCI, CH_4) or Xevo G2 QTOF (Waters, ESI+) instrument at the Université Paul Sabatier, Toulouse (France). Microwave reactions were performed in a CEM Discover microwave reactor.

3-Bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one was prepared according to a previously reported procedure.[22]

General procedure for the preparation of compounds 1–20 and 25

3-Bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (300 mg, 1.1 mmol, 1 equiv), cesium carbonate (1.1 g, 3.3 mmol, 3 equiv), $Pd(PPh_3)_4$ (127 mg, 0.12 mmol, 0.1 equiv) and the appropriate phenylboronic acid (1.2 equiv) were added in a sealed 25 mL flask. Under an argon atmosphere, anhydrous DME (10 mL) was then added. The reaction mixture was heated at 85 °C in a microwave reactor for 2 h. The reaction mixture was poured into water and extracted with dichloromethane (3×100 mL). The organic layers were combined, washed with water, dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated in vacuo. The crude residue was purified by chromatography on silica gel and recrystallised if necessary to give compounds **1–20** or **25**.

8-Nitro-3-phenylquinolin-2(1*H*)-one (1) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (97:3) as eluent, and recrystallised from acetonitrile to yield a yellow solid (264 mg, 0.99 mmol, 90%). T_{dec} = 177 °C; ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7.31–7.35 (m, 1H; H6), 7.41–7.50 (m, 3H; H3′, H4′ and H5′), 7.75–7.77 (m, 2H; H2′ and H6′), 7.91 (s, 1H; H4), 7.94 (dd, J = 7.6, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.49 (dd, J = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.40 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 121.4 (CH), 122.7 (C), 127.3 (CH), 128.5 (2×CH), 128.7 (2×CH), 129.1 (CH), 132.7 (C), 133.1 (C), 134.5 (C), 134.6 (C), 135.6 (CH), 136.7 (CH), 161.0 ppm (C); HRMS (DCI, CH_4): m/z calcd for $C_{15}H_{11}N_2O_3$: 267.0770 $[M+H]^+$; found: 267.0762.

3-(4-Methoxyphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (2) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (95:5) as eluent, and recrystallised from acetonitrile to yield an orange solid (287 mg, 0.97 mmol, 88%); mp: 229 °C; ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 3.87 (s, 3H; CH_3), 6.99–7.02 (m, 2H; H3′ and H5′), 7.29–7.33 (m, 1H; H6), 7.73–7.77 (m, 2H; H2′ and H6′), 7.87 (s, 1H; H4), 7.91 (dd, J = 7.6, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.47 (dd, J = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.38 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ = 55.4 (CH_3), 114.0 (2×CH), 121.3 (CH), 122.9 (C), 125.6 (C), 126.9 (CH), 130.0 (2×CH), 132.7 (C), 132.9 (C), 134.0 (C), 135.3 (CH), 135.4 (CH), 160.3 (C), 161.2 ppm (C); HRMS (DCI, CH_4): m/z calcd for $C_{16}H_{13}N_2O_4$: 297.0875 $[M+H]^+$; found: 297.0864.

3-(4-Hydroxyphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (3) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (75:25) as eluent to yield an orange solid (115 mg, 0.41 mmol, 37%); mp: 266 °C; ^1H NMR ([D_6]DMSO, 400 MHz): δ = 6.84–6.88 (m, 2H; H3′ and H5′), 7.40–7.44 (m, 1H; H6), 7.67–7.71 (m, 2H; H2′ and H6′), 8.20 (dd, J = 7.7, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.26 (s, 1H; H4), 8.40 (dd, J = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 9.74 (s, 1H; OH), 11.12 ppm (brs, 1H; NH);

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

^{13}C NMR ([D$_6$]DMSO, 75 MHz): δ = 115.4 (2×CH), 122.0 (CH), 122.8 (C), 125.8 (C), 127.1 (CH), 130.4 (2×CH), 132.3 (C), 132.5 (C), 133.5 (C), 136.0 (CH), 136.1 (CH), 158.5 (C), 160.8 ppm (C); HRMS (DCI, CH_4): *m/z* calcd for $C_{15}H_{11}N_2O_4$: 283.0719 $[M+H]^+$; found: 283.0706.

3-(4-Aminophenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (4) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (95:5) as eluent to yield an orange solid (128 mg, 0.45 mmol, 41%); mp: 280 °C; ^{1}H NMR ([D$_6$]DMSO, 400 MHz): δ = 5.44 (s, 2H; NH_2), 6.61–6.65 (m, 2H; H3′ and H5′), 7.37–7.41 (m, 1H; H6), 7.58–7.62 (m, 2H; H2′ and H6′), 8.15–8.18 (m, 2H; H4 and H5), 8.36 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.07 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR ([D$_6$]DMSO, 100 MHz): δ = 113.6 (2×CH), 121.9 (CH), 122.1 (C), 123.1 (C), 126.5 (C), 129.9 (2×CH), 131.9 (C), 132.9 (C), 133.4 (C), 134.1 (CH), 135.8 (CH), 150.0 (CH), 161.0 ppm (C); HRMS (DCI, CH_4): *m/z* calcd for $C_{15}H_{12}N_3O_3$:282.0879 $[M+H]^+$; found: 282.0874.

3-(4-Chlorophenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (5) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (97:3) as eluent to yield a yellow solid (241 mg, 0.80 mmol, 73%); mp: 222 °C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7.33–7.37 (m, 1H; H6), 7.40–7.42 (m, 2H; H3′ and H5′), 7.66–7.75 (m, 2H; H2′ and H6′), 7.92 (s, 1H; H4), 7.95 (dd, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 1H; H5), 8.51 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H; H7), 11.42 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ = 121.6 (CH), 122.4 (C), 126.9 (CH), 127.7 (CH), 128.7 (CH), 129.1 (CH), 129.7 (CH), 132.8 (C), 133.1 (C), 133.2 (C), 134.4 (C), 135.7 (CH), 136.2 (C), 137.3 (CH), 160.6 ppm (C); HRMS (DCI, CH_4): *m/z* calcd for $C_{15}H_{10}ClN_2O_3$: 301.0380 $[M+H]^+$; found: 301.0373.

3-(4-Fluorophenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (6) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (98:2) as eluent to yield a yellow solid (219 mg, 0.77 mmol, 70%); mp: 217 °C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7.12–7.20 (m, 2H; H2′ and H6′), 7.31–7.36 (m, 1H; H6), 7.73–7.80 (m, 2H; H3′ and H5′), 7.89 (s, 1H; H4), 7.94 (dd, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 1H; H5), 8.50 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H; H7), 11.41 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ = 115.5 (d, *J* = 21.6 Hz; 2×CH), 121.5 (CH), 122.6 (C), 124,4 (C), 127.4 (CH), 130.6 (d, *J* = 8.3 Hz; 2×CH), 132.7 (C), 133.1 (C), 133.5 (C), 135.5 (CH), 136.5 (CH), 160.9 (C), 163.2 ppm (d, *J* = 249.2 Hz, C); HRMS (DCI, CH_4): *m/z* calcd for $C_{15}H_{10}FN_2O_3$: 285.0675 $[M+H]^+$; found: 285.0676.

8-Nitro-3-(4-trifluoromethylphenyl)quinolin-2(1*H*)-one (7) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (98:2) as eluent to yield a yellow solid (220 mg, 0.66 mmol, 60%); mp: 168 °C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7.34–7.38 (m, 1H; H6), 7.72–7.75 (m, 2H; H2′ and H6′), 7.88 (m, 2H; H3′ and H5′), 7.95–7.98 (m, 2H; H4 and H5), 8.53 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.45 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz): δ = 121.7 (CH), 122.4 (C), 124.0 (q, *J* = 272.3 Hz, C), 125.4 (q, *J* = 3.7 Hz, 2×CH), 127.9 (CH), 129.1 (2×CH), 130.9 (q, *J* = 32.5 Hz, C), 132.8 (C), 133.2 (C), 133.4 (C), 135.8 (CH), 137.6 (CH), 138.0 (C), 160.5 ppm (C); HRMS (DCI, CH_4): *m/z* calcd for $C_{16}H_{10}F_3N_2O_3$: 335.0644 $[M+H]^+$; found: 335.0629.

8-Nitro-3-(thiophen-3-yl)quinolin-2(1*H*)-one (8) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (98:2) as eluent to yield a yellow solid (275 mg, 1.01 mmol, 92%); mp: 199 °C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7.31–7.35 (m, 1H; H6), 7.41–7.43 (m, 1H; H4′), 7.59 (dd, *J* = 5.1, 1.3 Hz, 1H; H5′), 7.94 (dd, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.05 (s, 1H; H4), 8.39 (dd, *J* = 3.0, 1.3 Hz, 1H; H2′), 8.48 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.42 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ = 121.4 (CH), 122.6 (C), 123.6 (C), 125.6 (CH), 126.2 (CH), 127.0 (CH), 127.1 (CH), 128.6 (C), 132.4 (C), 134.1 (CH), 134.3 (C), 135.4 (CH), 160.6 ppm (C); HRMS (DCI, CH_4): *m/z* calcd for $C_{13}H_9N_2O_3S$: 273.0334 $[M+H]^+$; found: 273.0330.

3-(2-Furanyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (9) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane as eluent to yield a dark red solid (183 mg, 0.71 mmol, 65%); mp: 257 °C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 6.58 (dd, *J* = 3.3 Hz, 1.9 Hz, 1H; H4′), 7.30–7.35 (m, 1H; H6), 7.55–7.56 (m, 2H; H3′ and H5′), 7.96 (dd, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.23 (s, 1H; H4), 8.46 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.42 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ = 112.6 (CH), 114.2 (CH), 121.6 (CH), 122.5 (C), 123.6 (C), 126.9 (CH), 130.7 (CH), 132.0 (C), 132.8 (C), 135.5 (CH), 143.3 (CH), 147.7 (C), 158.7 ppm (C); HRMS (DCI, CH_4): *m/z* calcd for $C_{13}H_9N_2O_4$: 257.0562 $[M+H]^+$; found: 257.0558.

8-Nitro-3-(pyridin-3-yl)quinolin-2(1*H*)-one (10) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate as eluent to yield a yellow solid (182 mg, 0.68 mmol, 62%); mp: 237 °C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7.35–7.39 (m, 1H; H6), 7.40–7.43 (m, 1H; H5′), 7.97–7.99 (m, 2H; H4 and H5), 8.20–8.23 (m, 1H; H6′), 8.53 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 8.66 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz; 1H; H4′), 8.90 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1H; H2′), 11.45 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ = 121.7 (CH), 122.3 (C), 123.1 (CH), 127.9 (CH), 130.5 (C), 131.4 (C), 132.8 (C), 133.3 (C), 135.8 (CH), 136.4 (CH), 137.2 (CH), 149.0 (CH), 150.0 (CH), 160.6 ppm (C); HRMS (DCI, CH_4): *m/z* calcd for $C_{14}H_{10}N_3O_3$: 268.0722 $[M+H]^+$; found: 268.0712.

8-Nitro-3-(pyridin-4-yl)quinolin-2(1*H*)-one (11) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/acetone (80:20) as eluent to yield a yellow solid (209 mg, 0.78 mmol, 71%); mp: 297 °C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7.36–7.40 (m, 1H; H6), 7.70–7.72 (m, 2H; H2′ and H6′), 7.98 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.03 (s, 1H; H4), 8.55 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 8.73–8.74 (m, 2H; H3′ and H5′), 11.46 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR (CF_3CO_2D, 100 MHz): δ = 121.6 (C), 123.7 (CH), 126.1 (C), 126.7 (2×CH), 130.7 (CH), 132.4 (C), 133.4 (C), 137.5 (CH), 140.6 (2×CH), 144.1 (CH), 153.5 (C), 161.1 ppm (C); HRMS (DCI, CH_4): *m/z* calcd for $C_{14}H_{10}N_3O_3$: 268.0722 $[M+H]^+$; found: 268.0713.

3-(4-Hydroxymethylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (12) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/acetone (75:25) as eluent to yield a yellow solid (251 mg, 0.85 mmol, 77%); mp: 219 °C; ^{1}H NMR ([D$_6$]DMSO, 400 MHz): δ = 4.56 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H; CH_2), 5.26 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H; OH), 7.41–7.46 (m, 3H; H6, H3′ and H5′), 7.76–7.79 (m, 2H; H2′ and H6′), 8.23 (dd, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.36 (s, 1H; H4), 8.43 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.17 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR ([D$_6$]DMSO, 100 MHz): δ = 63.1 (CH_2), 122.1 (CH), 122.6 (C), 126.6 (2×CH), 127.6 (CH), 128.8 (2×CH), 132.6 (C), 132.7 (C), 133.6 (C), 134.0 (C), 136.4 (CH), 137.6 (CH), 143.6 (C), 160.8 ppm (C); HRMS (DCI, CH_4): *m/z* calcd for $C_{16}H_{13}N_2O_4$: 297.0875 $[M+H]^+$; found: 297.0878.

3-(3-Hydroxymethylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (13) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/acetone (75:25) as eluent to yield a yellow solid (267 mg, 0.90 mmol, 82%); mp: 155 °C; ^{1}H NMR ([D$_6$]DMSO, 300 MHz): δ = 4.58 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H; CH_2), 5.27 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H; OH), 7.37–7.47 (m, 3H; H6, H4′ and H5′), 7.66–7.68 (m, 1H; H6′), 7.73–7.75 (m, 1H; H2′), 8.25 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.35 (s, 1H; H4), 8.44 (dd, *J* = 8.3 and 1.4 Hz, 1H; H7), 11.17 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR ([D$_6$]DMSO, 75 MHz): δ = 63.3 (CH_2), 122.1 (CH), 122.6 (C), 127.1 (CH), 127.2 (CH), 127.5 (CH), 127.7 (CH), 128.4 (CH), 132.7 (C), 133.0 (C), 133.7 (C), 135.1 (C), 136.5 (CH), 138.0 (CH), 142.9 (C), 160.6 ppm (C); HRMS (DCI, CH_4): *m/z* calcd for $C_{16}H_{13}N_2O_4$: 297.0875 $[M+H]^+$; found: 297.0861.

3-(2-Hydroxymethylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (14) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ethyl acetate (50:50) as eluent to yield a yellow solid (235 mg, 0.79 mmol, 72%); mp: 208 °C; ^{1}H NMR ([D$_6$]DMSO, 400 MHz): δ = 4.44 (d, J = 5.5 Hz, 2H; CH$_2$), 5.09 (s, 1H; OH), 7.28 (dd, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H; H3′), 7.33–7.37 (m, 1H; H6), 7.42–7.46 (m, 2H; H4′ and H5′), 7.57 (dd, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H; H6′), 8.12 (s, 1H; H4), 8.19 (dd, J = 7.6, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.45 (dd, J = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.19 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100 MHz): δ = 63.7 (CH$_2$), 121.9 (CH), 122.5 (C), 127.8 (CH), 128.4 (CH), 129.8 (CH), 130.1 (CH), 130.6 (CH), 132.7 (C), 133.1 (C), 133.9 (C), 135.7 (CH), 135.8 (C), 139.2 (CH), 139.9 (C), 162.2 ppm (C); HRMS (DCI, CH$_4$): m/z calcd for $C_{16}H_{13}N_2O_4$: 297.0875 $[M+H]^+$; found: 297.0869.

3-(4-Formylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (15) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/cyclohexane (80:20) as eluent, and recrystallised from acetonitrile to yield a yellow solid (165 mg, 0.56 mmol, 51%); mp: 243 °C; ^{1}H NMR (CDCl$_3$, 300 MHz): δ = 7.34–7.39 (m, 1H; H6), 7.93–8.00 (m, 6H; H4, H5, H2′, H3′, H5′ and H6′), 8.53 (dd, J = 8.5, 1.4 Hz, 1H; H7), 10.08 (s, 1H; CHO), 11.45 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR (CDCl$_3$, 75 MHz): δ = 121.7 (CH), 122.3 (C), 128.0 (CH), 129.4 (2×CH), 129.8 (2×CH), 132.8 (C), 133.2 (C), 133.4 (C), 135.9 (CH), 136.4 (C), 137.9 (CH), 140.5 (C), 160.5 (C), 191.7 ppm (CH); HRMS (DCI, CH$_4$): m/z calcd for $C_{16}H_{11}N_2O_4$: 295.0719 $[M+H]^+$; found: 295.0710.

3-(3-Formylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (16) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/acetone (75:25) as eluent to yield a yellow solid (104 mg, 0.35 mmol, 32%); mp: 209 °C; ^{1}H NMR (CDCl$_3$, 300 MHz): δ = 7.34–7.39 (m, 1H; H6), 7.63–7.69 (m, 1H; H5′), 7.94–7.99 (m, 2H; H5 and H6′), 8.01 (s, 1H; H4), 8.10–8.13 (m, 1H; H4′), 8.25–8.26 (m, 1H; H2′), 8.53 (dd, J = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 10.10 (s, 1H; CHO), 11.5 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100 MHz): δ = 121.7 (CH), 122.4 (C), 127.8 (CH), 129.2 (CH), 129.7 (CH), 130.2 (CH), 132.8 (C), 133.1 (C), 133.3 (C), 134.7 (CH), 135.6 (C), 135.8 (CH), 136.6 (C), 137.5 (CH), 160.7 (C), 192.0 ppm (CH); HRMS (DCI, CH$_4$): m/z calcd for $C_{16}H_{11}N_2O_4$: 295.0719 $[M+H]^+$; found: 295.0713.

3-(2-Formylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (17) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/acetone (60:40) as eluent to yield a yellow solid (210 mg, 0.71 mmol, 65%); mp: 230–231 °C; ^{1}H NMR (CDCl$_3$, 400 MHz): δ = 7.33–7.37 (m, 1H; H6), 7.44 (dd, J = 7.5, 1.3 Hz, 1H; H6′), 7.61–7.65 (m, 1H; H4′), 7.68–7.72 (m, 1H; H5′), 7.82 (s, 1H; H4), 7.93 (dd, J = 7.6, 1.4 Hz, 1H; H3′), 7.99 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.53 (dd, J = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 10.03 (s, 1H; CHO), 11.42 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100 MHz): δ = 121.6 (CH), 122.3 (C), 127.8 (CH), 129.5 (CH), 130.8 (CH), 131.0 (CH), 133.0 (C), 133.7 (C), 133.9 (CH), 134.5 (C), 135.0 (C), 135.7 (CH), 136.1 (C), 138.0 (CH), 160.8 (C), 191.2 ppm (CH); HRMS (DCI, CH$_4$): m/z calcd for $C_{16}H_{11}N_2O_4$: 295.0719 $[M+H]^+$; found: 295.0718.

3-(4-Methoxycarbonylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (18) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane as eluent, and recrystallised from acetonitrile to yield a yellow solid (257 mg, 0.79 mmol, 72%); mp: 245 °C; ^{1}H NMR (CDCl$_3$, 300 MHz): δ = 3.95 (s, 3H; CH$_3$), 7.33–7.38 (m, 1H; H6), 7.84–7.87 (m, 2H; H2′ and H6′), 7.95–7.97 (m, 2H; H4 and H5), 8.12–8.15 (m, 2H; H3′ and H5′), 8.52 (dd, J = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.43 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100 MHz): δ = 52.3 (CH$_3$), 121.6 (CH), 122.4 (C), 127.8 (CH), 128.7 (2×CH), 129.7 (2×CH), 130.4 (C), 132.8 (C), 133.3 (C), 133.5 (C), 135.8 (CH), 137.6 (CH), 139.0 (C), 160.6 (C), 166.7 ppm (C); HRMS (DCI, CH$_4$): m/z calcd for $C_{17}H_{13}N_2O_5$: 325.0824 $[M+H]^+$; found: 325.0818.

3-(3-Methoxycarbonylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (19) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/cyclohexane (90:10) as eluent to yield a yellow solid (253 mg, 0.78 mmol, 71%); mp: 212 °C; ^{1}H NMR (CDCl$_3$, 400 MHz): δ = 3.95 (s, 3H; CH$_3$); 7.33–7.37 (m, 1H; H6), 7.53–7.58 (m, 1H; H5′), 7.96 (dd, J = 7.7 Hz, 1.4 Hz, 1H; H5), 7.98 (s, 1H; H4), 8.05–8.11 (m, 2H; H4′ and H6′), 8.36–8.37 (m, 1H; H2′), 8.51 (dd, J = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.42 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100 MHz): δ = 52.3 (CH$_3$), 121.6 (CH), 122.5 (C), 127.7 (CH), 128.6 (CH), 129.6 (CH), 130.0 (CH), 130.5 (C), 132.8 (C), 133.2 (C), 133.4 (CH), 133.5 (C), 134.8 (C), 135.7 (CH), 137.3 (CH), 160.7 (C), 166.7 ppm (C); HRMS (DCI, CH$_4$): m/z calcd for $C_{17}H_{13}N_2O_5$: 325.0824 $[M+H]^+$; found: 325.0809.

3-(2-Methoxycarbonylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (20) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/acetone (70:30) as eluent to yield a yellow solid (257 mg, 0.79 mmol, 72%); mp: 212 °C; ^{1}H NMR (CDCl$_3$, 400 MHz): δ = 3.82 (s, 3H; CH$_3$), 7.29–7.33 (m, 1H; H6), 7.37–7.39 (m, 1H; H6′), 7.49–7.53 (m, 1H; H4′), 7.60–7.64 (m, 1H; H5′), 7.77 (s, 1H; H4), 7.91 (d, J = 7.65 Hz, 1H; H3′), 8.02 (d, J = 7.8 Hz, 1H; H5), 8.48 (d, J = 8.4 Hz, 1H; H7), 11.34 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100 MHz): δ = 52.3 (CH$_3$), 121.4 (CH), 122.7 (C), 127.2 (CH), 129.0 (CH), 130.1 (CH), 130.6 (CH), 131.0 (C), 132.4 (CH), 132.9 (C), 133.4 (C), 135.5 (CH), 135.6 (CH), 135.8 (C), 137.0 (C), 160.9 (C), 167.5 ppm (C); HRMS (DCI, CH$_4$): m/z calcd for $C_{17}H_{13}N_2O_5$: 325.0824 $[M+H]^+$; found: 325.0819.

General procedure for the preparation of compounds 21–23

A mixture of H$_2$O/ethanol (2:8, 40 mL) was added to 1 equiv (200 mg) of the 3-(methoxycarbonylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one derivative (**18–20**). Then, NaOH (5 equiv) was added and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 3 h. The reaction mixture was then poured into water, acidified to pH 1 with 37% HCl, and extracted with dichloromethane (2×50 mL) and ethyl acetate (2×50 mL). The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous MgSO$_4$ and evaporated in vacuo. The crude residue was purified by chromatography on silica gel and recrystallised if necessary to give compound **21**, **22** or **23**.

3-(4-Carboxyphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (21) was washed with dilute aqueous hydrochloric acid and recrystallised from acetonitrile to yield a yellow solid (124 mg, 0.40 mmol, 65%); mp: >310 °C; ^{1}H NMR ([D$_6$]DMSO, 400 MHz): δ = 7.45–7.49 (m, 1H; H6), 7.93–7.96 (m, 2H; H2′ and H6′), 8.03–8.06 (m, 2H; H3′ and H5′), 8.26 (dd, J = 7.9, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.46 (dd, J = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 8.49 (s, 1H; H4), 11.23 (brs, 1H; NH), 13.07 ppm (brs, 1H; COOH); ^{13}C NMR ([D$_6$]DMSO, 100 MHz): δ = 122.3 (CH), 122.35 (C), 128.1 (CH), 129.2 (2×CH), 129.6 (2×CH), 131.0 (C), 131.7 (C), 132.8 (C), 133.8 (C), 136.7 (CH), 139.1 (CH), 139.5 (C), 160.4 (C), 167.5 ppm (C); HRMS (ESI+): m/z calcd for $C_{16}H_{11}N_2O_5$: 311.0668 $[M+H]^+$; found: 311.0669.

3-(3-Carboxyphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (22) was washed with dilute aqueous hydrochloric acid and recrystallised from acetonitrile to yield a brown solid (88 mg, 0.28 mmol, 42%). T_{dec} = 305–306 °C; ^{1}H NMR (CDCl$_3$, 400 MHz): δ = 7.44–7.48 (m, 1H; H6), 7.60–7.64 (m, 1H; H5′), 8.00–8.02 (m, 1H; H6′), 8.03–8.06 (m, 1H; H4′), 8.27 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.39–8.40 (m, 1H; H2′), 8.46 (dd, J = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 8.47 (s, 1H; H4), 11.22 (brs, 1H; NH), 13.05 ppm (brs, 1H; COOH); ^{13}C NMR ([D$_6$]DMSO, 100 MHz): δ = 122.2 (CH), 122.5 (C), 127.9 (CH), 129.0 (CH), 129.8 (CH), 129.9 (CH), 131.3 (C), 131.8 (C), 132.8 (C), 133.4 (CH), 133.7 (C), 135.6 (C), 136.7 (CH), 138.6 (CH), 160.5 (C), 167.6 ppm (C); HRMS (DCI, CH$_4$): m/z calcd for $C_{16}H_{11}N_2O_4$: 311.0668 $[M+H]^+$; found: 311.0672.

3-(2-Carboxyphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (23) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl ace-

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

tate (50:50) as eluent to yield a yellow solid (109 mg, 0.35 mmol, 57%). T_{dec} = 282–285 °C; ^{1}H NMR ([D$_6$]DMSO, 400 MHz): δ = 7.43–7.48 (m, 2H; H6 and H6′), 7.54–7.58 (m, 1H; H4′), 7.66–7.70 (m, 1H; H5′), 7.91 (dd, J = 7.7, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.13 (s, 1H; H4), 8.20 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H; H3′), 8.42 (dd, J = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7); 11.08 (brs, 1H; NH), 12.72 ppm (brs, 1H; COOH); ^{13}C NMR ([D$_6$]DMSO, 100 MHz): δ = 122.1 (CH), 122.6 (C), 127.4 (CH), 129.1 (CH), 129.8 (CH), 131.3 (CH), 132.4 (CH), 132.5 (C), 132.7 (C), 133.9 (C), 136.1 (CH), 136.2 (C), 136.3 (CH), 136.4 (C), 160.7 (C), 168.4 ppm (C); HRMS (DCI, CH$_4$): m/z calcd for $C_{16}H_{11}N_2O_5$: 311.0668 $[M+H]^+$; found: 311.0673.

Preparation of 8-nitro-3-phenylethynylquinolin-2(1H)-one (24)

3-Bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (100 mg, 0.37 mmol, 1 equiv) previously synthesised in our team, CuI (7 mg, 0.037 mmol, 0.1 equiv) and Pd(PPh$_3$)$_4$, (43 mg, 0.037 mmol, 0.1 equiv) were added to a sealed 10 mL flask. Under an argon atmosphere, anhydrous dimethoxyethane (5 mL), Et$_3$N (155 µL, 1.11 mmol, 3 equiv) and phenylacetylene (61 µL, 0.56 mmol, 1.5 equiv) were successively added. The reaction mixture was cooled at 15 °C for 1.5 h. The reaction mixture was poured into water and extracted three times with dichloromethane. The organic layers were combined, washed with water, dried over anhydrous MgSO$_4$ and evaporated in vacuo. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane as an eluent to yield **24** as a yellow solid (78 mg, 0.27 mmol, 72%); mp: 186–187 °C; ^{1}H NMR (CDCl$_3$, 400 MHz): δ = 7.31–7.35 (m, 1H; H6), 7.37–7.38 (m, 2H; H3′, H4′ and H5′), 7.59–7.63 (m, 2H; H2′ and H6′), 7.87 (dd, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H; H5), 8.06 (s, 1H; H4), 8.49 (dd, J = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.40 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100 MHz): δ = 83.4 (C), 97.3 (C), 119.6 (C), 121.8 (CH), 122.0 (C), 122.1 (C), 128.0 (CH), 128.4 (2×CH), 129.2 (CH), 132.1 (2×CH), 133.0 (C), 133.0 (C), 135.3 (CH), 141.6 (CH), 159.9 ppm (C); HRMS (DCI, CH$_4$): m/z calcd for $C_{17}H_{13}N_2O_5$: 291.0770 $[M+H]^+$; found: 291.0776.

Preparation of 8-nitro-2-phenyl-furo[2,3-b]quinoline (25)

3-Bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (100 mg 0.37 mmol, 1 equiv) previously synthesised in our team, CuI (7 mg, 0.037 mmol, 0.1 equiv) and Pd(PPh$_3$)$_4$ (43 mg, 0.037 mmol, 0.1 equiv) were added to a sealed 10 mL flask. Under an argon atmosphere, anhydrous dimethoxyethane (5 mL), Et$_3$N (155 µL, 1.11 mmol, 3 equiv) and phenylacetylene (61 µL, 0.56 mmol, 1.5 equiv) were successively added. The reaction mixture was heated at 40 °C for 30 min. The reaction mixture was then poured into water and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous MgSO$_4$ and evaporated in vacuo. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane as an eluent and isolated to yield **25** as a grey solid (55 mg, 0.19 mmol, 51%); mp: 226 °C; ^{1}H NMR (CDCl$_3$, 400 MHz): δ = 7.16 (s, 1H; H3), 7.45–7.55 (m, 3H; H3′, H4′ and H5′), 7.56–7.59 (m, 1H; H6), 7.99–8.02 (m, 2H; H2′ and H6′), 8.08 (dd, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.14 (dd, J = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 8.41 ppm (s, 1H; H4); ^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100 MHz): δ = 99.2 (CH), 123.3 (CH), 123.4 (CH), 124.0 (C), 125.9 (2×CH), 127.7 (C), 128.2 (CH), 128.6 (C), 129.1 (2×CH), 130.5 (CH), 132.0 (CH), 136.0 (C), 147.7 (C), 159.6 (C), 162.4 ppm (C); HRMS (DCI, CH$_4$): m/z calcd for $C_{17}H_{11}N_2O_3$: 291.0770 $[M+H]^+$; found: 291.0768.

Preparation of 3-(4-carboxyphenyl)-2-methoxy-8-nitroquinoline (26)

Under an argon atmosphere, 3-(4-methoxycarbonylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (260 mg, 0.80 mmol, 1 equiv) was dissolved in anhydrous DMF (5 mL). This solution was then added to 60% sodium hydride (64 mg, 1.6 mmol, 2 equiv) in DMF (5 mL). After 10 min of stirring at RT, methyl iodide (100 µL, 1.6 mmol, 2 equiv) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at RT overnight, before being poured over ice. A precipitate formed and was filtered off and washed with water. The precipitate was dissolved in dichloromethane and this solution was dried over anhydrous MgSO$_4$ and evaporated in vacuo. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane as eluent. The resulting white solid intermediate was dissolved in a mixture of H$_2$O/ethanol (2:8, 40 mL). NaOH (excess, solid) was then added, and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 2 h. The reaction mixture was then poured into water, acidified to pH 1 with 37% HCl, and extracted with dichloromethane (2×50 mL) and ethyl acetate (2×50 mL). The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous MgSO$_4$ and evaporated in vacuo. The residue was washed with alkaline water (pH 8) to yield **26** as a white solid (87 mg, 0.27 mmol, 61%). T_{dec} = 270–274 °C; ^{1}H NMR ([D$_6$]DMSO, 400 MHz): δ = 4.00 (s, 3H; CH$_3$), 7.61–7.65 (m, 1H; H6), 7.80–7.82 (m, 2H; H2′ and H6′), 8.05–8.07 (m, 2H; H3′ and H5′), 8.23 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.27 (dd, J = 8.1, 1.4 Hz, 1H; H7), 8.56 (s, 1H; H4), 13.07 ppm (brs, 1H; NH); ^{13}C NMR ([D$_6$]DMSO, 100 MHz): δ = 54.5 (CH$_3$), 124.1 (CH), 124.7 (C), 126.6 (CH), 127.0 (C), 129.7 (2×CH), 130.0 (2×CH), 130.9 (C), 132.7 (CH), 136.7 (C), 139.3 (CH), 140.0 (C), 146.2 (C), 160.8 (C), 167.5 ppm (C); HRMS (DCI, CH$_4$): m/z calcd for $C_{17}H_{13}N_2O_5$: 325.0824 $[M+H]^+$; found: 325.0822.

Electrochemistry

Voltammetric measurements were carried out with a potentiostat Autolab PGSTAT100 (ECO Chemie, The Netherlands) controlled by GPES 4.09 software. Experiments were performed at room temperature in a homemade airtight three-electrode cell connected to a vacuum/argon line. The reference electrode consisted of a saturated calomel electrode (SCE) separated from the solution by a bridge compartment. The counter electrode was a platinum wire with an apparent surface area of approximately 1 cm^2. The working electrode was a GC microdisk (1.0 mm diameter; Bio-logic SAS). The supporting electrolyte [nBu$_4$N][PF$_6$] (99% puriss electrochemical grade, Fluka) and the solvent DMSO (Sigma–Aldrich puriss p.a., dried, < 0.02% water) were used as received and simply degassed under argon. The solutions used during the electrochemical studies were typically 10^{-3} and 0.1 M with respect to test compound and supporting electrolyte, respectively. Before each measurement, the solutions were degassed by bubbling argon, and the working electrode was polished with a polishing machine (Presi P230). Under these experimental conditions, the half-wave potential ($E_{1/2}$) of the ferrocene Fc$^+$/Fc couple in DMSO was $E_{1/2}$ = 0.45 V versus SCE. Experimental peak potentials were measured versus SCE and converted to NHE by adding 0.241 V.

Biology

Antileishmanial activity on L. infantum *axenic amastigotes*[31]

L. infantum promastigotes (MHOM/MA/67/ITMAP-263, CNR Leishmania, Montpellier, France, expressing luciferase activity) in the logarithmic phase, cultivated in RPMI 1640 medium supplemented

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

with 5% foetal calf serum, L-glutamine (2 mM) and antibiotics (100 U mL^{-1} penicillin and 100 μg mL^{-1} streptomycin), were centrifuged at 900 *g* for 10 min. The supernatant was removed carefully and was replaced by the same volume of RPMI 1640 complete medium at pH 5.4 and incubated for 24 h at 24 °C. The acidified promastigotes were incubated for 24 h at 37 °C in a ventilated flask. Promastigotes were then transformed into axenic amastigotes. The effects of the test compounds on the growth of *L. infantum* axenic amastigotes were assessed as follows. *L. infantum* amastigotes were incubated at a density of 2×10^6 parasites mL^{-1} in sterile 96-well plates with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (final concentration $<0.5\%$ *v/v*), in duplicate. The appropriate controls DMSO, amphotericin B, miltefosine and fexinidazole (reference drugs purchased from Sigma–Aldrich) were added to each set of experiments. After a 48 h incubation period at 37 °C, each well was examined by microscope for precipitate formation. To estimate the luciferase activity of axenic amastigotes, 80 μL of each well were transferred to white 96-well plates. Steady Glow reagent (Promega) was added according to the manufacturer's instructions, and plates were incubated for 2 min. The luminescence was measured using a Microbeta luminescence counter (PerkinElmer). IC_{50} was defined as the concentration of drug required to inhibit by 50% the metabolic activity of *L. infantum* amastigotes relative to the control. IC_{50} values were calculated by nonlinear regression analysis of dose–response curves, using TableCurve 2D V5 software. IC_{50} values represent the mean of three independent experiments.

Antitrypanosomal activity on T. brucei brucei *trypomastigotes*

Assays were performed on *T. brucei brucei* AnTat 1.9 strain (IMTA, Antwerp, Belgium). Trypanosomes were cultured in MEM containing Earle's salts, supplemented according to the protocol of Baltz et al.[32] with the following additions: mercaptoethanol (0.5 mM, Sigma–Aldrich, France), L-cysteine (1.5 mM, Sigma–Aldrich), bathocuproine disulfonate (0.05 mM, Sigma–Aldrich) and 20% heat-inactivated horse serum (Gibco, France), at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO_2. The parasites were incubated at an average density of 2000 parasites per well in sterile 96-wells plates (Mc2, France) with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (Sigma–Aldrich), in duplicate. Reference drugs suramin, eflornithine, and fexinidazole (purchased from Sigma–Aldrich, France and Fluorochem, UK) suspended in 0.9% NaCl or DMSO, were added to each set of experiments. The effects of the test compounds were assessed using the viability marker Alamar Blue assay described by Räz et al.[33] After a 69 h incubation period at 37 °C, Alamar Blue (10 μL, Fisher, France) was added to each well, and the plates were incubated for 5 h.[34] The plates were read using a PerkinElmer (Germany) ENSPIRE microplate reader using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. IC_{50} values were calculated by nonlinear regression analysis of dose–response curves using GraphPad Prism software. IC_{50} was defined as the concentration of drug required to inhibit by 50% the viability of *T. brucei brucei* relative to the control. IC_{50} values were calculated from three independent experiments in duplicate.

Antitrypanosomal activity on T. brucei *trypomastigotes overexpressing the nitroreductase NTR1*

Trypanosoma brucei bloodstream-form "single marker" S427 (T7RPOL TETR NEO) and drug-resistant cell lines were cultured at 37 °C in HMI9-T medium[35] supplemented with G418 (2.5 μg mL^{-1}, Melford) to maintain expression of T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor protein. Bloodstream trypanosomes overexpressing the *T. brucei* nitroreductase (NTR1)[36] were grown in medium supplemented with phleomycin (2.5 μg mL^{-1}) and expression of NTR was induced by the addition of tetracycline (1 μg mL^{-1}). Cultures were initiated with 1×10^5 cells per mL and sub-cultured if the cell density approached 1×10^6–2×10^6 cells per mL. To examine the effects of inhibitors on the growth of these parasites, triplicate cultures containing the inhibitor were seeded at 1×10^5 trypanosomes per mL. Cells overexpressing NTR were induced with tetracycline 48 h prior to EC_{50} analysis. Cell densities were determined after culture for 72 h, as previously described.[37] EC_{50} values were determined using the following two-parameter equation by nonlinear regression using GraFit [Eq. (1)]:

$$y = \frac{100}{1 + \left(\frac{[I]}{EC_{50}}\right)^m} \quad (1)$$

The experimental data were corrected for background cell density and expressed as a percentage of the uninhibited control cell density. In this equation, [I] represents inhibitor concentration and *m* is the slope factor.

Cytotoxicity evaluation on HepG2 cells

The evaluation of the cytotoxicity of the test molecules on HepG2 cells (hepatocarcinoma cell line from ECACC purchased from Sigma–Aldrich, ref. 85011430-1VL, certificated without mycoplasma) was performed according to the method of Mosmann with slight modifications.[38] In brief, cells (1×10^5 cells per mL) in complete medium [100 μL, Alpha MEM Eagle from PAN BIOTECH supplemented with 10% foetal bovine serum, L-glutamine (2 mM) and antibiotics (100 U mL^{-1} penicillin and 100 μg mL^{-1} streptomycin)] were seeded into each well of 96-well plates and incubated at 37 °C and 5% CO_2. After a 24 h incubation, medium (100 μL) with various product concentrations and appropriate controls was added and the plates were incubated for 72 h at 37 °C and 5% CO_2. Each well was then examined by microscope for possible precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. MTT solution (100 μL, 0.5 mg mL^{-1} in Alpha MEM Eagle) was then added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO_2. After this time, the MTT solution was removed and DMSO (100 μL) was added to dissolve the resulting formazan crystals. Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 5 min. The absorbance was measured at 570 nm with a microplate spectrophotometer (Eon BioTek). DMSO was used as a blank and doxorubicin (Sigma–Aldrich) as a positive control. CC_{50} values were calculated by nonlinear regression analysis of dose–response curves using TableCurve 2D V5 software. CC_{50} values represent the mean value calculated from three independent experiments.

Acknowledgements

The authors thank the Université Paul Sabatier de Toulouse and the Région Occitanie/Pyrénées-Méditerranée for funding this work. A.H.F. and S.W. are supported by funding from the Wellcome Trust (WT105021). Christian Bijani from the NMR facility Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse, Catherine Claparols, Nathalie Martins-Froment, Valérie Bourdon, and Eric Leroy from the mass spectrometry service of Institut de Chimie de

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Toulouse are also acknowledged for their support of NMR and HRMS experiments, respectively.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

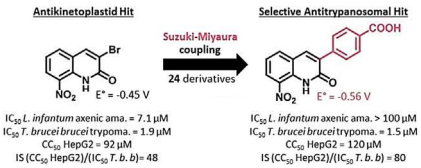
Keywords: 8-nitroquinolin-2(1*H*)-ones · antikinetoplastid pharmacomodulation · palladium-catalysed cross-coupling · parasitic nitroreductases · trypanosomatids

[1] P. Capewell, N. J. Veitch, C. M. Turner, C. M. R. Turner, J. Raper, M. Berriman, S. L. Hadjuk, A. MacLeod, *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1287.
[2] P. Büscher, G. Cecchi, V. Jamonneau, G. Priotto, *Lancet* **2017**, *390*, 2397–2405.
[3] D. Pace, *J. Infect.* **2014**, *69*, S10–S18.
[4] a) M. M. Ashkan, K. M. Rahim, *Trop. Doct.* **2008**, *38*, 186–188; b) *Neglected Tropical Diseases*, World Health Organization: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/ (accessed September 7, 2018).
[5] *Leishmaniasis*, WHO Fact Sheet, World Health Organization: http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis, updated March 14, 2018.
[6] *Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness)*, WHO Fact Sheet, World Health Organization: http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness), updated February 16, 2018.
[7] M. C. Field, D. Horn, A. H. Fairlamb, M. A. J. Ferguson, D. W. Gray, K. D. Read, M. De Rycker, L. S. Torrie, P. G. Wyatt, S. Wyllie, I. H. Gilbert, *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 217–231.
[8] G. Eperon, M. Balasegaram, J. Potet, C. Mowbray, O. Valverde, F. Chappuis, *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2014**, *12*, 1407–1417.
[9] B. Zulfiqar, T. B. Shelper, V. M. Avery, *Drug Discovery Today* **2017**, *22*, 1516–1531.
[10] S. Patterson, A. H. Fairlamb, *Curr. Med. Chem.* **2018**, DOI: https://doi.org/10.2174/0929867325666180426164352.
[11] R. T. Jacobs, B. Nare, S. A. Wring, M. D. Orr, D. Chen, J. M. Sligar, M. X. Jenks, R. A. Noe, T. S. Bowling, L. T. Mercer, C. Rewerts, E. Gaukel, J. Owens, R. Parham, R. Randolph, B. Beaudet, C. J. Bacchi, N. Yarlett, J. J. Plattner, Y. Freund, C. Ding, T. Akama, Y. K. Zhang, R. Brun, M. Kaiser, I. Scandale, R. Don, *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1151.
[12] S. Wyllie, S. Patterson, L. Stojanovski, F. R. C. Simeons, S. Norval, R. Kime, K. D. Read, A. H. Fairlamb, *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, e119.
[13] V. K. B. K. Mesu, W. M. Kalonji, C. Bardonneau, O. V. Mordt, S. Blesson, F. Simon, S. Delhomme, S. Bernhard, W. Kuziena, J. F. Lubaki, S. L. Vuvu, P. N. Ngima, H. M. Mbembo, M. Ilunga, A. K. Bonama, J. A. Heradi, J. L. L. Salomo, G. Mandula, L. K. Badibabi, F. R. Dama, P. K. Lukula, D. N. Tete, C. Lumbala, B. Scherrer, N. Strub-Wourgaft, A. Tarral, *Lancet* **2018**, *391*, 144–154.
[14] S. Patterson, S. Wyllie, *Trends Parasitol.* **2014**, *30*, 289–298.
[15] S. Wyllie, S. Patterson, A. H. Fairlamb, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 901–906.
[16] S. Wyllie, A. J. Roberts, S. Norval, S. Patterson, B. Foth, M. Berriman, K. Read, A. H. Fairlamb, *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005971/22.
[17] B. S. Hall, X. Wu, L. Hu, S. R. Wilkinson, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 1193–1199.
[18] P. Verhaeghe, P. Rathelot, S. Rault, P. Vanelle, *Lett. Org. Chem.* **2006**, *3*, 891–897.
[19] L. Paloque, P. Verhaeghe, M. Casanova, C. Castera-Ducros, A. Dumètre, L. Mbatchi, S. Hutter, M. Kraiem-M'Rabet, M. Laget, V. Remusat, P. Rathelot, N. Azas, P. Vanelle, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 75–86.
[20] C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe, S. Hutter, C. Castera-Ducros, M. Laget, V. Remusat, M. Kraiem-M'Rabet, S. Rault, P. Rathelot, N. Azas, P. Vanelle, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 282–294.
[21] C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe, L. Paloque, S. Hutter, C. Castera-Ducros, M. Laget, S. Rault, A. Valentin, P. Rathelot, N. Azas, P. Vanelle, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2377–2386.
[22] J. Pedron, C. Boudot, S. Hutter, S. Bourgeade-Delmas, J.-L. Stigliani, A. Sournia-Saquet, A. Moreau, E. Boutet-Robinet, L. Paloque, E. Mothes, M. Laget, L. Vendier, G. Pratviel, S. Wyllie, A. H. Fairlamb, N. Azas, B. Courtioux, A. Valentin, P. Verhaeghe, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 135–152.
[23] V. P. Andreev, Y. P. Nizhnnik, *Russ. J. Org. Chem.* **2002**, *38*, 137–138.
[24] N. J. O'Brien, M. Brzozowski, D. J. D. Wilson, L. W. Deady, B. M. Abbott, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3781–3790.
[25] M. S. Tremblay, M. Halim, D. Sames, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7570–7577.
[26] E. Chong, L. L. Schafer, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 6002–6005.
[27] S. D. Kuduk, J. W. Skudlarek, C. N. Di Marco, J. G. Bruno, M. A. Pausch, J. A. O'Brien, T. D. Cabalu, J. Stevens, J. Brunner, P. L. Tannenbaum, A. L. Gotter, C. J. Winrow, J. J. Renger, P. J. Coleman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 1784–1789.
[28] R. Zhou, W. Wang, Z.-j. Jiang, K. Wang, X.-l. Zheng, H.-y. Fu, H. Chen, R.-x. Li, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 6023–6026.
[29] H. Van de Poël, G. Guillaumet, M. C. Viaux-Massuard, *Heterocycles* **2002**, *57*, 55–71.
[30] O. A. Volkov, C. C. Cosner, A. J. Brockway, M. Kramer, M. Booker, S. Zhong, A. Ketcherside, S. Wei, J. Longgood, M. K. McCoy, T. E. Richardson, S. A. Wring, M. Peel, J. D. Klinger, B. A. Posner, J. K. De Brabander, M. A. Phillips, *ACS Infect. Dis.* **2017**, *3*, 512–526.
[31] C. Zhang, S. Bourgeade-Delmas, A. F. Alvarez, A. Valentin, C. Hemmert, H. Gornitzka, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 1635–1643.
[32] T. Baltz, D. Baltz, C. Giroud, J. Crockett, *EMBO J.* **1985**, *4*, 1273–1277.
[33] B. Räz, M. Iten, Y. Grether-Bühler, R. Kaminsky, *Acta. Trop.* **1997**, *68*, 139–147.
[34] J. Guillon, A. Cohen, R. N. Das, C. Boudot, N. M. Gueddouda, S. Moreau, L. Ronga, S. Savrimoutou, L. Basmaciyan, C. Tisnerat, S. Mestanier, S. Rubio, S. Amaziane, A. Dassonville-Klimpt, N. Azas, B. Courtioux, J.-L. Mergny, C. Mullié, P. Sonnet, *Chem. Biol. Drug Des.* **2018**, *91*, 974–995.
[35] N. Greig, S. Wyllie, S. Patterson, A. H. Fairlamb, *FEBS J.* **2009**, *276*, 376–386.
[36] S. Wyllie, B. J. Foth, A. Kelner, A. Y. Sokolova, M. Berriman, A. H. Fairlamb, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *71*, 625–634.
[37] D. C. Jones, I. Hallyburton, L. Stojanovski, K. D. Read, J. A. Frearson, A. H. Fairlamb, *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80*, 1478–1486.
[38] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.

Manuscript received: July 8, 2018
Revised manuscript received: August 29, 2018
Accepted manuscript online: ■■ ■■, 0000
Version of record online: ■■ ■■, 0000

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

***Para*-sites against parasites:** Antikinetoplastid pharmacomodulation at position 3 of an 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one scaffold was achieved using an optimised Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction. Among the 24 molecules synthesised, a *para*-carboxyphenyl derivative was identified as a new selective antitrypanosomal hit with a lower reduction potential. Unlike the initial hit, this compound is not efficiently bioactivated by type I trypanosomal nitroreductase, which suggests an alternative mechanism of action.



J. Pedron, C. Boudot, S. Bourgeade-Delmas, A. Sournia-Saquet, L. Paloque, M. Rastegari, M. Abdoulaye, H. El-Kashef, C. Bonduelle, G. Pratviel, S. Wyllie, A. H. Fairlamb, B. Courtioux, P. Verhaeghe, A. Valentin*

■■ – ■■

Antitrypanosomatid Pharmacomodulation at Position 3 of the 8-Nitroquinolin-2(1*H*)-one Scaffold Using Palladium-Catalysed Cross-Coupling Reactions

© 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

II.1.3. Etude des 19 molécules issues de la pharmacomodulation en position 6 de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one (partie 3)

Lors de la synthèse des 35 premières molécules, la substitution en position 6 avait permis de mettre en évidence des composés relativement actifs à l'encontre des trypanosomes, partant de ce constat, 19 nouvelles molécules ont été synthétisées en tenant compte de la pharmacomodulation en position 6. Ce travail toujours mené par l'équipe du LCC, par le Dr Julien Pedron et le Pr Pierre Verhaeghe, a utilisé des substituants électroattracteurs comme des atomes d'halogènes (Br, Cl, F…) ou de groupements trifluorométhyle (CF_3) afin d'accroitre la bioactivation du groupement nitro par les nitroréductases NTR1.

De plus, des molécules substituées à la fois en position 6 et en position 3 ont été synthétisées afin d'augmenter la puissance d'action antiparasitaire en tenant compte des résultats obtenus précédemment (figure 49).

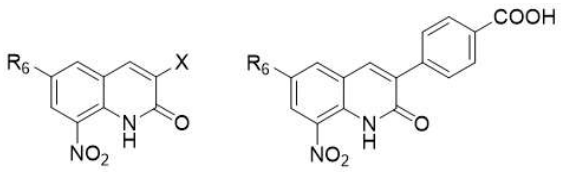


Figure 49. Structures mères des 19 nouveaux composés de cette série

II.1.3.1. Tests *in vitro*

a) Mesure de la cytotoxicité

En suivant le même protocole que pour les 2 autres séries, l'évaluation de la cytotoxicité a été menée à la suite de la synthèse chimique afin de vérifier leur innocuité sur les lignées cellulaires HepG2.

Les résultats de cette évaluation sont présentés dans la tableau 14.

BY-NC-ND

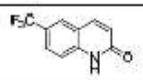
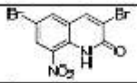
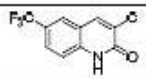
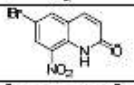
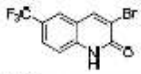
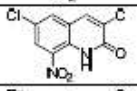
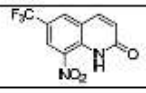
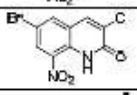
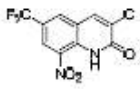
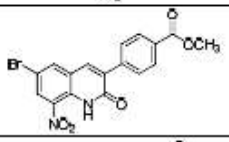
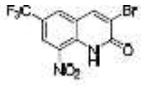
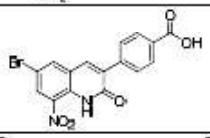
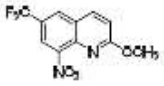
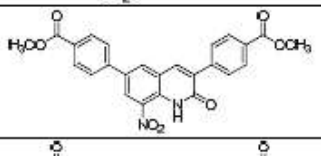
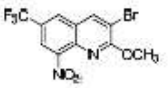
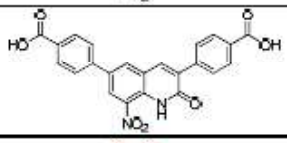
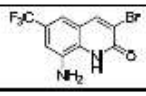
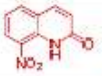
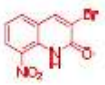
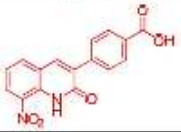
Numéro	Structure	CC_{50} HepG2 (µM)	Numéro	Structure	CC_{50} HepG2 (µM)
62		> 100	73		16,6 ± 1,2
63		> 100	74		27,9 ± 6,0
65		> 100	75		24,3 ± 0,9
66		41,3 ± 3,9	76		17,9 ± 2,5
67		31,4 ± 3,3	77		NS
68		41,0 ± 2,5	78		60,4 ± 14,4
69		> 100	79		NS
70		> 3,12	80		> 100
71		> 100	22		164 ± 28
24		92 ± 13	56		120 ± 7
Doxorubicine		0,2 ± 0,02	Suramine		> 100
Éflornithine		> 100	Fexinidazole		> 200
Amphotéricine B		5,5 ± 0,25	Miltéfosine		85 ± 8,8

Tableau 14. Résultats de l'évaluation de la cytotoxicité des 19 molécules
(En bleu les molécules les moins cytotoxiques, en rouge les hits précédemment identifiés)

Les résultats obtenus avec ces 19 molécules substituées en position 6 sont encourageants car exceptées les molécules 77 et 79 non solubles et la molécule 70 ayant une CC_{50} supérieure à 3 µM, les autres molécules sont peu ou pas cytotoxiques comme pour 6 d'entre elles ayant une CC_{50} > 100 µM. Parmi ces 6 molécules, cinq possèdent un groupement trifluorométhyle en position 6. A l'inverse, la substitution par un atome d'halogène en position 6 rend les molécules plus cytotoxiques à l'image des molécules 73 à 76 ayant des CC_{50} comprises entre 16,6 et 27,9 µM.

BY-NC-ND

b) Mesure de l'activité antiparasitaire

La recherche d'une activité antiparasitaire contre *Leishmania* et *Trypanosoma* a été évaluée pour les molécules solubles en suivant les mêmes protocoles que pour les autres séries (tableau 15).

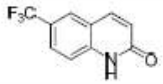
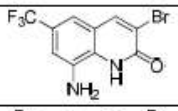
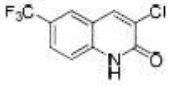
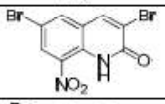
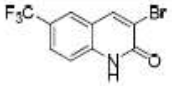
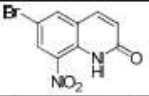
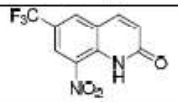
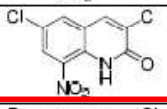
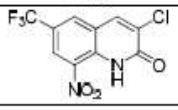
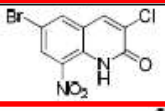
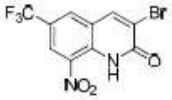
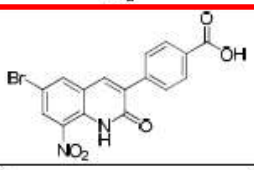
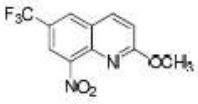
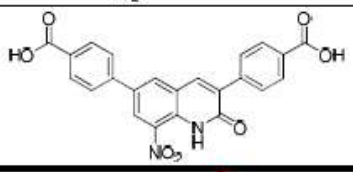
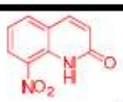
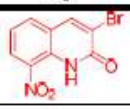
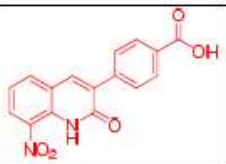
N°	Structure	CI_{50} *L. inf* ama. axénique (µM)	N°	Structure	CI_{50} *L. inf* ama. axénique (µM)
62		> 100	71		> 100
63		> 100	73		6,5 +/- 1,8
65		> 100	74		11,6 +/- 2,5
66		18,5 +/- 3,9	75		6,2 +/- 0,6
67		9,2 +/- 1,5	76		6,7 +/- 0,8
68		3,9 +/- 1,5	78		8,0 +/- 1,5
69		> 100	80		> 100
22		15,5 +/- 0,5	24		7,1 +/- 1,5
56		> 100	Amphotéricine B		0,06 +/- 0,001
			Miltéfosine		0,8 +/- 0,02
			Fexinidazole		3,4 +/- 0,8

Tableau 15. Résultats de l'évaluation de l'activité trypanocide des 14 molécules issues de la pharmacomodulation en position 6 de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one

Sur les 14 molécules évaluées, 3 molécules, ayant un trifluorométhyle en position 6 et ne possédant pas de groupement nitro, possèdent une CI_{50} > 50 µM. Par contre, 7 molécules présentent une activité très intéressante avec des CI_{50} comprises entre 0,01 et 0,6 µM. Il est donc évident que la présence du groupement nitro est indispensable pour l'activité

BY-NC-ND

trypanocide. Ceci est confirmé avec la molécule 71 qui présente une amine au lieu du nitro et voit son activité antiparasitaire diminuée (CI_{50} de 8,37 µM) par rapport à son homologue, la molécule 68 possédant un groupement nitro à la place de l'amine et qui a une CI_{50} de 0,2 µM. La substitution en position 6 par un halogène (brome ou chlore) conduit à des composés très actifs (molécules 73 à 78 avec des CI_{50} de 0,012 à 0,1 µM). De plus, les molécules substituées à la fois en position 3 et en position 6 présentent les meilleurs résultats avec des CI_{50} de 0,05 µM pour la molécule 73 (présence de 2 bromes) et 0,012 µM pour la plus active de toutes, la molécule 76 (un brome et un chlore). Cette dernière possède une activité près de 160 fois supérieure au « hit » initial, molécule 24. La substitution en position 3 cette fois-ci par le groupement *p*-carboxyphényle qui avait été identifiée comme actif avec la molécule « hit » 56 dans la deuxième série, montre également que lorsqu'il est couplé à une substitution en position 6 comme c'est le cas pour la molécule 78, son activité est multipliée par 25.

Ainsi les molécules 76 et 78 possédant respectivement des CI_{50} de 0,012 µM et 0,06 µM ont été identifiées comme 2 nouveaux « hits » dans la lutte contre les trypanosomes avec des IS de 1491 et 1007 respectivement (tableau 16). Ces molécules sont plus actives que les traitements de référence à savoir le fexinidazole (CI_{50} de 0,4 µM), l'éflornithine (CI_{50} de 15,8 µM) et même la suramine (CI_{50} de 0,03 µM) pour la molécule 76 uniquement.

BY-NC-ND

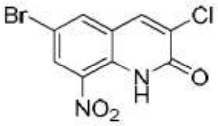
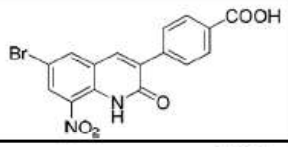
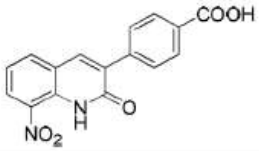
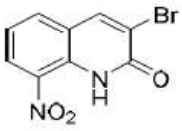
molécules	structure	CC_{50} HepG2 (µM)	CI_{50} *T. b. brucei* (µM)	IS CC_{50} / CI_{50}
76		17,9 ± 2,5	**0,012 ± 0,002**	**1492**
78		60,4 ± 14,4	**0,06 ± 0,01**	**1007**
56		120 ± 7	1,5 ± 0,2	80
24		92 ± 13	1,9 ± 0,4	48,4
Fexinidazole		> 200	0,4 ± 0,2	> 500
Eflornithine		> 100	15,8 ± 2,1	> 6
Suramine		< 100	0,02 ± 0,009	> 5000

Tableau 16. Bilan des profils biologiques des meilleures molécules issues des 3 séries

Afin de compléter les évaluations sur ces 2 molécules 76 et 78, les tests d'évaluation de la génotoxicité, des paramètres pharmacocinétiques et de passage de la BHE ont été menés en suivant les mêmes protocoles que précédemment cités (partie 1 et partie 2).

Ainsi l'équipe de Dundee a évalué dans les mêmes conditions, les molécules 76 et 78 en comparant les résultats de la souche sauvage de trypanosomes 'single marker' S427 (T7RPOL TETR NEO), qui a également été modifiée génétiquement pour surexprimer la NTR1, et cela dans le but de mesurer le rôle de ces enzymes dans la bioactivation de ces molécules. Les résultats obtenus sont présentés ci-après (tableau 17).

BY-NC-ND

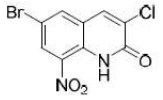
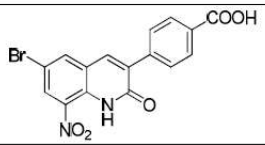
N°	Structure	CI_{50} *T. b. brucei* trypoma. sauvage (µM)	CI_{50} *T. b. brucei* trypoma. $NTR1^{SE}$ (µM)
76		0,3 ± 0,06	0,02 ± 0,008
78		4,0 ± 0,2	0,1 ± 0,009
Nifurtimox		1,9 ± 0,05	0,6 ± 0,05

Tableau 17. Tests d'activité des molécules 76 et 78 vis-à-vis d'une souche de *T.b.b* sauvage et d'une surexprimant la NTR1

Les deux molécules sont bioactivées par la NTR1, en témoignent les valeurs de CI_{50} de la souche surexprimant la nitroréductase dont les activités sont multipliées par 15 et 40 pour les molécules 76 et 78 respectivement. Il est à noter que la molécule 78 qui est bioactivée par la NTR1, dérive directement de la molécule « hit » 56 précédemment décrite qui n'était pas substrat de cette NTR1. La molécule 76 est la plus prometteuse des 2 et est 6 fois plus active que la molécule de référence, le nifurtimox.

c) Evaluation de la génotoxicité

Un test des comètes a été mis en place comme pour la molécule « hit » 24 pour évaluer la potentielle génotoxicité de la molécule la plus prometteuse, à savoir la molécule 76. L'équipe Toxalim a ainsi pu apprécier les éventuels dommages causés par les molécules sur l'ADN après un temps d'incubation de 2h et 72h.

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (tableau 18).

BY-NC-ND

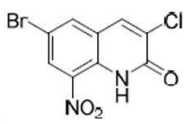
Test des comètes Négatif		
	t= 2 h	72 h
1 µM	-	-
10 µM	-	-
Methane Methylsulfonate	+	+

Tableau 18. Résultats du test des comètes pour la molécule 76

La molécule 76 n'est pas génotoxique après 2h ou 72h d'incubation aux concentrations de 1 et 10 µM. La CC_{50} étant de 17,9 µM, aucune concentration supérieure n'a été testée. Les photos prises lors du test n'indiquent aucune dégradation de l'ADN.

Concernant la molécule 78, les tests seront envisagés ultérieurement.

d) Etudes de pharmacocinétique

L'équipe Pasteur de Lille a mesuré la stabilité microsomale et la fixation aux protéines plasmatiques des molécules 76 et 78 dans le but d'évaluer leur potentiel pharmaceutique.

En suivant le même schéma que pour la molécule 24, la stabilité microsomale a été mesurée *in vitro* par chromatographie liquide après incubation avec des microsomes hépatiques murins (figure 50).

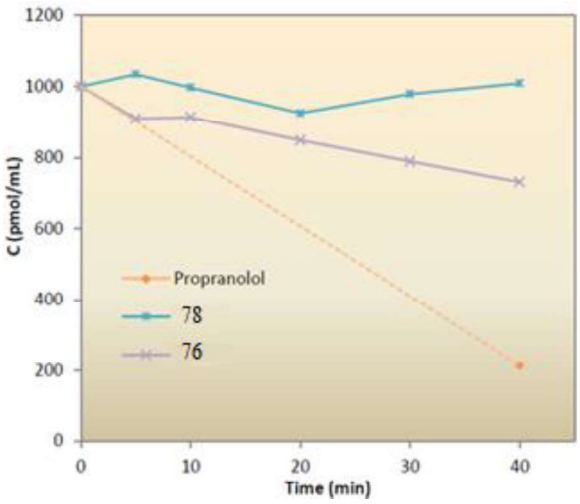


Figure 50. Résultats de la stabilité microsomale des molécules 76 et 78

BY-NC-ND

Avec ces résultats, nous constatons que les molécules 76 et 78 sont stables en présence de microsomes hépatiques avec notamment des $T_{1/2}$ > 40 minutes. Faiblement métabolisées au bout de 40 minutes (29% pour la molécule 76 et 0% pour la molécule 78), elles présentent un bon profil pharmacocinétique.

L'étude de fixation aux protéines plasmatiques et plus particulièrement à l'albumine a été menée par un suivi en chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse (tableau 19).

Molécule	% lié	Fraction libre (fu)	Log (fu)
76	99,2	0,0098	-2,007
78	> 99	< 0,001	< 2,000
Warfarine	99,07	0,0093	-2,032
Diclofénac	99,79	0,0021	-2,673

Tableau 19. Résultats du test de fixation à l'albumine pour les molécules 76 et 78

Les résultats indiquent que ces molécules sont fortement liées à l'albumine à plus de 99 %. La faible proportion libre des molécules va pouvoir directement agir. Pour le reste, il faudra attendre l'équilibre entre fraction libre et fraction liée pour espérer gagner en activité. Seule une étude *in vivo* permettra de savoir exactement l'impact de cette forte liaison, car le modèle *in vitro* ne permet pas d'anticiper les résultats *in vivo*.

e) Etude du franchissement de la BHE

Comme pour la molécule 56, il est important d'étudier le franchissement de la BHE dans le cas où les molécules 76 ou 78 soient proposées comme traitements de la Trypanosomose Africaine. Le CERMN a étudié ce franchissement par la mise en place d'un test PAMPA en utilisant toujours 2 contrôles, un contrôle négatif, la théophylline, qui ne diffuse pas au travers des barrières et un contrôle positif, la corticostérone, qui diffuse au niveau de la BHE.

Les résultats obtenus sont les suivants (tableau 20).

BY-NC-ND

Molécule	Concentration (µM)	logPe	Pe (10^{-6} cm/s)	Interprétation
76	100	4,40 ± 0,07	40,51 ± 6,93	**Diffuse**
78	100	- 5,90 ± 0,3	1,27 ± 0,09	**Diffuse moyennement**
Théophylline	250	- 6,22 ± 0,07	0,60 ± 0,10	**Ne diffuse pas**
Corticostérone	100	- 4,86 ± 0,07	3,86 ± 2,20	**Diffuse**

Tableau 20. Résultats de l'évaluation du test PAMPA pour les molécules 76 et 78

La molécule 76 possède un Pe très important, plus de 10 fois supérieure au contrôle positif, la corticostérone. Elle est donc capable de diffuser au niveau de la BHE. Par contre la molécule 78 présente un Pe de 1,27, soit 3 fois moins important que la corticostérone, mais 2 fois plus important que celui de la théophylline. Cette molécule diffuse donc moyennement au niveau de la BHE. Toutefois il est à noter que la molécule 78 qui dérive de la molécule 56 qui elle ne diffusait pas au travers de la BHE, semble avoir gagné en perméabilité grâce à la présence de l'atome de brome. Cet halogène a ainsi augmenté la lipophilie de la molécule. Il reste néanmoins à améliorer cette lipophilie pour augmenter la perméabilité.

L'ensemble des tests *in vitro* menés sur les 3 séries de molécules synthétisées par l'équipe du LCC de Toulouse a permis de mettre en évidence 4 molécules décrites comme des « hits » anti-*Trypanosoma* (tableau 21). Parmi ces quatre, les molécules 76 et 78 substituées à la fois en position 3 et position 6 ont montré une importante activité parasitaire avec un indice de sélectivité optimal. Les tests de pharmacocinétique ont confirmé l'intérêt porté à ces composés. La molécule 76 est un « hit » d'intérêt qui a été obtenu par synthèse de 80 dérivés.

BY-NC-ND

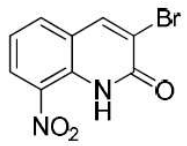
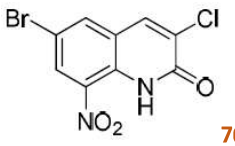
Molécules	CC_{50} HepG2 (µM)	CI_{50} *T.b.b* (µM)	IS	Stabilité microsomale	Fixation à l'albumine	Test PAMPA BHE	Bioactivation par la NTR1
 24	92 ± 13	1,9 ± 0,44	48	> 40 min	92,20%	_	**OUI**
56	120 ± 7	1,5 ± 0,2	80	> 40 min	_	Ne diffuse pas	OUI mais faible
 76	17,9 ± 2,5	**0,012 ± 0,02**	**1491**	> 40 min	99,20%	**Diffuse**	**OUI**
78	60,4 ± 14,4	**0,06 ± 0,01**	**1007**	> 40 min	> 99 %	Diffuse moyennement	**OUI**

Tableau 21. Bilan des tests menés sur les dérivés nitroquinoléinones

II.1.3.2. Tests *in vivo*

Le développement d'un médicament passe par des études précliniques comprenant des tests *in vitro* permettant comme cela a été le cas de faire un screening de molécules pour sélectionner la plus pertinente. Puis des tests *in vivo* sur l'animal doivent être initiés afin d'évaluer le comportement de la molécule sur un organisme vivant entier avant de pouvoir envisager de passer sur l'Homme. Le candidat médicament est alors évalué sur le plan de la toxicologie, de la pharmacocinétique et de la pharmacologie. En effet, les prérequis toxicologiques et pharmacologiques représentent les données les plus importantes au cours du développement d'un médicament. Elles sont définies par l'ICH (*International Conference of Harmonization*) et sont revues à modification tous les 2 ans ("ICH Official web site : ICH," n.d.). Ainsi la détermination de la dose létale 50 (DL_{50}) longtemps utilisée n'est plus obligatoire depuis 1991. Toutefois la nécessité de connaitre les effets sur l'animal oblige à tester des doses et de déterminer plusieurs valeurs de référence, à savoir la dose maximale tolérée (DMT) correspondant à la dose provoquant un effet dit toxique mais n'affectant pas la survie

BY-NC-ND

de l'animal, et la dose maximale sans effet toxique (DMSET) qui, elle, correspond à la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet significatif clinique, biologique ou anapathomologique n'est révélée et ceci par comparaison à des lots d'animaux témoins. La toxicité ne se juge pas uniquement sur la survie ou la mort de l'animal utilisé, mais aussi sur des critères cliniques tels l'évolution pondérale, l'état tégumentaire ou encore l'activité motrice. Cette toxicité s'évalue de façon aiguë mais également chronique afin de voir les effets sur les organes. Les animaux ayant survécu sont euthanasiés afin d'effectuer un examen macroscopique des organes internes. Une étude anapathomologique peut être réalisée devant des signes de défaillance viscérale. Cette étude est généralement menée sur 2 voies d'administration, à savoir la voie IV permettant d'avoir une biodisponibilité de 100 %, et la voie choisie pour les futurs essais cliniques.

Par la suite à cette même dose choisie, les études de pharmacocinétique vont décrire le comportement et le devenir du composé dans l'organisme en suivant le schéma ADME. Les études de pharmacologie vont permettre quant à elles, de mesurer l'activité de la molécule à la dose fixée.

La molécule 76 a été inclue dans des tests *in vivo* sur un modèle murin. L'intégralité des analyses a fait l'objet d'un dépôt de dossier, évalué et validé par un comité d'éthique et par le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation. En effet, depuis les années 80, les tests sur les animaux sont soumis au principe des 3R (Reduce, Replace, Refine) à savoir que les expérimentations animales doivent tout d'abord être remplacées tant que possible par des études *in vitro*, que lorsque cela est obligatoire, le nombre d'animaux doit être revu à la baisse et que les conditions de vie des animaux inclus dans les études soient améliorées. En France, la directive 2010/63/UE et les 5 arrêtés du 1er février 2013 obligent les utilisateurs d'animaux à limiter le nombre d'animaux et à en justifier l'utilisation.

Toutes les souris utilisées lors des études *in vivo* sont des souris femelles Swiss de 8 semaines d'âge (Janvier Labs). Elles ont été placées au sein de l'animalerie conventionnelle de la Faculté de Pharmacie soumise aux règles d'hygiène et de bien-être animal.

a) Recherche de la Dose Maximale Tolérée et de la Dose maximale sans effet toxique

La détermination de la DL_{50} n'étant plus obligatoire, le recours à une alternative permettant d'évaluer de façon empirique la dose toxique est proposée selon le schéma 1, 10 et 100 mg/kg.

BY-NC-ND

Bien qu'il soit nécessaire de tester sur 2 voies d'administration dont la voie IV, il a été impossible d'utiliser cette dernière avec la molécule 76. La molécule 76 est soluble dans le DMSO, mais non soluble dans de l'eau physiologique, or il est impossible d'employer un solvant toxique par voie IV ni une suspension. La voie *Per Os* fut alors la seule retenue.

Suivant le protocole établi par Torreele *et al.*, en 2010 pour étudier le fexinidazole, une suspension de la molécule 76 a été réalisée (Torreele et al., 2010). Pour cela, un mélange de Tween 80 et de 0,5 % de carboxyméthylcellulose (CMC) a été préparé auquel différentes concentrations de molécule 76 ont été ajoutées. Les suspensions ont par la suite été soniquées avant d'être données aux souris à hauteur de 50 µL par gavage. Trois lots de 4 souris non parasitées ont été utilisés afin de vérifier l'innocuité du solvant, de la molécule 76 et d'une molécule témoin le fexinidazole. Un suivi régulier des souris a été réalisé toutes les heures durant les 12 premières heures, puis chaque jour pendant 1 semaine, pour finir par 1 fois par semaine pendant 1 mois. Tout effet a été codifié afin d'avoir un suivi pour chaque animal (annexe 1).

La molécule 76, étant relativement cytotoxique (CC_{50} de 17,5 µM), la décision a été prise de ne tester que 2 concentrations à savoir 25 mg/kg et 50 mg/kg et de ne pas tester la concentration à 100 mg/kg en dose unique.

Pour la dose de 50 mg/kg de la molécule 76, 3 souris sur 4 ont présenté une certaine apathie durant la première heure suivant l'administration, et la 4ème souris a eu son poil un peu ébouriffé ainsi qu'une apathie jusqu'à 3h post administration. L'observation des hématies a montré une légère déformation mais non durable dans le temps. Pour la dose à 25 mg/kg, aucune des 4 souris n'a présenté d'effets néfastes sur les 24 premières heures ni sur le mois suivant. Les souris n'ont présenté aucune lésion ou grosseur (tableau 22).

Le solvant (Tween80/CMC) a été testé pour vérifier l'absence d'interaction entre les composés présents et les cellules de l'organisme. Le fexinidazole, molécule témoin, a été utilisé à la dose présentée dans la publication de Torreele (Torreele et al., 2010).

	Solvant	Molécule 76 50 mg/kg	Molécule 76 25 mg/kg	Fexinidazole 100 mg/kg
Effets indésirables	0/4	4/4	0/4	0/4

Tableau 22. Suivi des signes cliniques observés sur les souris pour déterminer la DMT et la DMSET (n=4 souris dans chaque lot)

BY-NC-ND

Ainsi, il a été considéré que la dose à 50 mg/kg correspondait à la DMT et que celle à 25 mg/kg pouvait être qualifiée de DMSET. La dose retenue pour effectuer les tests a donc été la dose à 25 mg/kg afin d'éviter tout risque pour l'animal.

b) Etude de pharmacocinétique

Une fois la DMSET validée, une étude de pharmacocinétique a été initiée pour mesurer les paramètres pharmacocinétiques permettant de connaitre le profil de la molécule, et plus particulièrement sa fréquence d'administration. Pour cela, la Concentration maximale (Cmax), le Temps maximal (Tmax), le $T_{1/2}$ et l'aire sous la courbe (AUC) à l'infini ont été mesurés à la suite d'une administration unique de la molécule 76.

Quatre souris ont donc reçu la DMSET par gavage à hauteur de 50 µL en dose unique. Des prélèvements de sang héparinés ont été faits au bout de 30 minutes, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h et 24 h à la queue de chaque souris pour un volume maximal de 100 µL.

Puis une extraction de type QuECHERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) a été réalisée (Westland and Dorman, 2013; Núñez et al., 2015; Dulaurent et al., 2016). La formulation des sels varie en fonction du modèle. Pour notre extraction nous avons utilisé la formulation suivante : 4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl, 1 g trisodium citrate hydrate, et 0,5 g disodium hydrogencitrate sesquihydrate. Avant même de réaliser l'analyse, un processus de validation est nécessaire pour démontrer que la méthode d'analyse fonctionne et que les résultats obtenus sont fiables. Pour cela, nous avons mis en place une procédure sur 5 jours qui étudie plusieurs paramètres à partir d'échantillons de sang total qui sont surchargés à des concentrations connues de composé. Ces échantillons surchargés se répartissent comme suit : des points de gamme pour construire la courbe de calibration ; des contrôles qualité répartis dans la gamme de dosage ; si nécessaire des points hors gamme pour tester l'effet dilution (annexe 1).

Une fois la méthode validée, nous avons pu effectuer les analyses à partir de nos échantillons. Le sang total hépariné a été mis en contact avec de l'acétonitrile (ACN) afin de précipiter les protéines. Puis les sels sont ajoutés et vont permettre d'obtenir 2 phases bien distinctes après centrifugation. En effet, une fois le mélange saturé en sels, la phase aqueuse n'est plus miscible avec l'ACN, il y a donc séparation. La molécule 76 et ses éventuels métabolites vont se répartir dans une des deux phases en fonction de leur affinité (dépendant de leur structure). Pour la molécule 76, elle va se répartir préférentiellement dans la phase organique.

BY-NC-ND

Une fois la phase organique récoltée, elle est diluée au 10ème dans 100% d'eau/ acide formique à 0,1%, avant injection dans le spectromètre de masse. Dans notre cas, il s'agit d'un spectromètre LCMS 8060 Shimadzu (Japon).

Pour toute analyse, il est nécessaire de savoir comment se comporte une molécule vis-à-vis de l'appareil. Pour cela, avant de passer les échantillons, il faut injecter directement dans le spectromètre la molécule pure à une concentration fixée de 1 µg/mL. Connaissant la masse théorique de la molécule 76 (303,3 g/mol) et sa formule brute $C_9H_4BrClN_2O_3$, le logiciel PeakView utilisé par la plateforme BiSCEM de l'Université de Limoges va pouvoir ainsi calculer le massif isotopique et l'abondance relative de la molécules 76. Le spectromètre de masse va alors optimiser les différents paramètres spécifiques à la molécule (mode positif ou négatif en fonction de la structure de la molécule, paramètres de tension…) pour finir par obtenir un spectre MS/MS, empreinte digitale de la molécule. Le spectromètre optimise alors les paramètres de fragmentation pour ne choisir que l'énergie de collision donnant un fragment le plus intense pour notre molécule.

La méthode la plus adaptée à notre molécule se compose d'une colonne C8 (Agilent Poroshell 120 EC-C8, 2,1x75 mm, 2,7 µm), d'un couple de phase mobile avec une phase A composée d'eau et 0,1 % d'acide acétique, et une phase B composée de 50/50 méthanol/ACN, 0,1 % acide acétique.

Chaque échantillon a été passé afin d'obtenir par méthode MRM (méthode permettant de quantifier une ou plusieurs molécules cibles dans un échantillon donné) un pic correspondant à la molécule (figure 51).

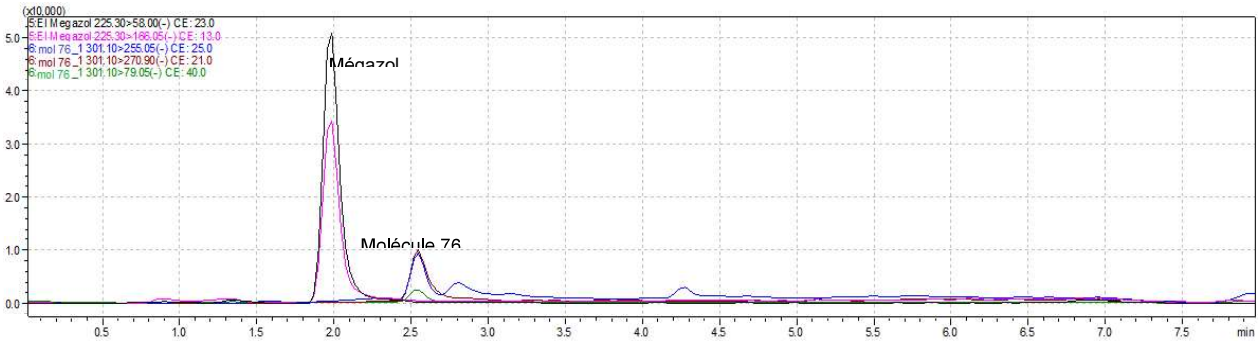


Figure 51. Chromatogramme MRM représentatif de la molécule 76 et du standard interne le mégazol

Les résultats obtenus pour la molécule 76 permettant de connaitre son profil pharmacocinétique sont les suivants (figure 52 et tableau 23):

BY-NC-ND

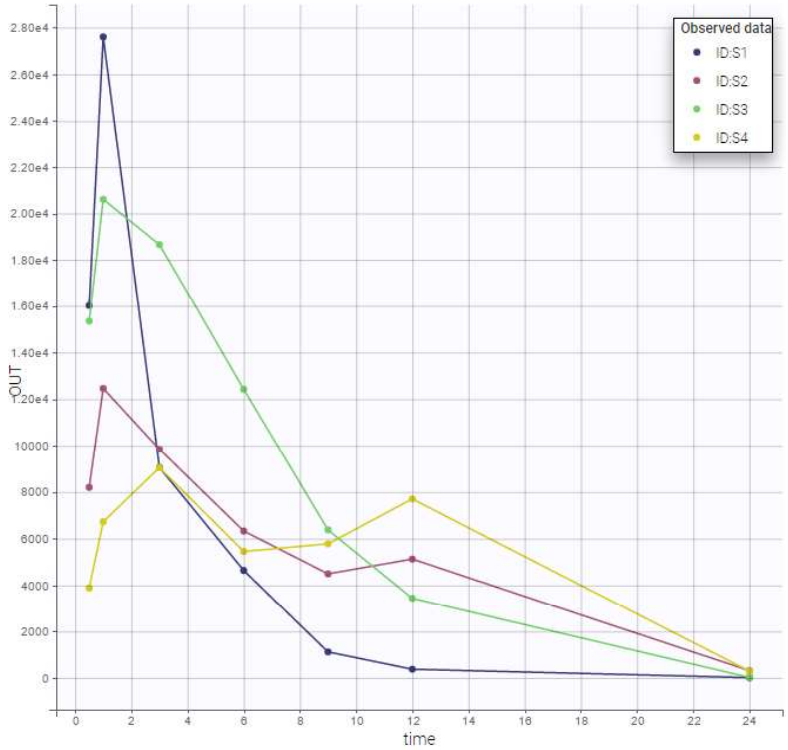


Figure 52. Résultats des concentrations plasmatiques de la molécule 76 pour les 4 souris
(Axe Y : Concentrations en ng/mL, axe X : Temps en h) (logiciel Monolix) (le logiciel ne permet pas de visualiser les valeurs SD sur ce graphique)

	Cmax (ng/mL) ± SD	Tmax (h) ± SD	$T_{1/2}$ (h) ± SD	$AUC_{0\text{-}inf}$ (ng.h/mL) ± SD	Clairance (mL/h) ± SD
molécule 76	17428,14 ± 8337,48	1,5 ± 1	2,87 ± 0,95	123495,05 ± 31693,56	0,00768 ± 0,0021

Tableau 23. Résultats des paramètres pharmacocinétiques de la molécules 76 après une administration PO
(Souris n=4, concentration de 25 mg/kg, dose unique) (logiciel Monolix)

A la suite d'une administration PO de 25 mg/kg en dose unique, son AUC est très importante indiquant une excellente diffusion au niveau plasmatique, ce qui est confirmé par sa Cmax de l'ordre de 17 µg/mL (pour rappelle la dose de 25 mg/kg correspond à une concentration de 18 mg/mL pour une souris de 36 g). Toutefois le $T_{1/2}$ est de presque 3h, ce qui signifie que la molécule subit une transformation qu'il est nécessaire de rechercher (métabolisation, séquestration).

La molécule 76, encore retrouvée au bout de 24h dans le compartiment sanguin peut être administrée en une dose unique à hauteur de 25 mg/kg.

BY-NC-ND

c) Mesure de l'activité trypanocide

Une fois la DMSET déterminée et les paramètres pharmacocinétiques mesurés, il est nécessaire de vérifier que la molécule 76 active *in vitro* le soit également *in vivo*. Pour cela, 4 souris ont été infectées par voie intrapéritonéale à hauteur de 2 000 parasites dans 100 µL avec la souche de *T.b.b.* AnTat 1.9 (utilisée lors des tests *in vitro*) qui mime une infection aiguë de la maladie, avec une mort en 4 - 5 jours maximum en l'absence de traitement.

Un contrôle de la parasitémie par prélèvement d'une goutte de sang à la queue des souris permet d'apprécier l'infection. Dès lors un comptage sur cellule de Malassez peut être fait afin d'avoir un suivi correct. Dès le 3ème jour d'infection et la présence de trypanosomes dans le sang, le traitement peut commencer à hauteur de 50 µL par gavage d'une suspension de molécule 76 à 25 mg/kg.

Le schéma d'administration se déroule sur 5 jours maximum avec une administration par jour, et un comptage de la parasitémie avant la première administration puis après chaque nouvelle administration.

Les résultats obtenus montrent qu'il n'a pas été possible d'aller jusqu'à 5 jours de traitements pour la molécule 76. En effet, au 2ème jour de traitement, la parasitémie était toujours croissante, et les souris sont mortes (figure 53 et tableau 24). Il en a été de même pour les souris ayant reçu le solvant seul, et de l'eau physiologique. Par contre les 4 souris traitées au fexinidazole ont montré une absence totale de parasite dès le 2ème jour d'administration. Aucune des 4 souris n'a rechuté par la suite.

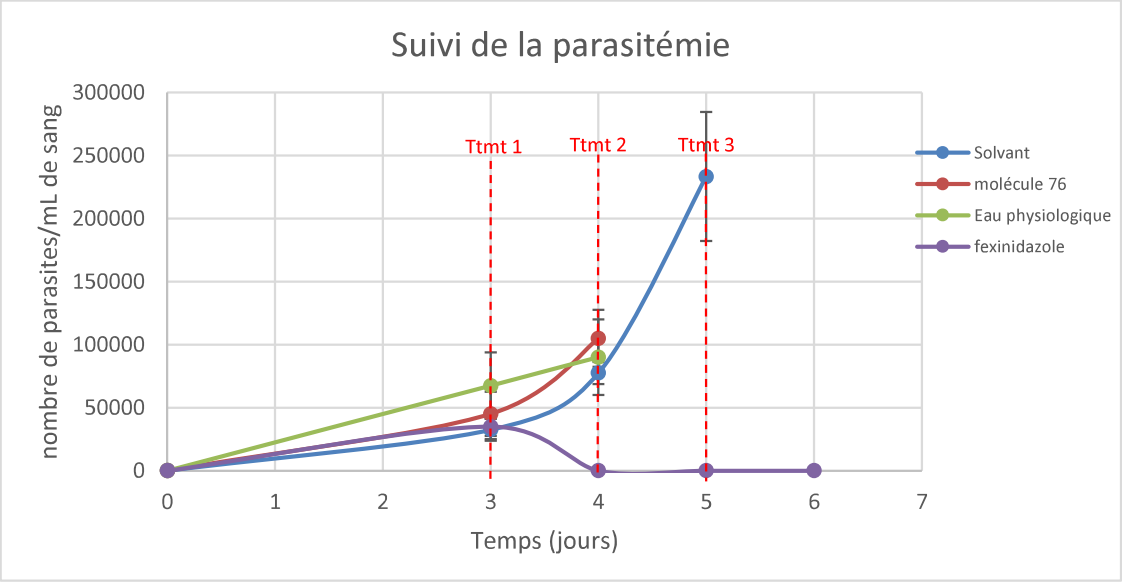


Figure 53. Suivi de la parasitémie chez les souris traitées avec la molécule 76 et avec les témoins (n=4 souris ; traits rouges : les jours de traitement (ttmt))

BY-NC-ND

	Molécule	Dose (mg/kg x Nombre de jours de traitement)	Guéries/Infectées
T.b.b. AnTat 1.9	Solvant	-	0/4
	76	25 x 2	0/4
	Eau Physiologique	-	0/4
	Fexinidazole	100 x 3	4/4

Tableau 24. Détermination *in vivo* de l'efficacité de la molécule 76 sur la souche *T.b.b.* AnTat 1.9

Pour comprendre l'absence d'efficacité *in vivo* de notre molécule 76 bien qu'elle présente toutes les caractéristiques pour être un bon candidat (activité *in vitro*, paramètres pharmacocinétiques optimum), nous avons mené une nouvelle étude *in vivo* en utilisant un inhibiteur des CYP450, principaux acteurs du mécanisme de métabolisation de phase 1. Une seconde étude a permis de rechercher d'éventuels métabolites dans le sang, les urines et les fèces des souris préalablement traitées ou non avec l'inhibiteur des CYP450 afin de voir si les souris sont capables de dégrader la molécule 76 en des composés sans efficacité.

d) Etude de l'inhibition des cytochromes P450 et recherche d'une activité trypanocide

L'aminobenzotriazole (ABT) est un inhibiteur irréversible et non spécifique des enzymes des CYP450. Utilisé pour étudier le profil pharmacocinétique de composés, dans le but de connaitre leur comportement et leur perméabilité au sein de l'organisme vivant, il peut être donné par voie orale (PO) ou injecté par voie intrapéritonéale (IP) à la dose de 50 ou 100 mg/kg sans risque pour l'animal (Balani et al., 2002; El-Kattan et al., 2008; Watanabe et al., 2016). Ainsi il est capable d'inhiber à la fois le métabolisme hépatique mais également le métabolisme intestinal souvent sous-estimé lors d'une administration PO tout comme celui pulmonaire. Son étude a permis de montrer qu'à dose unique, il peut être détecté durant 24h dans le plasma d'un rongeur permettant ainsi une action prolongée des molécules associées. Toutefois, son action inhibitrice des CYP450 n'est pas la même pour tous les cytochromes. Pour les CYP2A6 et CYP3A4, l'inactivation est totale, mais pour les CYP1A2, CYP2C9, CYP2B6, CYP2C19 ou encore CYP2D6, il existe une rétention d'une activité résiduelle, et ceci tout particulièrement pour le CYP2C9 présentant une résistance de plus de 60% pouvant expliquer des absences d'efficacité de certains composés substrats de ce cytochrome (Sun et al., 2011; De Montellano, 2018).

Suivant les études décrites dans la littérature et appliquées à notre modèle, nous avons infecté 3 souris avec la souche *T.b.b.* AnTat 1.9 (2 000 parasites dans 100 µL), puis à J3, nous avons

BY-NC-ND

injecté par voie IP de l'ABT à 50 mg/kg 2 heures avant la première administration de la molécule 76 (Watanabe et al., 2016). Ce schéma a été reproduit chaque jour pendant 5 jours de traitements.

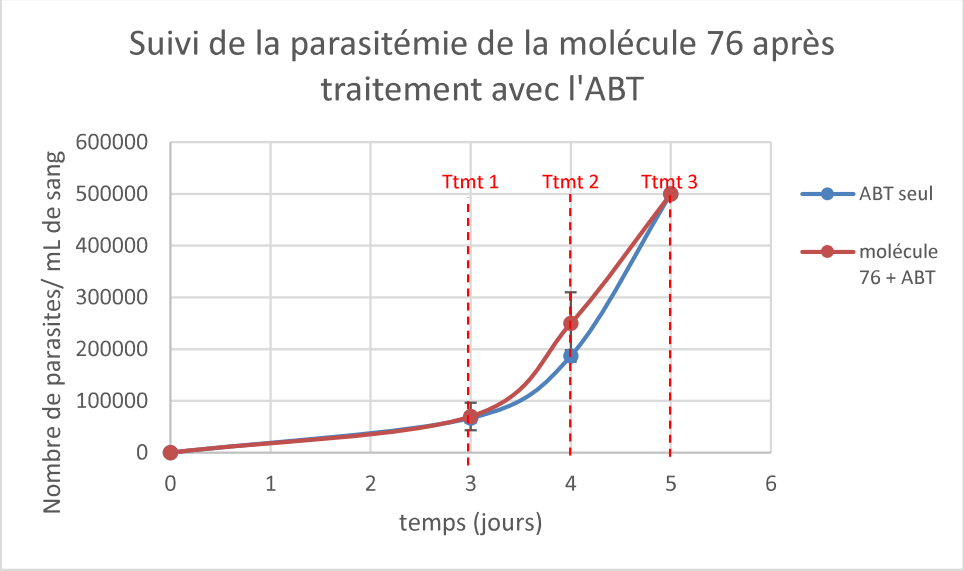


Figure 54. Suivi de la parasitémie après traitement à l'ABT + molécule 76 (n=3 souris; traits rouges : les jours de traitement)

A 5 jours post-infection, soit au 3ème jour de traitement, les souris des 2 lots présentaient une charge parasitaire très importante, obligeant leur euthanasie (figure 54). Malgré l'inhibtion des CYP450, il n'y a pas eu d'amélioration de l'activité. A ce stade, il est difficile de conclure sur le fait que la molécule est substrat ou non des cytochromes. Son action pourrait dépendre d'autres facteurs qu'il sera nécessaire de déterminer pour comprendre son fonctionnement.

Il a toutefois été intéressant d'aller vérifier l'absence de production de métabolites afin de confirmer que la molécule 76 n'est pas métabolisée, ou du moins ne subit pas une métabolisation de phase 1 faisant intervenir les CYP450.

e) Recherche des éventuels métabolites dans les fluides biologiques

Lors d'une administration par voie orale notamment, les xénobiotiques vont, suivant leur structure, subir une première métabolisation par l'action des enzymes hépatiques. Cette action appelée métabolisation de phase 1 est majoritairement due à l'action des cytochromes P450 capable d'oxyder, réduire ou d'hydrolyser les composés afin de les rendre actifs ou inactifs. Ces composés peuvent être par la suite conjugués. Il s'agit de la métabolisation de phase 2, correspondant à l'action d'autres systèmes enzymatiques (les plus connus font appels à l'acide

BY-NC-ND

glucuronique, au glycocolle, au sulfate ou à l'acétyl). Les composés formés sont donc plus propices à une élimination de l'organisme par voie urinaire ou biliaire. Pour comprendre comment certaines molécules fonctionnent, il est nécessaire de rechercher la présence de métabolites pouvant être actifs ou inactifs et donc responsable de l'efficacité ou de l'inefficacité de la molécule mère.

Deux souris non parasitées ont reçu une dose de 25 mg/kg par gavage. Une heure après l'administration, un prélèvement sanguin a été effectué sur les 2 souris et réparti dans un tube hépariné et dans un tube non hépariné afin d'obtenir le sérum. Par la suite, les 2 souris ont été placées durant 24 heures post traitement dans des cages à métabolisme permettant de collecter les urines et les fèces en 2 lots : un à 12h et un second à 24h.

Les différents fluides (les fèces ont été solubilisées dans du DMSO) ont subi une extraction aux QuECHERS suivant le protocole déjà établi pour l'étude de pharmacocinétique. Les échantillons ont été analysés en spectrométrie de masse couplée à de la chromatographie liquide haute performance (CLHP/SM) suivant une méthode GUS (General Unknown Screening) permettant un balayage complet de l'échantillon afin de détecter et d'identifier sans *a priori* les composés présents (Sauvage et al., 2006). Les métabolites ont été sélectionnés sur la base du profil du massif isotopique de la molécule mère à savoir la molécule 76. Ce massif isotopique se caractérise dans le cas de notre molécule par la présence de chlore et de brome permettant d'avoir un profil caractéristique validant la présence des molécules par comparaison entre les massifs isotopiques théoriques et expérimentaux (Figure 55).

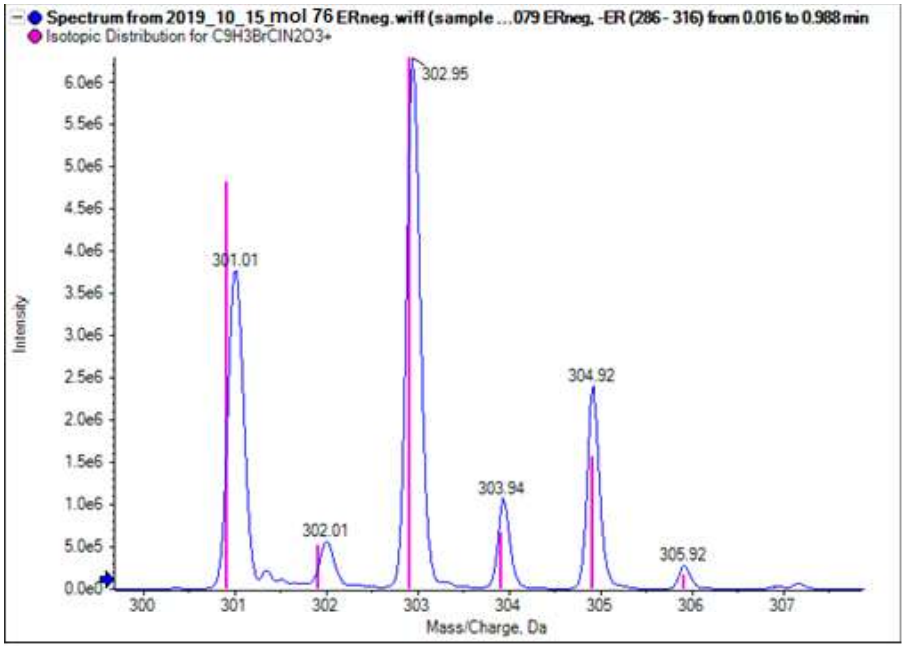


Figure 55. Superposition massifs isotopiques expérimental (bleu) / théorique (rose) de la molécule 76

BY-NC-ND

Suite à l'analyse en GUS, les métabolites potentiels ont été répertoriés et une analyse MRM (Multiple Reaction Monitoring) a permis de rechercher spécifiquement les composés dans les fluides biologiques et de confirmer leur présence. Cette analyse a été comparée à des fluides biologiques de souris vierges de ces composés. Après traitement des données de spectrométrie obtenues, nous avons pu identifier la présence de la molécule 76 et un métabolite non identifié de m/z 351 (possibilité qu'il s'agisse du composé réduit sulfoconjugué au niveau de l'oxygène). Son abondance varie en fonction des fluides biologiques, mais il est présent en plus grande quantité dans les fèces (figure 56).

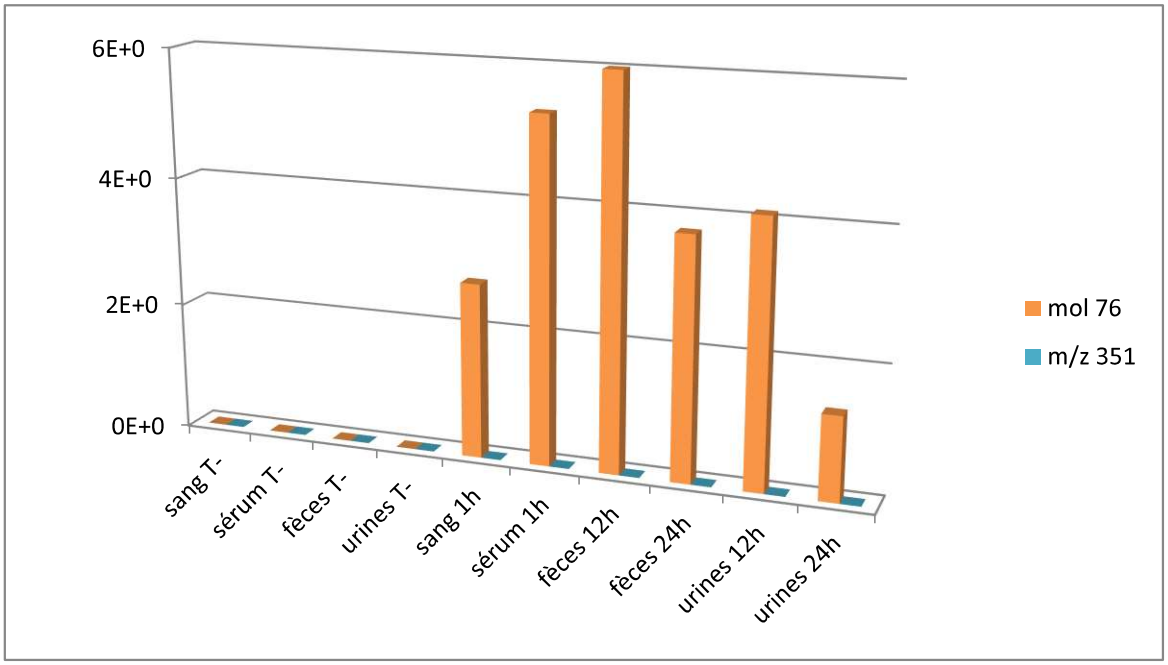


Figure 56.Histogrammes de présence dans les fluides biologiques de la molécule 76 et de son métabolite

Malgré un ensemble de paramètres favorables, la molécule 76 n'a pas montré d'activité trypanocide lors des tests *in vivo*. Cette absence d'efficacité est peut-être imputable à une trop forte fixation aux protéines plasmatiques. Il serait donc intéressant de développer de nouveaux composés plus polaires.

Ce travail fait l'objet d'un article publié en 2020 intitulé « New 8-Nitroquinolinone Derivative Displaying Submicromolar *in Vitro* Activities against Both *Trypanosoma brucei* and *cruzi*» (Pedron et al., 2020).

BY-NC-ND

New 8-Nitroquinolinone Derivative Displaying Submicromolar *in Vitro* Activities against Both *Trypanosoma brucei* and *cruzi*

Julien Pedron*, Clotilde Boudot*, Jean-Yves Brossas, Emilie Pinault, Sandra Bourgeade-Delmas, Alix Sournia-Saquet, Elisa Boutet-Robinet, Alexandre Destere, Antoine Tronnet, Justine Bergé, Colin Bonduelle, Céline Deraeve, Geneviève Pratviel, Jean-Luc Stigliani, Luc Paris, Dominique Mazier, Sophie Corvaisier, Marc Since, Aurélie Malzert-Fréon, Susan Wyllie, Rachel Milne, Alan H. Fairlamb, Alexis Valentin, Bertrand Courtioux, and Pierre Verhaeghe

Publié en Février 2020

Résumé:

Une étude sur la pharmacomodulation des antikinéoplastides a été menée en position 6 du pharmacophore 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one. Quinze nouveaux dérivés ont été synthétisés et évalués *in vitro* contre *L. infantum*, *T. brucei brucei* et *T. cruzi*, en parallèle avec un test de cytotoxicité sur la lignée cellulaire humaine HepG2. Un dérivé antitrypanosomal puissant et sélectif 6-bromo-substitué, **12** a été révélé, présentant des valeurs EC_{50} de 12 et 500 nM sur les trypomastigotes *T. b. brucei* et les amastigotes *T. cruzi* respectivement, en comparaison avec quatre médicaments de référence (30 nM ≤ EC_{50} ≤ 13 µM). De plus, le composé **12** n'était pas génotoxique au test des comètes et a montré une grande stabilité microsomale *in vitro* (demi-vie >40 min) ainsi qu'un comportement pharmacocinétique favorable chez la souris après administration orale. Enfin, la molécule **12** (E° = -0,37 V/NHE) s'est révélée bioactivée par les nitroréductases de type 1, tant chez *Leishmania* que chez *Trypanosoma*, et semble être un bon candidat pour la recherche de nouveaux composés antitrypanosomals.

BY-NC-ND

This is an open access article published under a Creative Commons Attribution (CC-BY) License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the author and source are cited.

ACS Medicinal Chemistry Letters

pubs.acs.org/acsmedchemlett Letter

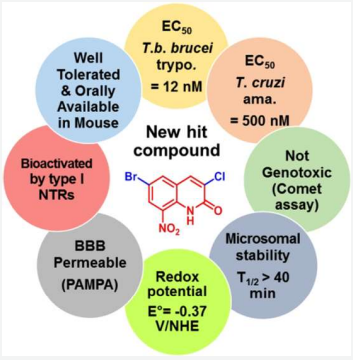
New 8-Nitroquinolinone Derivative Displaying Submicromolar *in Vitro* Activities against Both *Trypanosoma brucei* and *cruzi*

Julien Pedron,[+] Clotilde Boudot,[+] Jean-Yves Brossas, Emilie Pinault, Sandra Bourgeade-Delmas, Alix Sournia-Saquet, Elisa Boutet-Robinet, Alexandre Destere, Antoine Tronnet, Justine Bergé, Colin Bonduelle, Céline Deraeve, Geneviève Pratviel, Jean-Luc Stigliani, Luc Paris, Dominique Mazier, Sophie Corvaisier, Marc Since, Aurélie Malzert-Fréon, Susan Wyllie, Rachel Milne, Alan H. Fairlamb, Alexis Valentin, Bertrand Courtioux, and Pierre Verhaeghe*

Cite This: https://dx.doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00566 Read Online

ACCESS | Metrics & More | Article Recommendations | Supporting Information

ABSTRACT: An antikinetoplastid pharmacomodulation study was conducted at position 6 of the 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one pharmacophore. Fifteen new derivatives were synthesized and evaluated *in vitro* against *L. infantum*, *T. brucei brucei*, and *T. cruzi*, in parallel with a cytotoxicity assay on the human HepG2 cell line. A potent and selective 6-bromo-substituted antitrypanosomal derivative **12** was revealed, presenting EC_{50} values of 12 and 500 nM on *T. b. brucei* trypomastigotes and *T. cruzi* amastigotes respectively, in comparison with four reference drugs (30 nM ≤ EC_{50} ≤ 13 μM). Moreover, compound **12** was not genotoxic in the comet assay and showed high *in vitro* microsomal stability (half life >40 min) as well as favorable pharmacokinetic behavior in the mouse after oral administration. Finally, molecule **12** ($E°$ = −0.37 V/NHE) was shown to be bioactivated by type 1 nitroreductases, in both *Leishmania* and *Trypanosoma*, and appears to be a good candidate to search for novel antitrypanosomal lead compounds.



KEYWORDS: *Trypanosoma brucei brucei, Trypanosoma cruzi, 8-nitroquinolin-2(1H)-ones, redox potentials, NTR1*

Downloaded via UNIV DE LIMOGES on February 12, 2020 at 13:47:54 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

Human African trypanosomiasis (HAT),[1] Chagas diseases (CD),[2] and visceral leishmaniasis (VL)[3] are infectious diseases caused by unicellular flagellated kinetoplastid parasites belonging to the *Trypanosoma* and *Leishmania* genera. From an epidemiological point of view, the World Health Organization (WHO) estimates that millions of people are at risk of contracting HAT, CD, and VL. These three diseases are also estimated to be responsible for about 30 000 annual deaths, with the caveat that these numbers may be underestimated due to the difficulty in accessing some rural areas and the unspecific symptoms during the early stage of these infections.[4] Although these diseases are lethal if untreated, there are very few efficient and safe drugs available, each of them presenting various drawbacks for the patient (toxicity, emergence of resistances, mode of administration, treatment cost). Thus because of the lack of consideration and investments from the pharmaceutical industry, the WHO classified HAT, CD, and VL among "neglected tropical diseases" (NTDs).[5]

In this context, nitroaromatic derivatives play a key role in the fight against kinetoplastids (Figure 1). Beyond Nifurtimox and Benznidazole (antitrypanosomal drugs), nitroaromatics are fully part of the research efforts of the Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi). Thus among the few novel chemical entities in clinical trials against these infections,[6] the development of fexinidazole (an orally available 5-nitroimidazole derivative that received an agreement from the European Medicines Agency (EMA) in the treatment of HAT in 2018 and that is in phase 2 against CD),[7−9] delamanid (a derivative that is marketed against tuberculosis and that was studied against VL),[10] and DNDi-0690 (a 2-nitroimidazooxazine derivating from delamanid and that has recently entered phase-I clinical trials against VL) illustrate well the strong potential of nitroaromatic molecules in the search for novel antitrypanosomatids.[11]

The antiparasitic mechanism of action of these molecules involves parasitic nitroreductases (NTRs). NTRs contain a flavin as a cofactor and catalyze the one- or two-electron reduction of nitrodrugs into cytotoxic electrophilic metabolites such as nitroso and hydroxylamine derivatives, which are able to form covalent adducts with DNA or proteins.[12] Two NTRs were found in *Leishmania*: a mitochondrial NTR1 catalyzing a two-electron reduction[13] and a cytosolic NTR2 catalyzing a one-electron reduction.[14] In *Trypanosoma*, only a mitochondrial type 1 NTR is expressed.[15,16] It is important to note that

Received: December 2, 2019
Accepted: February 6, 2020
Published: February 6, 2020

ACS Publications © XXXX American Chemical Society

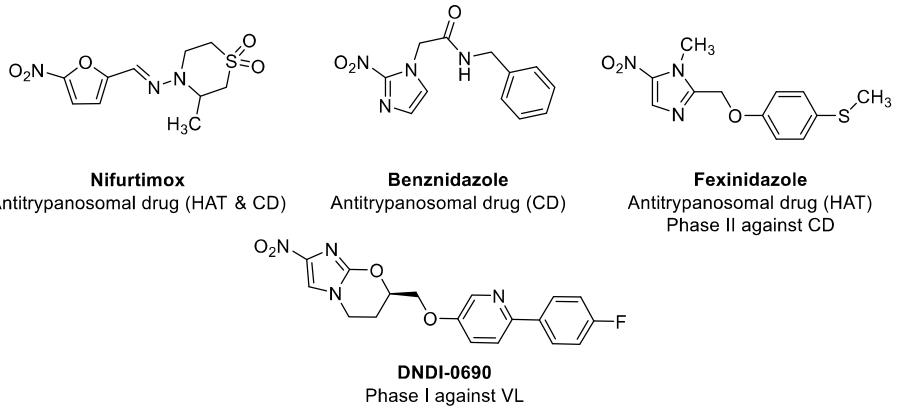


Figure 1. Structures of nitroaromatic drugs displaying antikinetoplastid activity.

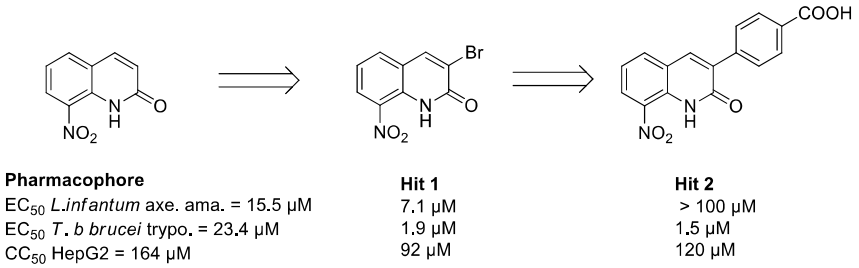
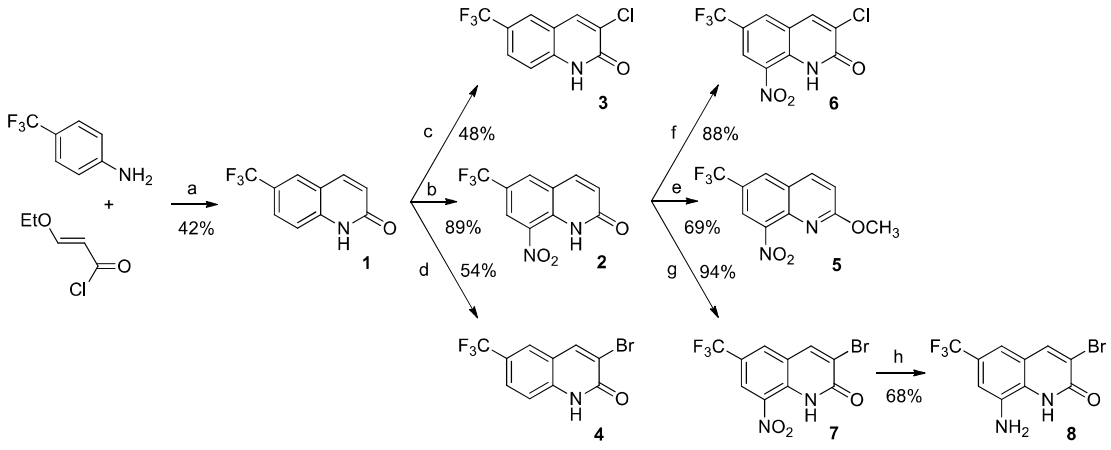


Figure 2. Antitrypanosomatid profile of previously reported 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one hit compounds.

Scheme 1. Synthesis of Compounds 1−8 from *p*-Trifluoromethylaniline



these enzymes are absent from mammalian cells, an important feature for developing selective antikinetoplastid molecules. Moreover, depending on the chemical structure of nitrated derivatives, the selectivity for NTRs could be modulated. For instance, fexinidazole is selectively bioactivated by NTR1 in both *Leishmania* and *Trypanosoma*; meanwhile, delamanid is only bioactivated by NTR2 in *Leishmania*.[14]

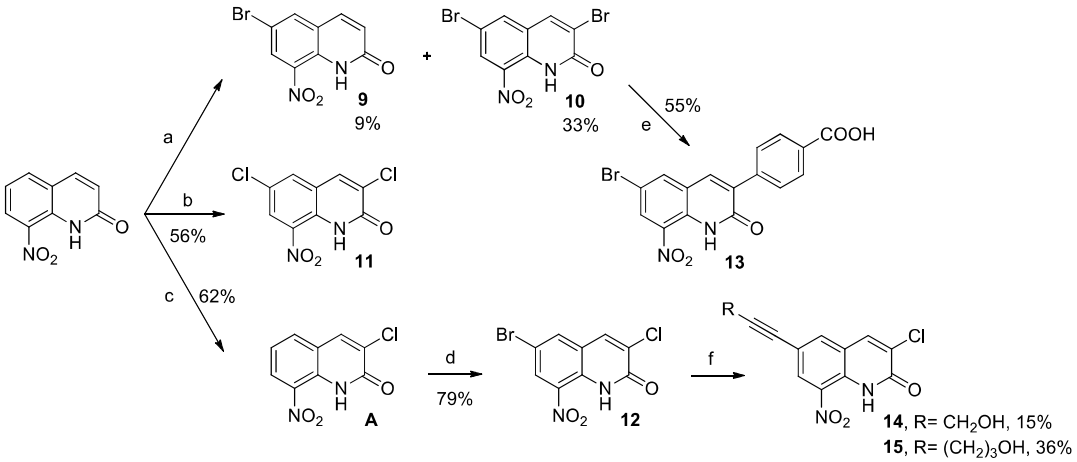
In this context, by studying the antiparasitic potential of the 8-nitroquinoline scaffold,[17] our research team reported a new antileishmanial pharmacophore: 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one.[18] After pharmacomodulation studies at position 4,[19,20] an electrochemistry-guided work highlighted the importance of an intramolecular hydrogen bond between the nitro group and the lactam function.[21] This work also led to the identification of a new 3-bromosubstituted antikinetoplastid hit compound derivative (**Hit 1**, Figure 2), which is bioactivated by type 1 NTRs, in both *L. donovani* and *T. brucei brucei* (*T. b. brucei*).[21] Recently, by introducing a *p*-carboxyphenyl functionality at position 3 of the pharmacophore, we reported a new selective antitrypanosomal hit compound (**Hit 2**, Figure 2).[22]

We herein present a medicinal chemistry work that greatly improved the antitrypanosomal activity of the current series via the synthesis of novel derivatives bearing electron-withdrawing groups at position 6 of the quinolinone scaffold.

To increase the oxidant character of the series and facilitate its bioactivation by nitroreductases, 15 derivatives (**1−15**) were prepared, bearing various electron-withdrawing groups (EWGs) at position 6. As presented in Scheme 1, eight compounds bearing a trifluoromethyl group at position 6 of the quinolinone scaffold were synthesized according to a previously reported protocol.[23] In brief, 3-ethoxyacryloyl chloride was synthesized in two steps by the saponification

https://dx.doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00566
ACS Med. Chem. Lett. XXXX, XXX, XXX−XXX

Scheme 2. Synthesis of Compounds 9−15



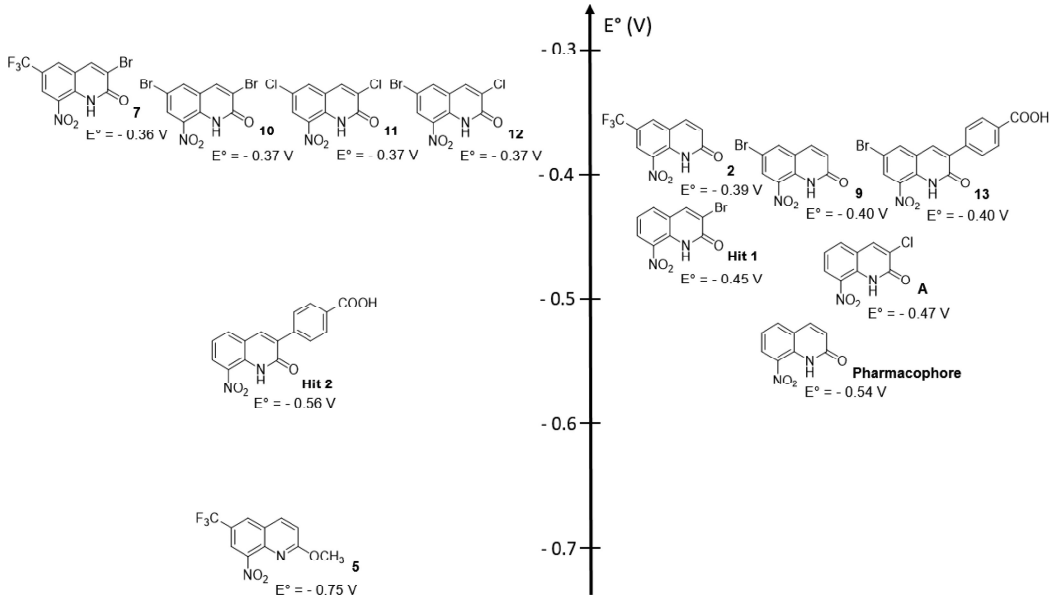


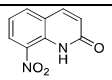
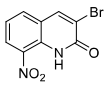
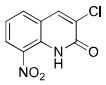
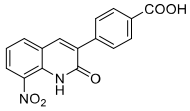
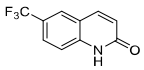
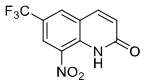
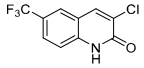
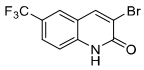
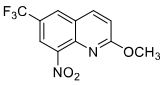
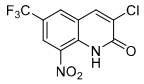
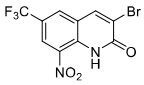
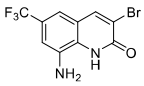
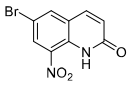
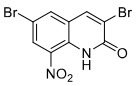
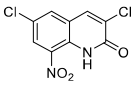
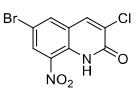
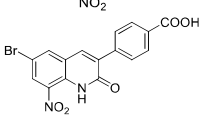
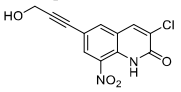
Figure 3. Redox potentials of synthesized nitroaromatic compounds determined by cyclic voltammetry.

of commercial 3,3′-diethoxyethylpropionate followed by a reaction with thionyl chloride. This acyl chloride was then reacted with *p*-trifluoromethylaniline to afford, after a cyclization step in H_2SO_4 (98%), compound **1** in 42% yield (a). Molecule **1** was then either nitrated at position 8, using classical conditions, to afford compound **2** in 89% yield (b) or selectively halogenated at position 3 to generate derivative **3** or **4** in 48 and 54% yield, respectively (c and d). The *O*-methylation of compound **2** was performed with a protocol using a mixture of methyl iodide and sodium hydride to prepare derivative **5** in 69% yield (e). Nitrated molecule **2** could also undergo chlorination at position 3, affording compound **6** in 88% yield (f), or react with $NaBrO_3$ in refluxing HBr, according to a previously reported protocol,[24] to afford halogenated derivative **7** in 94% yield (g). The nitro group of compound **7** was finally reduced to afford the amino-derivative **8**, considered as a negative control, using $SnCl_2$, in 68% yield (h).

The synthesis pathway used for preparing derivatives bearing a halogen atom at position 6 of the quinolinone ring is presented in Scheme 2. It starts from 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one,[21] which was reacted with bromine in refluxing acetic acid, saturated with sodium acetate, leading to a mixture of both 6-bromo and 3,6-dibromo derivatives **9** and **10** in 9 and 33% yield, respectively (a). Dichloro analogue **11** was also prepared from 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one by reacting with 5 equiv of sodium chlorate in refluxing hydrochloric acid for 24 h (b). By using the same reaction, decreasing the amount of sodium chlorate to 3 equiv, and limiting the reaction time to 45 min, 3-chloro-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one was formed (c).[21] This compound could be brominated at position 6 by reacting with an excess of $NaBrO_3$ in refluxing HBr, leading to **12** in good yield (d). Taking into account that we previously reported the benefit of introducing a *p*-carboxyphenyl moiety at position 3 of the scaffold toward antitrypanosomal activity,[22] we finally engaged dibromo-derivative **10** into a Suzuki−Miyaura reaction with *p*-(methoxycarbonyl)phenylboronic acid and then saponified the resulting ester coupling product to afford carboxylic acid **13** (e). Finally, from brominated compound **12**, derivatives **14** and **15** were obtained through a Sonogashira coupling reaction (f).

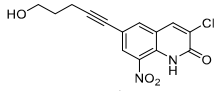
https://dx.doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00566
ACS Med. Chem. Lett. XXXX, XXX, XXX−XXX

Table 1. Antikinetoplastid Activities and Cytotoxicity of Compounds 1−15

Cpd	Structure	*L. infantum* axenic amastigote EC_{50} (μM)	*T. brucei brucei* trypomastigotes EC_{50} (μM)	Cytotoxicity HepG2 CC_{50} (μM) & *Selectivity index regarding T. b. brucei*
Phar.		15.5 +/-0.5	23.4 +/-5.7	164 +/-28 *7*
Hit 1		7.1 +/-1.5	1.9 +/-0.4	92 +/-13 *48*
A[27]		16 +/-0.9	1.2 +/-0.2	85 +/-4 *71*
Hit 2		> 100[a]	1.5 +/- 0.2	120+/-7 *80*
1		> 100[a]	> 50[a]	> 100[a] *ND*
2		18.5 +/- 3.9	1.7 +/- 0.9	41.3 +/- 3.9 *24*
3		> 100[a]	> 50[a]	> 100[a] *ND*
4		> 100[a]	> 50[a]	> 100[a] *ND*
5		> 100[a]	20.9 +/- 14.5	> 100[a] *>5*
6		9.2 +/- 1.5	0.57 +/- 0.25	31.4 +/- 3.3 *55*
7		3.9 +/- 1.5	0.2 +/- 0.09	41.3 +/- 3.9 *206*
8		> 100[a]	8.7 +/- 3.2	> 100[a] *>11*
9		11.6 +/- 2.5	0.07 +/- 0.01	27.9 +/- 6.0 *399*
10		6.5 +/- 1.8	0.05 +/- 0.008	16.6 +/- 1.2 *332*
11		6.2 +/- 0.6	0.1 +/- 0.04	24.3 +/- 0.9 *243*
12		6.7 +/- 0.8	0.012 +/- 0.002	18.1 +/- 2.5 *1508*
13		8.0 +/- 1.5	0.2 +/- 0.02	60.4 +/- 14.4 *302*
14		8.9 +/- 0.6	1.0 +/- 0.09	30.9 +/- 2.1 *31*

https://dx.doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00566
ACS Med. Chem. Lett. XXXX, XXX, XXX−XXX

Table 1. continued

Cpd	Structure	*L. infantum* axenic amastigote EC_{50} (μM)	*T. brucei brucei* trypomastigotes EC_{50} (μM)	Cytotoxicity HepG2 CC_{50} (μM) & *Selectivity index regarding T. b. brucei*
15		10.1 +/- 1.0	0.85 +/- 0.1	32.7 +/- 0.4 *38*
Doxorubicin[b]		-	-	0.2 +/-0.02
Amphotericin B[c]		0.06 +/-0.001	-	5.5 +/-0.25
Miltefosine[c]		0.8 +/-0.2	-	85 +/-8.8
Fexinidazole[c,d,e]		3.4 +/-0.8	0.4 +/- 0.2	> 200[a] *>500*
Suramin[d]		-	0.03 +/- 0.009	> 100[a] *>3333*
Eflornithine[d]		-	13.3 +/- 2.1	> 100[a] *>8*

[a]EC_{50} or CC_{50} value was not reached at the highest tested concentration. [b]Doxorubicin was used as a cytotoxic reference drug. [c]Amphotericin B, miltefosine, and fexinidazole were used as antileishmanial reference drugs. [d]Fexinidazole, suramin, and eflornithine were used as anti-*Trypanosoma brucei* reference drugs.

Electrochemistry. Because the compounds were expected to be nitroreductase substrates, we studied the influence of the introduction of EWGs at position 6 of the pharmacophore toward redox potentials. Thus redox potentials (couple R-NO_2/$RNO_2^{\bullet-}$) of the synthesized compounds were measured by cyclic voltammetry in DMSO (one-electron reversible reduction). Redox potentials ranged between −0.36 and −0.75 V/NHE (Figure 3). In comparison with the original pharmacophore, the introduction of a bromine atom at position 6 (compound **9**) led to a significant increase in the $E°$ value from −0.54 to −0.40 V. The same effect was observed when a bromine atom was introduced at position 6 of **hit 2** (compound **13**), with an increase in the $E°$ value of +0.16 V. It is important to note that introducing a bromine atom has a higher influence on the redox potential at position 6 (compound **9**) compared with position 3 (**hit 1**): +0.14 versus +0.09 V. The influence of the CF_3 group toward the redox potential of the scaffold was the same as that of the bromine atom: +0.15 V (comparison between the pharmacophore and compound **2**). Then, when two bromine atoms were combined at positions 3 and 6 (compound **10**), a slight increase of +0.03 V was observed (no additive effect) in comparison with 6-bromo-derivative **9**. Surprisingly, by comparing compounds **7** and **10**−**12**, there was almost no effect of the variation of the EWG at position 3 or 6 toward the redox potential values, with all compounds ranging from −0.36 to −0.37 V. Finally, by comparing compound **2** with its *O*-methylated derivative **5**, it appeared that the redox potential value was drastically lower (−0.36 V shift). This shift is not only due to the donating mesomeric effect of the methoxy group but also due to the disappearance of the intramolecular hydrogen bond between the nitro group and the lactam function.[21]

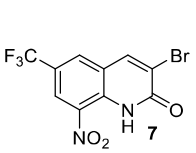
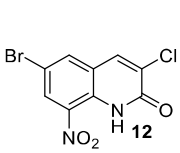
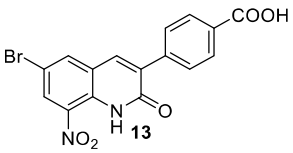
Compound Evaluation. The cytotoxicity of all compounds was first assessed on the human HepG2 cell line using doxorubicin as a positive control (Table 1). Compared with this reference drug (CC_{50} = 0.2 μM), the series showed little (CC_{50} = 17 μM) to no (CC_{50} > 100 μM) cytotoxicity. Non-nitrated molecules **1**, **3**, and **4**, *O*-methylated derivative **5**, and 8-amino-derivative **8**, considered as negative controls, displayed high CC_{50} values, >100 μM. The results show that the introduction of a bromine atom or a CF_3 group at position 6 of the nitrated scaffold leads to derivatives (**2** and **9**) that are four to five times more cytotoxic (CC_{50} = 28−41 μM) than the 8-nitroquinolinone pharmacophore (CC_{50} = 164 μM). When introducing an additional halogen atom at position 3 of the scaffold (**6**, **7**, **10**−**12**), the cytotoxicity remains close to the ones of 6-monosubstituted derivatives (CC_{50} = 17−41 μM). Nevertheless, introducing a *p*-carboxyphenyl functionality at position 3 of the scaffold (compound **13**) results in a three-fold decrease in the cytotoxicity (CC_{50} = 60 μM) in comparison with the 3,6-dibromo derivative **10** (CC_{50} = 17 μM).

All synthesized molecules were screened *in vitro* for their activity against *Leishmania infantum* axenic amastigotes, and their EC_{50} values were compared with the ones of three reference drugs (amphotericin B, miltefosine, and fexinidazole) and antikinetoplastid **hit 1** (Table 1). Among the tested compounds, only compound **7** ($E°$ = −0.36 V) showed a weak antileishmanial activity, displaying an EC_{50} value of 3.9 μM in addition to a selectivity index superior to 10. Derivatives of **7** without a nitro group at position 8 of the scaffold (**1**, **3**, **4**, and **8**) were inactive toward *L. infantum* as well as the *O*-methylated analogue **5** ($E°$ = −0.75 V), confirming both the key role of the nitro group toward antiparasitic activity and the importance of the interaction between the nitro group and the lactam function to confer suitable redox potentials for displaying antileishmanial properties in this chemical series.[21] Note that, contrary to **hit 2**, which was not active against *L. infantum* (EC_{50} > 100 μM), the 6-bromo derivative **13** was active (EC_{50} = 8 μM).

All molecules were also screened *in vitro* for their antitrypanosomal activity against *T. b. brucei* trypomastigotes, and their EC_{50} values were compared with the ones of three reference drugs, suramin, eflornithine, and fexinidazole, and with antitrypanosomal **hit 2**. Among the 15 tested molecules, **7**, **9**, **10**, **11**, **12**, and **13** displayed both submicromolar activity (12 ≤ EC_{50} ≤ 200 nM) and good selectivity indices (SI > 200) in comparison with suramin (EC_{50} = 30 nM), eflornithine (EC_{50} = 13 μM), fexinidazole (EC_{50} = 400 nM), and **hit 2** (EC_{50} = 1.5 μM). Molecule **12** was the most active and selective in the series: EC_{50} = 12 nM and SI = 1508. Compounds without a nitro group at position 8 of the scaffold

https://dx.doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00566
ACS Med. Chem. Lett. XXXX, XXX, XXX−XXX

Table 2. *In Vitro* Pharmacokinetic, Physicochemical, and Toxicological Properties of Compounds 7, 12, and 13

			
Microsomal stability (min)	> 40	> 40	> 40
Albumin binding assay (%)	99.4	99.0	> 99
BBB PAMPA assay (nm/s)	450.3 ± 170.5	405.1 ± 69.3	12.7 ± 0.9
cLogD[a] at pH = 7.4	3.24	2.97	0.44
Thermodynamic solubility at pH = 7.4 (μM)	-	21.7 +/-4.1	-
Comet assay at 1 and 10 μM	-	Negative	-

[a]Calculated with MarvinSketch (ChemAxon).

appeared to be inactive (compounds **1**, **3**, and **4**), and amino-derivative **8** was quite less active (EC_{50} = 9 μM). It is important to note that the introduction of a bromine atom at position 6 of the scaffold seems crucial to afford highly active antitrypanosomal molecules, with compound **9** being 334 times more active than the 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one pharmacophore and 27 times more active than its 3-bromo-position isomer (**hit 1**). This key effect of the bromine atom at position 6 of the scaffold also appears when comparing the activities of 3-chloro-6-bromo hit-compound **12** with its 3-chloro-analogue **A**: **12** is 100 times more active than **A**. When comparing molecules **2** and **9**, it appeared that the CF_3 group does not provide the same level of improvement in activity. Introducing an additional halogen atom at position 3 of hit molecule **9**, leading to dibromo-derivative **10** and dihalo-derivative **12**, afforded the most active compounds in the series (EC_{50} = 12−50 nM). A comparison between compound **12** and 3,6-dichlorosubstituted derivative **11** showed that the replacement of the bromine atom by a chlorine atom at position 6 was not in favor of antitrypanosomal activity. During pharmacomodulation studies at position 3 of the scaffold, **hit 2** was identified as a promising antitrypanosomal hit with an EC_{50} of 1.5 μM.[22] When a bromine atom is introduced at position 6 of **hit 2**, leading to compound **13**, the antitrypanosomal activity is improved, reaching an EC_{50} value of 200 nM.

Thus the molecule presenting the best antitrypanosomal profile in the series, regarding both the activity and the selectivity, was compound **12**. To better evaluate its antitrypanosomal potential, an *in vitro* evaluation against intracellular *T. cruzi* amastigotes was carried out using benznidazole and fexinidazole as positive controls (Table 1). Quite interestingly, despite being about 10 times more cytotoxic than reference drugs, molecule **12** displayed a high activity (EC_{50} = 0.5 μM) against *T. cruzi*, identical to the one of benznidazole (EC_{50} = 0.5 μM) and better than the one of fexinidazole (EC_{50} = 3 μM).

To investigate more deeply the potential of compounds 7, **12**, and **13** as the most active antikinetoplastid compounds of the studied series, an *in vitro* pharmacokinetic evaluation was performed, including a microsomal stability assay (female mouse microsomes), a human albumin binding assay, and a PAMPA assay using a blood−brain barrier (BBB) model (Table 2). All compounds presented good microsomal stability ($T_{1/2}$ > 40 min) and strong binding to human albumin (≥99%). However, the development of antitrypanosomal agents requires that molecules cross the BBB, as the second stage of HAT is meningoencephalitic. A PAMPA assay on a BBB model was then performed.[25,26] Compounds 7 and **12** diffused through the lipid bilayer with Pe values significantly higher than the positive control (Pe = 450.3 and 405.1 nm/s, respectively), whereas compound **13** displayed a low Pe value (Pe = 12.7 nm/s), indicating a limited crossing of the BBB, hindering the further development of **13**. This last result is not surprising because electrostatic repulsions between the negatively charged carboxylic acid group of this molecule and the negatively charged membrane constituents are probably responsible for its low permeability across the BBB in the PAMPA model. Moreover, **13** has a molecular weight approaching 400 g/mol, which could also contribute to limiting its diffusion across the BBB.[27] Unfortunately, the methylic ester precursor or **13** could not be evaluated *in vitro* because of a lack of aqueous solubility. The ability of hit-compound **12** to cross the BBB in the PAMPA assay is in accordance with its central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) score[28] that has a calculated value of 4.35. Finally, the aqueous solubility of hit-compound **12** was measured with a thermodynamic solubility assay at physiological pH and was determined at 21.7 μM (Table 2).

To check the antikinetoplastid mechanism of the bioactivation of compounds 7, **12** and **13**, their activities were evaluated *in vitro* toward *Leishmania donovani* promastigote strains overexpressing leishmanial nitroreductases (NTR1 or NTR2). EC_{50} values were determined and compared with the ones obtained on a wild-type strain to evaluate the

https://dx.doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00566
ACS Med. Chem. Lett. XXXX, XXX, XXX−XXX

bioactivation of these nitroaromatic compounds (Table 3). As reported for **hit 1**,[21] compounds **7** and **12** are selectively bioactivated by leishmanial NTR1, with EC_{50} values being 3.5 and 16 times lower on the strain overexpressing the NTR than on the wild type. Contrary to **7** and **12**, compound **13** did not demonstrate significant bioactivation by NTR1 or by NTR2 in *Leishmania*. The same experiments were carried out with compounds **7**, **12**, and **13** on *T. b. brucei* strains overexpressing the type 1 trypanosomal NTR, comparing the EC_{50} values with the ones determined on the wild-type strain (Table 3). All tested compounds were bioactivated by the type 1 nitroreductase of *T. b. brucei*, being, respectively, 7, 15, and 40 times more active against the strain overexpressing the NTR than against the wild type. It is interesting to note that **hit 2** (E° = −0.56 V) did not seem to be bioactivated by *T. b. brucei* NTR, whereas its 6-brominated derivative **13** (E° = −0.40 V) was. Finally, hit-compound **12** also appeared to be six times more active than nifurtimox against *T. b. brucei*, underlining the potential of this molecule as an antitrypanosomal candidate.

Table 3. Evaluation of the Bioactivation of Compounds 7, 12, and 13 by Leishmanial and Trypanosomal NTRs

Leishmania donovani promastigotes EC_{50} (μM)			
compound	wild type	NTR1 overexpressing	NTR2 overexpressing
Hit 1	5.9 ± 0.2	0.47 ± 0.02	4.6 ± 0.12
7	4.1 ± 0.2	1.2 ± 0.05	4.9 ± 0.3
12	4.7 ± 0.09	0.3 ± 0.01	2.9 ± 0.08
13	2.0 ± 0.2	1.3 ± 0.1	2.1 ± 0.1
Trypanosoma brucei brucei trypomastigotes EC_{50} (μM)			
compound	wild type	NTR overexpressing	
Hit 1	17.7 ± 1.0	3.9 ± 0.1	
Hit 2	5.4 ± 0.12	4.2 ± 0.2	
7	6.7 ± 0.4	0.9 ± 0.03	
12	0.3 ± 0.06	0.02 ± 0.008	
13	4.0 ± 0.2	0.1 ± 0.009	
Nifurtimox	1.9 ± 0.05	0.6 ± 0.05	

Even though many safe nitroaromatic molecules are today on the market (for example, antiprotozoal 5-nitroimidazoles such as metronidazole, several antihypertensive dihydropyridines like nicardipine, some benzodiazepines like loprazolam, anti-Parkinson's catechol *O*-methyltransferase (COMT) inhibitors like entacapone, antiandrogens like flutamide, anti-inflammatory nimesulide, immunomodulating azathioprine, anticoagulant acenocoumarol, anthelminthic niclosamide, etc.) or in clinical trials (for instance, delamanid), drugs including a nitroaromatic moiety suffer from a bad reputation as possible mutagenic or genotoxic molecules, which narrows their pharmaceutical development.[29] The Ames test is the most commonly used assay to evaluate the mutagenic potential of compounds, using *Salmonella typhimurium* strains. However, these bacteria possess NTR, making the Ames test generally unsuitable for the evaluation of most of nitroaromatic compounds, with the genotoxicity being attributed to the reduced metabolites that are bioactivated by these bacterial enzymes (absent in human cells).[30] Thus it is accepted that the comet assay or the micronucleus assay are more pertinent methods to evaluate the genotoxic potential of nitroaromatic compounds. For example, fexinidazole is positive in the Ames test but negative in the micronucleus assay.[31] A comet assay was then performed on the HepG2 cell line with hit compound **12**, using methylmethanesulfonate (MMS) as a positive control (see the Supporting Information). Compound **12** was not genotoxic after 2 or 72 h of incubation or at 1 or 10 μM, concentrations chosen to be lower than its CC_{50} on HepG2 cell line (CC_{50} = 18 μM).

Regarding tolerance in the mouse, a once daily oral dose of compound **12**, at 25 or 50 mg/kg, was administrated to eight mice (four mice in each group). These two doses were well tolerated with just a little apathy during 1 h for all mice receiving the dose of 50 mg/kg. The administration of a repeated dose of 25 mg/kg once daily for 5 days was well tolerated without any adverse effect noted. The no-observed-adverse-effect level (NOAEL)[31] in mice was then set at 25 mg/kg/day. After euthanasia, no lesions were found on the different organs (kidney, liver, brain, heart, and lung).

Finally, the *in vivo* pharmacokinetic parameters were determined in the mouse, after oral administration at 25 mg/kg in a mixture of 5% Tween 80 and 95% of 0.5% carboxymethylcellulose in water, by using the QuEChERS method.[32] Monolix Lixoft software was used to analyze the data by a noncompartmental model to fit pharmacokinetics parameters.[33] As presented in the Supporting Information (Figure S17), hit-compound **12** showed good pharmacokinetic properties: **12** is highly and rapidly absorbed after oral administration and shows good exposure. Its plasmatic half life (2.9 h) is higher than the one of the drug fexinidazole (0.8 h).[31]

Conclusions. *Via* an antitrypanosomal pharmacomodulation study of the 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one scaffold, by introducing an EWG at positions 3 and 6 of the quinolinone ring, a novel potent antitrypanosomal hit-compound (**12**) was identified, displaying high activities toward *T. b. brucei* (EC_{50} = 12 nM) and *T. cruzi* (EC_{50} = 0.5 μM) in comparison with eflornithine (EC_{50} = 13 μM), suramin (EC_{50} = 30 nM), benznidazole (EC_{50} = 0.5 μM), and fexinidazole (EC_{50} = 0.4 and 3.0 μM). Compound **12** displays good *in vitro* pharmacokinetic parameters (good microsomal stability and BBB permeability), is rapidly absorbed after oral administration, and is well tolerated in the mouse at 25 mg/kg. Nitroaromatic hit compound **12** is selectively bioactivated by type 1 NTR in both *Leishmania* and *Trypanosoma*. An electrochemistry study showed the strong influence of the introduction of an EWG in the benzenic part of the pharmacophore toward the redox potentials and the corresponding antitrypanosomal activities. Finally, the lack of genotoxicity of compound **12** in the comet assay is an additional favorable element so as to consider further development. Compound **12** meets all criteria for an antitrypanosomal hit, as defined by Katsuno and coworkers.[34] *In vivo* studies on the mice model of trypanosomiasis are now planned to investigate the potential of this compound to become an antitrypanosomal lead.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmedchemlett.9b00566.

Materials and methods, additional analysis of hit compounds **7**, **12**, and **13** as well as electrochemistry data, *in vitro* pharmokinetics (PK) data, and *in vivo* PK data (PDF)

https://dx.doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00566
ACS Med. Chem. Lett. XXXX, XXX, XXX−XXX

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Pierre Verhaeghe — *LCC-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31077 Toulouse, France;* orcid.org/0000-0003-0238-2447; Phone: +33 561 333 236; Email: pierre.verhaeghe@lcc-toulouse.fr

Authors

Julien Pedron — *LCC-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31077 Toulouse, France*

Clotilde Boudot — *Université de Limoges, UMR INSERM 1094, Faculté de Pharmacie, 87025 Limoges, France*

Jean-Yves Brossas — *AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Parasitologie Mycologie, 75013 Paris, France*

Emilie Pinault — *Université de Limoges, BISCEm Mass Spectrometry Platform, CBRS, F-87025 Limoges, France;* orcid.org/0000-0001-8811-2661

Sandra Bourgeade-Delmas — *UMR 152 PharmaDev, Université de Toulouse, IRD, UPS, 31077 Toulouse, France*

Alix Sournia-Saquet — *LCC-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31077 Toulouse, France*

Elisa Boutet-Robinet — *Toxalim, Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, 31077 Toulouse, France;* orcid.org/0000-0002-5223-4568

Alexandre Destere — *Department of Pharmacology, Toxicology and Pharmacovigilance, CHU Limoges, France, INSERM, UMR 1248, University of Limoges, F-87025 Limoges, France*

Antoine Tronnet — *LCC-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31077 Toulouse, France*

Justine Bergé — *LCC-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31077 Toulouse, France*

Colin Bonduelle — *LCC-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31077 Toulouse, France;* orcid.org/0000-0002-7213-7861

Céline Deraeve — *LCC-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31077 Toulouse, France*

Geneviève Pratviel — *LCC-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31077 Toulouse, France*

Jean-Luc Stigliani — *LCC-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31077 Toulouse, France*

Luc Paris — *AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Parasitologie Mycologie, 75013 Paris, France*

Dominique Mazier — *CIMI-Paris, Sorbonne Université, 75013 Paris, France*

Sophie Corvaisier — *Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN), Normandie Université, 14032 Caen, France*

Marc Since — *Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN), Normandie Université, 14032 Caen, France*

Aurélie Malzert-Fréon — *Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN), Normandie Université, 14032 Caen, France;* orcid.org/0000-0001-6023-1861

Susan Wyllie — *University of Dundee, School of Life Sciences, Division of Biological Chemistry and Drug Discovery, Dundee DD1 5EH, United Kingdom;* orcid.org/0000-0001-8810-5605

Rachel Milne — *University of Dundee, School of Life Sciences, Division of Biological Chemistry and Drug Discovery, Dundee DD1 5EH, United Kingdom*

Alan H. Fairlamb — *University of Dundee, School of Life Sciences, Division of Biological Chemistry and Drug Discovery, Dundee DD1 5EH, United Kingdom;* orcid.org/0000-0001-5134-0329

Alexis Valentin — *UMR 152 PharmaDev, Université de Toulouse, IRD, UPS, 31077 Toulouse, France*

Bertrand Courtioux — *Université de Limoges, UMR INSERM 1094, Faculté de Pharmacie, 87025 Limoges, France*

Complete contact information is available at: https://pubs.acs.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00566

Author Contributions

[+]J.P. and C.B. contributed equally.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Paul Sabatier University and the Région Occitanie are acknowledged for financial support. A.H.F., S.W., and R.M. are supported by funding from the Wellcome Trust (WT105021). C. Piveteau from Institut Pasteur de Lille, C. Bijani from Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse, and C. Claparols, N. Martins-Froment, V. Bourdon, and E. Leroy from the Institut de Chimie de Toulouse are also acknowledged for their support. We also thank Dr. J.-B. Woillard for the *in vivo* pharmacokinetic analysis, Mr. F.-L. Sauvage for his help with the mass spectrometry analysis, and Dr. Ismail Belfquih for his assistance with the culture of Vero cells and *T. cruzi*.

REFERENCES

(1) Büscher, P.; Cecchi, G.; Jamonneau, V.; Priotto, G. Human african trypanosomiasis. *Lancet* **2017**, *390*, 2397−2405.

(2) Pérez-Molina, J. A.; Molina, I. Chagas disease. *Lancet* **2018**, *391*, 82−94.

(3) Burza, S.; Croft, S. L.; Boelaert, M. Leishmaniasis. *Lancet* **2018**, *392*, 951−970.

(4) World Health Organization. *Neglected Tropical Diseases*. https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/ (accessed November 1, 2019).

(5) Molyneux, D.; Savioli, L.; Engels, D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. *Lancet* **2017**, *389*, 312−325.

(6) Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi). *DNDi R&D Portfolio June 2019*. https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/ (accessed November 1, 2019).

(7) Wyllie, S.; Patterson, S.; Stojanovski, L.; Simeons, F. R. C.; Norval, S.; Kime, R.; Read, K. D.; Fairlamb, A. H. The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 119re1.

(8) Patterson, S.; Fairlamb, A. H. Current and future prospects of nitro-compounds as drugs for trypanosomiasis and leishmaniasis. *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 4454−4475.

(9) Mesu, V. K. B. K.; Kalonji, W. M.; Bardonneau, C.; Mordt, O. V.; Blesson, S.; Simon, F.; Delhomme, S.; Bernhard, S.; Kuziena, W.; Lubaki, J. F.; Vuvu, S. L.; Ngima, P. N.; Mbembo, H. M.; Ilunga, M.; Bonama, A. K.; Heradi, J. A.; Solomo, J. L. L.; Mandula, G.; Badibabi, L. K.; Dama, F. R.; Lukula, P. K.; Tete, D. N.; Lumbala, C.; Scherrer, B.; Strub-Wourgaft, N.; Tarral, A. Oral fexinidazole for late-stage African Trypanosoma brucei gambiense trypanosomiasis: a pivotal multicentre, randomised, non-inferiority trial. *Lancet* **2018**, *391*, 144−154.

(10) Patterson, S.; Wyllie, S.; Norval, S.; Stojanovski, L.; Simeons, F. R. C.; Auer, J. L.; Osuna-Cabello; Read, K. D.; Fairlamb, A. H. The anti-tubercular drug delamanid as a potential oral treatment for visceral leishmaniasis. *eLife* **2016**, *5*, No. e09744.

(11) Ang, C. W.; Jarrad, A. M.; Cooper, M. A.; Blaskovich, M. A. T. Nitroimidazoles: Molecular Fireworks That Combat a Broad Spectrum of Infectious Diseases. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7636−7657.
(12) Patterson, S.; Wyllie, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends Parasitol.* **2014**, *30*, 289−298.
(13) Wyllie, S.; Patterson, S.; Fairlamb, A. H. Assessing the essentiality of leishmania donovani nitroreductase and its role in nitro drug activation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 901−906.
(14) Wyllie, S.; Roberts, A. J.; Norval, S.; Patterson, S.; Foth, B. J.; Berriman, M.; Read, K. D.; Fairlamb, A. H. Activation of bicyclic nitro-drugs by a novel nitroreductase (NTR2) in *Leishmania*. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, No. e1005971.
(15) Hall, B. S.; Bot, C.; Wilkinson, S. R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 13088−13095.
(16) Hall, B. S.; Wilkinson, S. R. Activation of Benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 115−123.
(17) Verhaeghe, P.; Rathelot, P.; Rault, S.; Vanelle, P. Convenient preparation of original vinylic chlorides with antiparasitic potential in quinolone series. *Lett. Org. Chem.* **2006**, *3*, 891−897.
(18) Paloque, L.; Verhaeghe, P.; Casanova, M.; Castera-Ducros, C.; Dumètre, A.; Mbatchi, L.; Hutter, S.; Kraiem-M'Rabet, M.; Laget, M.; Remusat, V.; Rault, S.; Rathelot, P.; Azas, N.; Vanelle, P. Discovery of a new antileishmanial hit in 8-nitroquinoline series. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 75−86.
(19) Kieffer, C.; Cohen, A.; Verhaeghe, P.; Hutter, S.; Castera-Ducros, C.; Laget, M.; Remusat, V.; M'Rabet, M. K.; Rault, S.; Rathelot, P.; Azas, N.; Vanelle, P. Looking for new antileishmanial derivatives in 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one series. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 282−294.
(20) Kieffer, C.; Cohen, A.; Verhaeghe, P.; Paloque, L.; Hutter, S.; Castera-Ducros, C.; Laget, M.; Rault, S.; Valentin, A.; Rathelot, P.; Azas, N.; Vanelle, P. Antileishmanial pharmacomodulation in 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one series. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2377−2386.
(21) Pedron, J.; Boudot, C.; Hutter, S.; Bourgeade-Delmas, S.; Stigliani, J.-L.; Sournia-Saquet, A.; Moreau, A.; Boutet-Robinet, E.; Paloque, L.; Mothes, E.; Laget, M.; Vendier, L.; Pratviel, G.; Wyllie, S.; Fairlamb, A. H.; Azas, N.; Courtioux, B.; Valentin, A.; Verhaeghe, P. Novel 8-nitroquinolin-2(1H)-ones as NTR-bioactivated antikinetoplastid molecules: synthesis, electrochemical and SAR study. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 135−152.
(22) Pedron, J.; Boudot, C.; Bourgeade-Delmas, S.; Sournia-Saquet, A.; Paloque, L.; Rastegari, M.; Abdoulaye, M.; El-Kashef, H.; Bonduelle, C.; Pratviel, G.; Wyllie, S.; Fairlamb, A. H.; Courtioux, B.; Verhaeghe, P.; Valentin, A. Antitrypanosomal pharmacomodulation at position 3 of the 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one scaffold using pallado-catalyzed cross coupling reactions. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2217−2228.
(23) Zaragoza, F.; Stephensen, H.; Peschke, B.; Rimvall, K. 2-(4-alkylpiperazin-1-yl)quinolines as a new class of imidazole-free histamine H_3 receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 306−311.
(24) O'Brien, N. J.; Brzozowski, M.; Wilson, D. J. D.; Deady, L. W.; Abbott, B. M. Synthesis and biological evaluation of substituted 3-anilinoquinolin-2(1H)-ones as PDK1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3781−3790.
(25) Di, L.; Kerns, E. H.; Bezar, I. F.; Petusky, S. L.; Huang, Y. Comparison of blood-brain barrier permeability assays: in situ brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 1980−1991.
(26) Jourdan, J. P.; Since, M.; El Kihel, L.; Lecoutey, C.; Corvaisier, S.; Legay, R.; Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Cresteil, T.; Malzert-Fréon, A.; Rochais, C.; Dallemagne, P. Benzylphenylpyrrolizinones with anti-amyloid and radical scavenging effects, potentially useful in Alzheimer's disease treatment. *ChemMedChem* **2017**, *12*, 913−916.
(27) Van De Waterbeemd, H.; Camenisch, G.; Folkers, G.; Chretien, J. R.; Raevsky, O. A. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *J. Drug Target* **1998**, *6*, 151−165.
(28) Wager, T. T.; Hou, X.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A. Moving beyond rules: the development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 435−449.
(29) Nepali, K.; Lee, H.-Y.; Liou, J.-P. Nitro-Group-Containing Drugs. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 2851−2893.
(30) Rosenkranz, E. J.; McCoy, E. C.; Mermelstein, R.; Rosenkranz, H. S. Evidence for the existence of distinct nitroreductases in Salmonella typhimurium: roles in mutagenesis. *Carcinogenesis* **1982**, *3*, 121−123.
(31) Torreele, E.; Bourdin Trunz, B.; Tweats, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Mazué, G.; Bray, M. A.; Pécoul, B. Fexinidazole - a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2010**, *4*, No. e923.
(32) Westland, J.; Dorman, F. QuEChERS extraction of benzodiazepines in biological matrices. *J. Pharm. Anal.* **2013**, *3*, 509−517.
(33) Pkanalix. *Data Processing and Calculation Rules*. http://pkanalix.lixoft.com/calculation-rules/ (accessed September 15, 2019).
(34) Katsuno, K.; Burrows, J. N.; Duncan, K.; van Huijsduijnen, R. H.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C. E.; Schmatz, D.; Warner, P.; Slingsby, B. T. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing worlds. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2015**, *14*, 751−758.

https://dx.doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00566
ACS Med. Chem. Lett. XXXX, XXX, XXX−XXX

II.2. Nitroimidazopyridines

Les travaux menés sur les dérivés nitroimidazopyridines ont été réalisés au sein du Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire (LPCR) de Marseille sous la direction du Pr P. Vanelle. Ce laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années au développement de molécules hétérocycliques azotés pouvant présenter des propriétés pharmacologiques anti-infectieuses intéressantes (Paloque et al., 2011, 2012; Kieffer et al., 2015). Des travaux ont alors été entrepris sur une pharmacomodulation de dérivés nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine, testés sur des souches de *Leishmania spp*. par le laboratoire de parasitologie de la Faculté de Marseille (UMR VITROME). Les résultats obtenus ont permis de mettre en lumière des caractéristiques essentielles à l'activité des composés, comme la présence d'un atome d'halogène en position 6, la présence d'un groupement nitro en position 3 et d'un groupement phénylsulfonylméthyle en position 2. De plus, la substitution en position 8 de la molécule a semblé prometteuse et a permis de conduire cette équipe à synthétiser un « hit » d'intérêt anti-leishmanien (figure 57) (Castera-Ducros et al., 2013).

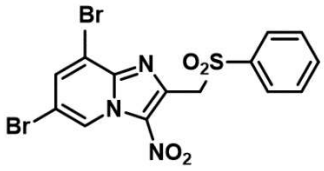


Figure 57. Structure de la molécule hit 6,8-dibromo-3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine

A partir de ce « hit » antileishmanien, l'équipe du LPCR a cherché à étudier l'influence des différents substituants potentiels en position 8 du noyau imidazo[1,2-*a*]pyridine, et cela à partir d'un intermédiaire, la 8-bromo-6-chloro-3-nitro-2-(phnéylsulfonylméthyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine. Trois types de réactions chimiques ont été mises en place afin de synthétiser différentes molécules possédant des groupements variés en position 8 de ce noyau. Les deux premières consistent en des réactions de couplages pallado-catalysés, l'une suivant la méthode de Suzuki-Miyaura, et la seconde suivant la méthode de Sonogashira. La dernière consiste en des réactions de substitution nucléophile sur aromatique (S_NAr) impliquant l'ajout de thiophénols. Ainsi 72 molécules ont pu être synthétisées et ont pu être testées lors d'études *in vitro* et *in vivo* pour devenir de futurs candidats médicaments (figure 58) (Fersing, 2018).

BY-NC-ND

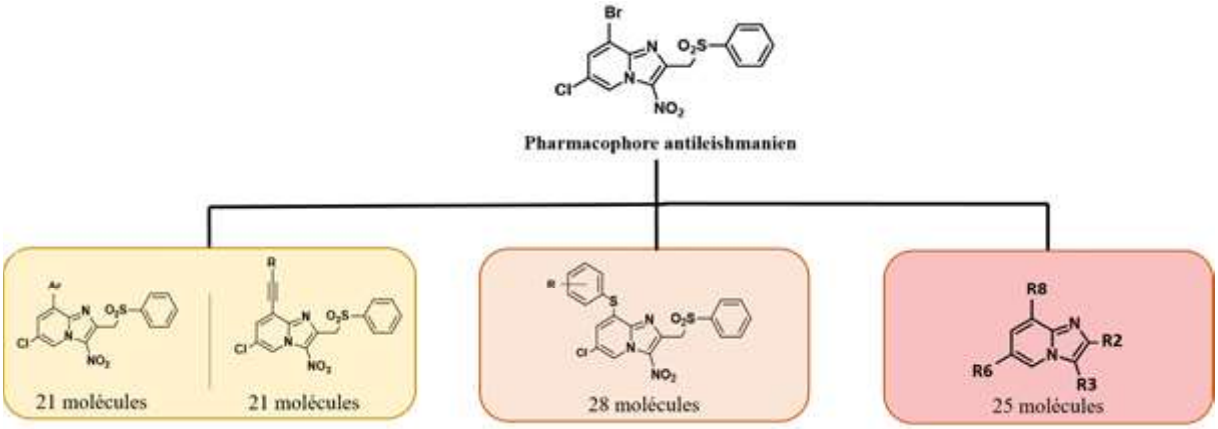


Figure 58. Plan des synthèses de pharmacochimie à partir de la 8-bromo-6-chloro-3-nitro-2-(phénylsulfonylméthyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine

II.2.1. Etude des 42 molécules dérivées de la 8-bromo-6-chloro-3-nitro-2-(phénylsulfonylméthyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (partie 1)

La première synthèse chimique suivant la réaction de Suzuki-Miyaura a permis d'obtenir 21 molécules. Cette réaction consiste à établir une liaison entre 2 carbones sp^2 en suivant un couplage pallado-catalysé. Dans notre cas, cette liaison s'est faite en position 8.

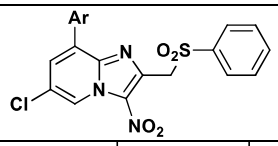
II.2.1.1. Tests *in vitro* (réaction de Suzuki-Miyaura)

a) Tests de cytotoxicité

Ces 21 molécules synthétisées ont subi dans un premier temps un criblage *in vitro* permettant de mesurer leur CC_{50} à l'encontre de la souche cellulaire HepG2. Ces tests suivent le même protocole qui celui utilisé pour les nitroquinoléinones, à savoir la mise en contact de concentrations de molécules avec des cellules HepG2 pour évaluer le caractère cytotoxique de ces dernières. Ce criblage permet de pouvoir directement éliminer les composés les plus toxiques mais également d'éliminer les composés présentant une trop faible hydrosolubilité, n'ayant donc aucun intérêt dans la poursuite des tests.

Les résultats obtenus avec les 21 composés sont les suivants (tableau 25).

BY-NC-ND



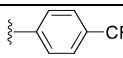
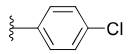
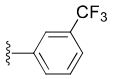
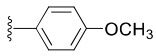
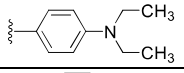
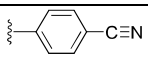
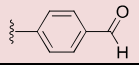
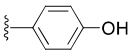
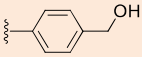
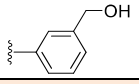
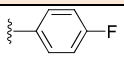
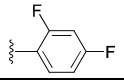
N°	Structures	CC_{50} HepG2 (µM)	N°	Structures	CC_{50} HepG2 (µM)
5		> 15,6	**19**		> 3,9
6		> 3,9	**20**		> 12,5
7		> 3,9	**21**		**22,7**
8		> 15,6	**22**		**> 31,3**
9		> 3,9	**23**		**> 50**
10		**> 31,2**	**24**		> 3,9
11		> 12,5	**25**		> 3,9
12		13,1	**Réf. 1**	**Hit**	**> 31**
13		**> 25**	**Réf. 2**	Doxorubicine	0,2
14		**88**	**Réf. 3**	Miltéfosine	50,3
15		> 15,6	**Réf. 4**	Amphotéricine B	8,8
16		> 12,5	**Réf. 5**	Fexinidazole	> 250
17		> 3,9	**Réf. 6**	Eflornithine	> 100
18		> 7,8	**Réf. 7**	Suramine	> 100

Tableau 25. Résultats de l'évaluation de la cytotoxicité des 21 molécules issues de la réaction de Suzuki-Miyaura
(Thèse de Cyril Fersing, 2018)

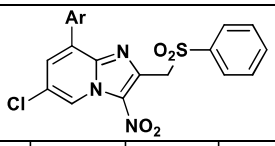
Parmi les 21 molécules testées, 8 composés (6, 7, 9, 17, 18, 19, 24, 25) ont présenté une trop forte lipophilie, ne permettant pas la réalisation des tests de CC_{50} au-delà de 8 µM et rendant donc impossible la poursuite des analyses. Ces 8 composés ont donc été abandonnés. Sept autres composés (5, 8, 11, 12, 15, 16, 20) ont présenté une solubilité peu encourageante avec une CC_{50} proche de 15 µM. Seulement 3 molécules (12, la 14 et la 21) ont une CC_{50} fixe avec une valeur de 13,1 µM, de 88 µM et de 22,7 µM respectivement. Trois composés le 10, 22 et 23 ont présenté des CC_{50} plus intéressantes que le hit initial avec des valeurs > 31,2 µM, > 31,3 µM et > 50 µM respectivement, tout comme la molécule 14 avec une valeur de 88 µM.

BY-NC-ND

b) Mesure de l'activité antiparasitaire

A la suite des tests de cytotoxicité, 13 molécules (5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 21, 22 et 23) ont pu poursuivre les tests de détermination des CI_{50} sur des souches de *L. donovani* et *L. infantum* à Marseille et Toulouse. Dans le même temps, j'ai testé ces 13 composés sur la souche de *T.b.b.* AnTat 1.9. La détermination de la CI_{50} de ces composés a suivi le même protocole que précédemment (Partie 1b tests *in vitro* des nitroquinoléinones) à savoir l'utilisation de la rézasurine (Fisher, France) comme révélateur coloré en fluorescence.

Les résultats obtenus sont les suivants (tableau 26).



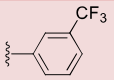
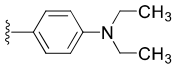
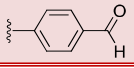
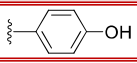
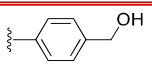
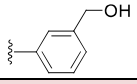
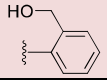
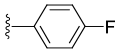
N°	Structures	CI_{50} *T.b.b.* AnTat 1.9 (µM)	SI	N°	Structures	CI_{50} *T.b.b.* AnTat 1.9 (µM)	SI
5		0,61	> 25,6	**20**		**0,04**	**> 313**
8		0,43	> 36	**21**		**0,07**	**324**
10		0,08	> 390	**22**		0,23	> 136
11		0,41	> 31	**23**		**0,25**	**> 200**
12		0,09	146	**Réf. 1**	**Hit**	**2,9**	**> 10,7**
13		**0,15**	**> 167**	**Réf. 5**	Fexinidazole	0,56	> 446,4
14		**0,16**	**550**	**Réf. 6**	Eflornithine	13,59	7,4
15		0,31	> 50	**Réf. 7**	Suramine	0,03	> 3333
16		0,20	> 63				

Tableau 26. Résultats de l'évaluation de l'activité trypanocide des 13 molécules

Les 13 molécules testées *in vitro* à l'encontre de *T.b.b.* sont très efficaces avec des CI_{50} inférieures à 1 µM. Quatre molécules encadrées en orange sont les plus actives avec des CI_{50} comprises entre 0,04 et 0,09 µM. Toutefois les plus prometteuses sont les molécules en rouge car elles présentent un IS supérieur à 300 pour les molécules 10, 20 et 21 et supérieur à 500 pour la molécule 14. Elles sont donc meilleures que le « hit » initial (en bleu) et plus efficaces que le fexinidazole.

BY-NC-ND

Ces molécules étant des nitroaromatiques, il a donc été évident de les tester vis-à-vis de souches surexprimant la NTR1 spécifique des trypanosomes. Ainsi, l'équipe de Dundee a testé les 2 plus prometteuses de ces 13 molécules à savoir la molécule 14 et la molécule 20 sur une souche sauvage de *T.b.b.* bloodstream form 'single marker' S427 (T7RPOL TETR NEO), qui a également été modifiée génétiquement pour surexprimer la NTR1.

Les résultats sont les suivants (tableau 27).

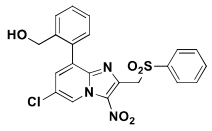
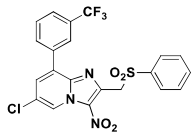
		***T. brucei* trypomastigote : CI_{50} [µM]**	
		Souche sauvage	Souche NTR1^{OE}
14		0,3918	**0,1871**
20		0,0915	**0,0395**
Réf.	Nifurtimox	**1,87**	**0,6**

Tableau 27. Tests d'activité des molécules 14 et 20 vis-à-vis d'une souche de *T.b.b.* sauvage et une surexprimant la NTR1

Les deux molécules voient leur activité augmentée d'un facteur 2 avec la souche surexprimant la NTR1, signifiant ainsi que les molécules sont bioactivées par cette nitroréductase. De plus, les molécules 14 et 20 présentent des CI_{50} beaucoup plus intéressantes que le nifurtimox.

c) Etude de la mutagénicité

Une seule molécule, la 23 a été évaluée par un test d'Ames. En effet, elle présente une faible cytotoxicité, une bonne activité leishmanicide et trypanocide. Le protocole suivi est le même que décrit précédemment (Partie 1c tests *in vitro* des nitroquinoléinones) et utilise 4 souches de *Salmonella typhimurium* mutées pour l'histidine, mélangées à du S9mix permettant de stimuler le métabolisme et d'étudier le caractère mutagène de certains produits. Les résultats obtenus sur cette molécule sont les suivants (tableau 28).

BY-NC-ND

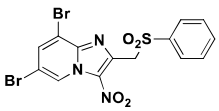
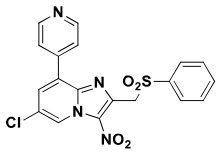
		 **Hit**		 **(23)**		**Benzo[*a*]pyrène** **Référence**	
		2,5 mM	25 mM	2,5 mM	25 mM	2,5 mM	25 mM
Souches	TA97a + S9mix	+	+	+	+	+	+
	TA98 + S9mix	-	-	-	*Toxique*	+	+
	TA100 + S9mix	-	-	+	+	+	+
	TA102 + S9mix	-	-	-	-	+	+

Tableau 28. Résultats du test d'Ames à l'encontre de la molécule 23

Nous constatons que la molécule 23 présente une mutagénicité pour 3 souches de salmonelle alors que le hit initial ne présente une mutagénicité que pour la souche TA97. Il semble donc que la présence d'un hétérocycle en position 8 soit défavorable pour la molécule, augmentant son risque de toxicité. Toutefois, ce test est à nuancer avec la présence des nitroréductases de salmonelle répondant positivement aux nitroaromatiques.

L'ensemble des résultats, obtenus à la suite de la réaction de Suzuki-Miyaura, a permis de montrer que la présence de groupement aryle ou hétéroaryle en position 8 augmente l'activité trypanocide sans pour autant augmenter la cytotoxicité. Cependant la solubilité peut être altérée dans certains cas.

Ce travail a pu être valorisée par la rédaction d'un article en 2018 intitulé « 8-Aryl-6-chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-a] pyridines as potent antitrypanosomatid molecules bioactivated by type 1 nitroreductases » (Fersing et al., 2018).

BY-NC-ND

8-Aryl-6-chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*] pyridines as potent antitrypanosomatid molecules bioactivated by type 1 nitroreductases

Cyril Fersing*, **Clotilde Boudot***, Julien Pedron, Sébastien Hutter, Nicolas Primas, Caroline Castera-Ducros, Sandra Bourgeade-Delmas, Alix Sournia-Saquet, Alain Moreau, Anita Cohen, Jean-Luc Stigliani, Geneviève Pratviel, Maxime D. Crozet, Susan Wyllie, Alan Fairlamb, Alexis Valentin, Pascal Rathelot, Nadine Azas, Bertrand Courtioux, Pierre Verhaghe et Patrice Vanelle

* Co-premier auteur

Publié en septembre 2018

Résumé :

Sur la base d'un dérivé antileishmanien précédemment décrit, le 6,8-dibromo-3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine, une réaction de couplage Suzuki-Miyaura en position 8 du composé mère a été étudiée et optimisée à partir d'un substrat 8-bromo-6-chloro-3-nitroimidazo[1,2-a]pyridine. Vingt et un dérivés originaux ont été préparés, puis analysés *in vitro* pour déterminer leur activité contre les amastigotes axéniques de *L. infantum* et les trypomastigotes de *T. brucei brucei.* Leur cytotoxicité a été évaluée sur la lignée cellulaire humaine HepG2. Ainsi, 7 composés à succès antileishmanien ont été identifiés, affichant des valeurs de CI_{50} comprises entre 1,1 et 3 µM. Les composés 13 et 23, les 2 molécules les plus sélectives (SI >18 ou >17) ont également été testées sur les stades promastigotes et amastigotes intramacrophagiques de *L. donovani*. Les deux molécules présentent une bonne activité (CI_{50} = 1,2-1,3 µM) sur le stade promastigote mais seule la molécule 23, portant un substituant 4-pyridinyle en position 8, était active sur le stade amastigote intracellulaire, avec une bonne valeur CI_{50} (2,3 µM), légèrement inférieure à celle de miltefosine (CI_{50} = 4,3 µM). Le screening antiparasitaire a également révélé 8 composés antitrypanosomales, dont le 14 et le 20, 2 molécules très actives (CI_{50} = 0,04-0,16 µM) et sélectives (SI >313 à 550) contre *T. brucei brucei*, en comparaison avec les molécules de référence : la suramine et l'éflornithine (CI_{50} = 0,03 et 13,3 µM respectivement) ou le fexinidazole (CI_{50} = 0,6 et SI > 333). L'introduction d'un groupement aryle en position 8 du composé mèrearyl a considérablement augmenté l'activité antitrypanosomale du pharmacophore. La bioactivation des molécules 13, 14, 20 et 23 des antikinéoplastidés a été évaluée par des nitroréductases parasitaires (soit chez *L. donovani*, soit chez *T. brucei brucei*), en utilisant des souches de parasites génétiquement modifiés qui surexpriment les NTR : toutes ces molécules sont des substrats des nitroréductases de type 1 (NTR1), comme celles qui sont responsables de la bio-activation du fexinidazole. Les potentiels rédox mesurés pour ces 4 composés ont été supérieurs à ceux du fexinidazole (-0,83 V), allant de -0,70 à -0,64 V.

BY-NC-ND

European Journal of Medicinal Chemistry 157 (2018) 115–126

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ejmech

Research paper

8-Aryl-6-chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridines as potent antitrypanosomatid molecules bioactivated by type 1 nitroreductases

Cyril Fersing [a, 1], Clotilde Boudot [b, 1], Julien Pedron [c], Sébastien Hutter [d], Nicolas Primas [a], Caroline Castera-Ducros [a], Sandra Bourgeade-Delmas [e], Alix Sournia-Saquet [c], Alain Moreau [c], Anita Cohen [d], Jean-Luc Stigliani [c], Geneviève Pratviel [c], Maxime D. Crozet [a], Susan Wyllie [f], Alan Fairlamb [f], Alexis Valentin [e], Pascal Rathelot [a], Nadine Azas [d], Bertrand Courtioux [b], Pierre Verhaeghe [c, *], Patrice Vanelle [a, **]

[a] *Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, FAC PHARM, 27 Boulevard Jean Moulin, CS30064, 13385, Marseille Cedex 05, France*
[b] *Université de Limoges, UMR Inserm 1094, Neuroépidémiologie Tropicale, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Dr Marcland, 87025, Limoges, France*
[c] *LCC-CNRS Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France*
[d] *IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Univ, UMR VITROME, 19-21 Boulevard Jean Moulin, 13005, Marseille, France*
[e] *UMR 152 PHARMA-DEV, Université de Toulouse, IRD, UPS, Toulouse, France*
[f] *University of Dundee, School of Life Sciences, Division of Biological Chemistry and Drug Discovery, Dow Street, Dundee, DD1 5EH, Scotland, United Kingdom*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 5 May 2018
Received in revised form
26 July 2018
Accepted 28 July 2018
Available online 1 August 2018

Keywords:
Imidazo[1,2-*a*]pyridine
Nitroheterocycles
Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction
Nitroreductases
Leishmania
Trypanosoma
In vitro activity
HepG2 cytotoxicity
SARs
Redox potentials

ABSTRACT

Based on a previously identified antileishmanial 6,8-dibromo-3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine derivative, a Suzuki-Miyaura coupling reaction at position 8 of the scaffold was studied and optimized from a 8-bromo-6-chloro-3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine substrate. Twenty-one original derivatives were prepared, screened *in vitro* for activity against *L. infantum* axenic amastigotes and *T. brucei brucei* trypomastigotes and evaluated for their cytotoxicity on the HepG2 human cell line. Thus, 7 antileishmanial hit compounds were identified, displaying IC_{50} values in the 1.1–3 μM range. Compounds **13** and **23**, the 2 most selective molecules (SI = >18 or >17) were additionally tested on both the promastigote and intramacrophage amastigote stages of *L. donovani*. The two molecules presented a good activity (IC_{50} = 1.2–1.3 μM) on the promastigote stage but only molecule **23**, bearing a 4-pyridinyl substituent at position 8, was active on the intracellular amastigote stage, with a good IC_{50} value (2.3 μM), slightly lower than the one of miltefosine (IC_{50} = 4.3 μM). The antiparasitic screening also revealed 8 antitrypanosomal hit compounds, including **14** and **20**, 2 very active (IC_{50} = 0.04–0.16 μM) and selective (SI = >313 to 550) molecules toward *T. brucei brucei*, in comparison with drug-candidate fexinidazole (IC_{50} = 0.6 & SI > 333) or reference drugs suramin and eflornithine (respective IC_{50} = 0.03 and 13.3 μM). Introducing an aryl moiety at position 8 of the scaffold quite significantly increased the antitrypanosomal activity of the pharmacophore. Antikinetoplastid molecules **13**, **14**, **20** and **23** were assessed for bioactivation by parasitic nitroreductases (either in *L. donovani* or in *T. brucei brucei*), using genetically modified parasite strains that over-express NTRs: all these molecules are substrates of type 1 nitroreductases (NTR1), such as those that are responsible for the bioactivation of fexinidazole. Reduction potentials measured for these 4 hit compounds were higher than that of fexinidazole (−0.83 V), ranging from −0.70 to −0.64 V.
Crown Copyright © 2018 Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Trypanosomatids are a group of kinetoplastid parasites infecting mammalians. Among trypanosomatids, *Leishmania* and

* Corresponding author.
** Corresponding author.
E-mail addresses: pierre.verhaeghe@univ-tlse3.fr (P. Verhaeghe), patrice.vanelle@univ-amu.fr (P. Vanelle).
[1] Co-first authors.

https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.064
0223-5234/Crown Copyright © 2018 Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Trypanosoma are the two main genera responsible for human infections that mainly occur in the intertropical region. Although these parasitic infections are lethal if untreated, there are very few efficacious, safe and affordable drugs available for treating infected patients with low income, living in developing countries. For this reason, the WHO classified trypanosomatid parasites among the infectious agents causing "neglected tropical diseases" [1,2].

The *Leishmania* parasites, mainly *L. donovani* and *L. infantum*, are responsible for leishmaniasis. Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe clinical form with about 300.000 new cases and 20.000 annual deaths annually, according to the WHO [3]. Briefly, the parasite is transmitted by the bite of a *phlebotominae* sandfly, as a flagellated motile promastigote which disseminates into the organism and penetrates into macrophages where it transforms into an amastigote stage, resistant to phagocytosis and multiplies, causing organ and tissue damages, leading to death [4].

In the *Trypanosoma* genus, *T. brucei* (*gambiense* or *rhodesiense*) is one of the species responsible for human infections. It causes Human African Trypanosomiasis (HAT), also called sleeping sickness, affecting about 3.000 people annually, mainly in central Africa [5]. This parasitic disease occurs after the bite of a tsetse fly and develops in two clinical stages: a phase 1 peripheral haemolymphatic stage followed by a meningoencephalitic phase 2 in which the parasite crosses the blood-brain barrier and invades the central nervous system, leading to death [6].

There are very few therapeutic options for treating VL in endemic areas: Antimony V derivatives are facing high resistance levels and are toxic molecules, pentamidine is also quite toxic and must be administered IV, amphotericin B is very active but also highly nephrotoxic, must be administered IV and is very expensive as a liposomal formulation and miltefosine, the only orally available drug, is teratogenic [7]. The available treatments against HAT carry similar disadvantages: pentamidine, melarsoprol, an arsenic derivative that is highly toxic, suramin which is only active on the phase 1 of the disease, and the eflornithine/nifurtimox combination for treating phase 2 [8,9].

Looking at the molecules studied as antileishmanial drug candidates [9,10], it must be noted that there is currently no novel chemical entity undergoing clinical trial against VL, at any stage [11], which is quite worrying. Regarding the antitrypanosomal pipeline, only acoziborole, a bore-containing molecule [9,11] and fexinidazole, a nitroaromatic compound [9,11,12], are new chemical entities in clinical development. At a pre-clinical stage of development, delamanid (a marketed antituberculosis treatment) is another nitroaromatic molecule displaying promising potential as an oral antileishmanial agent [13]. Thus, after several decades of abandonment, nitroaromatic derivatives are re-emerging as key molecules to fight against critical infectious diseases, displaying original mechanisms of action. As an antitrypanosomatid molecule, fexinidazole was first studied as an antileishmanial candidate [14]. It is a 5-nitroimidazole prodrug including a thioether group that is oxidized into an active sulfone metabolite (Fig. 1). Fexinidazole did not show sufficient clinical efficacy when used orally as a single therapy for the treatment of VL in a phase 2 clinical trial. Nevertheless, fexinidazole demonstrated good efficacy in pre-clinical studies against both peripheral [15] and central [16] stages of HAT and has recently completed a phase 3 clinical trial against HAT [12].

The antitrypanosomatid mechanism of action of fexinidazole depends on its bioactivation by parasite enzymes called nitroreductases (NTRs). Including a flavin co-factor, these enzymes catalyze the 1- or 2-electron reduction of nitroaromatic derivatives into electrophilic nitroso and hydroxylamine metabolites that are cytotoxic, forming covalent adducts with nucleophilic entities such as cysteine residues or DNA bases [17]. Interestingly, mammalian

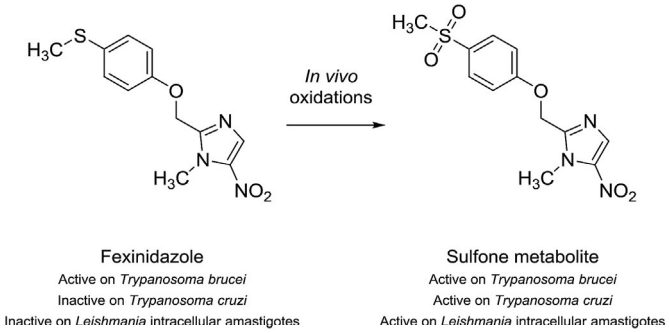
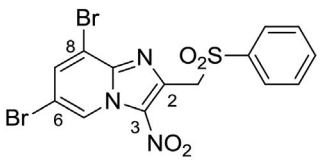


Fig. 1. Structure of drug candidate fexinidazole and its active sulfone metabolite.

cells do not possess NTRs, allowing very good antiparasitic selectivity for nitroaromatic compounds. In *Leishmania*, two nitroreductases have been characterized: an essential type 1 mitochondrial NTR1, catalyzing the 2-electron reduction of nitroaromatics [18,19] and, recently, a type 2 NTR2, catalyzing the 1-electron reduction of nitroaromatics [20]. In *Trypanosoma*, only one NTR1 was characterized [21]. Unfortunately, apart from their primary sequence, there is no structural data available for any of these parasitic NTRs. They have never been crystallized nor co-crystallized, which limits the rational medicinal chemistry approaches to the design of novel substrates of NTRs, as anti-trypanosomatid candidates.

The imidazo[1,2-*a*]pyridine ring is a well-known scaffold in pharmaceutical chemistry that has been extensively studied since the discovery of the hypnotic drug zolpidem (Ambien®, Stilnox®). Some imidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives were reported as *in vitro* antileishmanial molecules [22] and our group previously reported the synthesis and biological evaluation of 3-nitroimidazo[1,2-*a*] pyridines, active on both promastigote and intramacrophage amastigote stages of *L. donovani* [23]. Thus, a hit compound was identified (Fig. 2), bearing 2 bromine atoms at positions 6 and 8, a nitro group at position 3 and a phenylsulfonylmethyl substituent at position 2 of the imidazo[1,2-*a*]pyridine ring. In this work, the nitro group appeared to be necessary for providing activity and the introduction of a bromine atom at position 8 of the scaffold appeared to increase antileishmanial activity [23].

From these encouraging preliminary results and based on a strategy that we previously applied to the antileishmanial pharmacomodulation of bicyclic nitroaromatic molecules using the Suzuki-Miyaura reaction [24], we decided to study the effect of introducing aryl moieties at position 8 of the 3-nitroimidazo[1,2-*a*] pyridine scaffold. Moreover, the new synthesized derivatives were not only studied for their antileishmanial activity, as done for the initial hit molecule, but also regarding their antitrypanosomal



Initial antileishmanial hit molecule

IC_{50} *L. donovani* promastigotes = 1.8 μM
IC_{50} *L. donovani* intramacrophage amastigotes = 5.5 μM
CC_{50} HepG2 > 31 μM / CC_{50} THP1 > 25 μM

Fig. 2. Structure, *in vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of the previously identified hit molecule 6,8-dibromo-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*] pyridine.

activity, to get a broader idea of the antiparasitic potential of the corresponding pharmacophore.

2. Results and discussion

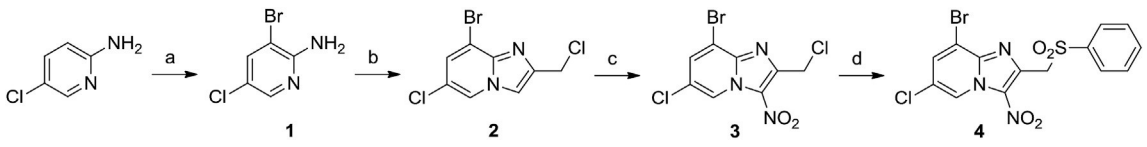
Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions at position 8 of the imidazo[1,2-*a*]pyridine ring were already reported [25]. However, when this ring is substituted by two bromine atoms at positions 6 and 8, the Suzuki-Miyaura coupling takes place at both positions [26]. To avoid this double coupling reaction and favor the selective functionalization at position 8 while maintaining a halogen atom at position 6 (to preserve the antiparasitic pharmacophore), a new substrate was prepared (Scheme 1). Adopting a previously reported synthesis strategy [27,28], 2-amino-5-chloropyridine was reacted with *N*-bromosuccinimide to afford 2-amino-3-bromo-5-chloropyridine **1** which was cyclized into the corresponding imidazo[1,2-*a*]pyridine derivative **2** by reaction with 1,3-dichloroacetone. The nitration of molecule **2**, in classical conditions, led to compound **3** which was engaged into a S_N2 reaction with the sodium salt of benzenesulfinic acid to form molecule **4**. Thus, an original substrate was prepared to conduct an antiparasitic pharmacomodulation study at position 8 *via* palladium-catalyzed coupling reactions.

Next, the Suzuki-Miyaura coupling reaction between **4** and phenylboronic acid was studied by varying several parameters such as nature and amount of catalyst, nature and amount of base, nature of solvent, reaction temperature and time, seeking an efficient operating procedure (Table 1). The initial conditions were inspired from a previously reported protocol involving 1.3 equiv. of phenylboronic acid, 10 mol% $Pd(PPh_3)_4$ and 3 equiv. of Na_2CO_3 in sealed tubes, under microwave (MW) heating [29]. The first studied parameter was the nature of the solvent (entries 1-10). By testing dioxane and dimethoxyethane (DME), it was rapidly noted that the total conversion of the substrate required to engage 5 equiv. of Na_2CO_3 (entries 3 and 4). Neither tetrahydrofuran (THF) nor water (or water/organic solvent mixtures) led to the same reaction yield as DME (49%, entry 4). Then, several bases were studied (entries 11-16) and the best result was obtained with K_2CO_3 (64%, entry 16). The use of three other Pd-containing catalysts (entries 17-19) did not show any improvement in reaction yield. When comparing entry 16 (best result) to conventional heating (entry 20) or to microwave heating at 95 °C (entry 21), it appeared that, with DME, the use of MW was favourable but increasing the reaction temperature was not. Finally, DME was replaced by THF and a very efficient procedure (90% yield) was achieved by heating at 120 °C in a sealed tube under MW for only 1 h (entry 25). In these efficient conditions, decreasing the amount of catalyst to 0.05 equiv. led to a poor reaction yield (36%, entry 26). To validate the operating conditions determined with phenylboronic acid, 2 other phenylboronic acid derivatives were engaged in the same reaction (entries 27-28), leading to comparable yields (84 and 87%) after 2 h.

As presented in Scheme 2, after optimizing the operating procedure, the reaction was extended to 20 other aryl- or heteroarylboronic acids, to synthesize a small library of novel derivatives bearing various aryl groups (substituted phenyl, thiophene, furan or pyridine) at position 8 of the imidazopyridine scaffold. The reaction yields varied from 90% (phenylboronic acid) to 41% (2-CF_3-phenylboronic acid) and were generally lower when using pyridinylboronic (51–53%) or furanylboronic (53%) acids. The X-ray structures of substrate **4** and coupling product **23** are presented in Fig. 3.

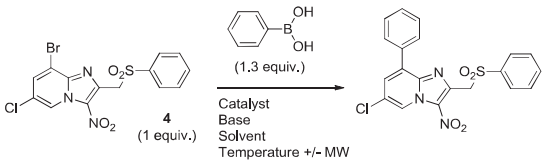
All synthesized compounds were tested *in vitro* for their cytotoxicity on the HepG2 human cell line and compared to a cytotoxic reference drug: doxorubicin (Table 2). Out of the 21 tested compounds, 8 molecules (**6**, **7**, **9**, **17**, **18**, **19**, **24** and **25**) could not be evaluated properly because of a lack of solubility in the culture medium. Thus, in comparison with the initial 8-brominated hit-compound (cLogP = 3.4), solubility in the culture medium was improved only when introducing a 4-pyridinyl or a 2-(hydroxymethyl)phenyl substituent at position 8 of the scaffold. Regarding the link between solubility in the aqueous culture medium and cLogP values in the studied series, it can be noted that all poorly soluble compounds (apart **25**) were the ones displaying cLogP values between 3.9 and 5.0 whereas the 2 most soluble compounds (**14** and **23**) were the ones displaying cLogP values of 3.4 and 2.9, respectively. Compound **12** was the most cytotoxic (CC_{50} = 13 μM), whereas compound **14** was the least cytotoxic (CC_{50} = 88 μM). Then, 13 molecules were screened *in vitro* for their activity against *L. infantum* axenic amastigotes and compared to 3 reference drugs (or drug candidate): amphotericin B, miltefosine and fexinidazole (Table 2). Seven molecules (**5**, **13**, **15**, **20**, **21**, **22**, **23**) appeared as new antileishmanial hit compounds by displaying good IC_{50} values (1.1–3 μM), close to the ones of miltefosine (0.8 μM) and fexinidazole (3.4 μM), together with selectivity index values above 10. Regarding antitrypanosomal activity, molecules were screened on the trypomastigote stage of *T. brucei brucei* and compared to 3 antitrypanosomal drugs (or drug candidate): eflornithine, suramin and fexinidazole (Table 2). Eight molecules (**10**, **12**, **13**, **14**, **20**, **21**, **22**, **23**) were considered as good antitrypanosomal hit compounds, presenting low IC_{50} values (0.04–0.25 μM), in comparison with all reference drugs, associated to high selectivity index values, ranging from >136 to 550. With respect to the initial hit compound (IC_{50} = 2.9 μM), it is important to note that introducing a phenyl or a pyridinyl group at position 8 of the pharmacophore strongly increased the antitrypanosomal activity. By combining all parameters, 5 molecules bearing a 3-(hydroxymethyl)phenyl (**13**), a CF_3-substituted phenyl (**20**, **21**) or pyridinyl (**22**, **23**) moiety at position 8 of the imidazo[1,2-*a*]pyridine ring, were the ones displaying a global antikinetoplastid profile.

To deeper evaluate the antileishmanial potential of molecules **13** and **23** (molecules with suitable aqueous solubility, low cytotoxicity, good activity and highest selectivity indices), an *in vitro* evaluation toward both the promastigote and the intramacrophage amastigote stage of *L. donovani* was carried out, after evaluating their cytotoxicity on the THP1 macrophage cell line (Table 3). The results showed that molecule **13**, containing a 3-(hydroxymethyl) phenyl moiety, was active on the promastigote stage but was not on the intramacrophage amastigote one whereas molecule **23**, presenting a 4-pyridinyl moiety, was active on both stages. Considering the key activity toward the intramacrophage amastigote



Scheme 1. Synthesis of substrate **4**: a) NBS, acetonitrile, 80 °C, 1 h, 71%; b) 1,3-dichloroacetone, EtOH, 80 °C, 96 h, 60%; c) HNO_3, H_2SO_4, 0 °C→RT, 1 h, 60%; d) Sodium benzenesulfinate, DMSO, RT, 3 h, 80%.

Table 1
Optimization of the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction between substrate **4** and phenylboronic acid..

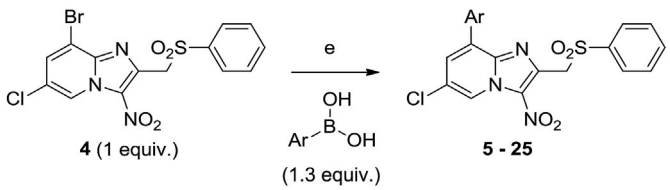


Entry	Reactant (1.3 equiv.)	Solvent	Base	Catalyst	Temp (°C)	Time (h)	Yield[a] (%)
1	Ph-B(OH)$_2$	Dioxane	Na_2CO_3, 3 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	110	24	-[b]
2	Ph-B(OH)$_2$	DME	Na_2CO_3, 3 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	85, MW	2	-[b]
3	Ph-B(OH)$_2$	Dioxane	Na_2CO_3, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	110	24	47
4	Ph-B(OH)$_2$	DME	Na_2CO_3, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	85, MW	2	49
5	Ph-B(OH)$_2$	THF	Na_2CO_3, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	70, MW	3	-[b]
6	Ph-B(OH)$_2$	Water	Na_2CO_3, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	100	24	-[b]
7	Ph-B(OH)$_2$	Water + TBAB	Na_2CO_3, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	100, MW	3	-[b]
8	Ph-B(OH)$_2$	Water/EtOH (8:2)	Na_2CO_3, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	90, MW	3	-[b]
9	Ph-B(OH)$_2$	Water/EtOH (5:5)	Na_2CO_3, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	90, MW	3	40
10	Ph-B(OH)$_2$	DME/Water (9:1)	Na_2CO_3, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	85, MW	3	-[b]
11	Ph-B(OH)$_2$	DME	Cs_2CO_3, 3 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	85, MW	1.5	25
12	Ph-B(OH)$_2$	DME	K_3PO_4, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	85, MW	3	20
13	Ph-B(OH)$_2$	DME	CsF, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	85, MW	3	-[b]
14	Ph-B(OH)$_2$	DME	K_2CO_3, 3 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	85, MW	3	-[b]
15	Ph-B(OH)$_2$	DME	K_2CO_3, 4 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	85, MW	3	-[b]
16	Ph-B(OH)$_2$	DME	K_2CO_3, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	85, MW	3	64
17	Ph-B(OH)$_2$	DME	K_2CO_3, 5 equiv.	Pd(dppf)Cl$_2$; 0.1 equiv.	85, MW	3	53
18	Ph-B(OH)$_2$	DME	K_2CO_3, 5 equiv.	PdCl$_2$(PPh$_3$)$_2$; 0.1 equiv.	85, MW	3	51
19	Ph-B(OH)$_2$	DME	K_2CO_3, 5 equiv.	Pd(OAc)$_2$; 0.1 equiv.	85, MW	3	58
20	Ph-B(OH)$_2$	DME	K_2CO_3, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	85	6	49
21	Ph-B(OH)$_2$	DME	K_2CO_3, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	95, MW	2	58
22	Ph-B(OH)$_2$	THF	K_2CO_3, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	70	36	73
23	Ph-B(OH)$_2$	THF	K_2CO_3, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	70, MW	3	-[b]
24	Ph-B(OH)$_2$	THF	K_2CO_3, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.	90, MW	5	90
25	**Ph-B(OH)$_2$**	**THF**	**K_2CO_3, 5 equiv.**	**Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.**	**120, MW**	**1**	**90**
26	Ph-B(OH)$_2$	THF	K_2CO_3, 5 equiv.	Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.05 equiv.	120, MW	1	36
27	*4-CH$_3$O-Ph- B(OH)$_2$*	*THF*	*K_2CO_3, 5 equiv.*	*Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.*	*120, MW*	*2*	***84***
28	*4-CF$_3$-Ph-B(OH)$_2$*	*THF*	*K_2CO_3, 5 equiv.*	*Pd(PPh$_3$)$_4$; 0.1 equiv.*	*120, MW*	*1*	***87***

In bold: Best reaction conditions.
[a] The reaction yield was calculated form the product isolated after purification by chromatography column.
[b] Only partial conversion of starting material was observed on TLC.

stage, molecule **23** was not only more active ($IC_{50} = 2.3$ μM) than the initial hit compound ($IC_{50} = 5.5$ μM), but was also slightly more active and selective (SI > 22) than miltefosine ($IC_{50} = 4.3$ μM, SI = 20) and as selective as amphotericin B (SI = 22). Neverthless, the aqueous solubility of hit molecule **23** remains to improve. Fexinidazole was not active *in vitro* toward the intramacrophage amastigote stage of *L. donovani*; only its sulfone metabolite is able to display intracellular activity [14–16].

To investigate the antiparasitic mechanism of action of these new nitrated molecules, we hypothesized that they could be substrates of kinetoplastid nitroreductases. This hypothesis was tested by comparing the IC_{50} values measured on wild-type parasite strains with the ones measured on recombinant parasite strains



Scheme 2. General procedure for the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction between imidazo[1,2-*a*]pyridine derivative **4** and various aryl- or heteroarylboronic acids using the optimized protocol: e) 0.1 equiv. of Pd(PPh$_3$)$_4$, 5 equiv. of K_2CO_3, THF in sealed tube, 120 °C, MW, 30 min to 2 h, 41%–90% yield.

overexpressing a nitroreductase (Table 4). Thus, the activities of molecules **13** and **23** were determined in parallel on a *L. donovani* wild-type strain (promastigote stage) and on two *L. donovani* strains overexpressing either NTR1 [19] or NTR2 [20]. As noted with the initial hit molecule, compounds **13** and **23** are selectively bioactivated by *L. donovani* NTR1 as their IC_{50} values are 20–40 times lower on the NTR1 overexpressing strain than on the wild type one. The same approach was followed with compounds **14** and **20**. Their activities toward a wild type strain of *T. brucei brucei* (trypomastigote stage) and a recombinant strain overexpressing NTR1 [21] were compared (Table 4). Like with nifurtimox, used as a reference drug, the tested molecules were more active (two-fold increase in activity) on the strain overexpressing NTR1. Interestingly, these molecules, especially compound **20**, were much more active than nifurtimox toward *T. brucei brucei*. It can then be concluded that molecules **13**, **14**, **20** and **23** are novel antikinetoplastid nitroaromatic compounds that are bioactivated by type 1 nitroreductases (NTR1), the same enzymes as the ones involved in the mechanism of action of fexinidazole by generating cytotoxic reduction metabolites [14].

Finally, an electrochemical study was done by measuring the reduction potentials of 7 molecules belonging to the studied series, using cyclic voltammetry, and comparing them to the one of fexinidazole (Table 5). For all tested molecules, a reversible single electron reduction was observed, corresponding to the formation of a nitro radical anion (see supplementary data). The redox potentials

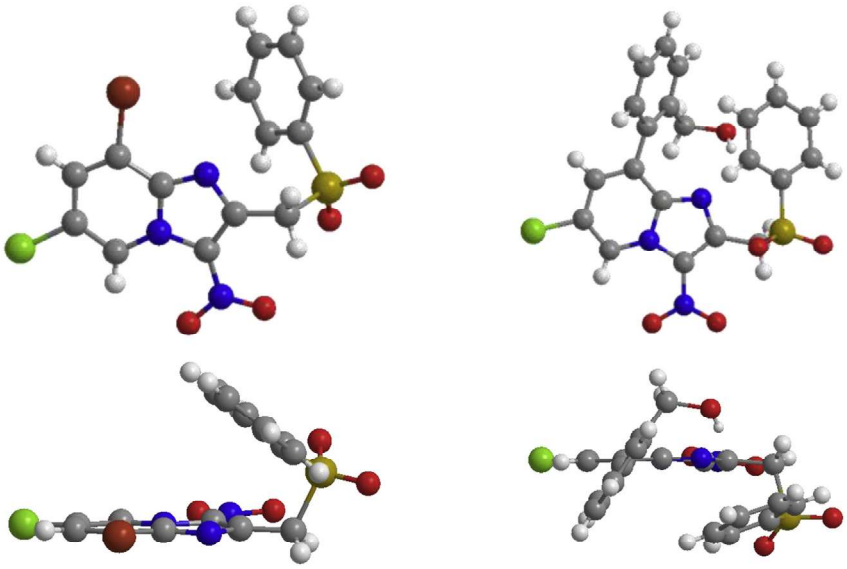


Fig. 3. X-ray structures of compounds **4** (left) and **14** (right).

of all molecules belonging to the 3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine series ranged from −0.7 to −0.6 V and were higher than that of fexinidazole ($E^\circ = -0.83$ V). When comparing brominated molecule **4** to the Suzuki-Miyaura coupling product **5**, bearing a phenyl moiety, it can be noted that the phenyl ring slightly reduces the E° value (−0.69 *versus* −0.65 V). Introducing electron-donating ($-CH_2OH$) or electron-withdrawing ($-CF_3$) groups on the phenyl ring at position 2 or 3 has a very limited influence on the redox potential (±0.01 or 0.02 V), whereas substituting a 4-pyridinyl moiety to the phenyl ring slightly increases the redox potential (−0.64 *versus* −0.69 V). Comparison of molecule **4** (8-bromo-6-chloro) to the initial hit (6,8-dibromo), showed that substituting a chlorine atom for a bromine atom at position 6 of the imidazo[1,2-*a*]pyridine ring decreases the E° value from −0.59 to −0.65 V. These results indicate that, in the studied series, it is possible to improve the antikinetoplastid activity while significantly decreasing the redox potential values from −0.59 V (initial hit) to −0.70 V (**13** and **14**), this last value remaining compatible with kinetoplastid NTR1 enzymatic capabilities. Starting from the initial hit compound, this decrease in E° value was achieved by introducing a chlorine atom at position 6 of the 3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine scaffold and by introducing a phenyl group at position 8.

Katsuno and co-workers [30] proposed a list of criteria to define antileishmanial and antitrypanosomal hit compounds, including original structure, easy synthesis (up to 5 reaction steps), $IC_{50} < 10\ \mu M$ (both on the promastigote and intramacrophage amastigote stages for *Leishmania*) and selectivity index > 10 (in comparison with mammalian cells). Of the 21 tested molecules, compound **23** meets all these criteria for an antileishmanial molecule and 13 compounds meet the same criteria for antitrypanosomal molecules.

3. Conclusion

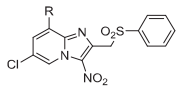
To design novel antitrypanosomatid molecules, a selective Suzuki-Miyaura coupling reaction was developed at position 8 of a 6,8-dihalogeno-3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine antileishmanial pharmacophore which was previously identified. A series of 21 new derivatives was prepared and screened *in vitro* toward *Leishmania* and *Trypanosoma*, highlighting 1 antileishmanial (molecule **23**) and several antitrypanosomal (including **14** and **20**) hit compounds with high activities ($0.04\ \mu M < IC_{50} < 3\ \mu M$) and good to excellent selectivity ($10 < SI < 550$) *versus* the HepG2 human cell line. Replacing the bromine atom at position 8 by aryl moieties particularly improved the antitrypanosomal activity. All derivatives appeared to be metabolized by type 1 nitroreductases (NTR1) in both *Leishmania* and *Trypanosoma*; their mechanism of action is therefore probably analogous to that of drug candidate fexinidazole. Indeed, the redox potentials of these new hit compounds were lower than that of the previously identified and less active hit molecule (−0.59 V), ranging from −0.7 to −0.6 V. Although a slight improvement in the aqueous solubility of this promising chemical series was achieved by introducing a 4-pyridinyl moiety, water solubility remains to be improved in order to achieve optimal properties for initiating *in vivo* studies on mouse models.

3.1. Experimental section

3.1.1. Chemistry

3.1.1.1. General procedures. All commercially available solvents and reagents were purchased from commercial suppliers (Fluorochem or Sigma Aldrich) and used without further purification. Melting points were determined in open capillary tubes with a Büchi apparatus and are uncorrected. ^1H and ^{13}C NMR spectra were determined on a Brucker Avance 200, 300 or 400 MHz instrument at the Faculté de Pharmacie de Marseille, Faculté des Sciences de St Jérôme (Marseille) and at the Laboratoire de Chimie de Coordination of Toulouse. Chemical shifts are given in δ values referenced to the solvent and using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. High resolution mass spectra were recorded on a QStar Elite mass spectrometer at the Spectropôle department of the Faculté des Sciences de St Jérôme. Silica Gel 60 (Merk 70–230) was used for column chromatography. TLC was performed on aluminium plates coated with silica gel 60F-254 (Merk) in an appropriate eluent. Visualisation was made with ultraviolet light (234 nm). Progress of the reactions and purity of the synthesized compounds were checked with LC-MS analyses which were realized at the Faculté de Pharmacie de Marseille on a Thermo Scientific Accela High Speed LC System® coupled with a single quadrupole mass spectrometer Thermo MSQ Plus®. The RP-HPLC column used is a Thermo Hypersil Gold® 50 × 2.1 mm (C13 bounded), with particles of 1.9 μM diameter. The volume of sample injected on the

Table 2
In vitro antileishmanial (*L. infantum*) and antitrypanosomal screening and cytotoxicity of synthesized imidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives (**5-25**).



Compd	R-	CC_{50} HepG2 (μM)	IC_{50} *L. infantum* axenic amastigotes (μM)	*Selectivity Index (SI) Leishmania*[f]	IC_{50} *T. brucei brucei* trypomastigotes (μM)	*Selectivity Index (SI) Trypanosoma*[g]	cLogP[h]
5	**Ph-**	**>15.6**[d]	**1.6 ± 0.6**	**>10**	0.61 ± 0.2	>25.6	4.1
6	4-Cl-Ph-	>3.9[d]	–	–	–	–	4.8
7	4-CH_3O-Ph-	>3.9[d]	–	–	–	–	4.0
8	4-($(C_2H_5)_2N$)-Ph-	>15.6[d]	2.5 ± 0.5	>6.2	0.43 ± 0.06	>36.3	5.0
9	4-CN-Ph-	>3.9[d]	–	–	–	–	4.0
10	**4-CHO-Ph-**	**>31.2**[d]	3.8 ± 0.3	>8.2	**0.08 ± 0.02**	**>390**	**3.9**
11	4-OH-Ph-	>12.5[d]	3.0 ± 0.8	>4.2	0.41 ± 0.08	>30.5	3.8
12	**4-CH_2OH-Ph-**	**13.1 ± 6.0**	1.5 ± 0.4	8.7	**0.09 ± 0.03**	**145.6**	**3.4**
13	**3-CH_2OH-Ph-**	**>25**[d]	**1.4 ± 0.2**	**>17.9**	**0.15 ± 0.03**	**>166.7**	**3.4**
14	**2-CH_2OH-Ph-**	**88 ± 32.0**	>10[e]	<8.8	**0.16 ± 0.03**	**550**	**3.4**
15	**4-F-Ph-**	>15.6[d]	**1.3 ± 0.2**	**>12**	0.31 ± 0.2	>50.3	4.3
16	3-F-Ph-	>12.5[d]	1.7 ± 0.5	>7.4	0.2 ± 0.1	>62.5	4.3
17	2-F-Ph-	>3.9[d]	–	–	–	–	4.3
18	2,4-F-Ph-	>7.8[d]	–	–	–	–	4.4
19	4-CF_3-Ph-	>3.9[d]	–	–	–	–	5.0
20	**3-CF_3-Ph-**	**>12.5**[d]	**1.1 ± 0.3**	**>11.4**	**0.04 ± 0.01**	**>312.5**	**5.0**
21	**2-CF_3-Ph-**	**22.7 ± 3.9**	**1.6 ± 0.4**	**14.2**	**0.07 ± 0.02**	**324.3**	**5.0**
22	**Pyridin-3-yl-**	**>31.3**[d]	**2 ± 0.6**	**>15.7**	**0.23 ± 0.01**	**>136.1**	**2.9**
23	**Pyridin-4-yl-**	**>50**[d]	**3 ± 0.8**	**>16.7**	**0.25 ± 0.01**	**>200**	**2.9**
24	Thiophen-2-yl-	>3.9[d]	–	–	–	–	3.9
25	Furan-2-yl-	>3.9[d]	–	–	–	–	3.2
Initial hit molecule		>31[d]	4.4 ± 0.8	>7.1	2.9 ± 0.5	>10.7	3.4
Doxorubicin[a]		0.2 ± 0.02	–	–	–	–	
Amphotericin B[b]		8.8 ± 0.3	0.06 ± 0.001	146.7	–	–	
Miltefosine[b]		85 ± 8.8	0.8 ± 0.2	106.3	–	–	
Fexinidazole[b,c]		>200[e]	3.4 ± 0.8	>58.8	0.6 ± 0.2	>333	
Suramin[c]		>100[e]	–	–	0.03 ± 0.009	>3333	
Eflornithine[c]		>100[e]	–	–	13.3 ± 2.1	>7.5	

Best results are indicated in bold.
[a] Doxorubicin was used as a cytotoxic reference drug.
[b] Amphotericin B, Miltefosine and Fexinidazole were used as antileishmanial reference drugs.
[c] Fexinidazole, Suramin and Eflornithine were used as antitrypanosomal reference drugs.
[d] The product could not be tested at higher concentrations in aqueous medium.
[e] The CC_{50} or IC_{50} value was not reached at the highest tested concentration.
[f] SI = CC_{50} HepG2/IC_{50} *L. infantum*.
[g] SI = CC_{50} HepG2/IC_{50} *T. brucei brucei*.
[h] Weighted LogP were computed with MARVIN® software (ChemAxon).

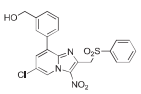
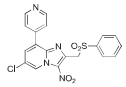
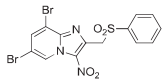
column was 1 μL. The chromatographic analysis, total duration of 8 min, is made with the following gradient of solvents: t = 0 min, water/methanol 50/50; 0 < t < 4 min, linear increase in the proportion of water to a water/methanol ratio of 95/5; 4 < t < 6 min, water/methanol 95/5; 6 < t < 7 min, linear decrease in the proportion of water to return to a ratio water/methanol of 50/50; 6 < t < 7 min, water/methanol 50/50. The water used was buffered with 5 mM ammonium acetate. The microwave reactions were performed in sealed vials, using a Biotage Initiator or CEM Discover SP-D microwave oven.

3.1.1.2. Synthesis. **3-Bromo-5-chloropyridin-2-amine (1)** [31]: To a solution of 5-chloropyridin-2-amine (10 g, 77.8 mmol, 1 equiv.) in acetonitrile (150 mL), *N*-bromosuccinimide (13.8 g, 77.8 mmol, 1 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred and refluxed for 1 h. Then the solvent was evaporated *in vacuo*. Compound **1** was obtained, after purification by chromatography on silica gel (eluent: dichloromethane–ethyl acetate 9:1) and recrystallization from propan-2-ol as a pale beige solid in 71% yield. mp: 82 °C, Lit.: 83–84 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D_6]DMSO) δ: 6.43 (2H, s), 7.88 (1H, d, J = 2.2 Hz), 7.96 (1H, d, J = 2.2 Hz), ^{13}C NMR (100 MHz, [D_6]DMSO) δ: 103.0 (C), 117.1 (C), 139.0 (CH), 145.0 (CH), 155.3 (C); MS ESI$^+$ (m/z): 207.27/209.32 $[M+H]^+$.

8-Bromo-6-chloro-2-chloromethylimidazo[1,2-*a*]pyridine (2): To a solution of 3-bromo-5-chloropyridin-2-amine **1** (10 g, 48.2 mmol, 1 equiv.) in ethanol (150 mL), 1,3-dichloroacetone (6.68 g, 53 mmol, 1.1 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 96 h. The solvent was then evaporated *in vacuo*. Compound **2** was obtained, after purification by chromatography on silica gel (eluent: dichloromethane–ethyl acetate 9:1) and recrystallization from diethyl ether as a white solid in 60% yield. mp: 161 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.78 (2H, s), 7.47 (1H, d, J = 1.7 Hz), 7.70 (1H, br s), 8.12 (1H, d, J = 1.7 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 39.3 (CH_2), 111.9 (C), 113.2 (CH), 120.5 (C), 123.1 (CH), 128.7 (CH), 141.9 (C), 145.1 (C); MS ESI$^+$ (m/z): 280.99/282.97 $[M+H]^+$; HRMS (+ESI): 280.9064 $[M + H]^+$; Calcd for $C_8H_5N_2BrCl_2$: 280.9062.

8-Bromo-6-chloro-2-chloromethyl-3-nitroimidazo[1,2-*a*] pyridine (3): To a solution of 8-bromo-6-chloro-2-chloromethylimidazo[1,2-*a*]pyridine **2** (5 g, 18 mmol, 1 equiv.) in concentrated sulfuric acid (50 mL) cooled by an ice-water bath, nitric acid 65% (5 mL, 0.11 mol, 6 equiv.) was added. The reaction

Table 3
In vitro antileishmanial profile of hit compounds **13** and **23**.

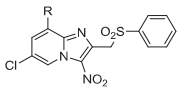
N°	Structure	IC_{50} *L. donovani* promastigotes (μM) & SI_{HepG2}	IC_{50} *L. donovani* intramacrophage amastigotes (μM) & SI_{HepG2}	IC_{50} *L. infantum* axenic amastigotes (μM) & SI_{HepG2}	CC_{50} HepG2 (μM)	CC_{50} THP1 (μM)
13		1.3 ± 0.2 *>19.2*	>10[d] -	1.4 ± 0.2 *>17.9*	>25[c]	>15[c]
23		1.2 ± 0.4 *>41.7*	2.3 ± 0.6 *>21.7*	3.0 ± 0.8 *>16.7*	>50[c]	>25[c]
Initial Hit		1.8 ± 0.8 *>17.2*	5.5 ± 0.2 *>5.6*	4.4 ± 0.8 *>7.0*	>31[c]	>25[c]
Doxorubicin[a]		–	–	–	0.2 ± 0.02	1.4 ± 0.5
Fexinidazole[b]		1.2 ± 0.2 *>166.7*	>50[d] –	3.4 ± 0.8 *>58.8*	>200[d]	>62.5[c]
Miltefosine[b]		3.1 ± 0.2 *27.4*	4.3 ± 1.7 *19.8*	0.8 ± 0.2 *106.3*	85 ± 8.8	>40[d]
Amphotericin B[b]		0.07 ± 0.01 *125.7*	0.4 ± 0.01 *22*	0.06 ± 0.001 *146.7*	8.8	3.6 ± 0.7

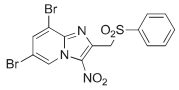
[a] Doxorubicin was used as a cytotoxic reference drug.
[b] Amphotericin B, Miltefosine and Fexinidazole were used as antileishmanial reference drugs.
[c] The product could not be tested at higher concentrations in aqueous medium.
[d] The CC_{50} or IC_{50} value was not reached at the highest tested concentration.

Table 4
8-Aryl-3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridines are bioactivated by kinetoplastid type 1 nitroreductases (NTR1).

	L. donovani promastigotes IC_{50} (μM)		
	Wild-type	$NTR1^{OE}$	$NTR2^{OE}$
13	1.4 ± 0.07	0.07 ± 0.003	1.9 ± 0.04
23	1.5 ± 0.05	0.04 ± 0.009	2.0 ± 0.2
Initial hit molecule	1.9 ± 0.08	0.07 ± 0.002	3.0 ± 0.08
	***T. brucei brucei* trypomastigotes IC_{50} (μM)**		
	Wild-type		**$NTR1^{OE}$**
14	0.39 ± 0.07		0.19 ± 0.019
20	0.09 ± 0.002		0.04 ± 0.001
Nifurtimox	1.87 ± 0.05		0.6 ± 0.05

Table 5
Reduction potential modulation in the studied series.



Compd	R-	E° (V)
4		−0.65
5		−0.69
13		−0.70
14		−0.70
20		−0.67
23		−0.64
Initial Hit		−0.59
Fexinidazole		−0.83

Cyclic voltammetry conditions: DMSO/$TBAPF_6$, SCE/GC, 1 electron reversible reduction, values are given in volt and are corrected toward NHE.

mixture was stirred for 1 h at room temperature. Then, the mixture was slowly poured into an ice-water mixture and the desired product precipitated. The yellow solid was collected by filtration, dried under reduced pressure and recrystallized from propan-2-ol to give the expected product **3** in 60% yield. mp 165 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 5.09 (2H, s), 7.92 (1H, d, *J* = 1.8 Hz), 9.49 (1H, d, *J* = 1.8 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 38.3 (CH_2), 113.3 (C), 124.8 (CH), 125.3 (C), 129.9 (C), 134.2 (CH), 141.0 (C), 147.7 (C); MS ESI^+ (*m*/*z*): 324.00/325.93 $[M+H]^+$; HRMS (+ESI): 323.8938 $[M + H]^+$; Calcd for $C_8H_4N_3O_2BrCl_2$: 323.8937.

8-Bromo-6-chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (4): To a solution of 8-bromo-6-chloro-2-chloromethyl-3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine **3** (5 g, 15.39 mmol, 1 equiv.) in dimethylsulfoxide (150 mL), sodium benzenesulfinate (7.58 g, 46.17 mmol, 3 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature. The reaction mixture was then slowly poured into an ice-water mixture, making the desired product precipitate. The pale orange solid was collected by filtration, dried under reduced pressure and recrystallized from acetonitrile to give the expected product **4** in 80% yield. mp 196 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 5.14 (2H, s), 7.52–7.56 (2H, m), 7.66–7.69 (1H, m), 7.84–7.89 (3H, m), 9.42 (1H, br s); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 56.8 (CH_2), 113.3 (C), 124.8 (CH), 125.4 (C), 128.6 (2CH), 129.4 (2CH), 131.8 (C), 134.2 (CH), 134.4 (CH), 139.2 (C), 139.8 (C), 141.1 (C); MS ESI^+ (*m*/*z*): 429.84/431.82 $[M+H]^+$. HRMS (+ESI): 431.9236 $[M + H]^+$; Calcd for $C_{14}H_9N_3O_4SClBr$: 431.9236.

General procedure for the preparation of 8-arylimidazo[1,2-

***a*]pyridine derivatives (5 to 25):** A mixture of 8-bromo-6-chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (400 mg, 1 equiv.), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.1 equiv., 107.3 mg), potassium carbonate (5 equiv., 642 mg), and appropriate boronic acid (1.3 equiv.) in THF (15 mL) under N_2 atmosphere was heated at 120 °C under microwave irradiation until complete disappearance of the starting material (as monitored by LC/MS or TLC). Water was then added and the mixture was extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed three times with water, dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated. The crude residue was purified by column chromatography on silica gel and recrystallized from the appropriate solvent, affording compounds **5** to **25**.

6-Chloro-3-nitro-8-phenyl-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (5): Compound **5** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 6.5/3/0.5) and recrystallization from acetonitrile as a yellow solid in 90% yield (0.36 g). mp 201 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.18 (s, 2H), 7.45–7.49 (m, 3H), 7.52–7.56 (m, 2H), 7.68–7.72 (m, 4H), 7.87–7.89 (m, 2H), 9.47 (d, J = 1.9 Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 56.7 (CH_2), 124.3 (CH), 126.2 (C), 128.7 (2CH), 129.0 (2CH), 129.4 (2CH), 129.5 (2CH), 130.0 (CH), 130.4 (CH), 131.2 (C), 132.0 (C), 133.1 (C), 134.1 (CH), 139.4 (C), 139.7 (C), 141.9 (C). MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 427.98/429.87 [M+H]$^+$. HRMS (+ESI): 428.0464 [M + H]$^+$. Calcd for $C_{20}H_{14}N_3O_4SCl$: 428.0466.

6-Chloro-8-(4-chlorophenyl)-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (6): Compound **6** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 6.5/3/0.5) as a pale yellow solid in 74% yield (0.32 g). mp 250 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 5.29 (s, 2H), 7.48–7.50 (m, 2H), 7.62–7.69 (m, 4H), 7.80–7.87 (m, 3H), 8.13 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 9.37 (d, J = 1.7 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.6 (CH_2), 124.4 (C), 125.1 (CH), 128.3 (2CH), 128.4 (2CH), 128.8 (C), 129.4 (2CH), 130.4 (CH), 131.2 (2CH), 131.7 (C), 132.6 (C), 134.2 (CH), 134.4 (C), 138.6 (C), 139.4 (C), 140.9 (C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 461.89/463.84 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 462.0074 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{20}H_{13}N_3O_4SCl_2$: 462.0077.

6-Chloro-8-(4-methoxyphenyl)-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (7): Compound **7** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 5.5/4/0.5) and recrystallization from acetonitrile as a yellow solid in 84% yield (0.36 g). mp 246 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 3.85 (s, 3H), 5.30 (s, 2H), 6.97 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.63–7.69 (m, 4H), 7.82–7.86 (m, 3H), 8.4 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 9.31 (d, J = 1.9 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.3 (CH_3), 55.6 (CH_2), 113.8 (2CH), 123.9 (CH), 124.5 (C), 125.0 (C), 128.3 (2CH), 129.2 (CH), 129.3 (2CH), 129.8 (C), 130.8 (2CH), 131.0 (C), 134.1 (CH), 138.7 (C), 139.2 (C), 141.1 (C), 160.2 (C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 457.94/459.96 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 458.0569 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{21}H_{16}N_3O_5SCl$: 458.0572.

4-(6-Chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-8-yl)-*N*,*N*-diethylaniline (8): Compound **8** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 4.5/5/0.5) and recrystallization from acetonitrile as a red solid in 50% yield (0.23 g). mp 188 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 1.14 (t, J = 6 Hz, 6H), 3.40–3.44 (m, 4H), 5.30 (s, 2H), 6.62 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.61–7.68 (m, 4H), 7.80–7.94 (m, 4H), 9.20 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 12.5 ($2CH_3$), 43.7 ($2CH_2$), 55.7 (CH_2), 110.8 (2CH), 118.5 (C), 122.4 (CH), 124.7 (C), 127.2 (CH), 128.3 (2CH), 129.4 (2CH), 130.4 (C), 130.5 (2CH), 130.8 (C), 134.0 (CH), 138.8 (C), 138.9 (C), 141.1 (C), 148.1 (C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 498.81/500.87 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 499.1204 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{24}H_{23}N_4O_4SCl$: 499.1201.

4-(6-Chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-8-yl)benzonitrile (9): Compound **9** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 5.5/3.5/1) and recrystallization from acetonitrile as a beige solid in 65% yield (0.27 g). mp 258 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 5.30 (s, 2H), 7.63–7.67 (m, 2H), 7.81–7.86 (m, 4H), 7.88–7.92 (m, 3H), 8.22 (s, 1H), 9.42 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.5 (CH_2), 111.9 (C), 118.5 (C), 124.3 (C), 125.8 (CH), 128.1 (C), 128.4 (2CH), 129.3 (2CH), 130.2 (2CH), 131.2 (CH), 131.8 (C), 132.1 (2CH), 134.2 (CH), 137.4 (C), 138.5 (C), 139.4 (C), 140.8 (C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 452.84/4754.94 [M+H]$^+$. HRMS (+ESI): 453.0418 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{21}H_{13}N_4O_4SCl$: 453.0419.

4-(6-Chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-8-yl)benzaldehyde (10): Compound **10** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 5/4/1) and recrystallization from acetonitrile as a yellow solid in 62% yield (0.26 g). mp 221 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 5.31 (s, 2H), 7.64–7.67 (m, 2H), 7.82–7.87 (m, 5H), 7.93–7.95 (m, 2H), 8.22 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 9.41 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 10.10 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.6 (CH_2), 124.3 (C), 125.6 (CH), 128.4 (2CH), 128.8 (C), 129.2 (2CH), 129.3 (2CH), 130.1 (2CH), 131.0 (CH), 131.1 (C), 134.1 (CH), 136.2 (C), 138.4 (C), 138.6 (C), 139.4 (C), 140.9 (C), 192.8 (C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 455.95/458.01 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 456.0417 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{21}H_{14}N_3O_5SCl$: 456.0415.

4-(6-Chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-8-yl)phenol (11): Compound **11** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 5/3/2) and recrystallization from acetonitrile as a yellow solid in 66% yield (0.27 g). mp 267 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 5.30 (s, 2H), 6.76–6.79 (m, 2H), 7.52–7.55 (m, 2H), 7.61–7.67 (m, 2H), 7.81–7.84 (m, 3H), 7.97 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 9.28 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 9.92 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.6 (CH_2), 115.2 (2CH), 123.4 (C), 123.6 (CH), 124.6 (C), 128.4 (2CH), 128.8 (CH), 129.3 (2CH), 130.2 (C), 130.9 (2CH), 131.0 (C), 134.0 (CH), 138.7 (C), 139.15 (C), 141.1 (C), 158.8 (C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 443.86/445.84 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 444.0412 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{20}H_{14}N_3O_5SCl$: 444.0415.

{4-[6-Chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-8-yl]phenyl}methanol (12): Compound **12** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 4.5/4.5/1) and recrystallization from acetonitrile as a yellow solid in 54% yield (0.23 g). mp 244 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 4.57 (s, 2H), 4.66 (bs, 1H), 5.30 (s, 2H), 7.33–7.37 (m, 2H), 7.59–7.67 (m, 4H), 7.81–7.85 (m, 3H), 8.08 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 9.35 (d, J = 1.9 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.7 (CH_2), 62.5 (CH_2), 124.4 (C), 124.5 (CH), 126.3 (2CH), 128.4 (2CH), 129.2 (2CH), 129.3 (2CH), 129.9 (CH), 130.2 (C), 131.0 (C), 131.1 (C), 134.1 (CH), 138.7 (C), 139.3 (C), 141.2 (C), 144.0 (C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 457.84/459.71 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 458.0571 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{21}H_{16}N_3O_5SCl$: 458.0572.

{3-[6-Chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-8-yl]phenyl}methanol (13): Compound **13** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 6/2/2) and recrystallization from acetonitrile as a yellow solid in 52% yield (0.22 g). mp 210 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 4.54 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 5.29 (s, 3H), 7.34–7.50 (m, 3H), 7.60–7.66 (m, 3H), 7.79–7.82 (m, 3H), 8.06 (s, 1H), 9.37 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.8 (CH_2), 62.7 (CH_2), 124.4 (C), 124.7 (CH), 127.1 (CH), 127.5 (CH), 128.0 (CH), 128.1 (CH), 128.3 (2CH), 129.3 (2CH), 130.2 (CH), 130.5 (C), 131.1 (C), 132.7 (C), 134.2 (CH), 138.7 (C), 139.4 (C), 141.2 (C), 143.0 (C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 457.80/459.80 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 458.0572 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{21}H_{16}N_3O_5SCl$: 458.0572.

{2-[6-Chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-8-yl]phenyl}methanol (14): Compound **14** was obtained after purification by chromatography (eluent:

dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 8/1/1) and recrystallization from propan-2-ol as a yellow solid in 62% yield (0.26 g). mp 170 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 4.31 (s, 2H), 5.03 (s, 1H), 5.22 (s, 2H), 7.18–7.20 (m, 1H), 7.31–7.36 (m, 1H), 7.45–7.50 (m, 1H), 7.54–7.59 (m, 3H), 7.72–7.75 (m, 3H), 7.91 (s, 1H), 9.39 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.7 (CH$_2$), 60.9 (CH$_2$), 123.9 (C), 125.0 (CH), 126.5 (CH), 127.8 (CH), 128.1 (2CH), 128.8 (CH), 129.2 (2CH), 130.4 (CH), 130.8 (CH), 130.9 (C), 131.8 (C), 131.9 (C), 134.0 (CH), 138.7 (C), 139.4 (C), 140.7 (C), 141.7 (C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 457.93/459.98 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 458.0575 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{21}H_{16}N_3O_5SCl$: 458.0572.

6-Chloro-8-(4-fluorophenyl)-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (15): Compound **15** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 5.5/4/0.5) and recrystallization from acetonitrile as a yellow solid in 64% yield (0.26 g). mp 211 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 5.30 (s, 2H), 7.27 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 7.63–7.72 (m, 4H), 7.81–7.87 (m, 3H), 8.09 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 9.35 (d, J = 1.8 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.5 (CH$_2$), 115.3 (d, J = 21.6 Hz, 2CH), 124.4 (C), 124.7 (CH), 128.3 (2CH), 129.0 (C), 129.2 (d, J = 3.1 Hz, C), 129.3 (2CH), 130.2 (CH), 131.0 (C), 131.6 (d, J = 8.5 Hz, 2CH), 134.1 (CH), 138.6 (C), 139.3 (C), 141.0 (C), 162.7 (d, J = 247.7 Hz, C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 445.81/447.12 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 446.0372 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{20}H_{13}N_3O_4SFCl$: 446.0372.

6-Chloro-8-(3-fluorophenyl)-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (16): Compound **16** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 6/3.5/0.5) and recrystallization from propan-2-ol as a yellow solid in 63% yield (0.26 g). mp 192 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 5.30 (s, 2H), 7.31 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.44–7.63 (m, 5H), 7.75–7.82 (m, 3H), 8.16 (s, 1H), 9.38 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.6 (CH$_2$), 116.0 (d, J = 3.6 Hz, CH), 116.3 (C), 124.3 (C), 125.1 (CH), 125.5 (d, J = 2.8 Hz, CH), 128.2 (2CH), 128.6 (d, J = 2.4 Hz, C), 129.2 (2CH), 130.3 (d, J = 8.4 Hz, CH), 130.6 (CH), 131.1 (C), 134.1 (CH), 134.9 (d, J = 8.6 Hz, CH), 138.6 (C), 139.3 (C), 140.9 (C), 161.8 (d, J = 243.5 Hz, C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 445.79/447.14 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 446.0370 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{20}H_{13}N_3O_4SFCl$: 446.0372.

6-Chloro-8-(2-fluorophenyl)-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (17): Compound **17** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 4.7/5/0.3) and recrystallization from propan-2-ol as a yellow solid in 71% yield (0.29 g). mp 220 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 5.26 (s, 2H), 7.26–7.42 (m, 3H), 7.53–7.61 (m, 3H), 7.76–7.78 (m, 3H), 8.05 (s, 1H), 9.41 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.7 (CH$_2$), 115.9 (d, J = 21.6 Hz, CH), 120.8 (d, J = 14 Hz, C), 123.8 (C), 124.3 (d, J = 3.5 Hz, CH), 125.3 (C), 125.6 (CH), 128.2 (2CH), 129.2 (2CH), 131.1 (C), 131.5 (d, J = 8.5 Hz, CH), 132.2 (d, J = 2.1 Hz, CH), 132.3 (d, J = 2.9 Hz, CH), 134.0 (CH), 138.7 (C), 139.5 (C), 141.2 (C), 159.2 (d, J = 248.5 Hz, C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 445.88/447.14 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 446.0369 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{20}H_{13}N_3O_4SFCl$: 446.0372.

6-Chloro-8-(2,4-difluorophenyl)-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (18): Compound **18** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 4.5/5/0.5) and recrystallization from acetonitrile as a yellow solid in 61% yield (0.26 g). mp 232 °C; ^{1}H NMR (300 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 5.25 (s, 2H), 7.16–7.23 (td, J = 2.2 Hz and 8.5 Hz, 1H), 7.41–7.50 (m, 2H), 7.57–7.62 (m, 2H), 7.76–7.81 (m, 3H), 8.06 (s, 1H), 9.41 (d, J = 1.7 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.6 (CH$_2$), 104.4 (t, J = 26.5 Hz, CH), 111.5 (dd, J = 3.7 Hz and 21.4 Hz, CH), 117.4 (dd, J = 3.7 Hz and 14.3 Hz, C), 123.8 (C), 124.4 (C), 125.7 (CH), 128.2 (2CH), 129.2 (2CH), 131.1 (C), 132.3 (d, J = 3.3 Hz, CH), 133.4 (dd, J = 3.8 Hz and 10.2 Hz, CH), 134.0 (CH), 139.1 (d, J = 62.6 Hz, C), 141.1 (C), 157.9 (d, J = 12.8 Hz, C), 161.2 (d, J = 14.7 Hz, C), 164.5 (d, J = 12.5 Hz, C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 463.85/465.80 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 464.0280 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{20}H_{12}N_3O_4SF_2Cl$: 464.0278.

6-Chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)-8-(4-trifluoromethylphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (19): Compound **19** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 5/4.5/0.5) and recrystallization from propan-2-ol as a yellow solid in 87% yield (0.40 g). mp 231 °C; ^{1}H NMR (300 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 5.29 (s, 2H), 7.61–7.67 (m, 2H), 7.75–7.86 (m, 7H), 8.19 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 9.40 (d, J = 1.7 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.6 (CH$_2$), 124.0 (q, J = 272.4 Hz, CF$_3$), 124.4 (C), 125.1 (q, J = 3.7 Hz, 2CH), 125.6 (CH), 128.4 (2CH), 128.6 (C), 129.3 (2CH), 129.5 (q, J = 32 Hz, C), 130.2 (2CH), 131.0 (CH), 131.1 (C), 134.1 (CH), 136.9 (C), 138.6 (C), 139.5 (C), 140.9 (C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 495.80/497.91 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 496.0342 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{21}H_{13}N_3O_4SF_3Cl$: 496.0340.

6-Chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)-8-(3-trifluoromethylphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (20): Compound **20** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 5.5/4/0.5) and recrystallization from acetonitrile as a yellow solid in 59% yield (0.27 g). mp 182 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 5.28 (s, 2H), 7.32–7.39 (m, 1H), 7.56–7.70 (m, 3H), 7.74–7.86 (m, 3H), 7.93–7.96 (m, 1H), 8.20–8.27 (m, 2H), 9.41 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.7 (CH$_2$), 124.0 (q, J = 272.4 Hz, CF$_3$), 124.4 (C), 125.4 (CH), 125.9 (q, J = 3.9 Hz, 2CH), 128.2 (2CH), 128.5 (C), 129.2 (2CH), 129.3 (CH), 129.4 (q, J = 32 Hz, C), 131.0 (CH), 131.1 (C), 133.6 (CH), 133.9 (C), 134.1 (CH), 138.7 (C), 139.4 (C), 141.0 (C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 495.82/497.89 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 496.0340 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{21}H_{13}N_3O_4SF_3Cl$: 496.0340.

6-Chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)-8-(2-trifluoromethylphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (21): Compound **21** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 5/4.5/0.5) and recrystallization from propan-2-ol as a yellow solid in 41% yield (0.19 g). mp 189 °C; ^{1}H NMR (300 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 5.21 (s, 2H), 7.37–7.39 (m, 1H), 7.51–7.55 (m, 2H), 7.65–7.67 (m, 2H), 7.70–7.79 (m, 3H), 7.88–7.89 (m, 1H), 7.92 (s, 1H), 9.44 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, [D$_6$] DMSO) δ: 55.6 (CH$_2$), 123.4 (C), 123.7 (q, J = 274.3 Hz, CF$_3$), 125.8 (CH), 126.2 (q, J = 4.9 Hz, CH), 127.6 (q, J = 29.8 Hz, C), 128.3 (2CH), 128.8 (C), 129.0 (2CH), 129.6 (CH), 131.1 (C), 131.7 (d, J = 2.1 Hz, C), 131.9 (d, J = 1.3 Hz, CH), 132.1 (CH), 132.6 (CH), 134.0 (CH), 138.5 (C), 139.5 (C), 141.8 (C); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 495.78/497.89 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 496.0341 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{21}H_{13}N_3O_4SF_3Cl$: 496.0340.

6-Chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)-8-(pyridin-3-yl) imidazo[1,2-*a*]pyridine (22): Compound **22** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/ethyl acetate 9/1) and recrystallization from acetonitrile as a yellow solid in 53% yield (0.21 g). mp 215 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 5.30 (s, 2H), 7.44–7.50 (m, 1H), 7.59–7.65 (m, 2H), 7.77–7.83 (m, 3H), 7.99–8.02 (m, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.66 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 8.92 (s, 1H), 9.40 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.6 (CH$_2$), 123.2 (CH), 124.4 (C), 125.4 (CH), 127.2 (C), 128.3 (2CH), 128.9 (C), 129.3 (2CH), 130.6 (CH), 131.1 (C), 134.2 (CH), 136.8 (CH), 138.6 (C), 139.4 (C), 141.0 (C), 149.6 (CH), 150.1 (CH); MS ESI$^+$ (*m*/*z*): 428.95/430.89 [M+H]$^+$; HRMS (+ESI): 429.0418 [M + H]$^+$; Calcd for $C_{19}H_{13}N_4O_4SCl$: 429.0419.

6-Chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)-8-(pyridin-4-yl) imidazo[1,2-*a*]pyridine (23): Compound **23** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/ethyl acetate 9/1) and recrystallization from acetonitrile as a yellow solid in 51% yield (0.20 g). mp 230 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, CDCl$_3$) δ: 5.18 (s, 2H), 7.52–7.58 (m, 2H), 7.67–7.74 (m, 3H), 7.82–7.89 (m, 3H), 8.73 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 9.54 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl$_3$) δ: 56.6 (CH$_2$), 123.6 (2CH), 125.7 (C), 126.0 (CH), 128.7 (2CH), 128.8 (C),

129.4 (2CH), 130.8 (CH), 131.3 (C), 134.3 (CH), 139.4 (C), 139.8 (C), 140.8 (C), 141.2 (C), 150.3 (2CH); MS ESI$^+$ (*m/z*): 428.93/430.97 $[M+H]^+$; HRMS (+ESI): 429.0417 $[M + H]^+$; Calcd for $C_{19}H_{13}N_4O_4SCl$: 429.0419.

6-Chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)-8-(thiophen-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (24): Compound **24** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 5.5/4/0.5) as a yellow solid in 60% yield (0.24 g). mp 255 °C; ^{1}H NMR (300 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 5.33 (s, 2H), 7.21 (s, 1H), 7.61–7.99 (m, 7H), 8.30 (s, 1H), 9.26 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 55.7 (CH_2), 123.8 (CH), 123.9 (C), 124.4 (C), 126.9 (CH), 127.8 (CH), 128.2 (2CH), 129.4 (2CH), 129.7 (CH), 130.6 (CH), 131.6 (C), 133.8 (C), 134.2 (CH), 138.8 (C), 138.9 (C), 141.1 (C); MS ESI$^+$ (*m/z*): 433.81/435.84 $[M+H]^+$; HRMS (+ESI): 434.0050 $[M + H]^+$; Calcd for $C_{18}H_{12}ClN_3O_4S_2$: 434.0031.

6-Chloro-8-(furan-2-yl)-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl) imidazo[1,2-*a*]pyridine (25): Compound **25** was obtained after purification by chromatography (eluent: dichloromethane/cyclohexane/diethyl ether 4/5.5/0.5) and recrystallization from acetonitrile as a yellow solid in 53% yield (0.21 g). mp 236 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO) δ: 5.34 (s, 2H), 6.70 (q, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.57–7.62 (m, 2H), 7.75 (tt, $J = 1.2$ Hz and 7.5 Hz, 1H), 7.81–7.84 (m, 2H), 7.97 (dd, $J = 0.6$ Hz and 1.7 Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 9.23 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$] DMSO) δ: 55.6 (CH_2), 112.7 (CH), 114.9 (CH), 119.6 (C), 123.7 (CH), 124.2 (C), 124.3 (CH), 128.2 (2CH), 129.2 (2CH), 131.2 (C), 134.1 (CH), 138.3 (C), 138.8 (C), 139.0 (C), 145.5 (C), 145.6 (CH); MS ESI$^+$ (*m/z*): 417.01/418.25 $[M+H]^+$; HRMS (+ESI): 418.0254 $[M + H]^+$; Calcd for $C_{18}H_{12}N_3O_5SCl$: 418.0259.

3.1.2. Biology

Antileishmanial activity assay on *L. infantum* axenic amastigotes [32]**:** *L. infantum* promastigotes in logarithmic phase were centrifuged at 900 G for 10 min. The supernatant was removed carefully and replaced by the same volume of RPMI 1640 complete medium at pH 5.4 and incubated for 24 h at 24 °C. The acidified promastigotes were incubated for 24 h at 37 °C in a ventilated flask. Promastigotes were then transformed into amastigotes. The effects of the tested compounds on the growth of *L. infantum* axenic amastigotes were assessed as follows. *L. infantum* amastigotes were incubated at a density of 2.106 parasites/mL in sterile 96-well plates with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v), in duplicate. Appropriate controls (DMSO, amphotericin B, miltefosine and pentamidine) were added to each set of experiments. After a 48 h incubation period at 37 °C, each plate-well was microscope-examined for detecting any precipitate formation. To estimate the luciferase activity of axenic amastigotes, 80 μL of each well were transferred to white 96-well plates, Steady Glow® reagent (Promega) was added according to manufacturer's instructions, and plates were incubated for 2 min. The luminescence was measured in Microbeta Luminescence Counter (PerkinElmer). Inhibitory concentration 50% (IC_{50}) was defined as the concentration of drug required to inhibit by 50% the metabolic activity of *L. infantum* amastigotes compared to control. IC_{50} values were calculated by non-linear regression analysis processed on dose-response curves, using TableCurve 2D V5 software. IC_{50} values represent the mean.

Antileishmanial activity assay on *L. donovani* promastigotes: The effects of the tested compounds on the growth of *L. donovani* promastigotes (MHOM/IN/00/DEVI strain) were assessed by MTT assay [33]. Briefly, promastigotes in log-phase in Schneider's medium supplemented with 20% fœtal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 μg mL^{-1} streptomycin), were incubated at an average density of 10^6 parasites/mL in sterile 96-well plates with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v), in duplicate. Appropriate controls treated by DMSO, miltefosine or amphotericin B (reference drugs purchased from Sigma Aldrich) were added to each set of experiments. After a 72 h incubation period at 27 °C, parasite metabolic activity was determined. Each plate-well was then microscope-examined for detecting possible precipitate formation. 10 μL of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution (10 mg/mL in PBS) were added to each well followed by incubation for another 4 h. The enzyme reaction was then stopped by addition of 100 μL of 50% isopropanol–10% sodium dodecyl sulfate. The plates were shaken vigorously (300 rpm) for 10 min. The absorbance was finally measured at 570 nm in a BIO-TEK ELx808 Absorbance Microplate Reader. Inhibitory concentration 50% (IC_{50}) was defined as the concentration of drug required to inhibit by 50% the metabolic activity of *L. donovani* and promastigotes compared to the control. IC_{50} were calculated by nonlinear regression analysis processed on dose–response curves, using TableCurve 2D V5.0 software. IC_{50} values represent the mean value calculated from three independent experiments.

Antileishmanial activity assay on *L. donovani* intra-macrophage amastigotes: The effects of the tested compounds on the growth of *Leishmania donovani* amastigotes were assessed according to the method of da Luz et al. [34]. 400 μL of THP-1 cells with Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (final concentration: 50 ng/mL) were seeded in sterile chamber-slides at an average density of 10^5 cells/mL and incubated for 48 h at 37 °C and 6% CO_2. *L. donovani* promastigotes were centrifuged at 900 G for 10 min and the supernatant was replaced by the same volume of Schneider 20% FCS pH 5.4 and incubated for 24 h at 27 °C. THP-1 cells were then infected by acidified promastigotes at an average density of 10^6 cells/mL (10:1 ratio) and chamber-slides were incubated for 24 h at 37 °C. Then, in duplicate, the medium containing various concentrations of tested compounds was added (final DMSO concentration below 0.5% v/v). Appropriate controls treated with or without solvent (DMSO), and various concentrations of miltefosine and amphotericin B were added to each set of experiments. After a 120 h incubation at 37 °C and 6% CO_2, the well supernatant was removed. Cells were fixed with analytical grade methanol and stained with 10% Giemsa. The percentage of infected macrophages in each assay was determined microscopically by counting at least 200 cells in each sample. IC_{50} was defined as the concentration of drug necessary to produce a 50% decrease in infected macrophages compared to the control. IC_{50} were calculated by non-linear regression analysis processed on dose–response curves, using TableCurve 2D V5.0 software. IC_{50} values represent the mean value calculated from three independent experiments.

Antitrypanosomal activity assay on trypomastigotes: The effects of the tested compounds on the growth of *T. brucei brucei* were assessed by Alamar Blue® assay described by Räz et al. [35] *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.9 (IMTA, Antwerpen, Belgium) was cultured in MEM with Earle's salts, supplemented according to the protocol of Baltz et al. [36] with the following modifications: 0.5 mM Mercaptoethanol (Sigma Aldrich®, France), 1.5 mM L-cysteine (Sigma Aldrich®), 0.05 mM Bathocuproïne sulfate (Sigma Aldrich®) and 20% heat-inactivated horse serum (Gibco®, France), at 37 °C and 5% CO_2. They were incubated at an average density of 2000 parasites/100 μL in sterile 96-well plates (Fisher®, France) with various concentrations of compounds dissolved in DMSO, in duplicate. Appropriate controls treated by DMSO on sterile water, suramin, eflornithine and fexinidazole (reference drugs purchased from Sigma Aldrich, France and Fluorochem, UK) were added to each set of experiments. After a 69 h incubation period at 37 °C, 10 μL of the viability marker Alamar Blue® (Fisher, France) was then added to each well, and the plates were incubated for 5 h. The

plates were read in a PerkinElmer ENSPIRE (Germany) microplate reader using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. IC_{50} was defined as the concentration of drug necessary to inhibit by 50% the activity of *T. brucei brucei* compared to the control. IC_{50} were calculated by nonlinear regression analysis processed on dose-response curves, using GraphPad Prism software (USA). IC_{50} values were calculated from three independent experiments.

Cytotoxicity assay on HepG2 cell line: The evaluation of the tested molecules cytotoxicity on the HepG2 cell line (hepatocarcinoma cell line purchased from ATCC, ref H-8065) was performed according to the method of Mosman [33] with slight modifications. Briefly, cells in 100 μL of complete RPMI medium, [RPMI supplemented with 10% FCS, 1% L-glutamine (200 mM) and penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 μg mL^{-1})] were inoculated into each well of 96-well plates and incubated at 37 °C in a humidified 6% CO_2. After a 24 h incubation, 100 μL of medium with various product concentrations dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v) were added and the plates were incubated for 72 h at 37 °C. Duplicate assays were performed for each sample. Each plate-well was then microscope-examined for detecting possible precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. 100 μL of MTT solution (0.5 mg/mL in medium without FCS) were then added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C. After this time, the MTT solution was removed and DMSO (100 μL) was added to dissolve the resulting blue formazan crystals. Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 5 min. The absorbance was measured at 570 nm with 630 nm as reference wavelength spectrophotometer using a BIO-TEK ELx808 Absorbance Microplate Reader. DMSO was used as blank and doxorubicin (purchased from Sigma Aldrich) as positive control. Cell viability was calculated as percentage of control (cells incubated without compound). The 50% cytotoxic concentration was determined from the dose–response curve by using the TableCurve 2D V5.0 software.

Cytotoxicity assay on THP1 cell line: The evaluation of the tested molecules cytotoxicity on the differentiated THP1 cell line (acute monocyte leukemia cell line purchased from ATCC, ref TIB-202) was performed according to the method of Mosman [33] with slight modifications. Briefly, cells in 100 μL of complete RPMI medium with Phorbol 12-myristate 13-acetate (final concentration: 50 ng/mL) were incubated at an average density of 10^6 cells/mL and in sterile 96-well plates. After a 48 h incubation, 100 μL of medium with various product concentrations dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v) were added and the plates were incubated for 72 h at 37 °C. Each plate-well was then microscope-examined for detecting possible precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. 100 μL of MTT solution (0.5 mg/mL in medium without FCS) were then added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C. After this time, the MTT solution was removed and DMSO (100 μL) was added to dissolve the resulting blue formazan crystals. Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 10 min. The absorbance was measured at 570 nm with 630 nm as reference wavelength spectrophotometer using a BIO-TEK ELx808 Absorbance Microplate Reader. DMSO was used as blank and doxorubicin (purchased from Sigma Aldrich) as positive control. Cell viability was calculated as percentage of control (cells incubated without compound). The 50% cytotoxic concentration was determined from the dose–response curve by using the TableCurve 2D V5.0 software.

Metabolism of 13 and 23 in *L. donovani* promastigotes: The clonal *Leishmania donovani* cell line LdBOB (derived from MHOM/SD/62/1S-CL2D) was grown as promastigotes at 26 °C in modified M199 media, as previously described [37]. LdBOB promastigotes overexpressing NTR1 (LinJ.05.0660) [19] and NTR2 (LinJ.12.0730) [20] were grown in the presence of nourseothricin (100 μg mL^{-1}). Then to examine the effects of test compounds on growth, triplicate promastigote cultures were seeded with 5×10^4 parasites.mL^{-1}. Parasites were grown in 10 mL cultures in the presence of drug for 72 h, after which 200 μL aliquots of each culture were added to 96-well plates, 50 μM resazurin was added to each well and fluorescence (excitation of 528 nm and emission of 590 nm) measured after a further 4 h incubation [14]. Data were processed using GRAFIT (version 5.0.4; Erithacus software) and fitted to a 2-parameter equation, where the data are corrected for background fluorescence, to obtain the effective concentration inhibiting growth by 50% (EC_{50}):

$$y = \frac{100}{1 + \left(\frac{[I]}{EC_{50}}\right)^{m}}$$

In this equation [I] represents inhibitor concentration and m is the slope factor. Experiments were repeated at least two times and the data is presented as the mean plus standard deviation.

Metabolism of 14 and 20 in *T. brucei*: *Trypanosoma brucei* bloodstream-form 'single marker' S427 (T7RPOL TETR NEO) and drug-resistant cell lines were cultured at 37 °C in HMI9-T medium [38] supplemented with 2.5 μg mL^{-1} G418 to maintain expression of T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor protein. Bloodstream trypanosomes overexpressing the *T. brucei* nitroreductase (NTR1) [21] were grown in medium supplemented with 2.5 μg mL^{-1} phleomycin and expression of NTR was induced by the addition of 1 μg mL^{-1} tetracycline. Cultures were initiated with 1×10^5 cells.mL^{-1} and sub-cultured when cell densities approached 1–2 ($\times 10^6$).mL^{-1}.

In order to examine the effects of inhibitors on the growth of these parasites, triplicate cultures containing the inhibitor were seeded at 1×10^5 trypanosomes.mL^{-1}. Cells overexpressing NTR were induced with tetracycline 48 h prior to EC_{50} analysis. Cell densities were determined after culture for 72 h, as previously described [39]. EC_{50} values were determined using the following two-parameter equation by non-linear regression using GraFit:

where the experimental data were corrected for background cell density and expressed as a percentage of the uninhibited control cell density.

$$y = \frac{100}{1 + \left(\frac{[I]}{EC_{50}}\right)^{m}}$$

In this equation [I] represents inhibitor concentration and m is the slope factor.

Acknowledgements

This work is supported by Aix-Marseille Université, the Université de Toulouse and the CNRS. A. Fairlamb and S. Wyllie are supported by funding from the Wellcome Trust (WT105021). C. Fersing thanks the Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille (AP-HM) for hospital appointment. The authors thank Dr Vincent Remusat for the NMR spectra recording, Christophe Chendo and Valérie Monnier for the HRMS analyses and Dr Michel Giorgi for the X-ray structure determinations.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.064.

References

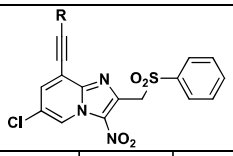
[1] World Health Organization (WHO): www.who.int/neglected_diseases/diseases/en.
[2] D.H. Molyneux, L. Savioli, D. Engels, Lancet 389 (2017) 312–325.
[3] World Health organization (WHO): www.who.int/leishmaniasis/en/.
[4] D. Pace, J. Infect. 69 (2014) s10–s18.
[5] World Health organization (WHO): www.who.int/trypanosomiasis_african/en/.
[6] P. Büscher, G. Cecchi, V. Jamonneau, G. Priotto, Lancet 390 (2017) 2397–2409.
[7] S. Sundar, A. Singh, Parasitology (2017), https://doi.org/10.1017/S0031182017002116.
[8] P.G.E. Kennedy, Lancet Neurol. 12 (2013) 186–194.
[9] M.C. Field, D. Horn, A.H. Fairlamb, M.A. Ferguson, D.W. Gray, K.D. Read, M. de Rycker, L.S. Torrie, P.G. Wyatt, S. Wyllie, I.H. Gilbert, Nat. Rev. Microbiol. 15 (2017) 217–231.
[10] A.S. Nagle, S. Khare, A.B. Kumar, F. Supek, A. Buchynskyy, C.J. Mathison, N.K. Chennamaneni, N. Pendem, F.S. Buckner, M.H. Gelb, V. Molteni, Chem. Rev. 114 (2014) 11305–11347.
[11] Drugs for neglected diseases initiative (DNDi): www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/.
[12] V.K.B.K. Mesu, W.M. Kalonji, C. Bardonneau, O.V. Mordt, S. Blesson, F. Simon, S. Delhomme, S. Bernhard, W. Kuziena, J.F. Lubaki, S.L. Vuvu, P.N. Ngima, H.M. Mbembo, M. Ilunga, A.K. Bonama, J.A. Heradi, J.L.L. Solomo, G. Mandula, L.K. Badibabi, F.R. Dama, P.K. Lukula, D.N. Tete, C. Lumbala, B. Scherrer, N. Strub-Wourgaft, A. Tarral, Lancet 391 (2018) 144–154.
[13] S. Patterson, S. Wyllie, S. Norval, L. Stojanovski, F.R.C. Simeons, J.L. Auer, M. Osuna-Cabello, K.D. Read, A.H. Fairlamb, eLife 5 (2016), e09744.
[14] S. Wyllie, S. Patterson, L. Stojanovski, F.R.C. Simeons, S. Norval, R. Kime, K.D. Read, A.H. Fairlamb, Sci. Transl. Med. 4 (2012) 119re1.
[15] E. Torreele, B. Bourdin Trunz, D. Tweats, M. Kaiser, R. Brun, G. Mazué, M.A. Bray, B. Pécoul, PLoS Neglected Trop. Dis. 4 (2010) e923.
[16] M. Kaiser, M.A. Bray, M. Cal, B. Bourdin Trunz, E. Torreele, R. Brun, Antimicrob. Agents Chemother. 55 (2011) 2602–5608.
[17] S. Patterson, S. Wyllie, Trends Parasitol. 30 (2014) 289–298.
[18] A.A. Voak, V. Gobalakrishnapillai, K. Seifert, E. Balczo, L. Hu, B.S. Hall, S.R. Wilkinson, J. Biol. Chem. 288 (2013) 28466–28476.
[19] S. Wyllie, S. Patterson, A. Fairlamb, Antimicrob. Agents Chemother. 57 (2013) 901–906.
[20] S. Wyllie, A.J. Roberts, S. Norval, S. Patterson, B. Foth, M. Berriman, K. Read, A.H. Fairlamb, PLoS Pathog. 12 (2016) e1005971/22.
[21] S. Wyllie, B.J. Foth, A. Kelner, A.Y. Sokolova, M. Berriman, A.H. Fairlamb, J. Antimicrob. Chemother. 71 (2016) 625–634.
[22] S. Marhadour, P. Marchand, F. Pagniez, M.-A. Bazin, C. Picota, O. Lozach, S. Ruchaud, M. Antoine, L. Meijer, N. Rachidi, P. Le Pape, Eur. J. Med. Chem. 58 (2012) 543–556.
[23] C. Castera-Ducros, L. Paloque, P. Verhaeghe, M. Casanova, C. Cantelli, S. Hutter, F. Tanguy, M. Laget, V. Remusat, A. Cohen, M.D. Crozet, P. Rathelot, N. Azas, P. Vanelle, Bioorg. Med. Chem. 21 (2013) 7155–7164.
[24] C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe, L. Paloque, S. Hutter, C. Castera-Ducros, M. Laget, S. Rault, A. Valentin, P. Rathelot, N. Azas, P. Vanelle, Bioorg. Med. Chem. 23 (2015) 2377–2386.
[25] E. Marie, S. Bouclé, C. Enguehard-Gueiffier, A. Gueiffier, Molecules 17 (2012) 10683–10707.
[26] R. Szabo, M.D. Crozet, P. Vanelle, Synthesis (2008) 127–135.
[27] C. Castera, M.D. Crozet, P. Vanelle, Heterocycles 65 (2005) 2979–2989.
[28] M.D. Crozet, C. Castera-Ducros, P. Vanelle, Tetrahedron Lett. 47 (2006) 7061–7065.
[29] Y. Kabri, P. Verhaeghe, A. Gellis, P. Vanelle, Molecules 15 (2010) 2949.
[30] K. Katsuno, J.N. Burrows, K. Duncan, R.H. van Huijsduijnen, T. Kaneko, K. Kita, C.E. Mowbray, D. Schmatz, P. Warner, B.T. Slingsby, Nat. Rev. Drug Discov. 14 (2015) 751–758.
[31] G. Mattern, Helv. Chim. Acta 60 (1977) 2062–2070.
[32] C. Zhang, S. Bourgeade-Delmas, A.F. Alvarez, A. Valentin, C. Hemmert, H. Gornitzka, Eur. J. Med. Chem. 143 (2018) 1635–1643.
[33] T.J. Mossmann, J. Immunol. Meth. 65 (1983) 55–63.
[34] R.I. da Luz, M. Vermeersch, J.-C. Dujardin, P. Cos, L. Maes, Antimicrob. Agents Chemother. 53 (2009) 5197–5203.
[35] B. Räz, M. Iten, Y. Grether-Bühler, R. Kaminsky, R. Brun, Acta Trop. 68 (1997) 139–147.
[36] T. Baltz, D. Baltz, C. Giroud, J. Crockett, EMBO J. 4 (1985) 1273–1277.
[37] S. Goyard, H. Segawa, J. Gordon, M. Showalter, R. Duncan, S.J. Turco, S.M. Beverley, Mol. Biochem. Parasitol. 130 (2003) 31–42.
[38] N. Greig, S. Wyllie, S. Patterson, A.H. Fairlamb, FEBS J. 276 (2009) 376–386.
[39] D.C. Jones, I. Hallyburton, L. Stojanovski, K.D. Read, J.A. Frearson, A.H. Fairlamb, Biochem. Pharmacol. 80 (2010) 1478–1486.

Pour compléter ces travaux, les chimistes du LPCR ont étudié un autre type de liaison carbone-carbone en position 8, et cela entre un carbone sp^2 et un carbon *sp via* la réaction de Sonogashira. De cette synthèse chimique, 21 composés ont été développés et testés *in vitro* afin d'évaluer leur cytotoxicité et leur activité antiparasitaire.

II.2.1.2. Tests *in vitro* (réaction de Sonogashira)

a) Tests de cytotoxicité

L'évaluation de la cytotoxicité des 21 composés a été faite sur des cellules HepG2 et a permis ainsi de sélectionner les composés les moins toxiques mais également ceux présentant une bonne solubilité pour la poursuite des tests. Les résultats sont les suivants (tableau 29).



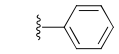
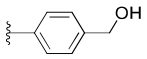
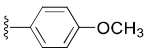
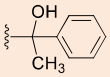
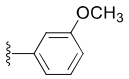
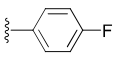
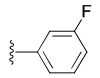
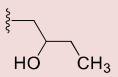
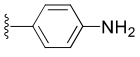
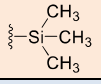
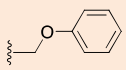
N°	Structures	CC_{50} HepG2 (µM)	N°	Structures	CC_{50} HepG2 (µM)
27		> 3,9	**38**		> 15,6
28		> 3,9	**39**		18,8
29		> 3,9	**40**		10,1
30		> 3,9	**41**		> 125
31		> 3,9	**42**		44,2
32		> 3,9	**43**		> 62,5
33		> 3,9	**44**		> 62,5
34		> 3,9	**45**		> 31,3
35		> 3,9	**46**		> 25
36		> 3,9	**47**		3,7
37		8,4	**Réf. 1**	**Hit**	**> 31**
			Réf. 2	Doxorubicine	0,2

Tableau 29. Résultats de l'évaluation de la cytotoxicité des 21 molécules issues de la réaction de Sonogashira

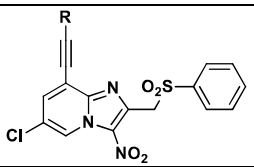
BY-NC-ND

Onze molécules ont présenté une CC_{50} insuffisante (< 4 µM) avec une trop faible solubilité empêchant leur développement pour la suite des analyses. Sur les 10 molécules restantes, six ont présenté des CC_{50} très encourageantes avec des valeurs comprises entre 25 et 125 µM avec parmi elles, 5 molécules (4 en rouge et la molécule 42 en orange) possédant une valeur de CC_{50} meilleure que celle du hit initial en bleu. Quatre molécules (en orange) possèdent quant à elles, des valeurs fixes. Ces 10 molécules ont donc été testées sur des cultures de *L. donovani* promastigote puis les meilleures ont été testées sur *L. infantum* amastigote axénique et *L. donovani* amastigote intramacrophagique (Fersing et al., 2018).

b) Mesure de l'activité antiparasitaire

Les 10 molécules sélectionnées ont également été testées vis-à-vis de la souche de *T.b.b*. AnTat 1.9 pour déterminer leur CI_{50}. La révélation s'est faite par l'utilisation de la rézasurine comme décrite précédemment (Cf : partie 1b tests *in vitro* des nitroquinoléinones).

Les résultats obtenus sont présentés ci-après (tableau 30).



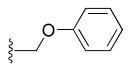
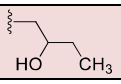
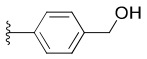
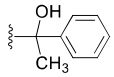
N°	Structures	CI_{50} *T.b.b* AnTat 1.9 (µM)	SI	N°	Structures	CI_{50} *T.b.b* AnTat 1.9 (µM)	SI
37		0,16	52,5	**44**		0,04	> 1563
38		0,16	> 98	**45**		0,10	> 313
39		0,13	145	**46**		0,10	> 250
40		0,12	84	**Réf. 1**	**Hit**	**2,9**	**> 10,7**
41		0,07	> 1894	**Réf. 5**	Fexinidazole	0,6	> 333
42		0,04	1028	**Réf. 6**	Éflornithine	13,3	> 7,5
43		0,12	> 521	**Réf. 7**	Suramine	0,03	> 3333

Tableau 30. Résultats de l'évaluation de l'activité trypanocide des 10 molécules

Les 10 molécules évaluées montrent une CI_{50} inférieure à 0,6 µM, valeur de CI_{50} du fexinidazole. Parmi elles, 3 (en rouge) ont une CI_{50} inférieure à 0,08 µM (molécules 41, 42 et 44) et présentent un IS très élevé, supérieur à 1 000, bien meilleur que celui du fexinidazole.

BY-NC-ND

Les molécules 41 et 44 sont donc présentées comme de nouveaux « hits » antitrypanosomals. La molécule 44 est également très efficace sur *L. donovani* promastigotes.

Les molécules 41 et 44 ont été par la suite testées par l'équipe de Dundee sur une souche sauvage 'single marker' S427 (T7RPOL TETR NEO) et une surexprimant la NTR1 de *T.b.b*. Les résultats sont les suivants (tableau 31) :

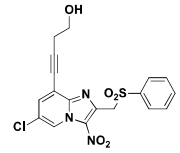
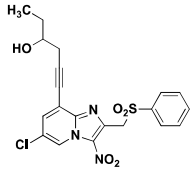
Composé n°	Structure	***T. b. brucei* trypomastigote CI_{50} [µM]**	
		Souche sauvage	Souche $NTR1^{OE}$
41		0,124	**0,0265**
44		0,200	**0,0663**
Nifurtimox		**1,870**	**0,600**

Tableau 31. Tests d'activité des molécules 41 et 44 vis-à-vis d'une souche de *T.b.b.* sauvage et une surexprimant la NTR1

Pour les 2 molécules, l'activité trypanocide sur la souche surexprimant la NTR1 est divisée par 5 pour la molécule 41 et par 3 pour la 44, montrant donc que ces dernières sont substrats de la nitroréductase. De plus, les valeurs de CI_{50} sont beaucoup plus intéressantes que celle du nifurtimox.

c) Etude de la mutagénicité et de génotoxicité

Pour compléter les analyses sur ces 2 molécules d'intérêt, un test d'Ames a été initié sur la molécule 41 pour évaluer son potentiel mutagène, tout en le comparant à la valeur de la molécule « hit » initiale. Les résultats obtenus sont les suivants (tableau 32).

BY-NC-ND

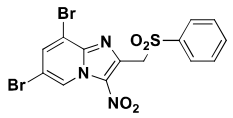
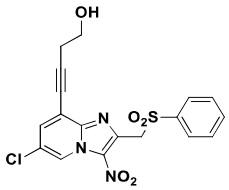
		 Molécule Hit		 (41)		Benzo[*a*]pyrène	
		2,5 mM	25 mM	2,5 mM	25 mM	2,5 mM	25 mM
Souches	TA97a + S9mix	+	+	+	+	+	+
	TA98 + S9mix	-	-	-	-	+	+
	TA100 + S9mix	-	-	+	+	+	+
	TA102 + S9mix	-	-	-	-	+	+

Tableau 32. Résultats du test d'Ames à l'encontre de la molécule 41

La molécule 41 présente un potentiel mutagène pour 2 souches de *S. typhimurium*. Par contre, aucune cytotoxicité n'a été retrouvée avec cette molécule. La réaction de Sonogashira en position 8 ne permet pas d'avoir des composés moins à risque mutagène que la molécule « hit » initiale.

En complément des études de mutagénicité, une étude de génotoxicité a été menée par l'équipe Toxalim est a permis de montrer que la molécule 41 n'était pas génotoxique (figure 59).

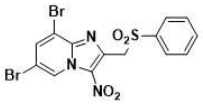
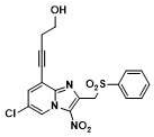
Test des comètes Négatif	 (hit)		 (41)	
	t= 2 h	72 h	t= 2 h	72 h
1 µM	-	-	-	-
10 µM	-	-	-	-
20 µM	-	-	-	-
Methane Methylsulfonate	+	+	+	+

Figure 59. Résultats du test des comètes pour la molécule 41

d) Etude du franchissement de la BHE

La molécule 41 qui semble prometteuse et pourrait constituer une molécule d'intérêt dans le traitement de la Trypanosomose Africaine doit répondre à plusieurs autres critères dont la capacité à franchir la BHE. Pour cela, un test PAMPA (décrit précédemment partie 2c tests *in*

BY-NC-ND

vitro des nitroquinoléinones) a été mis en place en utilisant les mêmes contrôles, à savoir la théophylline et la corticostérone (tableau 33).

Nom du produit	Concentration (µM)	$LogP_e$	P_e (10^{-6} cm/s)	Interprétation
(41)	100	-4,47	34,61	**Diffuse**
Théophylline	250	-6,26	0,55	**Ne diffuse pas**
Corticostérone	100	-4,86	13,86	**Diffuse**

Tableau 33. Résultats de l'évaluation du test PAMPA à l'encontre de la molécule 41

Les résultats obtenus montrent que la molécule 41 avec un Pe de 34,61.10^{-6} cm/s est capable de franchir la BHE et cela presque 3 fois mieux que la corticostérone avec une valeur de Pe de 13, 86.10^{-6} cm/s. La molécule 41 est donc tout à fait apte à franchir la BHE pour traiter un stade nerveux.

e) Etudes de pharmacocinétique

Pour continuer dans l'étude de la molécule 41 avec les données de pharmacocinétique, il a fallu évaluer son taux de fixation aux protéines plasmatiques, élément essentiel dans le développement de nouvelles thérapeutiques pour connaitre son profil ADME et ainsi pouvoir anticiper sa distribution, sa métabolisation et son élimination.

Pour cela un test de fixation à l'albumine a été initié par incubation avec du plasma humain et les résultats ont été obtenus par un suivi en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à l'Institut Pasteur de Lille (tableau 34).

Molécule	% lié	Fraction libre (f_u)	Log(f_u)
(41)	98,52 %	0,0148	-1,83
Carbamazépine	72,5 %	0,2752	-0,56
Oxazépam	95,7 %	0,0431	-1,37
Warfarine	99,35 %	0,0065	-2,19
Diclofénac	99,81 %	0,0019	-2,72

Tableau 34. Résultats du test de fixation à l'albumine pour la molécule 41

La molécule 41 présente un pourcentage de fixation aux protéines plasmatiques supérieur à 98%. A titre de comparaison, le fexinidazole a un pourcentage compris entre 87 et 95%. Toutefois il faut considérer l'équilibre entre la fraction libre et la fraction liée pour pouvoir estimer l'efficacité de la molécule. De plus, il faut également tenir compte de la lipophilie de la molécule qui va ainsi jouer un rôle dans la distribution de la molécule au sein de l'organisme.

BY-NC-ND

La molécule 41 semble donc trop fortement liée aux protéines plasmatiques avec une trop forte lipophilie pour pouvoir se distribuer correctement au sein de l'organisme entier.

Dans le même temps, une étude de la stabilité microsomale *in vitro* a été réalisée sur microsomes hépatiques murins afin de connaitre son temps de demi-vie et ainsi pouvoir estimer son devenir *in vivo* (figure 60).

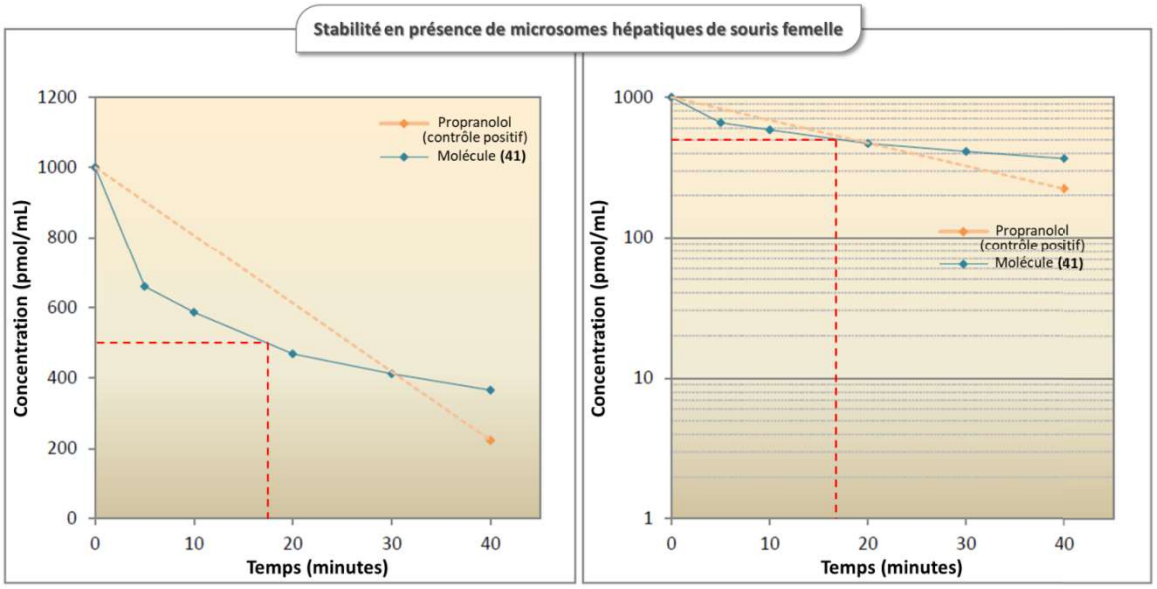


Figure 60. Résultats de la stabilité microsomale de la molécule 41

La molécule 41 présente un $T_{1/2}$ de 16 min, alors que le propranolol, utilisé comme témoin est métabolisé à plus de 80 % au bout de 40 min. La molécule 41 est métabolisée à 63 % au bout des 40 min. Ainsi malgré un temps de demi-vie court, elle reste une bonne candidate pour une étude *in vivo*, bien que la priorité est de rechercher des molécules suffisamment stables au court du temps pour avoir le maximum de chance de traitement.

A la suite de ces 2 séries de réactions de Suzuki-Miyaura et Sonogashira, 42 molécules ont été synthétisées et testées *in vitro* pour évaluer leur caractère cytotoxique et leur solubilité pour la poursuite des analyses. De ces 42 molécules, 23 ont pu poursuivre les tests de détermination des CI_{50} sur des souches de *Leishmania* et de *T.b.b.* A l'issue de ces tests, des analyses de mutagénicité ont été réalisées sur 2 composés les plus prometteurs (1 dans la série Suzuki-Miyaura (molécule 23, prometteuse contre les leishmanies), et 1 dans la série Sonogashira (molécule 41), bien que les molécules les plus prometteuses sur *T.b.b.* soient les molécules 14 et 41 (tableau 35).

BY-NC-ND

Concernant la molécule 41, elle est positive au test d'Ames, mais cela est à nuancer devant la présence du groupement nitro, substrat des nitroréductases parasitaires et bactériennes. De plus sa forte liaison aux protéines plasmatiques et son faible temps de demi-vie pourraient être un frein pour la suite des études, mais devraient être complétés pas des études *in vivo* pour évaluer son potentiel. Pour l'heure, aucune analyse de mutagénicité ou de pharmacocinétique n'a été entreprise sur la molécule 14.

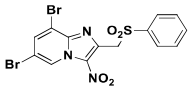
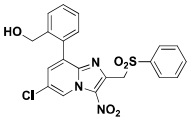
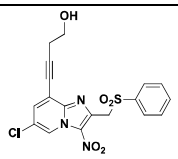
	 **Molécule Hit**	 **(14)**	 **(41)**
CC_{50} HepG2 (µM)	> 31	88	> 125
CI_{50} *T.b.b.* trypo. (µM) Index de sélectivité	2,9 > 10,7	0,16 550	0,07 > 1894
Bioactivation chez *T. brucei*	-	NTR1	NTR1
Test d'Ames	Positif	-	Positif
Test des comètes	Négatif	-	Négatif
Demi-vie microsomale	-	-	16 min
Taux de fixation aux protéines plasmatiques	-	-	98,52 %
Test PAMPA BHE	-	-	Positif

Tableau 35. Bilan des tests menés sur cette première série de molécules

II.2.1.3. Tests *in vivo* (réaction de Sonogashira)

La molécule 41 a réuni toutes les conditions pour être évaluée sur un modèle *in vivo*. Suivant les protocoles mis en place pour la molécule 76 des nitroquinoléinones, la DMSET a été mesurée, les paramètres pharmacocinétiques ont été calculées et son activité trypanocide observée.

a) Recherche de la Dose Maximale Tolérée et de la Dose maximale sans effet toxique

Quatre souris ont reçu par gavage, 50 µL d'une dose à 100 mg/kg de molécule 41. Aucun effet indésirable n'a été observé chez les 4 souris au cours des 24 premières heures suivant l'administration et aucun effet indésirable n'a été recensé au cours du mois suivant ce traitement (tableau 36). La DMSET a donc été fixée à 100 mg/kg. Toutefois nous avons pris

BY-NC-ND

la décision de ne pas tester de dose supérieure à 100 mg/kg. La DMT n'a donc pas été recherchée pour cette molécule.

	Solvant	Molécule 41 100 mg/kg	Fexinidazole 100 mg/kg
Effets indésirables	0/4	0/4	0/4

Tableau 36. Suivi des signes cliniques observés sur les souris pour déterminer la DMSET (n=4 souris dans chaque lot)

Toutes les analyses ultérieures ont été réalisées à partir de la dose de 100 mg/kg.

b) Etude de pharmacocinétique

Suivant le protocole établi pour la molécule 76 des nitroquinoléinones, une étude de pharmacocinétique a été mise en place afin de juger de la fréquence d'administration de la molécule 41. En effet, *in vitro*, les résultats montraient que la molécule 41 avait un $T_{1/2}$ de 16 min avec une métabolisation à 63% au bout de 40 min, il est donc nécessaire de vérifier son profil ADME pour les futurs traitements.

Quatre souris ont donc reçu 100 mg/kg en dose unique par gavage et des prélèvements de sang ont été effectués à 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h et 24 h à la queue des souris. Une extraction aux QuEChERS a été réalisée avant une analyse par spectrométrie de masse à la suite de la validation de la méthode de dosage (annexe 2).

Les résultats obtenus ont été analysés par le logiciel Monolix (figure 61, tableau 37).

BY-NC-ND

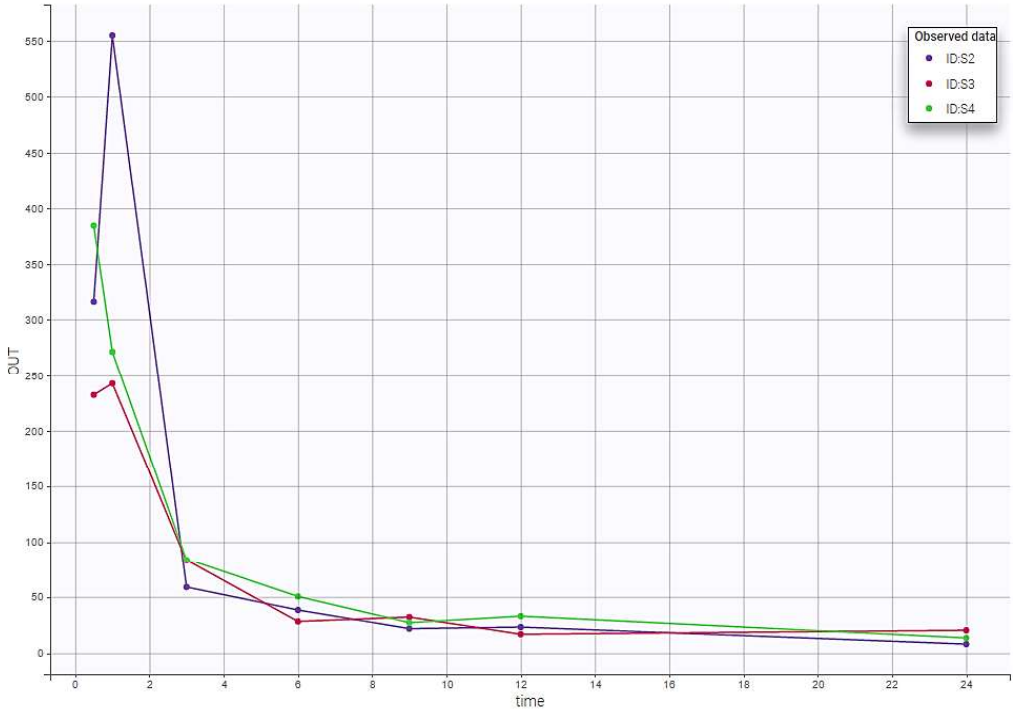


Figure 61. Résultats des concentrations plasmatiques de la molécule 41 pour les 3 souris
(Axe Y : Concentrations en ng/mL, axe X : Temps en h) (logiciel Monolix) (le logiciel ne permet pas de visualiser les valeurs SD sur ce graphique)

	Cmax (ng/mL) ± SD	Tmax (h) ± SD	$T_{1/2}$ (h) ± SD	$AUC_{0\text{-}inf}$ (ng.h/mL) ± SD	Clairance (mL/h) ± SD
molécule 41	393,96 ± 156,36	0,83 ± 0,29	10,01 ± 3,02	1433,05 ± 69,92	2,44 ± 0,03

Tableau 37. Résultats des paramètres pharmacocinétiques de la molécules 41 après une administration PO
(souris n=3, concentration de 100 mg/kg, dose unique)

Pour la molécule 41, seulement 3 souris sur les 4 ont été inclues dans l'analyse de pharmacocinétique. En effet, la souris 1 a été exclue, car elle présentait des résultats aberrants avec notamment un Tmax à 9h. Cette différence de résultats peut s'expliquer par une régurgitation de l'animal provoquant une absorption différée par rapport à ses congénères.

Les résultats obtenus montrent un Tmax relativement court inférieur à 1 h. Mais le $T_{1/2}$ de 10h permet d'envisager une diffusion lente du produit, et donc une libération progressive de la molécule 41 confirmée par une faible clairance d'élimination de 2,44 mL/h. La Cmax de l'ordre de 400 ng/mL montre une perte importante de la molécule à la suite de l'administration de 100 mg/kg correspondant à une concentration de 72 mg/mL.

BY-NC-ND

Il a donc été décidé d'administrer la dose de 100 mg/kg en dose unique à des souris parasitées.

c) Mesure de l'activité trypanocide

Suivant les expériences réalisées pour la molécule 76, 4 souris ont été infectées par voie IP par une souche de *T.b.b.* AnTat 1.9 (2 000 parasites dans 100 µL). Chaque souris infectée a par la suite reçu une dose unique de 100 mg/kg par gavage à hauteur de 50 µL. Le schéma d'administration se base sur maximum 5 jours de traitement.

Un comptage de la parasitémie a été réalisée avant le premier traitement puis chaque jour de nouvelles administrations (figure 62, tableau 38).

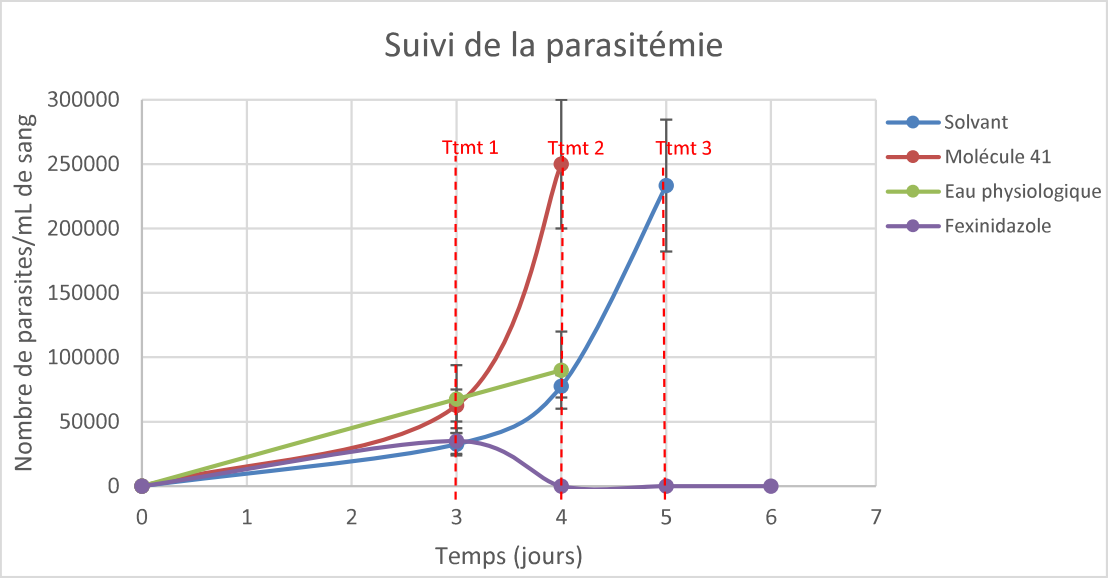


Figure 62. Suivi de la parasitémie chez les souris traitées avec la molécule 41 et avec les témoins (n=4 souris ; traits rouges : les jours de traitement)

	Molécule	Dose (mg/kg x Nombre de jours de traitement)	Guéries/Infectées
T.b.b. AnTat 1.9	Solvant		0/4
	41	100 x 2	0/4
	Eau Physiologique		0/4
	Fexinidazole	100 x 3	4/4

Tableau 38. Détermination *in vivo* de l'efficacité de la molécule 41 sur la souche *T.b.b.* AnTat 1.9

Les 4 souris ayant reçu la molécule 41 sont mortes au 2ème jour post traitement après une charge parasitaire croissante. Pour comprendre pourquoi la molécule 41 ne fonctionne pas *in*

BY-NC-ND

vivo alors qu'elle possède toutes les caractéristiques pour répondre favorablement, une étude d'inhibition de la métabolisation a été initiée comme pour la molécule 76.

d) Etude de l'inhibition des cytochromes P450 et recherche d'une activité trypanocide

Suivant le protocole établi pour la molécule 76 des nitroquinoléinones, une étude a été initiée en utilisant de l'ABT afin d'inhiber les CYP450 pouvant métaboliser la molécule 41 et provoquer une baisse de l'activité. Lors des tests *in vitro*, la molécule 41 était métabolisée à 63% au bout de 40 min. Il est donc intéressant de voir si cela se retrouve *in vivo* et si cela explique l'absence d'efficacité. Une administration de 50 mg/kg par voie IP d'ABT a été réalisée 2h avant le traitement avec 100 mg/kg de molécule 41.

Les résultats obtenus sont les suivants (figure 63).

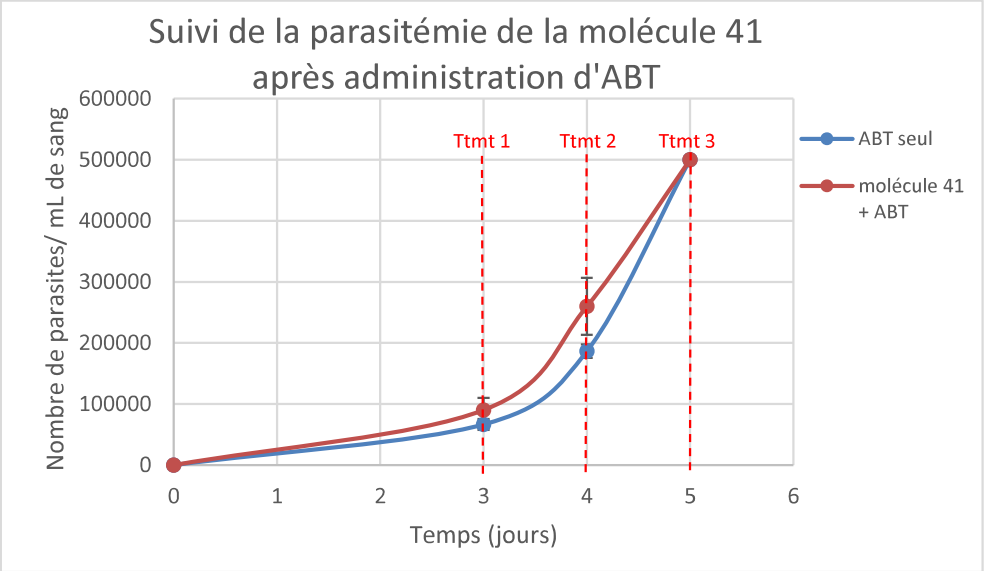


Figure 63. Suivi de la parasitémie après traitement à l'ABT + molécule 41
(n=3 souris ; traits rouges : les jours de traitements)

Les résultats obtenus montrent qu'après inhibition des CYP450 par administration de l'ABT, la molécule 41 ne présente pas d'amélioration de son efficacité. Malgré tout, nous avons trouvé pertinent de rechercher ses métabolites afin de comprendre pourquoi notre molécule n'est pas efficace *in vivo*.

BY-NC-ND

e) Recherche des éventuels métabolites dans les fluides biologiques

La molécule 41 a donc été administrée à hauteur de 100 mg/kg en dose unique à 2 nouvelles souris suivant le protocole établi pour la molécule 76 des nitroquinoléinones. Une heure post administration, un prélèvement sanguin a été réalisé et réparti en 2 tubes hépariné et non hépariné pour récupérer du sérum et du sang total, puis le souris ont été placées dans des cages à métabolisme pour collecter des urines et fèces sur 12h et 24h. L'extraction qui s'en suit se base sur la méthode des QuECHERS.

Suivant les mêmes conditions d'analyse que la molécule 76, une analyse en GUS puis en MRM ont été réalisées pour la mise en évidence des métabolites potentiellement présents issus de la molécule 41. Au total, 6 métabolites ont été identifiés, et 4 ont pu être caractérisés en suivant leur profil chromatographique, leur masse et leur temps de rétention. Ces métabolites sont présents dans les fluides biologiques de façon variable en suivant leur structure chimique. Les résultats obtenus sont présentés ci-après avec un comparatif entre les résultats MRM obtenus sur le sang au bout de 1 h, et sur les urines et les fèces au bout de 12 h. Nous pouvons alors voir la présence de la molécule 41, du composé réduit (-NO_2 réduit en -NH_2) issus de la métabolisation de phase 1, du composé réduit -NHOH, du composé réduit et glucuronoconjugué (issu de la métabolisation de phase 1 puis de phase 2), et de 3 autres métabolites potentiels non caractérisés de masse 440, 541 g/mol et le 440 glucuronoconjugué (figures 64 et 65). Les structures des métabolites pourront par la suite être validées par leur synthèse chimique.

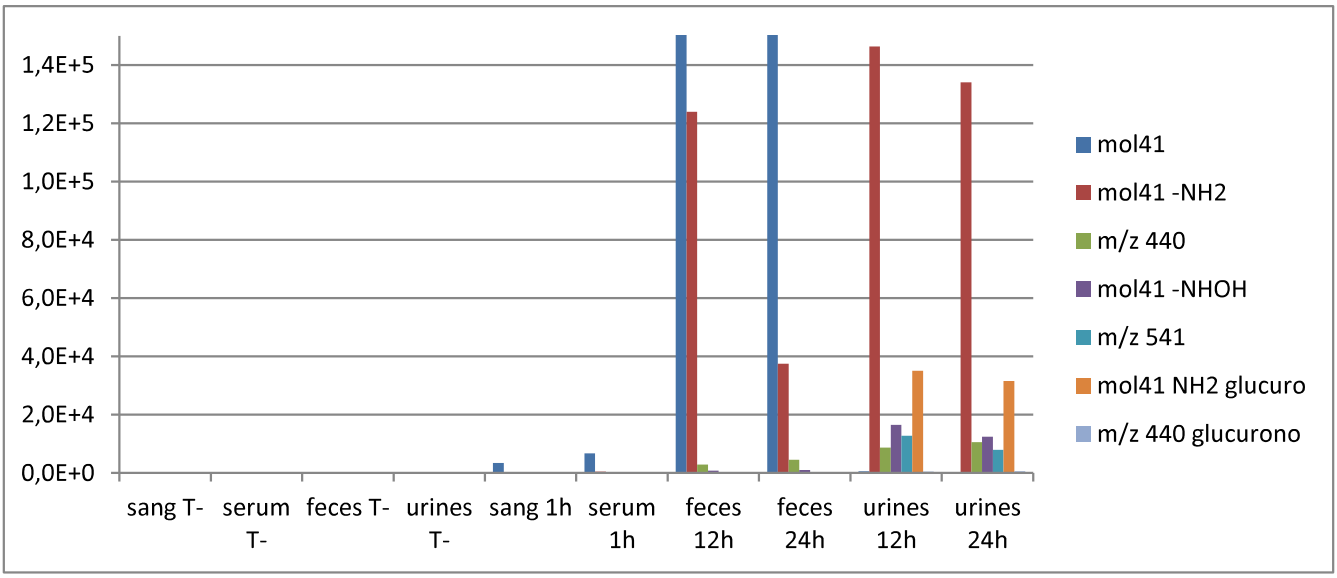


Figure 64. Histogrammes de présence dans les fluides biologiques de la molécule 41 et de ses métabolites

BY-NC-ND

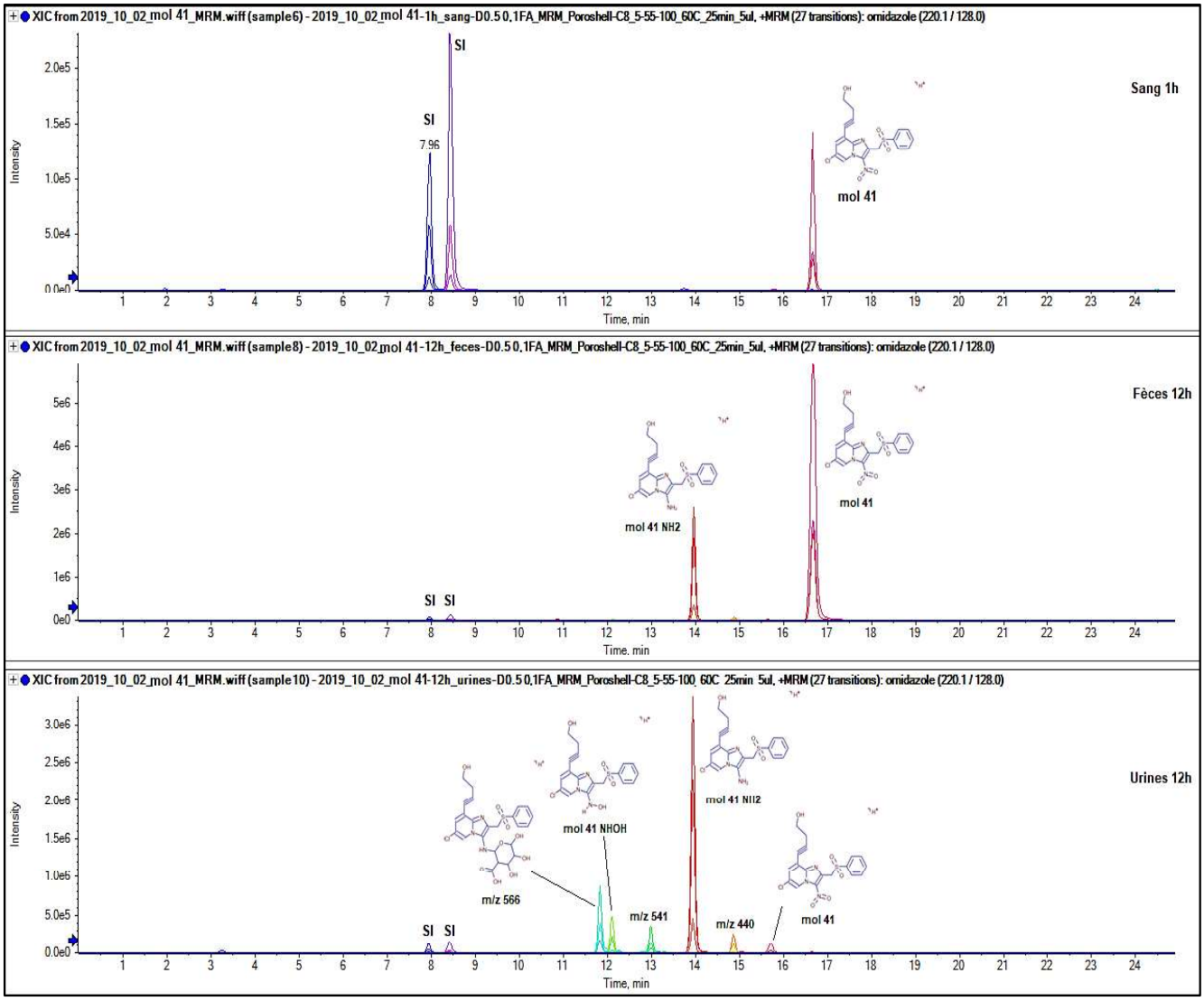


Figure 65. Chromatogrammes MRM pour la molécule 41 et ses métabolites dans 3 fluides biologiques
(Les métabolites sont classés suivants leur temps de rétention)

Les standards internes ont les mêmes proportions pour tous les échantillons. En fonction de l'intensité des métabolites présents dans les fluides biologiques, les standards internes sont alors plus ou moins tassés.

Une publication est en cours de rédaction pour valoriser ce travail effectué sur la molécule 41 : « 8-Alkynyl-3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridines display potent *in vitro* activity toward *T. b. brucei* and *T. cruzi* after bioactivation by type 1 nitroreductases".

BY-NC-ND

II.2.2. Etude des 28 molécules dérivées de la 8-(phénylthio)imidazo[1,2-*a*]pyridines (partie 2)

Vingt-huit molécules sont obtenues à la suite d'une substitution radicalaire nucléophile de type $S_{RN}1$. Cette réaction fait intervenir entre autre des motifs thiophénol, aniline ou phénol en position 8 du pharmacophore (figure 66).

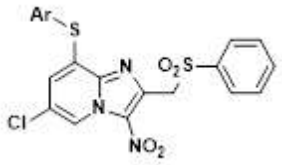


Figure 66. Structure mère des 28 molécules

Les 28 molécules portant un groupement thioéther en position 8 ont donc pu être évaluées *in vitro* afin de rechercher un futur « hit ».

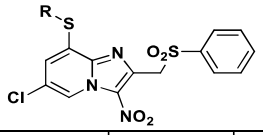
II.2.2.1. Tests *in vitro*

a) Tests de cytotoxicité

La détermination de la CC_{50} avec notamment l'évaluation de la solubilité des composés permet de sélectionner les molécules pouvant avoir un intérêt pour la détermination de la CI_{50}.

Les 28 molécules ont donc été mises en contact avec des cellules HepG2 pour évaluer leur cytotoxicité. Les résultats sont les suivants (tableau 39).

BY-NC-ND



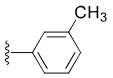
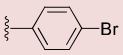
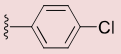
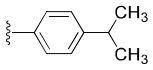
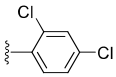
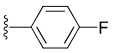
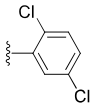
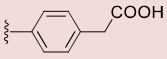
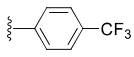
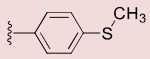
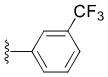
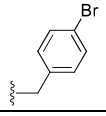
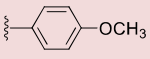
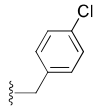
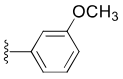
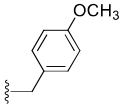
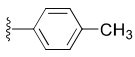
N°	Structures	CC_{50} HepG2 (µM)	N°	Structures	CC_{50} HepG2 (µM)
48		> 3,9	**63**		> 5,6
49		> 62,5	**64**		> 3,9
50		> 100	**65**		> 15,6
51		> 3,9	**66**		> 25
52		> 5	**67**		> 3,9
53		> 5	**68**		> 3,9
54		> 3,9	**69**		> 62,5
55		> 5	**70**		> 62,5
56		> 3,9	**71**		> 62,5
57		> 3,9	**72**		> 3,9
58		> 4,1	**73**		> 3,9
59		> 62,5	**74**		> 3,9
60		> 15,6	**75**		> 3,9
61		> 50	**Réf. 1**	**Hit initial**	**> 31**
62		> 3,9	**Réf. 2**	Doxorubicine	0,2

Tableau 39. Résultats de l'évaluation de la cytotoxicité des 28 molécules

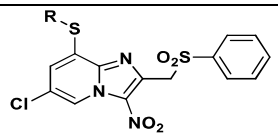
BY-NC-ND

Parmi les 28 molécules, 18 d'entre elles ont présenté une hydrosolubilité trop insuffisante pour poursuivre les tests avec des CC_{50} < 5 µM. Ces 18 molécules ont donc été arrêtées pour la suite des analyses. Sur les 10 molécules restantes, 3 molécules ont une CC_{50} comprise entre 15 et 25 µM donc une solubilité modérée, et les 7 dernières molécules (en rouge) présentent une CC_{50} > 50 µM. Les 10 dernières molécules vont donc poursuivre les tests de détermination de CI_{50} sur les souches de *Leishmania* et *Trypanosoma*.

b) Mesure de l'activité antiparasitaire

Au final, seuls 4 composés parmi les 10 présélectionnés ont été testés sur la souche de *T.b.b. in vitro* selon le protocole précédemment décrit utilisant la rézasurine (Cf Partie 1b tests *in vitro* des nitroquinoléinones).

Les résultats sont les suivants (tableau 40).



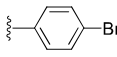
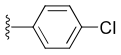
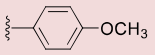
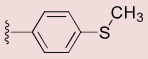
N°	Structures	CI_{50} *T.b.b.* AnTat 1.9 (µM)	SI	N°	Structures	CI_{50} *T.b.b.* AnTat 1.9 (µM)	SI
49		3,8	> 16,5	**Réf. 1**	**Hit initial**	**2,9**	**> 10,7**
50		1,3	> 76,9	**Réf. 5**	Fexinidazole	0,56	> 357,1
59		0,27	> 231,5	**Réf. 6**	Éflornithine	13,59	7,4
71		0,18	> 347,2	**Réf. 7**	Suramine	0,03	> 3333

Tableau 40. Résultats de l'évaluation de l'activité trypanocide des 4 molécules

Ces 4 molécules présentent des CI_{50} très intéressantes avec des valeurs comprises entre 0,18 et 3,8 µM. Notamment les molécules 59 et 71 (en rouge) qui ont les meilleurs profils avec des valeurs de 0,27 et 0,18 µM respectivement, valeurs en deçà de celle du fexinidazole (0,56 µM). Toutefois, lorsque l'on regarde les valeurs d'IS, seule la molécule 71 avec un IS > 347 se rapproche de celui du fexinidazole de 357.

Aucune des 4 molécules de cette série ne présente un profil aussi intéressant que la molécule 41 de la série de la réaction de Sonogashira. La molécule 50, ayant une CI_{50} de 1,3 µM à

BY-NC-ND

l'encontre de *T.b.b.* AnTat 1.9, a été évaluée comme le nouveau « hit » antileishmanien avec une valeur moyenne de 1,48 µM suivant les souches de leishmanies utilisées. Il a donc subi par la suite des tests de mutagénicité et de génotoxicité.

c) Evaluation de la mutagénicité et de la génotoxicité

La molécule 50 a été évaluée par un test d'Ames en la comparant au « hit » initial, tout comme lors des séries de Suzuki-Miyaura et Sonogashira. Les résultats obtenus sont présentés ci-après (tableau 41).

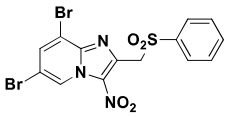
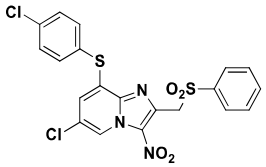
		 **Molécule hit initiale**		 **(50)**		**Benzo[*a*]pyrène** **Référence**	
		2,5 mM	25 mM	2,5 mM	25 mM	2,5 mM	25 mM
Souches	TA97a	+	+	-	-	+	+
	TA97a + S9mix	+	+	-	-	+	+
	TA98	+	+	-	-	+	+
	TA98 + S9mix	-	-	-	-	+	+
	TA100	+	+	-	-	+	+
	TA100 + S9mix	-	-	-	-	+	+
	TA102	+	+	-	-	+	+
	TA102 + S9mix	-	-	-	-	+	+

Tableau 41. Résultats du test d'Ames à l'encontre de la molécule 50

La molécule 50 a été testée dans les mêmes conditions que lors des tests précédents. Aucune des souches de *Salmonella* en présence ou en l'absence de S9 mix à deux concentrations différentes ne répondent positivement à la molécule 50. Cette dernière ne semble donc pas mutagène. La présence du groupement *p*-chlorophénylthioéther en position 8 semble favorable à l'absence de mutagénicité bien que la molécule soit un nitroaromatique.

Pour compléter les données concernant sa toxicité, un test des comètes a été fait par l'équipe Toxalim afin de vérifier l'absence de génotoxicité de la molécule 50 à l'encontre de cellules HepG2 (tableau 41 et figure 67).

BY-NC-ND

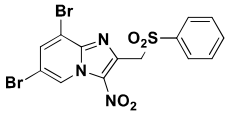
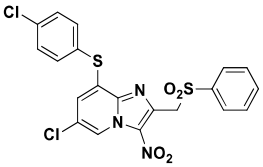
Test des comètes Négatif	 (hit)		 (50)	
	t= 2 h	72 h	t= 2 h	72 h
1 µM	-	-	-	-
10 µM	-	-	-	-
20 µM	-	-	-	-
Methane Methylsulfonate	+	+	+	+

Tableau 42. Résultats du test des comètes pour la molécule hit et pour la molécule 50

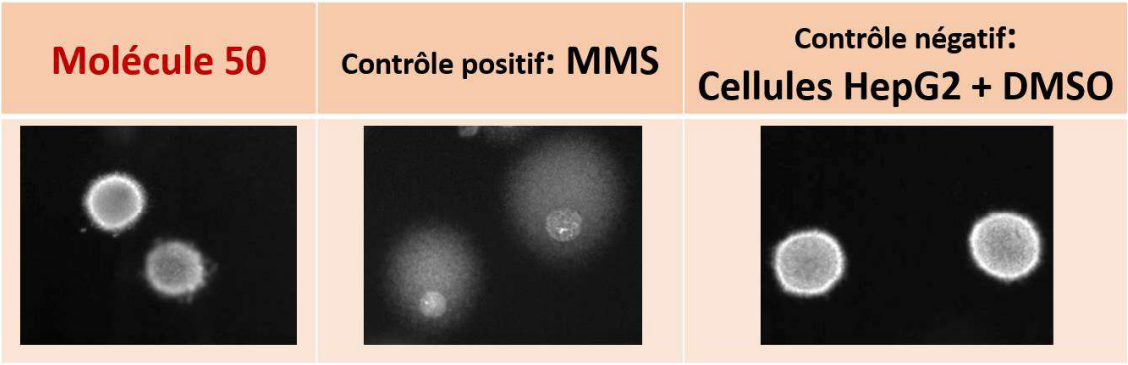


Figure 67. Résultats du test des comètes pour la molécule 50
(Grossissement x200) (MMS : MethaneMéthylSulfonate)

Les deux molécules (hit et 50) sont négatives au test des comètes et cela aux 3 concentrations testées et à 2 temps différents. Cette molécule 50 qui répond négativement au test d'Ames et au test des comètes est une bonne candidate pour la poursuite des études. En effet, aucune lésion de l'ADN n'a pu être mis en évidence (absence de comètes sur les photos). La molécule « hit », quant à elle, était positive au test d'Ames mais négative en génotoxicité. Ceci prouve donc la limite du test d'Ames par l'emploi de souche bactérienne possédant des nitroréductases capables de réduire les nitroaromatiques et donc de donner des faux positifs.

d) Etudes de pharmacocinétique

La molécule 50 a subi des analyses de pharmacocinétique afin de connaitre son taux de fixation aux protéines plasmatiques et son temps de demi-vie.

BY-NC-ND

Une première mesure du taux de fixation aux protéines plasmatiques a été réalisée (tableau 43).

Molécule	% lié	Fraction libre (f_u)	Log(f_u)
(50)	99,95 %	0,0005	-3,28
Carbamazépine	72,5 %	0,2752	-0,56
Oxazépam	95,7 %	0,0431	-1,37
Warfarine	99,35 %	0,0065	-2,19
Diclofénac	99,81 %	0,0019	-2,72

Tableau 43. Résultats du test de fixation à l'albumine pour la molécule 50

Les résultats montrent que la molécule 50 est très fortement liée aux protéines plasmatiques, à plus de 99%. Cette forte liaison pourrait être un frein au développement de la molécule pour des études *in vivo*. Il faudra voir si l'équilibre entre fraction libre et fraction liée est en faveur de la molécule. Par la suite, une mesure de la stabilité microsomale sur microsomes hépatiques murins a été réalisée (figure 68).

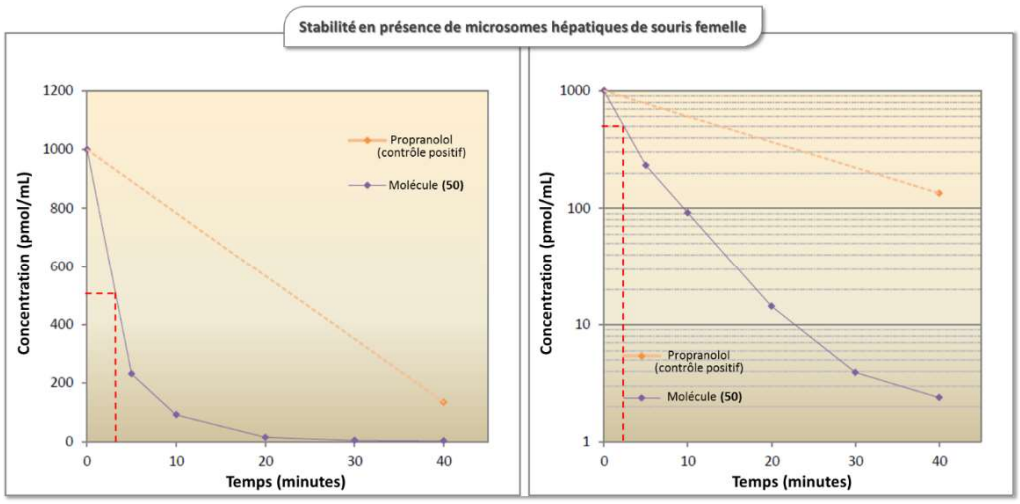


Figure 68. Résultats de la stabilité microsomale de la molécule 50

La molécule 50 présente un $T_{1/2}$ inférieur à 5 minutes (de l'ordre de 3 minutes). La molécule est donc très rapidement métabolisée, traduisant une instabilité importante. Elle pourrait donc sembler peu prometteuse pour un développement *in vivo*. Or, sa structure suggère qu'il s'agit d'une prodrogue dont la métabolisation est nécessaire pour donner des métabolites actifs. La présence du groupement thiophényl pourrait être réduit en sulfoxyde ou sulfone (comme c'est le cas pour le fexinidazole où ces derniers sont les composés actifs et sont plus stables que la molécule mère).

BY-NC-ND

Une synthèse de 2 composés dérivés de la molécule 50 a été réalisée afin d'obtenir un dérivé sulfoxide et un dérivé sulfone.

Suivant le même schéma, leur cytotoxicité a été évaluée en parallèle de leur activité sur des souches de *Leishmania* et *Trypanosoma*. Les résultats obtenus sont les suivants (tableau 44).

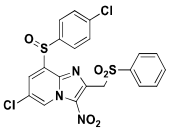
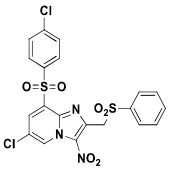
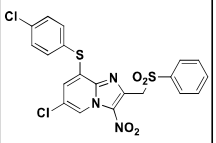
Composé n°	Structure	CI_{50} (µM)	Cytotoxicité (µM)	
		T.b.b.	CC_{50} HepG2	CC_{50} THP1
(99)		0,6	> 12,5	> 12,5
(100)		1,0	> 12,5	> 12,5
(50)		1,3	> 100	> 62,5
Réf. 1	Féxinidazole	0,56	> 200	> 62,5
Réf. 2	Miltéfosine	-	> 40	21,9
Réf. 3	Amphotéricine B	-	8,8	3,6
Réf. 4	Éflornithine	13,59	> 100	-
Réf. 5	Suramine	0,03	> 100	-

Tableau 44. Evaluation de l'activité trypanocide et de la cytotoxicité des composés 99 et 100 dérivant de la molécule 50

L'activité trypanocide de ces 2 composés semblent plus intéressantes que la molécule mère. Toutefois, la présence de groupement sulfoxide et sulfone entrainent une baisse de la solubilité avec des valeurs de CC_{50} bien inférieures, de l'ordre de 12,5 µM.

Une étude de pharmacocinétique de la molécule 100 a été réalisée au sein de l'équipe Pasteur de Lille, et a montré que cette dernière semble légèrement moins liée aux protéines plasmatiques (99% au lieu de 99,95%), son temps de demi-vie est toujours aussi court, traduisant donc une étape supplémentaire de biotransformation.

BY-NC-ND

e) Etude du franchissement de la barrière intestinale

Une étude de franchissement des barrières a été réalisée sur la molécule 50 mais cette fois-ci il s'agit d'une étude de mesure PAMPA-GIT (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay - GastroIntestinal Tract absorption) (Bujard et al., 2017). Suivant les mêmes conditions que pour l'étude du franchissement de la BHE, la molécule 50 a été mise en contact avec un premier milieu et une mesure du franchissement de la barrière intestinale a été faite en comparaison avec deux témoins, le kétoprofène capable de diffuser et l'antipyrine qui ne diffuse pas. Les résultats obtenus sont les suivants (tableau 45).

Nom produit	Concentration testée	Log Pe pH = 5	Log Pe pH = 6	Log Pe pH = 7.4	Interprétation
50	**100 µM**	**-6,21**	**-6,26**	**-6,34**	**Ne diffuse pas**
Antipyrine	100 µM	-5,77	-5,76	-5,70	**Ne diffuse pas**
Kétoprofène	100 µM	-5,88	-4,92	-4,37	**Diffuse à pH 6 et 7,4**

Tableau 45. Résultats de l'évaluation du test PAMPA-GIT pour la molécule 50

La molécule 50 présente un log de Pe compris entre 6,21 et 6,34 signifiant qu'elle ne diffuse pas au travers de la barrière intestinale et cela à pH acide comme neutre. Ceci pose alors la question d'une administration orale si une fois dans l'estomac, la molécule active n'est plus capable de franchir les barrières pour se retrouver dans le sang.

Pour conclure sur cette deuxième partie portant sur le développement de molécules issues de pharmacomodulation en position 8 par l'introduction d'un lien hétéro-atomique au niveau du pharmacophore imidazo[1,2-*a*]pyridine, 28 molécules ont été synthétisées et évaluées *in vitro*. Parmi les 10 ayant répondu positivement au test de cytotoxicité (valeurs de CC_{50} comprises entre 15,6 et 100 µM), quatre (49, 50, 59, 71) ont été testées sur la souche de *Trypanosoma*. Les valeurs de CI_{50} comprise entre 0,18 et 3,8 µM sont prometteuses notamment pour les molécules 59 et 71 avec des IS supérieurs à 200. Toutefois, la molécule 50 avec une CI_{50} de 1,3 µM sur *Trypanosoma*, a été qualifiée de « hit » antileishmanien et a donc poursuivi les tests de mutagénicité et de génotoxicité. Répondant négativement à ces 2 tests, la structure de la molécule 50 présente un profil intéressant pour de futures pharmacomodulations. Son temps de demi-vie très court (3 minutes), sa forte liaison aux protéines plasmatiques (99,95%) et son incapacité à franchir la barrière intestinale pourraient laisser penser à une absence d'efficacité *in vivo*, qu'il reste encore à déterminer.

BY-NC-ND

Ce travail a pu être valorisé par la publication d'un article en 2019 « Nongenotoxic 3-Nitroimidazo[1,2-*a*]pyridines Are NTR1 Substrates That Display Potent in Vitro Antileishmanial Activity » (Fersing et al., 2019).

BY-NC-ND

Nongenotoxic 3-Nitroimidazo[1,2-*a*]pyridines Are NTR1 Substrates That Display Potent in Vitro Antileishmanial Activity

Cyril Fersing, Louise Basmaciyan, **Clotilde Boudot**, Julien Pedron, Sébastien Hutter, Anita Cohen, Caroline Castera-Ducros, Nicolas Primas, Michèle Laget, Magali Casanova, Sandra Bourgeade-Delmas, Mélanie Piednoel, Alix Sournia-Saquet, Valère Belle Mbou, Bertrand Courtioux, Élisa Boutet-Robinet, Marc Since, Rachel Milne, Susan Wyllie, Alan H. Fairlamb, Alexis Valentin, Pascal Rathelot, Pierre Verhaeghe, Patrice Vanelleet Nadine Azas

Publié en décembre 2018

Résumé:

Vingt-neuf dérivés originaux du 3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine, portant un groupement phénylthio (ou benzylthio) en position 8 du composé mère, ont été synthétisés. L'évaluation *in vitro* a mis en évidence le composé 5 comme molécule antiparasitaire à succès présentant une faible cytotoxicité pour la lignée cellulaire HepG2 humaine (CC_{50} > 100 µM). De bonnes activités antileishmaniennes (CI_{50} = 1-2,1 µM) contre *L. donovani*, *L. infantum* et *L. major* et de bonnes activités antitrypanosomales (CI_{50} = 1,3-2,2 µM) contre *T. brucei brucei* et *T. cruzi* ont été mises en évidence, comparativement à plusieurs médicaments de référence comme la miltefosine, le fexinidazole, l'éflornithine et le benznidazole (CI_{50} = 0,6 à 13,3 µM). La molécule 5, a un faible potentiel rédox (E° = -0,63 V), et a été sélectivement bioactivée par la nitroreductase de type 1 (NTR1) de *L. donovani*. Il est important de noter que la molécule 5 n'est ni mutagène (test d'Ames négatif), ni génotoxique (test des comètes négatif), contrairement à de nombreux autres nitroaromatiques. La molécule 5 présente une faible stabilité microsomale ; toutefois, son métabolite principal (sulfoxyde) demeure à la fois actif et non mutagène, ce qui en fait un bon candidat pour de nouvelles études *in vivo*.

BY-NC-ND

This is an open access article published under a Creative Commons Attribution (CC-BY) License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the author and source are cited.

ACS Medicinal Chemistry Letters
Cite This: ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 34−39
Letter
pubs.acs.org/acsmedchemlett

Nongenotoxic 3-Nitroimidazo[1,2-*a*]pyridines Are NTR1 Substrates That Display Potent *in Vitro* Antileishmanial Activity

Cyril Fersing,[†] Louise Basmaciyan,[‡] Clotilde Boudot,[§] Julien Pedron,[∥] Sébastien Hutter,[‡] Anita Cohen,[‡] Caroline Castera-Ducros,[†] Nicolas Primas,[†] Michèle Laget,[◇] Magali Casanova,[‡] Sandra Bourgeade-Delmas,[⊥] Mélanie Piednoel,[†] Alix Sournia-Saquet,[∥] Valère Belle Mbou,[¶] Bertrand Courtioux,[§] Élisa Boutet-Robinet,[#] Marc Since,[▽] Rachel Milne,[○] Susan Wyllie,[○] Alan H. Fairlamb,[○] Alexis Valentin,[⊥] Pascal Rathelot,[†] Pierre Verhaeghe,[*,∥] Patrice Vanelle,[†] and Nadine Azas[‡]

[†]Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR 7273, Équipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France

[‡]Aix Marseille Univ, IRD, AP-HM, SSA, VITROME, Marseille, France

[§]Université de Limoges, UMR INSERM 1094, Neuroépidémiologie Tropicale, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges, France

[∥]LCC−CNRS Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France

[¶]CHU de Limoges, Service d'anatomopathologie, 2 avenue Martin Luther King, 87042 Limoges, France

[◇]Aix Marseille Univ, INSERM, UMR MD1, U1261, SSA, MCT, Marseille, France

[⊥]UMR 152 PharmaDev, Université de Toulouse, IRD, UPS, Toulouse, France

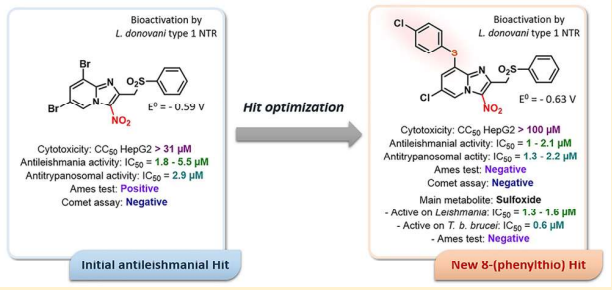
[#]Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

[▽]Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, Normandie Univ., UNICAEN, CERMN, 14000 Caen, France

[○]University of Dundee, School of Life Sciences, Division of Biological Chemistry and Drug Discovery, Dow Street, Dundee DD1 5EH, Scotland, United Kingdom

Supporting Information

ABSTRACT: Twenty nine original 3-nitroimidazo[1,2-*a*]-pyridine derivatives, bearing a phenylthio (or benzylthio) moiety at position 8 of the scaffold, were synthesized. *In vitro* evaluation highlighted compound **5** as an antiparasitic hit molecule displaying low cytotoxicity for the human HepG2 cell line (CC_{50} > 100 μM) alongside good antileishmanial activities (IC_{50} = 1−2.1 μM) against *L. donovani*, *L. infantum*, and *L. major*; and good antitrypanosomal activities (IC_{50} = 1.3−2.2 μM) against *T. brucei brucei* and *T. cruzi*, in comparison to several reference drugs such as miltefosine, fexinidazole, eflornithine, and benznidazole (IC_{50} = 0.6 to 13.3 μM). Molecule **5**, presenting a low reduction potential ($E°$ = −0.63 V), was shown to be selectively bioactivated by the *L. donovani* type 1 nitroreductase (NTR1). Importantly, molecule **5** was neither mutagenic (negative Ames test), nor genotoxic (negative comet assay), in contrast to many other nitroaromatics. Molecule **5** showed poor microsomal stability; however, its main metabolite (sulfoxide) remained both active and nonmutagenic, making **5** a good candidate for further *in vivo* studies.



KEYWORDS: *Leishmania ssp, imidazopyridine, nitroaromatic, nitroreductases, Ames test, comet assay*

Trypanosomatids are flagellated protozoan parasites that belong to the Kinetoplastid order. These unicellular parasites are responsible for several vector borne diseases in mammals. Among the trypanosomatids, *Leishmania spp* and *Trypanosoma spp* are the two main parasites encountered in human pathology and responsible for lethal infections: visceral leishmaniasis (VL),[1] human African trypanosomiasis (HAT),[2] or Chagas disease (CD).[3] These neglected tropical diseases threaten millions of people worldwide with current total deaths estimated at 30,000 per annum, mainly in tropical and

Received: July 31, 2018
Accepted: December 19, 2018
Published: December 19, 2018

Downloaded via INSERM on January 22, 2019 at 10:24:52 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

subtropical areas.[4] New efficient, safe, and cheap oral anti-Kinetoplastid agents are urgently needed due to the major limitations of the few currently available drugs (i.e., toxicity, mode of administration, cost) and the emergence of resistant parasites (mainly toward antimony derivatives and miltefosine).[5] In this context, small azaheterocyclic molecules, including imidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives,[6] are studied to enrich the antitrypanosomatid drug discovery pipeline.[7,8]

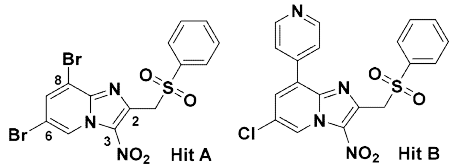
Recently, nitroaromatic molecules, such as fexinidazole[9] and delamanid,[10] showed a renewed interest against infectious diseases such as HAT, VL, CD, and even tuberculosis.[11] Indeed, these compounds act as prodrugs, requiring the bioactivation of their nitro group into reduced reactive intermediates, in order to display their antiparasitic properties. This bioactivation step is catalyzed by nitroreductases (NTR), enzymes found in some bacteria and parasites, but not in mammalian cells. Thus, the concept of exploiting NTR to activate prodrugs is an attractive strategy to target selectively pathogen parasites and bacteria.

Two NTRs have been identified and characterized in *Leishmania spp*: (i) an essential mitochondrial type 1 NTR (NTR1)[12] catalyzing a two-electron reduction reaction and that bioactivates 5-nitroimidazoles like fexinidazole[13,14] and (ii) a cytosolic type 2 NTR (NTR2)[15] catalyzing a monoelectronic reduction reaction. NTR2 more particularly activates bicyclic nitroheterocycles containing a 4-nitroimidazole moiety, such as delamanid and pretomanid.[16] In *Trypanosoma brucei spp*, only the type 1 NTR was discovered, mediating the bioactivation of the nitroaromatic drugs benznidazole[17] and nifurtimox.[18] To date, the structures of parasitic NTRs remain unknown, as no X-ray diffraction data is available. Thus, drug design techniques such as docking cannot be applied for designing new NTR substrates.

Previously, we reported the antileishmanial activity of 3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives. After identifying a hit molecule bearing bromine atoms at positions 6 and 8 of the imidazopyridine ring (hit **A**),[19] a pharmacomodulation study led to a series of 8-aryl-6-chloro-3-nitroimidazo[1,2-*a*]-pyridines that displayed an improved activity against *Leishmania spp* and *Trypanosoma b. brucei*,[20] suggesting the key role of the substituent at position 8 of the scaffold (Figure 1).

In a continuation of this project, we wanted to explore the influence of the insertion of a heteroatomic bridge between the imidazopyridine ring and an aryl group at position 8, using a synthetic route to functionalize antiparasitic azaheterocycles by a phenylthio moiety.[21,22] We applied this synthetic procedure to a previously described substrate: 8-bromo-6-chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine.[20] Twenty-six original nitroaromatic derivatives bearing a sulfur group at position 8 were then synthesized, using various thiophenol or benzylthiol reagents. The majority of these compounds were prepared with moderate to good yields (58−95%). The use of disubstituted thiophenols (compounds **20**−**22**) led to lower yields (31−38%).

All synthesized molecules were first screened *in vitro* against the promastigote form of *L. donovani* and potencies were compared to those achieved with commercial reference drugs (i.e., amphotericin B, miltefosine, and pentamidine) along with drug-candidate fexinidazole (Table 1). To assess antiparasitic selectivity, the cytotoxicity of all compounds was measured against the HepG2 human cell line, using doxorubicin as control.



	Hit A	Hit B
IC_{50} *L. donovani* promastigotes (μM)	1.8	1.2
IC_{50} *L. donovani* Intramacrophage amastigotes (μM)	5.5	2.3
IC_{50} *L. infantum* axenic amastigotes (μM)	4.4	3.0
IC_{50} *T. brucei brucei* trypomastigotes (μM)	2.9	0.25
CC_{50} *HepG2* / CC_{50} *THP1* (μM)	>31 / >25	>50 / >25

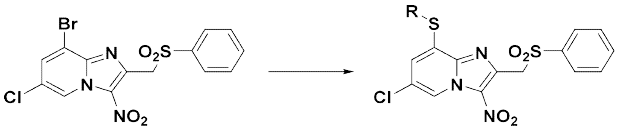
Figure 1. Structure of previously reported hit molecules **A** and **B** in 3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine series.

About half of the tested molecules showed poor solubility in the culture medium and could not be tested against the HepG2 cell line above 4−6 μM. This is particularly noted with the four benzylthioether derivatives **23** to **26**, which could not be tested. Three compounds (**10**, **18**, and **20**) showed moderate solubility in the culture medium, ranging from 15.6 to 25 μM. Finally, four molecules, all presenting a *para*-substituted thiophenyl moiety, showed satisfactory CC_{50} values, above 50 μM, indicating both good solubility in the culture medium and a low cytotoxicity on the tested cell line. Among the 22 molecules evaluated on the promastigote stage of *L. donovani*, only compound **19** was found to be devoid of antileishmanial activity, perhaps due to its charged carboxylate group. The active molecules display IC_{50} values ranging between 1.0 and 2.3 μM, slightly lower than miltefosine and comparable to fexinidazole. Two compounds (**2** and **5**) functionalized with a *p*-halophenylsulfane group are particularly promising and can be considered as hit compounds, with respective selectivity index of >62.5 and >100 (2 to 4 times better than miltefosine). The 3D structure of hit compound **5** was confirmed by X-ray diffraction (see Supporting Information).

A secondary screening was conducted on hit molecules **2** and **5**, against the intramacrophage amastigote stage of *L. donovani* and *L. major*, on the promastigote stage of *L. major* and on *L. infantum* axenic amastigotes. The CC_{50} values for these molecules (Table 2) were also determined against THP1 monocyte cell line. None of these compounds showed cytotoxic effects on THP1 cells up to 62.5 μM. Molecule **5** showed the best activities against intracellular *L. donovani* and *L. major* amastigotes (IC_{50} values of 1.3 and 2.1 μM, respectively), three times better than miltefosine against *L. donovani*. Compound **5** also returned an IC_{50} value of 1.7 μM against *L. infantum* axenic amastigotes, about two times lower than fexinidazole. This compound also demonstrated promising activity against the promastigote stage of *L. major* (IC_{50} = 1.3 μM). Moreover, molecules **2** and **5** also demonstrated *in vitro* activity against *Trichomonas vaginalis* (IC_{50} = 4.6−5.0 μM), comparable to that of the reference drug metronidazole (IC_{50} = 4.2 μM). This efficacy against *T. vaginalis*, also found with fexinidazole,[23] is probably due to similar modes of bioactivation by parasitic nitroreductases.[24] Nevertheless, compared with atovaquone (IC_{50} = 1 nM), the activity of

DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00347
ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 34−39

Table 1. Synthesis, *in Vitro* Antileishmanial Activity, and Cytotoxicity of 3-Nitroimidazopyridine Derivatives 1–26[a]



Cmpd	R-	*L. donovani* promastigotes IC_{50} (μM)	cytotoxicity HepG2 CC_{50} (μM)	selectivity index[f]
1	C_6H_5-	1.7 ± 0.1	>3.9[d]	>2.3
2	**4-Br-C_6H_4-**	**1.0 ± 0.3**	**>62.5**[d]	>62.5
3	2-Cl-C_6H_4-	1.4 ± 0.3	>5[d]	>3.6
4	3-Cl-C_6H_4-	0.7 ± 0.1	>3.9[d]	>3.6
5	**4-Cl-C_6H_4-**	**1.0 ± 0.3**	**>100**[d]	>100
6	2-F-C_6H_4-	1.2 ± 0.3	>5[d]	>4.2
7	3-F-C_6H_4-	1.2 ± 0.2	>3.9[d]	>2.1
8	4-F-C_6H_4-	1.3 ± 0.3	>5[d]	>3.8
9	2-CH_3O-C_6H_4-	2.3 ± 0.2	>50[d]	>21.7
10	3-CH_3O-C_6H_4-	2.3 ± 0.4	>15.6[d]	>6.8
11	4-CH_3O-C_6H_4-	1.5 ± 0.3	>62.5[d]	>41.7
12	2-CF_3-C_6H_4-	1.5 ± 0.3	>4.1[d]	>2.7
13	3-CF_3-C_6H_4-	1.3 ± 0.2	>3.9[d]	>2.4
14	4-CF_3-C_6H_4-	2.1 ± 0.3	>3.9[d]	>1.5
15	2-CH_3-C_6H_4-	1.7 ± 0.3	>3.9[d]	>1.5
16	3-CH_3-C_6H_4-	1.4 ± 0.2	>5.6[d]	>4
17	4-CH_3-C_6H_4-	1.4 ± 0.2	>3.9[d]	>2.2
18	4-*i*prop-C_6H_4-	1.6 ± 0.1	>25[d]	>15.6
19	4-(CH_2COOH)-C_6H_4-	65.6 ± 1.3	>62.5[d]	>1
20	2,3-di-Cl-C_6H_3-	2.0 ± 0.1	>25[d]	>12.5
21	2,4-di-Cl-C_6H_3-	1.7 ± 0.1	>3.9[d]	>2.2
22	2,5-di-Cl-C_6H_3-	1.3 ± 0.1	>3.9[d]	>1.5
23	C_6H_5-CH_2-	NS[g]	NS[g]	-
24	4-Br-C_6H_4–CH_2-	NS[g]	NS[g]	-
25	4-Cl-C_6H_4–CH_2-	NS[g]	NS[g]	-
26	4-CH_3O-C_6H_4-CH_2-	NS[g]	NS[g]	-
amphotericin B[c]		0.07 ± 0.01	8.8 ± 0.2	125.7
miltefosine[c]		3.1 ± 0.2	85 ± 8.8	27.4
pentamidine[c]		6.0 ± 0.8	2.3 ± 0.5	0.4
fexinidazole[c]		1.2 ± 0.20	>200[e]	>166.7
doxorubicin[b]		-	0.2 ± 0.05	-

[a]Reagents and conditions: thiophenol or benzylthiol reagent (1 equiv), NaH (1 equiv), DMSO, N_2, RT, 0.5–2 h. [b]Doxorubicin was used as a cytotoxic reference drug. [c]Amphotericin B, Miltefosine, Pentamidine, and Fexinidazole were used as antileishmanial reference drugs. [d]The product could not be tested at higher concentrations in the culture medium. [e]The CC_{50} value was not reached at the highest tested concentration. [f]SI = CC_{50} HepG2/IC_{50} *L. donovani* promastigote. [g]NS = nonsoluble in the culture medium. In bold: hit molecules.

compound **5** against *Plasmodium falciparum* (K1 strain) is negligible (IC_{50} = 19 μM), demonstrating its selectivity for the parasites expressing nitroreductases. Finally, the *in vitro* antitrypanosomal activity of compounds **2** and **5** were evaluated against the bloodstream form of *T. b. brucei* and the epimastigote form of *T. cruzi* and compared to reference drugs (i.e., eflornithine, suramin, benznidazole, and nifurtimox) and to drug candidate fexinidazole (Table 2). With IC_{50} values ranging from 1.3 to 6.2 μM, these molecules showed a better activity than eflornithine against *T. b. brucei* and a better activity than fexinidazole against *T. cruzi*, while molecule **5** was two times less active than drug candidate fexinidazole on *T. b. brucei* and two times less active than benznidazole on *T. cruzi*. Finally, the amino derivative **27** of hit-compound **5**, prepared by reduction of the nitro group, was tested *in vitro* (Table 3). As expected, **27** did not show antileishmanial activity (IC_{50} = 32 to 124 μM) and presented a limited antitrypanosomal activity (IC_{50} = 11 μM), in accordance with the hypothesis that these nitroaromatic molecules require bioactivation by parasitic NTRs, making the nitro group a key element of the pharmacophore.

To investigate the pharmaceutical potential of compound **5** (best molecule in the series) further, its microsomal stability was measured after incubation with hepatic microsomes isolated from female mice. Molecule **5** exhibited a poor stability with a half-life ($T_{1/2}$ of propranolol control = 26 min) of 3 min. An LC/MS/MS study (see Supporting Information) enabled us to identify that the primary metabolite of **5** was a sulfoxide derivative. This sulfoxide metabolite (**28**) was then synthesized from **5**, along with a probable secondary sulfone metabolite (**29**), respectively, by partial or complete oxidation of the sulfur atom, using *m*-CPBA (Table 3). The activities of metabolite **28** and molecule **29** were evaluated *in vitro* against *Leishmania spp* and *T. b. brucei*. Both molecules demonstrated promising activity against the promastigote stage of *L. donovani* and of *L. infantum* axenic amastigotes. Likewise, both molecules also demonstrated antitrypanosomal activity, thus compound **5** appears to resemble fexinidazole in that it is similarly metabolized into bioactive sulfoxide and sulfone derivatives.[13] These results suggest that the poor microsomal stability of **5** should not be a barrier to further *in vivo* evaluation.

The mutagenicity of many nitroaromatic molecules has been known for many years.[25] Nevertheless, considering the therapeutic potential of these molecules, many attempts have been made to dissociate their anti-infective activity from their mutagenic character.[26] However, the difficulty remains that the anti-infective mechanism(s) of these compounds involves the formation of mutagenic derivatives within microorganisms.[27] The *Salmonella typhimurium* strains used in the Ames test, the most common method for assessing the mutagenicity of a substance, also express nitroreductases,[28] particularly type 1. This may explain why nitrated molecules are generally identified as mutagens in this test. The mutagenic properties of hit **A**, molecule **5**, and sulfoxide metabolite **28** were then evaluated by the Ames test, using four classical strains of *S. typhimurium* expressing NTRs, both with and without addition of the metabolizing S9 mixture. Hit **A** shows a mutagenic character in the absence of S9 mix on each strain of *S. typhimurium*, as well as on the TA97a strain in metabolizing conditions. Interestingly, the Ames test was negative on all four strains of *Salmonella* exposed to molecules **5** or **28**, with or without S9 mix (Table 4). Molecules **5** and its principal metabolite **28** therefore appeared as nonmutagenic nitroaromatic derivatives in the Ames test. Thus, the introduction of a *p*-chlorophenylthioether group at position 8 of the imidazo[1,2-*a*]pyridine ring, along with the oxidation of the sulfur atom, seem to favor selectivity for parasitic NTRs.

To complete the toxicological profile of hit compound **5**, a comet assay using a HepG2 human hepatic cell line, which does not express any NTR, was carried out on hit **A** and molecule **5**. HepG2 cells were incubated with the drugs for 2

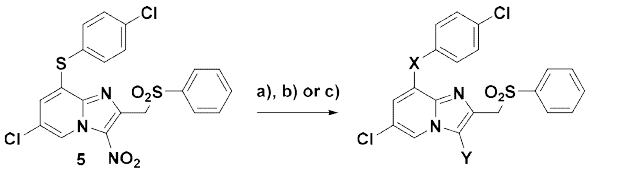
DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00347
ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 34–39

Table 2. *In Vitro* Antiparasitic Profile of Compounds 2 and 5 toward Kinetoplastids

Cmpd	*L. donovan* intramacrophage amastigotes IC_{50} (μM)	*L. infantum* axenic amastigotes IC_{50} (μM)	*L. major* promastigotes IC_{50} (μM)	*L. major* intramacrophage amastigotes IC_{50} (μM)	*T. brucei brucei* trypanosomes IC_{50} (μM)	*T. cruzi* epimastigotes IC_{50} (μM)	THP1 CC_{50} (μM)
2	3.5 ± 0.3	9.0 ± 1.4	1.3 ± 0.2	5	3.8 ± 0.45	6.2 ± 1.9	>62.5[e]
5	**1.3 ± 0.1**	**1.7 ± 0.3**	**1.3 ± 0.2**	**2.1 ± 0.1**	**1.3 ± 0.11**	**2.2 ± 0.08**	**>62.5**[e]
amphotericin B[a]	0.4 ± 0.01	0.06 ± 0.001	0.6 ± 0.08	0.2 ± 0.07	-	-	3.6 ± 0.7
miltefosine[a]	4.3 ± 1.7	0.8 ± 0.2	-	-	-	-	>40[e]
fexinidazole[a,b,c]	>50[d]	3.4 ± 0.8	-	-	0.6 ± 0.05	8.9 ± 0.7	>62.5[d]
eflornithine[b]	-	-	-	-	13.3 ± 2.1	-	-
suramin[b]	-	-	-	-	0.03 ± 0.004	-	-
benznidazole[c]	-	-	-	-	-	1.2 ± 0.1	-
nifurtimox[c]	-	-	-	-	-	0.3 ± 0.02	-

[a]Amphotericin B, miltefosine, and fexinidazole were used as antileishmanial reference drugs. [b]Eflornithine, suramin, and fexinidazole were used as anti-*T. b. brucei* reference drugs. [c]Fexinidazole, benznidazole, and nifurtimox were used as anti-*Trypanosoma cruzi* reference drugs. [d]Molecule was not tested at higher concentrations. [e]Molecules could not be tested at higher concentrations because of a lack of solubility in the culture media.

Table 3. Synthesis of Imidazopyridine Derivatives 27, 28 (Metabolite), and 29 and Their Biological Activities[a]

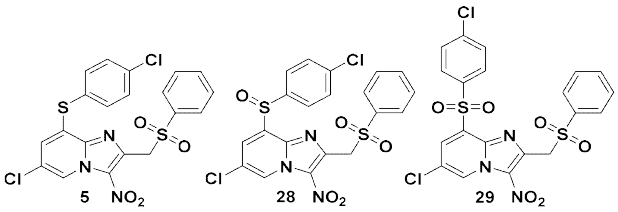


a; X = S, Y = NH_2, **27**, 90% yield
a; X = SO, Y = NO_2, **28**, 42% yield
b; X = SO_2, Y = NO_2, **29**, 45% yield

Cmpd	*L. donovani* pro. IC_{50} (μM)	*L. infantum* axe. ama. IC_{50} (μM)	*T. brucei brucei* trypo. IC_{50} (μM)	HepG2 CC_{50} (μM)
5	1.0 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.3 ± 0.45	>100
27	124.0 ± 1.1	31.6 ± 2.7	10.6 ± 1.2	>62.5[b]
28	1.3 ± 0.3	1.6 ± 0.4	0.6 ± 0.11	>12.5[b]
29	1.3 ± 0.3	3.7 ± 0.5	1.0 ± 0.05	>12.5[b]

[a]Reagents and conditions: (a) Fe (10 equiv), AcOH, reflux, 40 min; (b) *m*CPBA (1 equiv), DCM, 0 °C, 3 h; (c) *m*CPBA (2 equiv), DCM, RT, 24 h. [b]Compounds could not be tested at higher concentrations due to a poor aqueous solubility.

Table 4. Complementary *in Vitro* Biological Evaluations for Molecules 5, 28, and 29



molecule 5	
Ames test (at 250 μM and 2.5 mM ± S9 mix)	negative
Comet assay (at 2 and 72 h; 1, 10, and 20 μM)	negative
CHI $LogD_{7.4}$	4.26
thermodynamic aqueous solubility (μM)	1.4
binding % to human albumin	99.95
microsomal stability: $t_{1/2}$ (min)	3
IC_{50} *L. donovani* promastigote wild-type strain (μM)	0.26
IC_{50} *L. donovani* promastigote NTR1 overexpressing strain (μM)	0.033
IC_{50} *L. donovani* promastigote NTR2 overexpressing strain (μM)	0.3
molecule 28	
Ames test (at 62.5 and 625 μM ± S9 mix)	negative
molecule 29	
IC_{50} *L. donovani* promastigote wild-type strain (μM)	0.6
IC_{50} *L. donovani* promastigote NTR1 overexpressing strain (μM)	0.08
IC_{50} *L. donovani* promastigote NTR2 overexpressing strain (μM)	0.7

or 72 h (Table 4). No increase in the percentage of DNA laddering was observed for these two compounds at the three tested concentrations: 1, 10, and 20 μM (see Supporting Information). These molecules are therefore not genotoxic according to this test. This assay reveals, for hit **A**, a profile identical to fexinidazole or metronidazole: a mutagenic character shown by the Ames test and no genotoxic properties objectified on mammalian cells (micronucleus test or comet assay).[29] However, molecule **5** was neither mutagenic nor genotoxic.

Among the accepted criteria for the selection of antiparasitic candidate for preclinical evaluation,[30] the percentage of albumin binding may affect both the distribution and the elimination of the molecule under consideration. The binding percentage to human albumin of compound **5** was measured by LC/MS, after incubation in the presence of human plasma, and compared with four reference drugs. With a bound fraction of 99.95% ($\log(f_u) = -3.28$), this molecule is therefore strongly bound to albumin (Table 4). The chromatographic hydrophobicity index (CHI) of molecule **5** was also determined and provides a $logD_{7.4}$ value of 4.26, making this molecule very lipophilic, in accordance with a high albumin binding (Table 4). However, the binding of a drug to plasma proteins was shown to have little effect on the *in vivo* efficacy of this drug when its mechanism of action results in a covalent binding to its target,[31] which is the likely mode of action proposed for anti-infective nitroaromatics. Moreover, the high lipophilicity of **5** may facilitate its activity against the amastigote stage, by increasing its penetration into both macrophages and parasites.

In order to check that compounds **5** and **29** were substrates of parasitic NTRs, their IC_{50} values were determined on three strains of *L. donovani* promastigotes: a wild type strain, a strain overexpressing NTR1, and a strain overexpressing NTR2. The IC_{50} of **5** and **29** are about eight times lower in the strain overexpressing NTR1 than the two other strains (Table 4). These data demonstrate that these compounds are selectively bioactivated by NTR1 in *L. donovani*, the same type 1

DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00347
ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 34−39

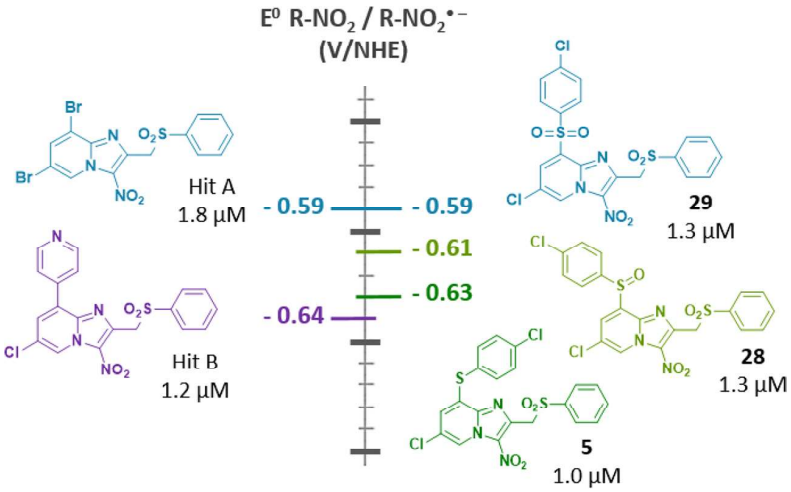


Figure 2. Reduction potentials measured for hit **A**, hit **B**, hit compound **5**, metabolite **28**, and derivative **29**.

nitroreductase that is responsible for the bioactivation of fexinidazole and its associated metabolites.

On the basis that molecules **5**, **28**, and **29** could be substrates of parasitic nitroreductases, we determined their reduction potential to examine whether the absence of mutagenicity of molecules **5** and **28** (and probable selectivity for *L. donovani* NTR1 *versus S. typhimurium* NTRs) was associated with a lower reduction potential. For the three tested molecules (as for the two hit molecules **A** and **B**), the cyclic voltammogram showed a reversible single electron reduction for a 1 $V \cdot s^{-1}$ scan rate, corresponding to the formation of a nitro radical anion. The measured reduction potentials of compounds **5**, **28**, and **29** ranged from −0.63 to −0.59 V/NHE. As expected, the more oxidized the sulfur atom in position 8, the higher the reduction potential (Figure 2). Nonmutagenic molecules **5** and **28** presented a lower reduction potential than mutagenic Hit **A**, but the difference in E° values was not significant. Thus, steric parameters should be explored in order to explain the atypical behavior of the current series that is selectively bioactivated by *L. donovani* NTR1 and not by *S. typhimurium* type 1 NTR. These data suggest that the introduction of a thiophenyl moiety at position 8 of the scaffold maintains affinity for the parasitic type 1 NTR while decreasing the affinity for the bacterial counterpart.

Finally, a preliminary *in vivo* toxicity study was conducted on swiss mice (three mice per group) that were treated by intraperitoneal administration (50 μL) of molecule **5** at either 1 (group 1) or 10 (group 2) mg/kg for 5 days. There was no sign of acute toxicity noted on living mice. In each group, a mouse was sacrificed at D7, D15, or D30 and autopsied. Histology analysis (brain, liver, kidney, spleen, heart, lung, adipose tissues, and muscles) did not reveal any sign of chronic toxicity in group 1. In group 2, only a discrete inflammatory infiltrate was detected in the liver, classified as nonspecific, and a hypodermic lymph node was observed in the skin in addition to some fibrosis and inflammation at the injection site (see Supporting Information).

In summary, introducing a *para*-chlorophenylthioether moiety at position 8 of the antileishmanial 3-nitroimidazo-[1,2-*a*]pyridine pharmacophore led to hit molecule **5** that displayed improved *in vitro* antikinetoplastid activity against both *Leishmania* (*donovani* and *infantum*) and *Trypanosoma* (*brucei brucei* and *cruzi*) parasites, in comparison with the previously identified hit molecules in the series. Moreover, **5** was the first compound in the series that was neither mutagenic nor genotoxic. It presented a short microsomal half-life due to transformation into the sulfoxide metabolite (**28**) that remains active and nonmutagenic. Hit compound **5** presents a low reduction potential and is selectively bioactivated by *L. donovani* NTR1. These results make molecule **5** a good candidate for a hit to lead program focused on developing novel and safe nitroaromatic drug candidates that selectively target flagellated protozoans.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00347.

Experimental details and characterization (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: pierre.verhaeghe@univ-tlse3.fr.

ORCID

Élisa Boutet-Robinet: 0000-0002-5223-4568
Susan Wyllie: 0000-0001-8810-5605
Alan H. Fairlamb: 0000-0001-5134-0329
Pierre Verhaeghe: 0000-0003-0238-2447

Author Contributions

All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Aix-Marseille Université, the Université de Toulouse,and the CNRS. A.H.F. and S.W. are supported by funding from the Wellcome Trust (WT105021). C.F. thanks the Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille for hospital appointment. J.P. thanks the Université Paul Sabatier and the Conseil Régional Occitanie for PhD funding. C.P. and A.B.(Institut Pasteur de Lille) are acknowledged for their contribution in determining PK parameters.

DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00347
ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 34−39

■ ABBREVIATIONS

CHI, chromatographic hydrophobicity index; CD, Chagas disease; HAT, human African trypanosomiasis; NTR, nitroreductase; VL, visceral leishmaniasis

■ REFERENCES

(1) Burza, S.; Croft, S. L.; Boelaert, M. Leishmaniasis. *Lancet* **2018**, *392*, 951−970.

(2) Büscher, P.; Cecchi, G.; Jamonneau, V.; Priotto, G. Human African trypanosomiasis. *Lancet* **2017**, *390* (10110), 2397−2409.

(3) Pérez-Molina, J. A.; Molina, I. Chagas Disease. *Lancet* **2018**, *391*, 82−94.

(4) (a) World Health Organization (WHO). http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. (b) http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/. (c) http://www.who.int/chagas/en/.

(5) Bilbe, G. Overcoming neglect of kinetoplastid diseases. *Science* **2015**, *348* (6238), 974−976.

(6) Silva, D. G.; Gillespie, J. R.; Ranade, R. M.; Herbst, Z. M.; Nguyen, U. T. T.; Buckner, F. S.; Montanari, C. A.; Gelb, M. H. New class of antitrypanosomal agents based on imidazopyridines. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8* (7), 766−770.

(7) Konstantinović, J.; Videnović, M.; Orsini, S.; Bogojević, K.; D'Alessandro, S.; Scaccabarozzi, D.; Jovanović, N. T.; Gradoni, L.; Basilico, N.; Šolaja, B. A. Novel aminoquinoline derivatives significantly reduce parasite load in *Leishmania infantum* infected mice. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9* (7), 629−634.

(8) Devine, W.; Thomas, S. M.; Erath, J.; Bachovchin, K. A.; Lee, P. J.; Leed, S. E.; Rodriguez, A.; Sciotti, R. J.; Mensa-Wilmot, K.; Pollastri, M. P. Antiparasitic lead discovery: toward optimization of a chemotype with activity against multiple protozoan parasites. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8* (3), 350−354.

(9) Chappuis, F. Oral fexinidazole for human African trypanosomiasis. *Lancet* **2018**, *391* (10116), 100−102.

(10) Patterson, S.; Wyllie, S.; Norval, S.; Stojanovski, L.; Simeons, F. R.; Auer, J. L.; Osuna-Cabello, M.; Read, K. D.; Fairlamb, A. H. The anti-tubercular drug delamanid as a potential oral treatment for visceral leishmaniasis. *eLife* **2016**, *5*, No. e09744.

(11) Fairlamb, A. H.; Patterson, S. Current and future prospects of nitro-compounds as drugs for trypanosomiasis and leishmaniasis. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, DOI: 10.2174/0929867325666180426164352.

(12) Voak, A. A.; Gobalakrishnapillai, V.; Seifert, K.; Balczo, E.; Hu, L.; Hall, B. S.; Wilkinson, S. R. An essential type I nitroreductase from *Leishmania major* can be used to activate leishmanicidal prodrugs. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (40), 28466−28476.

(13) Wyllie, S.; Patterson, S.; Stojanovski, L.; Simeons, F. R.; Norval, S.; Kime, R.; Read, K. D.; Fairlamb, A. H. The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4* (119), 119re1.

(14) Wyllie, S.; Patterson, S.; Fairlamb, A. H. Assessing the essentiality of *Leishmania donovani* nitroreductase and its role in nitro drug activation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57* (2), 901−906.

(15) Wyllie, S.; Roberts, A. J.; Norval, S.; Patterson, S.; Foth, B. J.; Berriman, M.; Read, K. D.; Fairlamb, A. H. Activation of bicyclic nitro-drugs by a novel nitroreductase (NTR2) in *Leishmania*. *PLoS Pathog.* **2016**, *12* (11), No. e1005971.

(16) Patterson, S.; Wyllie, S.; Stojanovski, L.; Perry, M. R.; Simeons, F. R.; Norval, S.; Osuna-Cabello, M.; De Rycker, M.; Read, K. D.; Fairlamb, A. H. The *R* enantiomer of the antitubercular drug PA-824 as a potential oral treatment for visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57* (10), 4699−4706.

(17) Hall, B. S.; Wilkinson, S. R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (1), 115−123.

(18) Hall, B. S.; Bot, C.; Wilkinson, S. R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (15), 13088−13095.

(19) Castera-Ducros, C.; Paloque, L.; Verhaeghe, P.; Casanova, M.; Cantelli, C.; Hutter, S.; Tanguy, F.; Laget, M.; Remusat, V.; Cohen, A.; Crozet, M. D.; Rathelot, P.; Azas, N.; Vanelle, P. Targeting the human parasite *Leishmania donovani*: Discovery of a new promising anti-infectious pharmacophore in 3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine series. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (22), 7155−7164.

(20) Fersing, C.; Boudot, C.; Pedron, J.; Hutter, S.; Primas, N.; Castera-Ducros, C.; Bourgeade-Delmas, S.; Sournia-Saquet, A.; Moreau, A.; Cohen, A.; Pratviel, G.; Crozet, M. D.; Wyllie, S.; Fairlamb, A.; Valentin, A.; Rathelot, P.; Azas, N.; Courtioux, B.; Verhaeghe, P.; Vanelle, P. 8-Aryl-6-chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridines as potent antitrypanosomatid molecules bioactivated by type 1 nitroreductases. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *157*, 115−126.

(21) Verhaeghe, P.; Dumètre, A.; Castera-Ducros, C.; Hutter, S.; Laget, M.; Fersing, C.; Prieri, M.; Yzombard, J.; Sifredi, F.; Rault, S.; Rathelot, P.; Vanelle, P.; Azas, N. 4-Thiophenoxy-2-trichloromethyquinazolines display *in vitro* selective antiplasmodial activity against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (19), 6003−6006.

(22) Kieffer, C.; Cohen, A.; Verhaeghe, P.; Hutter, S.; Castera-Ducros, C.; Laget, M.; Remusat, V.; M'Rabet, M. K.; Rault, S.; Rathelot, P.; Azas, N.; Vanelle, P. Looking for new antileishmanial derivatives in 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one series. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 282−294.

(23) Raether, W.; Seidenath, H. The activity of fexinidazole (HOE 239) against experimental infections with *Trypanosoma cruzi*, trichomonads and *Entamoeba histolytica*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1983**, *77* (1), 13−26.

(24) Pal, D.; Banerjee, S.; Cui, J.; Schwartz, A.; Ghosh, S. K.; Samuelson, J. *Giardia, Entamoeba* and *Trichomonas* enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases). *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53* (2), 458−464.

(25) McCann, J.; Spingarn, N. E.; Kobori, J.; Ames, B. N. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, *72* (3), 979−983.

(26) Walsh, J. S.; Wang, R.; Bagan, E.; Wang, C. C.; Wislocki, P.; Miwa, G. T. Structural alterations that differentially affect the mutagenic and antitrichomonal activities of 5-nitroimidazoles. *J. Med. Chem.* **1987**, *30* (1), 150−156.

(27) Blumer, J. L.; Friedman, A.; Meyer, L. W.; Fairchild, E.; Webster, L. T., Jr.; Speck, W. T. Relative importance of bacterial and mammalian nitroreductases for niridazole mutagenesis. *Cancer Res.* **1980**, *40* (12), 4599−4605.

(28) Yanto, Y.; Hall, M.; Bommarius, A. S. Nitroreductase from *Salmonella typhimurium*: characterization and catalytic activity. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (8), 1826−1832.

(29) Tweats, D.; Bourdin Trunz, B.; Torreele, E. Genotoxicity profile of fexinidazole, a drug candidate in clinical development for human African trypanomiasis (sleeping sickness). *Mutagenesis* **2012**, *27* (5), 523−532.

(30) Katsuno, K.; Burrows, J. N.; Duncan, K.; Hooft van Huijsduijnen, R.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C. E.; Schmatz, D.; Warner, P.; Slingsby, B. T. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2015**, *14* (11), 751−758.

(31) Smith, D. A.; Di, L.; Kerns, E. H. The effect of plasma protein binding on *in vivo* efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9* (12), 929−939.

DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00347
ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 34−39

II.2.2.2. Tests *in vivo*

Bien que la CI_{50} ne soit pas la plus intéressante pour la souche de *T.b.b.*, la molécule 50 a présenté une absence de cytotoxicité, de mutagénicité ou de génotoxicité très intéressante. Sa très faible stabilité microsomale en faisait une mauvaise candidate pour des analyses *in vivo*. Toutefois sa structure chimique laisse à penser qu'elle pourrait être métabolisée en des composés potentiellement actifs au sein de l'organisme. Il a donc été décidé de la tester *in vivo* dans les mêmes conditions que pour les molécules précédentes.

a) Recherche de la Dose Maximale Tolérée et de la Dose maximale sans effet toxique

La détermination de la DMSET a été faite selon les mêmes conditions que pour la molécule 76 des nitroquinoléinones. N'étant pas cytotoxique la dose de 100 mg/kg a été testée en dose unique. Comme pour la molécule 41, nous avons fait le choix de ne pas administrer de dose supérieure à 100 mg/kg afin d'éviter tout surdosage. Quatre souris ont reçu la dose de 100 mg/kg, et aucune d'entre elles n'a présenté d'effets indésirables. La dose de 100 mg/kg a donc été choisie comme DMSET (tableau 46).

	Solvant	Molécule 50 100 mg/kg	Fexinidazole 100 mg/kg
Effets indésirables	0/4	0/4	0/4

Tableau 46. Suivi des signes cliniques observés sur les souris pour déterminer la DMSET (n=4 souris dans chaque lot)

b) Etude de pharmacocinétique

Comme pour la molécule 76 des nitroquinoléinones et la molécule 41 des nitroimidazopyridines, il est nécessaire de connaitre le comportement de la molécule 50 au sein de l'organisme pour pouvoir correctement entreprendre les traitements. Et cela d'autant plus que la molécule 50 présente un $T_{1/2}$ de 3 min *in vitro* avec une très faible stabilité microsomale.

Les résultats de pharmacocinétiques ont été évalués suivant la même méthode d'extraction aux QuECHERS que précédemment et les analyses ont été faites avec le logiciel Monolix (figure 69, tableau 47).

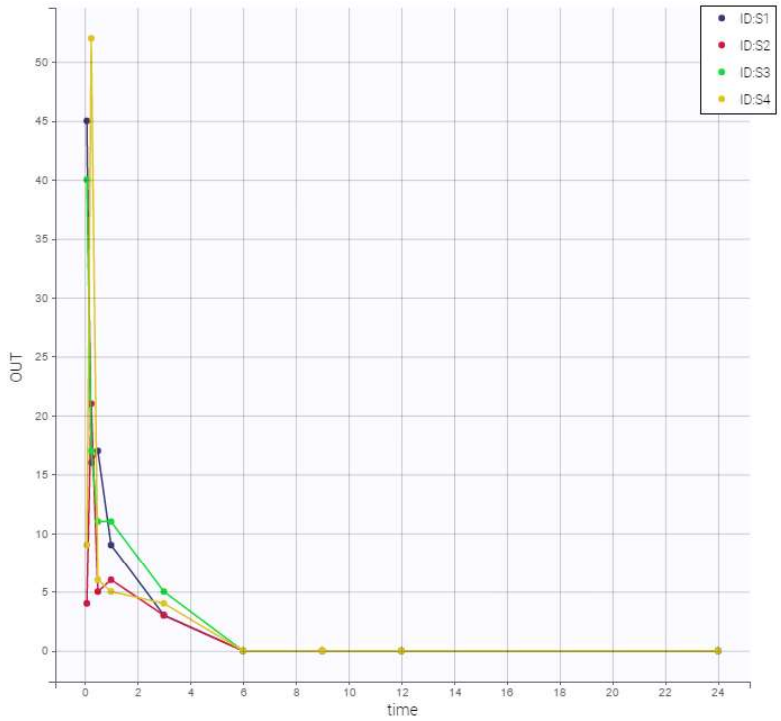


Figure 69. Résultats des concentrations plasmatiques de la molécule 50 pour les 4 souris
(Axe Y : Concentrations en ng/mL, axe X : Temps en h) (logiciel Monolix) (le logiciel ne permet pas de visualiser les valeurs SD sur ce graphique)

	Cmax (ng/mL) ± SD	Tmax (h) ± SD	$T_{1/2}$ (h) ± SD	$AUC_{0\text{-}inf}$ (ng.h/mL) ± SD	Clairance (mL/h) ± SD
molécule 50	39,5 ± 13,28	0,167 ± 0,09	2,67 ± 1,53	40,46 ± 10,04	93,33 ± 23,49

Tableau 47. Résultats des paramètres pharmacocinétiques de la molécules 50 après une administration PO
(Souris n=4, concentration de 100 mg/kg, dose unique)

Les résultats confirment le fait que la molécule 50 est instable et est rapidement éliminée ou dégradée de l'organisme. En effet, son Tmax est rapidement atteint au bout de 10 min, sa Cmax est très faible de l'ordre de 40 ng/mL et une AUC très basse signifiant une faible distribution systémique.

c) Mesure de l'activité trypanocide

Partant du même protocole que pour les molécules 76 et 50, 4 souris ont été parasitées par la souche *T.b.b*. AnTat 1.9 (2 000 parasites dans 100 µL). Chaque souris infectée a reçu une dose de 100 mg/kg par gavage à hauteur de 50 µL sur 5 jours de traitement. Une mesure de

BY-NC-ND

la parasitémie est effectuée avant la première dose et à chaque nouvelle administration pour évaluer une diminution ou non de la charge parasitaire. Suivant les résultats de pharmacocinétique, nous avons effectués 2 administrations par jour.

Les résultats obtenus sont les suivants (figure 70, tableau 48).

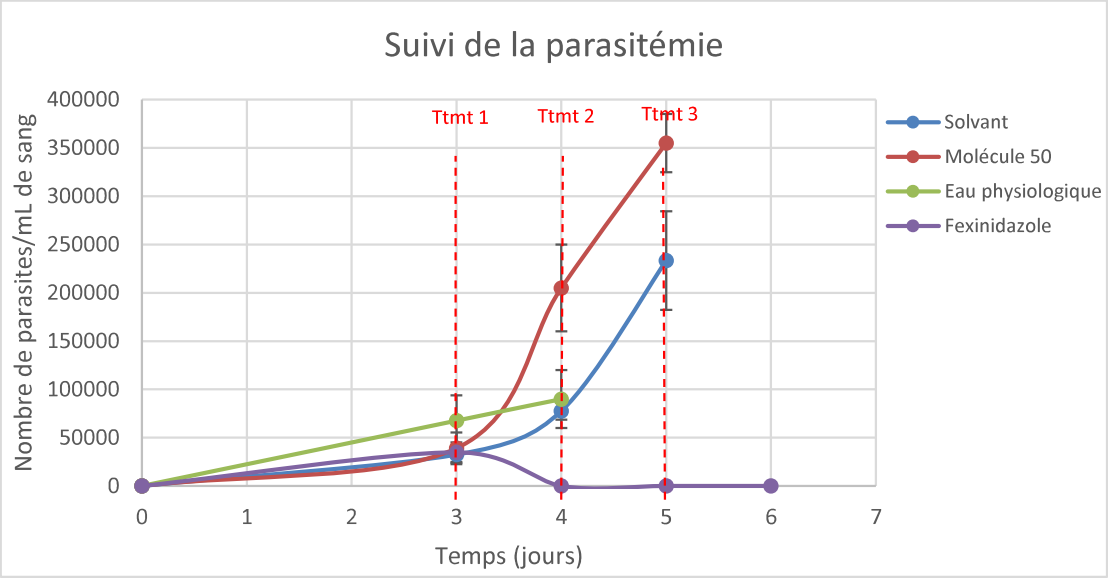


Figure 70. Suivi de la parasitémie chez les souris traitées avec la molécule 50 et avec les témoins (n=4 souris ; traits rouges : les jours de traitement)

	Molécule	**Dose (mg/kg x Nombre de jours de traitement)**	**Guéries/Infectées**
T. b. brucei AnTat 1.9	Solvant		0/4
	50	100 x 3	0/4
	Eau Physiologique		0/4
	Fexinidazole	100 x3	4/4

Tableau 48. Détermination *in vivo* de l'efficacité de la molécule 50 sur la souche *T.b.b.* AnTat 1.9

Au 3ème jour de traitement, 2 des 4 souris sont mortes avec une trop forte charge parasitaire et les 2 autres ont été euthanasiées. La mort des souris traitées à la molécule 50 montre l'absence d'efficacité de cette dernière.

Afin de comprendre si cette inefficacité *in vivo* est due à son profil pharmacocinétique, il a été nécessaire de rechercher les éventuels métabolites produits pour vérifier les hypothèses des tests *in vitro* du rôle de prodrogue de cette dernière.

BY-NC-ND

d) Recherche des éventuels métabolites dans les fluides biologiques

Suivants les mêmes conditions que pour les molécules 76 et 41, 2 nouvelles souris ont reçu la DMSET en dose unique. Les différents fluides biologiques (sang, sérum, urines et fèces) ont été collectés en vue de rechercher les composés présents dans ces fluides.

Les résultats obtenus montrent la présence de la molécule 50 et 2 métabolites de masse 464 et 478 g/mol correspondant respectivement à la molécule 50 réduite du -NO_2 en -NH_2 et de la molécule 50 réduite du -NO_2 en -NO. De plus nous constatons en comparant les résultats MRM de 3 fluides (sang 1 h, et urines et fèces 12h) que la molécule 50 n'est plus présente dans le sang au bout de 1 h ce qui est cohérent avec les résultats de pharmacocinétique obtenus précédemment (figure 71 et 72).

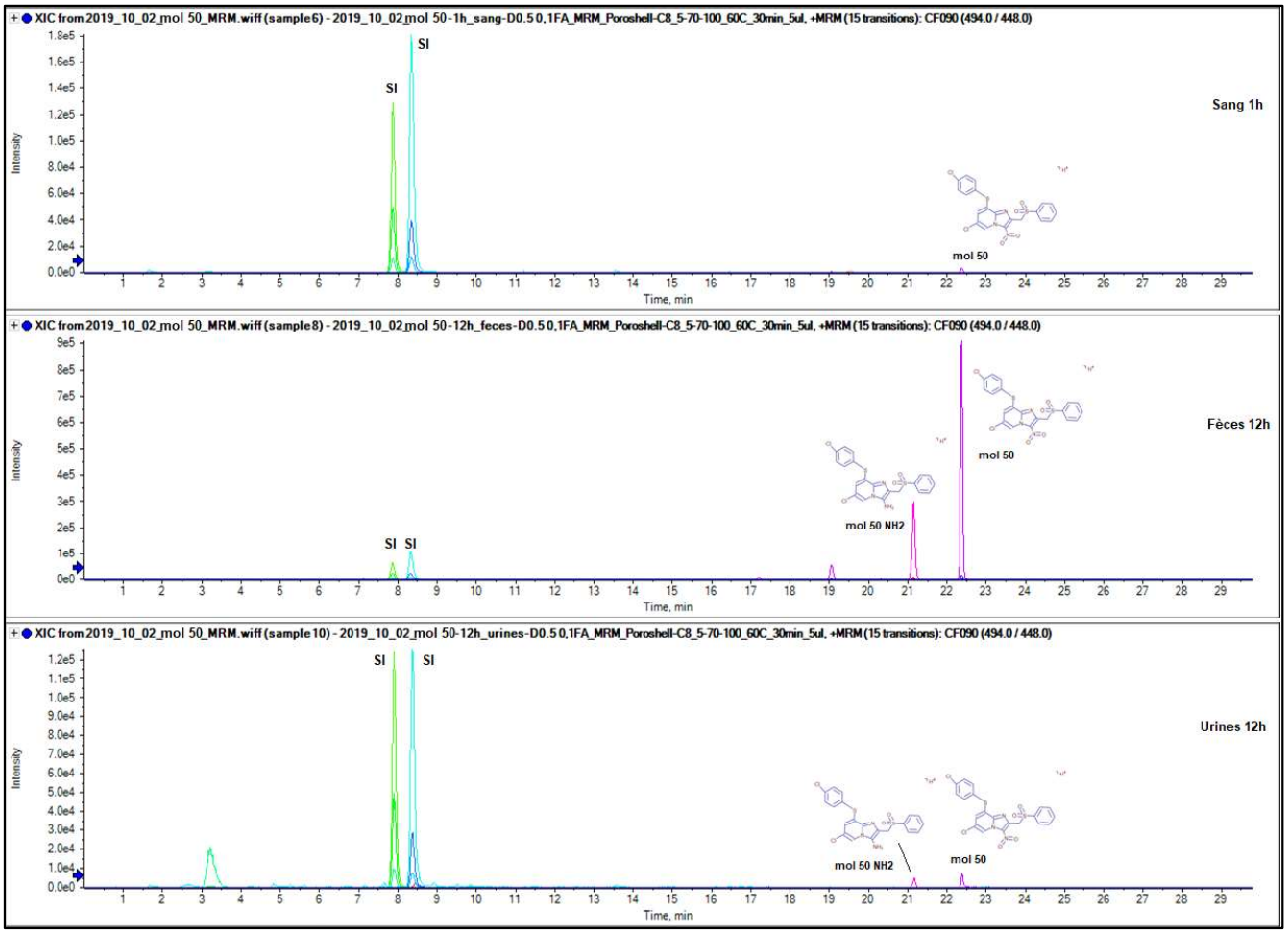


Figure 71. Chromatogrammes MRM pour la molécule 50 et ses métabolites dans 3 fluides biologiques

BY-NC-ND

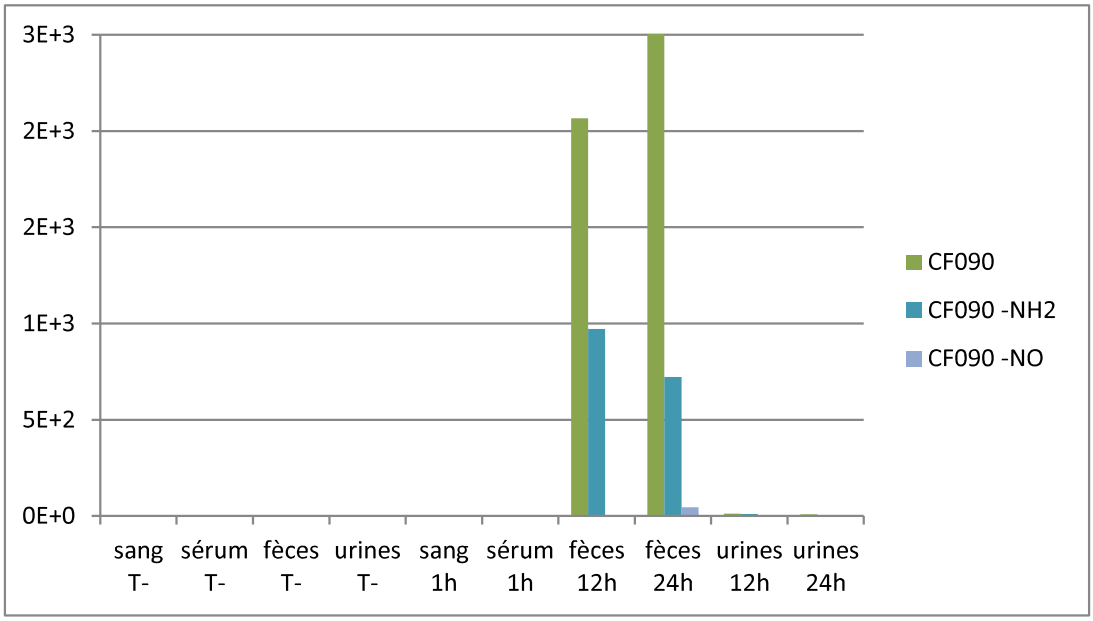


Figure 72. Histogrammes de présence dans les fluides biologiques de la molécule 50 et de ses métabolites

BY-NC-ND

II.2.3. Etude des 25 molécules issues de la rétro-analyse du pharmacophore anti-kinétoplastidés (partie 3)

Pour compléter les études relatives à la nature et à la position de substituant sur le pharmacophore initial, 25 molécules ont été synthétisées afin de monter la nécessité d'un groupement nitro en position 3, du rôle du substituant non halogéné en position 6 et de la possible absence du motif phénylsulfonylméthyle en position 2. Tout comme pour les 70 molécules précédentes, la détermination de la CC_{50} et de leur CI_{50} a été faites *in vitro*.

II.2.3.1. Tests *in vitro*

a) Tests de cytotoxicité

En fonction des substituants proposés, les molécules produites présentent des CC_{50} relativement intéressantes (tableau 49). Seules 4 molécules (118, 109, 128 et 131) présentent des CC_{50} peu intéressantes < 10 µM. Quatorze molécules (107, 117, 112, 108, 81, 119, 123, 124, 125, 134, 136, 121, 127 et 135) ont une CC_{50} comprise entre 10 et 50 µM et présentent une hydrosolubilité modérée. Pour finir, les 7 dernières molécules présentent une CC_{50} > 62,5 µM avec notamment une valeur fixe de 184 µM (en orange) pour la molécule 80 et 2 valeurs > 100 µM pour les molécules 130 et 133. En tout, les 12 molécules surlignées en rouge et les 2 molécules surlignées en orange avec des valeurs fixes ont une CC_{50} plus intéressantes que le « hit » initial.

BY-NC-ND

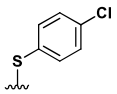
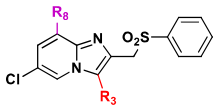
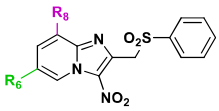
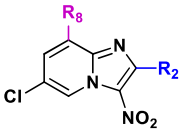
		R_8 = Br		R_8 = 	
		N°	CC_{50} HepG2 (µM)	N°	CC_{50} HepG2 (µM)
	R_3 = H	(80)	184	(81)	> 15,63
	R_3 = NH_2	(101)	> 34	(102)	> 62,5
	R_6 = H	(117)	> 15,63	(118)	> 3,9
	R_6 = H_3C	(112)	> 31,2	(113)	> 62,5
	R_6 = F_3C	(108)	> 15,6	(109)	> 7,8
	R_6 = Br	Hit	> 31	(119)	34,3
	R_2 = O_2S-CH_3	(120)	> 62,5	(123)	> 31,2
	R_2 = O_2S	(121)	> 15,6	(124)	> 31,2
	R_2 = O_2S	(122)	> 62,5	(125)	> 31,2
	R_2 = H	(127)	16,2	(128)	> 7,8
	R_2 = CH_3	(130)	>125	(131)	> 7,8
	R_2 = OH	(133)	> 250	(134)	> 15,6
	R_2 = S	(135)	> 31,2	(136)	> 15,6
Doxorubicine			0,2		0,2
Miltéfosine			50,3		50,3
Amphotéricine B			8,8		8,8
Fexinidazole			> 200		> 200
Eflornithine			> 100		> 100
Suramine			> 100		> 100

Tableau 49. Résultats de l'évaluation de la cytotoxicité des 25 molécules

Les 25 molécules ont par la suite pu être testées sur la souche de *L. donovani* et une partie (les plus intéressantes) ont été testées sur *T.b.b.*

BY-NC-ND

b) Mesure de l'activité antiparasitaire

Dix-huit molécules (celles ayant présentées les meilleures CC_{50} et CI_{50} sur les souches de leishmanies) ont été testées sur la souche *T.b.b.* AnTat 1.9. Les résultats sont les suivants (tableau 50).

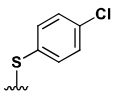
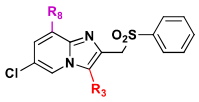
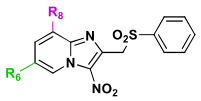
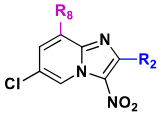
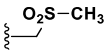
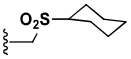
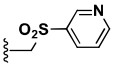
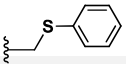
		R_8 =		R_8 = 	
		N°	CI_{50} *T. b.* trypo. (µM)	N°	CI_{50} *T. b.* trypo. (µM)
	R_3 =			(81)	25,5
	R_3 =			(102)	10,6
	R_6 =	(112)	1,2	(113)	1,8
	R_6 =	(108)	4,0	(109)	4,0
	R_6 =	Hit	2,9		
	R_2 = 	(120)	0,017	(123)	0,067
	R_2 = 	(121)	0,47	(124)	1,5
	R_2 = 	(122)	0,025	(125)	1,2
	R_2 =	(127)	0,4	(128)	0,087
	R_2 =	(133)	> 50	(134)	> 50
	R_2 = 	(135)	> 50	(136)	> 50
Fexinidazole			0,56		0,56
Eflornithine			13,59		13,59
Suramine			0,03		0,03

Tableau 50. Résultats de l'évaluation de l'activité trypanocide des 18 molécules

Parmi les 18 molécules testées, 4 ne sont pas intéressantes (CI_{50} > 50 µM). Sur les 14 restantes, 5 présentes des CI_{50} inférieures à 0,1 µM.

Il faut donc regarder de plus près pour savoir si le rôle des substituants et leur position impactent cette activité.

BY-NC-ND

Lors d'un changement au niveau de la position 3, place stratégique du nitro, nous constatons que les molécules perdent en activité et sont 25 fois moins efficaces que le fexinidazole. C'est le cas de la molécule 81 présentant un atome d'hydrogène, et une CI_{50} de 25,5 µM, ou de la molécule 102 avec un groupement amine et une valeur de CI_{50} de 10,2 µM.

Lors du changement de substituant en position 2, on constate une disparité des résultats. En effet, les composés possédant un atome d'hydrogène par rapport au hit initial (CI_{50} de 2,9 µM) présentent une activité plus importante (0,4 µM pour la molécule 127 et 0,087 µM pour la molécule 128). En revanche, les molécules avec un motif phénylthiométhyle (précurseur du phénylsulfphonylméthyl) ne sont absolument pas actives *in vitro* avec des CI_{50} > 50 µM, tout comme la présence d'une fonction alcool primaire (molécules 133 à 136). Les molécules les plus prometteuses sont les molécules 120, 122, 123 et 128 (en rouge) avec des CI_{50} de 0,017; 0,025; 0,067 et 0,087 µM respectivement. Ainsi la molécule 120 présente un IS > 3676 et la molécule 122 un IS > 2500. La position 2 semble donc très importante dans l'activité trypanocide, avec un rôle clé du dérivé sulfonylméthyl. Il sera donc intéressant de tester les autres composés de cette série (uniquement testés sur *L. donovani*) à l'encontre de *T.b.b*.

Lors du changement en position 6 cette fois-ci, on constate que l'activité n'est que peu modifiée en fonction du type de substituant. Les valeurs de CI_{50} sont de l'ordre de celle du « hit » initial, comprises entre 1,2 et 4 µM.

De l'ensemble de ces molécules, la molécule 120 ressort avec une absence de cytotoxicité (CC_{50} > 62,5 µM) et une activité trypanocide meilleure que le fexinidazole et la suramine (CI_{50} de 0,017 µM contre 0,56 et 0,03 µM respectivement).

c) Etude de pharmacocinétique

Les molécules 120 et 123 ont été soumises aux mêmes analyses que les molécules présentes à savoir des études de pharmacocinétique *in vitro* afin de connaitre leurs profils métaboliques pour de futures études.

Une étude de la stabilité métabolique sur microsomes hépatiques murins a été initiée. Les résultats sont les suivants (figure 73).

BY-NC-ND

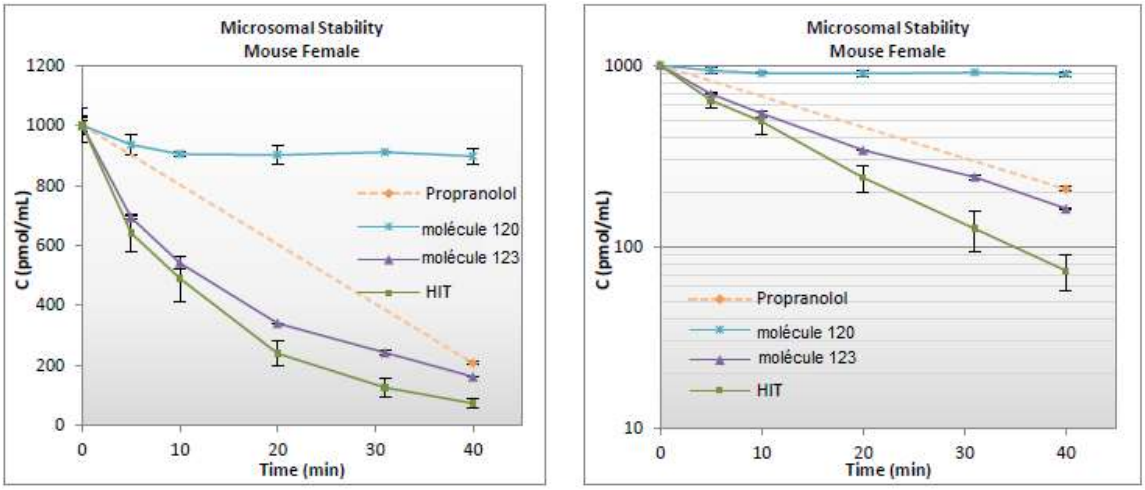


Figure 73. Résultats de la stabilité microsomale des molécules 120 et 123

La molécule 120 présente une importante stabilité microsomale avec un $T_{1/2}$ > 40 minutes. La molécule 123 présente quant à elle une stabilité bien moins intéressante de l'ordre de 12 minutes. Dans les deux cas, ces molécules sont beaucoup plus intéressantes que le « hit » initiale possédant un $T_{1/2}$ de 9 minutes.

Une étude de fixation aux protéines plasmatiques a été initiée (tableau 51).

Molécule	% lié	Fraction libre (f_u)	Log(f_u)
(120)	76,90 %	0,2310	-0,636
Diclofénac	99,70 %	0,0030	-2,523

Tableau 51. Résultats du test de fixation à l'albumine pour la molécule 120

Les résultats obtenus ont permis de révéler que la molécule 120 était liée à 77% à l'albumine. Ce résultat montre que la molécule est moins liée aux protéines plasmatiques que les autres molécules préalablement évaluées.

II.2.3.2. Tests *in vivo*

Bien que tous les tests *in vitro* n'aient pas été réalisés, la molécule 120 présente un profil très intéressant pour une étude *in vivo*. Elle a donc été testée dans les mêmes conditions que les molécules 76 des nitroquinoléinones, et 41 et 50 des nitroimidazopyridines.

BY-NC-ND

a) Recherche de la Dose Maximale Tolérée et de la Dose maximale sans effet toxique

La molécule 120 présente une très bonne valeur de CC_{50} (> 62,5 µM), permettant de tester directement une dose à 100 mg/kg pour de la future DMSET. Quatre souris ont donc reçu une dose unique de 100 mg/kg et ont été monitorées toutes les heures sur 24h puis tous les jours sur une semaine et 1 fois par semaine sur un mois (tableau 52).

	Solvant	Molécule 120 100 mg/kg	Fexinidazole 100 mg/kg
Effets indésirables	0/4	0/4	0/4

Tableau 52. Suivi des signes cliniques observés sur les souris pour déterminer la DMSET (n=4 souris dans chaque lot)

Les résultats obtenus montrent une DMSET fixée à 100 mg/kg. En effet les 4 souris ayant reçu une dose de 100 mg/kg n'ont présenté aucune gêne notable au cours des 24 premières heures suivant l'administration et aucun effet indésirable n'a été recensé au cours du mois suivant ce traitement.

Par la suite il a fallu étudier le comportement de la molécule 120 dans l'organisme.

b) Etude de pharmacocinétique

Avec un $T_{1/2}$ > 40 min lors des tests *in vitro*, la molécule 120 est un bon candidat pour des analyses *in vivo*. Il est important de connaitre sa distribution, sa métabolisation et son élimination au sein d'un organisme entier, avant d'envisager un schéma thérapeutique sur des animaux malades. Pour cela, une étude de pharmacocinétique a été menée sur 4 souris suivant le protocole mis en place pour les 3 autres molécules testées *in vivo*.

Les résultats de pharmacocinétique ont été évalués avec le logiciel Monolix et sont les suivants (figure 74, tableau 53).

BY-NC-ND

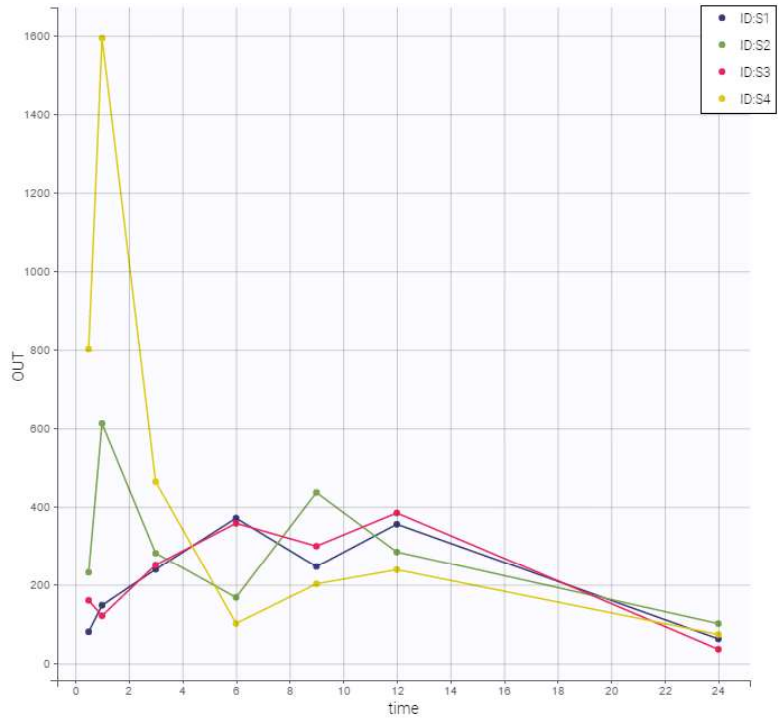


Figure 74. Résultats des concentrations plasmatiques de la molécule 120 pour les 4 souris

(Axe Y : Concentrations en ng/mL, axe X : Temps en h) (logiciel Monolix) (le logiciel ne permet pas de visualiser les valeurs SD sur ce graphique)

	Cmax (ng/mL) ± SD	**Tmax (h) ± SD**	**$T_{1/2}$ (h) ± SD**	**$AUC_{0\text{-inf}}$ (ng.h/mL) ± SD**	**Clairance (mL/h) ± SD**
molécule 120	740,62 ± 579,68	5 ± 5,23	7,65 ± 1,34	7059,94 ± 693,5	0,513 ± 0,05

Tableau 53. Résultats des paramètres pharmacocinétiques de la molécules 120 après une administration PO

(Souris n=4, concentration de 100 mg/kg, dose unique)

Les données obtenues montrent que la molécule 120 est largement distribuée dans le compartiment plasmatique avec une AUC très intéressante et un $T_{1/2}$ relativement long. Elle est donc capable de franchir la barrière intestinale pour agir au niveau sanguin. Avec un Tmax de 5h, la molécule diffuse progressivement au sein de l'organisme, ce qui permet d'envisager une administration unique hebdomadaire.

BY-NC-ND

c) Mesure de l'activité trypanocide

Présentant toutes les caractéristiques requises pour être un bon candidat, la molécule 120 a été testée sur des souris infectées par la souche *T.b.b*. AnTat 1.9 (2 000 parasites dans 100 µL) comme pour les molécules 76, 41 et 50. Chaque souris infectée a reçu une dose de 100 mg/kg par gavage à hauteur de 50 µL. Une mesure de la parasitémie a été réalisée pour juger de l'efficacité ou non de la molécule en comparaison avec le solvant et des témoins positifs et négatifs.

Les résultats obtenus sont les suivants (figure 75, tableau 54).

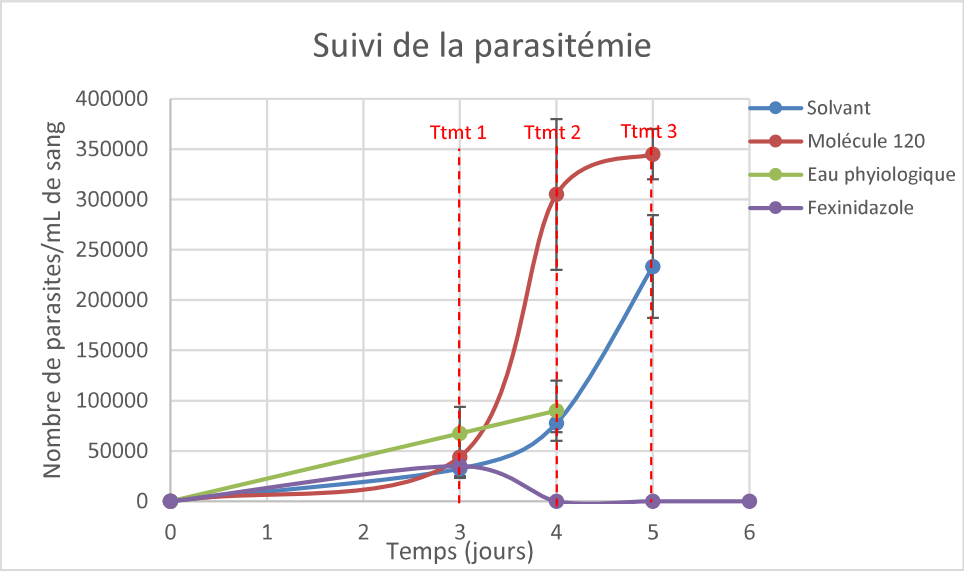


Figure 75. Suivi de la parasitémie chez les souris traitées avec la molécule 120 et avec les témoins (n=4 souris ; traits rouges : les jours de traitement)

	Molécule	**Dose (mg/kg x Nombre de jours de traitement)**	**Guéries/Infectées**
T.b.b. AnTat 1.9	Solvant		0/4
	120	100 x 3	0/4
	Eau Physiologique		0/4
	Fexinidazole	100 x 3	4/4

Tableau 54. Détermination *in vivo* de l'efficacité de la molécule 120 sur la souche *T.b.b.* AnTat 1.9

La molécule 120 ne présente aucune efficacité *in vivo*. La question s'est donc posée de savoir si cette absence d'efficacité était due à une métabolisation trop importante, ou à d'autres facteurs. Pour répondre à ces questions, une première étude a été menée utilisant de l'ABT afin de bloquer tous les CYP450. Parallèlement à cela, une étude pour la recherche des

BY-NC-ND

métabolites potentiellement produits chez des souris traitées avec la molécule 120 a été réalisée avec et sans ABT.

d) Etude de l'inhibition des cytochromes P450 et recherche d'une activité trypanocide

Suivant le même plan que pour les molécules testées *in vivo* précédemment décrites, la molécule 120 a été étudiée en présence d'un inhibiteur des enzymes du métabolisme, l'ABT. Le schéma d'administration est basé sur 5 jours d'administration par gavage.

Les résultats obtenus sont les suivants (figure 76).

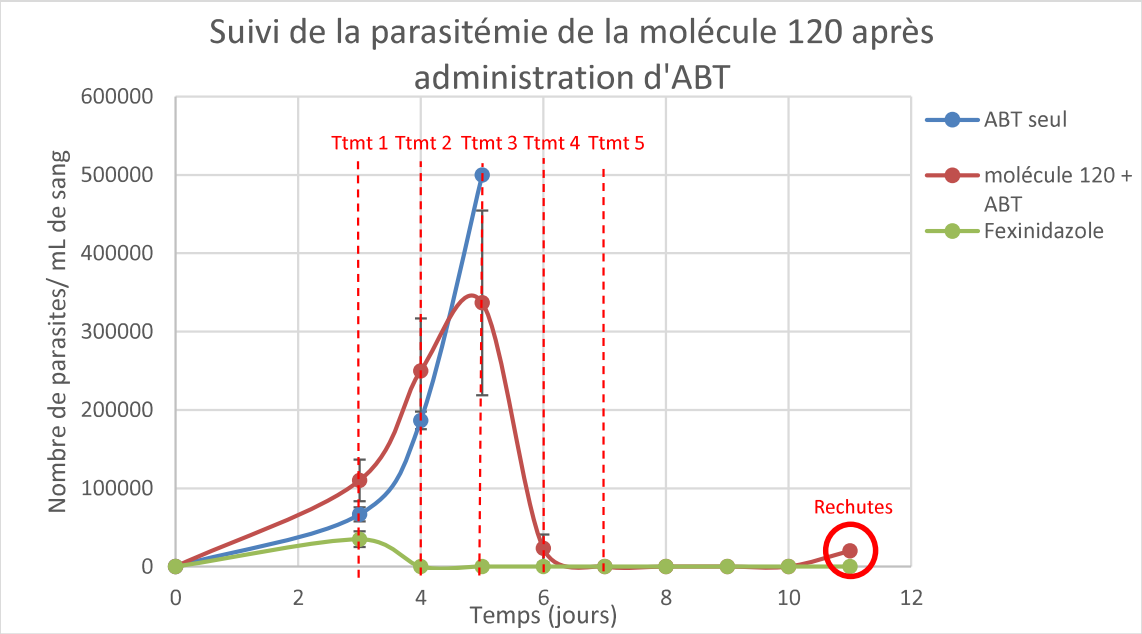


Figure 76. Suivi de la parasitémie après traitement à l'ABT + molécule 120
(n=3 souris ; traits rouges pointillés: les jours de traitements ; rond rouge : rechute)

L'association ABT et molécule 120 a présenté une efficacité dès le troisième jour d'administration avec une diminution de la parasitémie jusqu'à être nulle durant 4 jours. Malheureusement, au 4ème jour post fin de traitement, nous avons mis en évidence des parasites dans un prélèvement de sang des souris. La molécule 120 présente donc un intérêt notable avec une disparition de la charge parasitaire dès lors que les CYP450 sont inhibés, mais les rechutes observées signent le fait que les parasites ont été capables d'échapper à la molécule.

BY-NC-ND

e) Etude de la pharmacocinétique de la molécule 120 suite à un prétraitement à l'ABT

Les études *in vitro* sont la plupart du temps prédictives et sont confirmées par les résultats *in vivo*. Or dans le cas de la molécule 166, cela n'a pas été le cas concernant les études de stabilité microsomale qui ont montré une absence de métabolisation au bout de 40 minutes avec un $T_{1/2}$ > 40 min, alors que lors des tests *in vivo* utilisant une un inhibiteur des CYP450 et bloquant ainsi toute métabolisation de phase 1, la molécule 120 a présenté une activité très intéressante avec une disparition totale des parasites sur 4 jours.

Il a donc été nécessaire d'évaluer le comportement de la molécule 120 suite à l'administration d'ABT pour vérifier si sa concentration plasmatique se voit améliorée et sa demi-vie allongée.

Dans le même temps, nous avons recherché les métabolites pouvant être produits (métabolisation de phase 2 directement) afin de les comparer à ceux retrouvés lors de l'analyse sans ABT.

Pour cela, 3 souris ont été utilisées et ont reçu 100 mg/kg en dose unique. Puis pour l'étude de pharmacocinétique, des prélèvements de sang ont été réalisés aux même temps que pour l'étude précédente à savoir au bout de 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, et 24 h. Les souris ont été placées durant ce temps dans une cage à métabolisme afin de collecter les urines et les fèces sur 12 h et 24 h. Un prélèvement de sang plus conséquent (pool des 3 souris) a été réalisé au bout de 1 h afin de pouvoir rechercher les métabolites dans le sang total et dans le sérum.

Les résultats obtenus sont les suivants (figure 77 et tableau 55).

BY-NC-ND

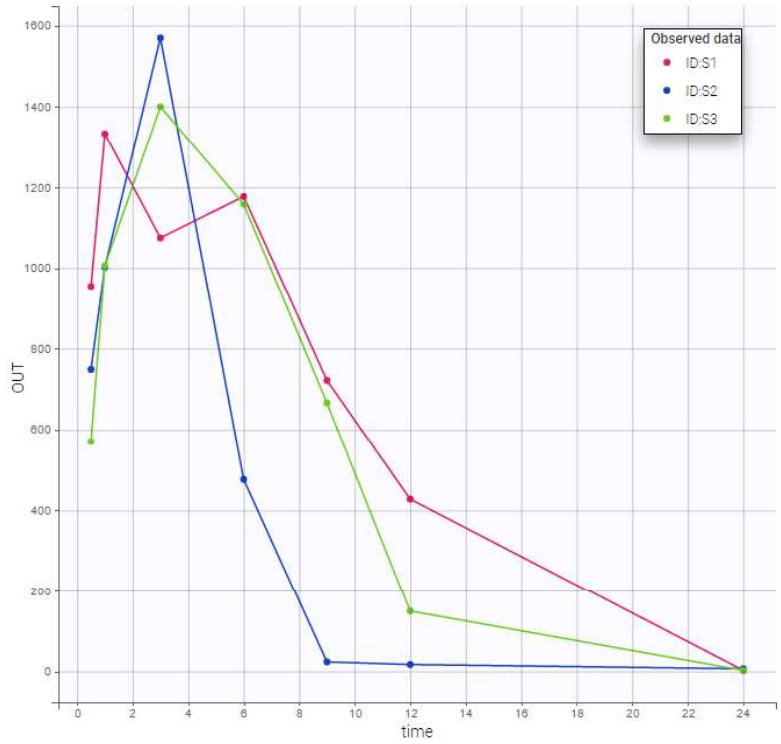


Figure 77. Résultats des concentrations plasmatiques de la molécule 120 + ABT pour les 3 souris (Axe Y : Concentrations en ng/mL, axe X : Temps en h) (logiciel Monolix) (le logiciel ne permet pas de visualiser les valeurs SD sur ce graphique)

	Cmax (ng/mL) ± SD	Tmax (h) ± SD	$T_{1/2}$ (h) ± SD	$AUC_{0\text{-}inf}$ (ng.h/mL) ± SD	Clairance (mL/h) ± SD
molécule 120 +ABT	1434,26 ± 121,88	2,33 ± 1,15	3,98 ± 3,65	10899 ± 3297,77	0,355 ± 0,123

Tableau 55. Résultats des paramètres pharmacocinétiques de la molécules 120 + ABT après une administration PO
(Souris n=3, concentration de 100 mg/kg, dose unique)

f) Recherche des éventuels métabolites dans les fluides biologiques

Partant des résultats obtenus lors des traitements des souris parasitées avec et sans ABT, une recherche des métabolites pouvant être produits au sein de l'organisme a été menée. Le même protocole que pour les molécules 76, 41 et 50 a été établi pour la molécule 120 avec et sans ABT et les résultats obtenus sont comparés ci-dessous.

Dans un premier temps, sont présentés les histogrammes de la fréquence de présence des métabolites identifiés sont présentés et comparés avec et sans ABT (figure 78).

BY-NC-ND

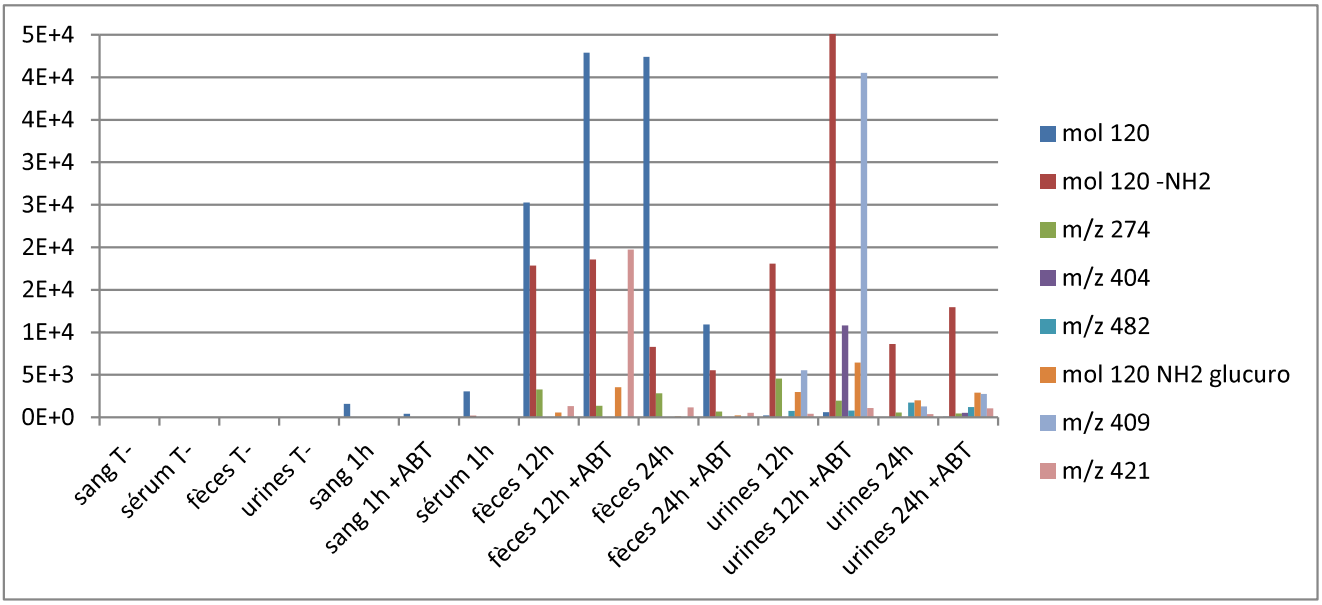


Figure 78. Histogrammes de présence dans les fluides biologiques de la molécule 120 et de ses métabolites

Pour finir les résultats de l'analyse MRM sur le sang, les urines et fèces des souris sont indiqués (figure 79). Nous comparons pour chaque fluide les résultats avec et sans ABT pour permettre une meilleure visualisation de la présence des métabolites.

BY-NC-ND

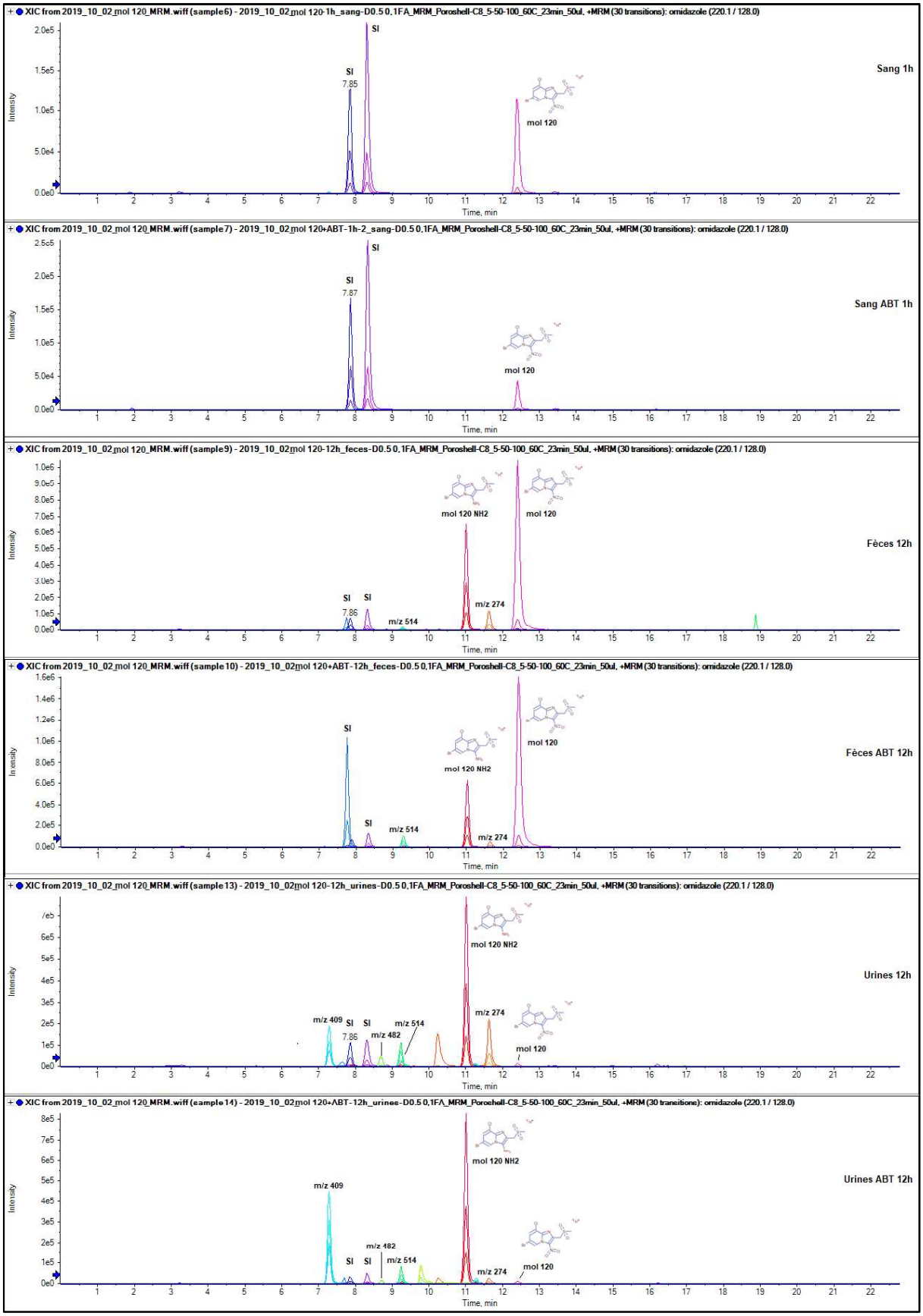


Figure 79. Chromatogrammes MRM pour la molécule 120 et ses métabolites dans 3 fluides biologiques

BY-NC-ND

Bilan des 4 molécules les plus prometteuses de cette étude des nitroaromatiques (tableau 56) :

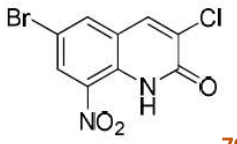
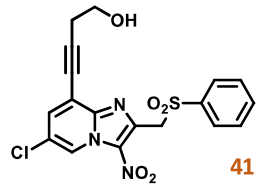
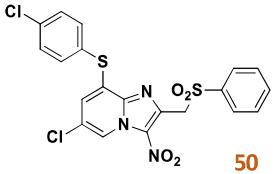
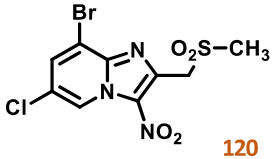
	Tests *in vitro*							Tests *in vivo*				
Molécules	**CC_{50} HepG2 (µM)**	**CI_{50} *T.b.b* (µM)**	**IS**	**mutagénicité / génotoxicité**	**Stabilité microsomale**	**Fixation à l'albumine**	**Test PAMPA BHE**	**DMSET**	**caractéristiques Pk**	**activité trypanocide**	**activité trypanocide après ABT**	**métabolites**
 76	17,9	**0,012**	**1491**	**_ / non**	> 40 min	99,20%	**Diffuse**	25 mg/kg	très bonne diffusion barrière intestinale	NON	NON	1
 41	**> 125**	**0,07**	**1894**	oui / non	13 min	98,52%	**Diffuse**	100 mg/kg	bonne diffusion barrière intestinale	NON	NON	6
 50	**> 100**	1,3	77	**non / non**	3 min	99,95%	_	100 mg/kg	mauvaise diffusion barrière intestinale	NON	NON	2
 120	**> 62,5**	**0,017**	**3676**	**_**	> 40 min	76%	_	100 mg/kg	bonne diffusion barrière intestinale	NON	**OUI**	7

Tableau 56. Bilan général des 4 molécules d'intérêt

II.3. Le mégazol

Composé nitré dérivé du 5-nitroimidazolé, dont la formule brute est 1-méthyl-2-(5-amino-1,3,4-thiadiazole)-5-nitroimidazolé, le mégazol a une longue histoire (figure 80).

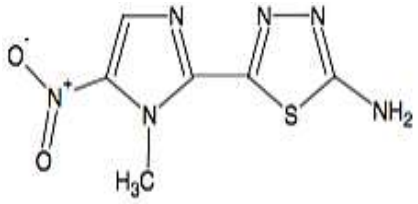


Figure 80. Structure du mégazol

Découvert et synthétisé en 1968 par l'industrie American Cyanamid, le mégazol a montré un réel potentiel bactéricide (bacilles Gram – et Gram +, méningocoques…) et parasiticide (*Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania donovani*, et *Trypanosoma spp.*) (Berkelhammer and Asato, 1968).

De nombreux travaux ont donc été initiés pour étudier son caractère trypanocide. Du point de vue du mécanisme d'action, les théories ont été nombreuses.

Portant un groupement -NO_2, son activité biologique pourrait donc être liée à la réduction de ce dernier en radical anion comme c'est le cas pour le nifurtimox, ou le fexinidazole plus récemment. Cette production de dérivés du stress oxydatif et de radicaux libres va interférer avec le métabolisme de l'oxygène conduisant à la mort du trypanosome (Viodé et al., 1999). Cette réduction fait intervenir la NTR1, qui va donc produire des intermédiaires de synthèse comme le groupement nitroso –NO. Il a été montré que ce groupement est capable de piéger efficacement les thiols (R-SH) essentiels aux trypanosomes (Viodé et al., 1999). De plus, le –NO va pouvoir être à nouveau réduit en amine, composé qui peut être alors facilement éliminé par le parasite. Ainsi, en condition aérobie, qui s'apparente à la vie du trypanosome au sein de la circulation sanguine, l'anion –NO_2 réagit avec l'oxygène pour former des anions superoxydes. Ces derniers sont à leur tour transformés en peroxyde d'hydrogène par l'action de la superoxyde dismutase. Or si le peroxyde d'hydrogène tend à s'accumuler au sein du parasite, il va y avoir génération de composés –OH qui sont toxiques pour le trypanosome (Docampo and Moreno, 1984). En effet, les parasites sont sensibles au stress oxydatif lors de l'absence de diverses molécules anti-oxydantes.

Le mégazol a également été testé à l'encontre de différentes cibles au sein du trypanosome (trypanothione réductase, enzyme qui joue un rôle dans la détoxification pour le parasite, la super oxyde dismutase qui intervient dans le métabolisme de l'oxygène) mais également vis-à-vis de certains transporteurs précédemment cités comme le transporteur P2 qui intervient

BY-NC-ND

dans le transport d'aminopurines (Le Trant et al., 1983; Krauth-Siegel and Schöneck, 1995; Barrett et al., 2000). La dernière étude prometteuse porte sur son action inhibitrice à l'encontre de la fumarate réductase. En effet, le mégazol en inhibant cette enzyme qui joue un rôle dans la chaine respiratoire mitochondriale en remplaçant l'oxygène par le fumarate, conduit à la mort du parasite (Turrens et al., 1996).

Parallèlement à ces études portant sur son mécanisme d'action, des études de pharmacocinétique ont permis de mettre en évidence que le mégazol était majoritairement éliminé par voie urinaire et sous forme inchangée (Enanga et al., 1999). Son temps de demi-vie de 42 minutes peut être allongé jusqu'à 3h si son administration est précédée d'une administration de suramine. En effet, lors d'études *in vivo* sur modèle murin notamment évaluant l'efficacité du mégazol, il a été présenté que le mégazol présentait une vitesse d'absorption digestive améliorée à la suite d'une prise de suramine (Enanga et al., 1999). De plus, en 2000, Enanga, a réalisé une étude similaire sur des singes infectés avec une souche de *T.b.g.*, et a montré l'efficacité du mégazol et sa diffusion au niveau du SNC (Enanga et al., 2000). Concernant sa tolérance, les résultats ont indiqué une DL_{50} (dose létale 50) à 1400 mg/kg sur modèle murin (Redin et al., 1968).

Il semblerait donc que le mégazol présente toutes les caractéristiques requises pour devenir un bon candidat médicament. Or les travaux portés par Nesslany en 2004, ont signalé son potentiel génotoxique et clastogène sur un modèle murin stoppant alors l'ensemble des études (Nesslany et al., 2004).

Une étude récente réalisée au sein de notre laboratoire UMR INSERM 1094 NET et faisant l'objet de 2 thèses d'exercice de Pharmacie dont la mienne en 2015, a permis de montrer que le mégazol présente une CI_{50} de 0,03 ± 0,0016 µM vis-à-vis de la souche *T.b.b.* AnTat 1.9, et qu'il présentait une efficacité notable dès 20 mg/kg et sans effet indésirable notable sur un modèle murin infecté par une souche de *T.b.b* AnTat 1.1E provoquant une infection chronique de la maladie (Keita et al., 1997; Enanga et al., 1998). De plus, au cours des travaux sur le mégazol, 17 métabolites ont été mis en évidence à partir des urines de souris, par méthodes GUS et MRM en spectrométrie de masse laissant supposer qu'un ou plusieurs d'entre eux pouvaient être à l'origine de l'activité voire de la toxicité attribuée au mégazol (Mespoulet, 2012; Boudot, 2015). En effet, certains des métabolites présentent les mêmes caractéristiques que le mégazol à savoir la présence des 2 cycles imidazoles et thiadazoles ainsi que le groupement nitro reconnu par la NTR 1, mais avec des substituants autre pouvant jouer sur l'efficacité et la toxicité. En 2019, au sein de notre équipe, j'ai approfondi l'étude portant sur

BY-NC-ND

les métabolites en utilisant une analyse TRIPLE TOF permettant d'obtenir des masses exactes pour chacun des métabolites. Parallèlement à cette identification, nous nous sommes posés la question de savoir si les métabolites obtenus chez l'animal parasité, étaient présents chez un animal sain et donc si les métabolites n'étaient le fruit que du métabolisme de l'animal, ou si des trypanosomes seuls en milieu de culture étaient capables de « métaboliser » la molécule. Ce travail fait l'objet d'une publication en cours de soumission « Identification of metabolites derived from the anti-trypanosomal drug megazol » (Boudot, en préparation) (annexe 3).

Or, il est complexe de pouvoir caractériser chacun de ces métabolites directement à partir des urines, alors que l'étude individuelle de ces composés permettraient de relancer les travaux sur ce composé très prometteur.

Au sein du laboratoire « Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes UMR 7245 CNRS/MNHN » à Paris, dirigé par le Pr Philippe Grellier, le Dr Didier Buisson travaille sur la biotransformation microbiologique (Fromentin et al., 2013; Joyeau et al., 2013; Laurencé et al., 2014; Olvera-Vargas et al., 2016). En effet les microorganismes sont capables de mimer des réactions de biotransformations des mammifères, voire d'en développer de nouvelles. Ainsi les microorganismes permettent d'obtenir les métabolites humains en quantité suffisantes pour en étudier les propriétés.

L'objectif des travaux sur le mégazol a donc été d'obtenir ses métabolites par une autre voie que celle utilisant un modèle animal. Toutefois, le manque de données nous a obligé à analyser une partie de la bibliothèque de microorganismes mise à notre disposition au sein du laboratoire UMR 7245 CNRS/MNHN.

1- Sélection des microorganismes actifs

La sélection des microorganismes a été réalisée par un criblage combinatoire reposant sur le mélange de plusieurs microorganismes afin d'effectuer un screening rapide et efficace de leur action sur la molécule à étudier. La bibliothèque de microorganismes de l'équipe UMR 7245 CNRS/MNHN, offre la possibilité de travailler sur des champignons filamenteux et des bactéries ayant des propriétés oxydatives et réductrices et des levures possédant majoritairement des propriétés réductrices. Pour éviter les compétitions des propriétés oxydatives et réductrices, les levures ont été étudiées seules, et les bactéries et autres champignons ont été mélangés.

Ainsi 33 microorganismes ont été étudiés, en 3 séries de 11 souches réparties dans 4 erlenmeyers suivant une répartition précise (tableau 57).

BY-NC-ND

		microorganismes	Souches	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Série 1	1	C	*Absidia glauca* LCP 00556	X			X								
	2	C	*Chaetonium indicum* LCP 984200	X			X								
	3	C	*Absidia blakesleena* ATCC 10148b	X											
	4	B	*Nocardia opaca* ATCC 4276	X	X										
	5	B	*Corynebacterium equi* ATCC 10146	X	X										
	6	C	*Absidia corymbifera* LCP 631800		X										
	7	C	*Syncephalastrum racemosum* LCP 722150		X	X									
	8	C	*Acremonium alternatum* MMP 3010		X	X									
	9	C	*Apsergillus niger* ATCC 9142			X									
	10	B	*Bacillus megaterium* NRLL R938			X	X								
	11	C	*Cunninghamella echinulata* ATCC 9245				X								
Série 2	12	C	*Aspergillus candidus* ATCC 20023					X			X				
	13	C	*Aspergillus terreus* LCP 752296					X			X				
	14	B	*Streptomyces antibioticus* NRRL 8167					X	X						
	15	B	*Streptomyces coelicolor* A(3)2												
	16	C	*Mucor sinensis* CBS 20474						X	X					
	17	C	*Mortierella isabelina* NRRL 1757						X						
	18	C	*Rhizopus arrhizus* ATCC 11145						X	X					
	19	C	*Cunninghamella echinulata var elegans* ATCC 36112							X					
	20	B	*Rhodococcus ruber* DSM 44541					X	X						
	21	B	*Rhodococcus rhodochrous* DSM 43198							X	X				
	22	C	*Mucor plumbeus* CBS 11016								X				
Série 3	23	L	*Kloekera magna* NRRL Y1611									X			X
	24	L	*Pichia anomala* NRRL Y40									X			X
	25	L	*Pichia minuta* MUCL 27758									X			
	26	L	*Rhodotorula buffonii* MUCL 29812									X	X		
	27	L	*Rhodotorula mucilaginosa*									X	X		
	28	L	*Rhodotorula rubra* ATCC 4056										X		
	29	L	*Saccharomyces montanus* CBS 6772										X	X	
	30	L	*Yarrowia lipolytica* MUCL 29853										X	X	
	31	L	*Zygosaccharomyces fermentati* MUCL 31281											X	
	32	L	*Kluyveromyces dubbzurski*												X
	33	L	*Dipodascus albidus* MUCL 31469											X	X

Tableau 57. Criblage analytique des microorganismes

Cette approche combinatoire permet de donner rapidement des résultats de manière précise. En effet, si nous obtenons des résultats uniquement dans l'erlenmeyer C de la série 1, nous pouvons donc en déduire que seul le microorganisme 9 (*Aspergillus niger*) est capable d'avoir une action à l'encontre de la molécule car les autres microorganismes sont présents dans les autres erlenmeyers. A l'inverse si nous obtenons des résultats dans les erlenmeyers A et D, nous pouvons conclure qu'il y a 2 candidats, les microorganismes 1 et 2 (*Absidia glauca* et *Chaetonium indicum)* puisqu'ils sont présents dans les 2 erlenmeyers. Cette méthode permet

BY-NC-ND

donc de réduire considérablement le nombre de manipulations. Elle permet également d'envisager des biotransformations dites croisées. En effet, lors du criblage, une molécule qui sera métabolisée par un microorganisme pourra dans un second temps subir une nouvelle métabolisation par un deuxième microorganisme et cela dans le même erlenmeyer.

Pour effectuer cette étude de biotransformation, une culture préalable de chaque microorganisme est nécessaire.

2- Etude analytique du mégazol à partir des microorganismes

Une fois les microorganismes sélectionnés, une culture de chacun d'entre eux a été faite suivant le protocole établi par le Dr Buisson en vue de l'étude analytique. Pour cela, chaque souche est mise en culture indépendamment dans du milieu stérile YMS glucosé, sous agitation à 25°C durant 24 à 48h suivant le microorganisme.

La biomasse est collectée par filtration pour les champignons ou par centrifugation pour les levures et bactéries, et elle est répartie dans les 4 différents erlenmeyers selon le schéma de répartition précédemment décrit. Cinq mL d'une solution de mégazol à 0,4 mg/mL de tampon phosphate pH 7 et DMSO est ajouté dans chaque erlenmeyer. Puis, du tampon phosphate pH 7 est ajouté dans chaque erlenmeyer pour obtenir un volume final de 20 mL. Tous les erlenmeyers sont alors mis à incuber à 25°C sous agitation. Des prélèvements réguliers sont alors effectués pour analyse CLHP. Les prélèvements sont centrifugés pour obtenir un surnageant qui est directement injecté en CLHP, et un culot qui est extrait au méthanol puis centrifugé et injecté en CLHP. L'ensemble de la méthode est décrit dans la figure 81.

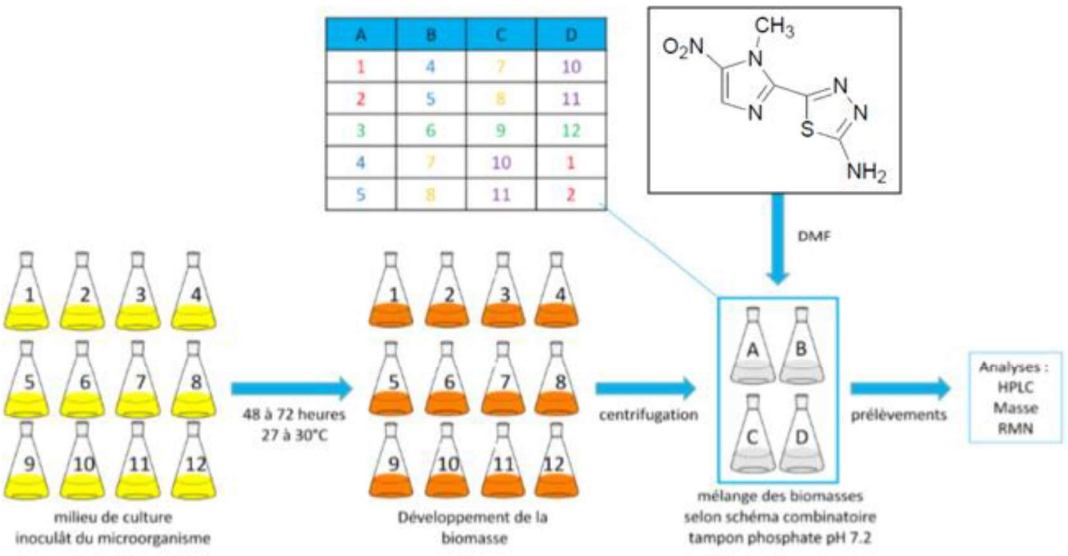


Figure 81. Plan du protocole de l'étude de bioconversion du mégazol
(Thèse Fromentin, 2013)

BY-NC-ND

Nous avons également analysé ces prélèvements à Limoges, par Chromatographie Liquide couplé à un Spectromètre de Masse (LC-MS) pour vérifier la présence ou non du mégazol et de ses métabolites. Ceci a été fait en se basant sur la même méthode MRM utilisée précédemment pour le modèle murin (Cf article Boudot 2019). Nous avons pu constater que certains microorganismes, essentiellement des champignons, étaient capables de produire des composés ayant les mêmes profils de fragmentation que ceux obtenus avec le modèle murin. C'est le cas pour les erlenmeyers E et H, où leur LC-MRM sont très proches (figures 82 et 83). On remarque que dans ces 2 erlenmeyers sont détectés au même temps de rétention et avec les mêmes transitions le mégazol, les composés 239 et 358. Ces composés sont également présents dans les analyses de souris (figures 84 et 85). *Aspergillus terreus* et *A. candidus* sont alors présents dans les erlenmeyers E et H.

L'ensemble des différentes analyses effectuées en CLHP puis en LC-MRM ont permis de sélectionner 6 microorganismes d'intérêt majeurs dans l'ensemble de la première étude : *Aspergillus candidus*, *Aspergillus terreus*, *Mortierella isabelina*, *Mucor plumbeus* et *Pichia minuta*.

Par la suite, des analyses individuelles de ces 6 microorganismes ont été réalisées, et après analyse CLHP, il a été constaté que seuls 3 d'entre eux jouaient un rôle dans la synthèse des composés. Il s'agit de *A. terreus*, *M. isabelina* et *M. plumbeus*.

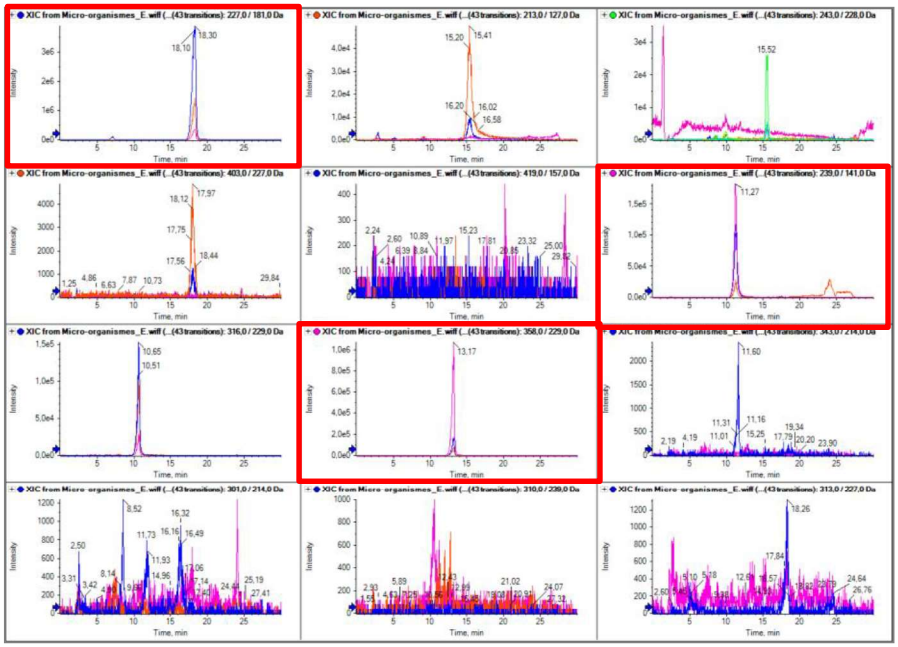


Figure 82. Résultats LC-MRM de l'erlenmeyer E

BY-NC-ND

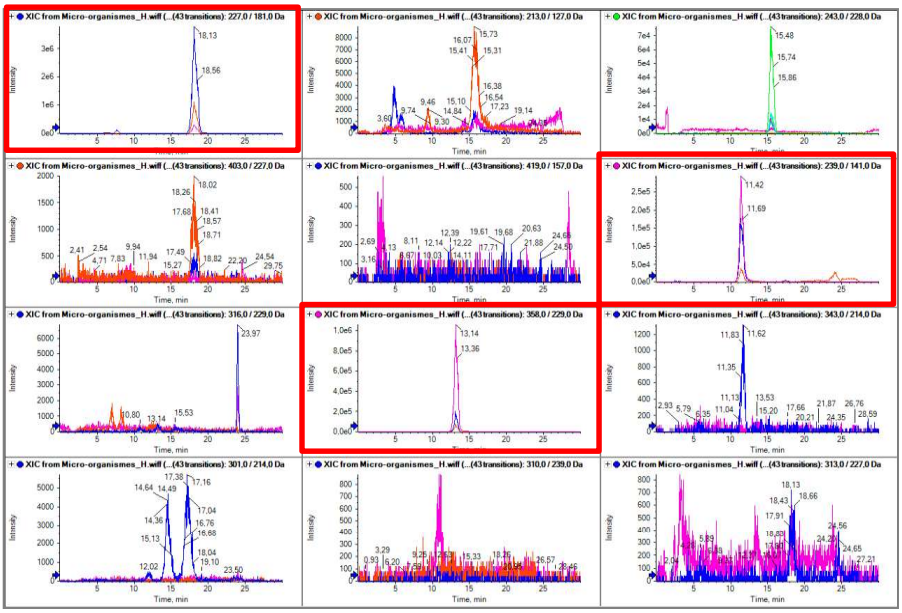


Figure 83. Résultats LC-MRM de l'erlenmeyer H

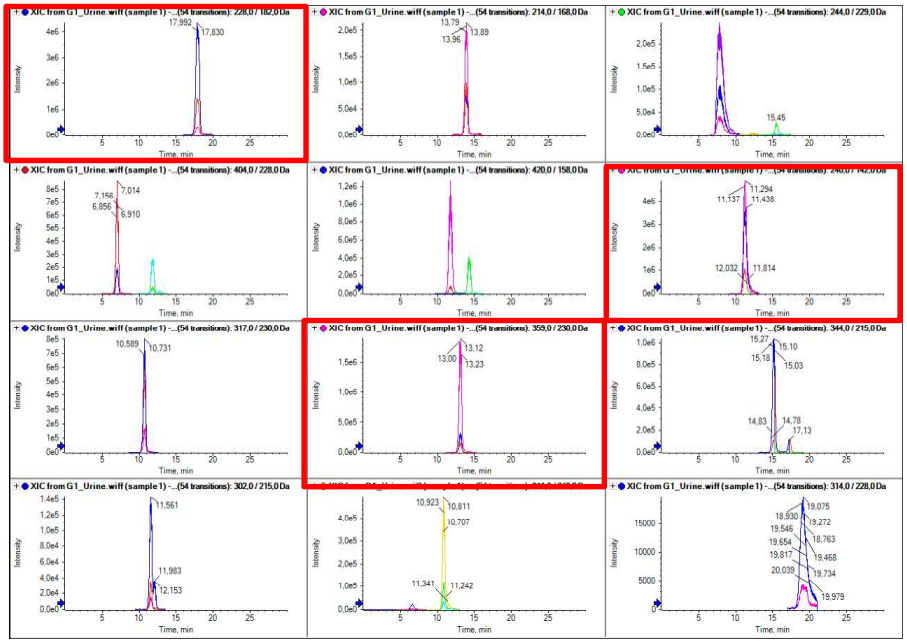


Figure 84. Résultats LC-MRM des urines de souris

BY-NC-ND

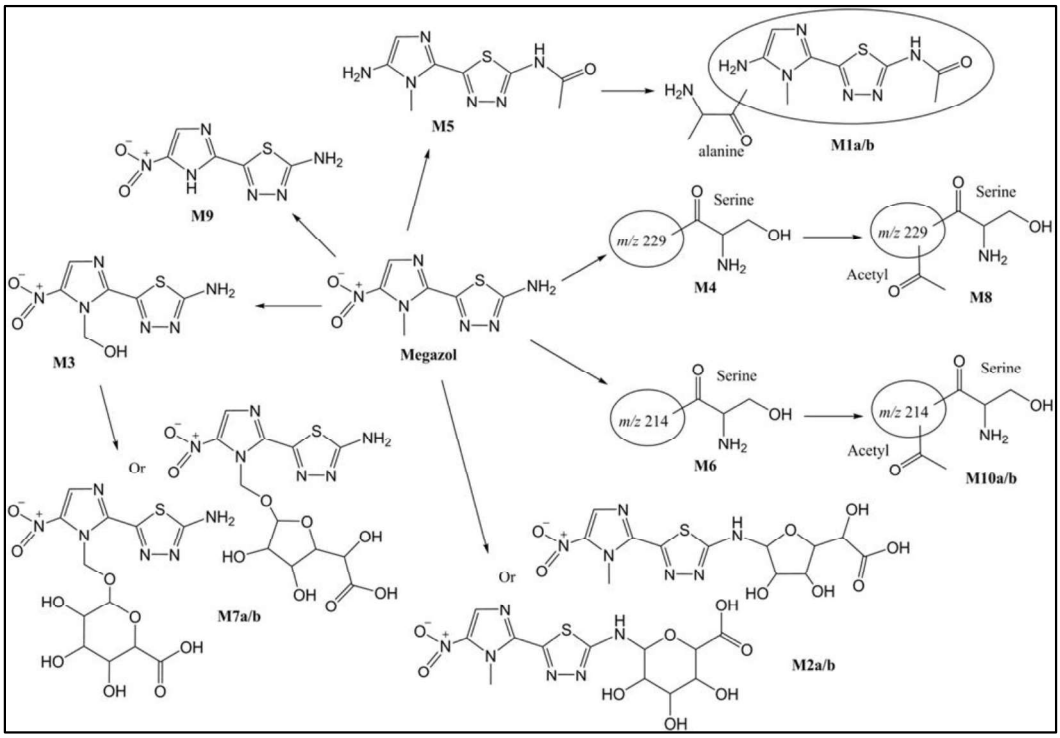


Figure 85. Structures envisagées pour les métabolites du mégazol

3- Etude préparative du mégazol à partir de microorganismes

1ère expérience :

Pour mettre en évidence les métabolites du mégazol, les conditions analytiques ont été transposées à l'échelle préparative à partir des microorganismes d'intérêt. Le premier microorganisme étudié est *Aspergillus terreus.* Une culture individuelle a été effectuée à grande échelle (1 L de milieu stérile YMS glucosé) afin d'obtenir suffisamment de biomasse.

Cette biomasse est par la suite reprise dans 500 mL de tampon phosphate pH 7 et mise dans un fermenteur. Une solution de mégazol à 0,7 mg/mL de tampon phosphate et DMSO est ajoutée progressivement pour atteindre un volume final de 1 L. Ce bioréacteur permet de contrôler un certain nombre de paramètres pendant l'incubation, à savoir la température, le pH, l'aération et l'agitation.

Après 7 jours d'incubation, le fermenteur est stoppé et l'intégralité du contenu est collectée pour filtration. La biomasse est remise en suspension dans du méthanol puis soniquée 3 fois pendant 15 minutes avant d'être à nouveau filtrée pour garder d'un côté la biomasse et de l'autre, l'extrait liquide méthanolique qui sera mis à évaporer. Le surnageant de départ dit « pur » et quant à lui lyophilisé (figure 86).

BY-NC-ND

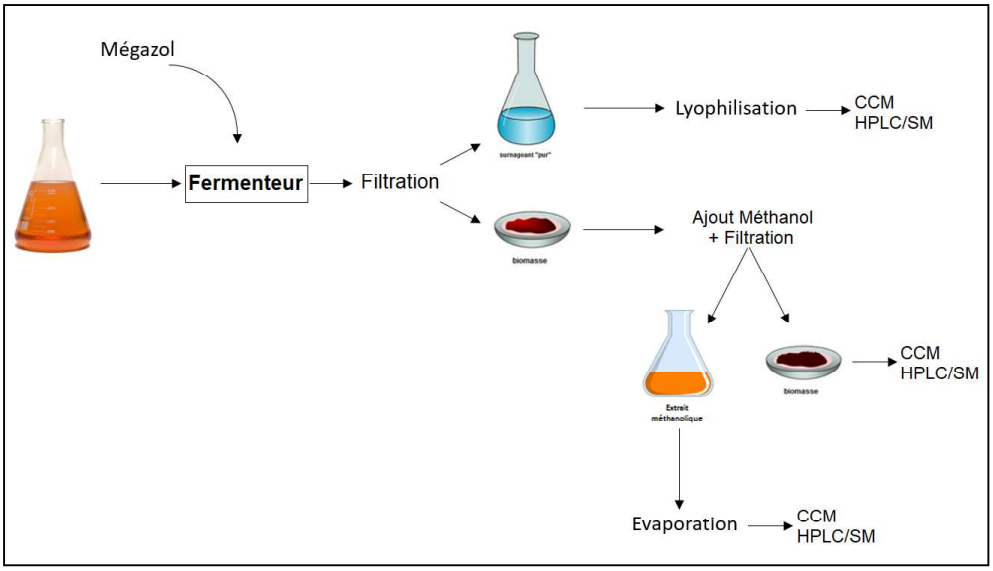


Figure 86. Principe de l'étude du fermenteur d'*A. terreus*

A partir de l'extrait liquide méthanolique, une évaporation est réalisée afin de le mettre en suspension dans un mélange MeOH/ACN pour une analyse par spectrométrie LC-MRM à Limoges (figure 87).

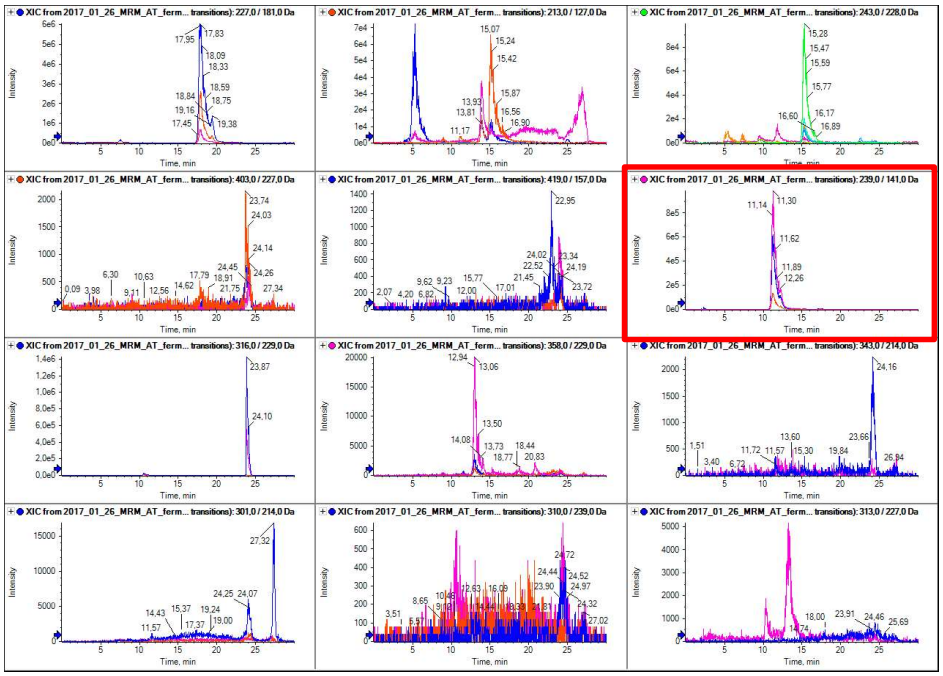


Figure 87. Chromatogramme de l'extrait méthanolique *A.terreus*

L'extrait lyophilisé est quant à lui repris dans du méthanol pour lavage. Puis il est mis à évaporer pour reprendre l'extrait dans le mélange MeOH/ACN. Une centrifugation permet donc d'obtenir un surnageant directement collecté pour analyse, le culot est quant à lui repris dans

BY-NC-ND

de l'eau pour une nouvelle centrifugation et recueil du nouveau surnageant aqueux. Ces échantillons sont par la suite analysés en spectrométrie à Limoges. Les résultats obtenus sont les suivants (figures 88, 89). En nous basant sur la méthode MRM de détection des métabolites issus des souris, nous détectons pour chaque extrait méthanolique ou lyophilisé, le composé 239 en quantité plus ou moins importante. Le mégazol et les autres métabolites ne sont pas présents dans ces échantillons.

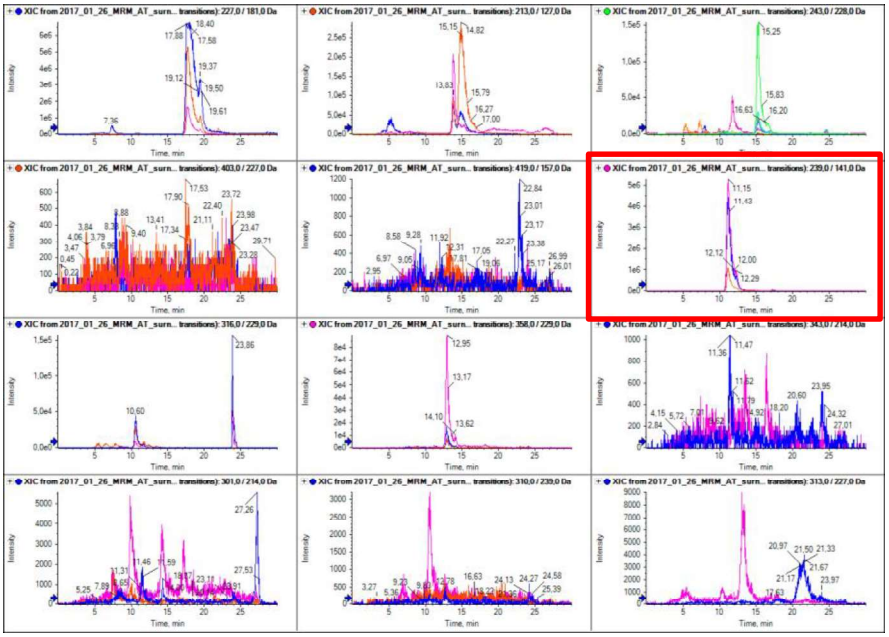


Figure 88. Chromatogramme de l'extrait lyophilisé *A. terreus* (culot des lavages MeOH/ACN)

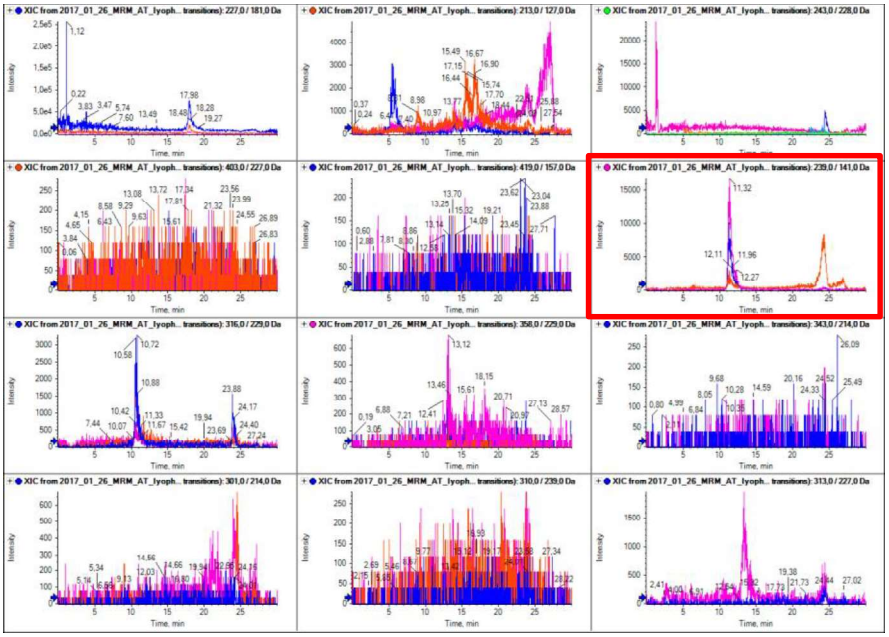


Figure 89. Chromatogramme de l'extrait lyophilisé *A. terreus* (Surnageant lavage MeOH/ACN)

BY-NC-ND

De plus, des chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées à partir des 3 extraits, et seuls les extraits « surnageant des lavages MeOH/ACN » et « extrait méthanolique », ont permis de montrer la présence de composé capable de migrer différemment du mégazol.

Nous avons donc décidé de poursuivre les tests sur l'extrait lyophilisé repris dans du MeOH.

❖ Analyse à partir de l'extrait lyophilisé d'*A. terreus* repris dans du MeOH

Nous avons effectué une purification à partir d'une colonne. Pour cela un solvant de purification composé de 50/50 CH_2Cl_2 (dichloromethane)/ AcOEt (acétate d'éthyle) est utilisé afin de séparer les constituants en fonction de leur polarité (le CH_2Cl_2 est moins polaire que l'AcOEt). La silice utilisée est un composé polaire permettant de retenir les composés polaires. Ainsi les composés apolaires vont être élués de la colonne en premier. Un dégradé de couleur, montrant la séparation des composés, est observé dès le début de la purification. Le contenu de la colonne est récupéré dans des tubes de 5 mL et tous les 5 tubes, une CCM est réalisée pour vérifier la présence de composés, leur pureté et pour observer un changement de migration. Les tubes contenant des composés identiques sont réunis et mis à évaporation pour de nouvelles études comme c'est le cas des tubes 15 à 17, des tubes 18 à 21, des tubes 22 à 30, des tubes 31 à 45, des tubes 46 à 60, et des tubes 61 à 75. A la fin, la colonne est lavée au MeOH et le contenu est analysé.

Une deuxième colonne est mise en place sur un pool de 2 fractions issues des tubes 15 à 17 et 18 à 21 de la première colonne et ayant montré le plus d'intérêt en CCM. Cette colonne utilise cette fois-ci le solvant 90/10 CH_2Cl_2/AcOEt. Le changement de proportion entre les 2 solvants permet d'apporter une moins grande polarité par le CH_2Cl_2 permettant de mieux séparer les composés en retenant les composés polaires plus longtemps. Le même protocole de purification est effectué, nous récupérons les fractions différentes dans des tubes afin de les tester en CCM pour vérifier la pureté des composés.

Les fractions issues des tubes 21 à 30 de la colonne 1 et les tubes de lavage méthanol de la colonne 2, présentant le plus d'intérêt par détection de composés purs lors des CCM, ont été utilisés pour faire une 3ème colonne. Dans un premier nous décidons d'utiliser une plus grosse silice permettant de retenir les produits directement dans le ballon contenant nos fractions. Le tout est mis à évaporation, et la silice capte les composés. Cette silice est alors déposée sur une colonne solide qui se compose de solvant 70/30 cyclohexane/AcOEt. Cette technique permet d'avoir un dépôt plus fin car le produit est plus vite entrainé de la grosse silice vers la silice fine. Nous collectons les fractions pour effectuer des CCM de confirmation.

BY-NC-ND

Pour les 3 colonnes effectuées, des échantillons des fractions les plus pertinentes, ayant mis en évidence des composés en CCM, ont été analysés à Limoges par spectrométrie de masse. Les analyses de spectrométrie de masse ont été faites en comparaison avec les résultats obtenus sur les urines de souris afin de retrouver les mêmes métabolites.

Les résultats obtenus sont les suivants (figures 90, 91).

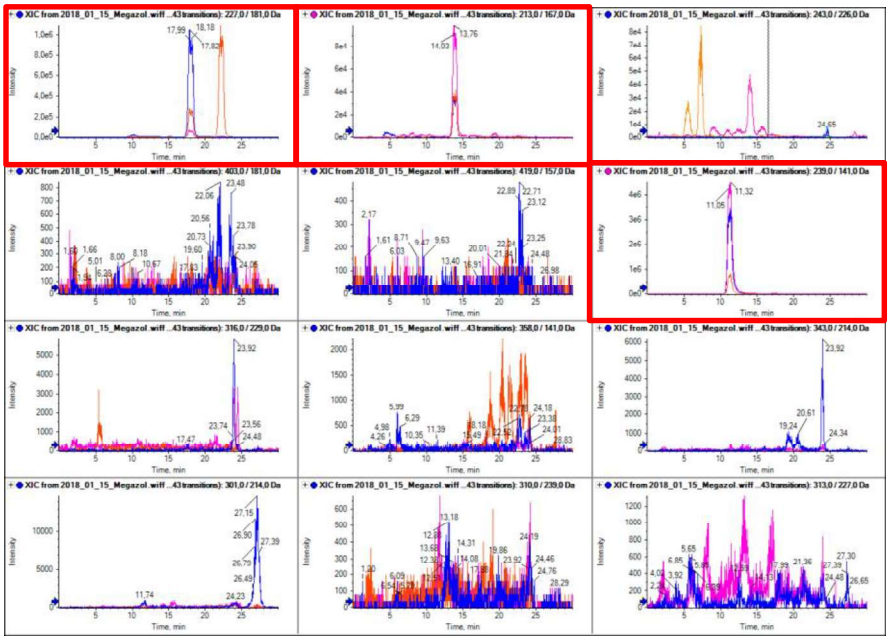


Figure 90. Chromatogramme de la fraction « Lavage MeOH colonne 1 »

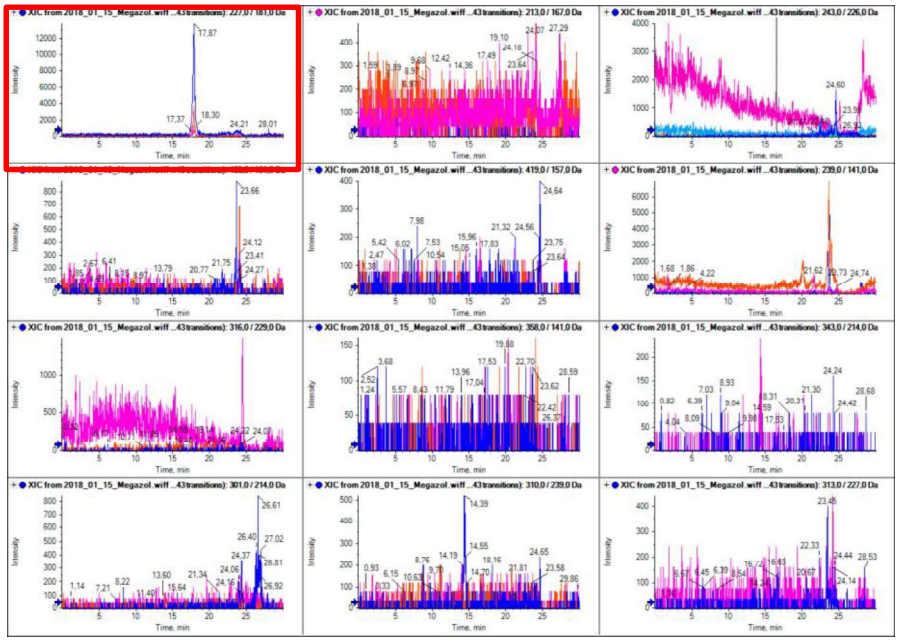


Figure 91. Chromatogramme des fractions « 15 à 19 de la colonne 3 »

BY-NC-ND

Les résultats obtenus montrent que même après 3 colonnes, nous retrouvons encore du mégazol dans les échantillons.

Les résultats les plus pertinents sont ceux des fractions de la colonne 1, où nous avons retrouvé du mégazol mais également une faible quantité d'ion 213. Ce dernier n'avait pourtant pas été retrouvé lors des premières analyses. Il n'y a que dans la fraction intitulée « lavage MeOH colonne 1 », que nous avons retrouvé le composé 239 en grande quantité. Les fractions de la colonne 2 n'ont donné aucun résultat pertinent pour la recherche des métabolites précédemment observés. De plus, dans la colonne 3, aucun autre composé n'a pu être retrouvé dans les fractions analysées. Or les CCM faites sur ces mêmes fractions présentaient des identifications de migration autres que celle du mégazol.

Une nouvelle expérience a donc été initiée.

2ème expérience :

Une culture de 3 L d'*A. terreus* a été faite afin d'initier une dernière expérience pour mettre en évidence le composé 239 en plus grande quantité.

Les 3 L de culture ont été filtrés. Le filtrat a été ajusté à pH 7 par ajout de NaOH 3M, et mis dans une ampoule à décanter pour effectuer une extraction à l'AcOEt afin d'obtenir 2 phases. La phase organique est recueillie et mise à l'évaporation, la phase aqueuse est remise dans l'ampoule à décanter pour une nouvelle extraction. Ce procédé a été réalisé 3 fois. Les phases organiques ont été assemblées et mises à évaporer.

Une nouvelle ampoule à décanter est alors utilisée pour effectuer une solvatation au NaCl. A partir du contenu du ballon évaporé, repris dans de l'AcOEt, et placé dans l'ampoule, nous avons ajouté une eau saturée en NaCl. Cette solvatation va permettre de dissoudre les composés et de les séparer pour pouvoir les collecter indépendamment. Nous prélevons donc une phase aqueuse et une phase organique. Cette dernière est alors mélangée avec du sulfate de magnésium afin de capter les composés pour les extraire du solvant. Le tout est alors filtré pour collecter une quantité de produit qu'il faut analyser, appelée « filtrat AcOEt ». Une dernière expérience est alors réalisée à partir des échantillons de l'expérience 2. En effet les résultats obtenus en spectrométrie de masse ont permis de montrer l'intérêt de certaines fractions. A partir de la fraction « lavage MeOH colonne 1 », nous décidons d'effectuer une CLHP préparative afin de récupérer les composés présents dans cette fraction de façon plus précise tout en ayant une plus grande quantité. Pour cela nous utilisons les paramètres suivants : Phase A : H2O/ACN 95/5 + 0,05% TFA ; Phase B : ACN/H2O 95/5 + 0,05% TFA. La CHLP est utilisée avec un débit de 10 mL/min et des longueurs d'onde de 254,4 nm et

BY-NC-ND

310,4 nm. La fraction C1 lavage MeOH est injectée dans la CLHP préparative et chaque composé identifié est récupéré individuellement (figure 92).

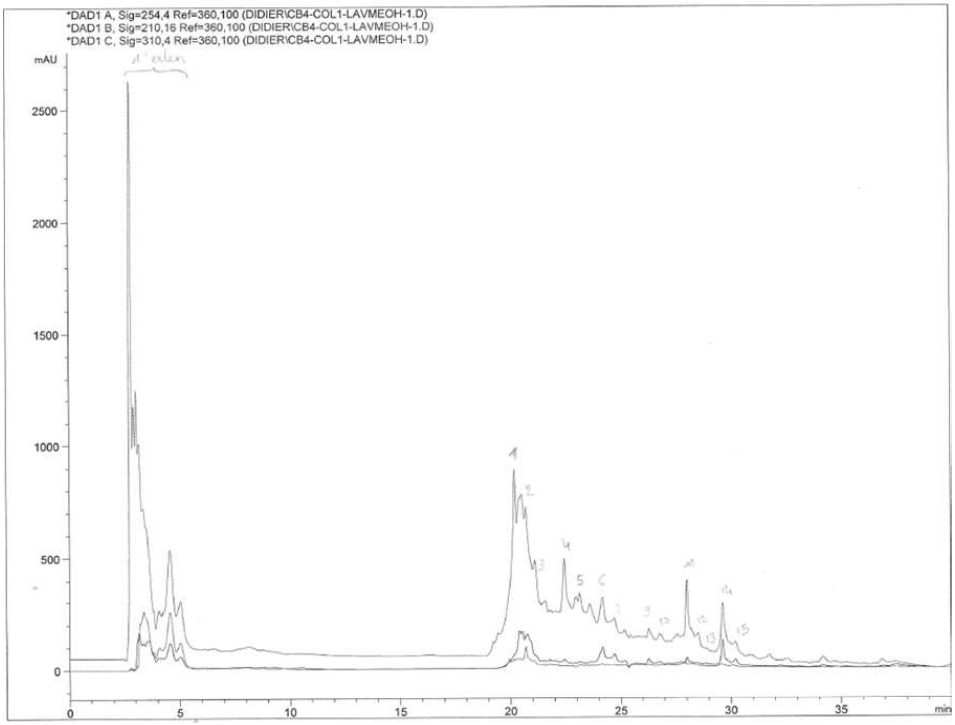


Figure 92. Chromatogramme de la CLHP préparative de la fraction C1 lavage MeOH

Chaque pic correspondant à un composé collecté est analysé en spectrométrie LC-MRM à Limoges. Les résultats obtenus sont les suivants (figures 93, 94).

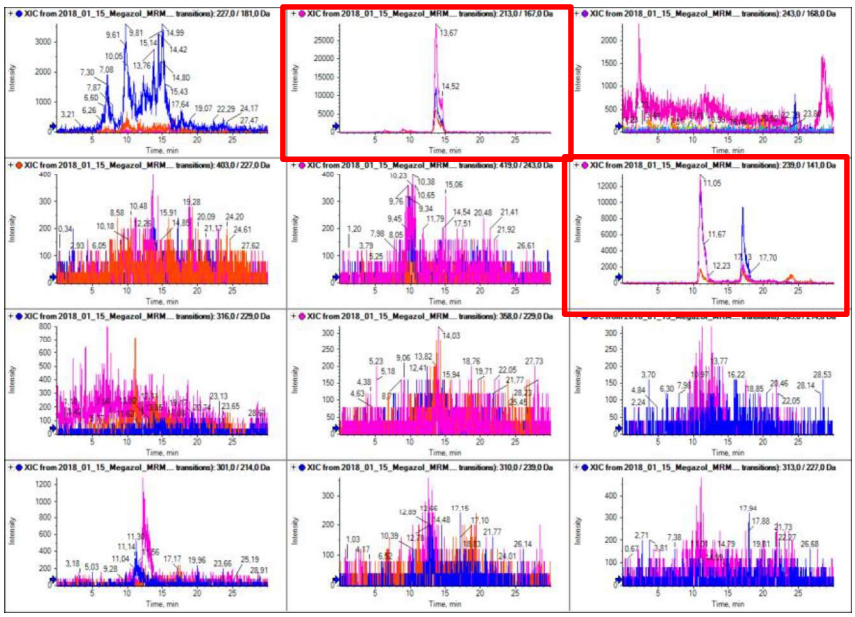


Figure 93. Chromatogramme correspondant au pic 1 de la CLHP préparative de la fraction « C1 lavage MeOH »

BY-NC-ND

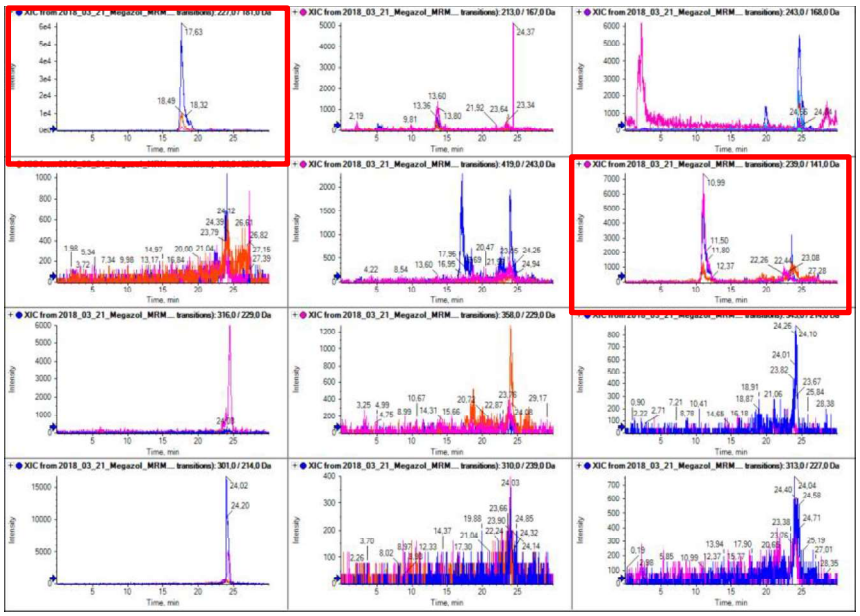


Figure 94. Chromatogramme correspondant au pic 14 de la CLHP préparative de la fraction « C1 lavage MeOH »

Nous constatons que nous retrouvons le composé 239 dans les 2 extraits recueillis mais que le mégazol n'est retrouvé que dans l'extrait 14, où il y a majoritairement de l'ACN en fin d'analyse. Ceci est cohérent car le mégazol est plus apolaire que les métabolites produits qui vont sortir avant comme c'est le cas pour l'ion 213 qui sort dès la fraction 1.

Malheureusement, la présence de mégazol signe le fait que les composés ne sont pas purs et que le microorganisme n'est pas capable de métaboliser en totalité le composé.

BY-NC-ND

Une collaboration a été initiée avec l'UMR INSERM U1212 / CNRS 5320 - Laboratoire ARNA de Bordeaux sous la direction du Pr Jean-Louis Mergny, et plus particulièrement avec le Pr Jean Guillon qui travaille à la conception et synthèse de molécules à visée thérapeutique. Spécialisé dans l'étude des G-Quadruplexes pour limiter la réplication des parasites par inhibition de la télomérase, le Pr Guillon travaille à la synthèse de différents systèmes moléculaires à partir d'une structure de base composée d'un noyau hétérocyclique de type azoté à laquelle sont liées des chaines aliphatiques portant une ou plusieurs fonctions amines. L'ensemble des pharmacomodulations proposées sont déclinées autour de ce synthon de type « quinoline-like » ou « pyridine-like » auquel s'ajoute des substitutions essentielles pour une meilleure activité comme la présence de groupements lipophiles afin d'optimiser le passage transmembranaire, et la présence de plusieurs sites de protonation ou d'une charge positive permettant de favoriser les interactions électrostatiques lors de la liaison ou du transport au travers des membranes (Leeder et al., 2016; Das et al., 2017; Gueddouda et al., 2017; Guillon et al., 2017). Ainsi, partant d'une structure phénanthrolinique, plusieurs substituants ont été ajoutés et de nouvelles modulations ont été réalisées (modulation du système hétérocyclique, mono substitution…) pour conduire à différentes séries de molécules présentées ci-après (Figure 95).

BY-NC-ND

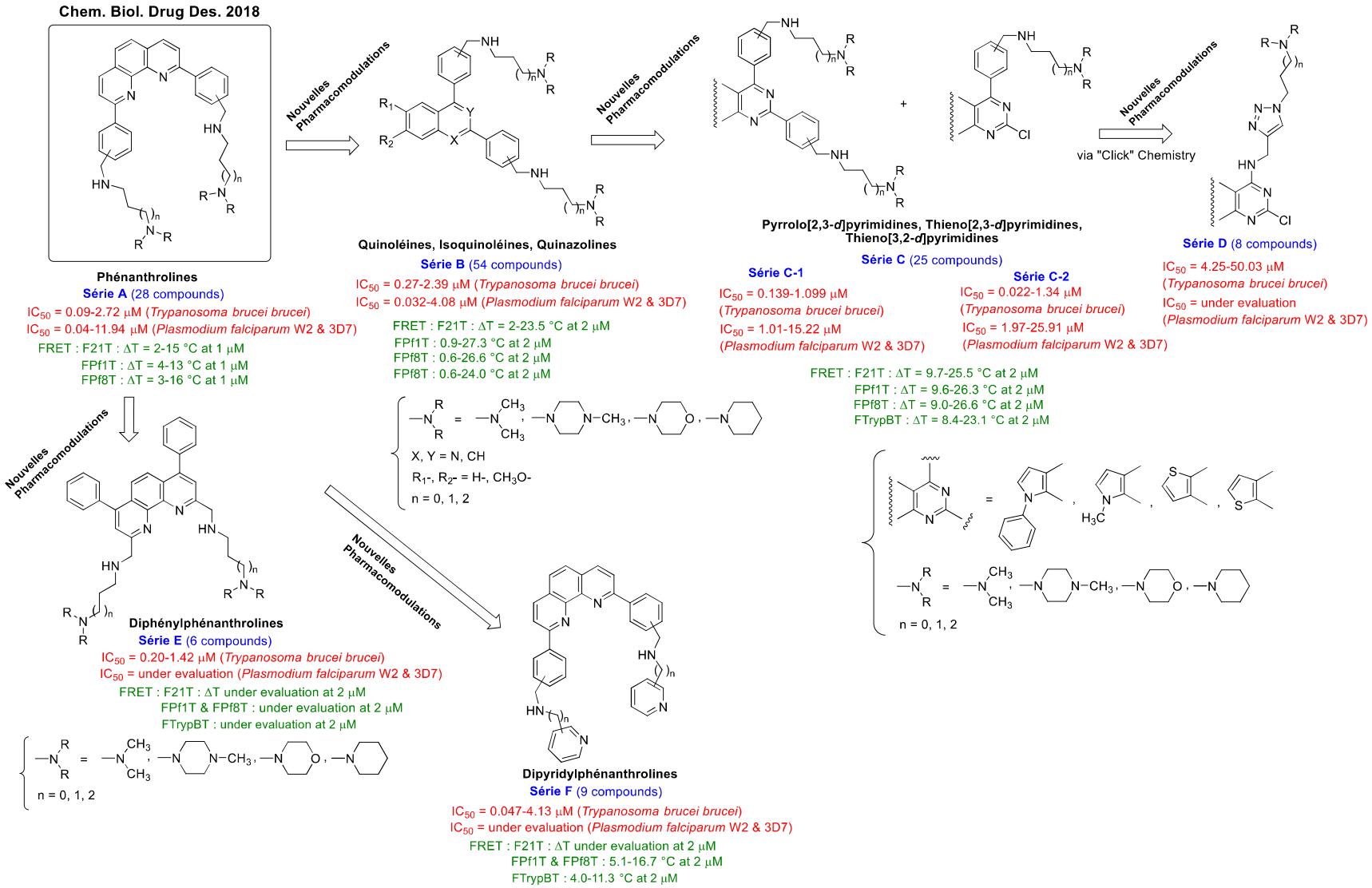


Figure 95. Structures des composés hétérocycles azotés

(Données personnelles Pr J. Guillon)

BY-NC-ND

Cibler la télomérase présente un grand intérêt car cette enzyme joue un rôle essentiel dans les phénomènes de réplication ou de transcription des eucaryotes et donc des protozoaires de types *Leishmania*, et *Trypanosoma*. En effet, la télomérase sert à conserver la longueur du chromosome pendant la réplication de l'ADN en ajoutant à chaque extrémité un complexe nucléoprotéique appelé télomère, qui permet de protéger les chromosomes de la dégradation, de la fusion ou de tout phénomène de recombinaison. Ainsi, les extrémités télomériques assurent à l'individu l'intégrité et la stabilité chromosomale. Ces séquences télomériques possèdent de nombreuses répétitions de groupe de type TTAGGG (Moyzis et al., 1988).

Les G-quadruplex sont des structures temporaires formées lorsque l'ADN se trouve sous forme simple brin, ainsi ils ne peuvent apparaitre que lors de phénomènes bien précis de réplication ou de transcription (Huppert and Balasubramanian, 2005; Rhodes and Lipps, 2015). Ce repliement transitoire de l'ADN se fait dans des régions riches en guanines, telles les séquences télomériques (figure 96). Or cette formation de G-quadruplex va inhiber l'action de la télomérase qui ne pourra plus agir pour allonger l'ADN, et va donc agir comme régulateur négatif de la formation des télomères (Zahler et al., 1991).

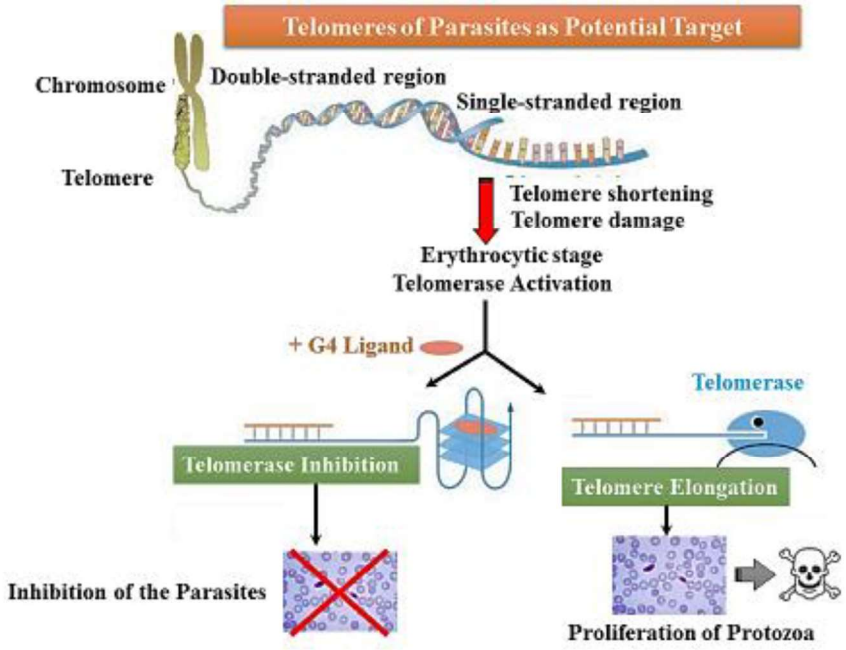


Figure 96. Mécanismes des ligands de G-quadruplex
(Pr J. Guillon)

Inhiber la télomérase par stabilisation des G-quadruplex des télomères offre une cible attractive et sélective pour développer de nouveaux composés susceptibles d'inhiber la prolifération des protozoaires. Dans cette optique, les séries décrites précédemment ont été testées à l'encontre de la souche de *T.b.b.* AnTat 1.9 pour déterminer leur CI_{50}.

III.1. Série A : Dérivés phénanthrolines

La série A, a été conçue et synthétisée à partir d'une structure de base dérivant de phénanthrolines pour accéder à des dérivés de type 2,9-bis[(substitués-aminométhyl)phényl]-1,10-phénanthroline. Les 25 composés de cette série ont été testés sur différents protozoaires et notamment différentes souches de *Plasmodium falciparum*, de promastigotes de *L. donovani* et d'une souche de *T.b.b.* afin de déterminer une valeur de CI_{50} les comparant aux traitements de référence.

Partant du même principe que pour le chapitre 1, l'évaluation de potentiels candidats médicaments se fait par des tests *in vitro* de détermination de la CC_{50} permettant donc de vérifier la cytotoxicité des composés mais également leur solubilité sur des cellules HepG2. Puis une recherche de la CI_{50} sur les parasites précédemment cités est effectuée. Les meilleurs candidats obtenus (CC_{50} > 62,5 µM et CI_{50} < 1 µM) pourront prétendre à poursuivre les tests *in vitro* de mutagénicité et de génotoxicité, voire *in vivo* sur modèle murin pour la recherche de l'activité trypanocide.

a) Tests de la cytotoxicité

La détermination de la CC_{50} a été faite par l'équipe Vitrome de Marseille. Cette expérience s'est faite avec des cellules HepG2 selon les mêmes conditions qu'expliquées dans le chapitre 1. Les résultats obtenus ont permis de montrer des composés cytotoxiques avec des CC_{50} ne dépassant jamais 20 µM. Ces résultats doivent être complétés par la recherche de la CI_{50} afin de calculer l'indice de sélectivité qui permet d'envisager des composés comme éventuels médicaments comme l'Amphotéricine B avec une CC_{50} de 5,5 µM mais une activité anti-infectieuse suffisamment intéressante pour être classée dans la liste des médicaments essentiels de l'OMS ("OMS | Listes modèles OMS des médicaments essentiels,").

b) Mesure de l'activité antitrypanosomale

Les 25 molécules ont été testées sur la souche de *T.b.b.* AnTat 1.9 suivant le protocole précédemment cité faisant intervenir l'Alamar Blue®. Sur les 25 molécules, seule la molécule 1t, présente une CI_{50} > 50 µM, les 24 autres ont une CI_{50} comprise entre 0,05 et 3,5 µM. Sur ces 24, 16 ont une CI_{50} < 1 µM et parmi celles-ci la molécule 1b présente une CI_{50} < 0,1 µM.

Le calcul des index de sélectivité montre que seulement 7 molécules présentent un IS > 10. Il sera donc primordial de jouer sur l'activité trypanocide ou la cytotoxicité pour améliorer cet index de sélectivité. Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2017 intitulée « Design, synthesis, and antiprotozoal evaluation of new 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline derivatives » (Guillon et al., 2018).

BY-NC-ND

Design, synthesis, and antiprotozoal evaluation of new 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline derivatives

Jean Guillon, Anita Cohen, Rabindra Nath Das, **Clotilde Boudot**, Nassima Meriem Gueddouda, Stéphane Moreau, Luisa Ronga, Solène Savrimoutou, Louise Basmaciyan, Camille Tisnerat, Sacha Mestanier, Sandra Rubio, Sophia Amaziane, Alexandra Dassonville-Klimpt, Nadine Azas, Bertrand Courtioux, Jean-Louis Mergny, Catherine Mullié, Pascal Sonnet

Publié en Décembre 2017

Résumé:

Une série de nouveaux dérivés de la 2,9-bis[(aminométhyl substitué)phényl]-1,10-phénanthroline a été synthétisée et les composés ont été criblés *in vitro* sur trois protozoaires (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, et *Trypanosoma brucei brucei*). Les résultats biologiques ont montré une activité antiparasitaire avec des valeurs de CI_{50} de l'ordre du µM. La cytotoxicité *in vitro* de ces molécules a été évaluée par incubation avec des cellules HepG2 humaines; pour certains dérivés, la cytotoxicité a été observée à des concentrations beaucoup plus élevées que l'activité antiparasitaire. La 2,9-bis[(aminométhyl substitué)phényl]-1,10-phénanthroline **1h** a été identifiée comme le candidat antipaludique le plus puissant avec des rapports d'activités cytotoxiques/antiparasitaires de 107 et 39 contre une souche de *P. falciparum* sensible et chloroquino-résistante. Comme les télomères de *P. falciparum* sont la cible probable de ce composé, nous avons étudié la stabilisation des G-quadruplexes télomériques du *Plasmodium* par nos dérivés phénanthrolines au moyen d'un test de fusion FRET. On a remarqué que les ligands **1f** et **1m** étaient plus spécifiques pour FPf8T avec une stabilisation plus élevée pour FPf8T que pour la séquence F21T humaine.

BY-NC-ND

Received: 26 September 2017 | Revised: 4 December 2017 | Accepted: 7 December 2017

DOI: 10.1111/cbdd.13164

RESEARCH ARTICLE

WILEY

Design, synthesis, and antiprotozoal evaluation of new 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline derivatives

Jean Guillon[1] | **Anita Cohen**[2] | **Rabindra Nath Das**[1] | **Clotilde Boudot**[3,4] | **Nassima Meriem Gueddouda**[1] | **Stéphane Moreau**[1] | **Luisa Ronga**[1] | **Solène Savrimoutou**[1] | **Louise Basmaciyan**[2] | **Camille Tisnerat**[1] | **Sacha Mestanier**[1] | **Sandra Rubio**[1] | **Sophia Amaziane**[1] | **Alexandra Dassonville-Klimpt**[5] | **Nadine Azas**[2] | **Bertrand Courtioux**[3,4] | **Jean-Louis Mergny**[1,6] | **Catherine Mullié**[5] | **Pascal Sonnet**[5]

[1]INSERM U1212, UMR CNRS 5320, ARNA Laboratory, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

[2]Laboratory of Parasitology, UMR-MD3, Faculty of Pharmacy, Aix-Marseille University, Marseille, France

[3]INSERM U1094, Tropical Neuroepidemiology, Limoges, France

[4]Institute of Neuroepidemiology and Tropical Neurology, Université de Limoges, Limoges, France

[5]Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressouces, UMR CNRS 7378, UFR de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

[5]Institute of Biophysics of the CAS, v.v.i., Brno, Czech Republic

Correspondence
Jean Guillon, INSERM U1212, UMR CNRS 5320, ARNA Laboratory, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.
Email: jean.guillon@u-bordeaux.fr

Funding information
DGA; ANR, Grant/Award Number: ANR-12-ASTR-003, ANR-12-IS07-0001, ANR-12-BSV8-0008-01 and ANR-10-NANO-04-03; Conseil Régional d'Aquitaine and Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000477

A series of new 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline derivatives was synthesized, and the compounds were screened in vitro against three protozoan parasites (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, and *Trypanosoma brucei brucei*). Biological results showed antiparasitic activity with IC_{50} values in the μM range. The in vitro cytotoxicity of these molecules was assessed by incubation with human HepG2 cells; for some derivatives, cytotoxicity was observed at significantly higher concentrations than antiparasitic activity. The 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline **1h** was identified as the most potent antimalarial candidate with ratios of cytotoxic-to-antiparasitic activities of 107 and 39 against a chloroquine-sensitive and a chloroquine-resistant strain of *P. falciparum*, respectively. As the telomeres of the parasite *P. falciparum* are the likely target of this compound, we investigated stabilization of the Plasmodium telomeric G-quadruplexes by our phenanthroline derivatives through a FRET melting assay. The ligands **1f** and **1m** were noticed to be more specific for FPf8T with higher stabilization for FPf8T than for the human F21T sequence.

KEYWORDS
antileishmanial activity, antimalarial activity, antitrypanosomal activity, G-quadruplex, phenanthroline

 © 2017 John Wiley & Sons A/S

1 | INTRODUCTION

Malaria remains an important public health problem: In 2015, an estimated 212 million cases occurred worldwide with about 429,000 associated deaths. The vast majority (99%) of cases are due to *Plasmodium falciparum*, and 330,000 are estimated to have occurred in children aged under 5 years of age (70% of the total number of cases worldwide).[1] Although there is a trend toward lower incidence and deaths with a decrease of 21% in incidence rate and 29% in deaths of children between 2010 and 2015[1] due to successful antimalaria programs,[2–4] efforts in research need to be accelerated to control this infectious disease[5], which mainly affects the WHO African Region, the WHO South-East Asia Region, and the WHO Eastern Mediterranean Region.[5] The increasing drug resistance of parasites worldwide is a major impediment to eradication of malaria. Notably, the resistance of *Plasmodium falciparum* to artemisinin has spread within South-East Asia. It was first observed on the Cambodia–Thailand border in 2009[6,7] and has now spread across a wide area of the Greater Mekong Subregion.[1] Rapid scientific advances in understanding of this problem have recently occurred,[8–10] and defined mutations in "K13" gene of *P. falciparum* are now known to be associated with reduced ring-stage susceptibility to artemisinins.[11] Artemisinin and its derivatives are used in malaria treatment in endemic areas, and guidelines for the treatment of severe malaria strongly recommend that adults and children, except pregnant women in their first trimester,

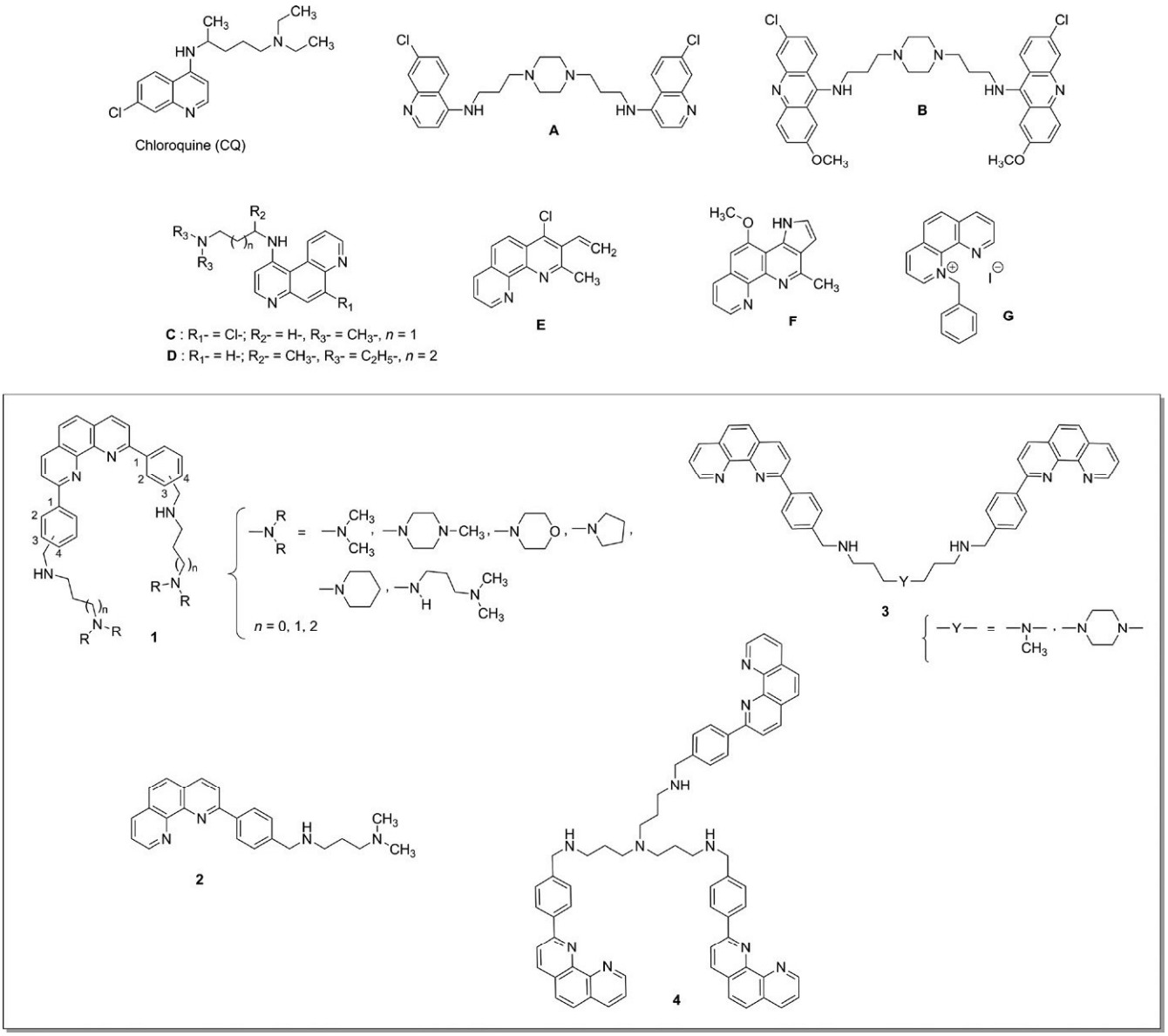


FIGURE 1 The structures of chloroquine, bisquinoline **A**, bisacridine **B**, 4,7-phenanthrolines **C** and **D**, 4-chloro-2-methyl-3-vinyl-1,10-phenanthroline **E**, 4-methoxy-11-methyl-3*H*-pyrrolo[3,2-*c*][1,10]phenanthroline **F**, *N*-benzyl-1,10-phenanthroline **G**, and newly synthesized substituted phenanthroline derivatives **1–4**

be treated with intravenous or intramuscular artesunate for at least 24 hr and until oral medication can be tolerated.[12] Artemisinin-based combination therapies (ACTs) composed of artemisinin or its derivatives and different partner drugs (such as mefloquine, lumefantrine, amodiaquine, sulfadoxine–pyrimethamine, or piperaquine) are then recommended for 3 days.[12] These ACTs are also recommended as the first-line treatment for uncomplicated malaria, caused by all *Plasmodium* species, again with the exception of pregnant women in their first trimester.

The increase in drug resistance in the malaria endemic areas has significantly reduced the potency of most currently used antimalarial compounds. Thus, new antimalarial drugs with new potential mechanisms of action are now required to overcome this emerging resistance and also to control an ever-increasing number of epidemics due to the parasites.[13] Efforts to discover new 4-aminoquinoline derivatives are ongoing. In fact, it is unlikely that the parasite will be able to evolve resistance to drugs targeting the pathway involving the hemoglobin degradation. Previous studies have shown that modification and modulation of the lateral side chain of chloroquine that led to original aminoquinoline compounds avoid the chloroquine resistance mechanism.[14,15]

Another strategy is to design and synthesize quinoline-based drugs that are not recognized by the protein system involved in the drug efflux. Two new series of bisquinoline and bisacridine antimalarial drugs are shown in Figure 1A,B).[16–19] These new derivatives had much lower resistance indices than chloroquine, indicating that these bisheterocyclic structures are less efficiently excluded by drug-resistant parasites. Moreover, previous studies in in vitro antiplasmodial activity of diaza phenanthrene analogs indicated that the 1,10-phenanthroline skeleton represents a potential antimalarial lead compound. A few bioactive antimalarial phenanthrolines based on this skeleton have been described such as 4,7-phenanthrolines (Figure 1C,D),[20] 4-chloro-2-methyl-3-vinyl-1,10-phenanthroline (Figure 1E),[21] 4-methoxy-11-methyl-3*H*-pyrrolo[3,2-*c*][1,10]phenanthroline (Figure 1F),[22] and *N*-benzyl-1,10-phenanthrolinium iodide[23,24] (Figure 1G).

Other parasitic diseases also remain public health challenges. Leishmaniasis is one of the world's most neglected parasitic diseases. *Leishmania* protozoans infect numerous mammal species including humans and are transmitted by the bite of the infected female phlebotomine sandfly insect vector. Some 20 *Leishmania* species cause clinical manifestations of human leishmaniasis. Patients with leishmania have diverse symptoms grouped into two main clinical forms: cutaneous/mucocutaneous leishmaniasis, a benign but often disfiguring condition that is caused by the multiplication of *Leishmania* in the phagocytes of the skin and which has a tendency toward spontaneous resolution, and visceral leishmaniasis, a severe condition that results from the dissemination of *Leishmania* in the phagocytes, mainly macrophages, and which is fatal in almost all cases if untreated. Leishmaniases are endemic in over 98 countries, with more than 350 million people at risk. It is estimated that 1.3 million new cases of leishmaniasis (0.3 million visceral form and 1 million cutaneous form) occur every year.[25] A limited number of chemotherapeutic agents (meglumine antimoniate, sodium stibogluconate, pentamidine, amphotericin B, and miltefosine), all of which have high toxicities and costs,[26,27] can be used to treat leishmaniasis, and although efforts have been made by WHO, non-governmental organizations, and manufacturers to improve access to medicines, leishmaniasis persists in poor countries.

Human African trypanosomiasis (HAT), also known as sleeping sickness, is a parasitic disease caused by *Trypanosoma* transmitted by the bite of the *Glossina* insect, commonly known as the tsetse fly. The disease mostly affects poor populations living in remote rural areas of Africa; if untreated, it is usually fatal. The latest data released by the WHO showed a sustained decrease in the number of new cases of HAT since 1999. In 2015, there were 2,804 new cases reported, of which 2,733 were caused by *Trypanosoma brucei gambiense* and 71 were caused by *Trypanosoma brucei rhodesiense*. [28]

In the course of our work devoted to discovery of new heterocyclic compounds for use in anticancer chemotherapy, we prepared a series of substituted 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline derivatives (Figure 1, **1**) designed to bind to DNA G-quadruplexes.[29] As these 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthrolines possess the structural parameters required for an antimalarial activity, we decided to synthesize new substituted 1,10-phenanthroline compounds (Figure 1) taking into account our experience in the field of the synthesis of new antiprotozoal heterocyclic compounds.[30–36] Herein, we describe the design and synthesis of phenanthrolines and bis- and tris-phenanthrolines (Figure 1, **1–4**) that are considered as new analogs of compounds **A** and **B**. We report on their in vitro antiplasmodial activity against the chloroquine-sensitive (3D7) and the chloroquine-resistant (W2) strains of the malaria parasite *P. falciparum*. As these new compounds were designed as quinoline-like or acridine-like bioisosteres, and as aza heterocycle skeletons are the fundamental unit of many antiprotozoan drugs, these phenanthroline derivatives were also tested for in vitro efficacy against medically important protozoans *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei brucei*.

Moreover, the in vitro cytotoxicity of our new phenanthroline derivatives was assessed in human HepG2 cells, and an index of selectivity, the ratio of cytotoxic-to-antiparasitic activity, was determined for each derivative. The telomeres of the different protozoa constitute attractive drug targets.[37–40] Telomerase activity is detected in gametocytes and during the

transition to the erythrocytic stage of *P. falciparum*.[41] The telomeric 3′ G-overhang region of *P. falciparum* is a repetition of degenerate unit $^{5'}$GGGTTYA$^{3'}$ (where Y could be T or C)[42] and can fold into intramolecular G-quadruplex.[43] We investigated the possibility that these derivatives stabilize telomeric DNA G-quadruplex structures. Potential stabilization of *P. falciparum* telomeric G-quadruplexes was evaluated using a FRET melting assay. All derivatives tested stabilized the intramolecular G-quadruplex formed by the *Plasmodium* telomeric DNA sequence.

2 | METHODS AND MATERIALS

2.1 | Chemistry

Commercial reagents were used as received without additional purification. Melting points were determined with an SM-LUX-POL Leitz hot-stage microscope (Leitz GMBH, Midland, ON, USA) and are uncorrected. IR spectra were recorded on a NICOLET 380FT-IR spectrophotometer (Thermo Electron Scientific Instruments LLC, Madison, WI, USA). NMR spectra were recorded with tetramethylsilane as an internal standard using a BRUKER AVANCE 300 spectrometer (Bruker BioSpin, Wissembourg, France). Splitting patterns are designated as follows: s = singlet; bs = broad singlet; d = doublet; t = triplet; q = quartet; qt = quintet, dd = double doublet; ddd = double double doublet; dt = double triplet; m = multiplet. Analytical TLC analyses were carried out on 0.25-mm precoated silica gel plates (POLYGRAM SIL G/UV$_{254}$), and compounds were visualized with UV light irradiation. Silica gel 60 (70–230 mesh) was used for column chromatography. Microwave experiments were carried out using a focused microwave reactor (CEM Discover, Saclay, France). High-resolution mass spectra (electrospray in positive mode, ESI+) were recorded on a Waters Q-TOF Ultima apparatus. Mass spectra were recorded on an Ultraflex III TOF/TOF system (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), equipped with 200 Hz SmartBeam laser (355 nm) and operating in reflectron-positive ion mode. Mass spectra were acquired over the 300–5,000 *m/z* range by accumulating data from 1,000 laser shots for each spectrum. The instrumental conditions employed to analyze molecular species were the following: ion source 1: 25.08 kV; ion source 2: 21.98 kV; lens: 11.03 kV; pulsed ion extraction: 30 ns; reflector: 26.39 kV; reflector 2: 13.79 kV. Matrix suppression was activated by deflection mode with suppression up to 450 Da. Mass calibration was performed for each sample with a peptide calibration mixture (8206195, Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics). The instrument was controlled using Bruker's flexControl 3.4 software, and mass spectra were analyzed in Bruker's FlexAnalysis 3.4 software (Bruker Daltonics).

2.2 | General procedure for the synthesis of 2,9-*bis*[(substituted-iminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthrolines (6a–s)

To a solution of diamine (2.7 mmol) in ethanol (15 ml) was added *bis*-[2,9-(2-, 3- or 4-formylphenyl)]-1,10-phenanthrol ine **5a–c** (1.29 mmol). The reaction mixture was then heated under reflux for 5 hr and then evaporated to dryness under reduced pressure. After cooling, the residue was extracted with dichloromethane (40 ml). The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. Products were then used without further purification.

2.2.1 | 2,9-*Bis*{4-[(4-dimethylaminobutyl) iminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (6a)

Orange oil (97%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.54 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.40 (s, 2H, 2 HC=N), 8.33 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.19 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.94 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 7.81 (s, 2H, H-5 and H-6), 3.70 (t, J = 7.00 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.36 (t, J = 7.00 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.26 (s, 12H, 4 CH_3), 1.78 (qt, J = 7.00 Hz, 4H, 2 CH_2), 1.59 (qt, J = 7.00 Hz, 4H, 2 CH_2).

2.2.2 | 2,9-*Bis*{4-[(2-dimethylaminoethyl) iminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (6c)

Orange oil (96%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.50 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.41 (s, 2H, 2 HC=N), 8.25 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.12 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.92 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 7.72 (s, 2H, H-5 and H-6), 3.81 (t, J = 7.00 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.70 (t, J = 7.00 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.34 (s, 12H, 4 CH_3).

2.2.3 | 2,9-*Bis*{4-[(4-(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)iminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (6d)

Yellow oil (98%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.54 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.39 (s, 2H, 2 HC=N), 8.33 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.19 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.95 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 7.80 (s, 2H, H-5 and H-6), 3.70 (t, J = 7.15 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.58–2.39 (m, 20H, 2 NCH_2 and 8 NCH_2pip.), 2.28 (s, 6H, 2 CH_3), 1.83–1.73 (qt, J = 7.15 Hz, 4H, 2 CH_2), 1.67–1.57 (qt, J = 7.15 Hz, 4H, 2 CH_2).

2.2.4 | 2,9-*Bis*{4-[(2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl)iminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (6f)

Orange oil (98%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.52 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.41 (s, 2H, 2 HC=N), 8.31 (d,

J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.18 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.94 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 7.79 (s, 2H, H-5 and H-6), 3.85 (t, J = 7.00 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.79 (t, J = 7.00 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.65–2.43 (m, 16H, 2 NCH_2 and 8 NCH_2pip.), 2.31 (s, 6H, 2 CH_3).

2.2.5 | 2,9-*Bis*{4-[(2-morpholinoethyl) iminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (6h)

Pale-yellow crystals (88%); mp = 118°C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.56 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.45 (s, 2H, 2 HC=N), 8.37 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.22 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.96 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 7.84 (s, 2H, H-5 and H-6), 3.88 (t, J = 6.90 Hz, 4H, 2 NCH_2), 3.78 (t, J = 4.70 Hz, 8H, 4 OCH_2), 2.80 (t, J = 6.90 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.63 (t, J = 4.60 Hz, 8H, 4 NCH_2morph.).

2.2.6 | 2,9-*Bis*{4-[(2-pyrrolidin-1-ylethyl) iminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (6j)

Pale-yellow crystals (98%); mp = 179°C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.56 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.48 (s, 2H, 2 HC=N), 8.37 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.22 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.98 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 7.85 (s, 2H, H-5 and H-6), 3.91 (t, J = 7.10 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.94 (t, J = 7.10 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.71–2.68 (m, 8H, 4 NCH_2pyrrol.), 1.89–1.80 (m, 8H, 4 CH_2pyrrol.).

2.2.7 | 2,9-*Bis*{4-[(3-piperidin-1-ylpropyl) iminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (6k)

Pale-yellow crystals (98%); mp = 93°C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.54 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.41 (s, 2H, 2 HC=N), 8.33 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.19 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.95 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 7.81 (s, 2H, H-5 and H-6), 3.74 (t, J = 7.00 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.51–2.38 (m, 12H, 4NCH_2), 2.03–1.92 (qt, J = 7.00 Hz, 4H, 2 CH_2), 1.68–1.55 (qt, J = 5.70 Hz, 8H, 4 CH_2), 1.49–1.41(qt, J = 5.70 Hz, 4H, 2 CH_2).

2.2.8 | 2,9-*Bis*{4-[(3-(3-dimethylaminopropylamino)propyl) iminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (6l)

Orange oil (98%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.53 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.38 (s, 2H, 2 HC=N), 8.32 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.18 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.94 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 7.81 (s, 2H, H-5 and H-6), 4.07 (s, 4H, 2 NCH_2), 3.39–2.84(m, 8H, 4 NCH_2), 2.50–2.34 (m, 4H, 2 NCH_2), 2.24 (s, 12H, 4 CH_3), 1.99–1.88 (qt, J = 7.00 Hz, 4H, 2 CH_2), 1.79–1.65 (qt, J = 7.00 Hz, 4H, 2 CH_2).

2.2.9 | 2,9-*Bis*{3-[(2-morpholinoethyl) iminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (6o)

Orange oil (98%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.70–8.67(m, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.47 (s, 2H, HC=N), 8.32 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.22 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.87 (ddd, J = 7.85, 1.20 and 1.20 Hz, 2H, 2 H-4′), 7.80 (s, 2H, H-5 and H-6), 7.66 (t, J = 7.85 Hz, 2H, 2 H-5′), 3.85 (t, J = 6.85 Hz, 4H, 2 NCH_2), 3.75 (t, J = 4.65 Hz, 8H, 4 OCH_2), 2.79 (t, J = 6.85 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.58 (t, J = 4.65 Hz, 8H, 4 NCH_2morph.).

2.2.10 | 2,9-*Bis*{2-[(3-morpholinopropyl) iminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (6s)

Yellow-orange oil (96%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.83 (s, 2H, HC=N), 8.35 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.12 (dd, J = 7.50 and 1.50 Hz, 2H, 2 H-6′), 7.90 (s, 2H, H-5 and H-6), 7.82 (dd, J = 7.50 and 1.50 Hz, 2H, 2 H-3′), 7.81 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.56 (ddd, J = 7.50 and 1.50 Hz, 2H, 2 H-5′), 7.48 (ddd, J = 7.50 and 1.80 Hz, 2H, 2 H-4′), 3.69 (t, J = 6.80 Hz, 4H, 2 NCH_2), 3.62 (t, J = 4.80 Hz, 8H, 4 OCH_2), 3.52 (t, J = 6.80 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.36–2.28 (m,8H, 4 NCH_2morph.), 1.84–1.77 (qt, J = 6.80 Hz, 4H, 2 CH_2).

2.2.11 | 2,9-*Bis*{4-[(quinolin-3-yl) iminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (6t)

Orange crystals (96%); mp>260°C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 9.00 (d, J = 2.40 Hz, 2H, 2 H-2quinol.), 8.74 (s, 2H, 2 HC=N), 8.66 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.39 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.26 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 8.22 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 8.16 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-8quinol.), 7.94 (d, J = 2.40 Hz, 2H, 2 H-6quinol.), 7.88 (dd, J = 8.10 and 1.50 Hz, 2H, H-5quinol.), 7.86 (s, 2H, H-5 and H-6), 7.71 (ddd, J = 8.40, 8.40 and 1.50 Hz, 2H, 2 H-6quinol.), 7.61 (ddd, J = 8.40, 8.40 and 1.50 Hz, 2H, 2 H-7quinol.).

2.3 | General procedure for the synthesis of 2,9-*bis*[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthrolines (1a–s)

To a solution of compound **6a–s** (1.26 mmol) in methanol (40 ml) was added portion-wise at 0°C sodium borohydride (10.1 mmol; 8 equiv.). The reaction mixture was then heated under reflux for 4 hr and then evaporated to dryness under reduced pressure. After cooling, the residue was triturated in water and extracted with dichloromethane (85 ml).

The organic layer was separated, dried over sodium sulfate, and evaporated to dryness. Oils were used without further purification.

2.3.1 | 2,9-*Bis*{4-[(4-dimethylaminobutyl) aminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (1a)

Yellow-orange oil (81%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.43 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.31 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.14 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.78 (s, 2H, H-5 and H-6), 7.54 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 3.91 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.70 (t, J = 6.90 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.28 (t, J = 6.90 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.21 (s, 12H, 4 CH_3), 2.18 (bs, 2H, 2 NH), 1.61–1.51 (m, 8H, 4 CH_2). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 157.9 (C-2 and C-9), 147.4 (C-1a and C-10a), 143.2 (2 C-4′), 139.5 (2 C-1′), 138.2 (C-4 and C-7), 129.9 (2 C-3′ and 2 C-5′), 129.2 (C-4a and C-6a), 129.1 (2 C-2′ and 2 C-6′), 127.3 (C-5 and C-6), 121.2 (C-3 and C-8), 61.1 (2 NCH_2), 55.1 (2 NCH_2), 50.6 (2 NCH_2), 46.9 (4 CH_3), 29.4 (2 CH_2), 26.9 (2 CH_2). MALDI-TOF MS *m/z* $[M + H]^+$ Calcd for $C_{38}H_{49}N_6$: 589.402, found: 589.422.

2.3.2 | 2,9-*Bis*{4-[(2-dimethylaminoethyl) aminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (1c)

Yellow oil (66%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.43 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.27 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.12 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.75 (s, 2H, H-5 and H-6), 7.55 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 3.93 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.75 (t, J = 6.30 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.47 (t, J = 6.30 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.31 (bs, 2H, 2 NH), 2.22 (s, 12H, 4 CH_3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 157.9 (C-2 and C-9), 147.4 (C-1a and C-10a), 141.7 (2 C-4′), 139.9 (2 C-1′), 138.3 (C-4 and C-7), 130.3 (2 C-3′ and 2 C-5′), 129.3 (C-4a and C-6a), 129.2 (2 C-2′ and 2 C-6′), 127.4 (C-5 and C-6), 121.3 (C-3 and C-8), 59.2 (2 NCH_2), 54.4 (2 NCH_2), 46.5 (2 NCH_2), 46.2 (4 CH_3). MALDI-TOF MS *m/z* $[M + H]^+$ Calcd for $C_{34}H_{41}N_6$: 533.339, found: 533.374.

2.3.3 | 2,9-*Bis*{4-[(4-(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)aminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (1d)

Yellow oil (86%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.38 (d, J = 8.10 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.21 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.07 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.68 (s, 2H, H-5 and H-6), 7.49 (d, J = 8.10 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 3.86 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.65 (t, J = 7.10 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.59–2.28 (m, 22H, 2 NCH_2, 2 NH and 8 NCH_2pip.), 2.22 (s, 6H, 2 CH_3), 1.55–1.43 (m, 8H, 4 CH_2). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 157.9 (C-2 and C-9), 147.4 (C-1a and C-10a), 143.2 (2 C-4′), 139.5 (2 C-1′), 138.2 (C-4 and C-7), 129.9 (2 C-3′ and 2 C-5′), 129.2 (C-4a and C-6a), 129.0 (2 C-2′ and 2 C-6′), 127.2 (C-5 and C-6), 121.1 (C-3 and C-8), 59.9 (2 NCH_2), 56.5 (4 NCH_2pip.), 55.1 (2 NCH_2), 54.6 (4 NCH_2pip.), 50.6 (2 NCH_2), 47.4 (2 CH_3), 29.5 (2 CH_2), 26.1 (2 CH_2). MALDI-TOF MS *m/z* $[M + H]^+$ Calcd for $C_{44}H_{59}N_8$: 699.486, found: 699.462.

2.3.4 | 2,9-*Bis*{4-[(2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl)aminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (1f)

Yellow-orange oil (77%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.44 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.30 (d, J = 8.20 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.14 (d, J = 8.20 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.78 (s, 2H, H-5 and H-6), 7.55 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 3.96 (s, 4H, 2 NCH_2), 3.14 (bs, 2H, 2 NH), 2.77 (t, J = 6.90 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.61–2.38 (m, 16H, 2 NCH_2 and 8 NCH_2pip.), 2.28 (s, 6H, 2 CH_3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 157.9 (C-2 and C-9), 147.5 (C-1a and C-10a), 142.7 (2 C-4′), 139.7 (2 C-1′), 138.3 (C-4 and C-7), 130.1 (2 C-3′ and 2 C-5′), 129.2 (C-4a and C-6a), 129.1 (2 C-2′ and 2 C-6′), 127.3 (C-5 and C-6), 121.3 (C-3 and C-8), 58.8 (2 NCH_2), 56.5 (4 NCH_2pip.), 54.9 (2 NCH_2), 54.4 (4 NCH_2pip.), 47.3 (2 CH_3), 46.7 (2 NCH_2). MALDI-TOF MS *m/z* $[M + H]^+$ Calcd for $C_{40}H_{51}N_8$: 643.424, found: 643.532.

2.3.5 | 2,9-*Bis*{4-[(2-morpholinoethyl) aminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (1h)

Yellow oil (88%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.44 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.31 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.15 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.79 (s, 2H, H-5 and H-6), 7.55 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 3.94 (s, 4H, 2 NCH_2), 3.73 (t, J = 4.60 Hz, 8H, 4 OCH_2), 2.76 (t, J = 6.00 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.55 (t, J = 6.00 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.44 (t, J = 4.60 Hz, 8H, 4 NCH_2morph.), 2.12 (bs, 2H, 2 NH). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 158.0 (C-2 and C-9), 147.5 (C-1a and C-10a), 143.1 (2 C-4′), 139.7 (2 C-1′), 138.3 (C-4 and C-7), 130.0 (2 C-3′ and 2 C-5′), 129.2 (C-4a and C-6a), 129.1 (2 C-2′ and 2 C-6′), 127.4 (C-5 and C-6), 121.3 (C-3 and C-8), 68.4 (4 OCH_2), 59.6 (2 NCH_2), 55.1 (4 NCH_2), 46.4 (2 NCH_2). MALDI-TOF MS *m/z* $[M + H]^+$Calcd for $C_{40}H_{49}N_6O_2$: 645.392, found: 645.469.

2.3.6 | 2,9-*Bis*{4-[(2-pyrrolidin-1-ylethyl) aminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (1j)

Yellow oil (90%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.45 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.31 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.16 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.80 (s, 2H, H-5 and H-6), 7.57 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 3.96 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.82 (t, J = 6.15 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.68 (t, J = 6.15 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.55–2.48 (m, 8H, 4 NCH_2pyrrol.), 2.08 (bs, 2H, 2 NH), 1.82–1.75 (m, 8H, 4

CH_2pyrrol.). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 158.0 (C-2 and C-9), 147.4 (C-1a and C-10a), 143.1 (2 C-4′), 139.5 (2 C-1′), 138.3 (C-4 and C-7), 130.0 (2 C-3′ and 2 C-5′), 129.2 (C-4a and C-6a), 129.1 (2 C-2′ and 2 C-6′), 127.3 (C-5 and C-6), 121.3 (C-3 and C-8), 52.3 (2 NCH_2), 55.6 (4 NCH_2), 55.1 (2 NCH_2), 49.0 (4 2 NCH_2), 24.8 (4 CH_2).MALDI-TOF MS *m/z* $[M + H]^+$Calcd for $C_{38}H_{45}N_6$: 585.371, found: 585.459.

2.3.7 | 2,9-*Bis*{4-[(3-piperidin-1-ylpropyl) aminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (1k)

Yellow oil (97%). ^1H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.43 (d, $J = 8.30$ Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.29 (d, $J = 8.40$ Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.13 (d, $J = 8.40$ Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.77 (s, 2H, H-5 and H-6), 7.54 (d, $J = 8.30$ Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 3.90 (s, 4H, 2 NCH_2),2.72 (t, $J = 6.90$ Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.42–2.34 (m, 12H, 4 NCH_2), 2.16 (bs, 2H, 2 NH), 1.81–1.70 (qt, $J = 7.00$ Hz, 4H, 2 CH_2), 1.63–1.53 (qt, $J = 5.40$ Hz, 8H, 4 CH_2), 1.48–1.39 (qt, $J = 5.40$ Hz, 4H, 2 CH_2).^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ:157.6 (C-2 and C-9), 147.0 (C-1a and C-10a), 142.9 (2 C-4′), 139.1 (2 C-1′), 137.8 (C-4 and C-7), 129.5 (2 C-3′ and 2 C-5′), 128.8 (C-4a and C-6a), 128.6 (2 C-2′ and 2 C-6′), 126.9 (C-5 and C-6), 120.8 (C-3 and C-8), 58.8 (2 NCH_2), 55.6 (4 NCH_2), 54.7 (2 NCH_2), 49.2 (4 2 NCH_2), 28.00 (2 CH_2), 27.0 (4 CH_2), 25.4 (2 CH_2). MALDI-TOF MS *m/z* $[M + H]^+$Calcd for $C_{42}H_{53}N_6$: 641.433, found: 641.261.

2.3.8 | 2,9-*Bis*{4-[(3-(3-dimethylaminopropylamino)propyl) aminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (1l)

Orange oil (80%). ^1H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.42 (d, $J = 8.40$ Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.26 (d, $J = 8.55$ Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.10 (d, $J = 8.55$ Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.74 (s, 2H, H-5 and H-6), 7.52 (d, $J = 8.40$ Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 3.89 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.75–2.63 (m, 12H, 6 NCH_2), 2.30 (t, $J = 7.00$ Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.19 (s, 12H, 4 CH_3), 2.13 (bs, 4H, 4 NH), 1.74 (qt, $J = 7.00$ Hz, 4H, 2 CH_2), 1.66 (qt, $J = 7.00$ Hz, 4H, 2 CH_2). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 158.0 (C-2 and C-9), 147.4 (C-1a and C-10a), 143.1 (2 C-4′), 139.6 (2 C-1′), 138.2 (C-4 and C-7), 130.0 (2 C-3′ and 2 C-5′), 129.2 (C-4a and C-6a), 129.1 (2 C-2′ and 2 C-6′), 127.3 (C-5 and C-6), 121.3 (C-3 and C-8), 59.4 (2 NCH_2), 55.1 (2 NCH_2), 49.8 (4 NCH_2), 49.2 (2 NCH_2), 46.9 (4 CH_3), 31.3 (2 CH_2), 29.1 (2 CH_2). MALDI-TOF MS *m/z* $[M + H]^+$ Calcd for $C_{42}H_{59}N_8$: 675.486, found: 675.584.

2.3.9 | 2,9-*Bis*{3-[(2-morpholinoethyl) aminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (1o)

Yellow oil (94%). ^1H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.41 (dd, $J = 1.30$ and 1.30 Hz, 2H, 2 H-2′), 8.37 (ddd, $J = 7.55$, 1.30 and 1.30 Hz, 2H, 2 H-6′), 8.27 (d, $J = 8.40$ Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.13 (d, $J = 8.40$ Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.74 (s, 2H, H-5 and H-6), 7.54 (t, $J = 7.55$ Hz, 2H, 2 H-5′), 7.46 (ddd, $J = 7.55$, 1.30 and 1.30 Hz, 2H, 2 H-4′), 3.98 (s, 4H, 2 NCH_2),3.63 (t, $J = 4.80$ Hz, 8H, 4 OCH_2), 2.75 (t, $J = 6.00$ Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.50 (t, $J = 6.00$ Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.39–2.34 (m, 8H, 4 NCH_2morph.), 2.14 (bs, 2H, 2 NH). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 157.9 (C-2 and C-9), 147.4 (C-1a and C-10a), 142.3 (2 C-3′), 140.9 (2 C-1′), 138.3 (C-4 and C-7), 130.6 (2 C-2′), 130.3 (2 C-5′), 129.3 (C-4a and C-6a), 128.8 (2 C-4′), 127.7 (2 C-6′), 127.4 (C-5 and C-6), 121.3 (C-3 and C-8), 68.3 (4 OCH_2), 59.7 (2 NCH_2), 55.1 (4 NCH_2), 46.5 (2 NCH_2). MALDI-TOF MS *m/z* $[M + H]^+$ Calcd for $C_{38}H_{45}N_6O_2$: 617.360, found: 617.462.

2.3.10 | 2,9-*Bis*{2-[(3-morpholinopropyl) aminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (1s)

Yellow oil (96%). ^1H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.37 (d, $J = 8.40$ Hz, 2H, H-4 and H-7), 7.89 (s, 2H, H-5 and H-6), 7.88 (d, $J = 8.40$ Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.64–7.60 (m, 2H, 2 H-6′), 7.56–7.51 (m, 2H, 2 H-3′), 7.45–7.41 (m, 4H, 2 H-4′ and 2 H-5′), 3.70(s, 4H, 2 NCH_2), 3.55 (t, $J = 4.20$ Hz, 8H, 4 OCH_2), 2.43 (t, $J = 7.20$ Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.17–2.12 (m, 8H, 4 NCH_2morph.), 1.99 (t, $J = 7.20$ Hz, 4H, 2 NCH_2), 1.27 (qt, $J = 7.20$ Hz, 4H, 2 CH_2). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 160.9 (C-2 and C-9), 146.5 (C-1a and C-10a), 142.5 (2 C-2′), 141.6 (2 C-1′), 138.2 (C-4 and C-7), 133.1 (2 C-3′), 131.6 (2 C-5′), 130.1 (2 C-6′), 128.8 (C-4a and C-6a), 128.6 (2 C-4′), 127.7 (C-5 and C-6), 125.2 (C-3 and C-8), 68.2 (4 OCH_2), 58.2 (2 NCH_2), 54.9 (4 NCH_2), 52.8 (2 NCH_2), 47.7 (2 NCH_2), 27.6 (2 CH_2). MALDI-TOF MS *m/z* $[M]^+$ Calcd for $C_{40}H_{48}N_6O_2$: 644.384, found: 644.650.

2.4 | 2,9-*Bis*{4-[4-((3-dimethylamino) propyl)piperazin-1-ylmethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (1u) and 9-{4-[4-((3-dimethylamino)propyl)piperazin-1-ylmethyl] phenyl}-2-[4-(hydroxymethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline (7)

The pH of a solution of dialdehyde **5a** (0.464 mmol) and 1-[3-(dimethylamino)propyl]piperazine (1.11 mmol) in 10 ml methanol was adjusted to 6 by the dropwise addition of acetic acid. Powered sodium cyanoborohydride (2.55 mmol) was then added, and the resultant mixture was refluxed for 5 hr. After removal of the methanol by rotary evaporation, the residue was triturated in water and extracted with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over magnesium sulfate, and evaporated to dryness. Column chromatography of the residue on silica gel using dichloromethane/methanol/32% ammonium hydroxide solution (80/20/2) as eluent gave compounds **1u** and **7**.

2.4.1 | 2,9-*Bis*{4-[4-((3-dimethylamino) propyl)piperazin-1-ylmethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline (1u)

Pale-yellow oil (45%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.39 (d, J = 8.10 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.25 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4 and H-7), 8.09 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3 and H-8), 7.73 (s, 2H, H-5 and H-6), 7.53 (d, J = 8.10 Hz, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 3.61 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.62–2.47 (m, 16H, 8 NCH_2pip.), 2.38 (t, 4H, J = 7.50 Hz, 2 NCH_2), 2.29 (t, 4H, J = 7.50 Hz, 2 NCH_2), 2.23 (s, 6H, 2 CH_3), 1.69 (qt, 4H, J = 7.50 Hz, 2 CH_2). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 158.1 (C-2 and C-9), 147.5 (C-1a and C-10a), 140.8 (2 C-4′), 139.8 (2 C-1′), 138.3 (C-4 and C-7), 131.1 (2 C-3′ and 2 C-5′), 129.2 (C-4a and C-6a), 129.0 (2 C-2′ and 2 C-6′), 127.3 (C-5 and C-6), 121.3 (C-3 and C-8), 64.2 (2 NCH_2), 59.0 (2 NCH_2), 57.7 (2 NCH_2), 54.6 (4 NCH_2pip.), 54.4 (4 NCH_2pip.), 46.4 (2 CH_3), 25.8 (2 CH_2). MALDI-TOF MS m/z $[M + H]^+$ Calcd for $C_{44}H_{59}N_8$: 699.486, found: 699.570.

2.4.2 | 9-{4-[4-((3-dimethylamino) propyl)piperazin-1-ylmethyl]phenyl}-2-[4-(hydroxymethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline (7)

Yellow oil (10%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.44 (d, J = 8.10 Hz, 2H, H-2′ and H-6′), 8.39 (d, J = 8.10 Hz, 2H, H-2” and H-6”), 8.31 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-4), 8.29 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-7), 8.14 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-3), 8.12 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-8), 7.78 (s, 2H, H-5 and H-6), 7.57 (d, J = 8.10 Hz, 2H, H-3′ and H-5′), 7.53 (d, J = 8.10 Hz, 2H, H-3″ and H-5″), 4.79 (s, 1H, CH_2O), 3.63 (s, 2H, NCH_2), 2.63–2.47 (m, 8H, 4 NCH_2pip.), 2.47 (t, 2H, J = 7.50 Hz, NCH_2), 2.42 (t, 2H, J = 7.50 Hz, NCH_2), 2.34 (s, 3H, CH_3), 1.77 (qt, 2H, J = 7.50 Hz, CH_2). MALDI-TOF MS m/z $[M + H]^+$ Calcd for $C_{35}H_{40}N_5O$: 546.323, found: 546.464.

2.5 | 9-Chloro-2-(5-formylthien-2-yl)-1,10-phenanthroline (8)

To a suspension of 2,9-dichloro-1,10-phenanthroline (1.2 mmol), 5-formylthiophene-2-boronic acid (2.65 mmol), and $Pd(PPh_3)_4$ (0.12 mmol) in DME (15 ml) under nitrogen was added 1.5 ml of a 2 M aqueous solution of Na_2CO_3. The reaction mixture was refluxed for 24 hr. The suspension was then evaporated to dryness and extracted with CH_2Cl_2 (2 × 25 ml). The organic layer was filtered and washed with water (2 × 30 ml). The organic layer was dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated under reduced pressure. The crude residue was triturated in ethanol. The resulting precipitate was filtered, washed with ethanol, and purified by column chromatography on silica gel using dichloromethane as eluent to give the pure product **8**. Yellow crystals (57%); mp = 183°C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 10.00 (s, 1H, CHO), 8.34 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-4), 8.22 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-7), 8.08 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-8), 8.04 (d, J = 3.90 Hz, H-4′), 7.87 (d, J = 3.90 Hz, H-3′), 7.86 (d, J = 8.90 Hz, 1H, H-6), 7.82 (d, J = 8.90 Hz, 1H, H-5), 7.67 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-3).

2.6 | 9-Chloro-2-{5-[(3-dimethylaminopropyl)iminomethyl]thien-2-yl}-1,10-phenanthroline (9)

To a solution of diamine (0.5 mmol) in ethanol (5 ml) was added 9-chloro-2-(5-formylthien-2-yl)-1,10-phenanthroline **8** (0.55 mmol). The reaction mixture was then heated under reflux for 5 hr and then evaporated to dryness under reduced pressure. After cooling, the residue was extracted with dichloromethane (20 ml). The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. The obtained product **9** was then used without further purification. Yellow oil (95%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.41 (s, 1H, HC=N), 8.24 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-4), 8.17 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-7), 7.98 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-8), 7.95 (d, J = 3.90 Hz, H-4′), 7.78 (d, J = 8.70 Hz, 1H, H-6), 7.73 (d, J = 8.70 Hz, 1H, H-5), 7.61 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-3), 7.38 (d, J = 3.90 Hz, H-3′), 3.68(t, J = 7.05 Hz, 2H, NCH_2), 2.38 (t, J = 7.05 Hz, 2H, NCH_2), 2.26 (s, 6H, 2 CH_3), 1.92 (qt, J = 7.05 Hz, 2H, CH_2).

2.7 | 9-Chloro-2-{5-[(3-dimethylaminopropyl)aminomethyl]thien-2-yl}-1,10-phenanthroline (10)

To a solution of compound **9** (0.49 mmol) in methanol (10 ml) was added portion-wise at 0°C sodium borohydride (1.96 mmol; 4 equiv.). The reaction mixture was then heated under reflux for 4 hr and then evaporated to dryness under reduced pressure. After cooling, the residue was triturated in water and extracted with dichloromethane (35 ml). The organic layer was separated, dried over sodium sulfate, and evaporated to dryness to give compound **10**, which was used without further purification. Yellow oil (90%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 8.18 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-4), 8.15 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-7), 7.94 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-8), 7.75 (d, J = 8.70 Hz, 1H, H-6), 7.71 (d, J = 3.60 Hz, H-4′), 7.68 (d, J = 8.70 Hz, 1H, H-5), 7.58 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-3), 6.99 (d, J = 3.60 Hz, H-3′), 4.05 (s, 2H, NCH_2), 2.75(t, J = 7.10 Hz, 2H, NCH_2), 2.35 (t, J = 7.10 Hz, 2H, NCH_2), 2.23 (s, 6H, 2 CH_3), 1.71 (qt, J = 7.10 Hz, 2H, CH_2).^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 154.4 (C-2), 152.7 (C-10a), 149.9 (C-9), 147.2 (C-5′), 146.2 (C-2′), 145.0 (C-1a), 140.1 (C-7), 138.1 (C-4), 129.1 (C-4a), 129.0 (C-6a), 128.1 (C-3′), 127.6 (C-6), 127.4 (C-5), 126.3 (C-4′), 125.6 (C-8), 120.8 (C-3), 59.4 (NCH_2), 50.26 (NCH_2), 48.9 (NCH_2), 46.9 (2 CH_3),

29.3 (CH_2). MALDI-TOF MS *m/z* $[M + H]^+$ Calcd for $C_{22}H_{24}ClN_4S$: 411.141, found: 411.127.

2.8 | General procedure for the synthesis of 2-(formylphenyl)-1,10-phenanthrolines (11a–b)

Under nitrogen, 3- or 4-formylphenylboronic acid, pinacol ester (3.5 mmol), 2-chloro-1,10-phenanthroline (4 mmol), $Pd(PPh_3)_4$ (0.07 mmol), Cs_2CO_3 (5.8 mmol), and 1,2-dimethoxyethane (23 ml) were mixed, followed by stirring at 80°C for 6 hr. The reaction mixture was then cooled, and water (31 ml) was added to the reaction mixture. After a stirring for 10 min at 0°C, the precipitate was removed by filtration to yield an orange solid that was then purified by column chromatography on silica gel using dichloromethane/methanol (90/10: v/v) as eluent to give the pure product **11a–b**.

2.8.1 | 2-(3-Formylphenyl)-1,10-phenanthrolines (11b)

White crystals (62%); mp = 69°C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 10.22 (s, 1H, CHO), 9.26 (dd, J = 4.20 and 1.50 Hz, 1H, H-9), 8.52 (s, 1H, H-2′), 8.70 (d, J = 7.80 Hz, 1H, H-6′), 8.39 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-4), 8.30 (dd, J = 8.10 and 1.50 Hz, 1H, H-7), 8.19 (d, J = 8.40 Hz, 1H, H-3), 8.02 (d, J = 7.80 Hz, 1H, H-4′), 7.87 (d, J = 8.70 Hz, 1H, H-6), 7.84 (d, J = 8.70 Hz, 1H, H-5), 7.75 (t, J = 7.80 Hz, 1H, H-5′), 7.69 (dd, J = 8.10 and 4.20 Hz, 1H, H-8). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 192.5 (C=O), 155.9 (C-2), 150.4 (C-9), 146.2 (C-1a), 146.1 (C-10a), 140.6 (C-3′), 137.2 (C-4), 136.9 (C-1′), 136.2 (C-7), 133.9 (C-2′), 130.0 (C-5′), 129.6 (C-4′), 129.5 (C-6′), 129.2 (C-6a), 127.9 (C-4a), 126.8 (C-5), 126.3 (C-6), 123.1 (C-8), 120.4 (C-3). HRMS-ESI *m/z* $[M + H]^+$ Calcd for $C_{19}H_{12}N_2O$: 285.1028, found: 285.1034.

2.9 | General procedure for the synthesis of *bis*{*N*-[4-(1,10-phenanthrolin-2-yl)benzylidene]-3-aminopropyl}methylamine (13a), *bis*{*N*-[4-(1,10-phenanthrolin-2-yl)benzylidene]-3-aminopropyl}piperazine (13b) and *bis*{*N*-[3-(1,10-phenanthrolin-2-yl)benzylidene]-3-aminopropyl}piperazine (13c)

To a solution of diamine (0.35 mmol) in ethanol (8 ml) was added 2-(formylphenyl)]-1,10-phenanthroline **11a–b** (0.7 mmol). The reaction mixture was then heated under reflux for 5 hr and then evaporated to dryness under reduced pressure. After cooling, the residue was extracted with dichloromethane (20 ml). The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. Products **13a–c** were then used without further purification.

2.9.1 | *Bis*{*N*-[4-(1,10-phenanthrolin-2-yl) benzylidene]-3-aminopropyl}methylamine (13a)

Yellow oil (98%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 9.25 (dd, J = 4.35 and 1.80 Hz, 2H, 2 H-9), 8.41 (s, 2H, 2 HC=N), 8.39 (d, J = 8.10 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.27 (d, J = 8.40 Hz, 2H, 2 H-4), 8.26 (dd, J = 8.10 and 1.80 Hz, 2H, 2 H-7), 8.10 (d, J = 8.40 Hz, 2H, 2 H-3), 7.89 (d, J = 8.10, 2H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 7.80–7.77 (m, 4H, H-5 and H-6), 7.65 (dd, J = 8.10 and 4.35 Hz, 1H, H-8), 3.75 (t, J = 6.60 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.80 (t, J = 6.60 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.52 (s, 3H, NCH_3), 2.11 (qt, J = 6.60 Hz, 4H, 2 CH_2).

2.9.2 | *Bis*{*N*-[4-(1,10-phenanthrolin-2-yl) benzylidene]-3-aminopropyl}piperazine (13b)

Yellow oil (98%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 9.23 (dd, J = 4.50 and 1.80 Hz, 2H, 2 H-9), 8.39 (d, J = 8.10 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.36 (s, 2H, 2 HC=N), 8.26 (d, J = 8.40 Hz, 2H, 2 H-4), 8.22 (dd, J = 8.10 and 1.80 Hz, 2H, 2 H-7), 8.08 (d, J = 8.40 Hz, 2H, 2 H-3), 7.89 (d, J = 8.10, 2H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 7.88 (d, J = 8.70 Hz, 2H, 2 H-6), 7.72 (d, J = 8.70 Hz, 2H, 2 H-5), 7.61 (dd, J = 8.10 and 4.50 Hz, 1H, H-8), 3.68 (t, J = 6.90 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.57–2.48 (m, 8H, 4 CH_2 pip.), 2.49 (t, J = 6.90 Hz, 4H, 2 NCH_2), 1.95 (qt, J = 6.90 Hz, 4H, 2 CH_2).

2.9.3 | *Bis*{*N*-[3-(1,10-phenanthrolin-2-yl) benzylidene]-3-aminopropyl}piperazine (13c)

Yellow oil (97%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 9.16 (dd, J = 4.20 and 1.50 Hz, 2H, H-9), 8.62 (s, 2H, 2 HC=N), 8.39 (s, 2H, H-2′), 8.36 (d, J = 7.90 Hz, 2H, H-6′), 8.16 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4), 8.14 (dd, J = 8.10 and 1.50 Hz, 2H, H-7), 8.03 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3), 7.79 (d, J = 7.90 Hz, 2H, H-4′), 7.66 (d, J = 8.70 Hz, 2H, H-6), 7.62 (d, J = 8.70 Hz, 2H, H-5), 7.54 (dd, J = 8.10 and 4.20 Hz, 2H, H-8), 7.51 (t, J = 7.90 Hz, 2H, H-5′), 3.63 (t, J = 6.90 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.55–2.47 (m, 8H, 4 CH_2 pip.), 2.42 (t, J = 6.90 Hz, 4H, 2 NCH_2), 1.91 (qt, J = 6.90 Hz, 4H, 2 CH_2).

2.10 | General procedure for the synthesis of *bis*{*N*-[4-(1,10-phenanthrolin-2-yl)benzyl]-3-aminopropyl}methylamine (3a), *bis*{*N*-[4-(1,10-phenanthrolin-2-yl)benzyl]-3-aminopropyl} piperazine (3b) and *bis*{*N*-[3-(1,10-phenanthrolin-2-yl)benzyl]-3-aminopropyl} piperazine (3c)

To a solution of compound **13a–c** (0.23 mmol) in methanol (10 ml) was added portion-wise at 0°C sodium borohydride (1.84 mmol; 8 equiv.). The reaction mixture was then heated under reflux for 3 hr and then evaporated to dryness under

reduced pressure. After cooling, the residue was triturated in water and extracted with dichloromethane (30 ml). The organic layer was separated, dried over sodium sulfate, and evaporated to dryness. The residue was then purified by column chromatography on silica gel using dichloromethane/methanol (90/10, v/v) as eluent to give the pure product **3a–c**.

2.10.1 | *Bis*{*N*-[4-(1,10-phenanthrolin-2-yl) benzyl]-3-aminopropyl}methylamine (3a)

Yellow oil (77%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 9.24 (dd, J = 4.50 and 1.80 Hz, 2H, 2 H-9), 8.26 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.24 (d, J = 8.40 Hz, 2H, 2 H-4), 8.22 (dd, J = 8.10 and 1.80 Hz, 2H, 2 H-7), 8.03 (d, J = 8.40 Hz, 2H, 2 H-3), 7.78 (d, J = 8.80 Hz, 2H, 2 H-6), 7.72 (d, J = 8.80 Hz, 2H, 2 H-5), 7.63 (dd, J = 8.10 and 4.50 Hz, 2H, 2 H-8), 7.49 (d, J = 8.40, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 3.90 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.73 (t, J = 6.90 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.46 (t, J = 6.90 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.25 (s, 3H, NCH_3), 1.76 (qt, J = 6.90 Hz, 4H, 2 CH_2). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 158.7 (C-2), 151.8 (C-9), 147.7 (C-10a), 147.4 (C-4′), 142.0 (C-1a), 139.9 (C-1′), 138.2 (C-4), 137.5 (C-7), 130.4 (C-6a), 130.1 (C-3′ and C-5′), 129.5 (C-2′ and C-6′), 128.9 (C-4a), 127.7 (C-5), 127.5 (C-6), 124.3 (C-8), 121.9 (C-3), 57.6 (NCH_2), 54.8 (NCH_2), 49.1 (NCH_2), 43.5 (NCH_3), 28.3 (CH_2).MALDI-TOF MS *m/z* $[M + H]^+$ Calcd for $C_{45}H_{44}N_7$: 682.366, found: 682.348.

2.10.2 | *Bis*{*N*-[4-(1,10-phenanthrolin-2-yl) benzyl]-3-aminopropyl}piperazine (3b)

Yellow oil (96%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 9.21 (dd, J = 4.50 and 1.80 Hz, 2H, 2 H-9), 8.28 (d, J = 8.40 Hz, 4H, 2 H-2′ and 2 H-6′), 8.23 (d, J = 8.40 Hz, 2H, 2 H-4), 8.20 (dd, J = 8.10 and 1.80 Hz, 2H, 2 H-7), 8.05 (d, J = 8.40 Hz, 2H, 2 H-3), 7.75 (d, J = 8.70 Hz, 2H, 2 H-6), 7.70 (d, J = 8.70 Hz, 2H, 2 H-5), 7.60 (dd, J = 8.10 and 4.50 Hz, 2H, 2 H-8), 7.47 (d, J = 8.40, 4H, 2 H-3′ and 2 H-5′), 3.85 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.67 (t, J = 6.90 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.58–2.37 (m, 8H, 4 CH_2 pip.), 2.40 (t, J = 6.90 Hz, 4H, 2 NCH_2), 1.72 (qt, J = 6.90 Hz, 4H, 2 CH_2).^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 158.7 (C-2), 151.7 (C-9), 147.7 (C-10a), 147.4 (C-4′), 143.1(C-1a), 139.6 (C-1′), 138.2 (C-4), 137.4 (C-7), 130.4 (C-6a), 129.8 (C-3′ and C-5′), 129.4 (C-2′ and C-6′), 128.8(C-4a), 127.7 (C-5), 127.5 (C-6), 124.2 (C-8), 121.9 (C-3), 58.5 (NCH_2), 55.0 (NCH_2), 54.7 (NCH_2), 49.5 (NCH_2), 28.3 (CH_2). MALDI-TOF MS *m/z* $[M + H]^+$ Calcd for $C_{48}H_{49}N_8$: 737.408, found: 737.249.

2.10.3 | *Bis*{*N*-[3-(1,10-phenanthrolin-2-yl) benzyl]-3-aminopropyl}piperazine (3c)

Yellow oil (92%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 9.21 (dd, J = 4.20 and 1.50 Hz, 2H, H-9), 8.29 (s, 2H, H-2′), 8.25 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-4), 8.20 (dd, J = 8.10 and 1.50 Hz, 2H, H-7), 8.16 (ddd, J = 7.80, 1.50 and 1.50 Hz, 2H, H-6′), 8.08 (d, J = 8.40 Hz, 2H, H-3), 7.76 (d, J = 9.00 Hz, 2H, H-6), 7.72 (d, J = 9.00 Hz, 2H, H-5), 7.60 (dd, J = 8.10 and 4.20 Hz, 2H, H-8), 7.49 (t, J = 7.80 Hz, 2H, H-5′), 7.42 (d, J = 7.80 Hz, 2H, H-4′), 3.91 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.68 (t, J = 6.90 Hz, 4H, 2 NCH_2), 2.52–2.35 (m, 8H, 4 CH_2 pip.), 2.33 (t, J = 6.90 Hz, 4H, 2 NCH_2), 1.66 (qt, J = 6.90 Hz, 4H, 2 CH_2). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 158.9 (C-2), 151.7 (C-9), 147.7 (C-1a), 147.4 (C-3′), 142.3 (C-1′), 141.1 (C-10a), 138.1 (C-4), 137.4 (C-7), 130.5 (C-2′), 130.4 (C-6a), 130.2 (C-5′), 129.1 (C-5), 128.9 (C-4a), 127.0 (C-6), 127.7 (C-4′), 127.6 (C-6′), 124.2 (C-8), 122.1 (C-3), 58.4 (NCH_2), 55.4 (NCH_2), 54.6 (NCH_2), 49.6 (NCH_2), 28.3 (CH_2). MALDI-TOF MS *m/z* $[M + H]^+$ Calcd for $C_{48}H_{49}N_8$: 737.408, found: 737.451.

2.11 | *Tris*{*N*-[4-(1,10-phenanthrolin-2-yl) benzylidene]-3-aminopropyl}amine (14)

To a solution of triamine (1.2 mmol) in ethanol (11 ml) was added 2-(4-formylphenyl)]-1,10-phenanthroline **11** (0.4 mmol). The reaction mixture was then heated under reflux for 24 hr and then evaporated to dryness under reduced pressure. After cooling, the residue was extracted with dichloromethane (20 ml). The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness to give product **14**, which was used without further purification. White crystals (74%); mp = 84°C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 9.23 (dd, J = 4.35 and 1.50 Hz, 2H, 2 H-9), ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 9.23 (dd, J = 4.35 and 1.80 Hz, 3H, 3 H-9), 8.40 (s, 3H, 3 HC=N), 8.35 (d, J = 8.40 Hz, 6H, 3 H-2′ and 3 H-6′), 8.23 (dd, J = 8.10 and 1.80 Hz, 3H, 3 H-7), 8.16 (d, J = 8.40 Hz, 3H, 3 H-4), 8.00 (d, J = 8.40 Hz, 3H, 3 H-3), 7.89 (d, J = 8.40, 6H, 6 H-3′ and 3 H-5′), 7.73 (d, J = 8.80 Hz, 3H, 3 H-6), 7.68 (d, J = 8.80 Hz, 3H, 3 H-5), 7.62 (dd, J = 8.10 and 4.35 Hz, 3H, 3 H-8), 3.74 (t, J = 6.90 Hz, 6H, 3 NCH_2), 2.73 (t, J = 6.90 Hz, 6H, 3 NCH_2), 2.01 (qt, J = 6.90 Hz, 6H, 3 CH_2).

2.12 | *Tris*{*N*-[4-(1,10-phenanthrolin-2-yl) benzyl]-3-aminopropyl}amine (4)

To a solution of compound **14** (0.3 mmol) in methanol (14 ml) was added portion-wise at 0°C sodium borohydride (2.4 mmol; 8 equiv.). The reaction mixture was then heated under reflux for 3 hr and then evaporated to dryness under reduced pressure. After cooling, the residue was triturated in water and extracted with dichloromethane (30 ml). The organic layer was separated, dried over sodium sulfate, and evaporated to dryness. The residue was then purified by column chromatography on silica gel using dichloromethane/methanol (90/10, v/v) as eluent to give the pure product **4**.

Yellow oil (58%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 9.21 (dd, J = 4.50 and 1.80 Hz, 3H, 3 H-9), 8.25 (d, J = 8.40 Hz, 6H, 3 H-2′ and 3 H-6′), 8.23 (d, J = 8.40 Hz, 3H, 3 H-4), 8.19 (dd, J = 8.10 and 1.80 Hz, 3H, 3 H-7), 7.98 (d, J = 8.40 Hz, 3H, 3 H-3), 7.72 (d, J = 8.70 Hz, 3H, 36 H-6), 7.69 (d, J = 8.70 Hz, 3H, 3 H-5), 7.59 (dd, J = 8.10 and 4.50 Hz, 3H, 3 H-8), 7.47 (d, J = 8.40, 6H, 3 H-3′ and 3 H-5′), 3.86 (s, 6H, 3 NCH_2), 2.72 (bs, 3H, 3 NH), 2.69 (t, J = 6.90 Hz, 6H, 3 NCH_2), 2.51 (t, J = 6.90 Hz, 6H, 3 NCH_2), 1.71 (qt, J = 6.90 Hz, 6H, 3 CH_2). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ: 158.7 (C-2), 151.7 (C-9), 147.7 (C-10a), 147.4 (C-4′), 143.0 (C-1a), 139.6 (C-1′), 138.1 (C-4), 137.4 (C-7), 130.4 (C-6a), 129.9 (C-3′ and C-5′), 129.3 (C-2′ and C-6′), 128.8 (C-4a), 127.7 (C-5), 127.4 (C-6), 124.2 (C-8), 121.9 (C-3), 55.2 (NCH_2), 53.6 (NCH_2), 49.3 (NCH_2), 28.3 (CH_2). MALDI-TOF MS m/z $[M + H]^+$ Calcd for $C_{66}H_{61}N_{10}$: 993.508, found: 993.487.

2.13 | General procedure for the preparation of 2,9-*bis*[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthrolines, 2,9-*bis*{4-[4-((3-dimethylamino)propyl) piperazin-1-ylmethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline, 9-{4-[4-((3-dimethylamino) propyl)piperazin-1-ylmethyl]phenyl}-2-[4-(hydroxymethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline,9-chloro-2-{5-[(3-dimethylaminopropyl) aminomethyl]thien-2-yl}-1,10-phenanthroline, *bis*{*N*-[4-(1,10-phenanthrolin-2-yl)benzyl]-3-aminopropyl}methylamine, *bis*{*N*-[4-(1,10-phenanthrolin-2-yl)benzyl]-3-aminopropyl} piperazine and *tris*{*N*-[4-(1,10-phenanthrolin-2-yl)benzyl]-3-aminopropyl}amineoxalate salts

To a solution of compounds **1a–u**, **7**, **10**, **3a–c**, or **4** (0.4 mmol) in isopropanol (12 ml) was added oxalic acid (8 or 4 mmol). The reaction mixture was heated under reflux for 30 min. The precipitate was filtered, washed with isopropanol then with diethyl ether, and dried under reduced pressure to give the ammonium salts of **1a–u**, **7**, **10**, **3a–c** or **4**.

2.14 | In vitro antiplasmodial activity

The in vitro antiplasmodial activities were tested over concentrations ranging from 39 nM to 40 μM against culture-adapted *Plasmodium falciparum* reference strains 3D7 and W2. The former strain is susceptible to chloroquine (CQ) but displays a decreased susceptibility to mefloquine (MQ); the latter is considered resistant to CQ. The parasites were cultivated in RPMI medium (Sigma-Aldrich, Lyon, France) supplemented with 0.5% Albumax I (Life Technologies Corporation, Paisley, UK), hypoxanthine (Sigma-Aldrich), and gentamicin (Sigma-Aldrich) with human erythrocytes and were incubated at 37°C in a candle jar, as described previously.[44] The *P. falciparum* drug susceptibility test was carried out in 96-well flat bottom sterile plates in a final volume of 250 μl. After a 48-hr incubation with the drugs, quantities of DNA in treated and control cultures of parasites in human erythrocytes were quantified using the SYBR Green I (Sigma-Aldrich) fluorescence-based method.[45,46] Briefly, after incubation, plates were frozen at −20°C until use. Plates were then thawed for 2 hr at room temperature, and 100 μl of each homogenized culture was transferred to a well of a 96-well flat bottom sterile black plate (Nunc, Inc.) that contained 100 μl of the SYBR Green I lysis buffer (2xSYBR Green, 20 mM Tris base pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.008% w/v saponin, 0.08% w/v Triton X-100). A negative control, controls treated with solvent (typically DMSO or H_2O), and positive controls (CQ and MQ) were added to each set of experiments. Plates were incubated for 1 hr at room temperature and then read on a fluorescence plate reader (Tecan, Austria) using excitation and emission wavelengths of 485 and 535 nm, respectively. Concentrations inhibiting 50% of the parasite's growth (half maximal inhibitory concentration or IC_{50} values) were then calculated from the obtained experimental results using a previously described regression program.[47]

2.15 | In vitro antileishmanial activity

Leishmania donovani (MHOM/IN/00/DEVI) used in this study was provided by the CNR *Leishmania* (Montpellier, France). The effects of the tested compounds on the growth of *L. donovani* (MHOM/IN/00/DEVI) promastigotes were assessed by MTT assay.[48] Briefly, promastigotes in log phase in Schneider's medium supplemented with 20% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin) were incubated at an average density of 10^6 parasites/ml in sterile 96-well plates with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v), in duplicate. Appropriate controls treated by DMSO and pentamidine or amphotericin B (reference drugs purchased from Sigma-Aldrich) were added to each set of experiments. After a 72-hr incubation period at 27°C, parasite metabolic activity was determined. Each well was microscopically examined for precipitate formation. To each well was added 20 μl of a 5 mg/ml MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)] solution followed by incubation for another 4 hr. The enzyme reaction was stopped by addition of 100 μl of 50% isopropanol/10% sodium dodecyl sulfate.[49] Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 10 min, and the absorbance measured in a plate reader at 570 nm in a BIO-TEK ELx808 Absorbance Microplate Reader. The IC_{50} was defined as the concentration of drug required to inhibit by 50% of the metabolic activity of *L. donovani* promastigotes compared to the control. IC_{50} values were calculated by

non-linear regression analysis of data from dose–response curves, using TableCurve 2D V5.0 software (Systat Software, San Jose, CA, USA). IC_{50} values are reported as means calculated from three independent experiments.

2.16 | In vitro antitrypanosomal activity

The effects of the tested compounds on the growth of *T. brucei brucei* were assessed using an Alamar Blue® assay described by Räz et al.[50] *T. brucei brucei* AnTat 1.9 (IMTA, Antwerpen, Belgium) was cultured in MEM with Earle's salts, supplemented according to the protocol of Baltz et al.[51] with the following modifications, 0.5 mM mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), 1.5 mM L-cysteine (Sigma-Aldrich), 0.05 mM bathocuproine sulfate (Sigma-Aldrich), and 20% heat-inactivated horse serum (Gibco, France) at 37°C and 5% CO_2. Samples were incubated at an average density of 2,000 parasites/well in sterile 96-well plates (Fisher, France) with various concentrations of compounds dissolved in 0.9% NaCl. All doses were tested in duplicate. Appropriate controls treated with solvents 0.9% NaCl or DMSO or with suramin, pentamidine, eflornithine, and fexinidazole (reference drugs purchased from Sigma-Aldrich and Fluorochem, UK) were added to each set of experiments. After a 69-hr incubation at 37°C, 10 µl of the viability marker Alamar Blue (Fisher) was added to each well, and the plates were incubated for 5 hr. The plates were read in a PerkinElmer ENSPIRE (Germany) microplate reader using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. The IC_{50} was defined as the concentration of drug necessary to inhibit by 50% the activity of *T. brucei brucei* compared to the control. IC_{50} values were calculated using a non-linear regression analysis of dose–response curves performed using GraphPad Prism software (USA). IC_{50} values were calculated from three independent experiments.

2.17 | Cytotoxicity evaluation

A cytotoxicity evaluation was performed using the method reported by Mosmann[48] with slight modifications to determine the cytotoxic concentrations 50% (CC_{50}) and using doxorubicin as a cytotoxic reference compound. These assays were performed in human HepG2 cells. HepG2 cells were purchased from ATCC (ref HB-8065). These cells are a commonly used human hepatocarcinoma-derived cell line that has characteristics similar to those of primary hepatocytes. These cells express many hepatocyte-specific metabolic enzymes, thus enabling the cytotoxicity of tested product metabolites to be evaluated. Briefly, cells in 100 µl of complete RPMI medium [RPMI supplemented with 10% FCS, 1% L-glutamine (200 mM), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml)] were inoculated into each well of 96-well plates and incubated at 37°C in a humidified chamber in 6% CO_2. After 24 hr, 100 µl of medium with test compound at various concentrations dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v) was added, and the plates were incubated for 72 hr at 37°C. Duplicate assays were performed for each sample. Each well was microscopically examined for precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. After aspiration, 100 µl of MTT solution (0.5 mg/ml in medium without FCS) was then added to each well. Cells were incubated for 2 hr at 37°C. MTT solution was removed, and DMSO (100 µl) was added to dissolve the resulting blue formazan crystals. Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 5 min. The absorbance was measured at 570 nm with 630 nm as reference wavelength in a BIO-TEK ELx808 Absorbance Microplate Reader. DMSO was used as blank and doxorubicin (Sigma-Aldrich) as positive control. Cell viability was calculated as percentage of control (cells incubated without compound). The CC_{50} was determined from the dose–response curve using the TableCurve 2D V5.0 software (Systat Software).

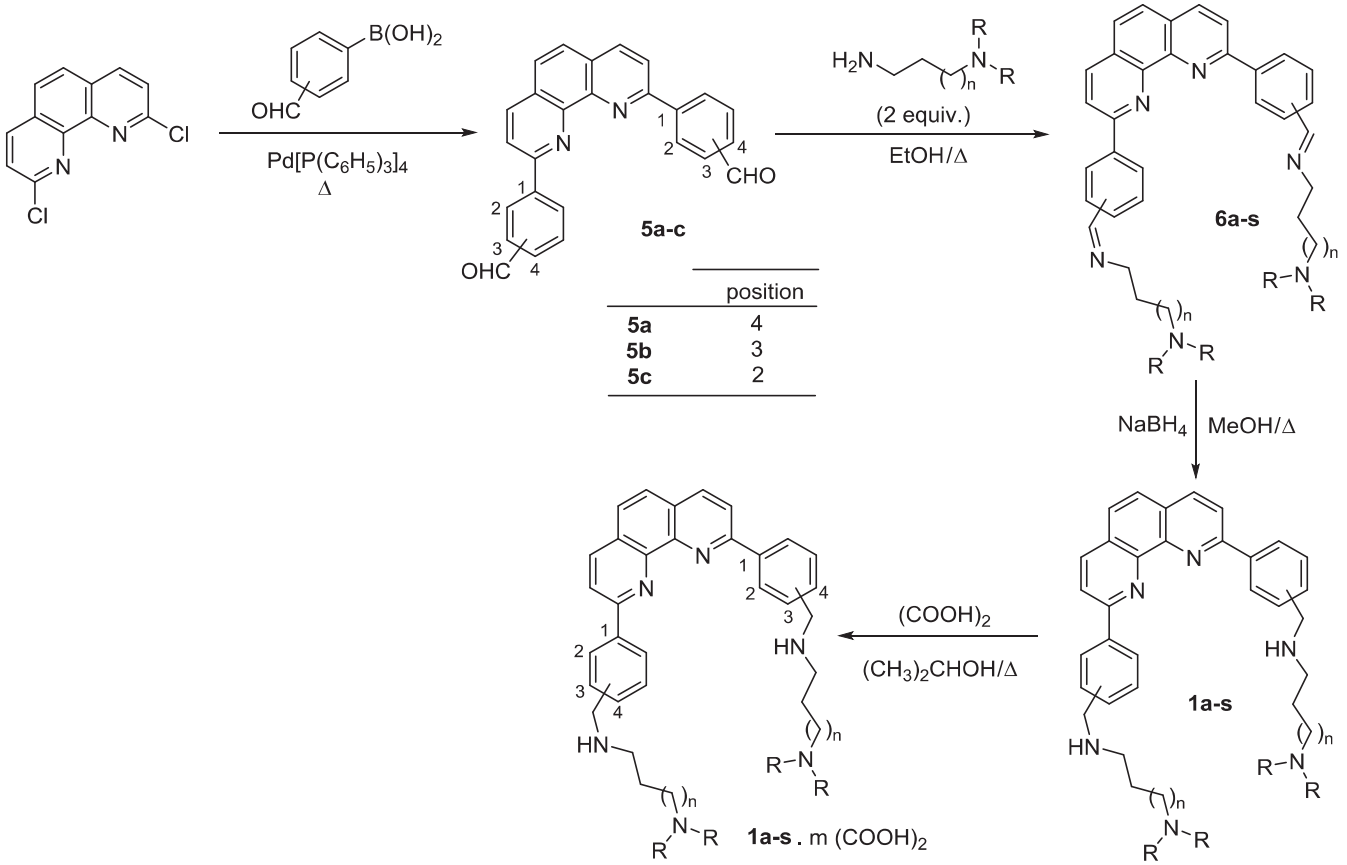
2.18 | FRET melting experiments

FRET melting experiments were performed with dual-labeled oligonucleotides mimicking the *Plasmodium* telomeric sequences FPf1T [FAM-$^{5'}$(GGGTTTA)$_3$-GGG$^{3'}$-TAMRA] and FPf8T [FAM-$^{5'}$(GGGTTCA)$_3$GGG$^{3'}$-TAMRA] and the human telomeric sequence F21T [FAM-(GGGTTA)$_3$-GGG$^{3'}$-TAMRA].[36,52] The oligonucleotides were prefolded in 10 mM lithium cacodylate buffer (pH 7.2), with 10 mM KCl and 90 mM LiCl (K^+ condition). The FAM emissions were recorded at 516 nm using a 492-nm excitation wavelength in the absence and presence of a single compound as a function of temperature (25–95°C) in 96-well microplates using a Stratagene MX3000P real-time PCR device at a rate of 1°C/min. The data obtained were normalized between 0 and 1, and the temperature required for half-denaturation of oligonucleotides corresponding to the emission value of 0.5 was taken as the T_m. Each experiment was performed in duplicate with 200 nM of labeled oligonucleotide and 0, 1, 2, or 5 µM of compound under K^+ condition. For each compound, two independent experiments were carried out. The data were plotted using OriginPro 9.1 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

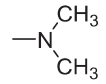
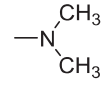
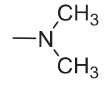
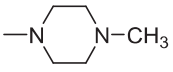
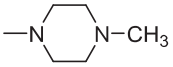
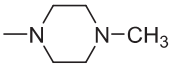
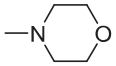
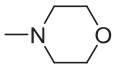
3 | RESULTS AND DISCUSSION

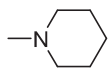
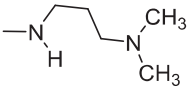
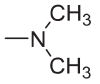
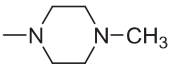
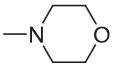
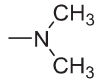
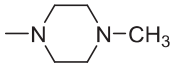
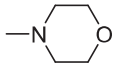
3.1 | Chemistry

The novel 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline derivatives **1a–s** were prepared starting from the commercially 2,9-dichloro-1,10-phenanthroline (Scheme 1). The intermediate

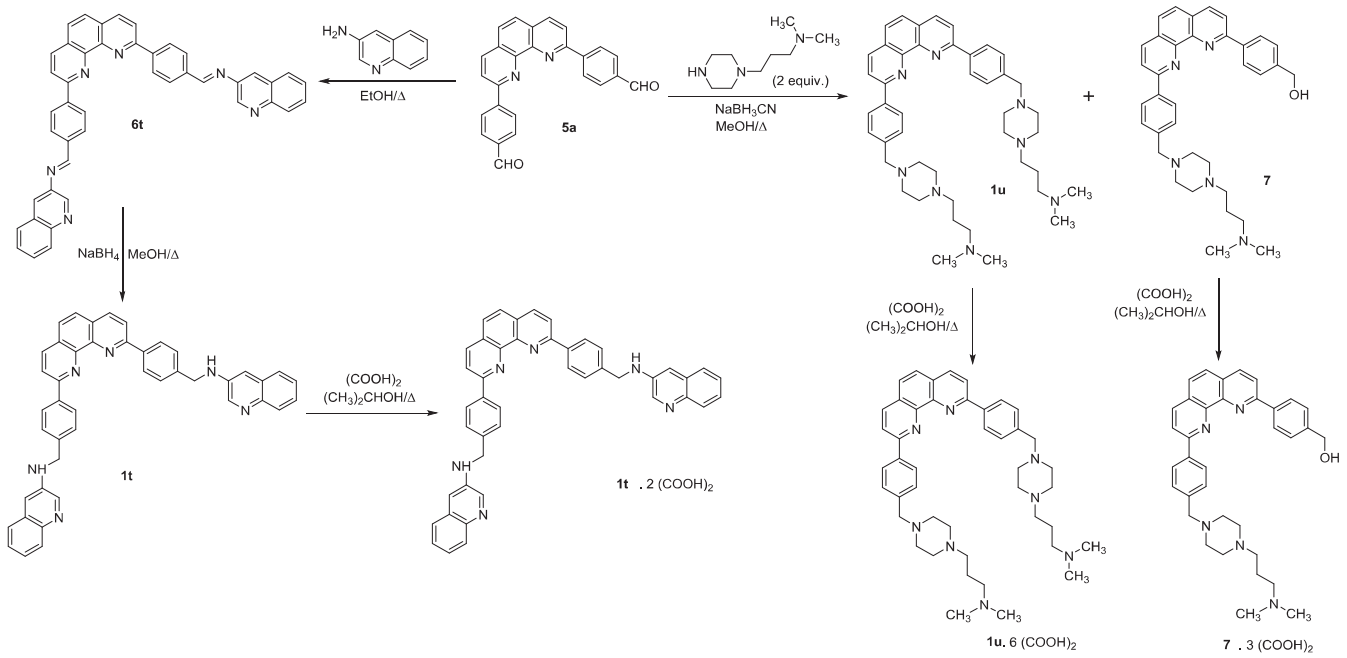


	position
5a	4
5b	3
5c	2

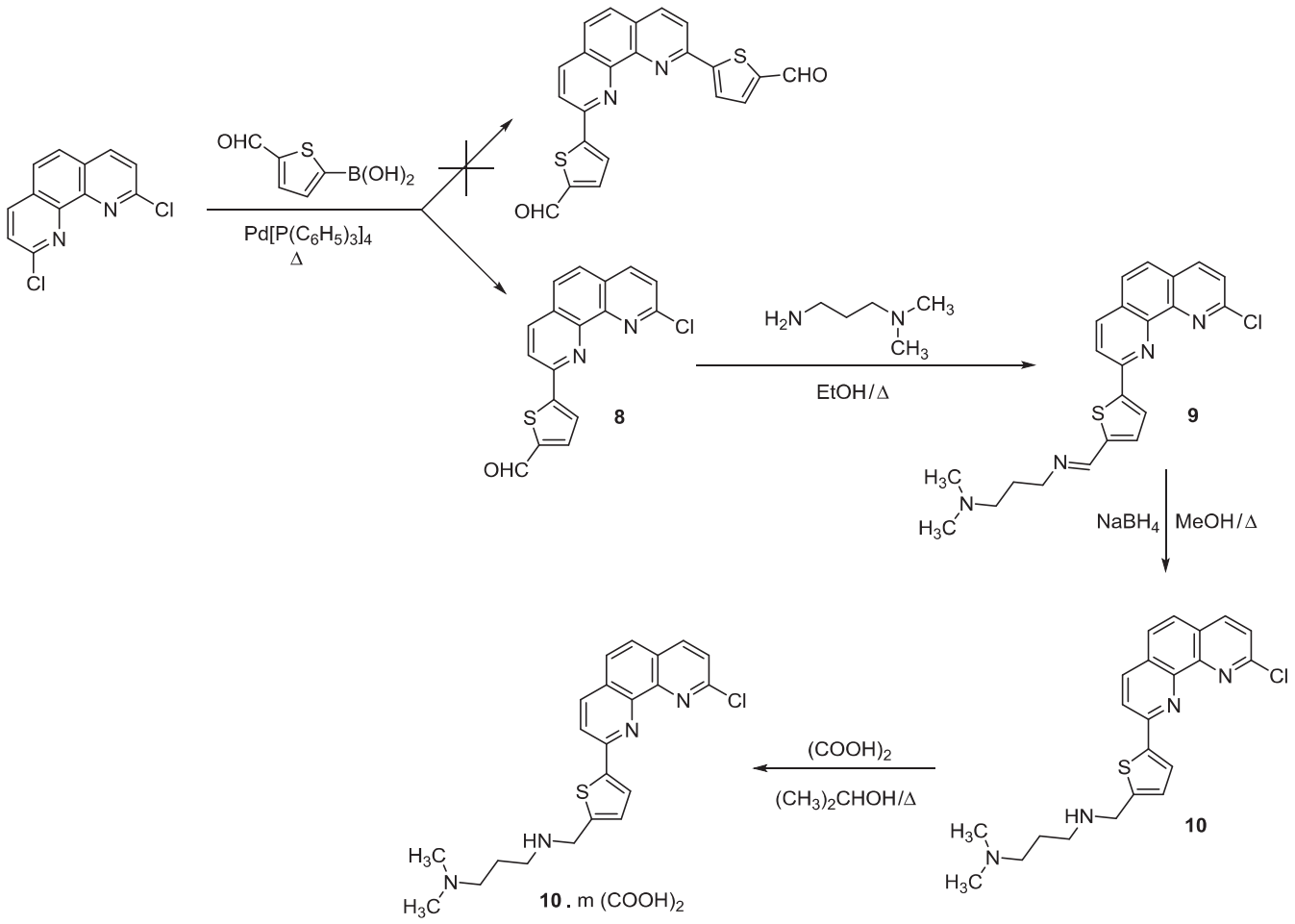
		position	n	m
6a, 1a		4	2	4
6b, 1b		4	1	4
6c, 1c		4	0	4
6d, 1d		4	2	6
6e, 1e		4	1	6
6f, 1f		4	0	6
6g, 1g		4	1	4
6h, 1h		4	0	4
6i, 1i		4	1	4
6j, 1j		4	0	4

		position	n	m
6k, 1k		4	1	4
6l, 1l		4	1	6
6m, 1m		3	1	4
6n, 1n		3	1	6
6o, 1o		3	0	4
6p, 1p		3	1	4
6q, 1q		2	1	4
6r, 1r		2	1	6
6s, 1s		2	1	4

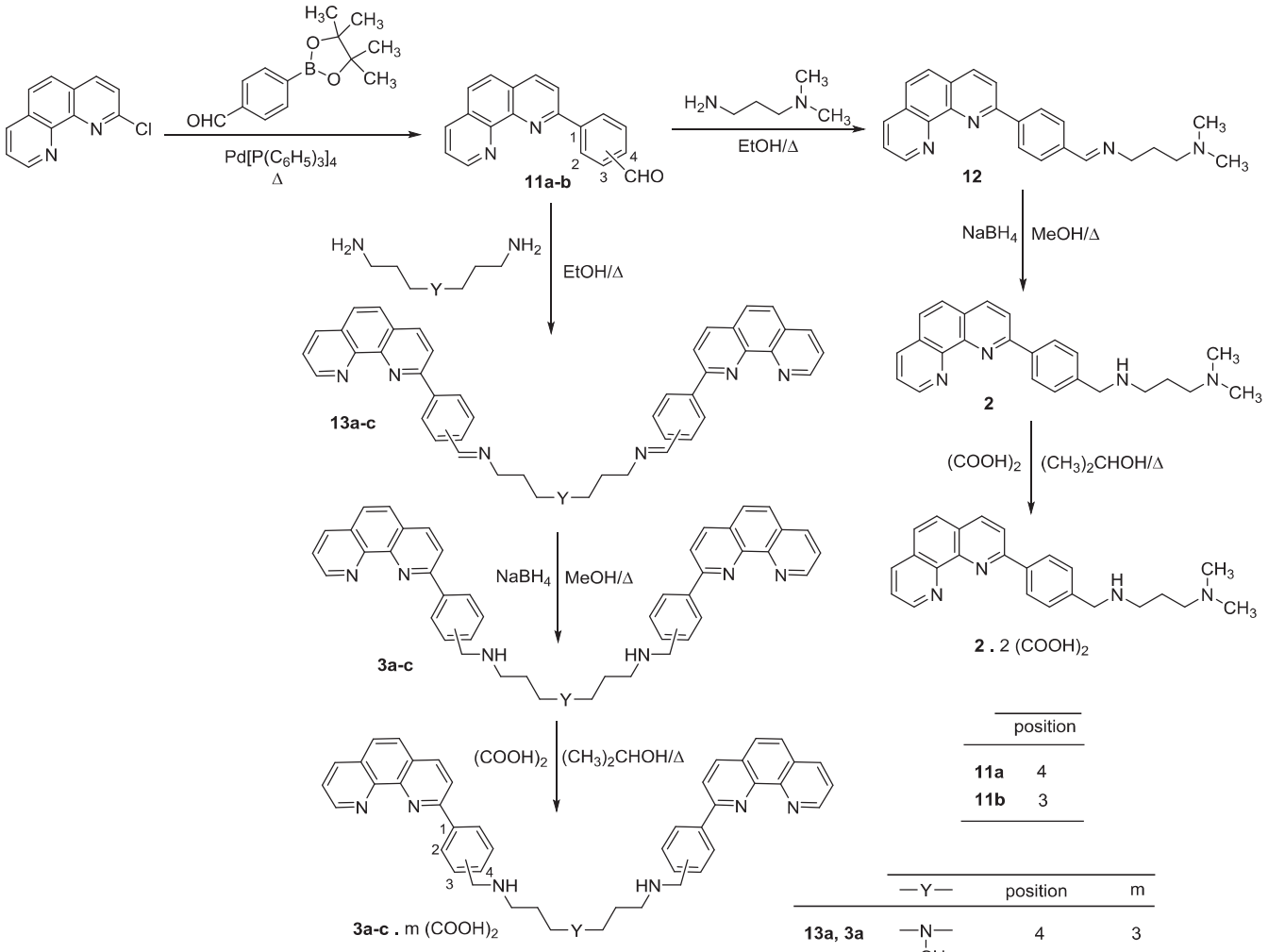
SCHEME 1 Synthesis of 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthrolines **1a–s**



SCHEME 2 Synthesis of 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthrolines **1t–u**



SCHEME 3 Synthesis of 9-chloro-2-{5-[(3-dimethylaminopropyl)aminomethyl]thien-2-yl}-1,10-phenanthroline **10**

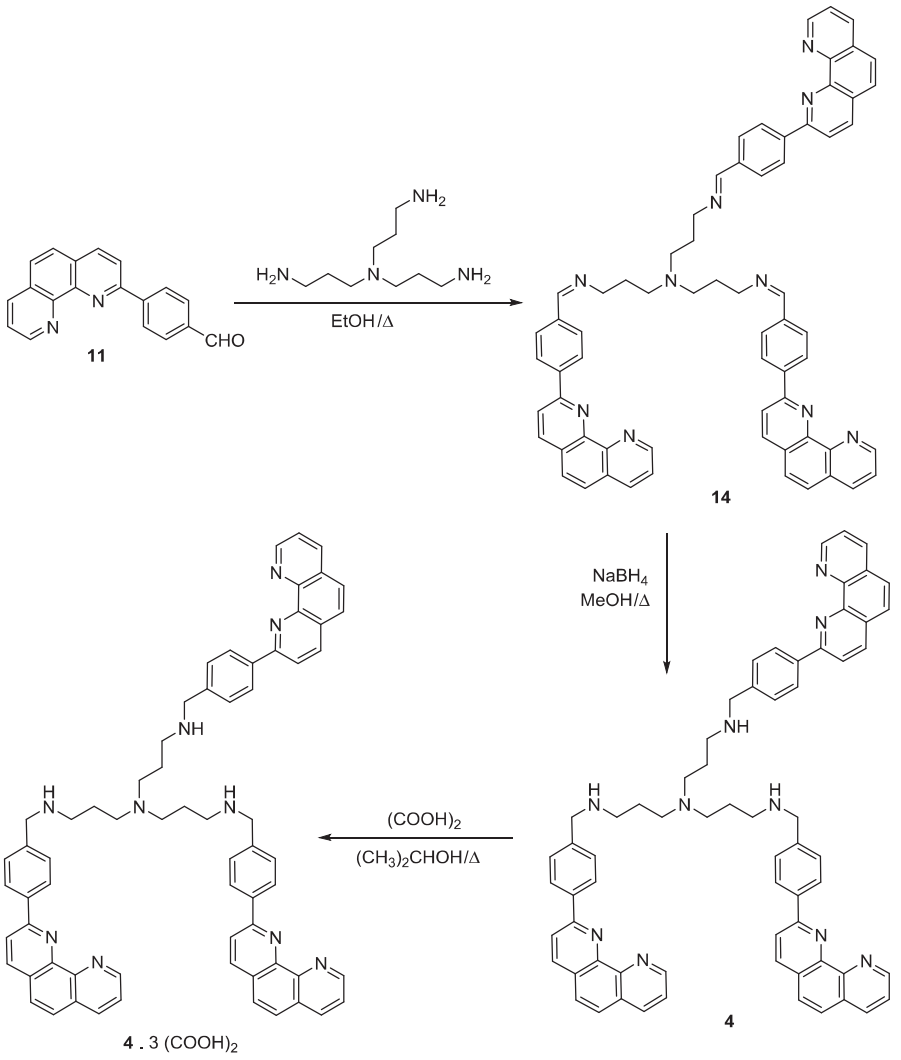


SCHEME 4 Synthesis of 1,10-phenanthroline derivatives **2** and **3a–c**

bis-[2,9-(formylphenyl)]-1,10-phenanthrolines **5a–c** were prepared by a double Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction of 2,9-dichloro-1,10-phenanthroline with 2-, 3-, or 4-formylphenylboronic acids in the presence of $Pd(PPh_3)_4$ as a catalyst and in the presence of potassium (or sodium) carbonate.[30,31] Condensation of primary amines with dialdehydes **5a–c** afforded the di-imines **6a–s**, which were immediately reduced into the 2,9-*bis*-[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthrolines **1a–s** using sodium borohydride as reductive agent in refluxing methanol as previously described by our team.[29]

The same strategy was used for the synthesis of the 2,9-*bis*{4-[(quinolin-3-yl)aminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline **1t** via the key intermediate di-imine **6t** and starting from the dialdehyde **5a** (Scheme 2). Compound **5a** was then engaged in a reductive amination with $NaBH_3CN$ and 1-[3-(dimethylamino)propyl]piperazine to give 2,9-*bis*{4-[4-((3-dimethylamino)propyl)piperazin-1-ylmethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline **1u** (45%) and a small amount of 9-{4-[4-((3-dimethylamino)propyl)piperazin-1-ylmethyl]phenyl}-2-[4-(hydroxymethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline **7** (10%) (Scheme 2).

To synthesize new bioisosteres of the 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthrolines **1**, we sought to replace the two phenyl moieties of these phenanthrolines with thiophene substituents. Unfortunately, the Suzuki-type cross-coupling reaction of 2,9-dichloro-1,10-phenanthroline with two equivalents of 5-formylthiophene-2-boronic acid using palladium catalyst did not lead to the expected *bis*-[2,9-(5-formylthien-2-yl)]-1,10-phenanthroline. This reaction



SCHEME 5 Synthesis of *tris*{*N*-[(phenanthrolin-2-yl)benzyl]-3-aminopropyl}amine **4**

afforded the 9-chloro-2-(5-formylthien-2-yl)-1,10-phenanth roline **8** through a single cross-coupling reaction on the dichlorophenanthroline (Scheme 3). This aldehyde **8** was then used to synthesize imine **9** through a condensation reaction with 3-(dimethylamino)propylamine. This latter imine **9** was then reduced to yield the amine **10** using sodium borohydride in refluxing methanol.

The mono-aldehydes **11a–b** were prepared using 4-formylphenylboronic acid pinacol ester under mild conditions in the presence of $Pd(PPh_3)_4$ and cesium carbonate as previously described by our team[36]. Reaction of primary amines, such as 3,3′-diamino-*N*-methyldipropylamine or 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine), with **11a–b** gave the di-imines **13a–c**, which were reduced into the bis{*N*-[(phenanthrolin-2-yl)benzyl]-3-aminopropyl}amines **3a–c** using sodium borohydride in methanol (Scheme 4).

Using the same procedure, the *tris*{*N*-[(phenanthrolin-2-yl)benzyl]-3-aminopropyl}amine **4** was synthesized via the tri-imine intermediate **14** (Scheme 5).

All phenanthroline compounds **1a–u**, **7**, **10**, **3a–c**, and **4** were then converted into ammonium oxalate salts by treatment with oxalic acid in refluxing isopropanol. Table 1 summarizes the physical properties of the new synthesized **1a–u**, **7**, **10**, **3a–b**, and **4** oxalates.

3.2 | In vitro antimalarial activity

The new 1,10-phenanthroline derivatives **1a–u**, **2**, **3a–c**, **4**, **7**, and **10** were evaluated for their antimalarial activity in vitro by incubation with *P. falciparum* CQ-resistant strain W2 (IC_{50} CQ = 0.20 μM, IC_{50} MQ = 0.032 μM) and the strain 3D7, which is CQ-sensitive and which has decreased sensitivity to MQ decrease (IC_{50} CQ = 0.08 μM, MQ = 0.08 μM). As shown in Table 2, the novel compounds had IC_{50} values between 0.066 and 4.535 μM against W2 and between 0.075 and 11.940 μM against 3D7 *P. falciparum* strains.

The influence of the length of the carbon chain between the two amino functions of the side chain, the position on the phenyl ring of these polyamino side chains, and also the nature of the terminal amine group was analyzed. Against the *P. falciparum* CQ-resistant strain W2, compound **1h** bearing morpholinoethylamino side chains at position 4

TABLE 1 Physical properties of amines **1a–u**, **7**, **10**, **3a–c**, and **4**

Compound		Salt[a]	mp (°C)[b]	% Yield[c]
1a	Pale-yellow crystals	4 $(COOH)_2$	215–217	84
1c	Yellow crystals	4 $(COOH)_2$	218–221	85
1d	Yellow crystals	6 $(COOH)_2$	254–257	82
1f	Yellow crystals	6 $(COOH)_2$	210–213	64
1h	Yellow crystals	4 $(COOH)_2$	> 260	68
1j	Beige crystals	4 $(COOH)_2$	221–223	68
1k	Yellow crystals	4 $(COOH)_2$	233–236	71
1l	Yellow crystals	6 $(COOH)_2$	217–219	85
1o	Beige crystals	4 $(COOH)_2$	220–222	67
1s	Beige crystals	4 $(COOH)_2$	112–114	77
1t	Yellow crystals	2 $(COOH)_2$	>260	78
1u	Yellow crystals	6 $(COOH)_2$	253–255	87
7	Yellow crystals	3 $(COOH)_2$	192–194	56
10	Yellow crystals	2 $(COOH)_2$	234–237	67
3a	Beige crystals	3 $(COOH)_2$	178–182	87
3b	Beige crystals	4 $(COOH)_2$	231–233	85
3c	Beige crystals	4 $(COOH)_2$	224–226	92
4	Pale-yellow crystals	4 $(COOH)_2$	165–167	86

[a]The stoichiometry and composition of the salts were determined by elemental analyses, and obtained values were within ±0.4% of the theoretical values.
[b]Crystallization solvent: 2-PrOH–H_2O.
[c]The yields only included the conversions into the ammonium oxalates.

of each of the benzyl moieties was found to be the most active with an IC_{50} of 0.04 μM. In comparison, its counterparts with morpholinopropylamino side chains at position 4 (compound **1g**) and with morpholinoethylamino side chains at position 3 (compound **1o**) were significantly less active (up to 6.75 times with $IC_{50} = 0.27$ μM for **1g**; up to 4.65 times with $IC_{50} = 0.19$ μM for **1o**) than phenanthroline **1h**. In this novel series, all derivatives bearing aminoethylamino side chains at position 4 of the benzyl rings displayed better activities than analogs substituted with aminopropylamino or aminobutylamino side chains ($IC_{50} = 0.20$ μM for **1c** versus $IC_{50} = 0.72$ and 4.47 μM for **1b** and **1a**, respectively). Moreover, the substitutions of the amino-alkylamino side chains at position 3 of the benzyl nucleus (compounds **1m–p**) showed better antimalarial activities against the W2 strain than their homologues substituted at positions 4 or 2, with the exception of compound **1o**. In addition, the monopolyaminoalkyled side product **7** exhibited a better antimalarial activity than its disubstituted analog **1u** ($IC_{50} = 0.07$ μM for **7** versus $IC_{50} = 2.49$ μM for **1u**). The monothienyl analog **10** bearing a chlorine at position 9 of the phenanthroline core was also active against the W2 strain with an IC_{50} of 0.07 μM. The bisphenanthroline **3a** containing a *bis*-(3-aminopropyl)methylamine linker was more active (up to 3.14 times) against the *P. falciparum* W2 strain than its counterpart compound **4** with a *tris*-(3-aminopropyl)amine linkage ($IC_{50} = 0.37$ μM for **3a** versus $IC_{50} = 1176$ μM for **4**).

Against the CQ-sensitive strain 3D7, the monopolyaminoalkyled thienyl phenanthroline **10** was the most potent antiplasmodial compound with an IC_{50} of 0.07 μM. This is very similar to IC_{50} values of the two reference drugs, CQ and MF, which both had IC_{50} values of 0.08 μM. Among the newly reported 2,9-*bis*-[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline derivatives **1a–t**, the 2,9-*bis*{4-[(2-morpholinoethyl)aminomethyl]phenyl}-1,10-phenanthroline **1h** was the most potent compound with an IC_{50} of 0.11 μM against the 3D7 strain, but this molecule was more active against *P. falciparum* strain W2 than *P. falciparum* strain 3D7.

3.3 | In vitro antileishmanial activity against promastigote forms

To better understand the biological profile of molecules **1a–u**, **2**, **3a–c**, **4**, **7**, and **10**, complementary antiparasitic analyses were also performed. Notably, *P. falciparum* belongs to coccidian protozoan parasite family. Therefore, in vitro activity against flagellate protozoan parasite *L. donovani* was evaluated (Table 2). The reference drugs amphotericin B and pentamidine had IC_{50} values of 0.10 μM and 5.50 μM, respectively, against *L. donovani*. None of our novel compounds had antileishmanial activity (all IC_{50} values ≥ 10 μM).

TABLE 2 In vitro sensitivity of *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani,* and *Trypanosoma brucei brucei* strains to compounds **1a–u**, **7**, **10**, **2**, **3a–c**, and **4** and cytotoxicity of these compound in HepG2 cells

Compound	*P. falciparum strains* IC_{50} values (μM)[a]		*L. donovani* IC_{50} values (μM)[b]	*Trypanosoma brucei brucei* IC_{50} values (μM)[c]	Cytotoxicity to HepG2 cells CC_{50} values (μM)[d]
	W2	3D7			
Chloroquine[e]	0.20 ± 0.03	0.08 ± 0.003	n.d.	n.d.	30
Mefloquine[e]	0.032 ± 0.001	0.08 ± 0.008	n.d.	n.d.	n.d.
Pentamidine[f]	n.d.	n.d.	5.5 ± 0.8	0.0002 ± 0.00006	2.3 ± 0.5
Amphotericin B[f]	n.d.	n.d.	0.1 ± 0.04	n.d.	8.8 ± 0.6
Suramine[g]	n.d.	n.d.	n.d.	0.03 ± 0.003	n.d.
Fexinidazole[g]	n.d.	n.d.	n.d.	0.59 ± 0.039	n.d.
Eflornithine[g]	n.d.	n.d.	n.d.	15.19 ± 0.64	n.d.
Doxorubicin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.06 ± 0.02
1a	4.47 ± 0.58	1.31 ± 0.06	≥10[h]	0.80 ± 0.122	8.14 ± 0.5
1b	0.72 ± 0.032	1.31 ± 0.115	≥10[h]	0.09 ± 0.008	2.00 ± 0.4
1c	0.20 ± 0.017	0.27 ± 0.022	≥10[h]	0.59 ± 0.050	3.11 ± 0.4
1d	n.d.	11.94 ± 1.66	≥10[h]	2.47 ± 0.702	8.72 ± 2.69
1e	1.04 ± 0.095	1.45 ± 0.272	≥10[h]	0.77 ± 0.054	4.13 ± 0.4
1f	0.82 ± 0.05	1.49 ± 0.16	≥10[h]	0.42 ± 0.071	3.02 ± 1.4
1g	0.27 ± 0.023	0.41 ± 0.007	≥10[h]	0.99 ± 0.108	2.8 ± 0.13
1h	0.04 ± 0.004	0.11 ± 0.017	≥10[h]	0.35 ± 0.043	4.28 ± 0.5
1i	2.41 ± 0.23	5.24 ± 0.462	≥10[h]	1.70 ± 0.307	2.63 ± 0.69
1j	0.12 ± 0.01	0.76 ± 0.179	≥10[h]	0.72 ± 0.067	3.07 ± 0.17
1k	1.65 ± 0.124	3.54 ± 0.231	≥10[h]	0.44 ± 0.053	3.90 ± 0.2
1l	4.53 ± 0.627	1.23 ± 0.077	≥10[h]	2.14 ± 0.319	1.21 ± 0.3
1m	0.63 ± 0.098	0.85 ± 0.167	≥10[h]	1.17 ± 0.146	2.1 ± 0.4
1n	0.79 ± 0.126	1.28 ± 0.170	≥10[h]	2.72 ± 0.125	1.4 ± 0.3
1o	0.19 ± 0.023	0.38 ± 0.030	≥10[h]	0.76 ± 0.047	8.58 ± 0.2
1p	0.48 ± 0.046	1.14 ± 0.110	≥10[h]	1.24 ± 0.131	2.81 ± 0.36
1q	2.22 ± 0.189	0.97 ± 0.128	≥10[h]	0.75 ± 0.065	10.96 ± 1.9
1r	1.02 ± 0.117	3.64 ± 0.549	≥10[h]	1.41 ± 0.267	6.27 ± 0.1
1s	n.d.	5.21 ± 0.135	≥10[h]	0.81 ± 0.065	15.68 ± 2.16
1t	>40	>40	n.d.	>50	n.d.
1u	2.49 ± 0.348	0.31 ± 0.020	≥10[h]	1.05 ± 0.097	2.90 ± 0.59
7	0.07 ± 0.003	0.29 ± 0.034	≥10[h]	0.59 ± 0.042	2.99 ± 1.08
10	0.071 ± 0.005	0.07 ± 0.005	≥10[h]	0.23 ± 0.017	2.13 ± 0.70
2	n.d.	3.53 ± 0.331	≥10[h]	0.77 ± 0.153	8.47 ± 0.9
3a	0.37 ± 0.51	0.28 ± 0.041	n.d.	0.57 ± 0.038	n.d.
3b	n.d.	4.10 ± 0.482	≥10[h]	1.47 ± 0.181	13.18 ± 2.6
3c	n.d.	n.d.	≥10[h]	1.16 ± 2.81	10.75 ± 0.81
4	1.17 ± 0.154	0.68 ± 0.059	≥10[h]	3.38 ± 0.221	n.d.

n.d.: not done.

[a]Values were measured against chloroquine-resistant and mefloquine-sensitive strain W2 and the chloroquine-sensitive and mefloquine-resistant strain 3D7.

[b]IC_{50} values were measured against the promastigotes of *Leishmania donovani* strain. The IC_{50} (μM) values correspond to the mean ± SDs from three independent experiments.

[c]IC_{50} values were measured against the slender bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.9 strain. The IC50 (μM) values correspond to the mean ± SDs from three independent experiments with each concentration tested in duplicate in all experiments.

[d]CC_{50} values were measured against HepG2 cells. The CC_{50} (μM) values correspond to the mean ± SDs from three independent experiments.

[e]Chloroquine and mefloquine were used as antiplasmodial compounds of reference.

[f]Pentamidine and amphotericin B were used as antileishmanial compounds of reference.

[g]Suramine, pentamidine, fexinidazole, and eflornithine were used as antitrypanosomal compounds of reference.

[h]No activity noted at the highest concentration tested.

TABLE 3 Selectivity indexes of compounds **1a–u**, **7**, **10**, **2**, **3a–c,** and **4**

Compound	Selectivity index[a]		
	HepG2/W2	HepG2/3D7	HepG2/*Tryp.*
Chloroquine	150	300	n.d.
Pentamidine	n.d.	n.d.	11500
1a	1.8	6.2	10.1
1b	2.8	1.5	23.3
1c	15.5	11.5	5.3
1d	n.d.	0.7	3.5
1e	4.0	2.9	5.4
1f	3.7	2.0	7.2
1g	10.4	6.8	2.8
1h	107.0	38.9	12.2
1i	1.1	0.5	1.5
1j	25.6	4.0	4.2
1k	2.4	1.1	8.8
1l	0.3	1.0	0.6
1m	3.3	2.5	1.8
1n	1.8	1.1	0.5
1o	46.1	22.7	11.3
1p	5.9	2.5	2.3
1q	4.9	11.2	14.6
1r	6.2	1.7	4.4
1s	n.d.	3.0	19.4
1t	n.d.	n.d.	n.d.
1u	1.2	9.2	2.8
7	45.3	10.3	5.0
10	30.0	28.4	9.2
2	n.d.	2.4	11.0
3a	n.d.	n.d.	n.d.
3b	n.d.	3.2	8.9
3c	n.d.	n.d.	9.3
4	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: not done.

[a]SI was defined as the ratio between the CC_{50} value on the HepG2 cells and the IC_{50} value against the *P. falciparum* W2 or 3D7 or *Trypanosoma brucei brucei* strains.

3.4 | In vitro activity against *Trypanosoma brucei brucei*

The newly synthesized compounds were also evaluated against *T. brucei brucei*. Suramine, pentamidine, fexinidazole, and eflornithine were used as reference drugs. The screening data are presented in Table 2. Phenanthroline derivatives **1–4**, **7**, and **10** were active against *T. brucei brucei* with IC_{50} values ranging from 0.086 to 3.38 μM; compound **1t** was found inactive ($IC_{50} > 50$ μM). As these new tested compounds share the same phenanthroline core and differ in the nature and the position of the polyaminoalkyl chain substitutions, we tried to infer structure–activity relationships (SAR) among these new antiparasitic derivatives. The best efficacy against the *T. brucei brucei* strain was observed with compound **1b** with an IC_{50} of 0.09 μM, the same order of magnitude as the drug suramine ($IC_{50} = 0.03$ μM). Its structural analogous **1a** and **1c**, bearing, respectively, C_4 and C_2 side chains at position 4 of the phenyls, were found less active than compound **1b** ($IC_{50} = 0.80$ μM and 0.59 μM for **1a** and **1c**, respectively). Moreover, when the (dimethylaminopropyl)aminomethyl substituents were anchored in positions 2 or 3 of the phenyl rings (compounds **1q** and **1m**), a considerable decrease in the antitrypanosomal activity was observed ($IC_{50} = 0.75$ μM for **1q** and 1.17 μM for **1m**).

For the (4-methylpiperazin-1-yl)propyl) aminomethyl substitutions, phenanthroline **1e** was more active than its 2- or 3-substituted analogs **1r** and **1n** ($IC_{50} = 0.77$ μM for **1e** versus 1.41 and 2.72 μM for **1r** and **1n**, respectively). Surprisingly, the 2,9-*bis* [(substituted-aminoethylaminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthrolines **1f**, **1h**, and **1j**, which are disubstituted with C_2 polyaminoalkyl chains on position 4 of the benzyl moieties, exhibited better antitrypanosomal activity than their C_3 analogs (compounds **1e**, **1g**, and **1i**) with IC_{50} ranging from 0.35 to 0.72 μM. The exception was compound **1c** ($IC_{50} = 0.59$ μM), which was less active than its C_3 analog **1b** ($IC_{50} = 0.03$ μM). Moreover, phenanthroline **1l**, bearing a 3-(3-dimethylaminopropylamino) propyl) aminomethyl substituent on the heterocyclic skeleton, exhibited moderate antimalarial activity against the *T. brucei brucei* strain with an IC_{50} of 2.14 μM. Interestingly, compound **2** bearing only one (dimethylaminopropyl)aminomethyl substituent in position 4 of the phenyl nucleus of the phenanthroline skeleton exhibited lower activity against the *T. brucei brucei* strain than did the disubstituted compound **1b** ($IC_{50} = 0.77$ μM for **2** versus 0.03 μM for **1b**). The monothienyl analog **10** bearing a chlorine in position 9 was more active than **2** against *T. brucei brucei* ($IC_{50} = 0.77$ μM for **2** versus $IC_{50} = 0.23$ μM for **10**). In addition, the monopolyaminoalkyled side product **7** exhibited better biological activity than did its disubstituted analog **1u** ($IC_{50} = 0.59$ μM for **7** versus 1.05 μM for **1u**). The bisphenanthroline **3a** joined by a *bis*-(3-aminopropyl) methylamine linker was more active (up to 2.58 times) against the *T. brucei brucei* strain than its counterpart **3b** with a *bis*-(3-aminopropyl) piperazine linkage ($IC_{50} = 0.57$ μM for **3a** versus 1.47 μM for **3b**). Substitution of the *bis*-(3-aminopropyl) piperazine linkage in position 3 of the phenyl moieties (compound **3c**) did not influence the antitrypanosomal activity ($IC_{50} = 1.16$ μM). Introduction of a third phenanthroline ring (compound **4**) reduced considerably the antitrypanosomal activity ($IC_{50} = 3.38$ μM). In summary, this series includes compounds with selective antiplasmodial and antitrypanosomal profiles.

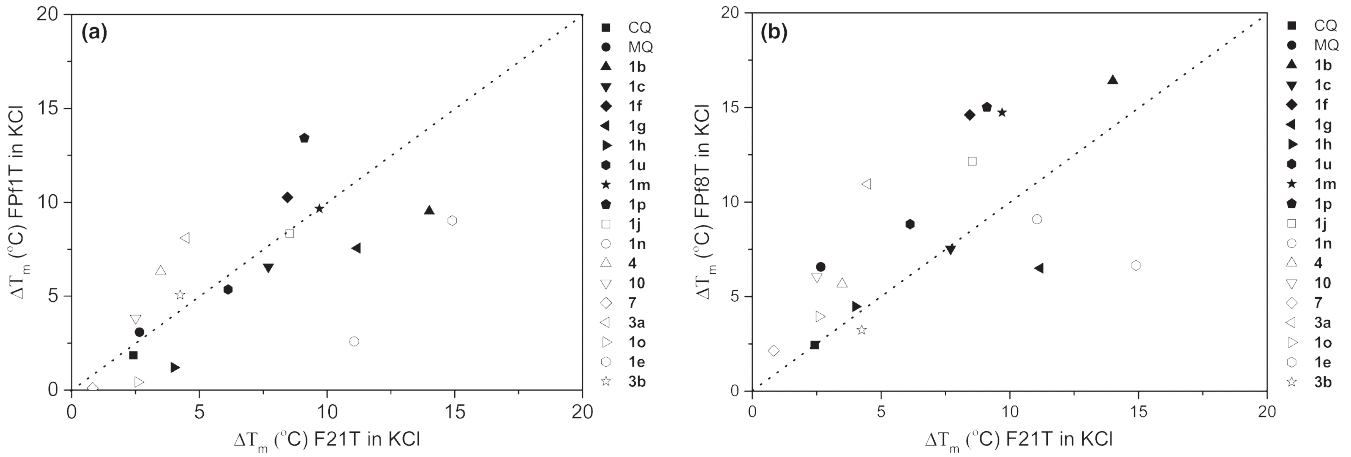


FIGURE 2 Thermal stabilization (ΔT_m) induced by selected compounds **1**, **3–4**, **7**, and **10** (at 1 μM) of *Plasmodium* telomeric G-quadruplexes (a) FPf1T and (b) FPf8T versus the human telomeric quadruplex F21T

3.5 | Cytotoxicity and selectivity index

To assess selectivity of action, the cytotoxicities of the antimalarial compounds **1a–u**, **2**, **3a–c**, **4**, **7**, and **10** were evaluated in vitro in the human cell line HepG2. HepG2 is a commonly used human-derived hepatocarcinoma cell line. These cells express many hepatocyte-specific metabolic enzymes. The aim of this assay using HepG2 cells was to evaluate the impact of metabolic activation of the tested compounds on cell viability. The cytotoxic concentrations 50% (CC_{50}) were determined, and selectivity indexes (SI), defined as the ratios of cytotoxic-to-antiparasitic activities ($SI = CC_{50}/IC_{50}$), were calculated. The results of cytotoxicity assays and the associated SI values are presented in Table 3. Most of the 1,10-phenanthroline derivatives that were active against the parasites showed significant cytotoxicity against the HepG2 cells (CC_{50} values from 1.40 to 15.68 μM). For the malaria W2 strain, the SIs were between 0.3 and 107.0. The SIs ranged from 0.6 to 23.3 for the CQ-sensitive strain 3D7. Analyses of SI values identified compound **1h** as interesting: Compound **1h** has an SI of 107.0 for the W2 strain and an SI of 38.9 for the 3D7 strain. In addition, the other phenanthrolines **1o**, **7**, and **10** also had high SIs of 46.1, 45.3, and 30.0, respectively, for the CQ-resistant W2. For the *T. brucei brucei* strain, compounds **1b** and **1s** had SIs of 23.3 and 19.4, respectively. These high SI values indicate that these compounds warrant further investigation into their potential as antiparasitic drugs.

3.6 | FRET melting experiments

As similar phenanthroline derivatives showed interesting effects as G-quadruplex sequence stabilizing ligands,[29] we investigated whether the newly synthesized compounds bound to *P. falciparum* telomeric sequences as we reasoned that this might be the mechanism of antiprotozoan effects. Interestingly, *Plasmodium* telomeres contain a repeated degenerate motif of $^{5'}$GGGTTYA$^{3'}$ (where Y may be T or C), which is quite different from the human telomeric one ($^{5'}$GGGTTA$^{3'}$).[42] We used a FRET melting assay to determine the degree to which the new phenanthroline derivatives stabilize the G-quadruplexes formed by oligonucleotides with *P. falciparum* as well as human telomeric sequences. For this purpose, we used two fluorescently labeled *P. falciparum* telomeric sequences (FPf1T and FPf8T) and one human telomeric sequence (F21T). For comparison, we evaluated CQ and MQ. To enable comparison of selectivities, we calculated the difference (ΔT_m) between the T_m of the G-quadruplex formed by FPf1T, FPf8T, or F21T in the presence compared to the absence of each compound. These ΔT_m values are plotted in Figure 2.

The FRET analyses showed that almost all new ligands except **1h**, **1o**, **7**, and **10** stabilize all the three G-quadruplexes to a greater extent than do CQ and MQ. The ligands **1c**, **1f**, **1j**, **1m**, **1p**, **1g**, **1b**, **1e**, and **1n** strongly stabilized the F21T G-quadruplex. The ΔT_m values ranged from 7.5 to 15°C at 1 μM ligand concentration. The novel compounds stabilized the FPf1T G-quadruplex and the human F21T G-quadruplex to similar extents and stabilized the FPf8T G-quadruplex to a slightly greater extent than they did the human G-quadruplex. Compound **1p** displayed a better stabilization profile for both the *P. falciparum* telomeric sequences than the human telomeric G-quadruplex. In addition, ligands **1f** and **1m** were also found to be more specific for FPf8T with higher ΔT_m for FPf8T than for F21T. By taking into account these results, novel pharmacomodulations may be carried out to increase the specificity of these ligands for the *P. falciparum* telomeric sequences.

4 | CONCLUSIONS

In the present report, we described the synthesis, the antiparasitic activities, and the in vitro cytotoxicity toward

human cells of a novel series of 2,9-*bis*-[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline derivatives. These new derivatives were tested for their in vitro antiparasitic activity toward the CQ-resistant W2 and CQ-sensitive 3D7 *P. falciparum* strains, the promastigote form of *L. donovani*, and a *T. brucei brucei* strain. Among these new synthesized 1,10-phenanthrolines, a few have potential as antiplasmodial lead compounds with the most potent having IC_{50} values ranging from 0.04 to 0.27 μM against *P. falciparum*. Unfortunately, none of our compounds showed activity against the promastigote forms of *L. donovani*. In addition, their antiprotozoal activity spectrum using a *T. brucei brucei* strain revealed IC_{50} values ranging from 0.09 to 3.38 μM, which warrant further investigation. Moreover, when the in vitro cytotoxicity of these novel phenanthrolines was also assessed using human HepG2 cells, we identified phenanthroline **1h** with an index of selectivity of 107 for the CQ-resistant W2. Their ability to target human telomeric sequences as potential mechanism of action has been described and was confirmed using a FRET melting assay. Thus, the telomeric sequences of the parasites could be the targets of these potential drugs.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the DGA and ANR (projects ANR-12-ASTR-003, OligoSwitch [ANR-12-IS07-0001], "Quarpdiems" [ANR-12-BSV8-0008-01], and "VIBBnano" [ANR-10-NANO-04-03]) for financial support of this study. J.-L.M. also acknowledges funding from Conseil Régional d'Aquitaine and Agence Nationale de la Recherche as well as the SYMBIT project (reg. no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000477) financed by the ERDF.

CONFLICT OF INTEREST

The authors report no conflict of interests. The authors alone are responsible for the content and writing of the manuscript.

ORCID

Jean Guillon http://orcid.org/0000-0001-8577-3894

REFERENCES

[1] J. Aponte, M. Aregawi, L. Bergeron, R. Cibulskis, J. Cunningham, T. Knox, E. Patouillard, P. Ringwald, S. Schwarte, S. Stewart, R. Williams, World Malaria Report, World Health Organization, Geneva, Switzerland **2016**.

[2] E. H. Atake, *Appl. Health Econ. Health Policy* **2016**, *15*, 249.

[3] J. Zhang, J. Q. Dong, J. Y. Li, Y. Zhang, Y. H. Tian, X. Y. Sun, G. Y. Zhang, Q. P. Li, X. Y. Xu, T. Cai, *Infect. Dis. Poverty* **2016**, *5*, 80.

[4] M. S. Alilio, I. C. Bygbjerg, J. G. Breman, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, *71*, 268.

[5] M. Mishra, V. K. Mishra, V. Kashaw, A. K. Iyer, S. K. Kashaw, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *125*, 1300.

[6] S. Yeung, D. Socheat, V. S. Moorthy, A. J. Mills, *Lancet* **2009**, *374*, 1418.

[7] O. Müller, A. Sié, P. Meissner, R. H. Schirmer, B. Kouyaté, *Lancet.* **2009**, *374*, 1419.

[8] E. A. Winzeler, M. J. Manary, *Genome Biol.* **2014**, *15*, 544.

[9] R. M. Fairhurst, *Curr. Opin. Infect Dis.* **2015**, *28*, 417.

[10] L. Tilley, J. Straimer, N. F. Gnadig, S. A. Ralph, D. A. Fidock, *Trends Parasitol.* **2016**, *32*, 682.

[11] F. Ariey, B. Witkowski, C. Amaratunga, J. Beghain, A. C. Langlois, N. Khim, S. Kim, V. Duru, C. Bouchier, L. Ma, P. Lim, R. Leang, S. Duong, S. Sreng, S. Suon, C. M. Chuor, D. M. Bout, S. Ménard, W. O. Rogers, B. Genton, T. Fandeur, O. Miotto, P. Ringwald, J. Le Bras, A. Berry, J. C. Barale, R. M. Fairhurst, F. Benoit-Vical, O. Mercereau-Puijalon, D. Ménard, *Nature.* **2014**, *505*, 50.

[12] World Health Organization, Guidelines for the treatment of Malaria 3rd ed, World Health Organization, Geneva, Switzerland **2015**.

[13] C. Biot, K. Chibale, *Infect. Disorders-Drug Targets* **2006**, *6*, 173.

[14] D. De, F. M. Krogstad, F. B. Cogswell, D. J. Krogstad, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1996**, *55*, 579.

[15] R. G. Ridley, W. Hfheinz, H. Matile, C. Jaquet, A. Dorn, R. Masciadri, S. Jolidon, W. F. Richter, A. Guenzi, M. A. Girometta, H. Urwyler, W. Huber, S. Thaithong, W. Peters, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1846**, *1996*, 40.

[16] S. Deshpande, B. Kuppast, *Med. Chem.* **2016**, *6*, 1.

[17] S. Kumar, R. K. Singh, B. Patial, S. Goyal, T. R. Bhardwaj, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 173.

[18] S. Manohar, M. Tripathi, D. S. Rawat, *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 1706.

[19] P. M. O'Neill, S. A. Ward, N. G. Berry, J. P. Jeyadevan, G. A. Biagini, E. Asadollaly, B. K. Park, P. G. A. Bray, *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 479.

[20] B. Douglas, W. O. Kermack, *J. Chem. Soc.* **1949**, 1017.

[21] A.-D. Yapi, A. Valentin, J.-M. Chezal, O. Chavignon, B. Chaillot, R. Gerhardt, J.-C. Teulade, Y. Blache, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2006**, *339*, 201.

[22] C. Sall, A.-D. Yapi, A. N. Desbois, S. Chevalley, J.-M. Chezal, K. Tan, J.-C. Teulade, A. Valentin, Y. Blache, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4666.

[23] M. A. Wijayanti, E. N. Sholikhah, R. Hadanu, J. Jumina, S. Supargiyono, M. Mustofa, *Malar. Res. Treat.* **2010**, *2010*, 540786.

[24] E. N. Sholikhah, S. Supargiyono, J. Jumina, M. A. Wijayanti, I. Tahir, R. Hadanu, M. Mustofa, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* **1072**, *2006*, 37.

[25] L. Gradoni, R. Lopez-Vélez, M. Mokni, Manual on case management and surveillance of the leishmaniases in the WHO European region, World Health Organization, Regional Office for Europe, Copenhagen **2017**.

[26] WHO Technical report series n°975, Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis, **2012**, 116.

[27] L. H. Freitas-Junior, E. Chatelain, H. A. Kim, J.-L. Siqueira-Neto, *Int. J. Parasitol.* **2012**, *2*, 11.

[28] P. Büscher, G. Cecchi, V. Jamonneau, G. Priotto, *Lancet.* **2017**, *390*, 2397.

[29] N. M. Gueddouda, M. R. Hurtado, S. Moreau, L. Ronga, R. N. Das, S. Savrimoutou, S. Rubio, A. Marchand, O. Mendoza, M. Marchivie, L. Elmi, A. Chansavang, V. Desplat, V. Gabelica, A. Bourdoncle, J.-L. Mergny, J. Guillon, *ChemMedChem.* **2017**, *12*, 146.

[30] J. Guillon, P. Grellier, M. Labaied, P. Sonnet, J.-M. Léger, R. Déprez-Poulain, I. Forfar-Bares, P. Dallemagne, N. Lemaître, F. Péhourcq, J. Rochette, C. Sergheraert, C. Jarry, *J. Med. Chem.* **1997**, *2004*, 47.

[31] J. Guillon, I. Forfar, M. Mamani-Matsuda, V. Desplat, M. Saliège, D. Thiolat, S. Massip, A. Tabourier, J.-M. Léger, B. Dufaure, G. Haumont, C. Jarry, D. Mossalayi, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 194.

[32] J. Guillon, I. Forfar, V. Desplat, S. Belisle-Fabre, D. Thiolat, S. Massip, H. Carrie, D. Mossalayi, C. Jarry, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22*, 541.

[33] J. Guillon, S. Moreau, E. Mouray, V. Sinou, I. Forfar, S. Belisle-Fabre, V. Desplat, P. Millet, D. Parzy, C. Jarry, P. Grellier, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9133.

[34] J. Guillon, E. Mouray, S. Moreau, C. Mullié, I. Forfar, V. Desplat, S. Belisle-Fabre, F. Ravanello, A. Le-Naour, N. Pinaud, J.-M. Léger, G. Gosmann, C. Jarry, G. Déléris, P. Sonnet, P. Grellier, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2310.

[35] L. Ronga, M. Del Favero, A. Cohen, C. Soum, P. Le Pape, S. Savrimoutou, N. Pinaud, C. Mullié, S. Daulouede, P. Vincendeau, N. Farvacques, P. Agnamey, F. Pagniez, S. Hutter, N. Azas, P. Sonnet, *J. Guillon. Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *81*, 378.

[36] J. Guillon, A. Cohen, N. M. Gueddouda, R. N. Das, S. Moreau, L. Ronga, S. Savrimoutou, L. Basmaciyan, A. Monnier, M. Monget, S. Rubio, T. Garnerin, N. Azas, J.-L. Mergny, C. Mullié, P. Sonnet, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 547.

[37] E. P. Calvo, M. Wasserman, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2016**, *207*, 33.

[38] R. R. Tidwell, D. W. Boykin, M. A. Ismail, W. D. Wilson, E. W. White, A. Kumar, R. Nanjunda, **2007**, EP 1792613A2.

[39] W.-M. Leeder, N. F. C. Hummel, H. U. Göringer, *Sci. Rep.* **2016**, https://doi.org/10.1038/srep29810.

[40] R. Lombrana, A. Alvarez, J. M. Fernandez-Justel, R. Almeida, C. Poza-Carrion, F. Gomes, A. Calzada, J. M. Requena, M. Gomez, *Cell Rep.* **2016**, *16*, 1774.

[41] E. Bottius, N. Bakhsis, A. Scherf, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 919.

[42] D. K. Raj, B. R. Das, A. P. Dash, P. C. Supakar, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *309*, 685.

[43] A. De Cian, P. Grellier, E. Mouray, D. Depoix, H. Bertrand, D. Monchaud, M.-P. Telade-Fichou, J.-L. Mergny, P. Alberti, *ChemBioChem.* **2008**, *9*, 2730.

[44] R. E. Desjardins, C. J. Canfield, J. D. Haynes, J. D. Chulay, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *16*, 710.

[45] T. N. Bennett, M. Paguio, B. Gligorijevic, C. Seudieu, A. D. Kosar, E. Davidson, P. D. Roepe, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1807**, *2004*, 48.

[46] D. J. Bacon, C. Latour, C. Lucas, O. Colina, P. Ringwald, S. Picot, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1172.

[47] H. Kaddouri, S. Nakache, S. Houzé, F. Mentré, J. Le Bras, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 3343.

[48] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods.* **1983**, *65*, 55.

[49] S. A. Emami, S. Zamanai Taghizadeh Rabe, A. Ahi, M. Mahmoudi, *Iran J. Basic Med. Sci.* **2012**, *15*, 807.

[50] B. Räz, M. Iten, Y. Grether-Bühler, R. Kaminsky, R. Brun, *Acta Trop.* **1997**, *68*, 139.

[51] T. Baltz, D. Baltz, C. Giroud, *EMBO J.* **1985**, *4*, 1273.

[52] A. De Cian, L. Guittat, M. Kaiser, B. Saccà, S. Amrane, A. Bourdoncle, P. Alberti, M.-P. Teulade-Fichou, L. Lacroix, J.-L. Mergny, *Methods.* **2007**, *42*, 183.

How to cite this article: Guillon J, Cohen A, Das RN, et al. Design, synthesis, and antiprotozoal evaluation of new 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline derivatives. *Chem Biol Drug Des*. 2018;00:1–22. https://doi.org/10.1111/cbdd.13164

III.2. Série B : Dérivés Quinoléines, Isoquinoléines et Quinazolines

Dérivant de la série A, de nouvelles pharmacomodulations ont été envisagées pour donner dans un premier temps une série B à base de quinoléines, isoquinoléines et quinazolines comme synthons hétérocycliques azotés de base. Ces structures sont connues pour être des pharmacophores importants possédant des propriétés antipaludiques dont certaines sont déjà utilisées en thérapeutique. Les nouvelles molécules synthétisées par l'équipe du Pr Guillon ont été, comme pour la série A, testées contre des protozoaires précédemment cités pour évaluer leur CC_{50} et leur CI_{50}.

Ce travail a fait l'objet d'une publication en janvier 2020 intitulée « Design, synthesis, and antiprotozoal evaluation of new 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinoline, 1,3-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]isoquinoline and 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinazoline derivatives » (Guillon et al., 2020).

BY-NC-ND

Design, synthesis, and antiprotozoal evaluation of new 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinoline, 1,3-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]isoquinoline and 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinazoline derivatives

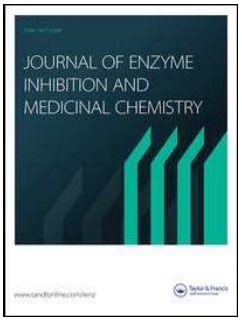
Jean Guillon, Anita Cohen, Clotilde Boudot, Alessandra Valle, Vittoria Milano, Rabindra Nath Das, Aurore Guedin, Stephane Moreau, Luisa Ronga, Solène Savrimoutou, Maxime Demourgues, Elodie Reviriego, Sandra Rubio, Sandie Ferriez, Patrice Agnamey, Cecile Pauc, Serge Moukha, Pascale Dozolme, Sophie Da Nascimento, Pierre Laumaille, Anne Bouchut, Nadine Azas, Jean-Louis Mergny, Catherine Mullié, Pascal Sonnet and Bertrand Courtioux

Publié en Janvier 2020

Résumé:

Une série de nouveaux dérivés de 2,4-bis[(aminométhyl substitué)phényl]quinoléine, de 1,3 bis[(aminométhyl substitué)phényl] isoquinoléine et de 2,4-bis[(aminométhyl substitué)phényl]quinazoline a été conçue, synthétisée et évaluée *in vitro* contre trois parasites protozoaires (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani* et *Trypanosoma brucei brucei*). Les résultats biologiques ont montré une activité antiprotozoaire avec des valeurs de CI_{50} dans la gamme des mM. En outre, la cytotoxicité *in vitro* de ces molécules originales a été évaluée avec des cellules HepG2 humaines. La quinoléine 1c a été identifiée comme le candidat antipaludique le plus puissant avec un rapport entre les activités cytotoxiques et antiparasitaires de 97 contre la souche 3D7 sensible à la CQ de *P. falciparum*. La quinazoline 3h a également été identifiée comme le candidat trypanosomique le plus puissant avec un indice de sélectivité (SI) de 43 sur la souche *T. brucei brucei*. De plus, comme les télomères des parasites *P. falciparum* et *Trypanosoma* sont des cibles possibles de ce type de composés hétérocycliques azotés, nous avons également étudié la stabilisation des G-quadruplexes télomériques de *Plasmodium* et *Trypanosoma* par nos meilleurs composés grâce aux essais de fusion FRET.

BY-NC-ND



Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry

ISSN: 1475-6366 (Print) 1475-6374 (Online) Journal homepage: https://www.tandfonline.com/loi/ienz20

Design, synthesis, and antiprotozoal evaluation of new 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinoline, 1,3-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]isoquinoline and 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinazoline derivatives

Jean Guillon, Anita Cohen, Clotilde Boudot, Alessandra Valle, Vittoria Milano, Rabindra Nath Das, Aurore Guédin, Stéphane Moreau, Luisa Ronga, Solène Savrimoutou, Maxime Demourgues, Elodie Reviriego, Sandra Rubio, Sandie Ferriez, Patrice Agnamey, Cécile Pauc, Serge Moukha, Pascale Dozolme, Sophie Da Nascimento, Pierre Laumaillé, Anne Bouchut, Nadine Azas, Jean-Louis Mergny, Catherine Mullié, Pascal Sonnet & Bertrand Courtioux

To cite this article: Jean Guillon, Anita Cohen, Clotilde Boudot, Alessandra Valle, Vittoria Milano, Rabindra Nath Das, Aurore Guédin, Stéphane Moreau, Luisa Ronga, Solène Savrimoutou, Maxime Demourgues, Elodie Reviriego, Sandra Rubio, Sandie Ferriez, Patrice Agnamey, Cécile Pauc, Serge Moukha, Pascale Dozolme, Sophie Da Nascimento, Pierre Laumaillé, Anne Bouchut, Nadine Azas, Jean-Louis Mergny, Catherine Mullié, Pascal Sonnet & Bertrand Courtioux (2020) Design, synthesis, and antiprotozoal evaluation of new 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinoline, 1,3-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]isoquinoline and 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinazoline derivatives, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 35:1, 432-459, DOI: 10.1080/14756366.2019.1706502

To link to this article: https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1706502

© 2020 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

View supplementary material

Published online: 03 Jan 2020.

Submit your article to this journal

View related articles

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ienz20

JOURNAL OF ENZYME INHIBITION AND MEDICINAL CHEMISTRY
2020, VOL. 35, NO. 1, 432–459
https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1706502

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS Check for updates

Design, synthesis, and antiprotozoal evaluation of new 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinoline, 1,3-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl] isoquinoline and 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinazoline derivatives

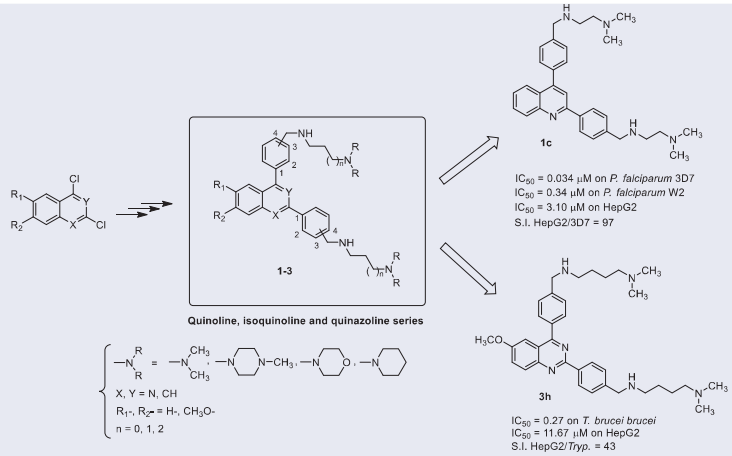
Jean Guillon[a], Anita Cohen[b], Clotilde Boudot[c], Alessandra Valle[a], Vittoria Milano[a], Rabindra Nath Das[a], Aurore Guédin[a], Stéphane Moreau[a], Luisa Ronga[d], Solène Savrimoutou[a], Maxime Demourgues[a], Elodie Reviriego[a], Sandra Rubio[a], Sandie Ferriez[a], Patrice Agnamey[e], Cécile Pauc[e], Serge Moukha[f], Pascale Dozolme[f], Sophie Da Nascimento[e], Pierre Laumaillé[e], Anne Bouchut[e], Nadine Azas[b], Jean-Louis Mergny[a,g,h], Catherine Mullié[e], Pascal Sonnet[e] and Bertrand Courtioux[c]

[a]INSERM U1212, UMR CNRS 5320, ARNA Laboratory, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université de Bordeaux, Bordeaux, France; [b]IRD, AP-HM, SSA, VITROME, Aix-Marseille University, Marseille, France; [c]INSERM U1094, Tropical Neuroepidemiology, Institute of Neuroepidemiology and Tropical Neurology, Université de Limoges, Limoges, France; [d]PREM UMR5254 – UPPA/CNRS, Technopole Hélioparc, Université de Pau, Pau, France; [e]UFR de Pharmacie, AGIR (Agents Infectieux, Résistance et chimiothérapie), Université de Picardie Jules Verne, Amiens,France; [f]Université de Bordeaux, Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée - INRA, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Bordeaux, France; [g]Institut Curie, Université Paris-Saclay, CNRS-UMR 9187, INSERM U1196, Université Paris-Saclay, Orsay, France; [h]Institute of Biophysics of the CAS, Brno, Czech Republic

ABSTRACT

A series of new 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinoline, 1,3-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]isoquinoline, and 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinazoline derivatives was designed, synthesised, and evaluated *in vitro* against three protozoan parasites (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, and *Trypanosoma brucei brucei*). Biological results showed antiprotozoal activity with IC_{50} values in the μM range. In addition, the *in vitro* cytotoxicity of these original molecules was assessed with human HepG2 cells. The quinoline **1c** was identified as the most potent antimalarial candidate with a ratio of cytotoxic to antiparasitic activities of 97 against the *P. falciparum* CQ-sensitive strain 3D7. The quinazoline **3h** was also identified as the most potent trypanosomal candidate with a selectivity index (SI) of 43 on *T. brucei brucei* strain. Moreover, as the telomeres of the parasites *P. falciparum* and *Trypanosoma* are possible targets of this kind of nitrogen heterocyclic compounds, we have also investigated stabilisation of the *Plasmodium* and *Trypanosoma* telomeric G-quadruplexes by our best compounds through FRET melting assays.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE HISTORY

Received 4 October 2019
Revised 4 December 2019
Accepted 14 December 2019

KEYWORDS

Antimalarial activity; quinoline-like derivatives; antitrypanosomal activity; antileishmanial activity; G-quadruplex

CONTACT Jean Guillon jean.guillon@u-bordeaux.fr INSERM U1212, UMR CNRS 5320, ARNA Laboratory, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université de Bordeaux, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France

Supplemental data for this article is available online at here.

© 2020 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

According to WHO, malaria remains a major public health problem, all the more worrying nowadays as epidemiological data show that no significant progress in reducing malaria cases was registered for the period 2015–2017. Indeed, in 2017, an estimated 219 million cases of malaria occurred worldwide compared with 239 million cases in 2010 and 217 million cases in 2015[1]. Fortunately, progress in reducing mortality from malaria occurs, since in 2017, indeed 435 000 estimated deaths were globally recorded from malaria, compared with 451,000 estimated deaths in 2016 and 607,000 in 2010[1]. In this context, even if artemisinin and artemisinin-based combination therapies (ACTs) represent the most effective antimalarial drugs, a resistance of *Plasmodium falciparum* to artemisinin has been first observed on the Cambodia–Thailand border in 2009[2,3], then spread in the Greater Mekong Subregion[1]. Recent studies have demonstrated that the mechanisms of resistance developed by the parasite against artemisinin affect only one stage of the malaria parasite cycle in humans, the ring stage, resulting in a "partial resistance," that includes information on the genotype, since in 2013, the identification of the *Pf*Kelch13 (K13) mutations has been defined to be associated with reduced susceptibility to artemisinin[4,5]. ACTs composed of artemisinin or its derivatives and various partner drugs (mefloquine (MQ), lumefantrine, amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine, or piperaquine) are then recommended for 3 d[6]. These ACTs are also recommended as the first-line treatment for uncomplicated malaria, caused by all *Plasmodium* species, except for the first trimester of pregnancy.

The increase in global drug resistance in the malaria-endemic areas has significantly reduced the potency of most current used antimalarial compounds. In order to solve this problem, the development of new antimalarial drug candidates with novel potential mechanisms of action is urgently needed[7–10]. Efforts to discover new 4-aminoquinoline derivatives are ongoing. In fact, it is unlikely that the parasite will be able to evolve resistance to drugs targeting the pathway involved in haemoglobin degradation. Previous studies have shown that modification and modulation of the lateral side chain of chloroquine (CQ) that led to original aminoquinoline compounds avoid the CQ resistance mechanism[11–14].

Another strategy is the design and the synthesis of new quinoline-based drugs that could not be recognised by the protein system involved in the drug efflux. By following this strategy, two original series of bisquinoline and bisacridine antiplasmodium drugs were designed and prepared (Figure 1(A,B))[15–18]. These new derivatives had much lower resistance indices than CQ, indicating that these original heterocyclic pharmacophores are less efficiently excluded by drug-resistant parasites. Recently, high throughput screens (HTS) followed by the design and synthesis of new structures revealed several analogues possessing the 2-anilino quinazoline scaffold, such as the disubstituted quinazolines **C-D**, **BIX-01294,** and **TM2-115** (Figure 1). In addition, the quinoline-4-carboxamide series was also identified from a screen against the *P. falciparum* 3D7 strain leading to the discovery of quinolines **E** and **DDD107498** (Figure 1)[19–23].

Among other vector-borne parasitic diseases, those caused by parasites of the *Trypanosomatidae* family are also public health problems. Indeed, leishmaniases, caused by parasites of the *Leishmania* genus which are transmitted by the bite of infected female phlebotomine sandflies, are among the most neglected parasitic diseases in the world. An estimated 0.7–1 million new cases of leishmaniases per year are reported from nearly 100 endemic countries[24]. There are three main clinical forms of leishmaniases: cutaneous (the most common), mucocutaneous and visceral, also known as kala-azar and the most serious form of the disease since this is fatal if left untreated in over 95% of cases. Humans are the main reservoir for visceral leishmaniasis (VL) due to *Leishmania donovani*. Nevertheless, *Leishmania infantum* may also cause VL, but the domestic dog is the primary reservoir of this *Leishmania* species, although other mammalian reservoirs exist and sporadic non-vector transmission routes such as direct transmission between drug users co-infected with HIV through sharing needles[25]. VL is mainly characterised by irregular fever, enlargement of the spleen and liver, and anaemia. Most cases occur in Brazil, East Africa, and South-East Asia. An estimated 50,000–90,000 new cases of VL occur worldwide each year, less than half of which are reported to WHO[2]. In 2017, more than 95% of new cases reported to WHO occurred in only 10 countries: Bangladesh, Brazil, China, Ethiopia, India, Kenya, Nepal, Somalia, South Sudan, and Sudan. A limited number of drugs (meglumine antimoniate, sodium stibogluconate, pentamidine, amphotericin B, and miltefosine), all of which have high toxicities, resistances, and costs[24,26,27], can be used to treat leishmaniases, and although efforts have been made by WHO, non-governmental organisations, and manufacturers to improve access to medicines, leishmaniases persist as poverty-related diseases.

Furthermore, another neglected disease caused by *Trypanosomatidae* parasites of the *Trypanosoma* genus is the human African trypanosomiasis (HAT), or sleeping sickness, almost invariably fatal unless treated. This infection is transmitted to humans through the bite of an infected tsetse fly. Brain involvement causes various neurological disturbances, including sleep disorders, progression to coma and, ultimately, death. There are two clinical forms: the slowly progressing form (gambiense HAT), caused by infection with *Trypanosoma brucei gambiense* (currently 98% of cases), and the faster progressing form (rhodesiense HAT), caused by infection with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. As a neglected tropical disease targeted by the WHO for elimination, a historically low number of cases (<1000) was reported in 2018. The recent approval of a new medicine (fexinidazole) for the treatment of gambiense HAT has opened new possibilities for the management of cases and thus led to recent WHO interim guidelines for this treatment[27]. A veterinary form of this parasitic disease exists. Named Nagana, it is caused by *Trypanosoma brucei brucei* which contaminates African livestock, thus having a significant economic impact.

In the course of our work devoted to discovery of new heterocyclic compounds for use in antiprotozoal chemotherapy[28–34], we previously prepared a series of substituted 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline derivatives (Figure 1) designed as antimalarial candidates that could bind to *P. falciparum* DNA G-quadruplexes[35]. By taking into account our experience in the field of the synthesis of new antiprotozoal heterocyclic compounds, we describe here the design and synthesis of new 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinoline, 1,3-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]isoquinoline and 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinazoline derivatives **1–3** (Figure 1) that could be considered as new bioisoster analogues of our previously described phenanthroline compounds. We report on their *in vitro* antiplasmodial activity against the CQ -sensitive (3D7) and the CQ -resistant (W2) strains of the malaria parasite *P. falciparum*. As aza heterocyclic scaffolds are the fundamental units of many antiprotozoal candidates, these quinoline-like derivatives were also tested for *in vitro* efficacy against medically important protozoans *L. donovani* and *T. brucei brucei*.

In addition, the *in vitro* cytotoxicity of our new bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinoline-like derivatives was assessed in

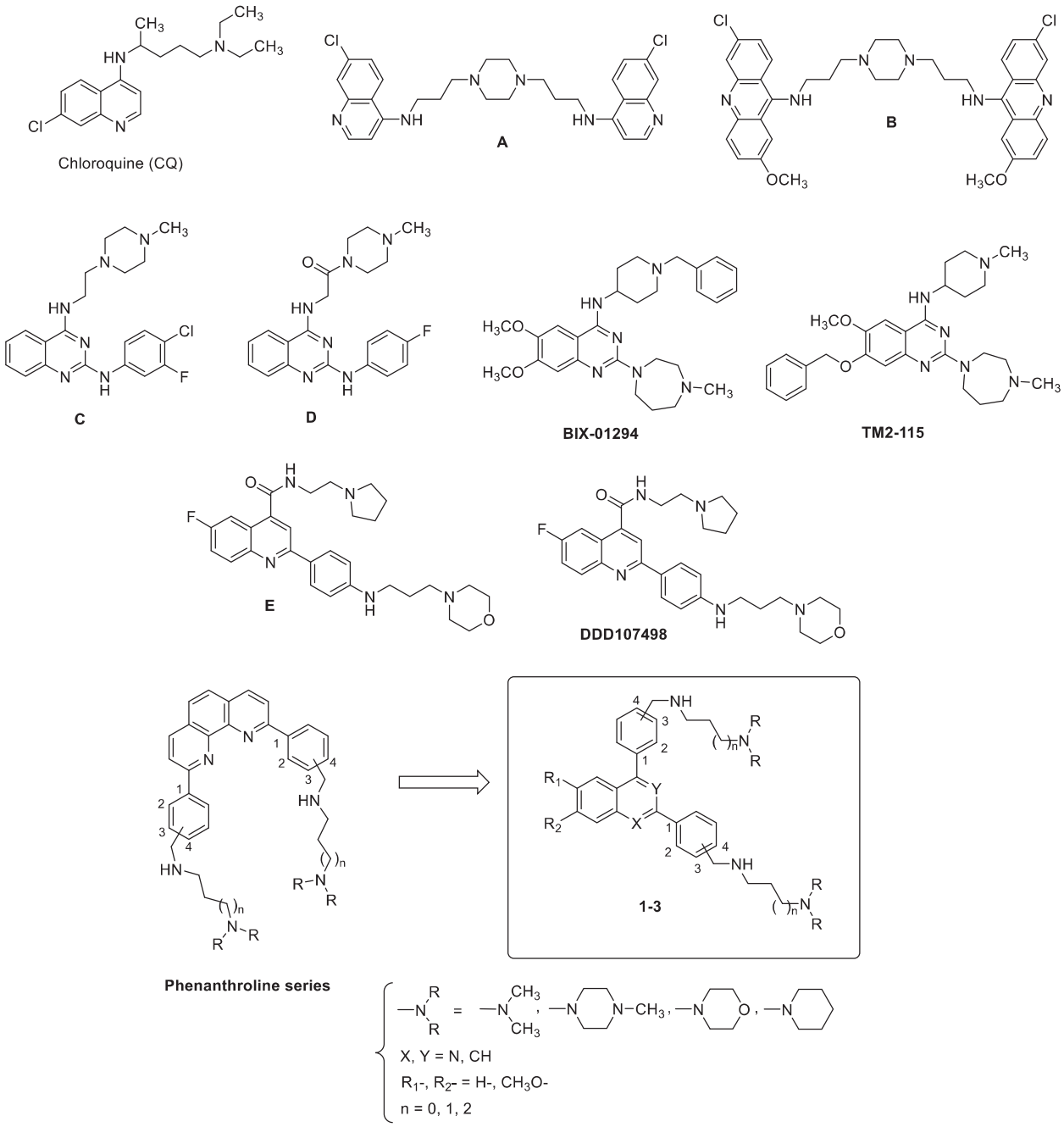


Figure 1. The structures of chloroquine (CQ), bisquinoline A, bisacridine B, 2-anilino-4-amino- quinazolines C, D, diamino-quinazolines BIX-01294 and TM2-115, and quinolines E and DDD107498, and newly synthesised 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinoline, 1,3-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]isoquinoline and 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinazoline derivatives **1–3**.

human HepG2 cells, and an index of selectivity, the ratio of cytotoxic to antiparasitic activity, was determined for each derivative. The telomeres of the different protozoa could constitute attractive drug targets[36–39] and telomerase activity is detected in gametocytes and during the transition to the erythrocytic stage of *P. falciparum*[40]. The telomeric 3′G-overhang region of *P. falciparum* is a repetition of degenerate unit 5′-GGGTTYA-3′ (where Y could be T or C)[41] which can fold into intramolecular G-quadruplex[42]. This difference between parasitic and human (5′-GGGTTA-3′) G-quadruplexes is also observed with *L.* spp and *T. brucei brucei*, which augurs the possibility of developing antiparasitic ligands targeting G-quadruplexes found in these protozoal species. Thus, we investigated whether these derivatives could stabilise some parasitic telomeric DNA G-quadruplex structures. Consequently, potential stabilisation of *P. falciparum* and *T. brucei brucei* telomeric G-quadruplexes was evaluated using a FRET melting assay.

Experimental

Chemistry

The received commercial reagents were used without additional purification. Melting points were determined with a SM-LUX-POL Leitz hot-stage microscope and are uncorrected. IR spectra were recorded on a NICOLET 380FT-IR spectrophotometer. NMR spectra were recorded with tetramethylsilane as an internal standard

using a BRUKER AVANCE 300 spectrometer. Splitting patterns have been designated as follows: s = singlet; bs = broad singlet; d = doublet; t = triplet; q = quartette; qt = quintuplet, dd = double doublet; ddd = double double doublet; and m = multiplet. Analytical TLC was carried out on 0.25 precoated silica gel plates (POLYGRAM SIL G/UV254) and visualisation of compounds after UV light irradiation. Silica gel 60 (70–230 mesh) was used for column chromatography. Microwave experiments were carried out at atmospheric pressure using a focussed microwave reactor (CEM Discover). High-resolution mass spectra (electrospray in positive mode, ESI + or MALDI-TOF MS) were recorded on a Waters Q-TOF Ultima apparatus. Elemental analyses were found within ±0.4% of the theoretical values.

General procedure for 2,4-bis(4-formylphenyl)quinolines (4a–d), 1,3-bis(4-formylphenyl)isoquinolines(5a–c) and 2,4-bis(4-formylphenyl) quinazolines (6a–d)

To a solution of 4.37 mmol of the appropriate 2,4-dichloroquinoline, or 1,3-dichloroisoquinoline or 2,4-dichloroquinazoline, 1.44 g of 3- or 4-formylphenyl boronic acid (9.63 mmol, 2.2 eq.) and 506 mg (0.437 mmol, 0.1 eq.) of tetrakis(triphenylphosphine) palladium in 45 ml of 1,2-dimethoxyethane, 5 ml of 2 M K_2CO_3 aqueous solution, previously degassed for 10 min with nitrogen, were added at room temperature. Then, the mixture was warmed to reflux and stirred for 24 h under nitrogen positive pressure. The reaction mixture was cooled down to room temperature and the solvent was evaporated under vacuum. The organic layer was extracted with CH_2Cl_2 and the organic phase was filtered on filter paper, then washed with water (20 ml× 3 times), dried over anhydrous sodium sulphate and activated charcoal, filtered, and evaporated under vacuum. The residue was cooled and triturated with a minimum of EtOH and EtO_2 and filtered on sintered glassware to give the crude product. The residue was purified by silica gel column chromatography (CH_2Cl_2/CH_3OH 95:5), then cooled and triturated again in EtOH, filtered on sintered glassware, washed with a minimum of EtOH, EtO_2 and petroleum ether and dried under pressure to give the solid product.

2,4-bis(4-Formylphenyl)quinoline (4a)

White crystals (60%); Mp = 186 °C; IR ν_{max} (KBr)/cm^{-1} 1695 (C=O);^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 10.19 (s, 1H, CHO), 10.14 (s, 1H, CHO), 8.41 (d, 2H, J= 9.00 Hz, H-3″ and H-5″), 8.33 (dd, 1H, J= 9.00 and 1.60 Hz, H-8), 8.12 (d, 2H, J= 9.00 Hz, H-3′ and H-5′), 8.08 (d, 2H, J= 9.00 Hz, H-2″ and H-6″), 7.90 (s, 1H, H-3), 7.87(dd, 1H, J= 9.00 and 1.60 Hz, H-5), 7.83 (ddd, J= 9.00, 7.20 and 1.60 Hz, H-7), 7.77 (d, 2H, J= 9.00 Hz, H-2′ and H-6′), 7.59 (ddd, 1H, J= 9.00, 7.20 and 1.60 Hz, H-6); HRMS-ESI m/z $[M+H]^+$ Calcd for $C_{23}H_{16}NO_2$: 338.1181, Found: 338.1182.

6-Methoxy-2,4-bis(4-formylphenyl)quinoline (4b)

Pale yellow crystals (44.1%); Mp = 212 °C; Rf = 0.84; IR ν_{max} (KBr)/cm^{-1} 1695 (C=O);^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 10.18 (s, 1H, CHO), 10.12 (s, 1H, CHO), 8.38 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-3″ and H-5″), 8.20 (d, 1H, J= 9.30 Hz, H-8), 8.12 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-3′ and H-5′), 8.00 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-2″ and H-6″), 7.84 (s, 1H, H-3), 7.79 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-2′ and H-6′), 7.47 (dd, 1H, J= 9.30 and 2.70 Hz, H-7), 7.10 (d, 1H, J= 2.70 Hz, H-5), 3.83 (s, 3H, CH_3O); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 193.4 (CHO), 193.1 (CHO), 160.0 (C-6), 154.2 (C-2), 148.2 (C-4), 148.0 (C-8a), 146.3 (C-4′), 146.0 (C-4″), 137.8 (C-1′), 137.6 (C-1″), 133.4 (C-8), 131.5 (C-3′ and C-5′, C-3″ and C-5″, C-2′ and C-6′), 129.2 (C-2″ and C-6″), 127.9 (C-4a), 124.1 (C-7), 120.8 (C-3), 104.4 (C-5), 56.9 (CH_3O); HRMS-ESI m/z $[M+H]^+$ Calcd for $C_{24}H_{18}NO_3$: 368.1287, Found: 368.1289.

7-Methoxy-2,4-bis(4-formylphenyl)quinoline (4c)

Pale yellow crystals (71.4%); Mp = 179 °C; Rf = 0.83; IR ν_{max} (KBr)/cm^{-1} 1696 (C=O); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 10.18 (s, 1H, CHO), 10.14 (s, 1H, CHO), 8.39 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-3″ and H-5″), 8.11 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-3′ and H-5′), 8.07 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-2″ and H-6″), 7.77 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-2′ and H-6′), 7.76 (s, 1H, H-3), 7.75 (d, 1H, J= 9.30 Hz, H-5), 7.63 (d, 1H, J= 2.60 Hz, H-8), 7.23 (dd, 1H, J= 9.30 and 2.60 Hz, H-6), 4.04 (s, 3H, CH_3O); HRMS-ESI m/z $[M+H]^+$ Calcd for $C_{24}H_{18}NO_3$: 368.1287, Found: 368.1287.

2,4-bis(3-Formylphenyl)quinoline (4d)

White crystals (66%); Mp = 150 °C; IR ν_{max} (KBr)/cm^{-1}1694 (C=O); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 10.19 (s, 1H, CHO), 10.18 (s, 1H, CHO), 8.74 (dd, 1H, J= 1.50 and 1.50 Hz, H-2′), 8.57 (ddd, 1H, J= 7.80, 1.50 and 1.50 Hz, H-6′), 8.33 (dd, 1H, J= 8.70 and 1.20 Hz, H-8), 8.13 (dd, 1H, J= 1.50 and 1.50 Hz, H-2″), 8.09 (ddd, 1H, J= 7.80, 1.50 and 1.50 Hz, H-4′), 8.03 (ddd, 1H, J= 7.80, 1.50 and 1.50 Hz, H-4″), 7.93 (s, 1H, H-3), 7.91–785 (m, 2H, H-5 and H-6″), 7.83 (ddd, 1H, J= 8.70, 7.20 and 1.20 Hz, H-7), 7.81 (t, 1H, J= 7.80 Hz, H-5′), 7.75 (t, 1H, J= 7.80 Hz, H-5″), 7.58 (ddd, 1H, J= 8.70, 7.20 and 1.20 Hz, H-6); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 193.5 (C=O), 193.1 (C=O), 156.5 (C-2), 150.0 (C-4), 149.5 (C-8a), 141.5 (C-1″), 140.5 (C-3′), 138.3 (C-3″), 138.2 (C-1′), 136.7 (C-6′), 134.7 (C-6″), 131.9 (C-2′ and C-4″), 131.7 (C-2″), 131.5 (C-4′), 131.3 (C-7), 131.0 (C-5″), 130.9 (C-5′), 130.1 (C-8), 128.6 (C-5), 127.0 (C-4a), 126.5 (C-6), 120.3 (C-3); HRMS-ESI m/z $[M+H]^+$ Calcd for $C_{23}H_{16}NO_2$: 338.1181, Found: 338.1182.

1,3-bis(4-Formylphenyl)isoquinoline (5a)

Beige crystals (72%); Mp = 194 °C; IR ν_{max} (KBr)/cm^{-1} 1695 (C=O); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 10.20 (s, 1H, CHO), 10.12 (s, 1H, CHO), 8.41 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.26 (s, 1H, H-4), 8.14–8.09 (m, 3H, H-8, H-3′ and H-5′), 8.06–8.00 (m, 5H, H-2″, H-6″, H-2′, H-6′ and H-5), 7.79 (ddd, 1H, J= 7.10, 6.90 and 1.50 Hz, H-6), 7.63 (ddd, 1H, J= 7.10, 6.90 and 1.50 Hz, H-7); HRMS-ESI m/z $[M+H]^+$ Calcd for $C_{23}H_{16}NO_2$: 338.1181, Found: 338.1183.

7-Methoxy-1,3-bis(4-formylphenyl)isoquinoline (5b)

Pale-yellow crystals (57%); Mp = 190 °C; IR ν_{max} (KBr)/cm^{-1} 1692 (C=O); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 10.19 (s, 1H, CHO), 10.10 (s, 1H, CHO), 8.38 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2″ and H-6″), 8.19 (s, 1H, H-4), 8.13 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 8.04 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.02 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.94 (d, 1H, J= 9.00 Hz, H-5), 7.44 (dd, 1H, J= 9.00 and 2.40 Hz, H-6), 7.36 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-8), 3.87 (s, 3H, CH_3O); HRMS-ESI m/z $[M+H]^+$ Calcd for $C_{24}H_{18}NO_3$: 368.1287, Found: 368.1286.

6-Methoxy-1,3-bis(4-formylphenyl)isoquinoline (5c)

White crystals (76%); Mp = 191 °C; IR ν_{max} (KBr)/cm^{-1} 1695 (C=O); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 10.20 (s, 1H, CHO), 10.10 (s, 1H, CHO), 8.37 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2″ and H-6″), 8.12 (d, 1H, J= 9.00 Hz, H-8), 8.10 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 8.02 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.00 (s, 1H, H-4), 7.97 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.26 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-5), 7.23 (dd, 1H, J= 9.00 and

2.40 Hz, H-7), 4.02 (s, 3H, CH_3O); HRMS-ESI *m/z* $[M+H]^+$ Calcd for $C_{24}H_{18}NO_3$: 368.1287, Found: 368.1293.

2,4-bis(4-Formylphenyl)quinazoline (6a)

White crystals (53%); Mp = 194 °C; IR ν_{max} (KBr)/cm^{-1} 1698 (C=O); ^1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 10.22 (s, 1H, CHO), 10.16 (s, 1H, CHO), 8.89 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.25 (dd, 1H, *J*= 8.40 and 1.35 Hz, H-8), 8.17 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 8.14 (dd, 1H, *J*= 8.40 and 1.35 Hz, H-5), 8.10–8.06 (m, 4H, H-2″, H-6″, H-2′ and H-6′),8.00 (ddd, 1H, *J*= 8.40, 7.05 and 1.35 Hz, H-7), 7.67 (ddd, 1H, *J*= 8.40, 7.05 and 1.35 Hz, H-6); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 193.6 (C=O), 193.2 (C=O), 168.6 (C-2), 160.3 (C-4), 153.3 (C-8a), 144.7 (C-1″), 144.4 (C-1′), 139.0 (C-4″), 138.5 (C-4′), 135.6 (C-7), 132.2 (C-3″ and C-5″), 131.3 (C-2″, C-6″, C-3′ and C-5′), 131.0 (C-8), 130.5 (C-2′ and C-6′), 129.6 (C-5), 127.8 (C-6), 123.1 (C-4a); HRMS-ESI *m/z* $[M+H]^+$ Calcd for $C_{22}H_{15}N_2O_2$: 339.1134, Found: 339.1126.

6-Methoxy-2,4-bis(4-formylphenyl)quinazoline (6b)

Pale yellow crystals (32%); Mp = 220 °C; Rf = 0.81; IR ν_{max} (KBr)/cm^{-1} 1697 (C=O); ^1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 10.21 (s, 1H, CHO), 10.13 (s, 1H, CHO), 8.83 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.18–8.10 (m, 7H, H-8, H-3′ and H-5′, H-2″ and H-6″, H-2′ and H-6′), 7.63 (dd, 1H, *J*= 9.20 and 2.90 Hz, H-7), 7.31 (d, 1H, *J*= 2.90 Hz, H-5), 3.89 (s, 3H, CH_3O); HRMS-ESI *m/z* $[M+H]^+$ Calcd for $C_{23}H_{17}N_2O_3$: 369.1239, Found: 369.1236.

7-Methoxy-2,4-bis(4-formylphenyl)quinazoline (6c)

Yellow crystals (73%); Mp = 238 °C; Rf = 0.78; IR ν_{max} (KBr)/cm^{-1} 1697 (C=O); ^1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 10.20 (s, 1H, CHO), 10.15 (s, 1H, CHO), 8.85 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-2″ and H-6″), 8.14 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 8.06 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.04 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.96 (d, 1H, *J*= 9.30 Hz, H-5), 7.51 (d, 1H, *J*= 2.55 Hz, H-8), 7.26 (d, 1H, *J*= 9.30 and 2.55 Hz, H-6), 4.07 (s, 3H, CH_3O); HRMS-ESI *m/z* $[M+H]^+$ Calcd for $C_{23}H_{17}N_2O_3$: 369.1239, Found: 369.1231.

2,4-bis(3-Formylphenyl)quinazoline (6d)

White crystals (54%); Mp = 174 °C; IR ν_{max} (KBr)/cm^{-1} 1697 (C=O); ^1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 10.21 (s, 1H, CHO), 10.20 (s, 1H, CHO), 9.20 (dd, 1H, *J*= 1.35 and 1.35 Hz, H-2′), 8.99 (ddd, 1H, *J*= 7.70, 1.35 and 1.35 Hz, H-6′), 8.42 (dd, 1H, *J*= 1.35 and 1.35 Hz, H-2″), 8.24–8.18 (m, 2H, H-8 and H-6″), 8.15 (ddd, 1H, *J*= 7.70, 1.35 and 1.35 Hz, H-4′), 8.17–8.07 (m, 1H, H-5), 8.05 (ddd, 1H, *J*= 7.70, 1.35 and 1.35 Hz, H-4″), 7.98 (ddd, 1H, *J*= 8.30, 7.20 and 1.50 Hz, H-7), 7.83 (dd, 1H, *J*= 7.70 and 7.70 Hz, H-5″), 7.72 (dd, 1H, *J*= 7.70 and 7.70 Hz, H-5′), 7.65 (ddd, 1H, *J*= 8.30, 7.20 and 1.50 Hz, H-6); HRMS-ESI *m/z* $[M+H]^+$ Calcd for $C_{22}H_{15}N_2O_2$: 339.1134, Found: 339.1128.

General procedure for 2,4-bis[(substituted-iminomethyl)phenyl] quinolines (7a-t), 1,3-bis[(substituted-iminomethyl)phenyl] isoquinolines (8a–l), and 2,4-bis[(substituted-iminomethyl) phenyl]quinazolines (9a–v)

To a solution of diamine (0.126 mmol, 2.1 eq.) in ethanol (7 ml) was added 2,4-bis(4-formylphenyl)quinoline **4** or 1,3-bis(4-formylphenyl)isoquinoline **5** or 2,4-bis(4-diformylphenyl)quinazoline **6**(0.6 mmol). The reaction mixture was then heated under reflux for 5 h, and then evaporated to dryness under reduced pressure. After cooling, the residue was extracted with dichloromethane (40 ml). The organic layer was dried over sodium sulphate and activated charcoal and evaporated to dryness. Products were then used without further purification.

2,4-Bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7a)

Yellow oil (97%); ^1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.36 (s, 1H, CH=N), 8.32 (s, 1H, CH=N), 8.23 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.21 (dd, 1H, *J*= 8.50 and 1.35 Hz, H-8), 7.87 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.86 (s, 1H, H-3), 7.82 (dd, 1H, *J*= 8.50 and 1.35 Hz, H-5), 7.81 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-2″ and H-6″), 7.72 (ddd,1H, *J*= 8.50, 7.00 and 1.35 Hz, H-7), 7.57 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-2′ and H-6″), 7.45 (ddd, 1H, *J*= 8.50, 7.00 and 1.35 Hz, H-6), 3.67 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 3.64 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 2.34–2.26 (m. 4H, $2NCH_2$), 2.21 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.20 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.80–1.68 (m, 4H, $2CH_2$), 1.61–1.52 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7b)

Yellow oil (98%); ^1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.42 (s, 1H, CH=N), 8.38 (s, 1H, CH=N), 8.28 (d, 2H, *J*= 9.00 Hz, H-3″ and H-5″), 8.26 (dd, 1H, *J*= 8.90 and 1.50 Hz, H-8), 7.94 (d, 2H, *J*= 9.00 Hz, H-3′ and H-5′), 7.89 (dd, 1H, *J*= 8.90 and 1.50 Hz, H-5), 7.88 (d, 2H, *J*= 9.00 Hz, H-2″ and H-6″), 7.85 (s, 1H, H-3), 7.76 (ddd,1H, *J*= 8.90, 7.20 and 1.50 Hz, H-7), 7.62 (d, 2H, *J*= 9.00 Hz, H-2′ and H-6′), 7.50 (ddd, 1H, *J*= 8.90, 7.20 and 1.50 Hz, H-6), 3.73 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 3.69 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 2.46–2.40 (m. 4H, $2NCH_2$), 2.30 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.29 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.00–1.89 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{4-[(2-dimethylaminoethyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7c)

Yellow oil (98%); ^1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.43 (s, 1H, CH=N), 8.40 (s, 1H, CH=N), 8.27 (d, 2H, *J*= 9.00 Hz, H-3″ and H-5″), 8.24 (dd, 1H, *J*= 8.90 and 1.50 Hz, H-8), 7.92 (d, 2H, *J*= 9.00 Hz, H-3′ and H-5′), 7.89 (d, 2H, *J*= 9.00 Hz, H-2″ and H-6″),7.86 (dd, 1H, *J*= 8.90 and 1.50 Hz, H-5), 7.84 (s, 1H, H-3), 7.75 (ddd,1H, *J*= 8.90, 7.20 and 1.50 Hz, H-7), 7.61 (d, 2H, *J*= 9.00 Hz, H-2′ and H-6′), 7.49 (ddd, 1H, *J*= 8.90, 7.20 and 1.50 Hz, H-6), 3.82 (t, 2H, *J*= 7.00 Hz, NCH_2), 3.80 (t, 2H, *J*= 7.00 Hz, NCH_2), 2.71 (t, 2H, *J*= 7.00 Hz, NCH_2), 2.69 (t, 2H, *J*= 7.00 Hz, NCH_2), 2.36 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.35 (s, 6H, $N(CH_3)_2$).

2,4-Bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7d)

Yellow oil (97%); ^1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.39 (s, 1H, CH=N), 8.35 (s, 1H, CH=N), 8.27–8.23 (m, 3H, H-3″, H-5″ and H-8), 7.90 (d, 2H, *J*= 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.88 (dd, 1H, *J*= 8.10 and 1.20 Hz, H-5), 7.87 (d, 2H, *J*= 8.10 Hz, H-2″ and H-6″), 7.85 (s, 1H, H-3), 7.75 (ddd,1H, *J*= 8.10, 6.90 and 1.20 Hz, H-7), 7.61 (d, 2H, *J*= 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 7.49 (ddd, 1H, *J*= 8.10, 6.90 and 1.20 Hz, H-6), 3.69 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 3.67 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 2.74–2.35 (m. 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$pip.), 2.29 (s, 3H, NCH_3), 2.28 (s, 3H, NCH_3), 1.79–1.74 (m, 4H, $2CH_2$), 1.62–1.58 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7e)

Yellow oil (98%); ^1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.41 (s, 1H, CH=N), 8.37 (s, 1H, CH=N), 8.27 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.25 (dd, 1H, *J*= 8.40 and 1.50 Hz, H-8), 7.91 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.88 (dd, 1H, *J*= 8.40 and 1.50 Hz, H-5), 7.87 (d, 2H,

J= 8.40 Hz, H-2″ and H-6″), 7.85 (s, 1H, H-3), 7.76 (ddd,1H, J= 8.40, 6.90 and 1.50 Hz, H-7), 7.63 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 7.50 (ddd, 1H, J= 8.40, 6.90 and 1.50 Hz, H-6), 3.72 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 3.70 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.65–2.46 (m. 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$pip.), 2.32 (s, 3H, NCH_3), 2.31 (s, 3H, NCH_3), 2.00–1.92 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{4-[(2–(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7f)

Yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.40 (s, 1H, CH=N), 8.36 (s, 1H, CH=N), 8.25 (d, 2H, J= 9.00 Hz, H-3″ and H-5″), 8.23 (dd, 1H, J= 8.50 and 1.40 Hz, H-8), 7.89 (d, 2H, J= 9.00 Hz, H-3′ and H-5′), 7.86 (d, 2H, J= 9.00 Hz, H-2″ and H-6″), 7.85 (dd, 1H, J= 8.50 and 1.40 Hz, H-5), 7.83 (s, 1H, H-3), 7.74 (ddd,1H, J= 8.50, 6.90 and 1.20 Hz, H-7), 7.60 (d, 2H, J= 9.00 Hz, H-2′ and H-6′), 7.48 (ddd, 1H, J= 8.50, 6.90 and 1.20 Hz, H-6), 3.85–3.66 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.83–2.72 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.62–2.42 (m. 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$pip.), 2.29 (s, 3H, NCH_3), 2.28 (s, 3H, NCH_3).

2,4-Bis{4-[(3-morpholinopropyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7g)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.43 (s, 1H, CH=N), 8.39 (s, 1H, CH=N), 8.28 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.26 (dd, 1H, J= 8.00 and 1.50 Hz, H-8), 7.93 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.90 (dd, 1H, J= 8.00 and 1.50 Hz, H-5), 7.88 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2″ and H-6″), 7.86 (s, 1H, H-3), 7.77 (ddd,1H, J= 8.00, 7.20 and 1.50 Hz, H-7), 7.64 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 7.51 (ddd, 1H, J= 8.00, 7.20 and 1.50 Hz, H-6), 3.78–3.69 (m, 12H, $2NCH_2$ and 4 OCH_2), 2.52–2.45 (m, 12H, $6NCH_2$), 2.02–1.90 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{4-[(2-morpholinoethyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7h)

Orange oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.43 (s, 1H, CH=N), 8.39 (s, 1H, CH=N), 8.27 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.25 (dd, 1H, J= 8.70 and 1.50 Hz, H-8), 7.93 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.90 (dd, 1H, J= 8.70 and 1.50 Hz, H-5), 7.88 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2″ and H-6″), 7.86 (s, 1H, H-3), 7.77 (ddd,1H, J= 8.70, 7.10 and 1.50 Hz, H-7), 7.63 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 7.51 (ddd, 1H, J= 8.70, 7.10 and 1.50 Hz, H-6), 3.86 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 3.83 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 3.78 (m, 8H, 4 OCH_2), 2.80–2.73 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.62–2.57 (m, 8H, $4NCH_2$).

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7i)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.35 (s, 1H, CH=N), 8.30 (s, 1H, CH=N), 8.19 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3″ and H-5″), 8.10 (d, 1H, J= 9.30 Hz, H-8), 7.87 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.82 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2″ and H-6″), 7.75 (s, 1H, H-3), 7.58 (d, 2H, J = 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 7.35 (dd,1H, J= 9.30 and 2.60 Hz, H-7), 7.10 (m, 1H, H-5), 3.74 (s, 3H, CH_3O), 3.67–3.62 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.33–2,25 (m. 4H, $2NCH_2$), 2.21 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.19 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.76–1.70 (m, 4H, $2CH_2$), 1.56–1.50 (m, 4H, $2CH_2$).

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7j)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.38 (s, 1H, CH=N), 8.32 (s, 1H, CH=N), 8.20 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-3″ and H-5″), 8.11 (d, 1H, J= 9.00 Hz, H-8), 7.89 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-3′ and H-5′), 7.84 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-2″ and H-6″), 7.76 (s, 1H, H-3), 7.60 (d, 2H, J = 8.25 Hz, H-2′and H-6′), 7.36 (dd, 1H, J= 9.00 and 2.70 Hz, H-7), 7.12 (d, 1H, J= 2.70 Hz, H-5), 3.74 (s, 3H, CH_3O) 3.69 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 3.65 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.37 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.35 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.24 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.22 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.95–1.80 (m, 4H, $2CH_2$).

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7k)

Pale yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.31 (s, 1H, CH=N), 8.25 (s, 1H, CH=N), 8.16 (d, 2H, J= 8.50 Hz, H-3″ and H-5″), 8.07 (d, 1H, J= 9.30 Hz, H-8), 7.84 (d, 2H, J= 8.50 Hz, H-3′ and H-5′), 7.78 (d, 2H, J= 8.50 Hz, H-2″ and H-6″), 7.72 (s, 1H, H-3), 7.55 (d, 2H, J= 8.50 Hz, H-2′ and H-6′), 7.32 (dd,1H, J= 9.30 and 2.80 Hz, H-7), 7.07 (d, 1H, J= 2.80 Hz, H-5), 3.70 (s, 3H, CH_3O), 3.62 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 3.58 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.50–2.29 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$ pip), 2.21 (s, 3H, NCH_3), 2.20 (s, 3H, NCH_3), 1.75–1.63 (m, 4H, $2CH_2$), 1.59–1.46 (m, 4H, $2CH_2$).

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7l)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.35 (s, 1H, CH=N), 8.30 (s, 1H, CH=N), 8.18 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3″ and H-5″), 8.09 (d, 1H, J= 9.30 Hz, H-8), 7.86 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.81 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2″ and H-6″), 7.74 (s, 1H, H-3), 7.58 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 7.34 (dd,1H, J= 9.30 and 2.60 Hz, H-7), 7.09 (d, 1H, J= 2.60 Hz, H-5), 3.73 (s, 3H, CH_3O), 3.67 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 3.63 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.47–2.38 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$ pip), 2.25 (s, 3H, NCH_3), 2.24 (s, 3H, NCH_3), 1.93–1.85 (m, 4H, $2CH_2$).

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7m)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.34 (s, 1H, CH=N), 8.31 (s, 1H, CH=N), 8.20 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-3″ and H-5″), 7.86 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-3′ and H-5′), 7.83 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2″ and H-6″), 7.72 (d, 1H, J= 9.15 Hz, H-5), 7.66 (s, 1H, H-3), 7.55 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2′ and H-6′), 7.53 (d, 1H, J= 2,70 Hz, H-8), 7.09 (dd, 1H, J= 9.15 and 2.70 Hz, H-6), 3.94 (s, 3H, CH_3O) 3.65 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 3.63 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.30 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.39 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.20 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.19 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.78–1.67 (m, 4H, $2CH_2$), 1.60–1.48 (m, 4H, $2CH_2$).

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7n)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.36 (s, 1H, CH=N), 8.33 (s, 1H, CH=N), 8.20 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 7.89–7.83 (m, 4H, H-3′ and H-5′, H-2″ and H-6″), 7.73 (d, 1H, J= 9.30 Hz, H-5), 7.67 (d, 1H, J= 2,10 Hz, H-8), 7.57–7.53 (m, 3H, H-2′ and H-6′, H-3), 7.10 (dd, 1H, J= 9.30 and 2.10 Hz, H-6), 3.95 (s, 3H, CH_3O) 3.68 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 3.65 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.36–2,32 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.23 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.22 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.95–1.80 (m, 4H, $2CH_2$).

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7o)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.32 (s, 1H, CH=N), 8.29 (s, 1H, CH=N), 8.19 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3″and H-5″), 7.84 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.81 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2″and H-6″), 7.71 (d, 1H, J= 9.30 Hz, H-5), 7.65 (s, 1H, H-3), 7.54 (d, 2H,

J= 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 7.52 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-8), 7.09 (dd,1H, J= 9.30 and 2.40 Hz, H-6), 3.94 (s, 3H, CH_3O), 3.62 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 3.61 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.42–2.29 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$ pip), 2.23 (s, 3H, NCH_3), 2.22 (s, 3H, NCH_3), 1.71–1.67 (m, 4H, $2CH_2$), 1.59–1.52 (m, 4H, $2CH_2$).

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7p)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.34 (s, 1H, CH=N), 8.31 (s, 1H, CH=N), 8.19 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-3′′ and H-5′′), 7.85 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-3′ and H-5′), 7.83 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2′′and H-6′′), 7.72 (d, 1H, J= 9.25 Hz, H-5), 7.66 (s, 1H, H-3), 7.55 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2′ and H-6′), 7.53 (d, 1H, J= 2.60 Hz, H-8), 7.10 (dd,1H, J= 9.25 and 2.60 Hz, H-6), 3.95 (s, 3H, CH_3O), 3.67 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 3.64 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.46–2.33 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$ pip), 2.25 (s, 3H, NCH_3), 2.24 (s, 3H, NCH_3), 1.93–1.86 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{3-[(3-dimethylaminopropyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7q)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.53 (dd, 1H, J= 1.50 and 1.50 Hz, H-2′), 8.44 (s, 1H, CH=N), 8.41 (s, 1H, CH=N), 8.31 (ddd, 1H, J= 7.80, 1.50 and 1.50 Hz, H-6′), 8.26 (dd, 1H, J= 8.50 and 1.20 Hz, H-8), 7.94–7.85 (m, 5H, H-2′′, H-4′, H-4′′, H-5 and H-3), 7.76 (ddd,1H, J= 8.50, 7.20 and 1.20 Hz, H-7), 7.65–7.57 (m, 3H, H-5′, H-5′′ and H-6′′), 7.51 (ddd, 1H, J= 8.50, 7.20 and 1.20 Hz, H-6), 3.72 (t, 4H, J= 7.00 Hz, $2NCH_2$), 2.43 (t, 4H, J= 7.00 Hz, $2NCH_2$), 2.29 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.28 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.97–1.89 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{3-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7r)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.48 (dd, 1H, J= 1.50 and 1.50 Hz, H-2′), 8.37 (s, 1H, CH=N), 8.34 (s, 1H, CH=N), 8.26 (ddd, 1H, J= 7.80, 1.50 and 1.50 Hz, H-6′), 8.22 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-8), 7.88–7.78 (m, 5H, H-2′′, H-4′, H-4′′, H-5 and H-3), 7.70 (ddd,1H, J= 8.10, 7.20 and 1.50 Hz, H-7), 7.57–7.50 (m, 3H, H-5′, H-5′′ and H-6′′), 7.44 (ddd, 1H, J= 8.10, 7.20 and 1.50 Hz, H-6), 3.67–3.60 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.56–2.33 (m, 20H, $10NCH_2$), 2.24 (s, 3H, NCH_3), 2.23 (s, 3H, NCH_3), 1.94–1.82 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{3-[(3-morpholinopropyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7s)

Yellow oil (99%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.48 (dd, 1H, J= 1.50 and 1.50 Hz, H-2′), 8.35 (s, 1H, CH=N), 8.32 (s, 1H, CH=N), 8.25 (ddd, 1H, J= 8.10, 1.50 and 1.50 Hz, H-6′), 8.20 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-8), 7.87–7.65 (m, 5H, H-2′′, H-4′, H-4′′, H-5 and H-3), 7.66 (ddd,1H, J= 8.10, 6.90 and 1.50 Hz, H-7), 7.56–7.48 (m, 3H, H-5′, H-5′′ and H-6′′), 7.44 (ddd, 1H, J= 8.10, 6.90 and 1.50 Hz, H-6), 3.67–3.60 (m, 12H, $2NCH_2$ and $4OCH_2$), 2.40–2.35 (m, 12H, $6NCH_2$), 1.91–1.79 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{3-[(2-morpholinoethyl)iminomethyl]phenyl}quinoline (7t)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.48 (dd, 1H, J= 1.50 and 1.50 Hz, H-2′), 8.36 (s, 1H, CH=N), 8.33 (s, 1H, CH=N), 8.25 (ddd, 1H, J= 7.80, 1.50 and 1.50 Hz, H-6′), 8.20 (dd, 1H, J= 8.40 and 1.50 Hz, H-8), 7.88–7.76 (m, 5H, H-2′′, H-4′, H-4′′, H-5 and H-3), 7.68 (ddd,1H, J= 8.40, 6.90 and 1.50 Hz, H-7), 7.56–7.49 (m, 3H, H-5′, H-5′′ and H-6′′), 7.43 (ddd, 1H, J= 8.40, 6.90 and 1.50 Hz, H-6), 3.75 (t, 4H, J= 7.20 Hz, $2NCH_2$), 3.68–3.64 (m, 8H, $4OCH_2$), 2.70–2.64 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.52–2.47 (m, 8H, $4NCH_2$).

1,3-Bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)iminomethyl]phenyl}isoquinoline (8a)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.37 (s, 1H, CH=N), 8.30 (s, 1H, CH=N), 8.25 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′′ and H-5′′), 8.08 (s, 1H, H-4), 8.06 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-8), 7.91–7.87 (m, 3H, H-5, H-3′ and H-5′), 7.85–7.80 (m, 4H, H-2′′, H-6′′, H-2′, and H-6′), 7.64 (ddd, 1H, J= 8.10, 7.20 and 1.20 Hz, H-6), 7.48 (ddd, 1H, J= 8.10, 7.20 and 1.20 Hz, H-7), 3.70–3.62 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.32 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.29 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.22 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.21 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.78–1.68 (m, 4H, $2CH_2$), 1.62–1.52 (m, 4H, $2CH_2$).

1,3-Bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)iminomethyl]phenyl}isoquinoline (8 b)

Yellow oil (99%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.38 (s, 1H, CH=N), 8.31 (s, 1H, CH=N), 8.23 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′′ and H-5′′), 8.10 (s, 1H, H-4), 8.07 (d, 1H, J= 8.00 Hz, H-8), 7.93–7.75 (m, 7H, H-5, H-3′, H-5′, H-2′′, H-6′′, H-2′ and H-6′), 7.66 (t, 1H, J= 8.00 Hz, H-6), 7.49 (t, 1H, J= 8.00 Hz, H-7), 3.68–3.62 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.35–2.24 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.21 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.18 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.96–1.78 (m, 4H, $2CH_2$).

1,3-Bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)iminomethyl]phenyl}isoquinoline (8c)

Yellow oil (80%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.34 (s, 1H, CH=N), 8.27 (s, 1H, CH=N), 8.22 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′′ and H-5′′), 8.06 (s, 1H, H-4), 8.04 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-8), 8.04 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-5), 7.85 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.80 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′′ and H-6′′), 7.78 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 7.62 (ddd, 1H, J= 8.10, 7.80 and 1.20 Hz, H-6), 7.46 (ddd, 1H, J= 8.10, 7.80 and 1.20 Hz, H-7), 3.65 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 3.60 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.45–2.35 (m, 20H, $2NCH_2$ and 8 NCH_2pip.), 2.24 (s, 3H, NCH_3), 2.23 (s, 3H, NCH_3), 1.75–1.65 (m, 4H, $2CH_2$), 1.61–1.51 (m, 4H, $2CH_2$).

1,3-Bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)iminomethyl]phenyl}isoquinoline (8d)

Yellow oil (99%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.36 (s, 1H, CH=N), 8.29 (s, 1H, CH=N), 8.22 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′′ and H-5′′), 8.07 (s, 1H, H-4), 8.05 (d, 1H, J= 8.00 Hz, H-8), 7.88 (d, 1H, J= 8.00 Hz, H-5), 7.87 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′, and H-5′), 7.82 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′′ and H-6′′), 7.79 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 7.63 (t, 1H, J= 8.00 Hz, H-6), 7.47 (t, 1H, J= 8.00 Hz, H-7), 3.66 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 3.61 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.46–2.38 (m, 20H, $2NCH_2$ and 8 NCH_2pip.), 2.25 (s, 3H, NCH_3), 2.23 (s, 3H, NCH_3), 1.95–1.83 (m, 4H, $2CH_2$).

7-Methoxy-1,3-bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)iminomethyl]phenyl}isoquinoline (8e)

Yellow oil (88%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.41 (s, 1H, CH=N), 8.33 (s, 1H, CH=N), 8.23 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′′ and H-5′′), 8.05 (s, 1H, H-4), 7.94–7.81 (m, 7H, H-5, H-3′, H-5′, H-2′′, H-6′′, H-2′ and H-6′), 7.38 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-8), 7.34 (dd, 1H, J= 9.00 and 2.40 Hz, H-6), 3.81 (s, 3H, CH_3O), 3.70 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 3.66 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.35 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.30 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.23 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.21 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.81–1.70 (m, 4H, $2CH_2$), 1.65–1.54 (m, 4H, $2CH_2$).

7-Methoxy-1,3-bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)iminomethyl]phenyl}isoquinoline (8f)

Orange-yellow oil (91%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.44 (s, 1H, CH=N), 8.36 (s, 1H, CH=N), 8.25 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.08 (s, 1H, H-4), 7.98–7.88 (m, 6H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″, H-2′ and H-6′), 7.84 (d, 1H, J= 8.40 Hz, H-5), 7.41 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-8), 7.37 (dd, 1H, J= 8.40 and 2.40 Hz, H-6), 3.83 (s, 3H, CH_3O), 3.73 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 3.69 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.42 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.39 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.28 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.26 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.00–1.87 (m, 4H, $2CH_2$).

7-Methoxy-1,3-bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)iminomethyl]phenyl}isoquinoline (8g)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.30 (s, 1H, CH=N), 8.22 (s, 1H, CH=N), 8.14 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 7.94 (s, 1H, H-4), 7.83 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.78 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2″ and H-6″), 7.73 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 7.71 (d, 1H, J= 9.00 Hz, H-5), 7.28 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-8), 7.24 (dd, 1H, J= 9.00 and 2.40 Hz, H-6), 3.71 (s, 3H, CH_3O), 3.58 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 3.54 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.40–2.25 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$pip.), 2.20 (s, 3H, NCH_3), 2.19 (s, 3H, NCH_3), 1.72–1.63 (m, 4H, $2CH_2$), 1.54–1.47 (m, 4H, $2CH_2$).

7-Methoxy-1,3-bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)iminomethyl]phenyl}isoquinoline (8h)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.37 (s, 1H, CH=N), 8.29 (s, 1H, CH=N), 8.20 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.01 (s, 1H, H-4), 7.90–7.78 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″, H-2′, H-6′ and H-5), 7.33 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-8), 7.28 (dd, 1H, J= 8.40 and 2.40 Hz, H-6), 3.76 (s, 3H, CH_3O), 3.68–3.61 (m, 4H, $2NCH_2$), 32.47–2.38 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$pip.), 2.26 (s, 3H, NCH_3), 2.25 (s, 3H, NCH_3), 1.96–1.84 (m, 4H, $2CH_2$).

6-Methoxy-1,3-bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)iminomethyl]phenyl}isoquinoline (8i)

Pale-orange oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.35 (s, 1H, CH=N), 8.29 (s, 1H, CH=N), 8.21 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 7.98 (s, 1H, H-4), 7.94 (d, 1H, J= 9.30 Hz, H-8), 7.87 (d, 2H, J= 8.40 Hz,H-3′ and H-5′), 7.79 (d, 4H, J= 8.40 Hz, H-2″, H-6″, H-2′ and H-6′), 7.14 (d, 1H, J= 2.50 Hz, H-5), 7.09 (dd, 1H, J= 9.30 and 2.50 Hz, H-7), 3.91 (s, 3H, CH_3O),3.65 (t, 2H, J= 6.80 Hz, NCH_2), 3.63 (t, 2H, J= 6.80 Hz, NCH_2), 2.46–2.38 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.28 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.26 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.76–1.67 (m, 4H, $2CH_2$), 1.64–1.55 (m, 4H, $2CH_2$).

6-Methoxy-1,3-bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)iminomethyl]phenyl}isoquinoline (8j)

Pale-yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.34 (s, 1H, CH=N), 8.28 (s, 1H, CH=N), 8.20 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 7.93 (s, 1H, H-4), 7.91 (d, 1H, J= 9.00 Hz, H-8), 7.86 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.78 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2″ and H-6″), 7.76 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 7.09 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-5), 7.06 (dd, 1H, J= 9.00 and 2.40 Hz, H-7), 3.87 (s, 3H, CH_3O), 3.66 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 3.63 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.37–2.30 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.22 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.21 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.91–1.85 (m, 4H, $2CH_2$).

6-Methoxy-1,3-bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)iminomethyl]phenyl}isoquinoline (8k)

Orange-yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.29 (s, 1H, CH=N), 8.23 (s, 1H, CH=N), 8.17 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 7.92 (s, 1H, H-4), 7.88 (d, 1H, J= 9.00 Hz, H-8), 7.82 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.74 (d, 4H, J= 8.40 Hz, H-2″, H-6″, H-2′ and H-6′), 7.08 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-5), 7.03 (dd, 1H, J= 9.00 and 2.40 Hz, H-7), 3.85 (s, 3H, CH_3O), 3.62–3.54 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.48–2.30 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$pip.), 2.21 (s, 3H, NCH_3), 2.19 (s, 3H, NCH_3), 1.71–1.64 (m, 4H, $2CH_2$), 1.56–1.49 (m, 4H, $2CH_2$).

6-Methoxy-1,3-bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)iminomethyl]phenyl}isoquinoline (8l)

Yellow oil (95%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.38 (s, 1H, CH=N), 8.33 (s, 1H, CH=N), 8.23 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.01 (s, 1H, H-4), 7.97 (d, 1H, J= 9.20 Hz, H-8), 7.89 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.82 (d, 4H, J= 8.40 Hz, H-2″, H-6″, H-2′ and H-6′), 7.18 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-5), 7.11 (dd, 1H, J= 9.20 and 2.40 Hz, H-7), 3.96 (s, 3H, CH_3O),3.69 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 3.66 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.50–2.38 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$pip.), 2.27 (s, 3H, NCH_3), 2.26 (s, 3H, NCH_3), 1.99–1.90 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9a)

Yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.72 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.39 (s, 1H, CH=N), 8.35 (s, 1H, CH=N), 8.13 (dd, 1H, J= 8.60 and 1.50 Hz, H-8), 8.07 (dd, 1H, J= 8.60 and 1.50 Hz, H-5), 7.96–7.84 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″ H-2′, H-6′ and H-7), 7.54 (ddd,1H, J= 8.60, 7.20 and 1.50 Hz, H-6), 3.69 (t, 2H, J= 7.00 Hz, NCH_2), 3.67 (t, 2H, J= 7.00 Hz, NCH_2), 2.38–2.31 (m. 4H, $2NCH_2$), 2.26 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.24 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.82–1.70 (m, 4H, $2CH_2$), 1.64–1.52 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9b)

Yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.76 (d, 2H, J= 8.80 Hz, H-3″ and H-5″), 8.44 (s, 1H, CH=N), 8.39 (s, 1H, CH=N), 8.18 (dd, 1H, J= 8.60 and 1.50 Hz, H-8), 8.12 (dd, 1H, J= 8.60 and 1.50 Hz, H-5), 7.97–7.85 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″ H-2′, H-6′ and H-7), 7.58 (ddd,1H, J= 8.60, 7.20 and 1.50 Hz, H-6), 3.74–3.70 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.43 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.41 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.30 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.29 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.99–1.92 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{4-[(2-dimethylaminoethyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9c)

Yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.72 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.47 (s, 1H, CH=N), 8.42 (s, 1H, CH=N), 8.18 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.50 Hz, H-8), 8.08 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.50 Hz, H-5), 7.95–7.88 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″ H-2′, H-6′ and H-7), 7.58 (ddd,1H, J= 8.10, 6.90 and 1.50 Hz, H-6), 3.84 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 3.82 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.73 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.71 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.37 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.35 (s, 6H, $N(CH_3)_2$).

2,4-Bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9d)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.74 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.41 (s, 1H, CH=N), 8.37 (s, 1H, CH=N), 8.18 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-8), 8.18 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-5), 7.96–7.86 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″ H-2′, H-6′ and H-7), 7.60 (ddd,1H, J= 8.10, 6.90 and 1.20 Hz, H-6), 3.72–3.66 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.65–2.38 (m, 20H, $2NCH_2$ and 8 NCH_2pip.), 2.29 (s, 3H, NCH_3), 2.28(s, 3H, NCH_3), 1.83–1.71 (m, 4H, $2CH_2$), 1.63–1.58 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9e)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.75 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.43 (s, 1H, CH=N), 8.38 (s, 1H, CH=N), 8.17 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-8), 8.13 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-5), 7.96–7.86 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″ H-2′, H-6′ and H-7), 7.58 (ddd,1H, J= 8.10, 6.90 and 1.20 Hz, H-6), 3.76–3.67 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.65–2.41 (m, 20H, $2NCH_2$ and 8 NCH_2pip.), 2.31 (s, 3H, NCH_3), 2.30 (s, 3H, NCH_3), 1.99–1.91 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{4-[(3-morpholinopropyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9f)

Yellow oil (93%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.67 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.32 (s, 1H, CH=N), 8.28 (s, 1H, CH=N), 8.06 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-8), 7.99 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-5), 7.89–7.77 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″, H-2′, H-6′ and H-7), 7.46 (ddd, 1H, J= 8.10, 6.90 and 1.20 Hz, H-6), 3.67–3.57 (m, 12H, $2NCH_2$ and 4 OCH_2), 2.40–2.32 (m, 12H, $6NCH_2$), 1.92–1.81 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{4-[(2-morpholinoethyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9g)

Yellow oil (88%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.76 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.45 (s, 1H, CH=N), 8.41 (s, 1H, CH=N), 8.17 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-8), 8.12 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-5), 7.97–7.75 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″, H-2′, H-6′ and H-7), 7.60 (ddd, 1H, J= 8.10, 6.90 and 1.20 Hz, H-6), 3.87 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 3.84 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 3.78–3.71 (m, 8H, $4OCH_2$), 2.84–2.74 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.61–2.57 (m, 8H, $4NCH_2$).

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9h)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.64 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-3″ and H-5″), 8.35 (s, 1H, CH=N), 8.30 (s, 1H, CH=N), 7.99 (s, 1H, J= 9.30 Hz, H-8), 7.90–7.88 (m, 4H, H-3′ and H-5′, H-2″ and H-6″), 7.80 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-2′ and H-6′), 7.46 (dd, 1H, J= 9.30 and 2.70 Hz, H-7), 7.25 (d, 1H, J= 2.70 Hz, H-5), 3.76 (s, 3H, CH_3O and $2NCH_2$), 3.65 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 3.62 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.28 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.27 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.19 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.18 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.76–1.68 (m, 4H, $2CH_2$), 1.57–1.50 (m, 4H, $2CH_2$).

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9i)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.66 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-3″ and H-5″), 8.39 (s, 1H, CH=N), 8.33 (s, 1H, CH=N), 8.00 (d, 1H, J= 9.15 Hz, H-8), 7.92–7.90 (m, 4H, H-3′ and H-5′, H-2″ and H-6″), 7.82 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-2′ and H-6′), 7.48 (dd,1H, J= 9.15 and 2.40 Hz, H-7), 7.28 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-5), 3.77 (s, 3H, CH_3O), 3.69–3.62 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.39–2.32 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.23 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.22 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.95–1.83 (m, 4H, $2CH_2$).

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(2-dimethylaminoethyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9j)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.66 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.36 (s, 1H, CH=N), 8.30 (s, 1H, CH=N), 7.95–7.76 (m, 7H, H-8, H-3′ and H-5′, H-2″ and H-6″, H-2 and H-6′), 7.41 (dd, 1H, J= 9.10 and 2.80 Hz, H-7), 7.20 (d, 1H, J= 2.80 Hz, H-5), 3.77–3.70 (m, 7H, CH_3O and $2NCH_2$), 2.64 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.62 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.27 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.26 (s, 6H, $N(CH_3)_2$).

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9k)

Yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.61 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.33 (s, 1H, CH=N), 8.27 (s, 1H, CH=N), 7.96 (d, 1H, J= 9.15 Hz, H-8), 7.89–7.83 (m, 4H, H-3′ and H-5′, H-2″ and H-6″), 7.77 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 7.43 (dd,1H, J= 9.15 and 2.70 Hz, H-7), 7.22 (d, 1H, J= 2.70 Hz, H-5), 3.72 (s, 3H, CH_3O), 3.64 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 3.60 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.50–2.30 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$ pip.), 2.21 (s, 3H, NCH_3), 2.20 (s, 3H, NCH_3), 1.90–1.82 (m, 4H, $2CH_2$).

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(2–(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9l)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.64 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.38 (s, 1H, CH=N), 8.32 (s, 1H, CH=N), 8.00 (d, 1H, J= 9.15 Hz, H-8), 7.90 (S, 4H, H-3′ and H-5′, H-2″ and H-6″), 7.80 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 7.48 (dd,1H, J= 9.15 and 2.70 Hz, H-7), 7.27 (d, 1H, J= 2.70 Hz, H-5), 3.82–3.73 (m, 7H, CH_3O and $2NCH_2$), 2.73 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.71 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.58–2.38 (m, 16H, $8NCH_2$ pip.), 2.25 (s, 3H, NCH_3), 2.24 (s, 3H, NCH_3).

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9m)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.72 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.41 (s, 1H, CH=N), 8.37 (s, 1H, CH=N), 8.00–7.85 (m, 7H, H-5, H3′ and H5′, H-2″ and H-6″, H-2′ and H-6′), 7.45 (d, 1H, J= 2.70 Hz, H-8), 7.18 (dd,1H, J= 9.30 and 2.70 Hz, H-6), 4.02 (s, 3H, CH_3O), 3.71 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 3.62 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.35 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.32 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.25 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.23 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.81–1.71 (m, 4H, $2CH_2$), 1.64–1,54 (m, 4H, $2CH_2$).

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9n)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.73 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.44 (s, 1H, CH=N), 8.40 (s, 1H, CH=N), 8.00 (d, 1H, J= 9.25 Hz, H-5), 7.97 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.92 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2″ and H-6″), 7.88 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 7.46 (d, 1H, J= 2.50 Hz, H-8), 7.19 (dd,1H, J= 9.25 and 2.50 Hz, H-6), 4.04 (s, 3H, CH_3O), 3.74 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 3.71 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.40 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.39 (t,

2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.28 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.27 (s, 6H, $N(CH_3)_2$),1.96–1.83 (m, 4H, $2CH_2$).

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(2-dimethylaminoethyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9o)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.69 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3″ and H-5″), 8.42 (s, 1H, CH=N), 8.38 (s, 1H, CH=N), 7.95–7.84 (m, 7H, H-5, H3′ and H5′, H-2″ and H-6″, H-2′ and H-6′), 7.41 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-8), 7.14 (dd,1H, J= 9.30 and 2.40 Hz, H-6), 3.98 (s, 3H, CH_3O), 3.80 (t, 2H, J= 7.00 Hz, NCH_2), 3.78 (t, 2H, J= 7.00 Hz, NCH_2), 2.68 (t, 2H, J= 7.00 Hz, NCH_2), 2.67 (t, 2H, J= 7.00 Hz, NCH_2), 2.33 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.32 (s, 6H, $N(CH_3)_2$).

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9p)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.59 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.26 (s, 1H, CH=N), 8.22 (s, 1H, CH=N), 7.84–7.72 (m, 7H, H-5, H3′ and H5′, H-2″ and H-6″, H-2′ and H-6′), 7.28 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-8), 7.12 (dd,1H, J= 9.30 and 2.40 Hz, H-6), 3.86 (s, 3H, CH_3O), 3.57 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 3.53 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.50–2.20 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$ pip.), 2.17 (s, 3H, NCH_3), 2.16 (s, 3H, NCH_3), 1.66–1.62 (m, 4H, $2CH_2$), 1.51–1.47 ($2CH_2$).

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline(9q)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.70 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.40 (s, 1H, CH=N), 8.36 (s, 1H, CH=N), 7.96 (d, 1H, J= 9.30 Hz, H-5), 7.93 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.88 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2″ and H-6″), 7.85 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 7.43 (d, 1H, J= 2.70 Hz, H-8), 7.16 (dd,1H, J= 9.30 and 2.70 Hz, H-6), 4.00 (s, 3H, CH_3O), 3.73–3.65 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.49–2,42 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$ pip.), 2.28 (s, 3H, NCH_3), 2.27 (s, 3H, NCH_3), 1.99–1.87 (m, 4H, $2CH_2$).

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(2–(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9r)

Orange oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.68 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 8.39 (s, 1H, CH=N), 8.35 (s, 1H, CH=N), 7.94–7.82 (m, 7H, H-5, H3′ and H5′, H-2″ and H-6″, H-2′ and H-6′), 7.41 (d, 1H, J= 2.60 Hz, H-8), 7.14 (dd,1H, J= 9.25 and 2.60 Hz, H-6), 3.98 (s, 3H, CH_3O), 3.82 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 3.79 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.76 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.73 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.65–2,30 (m, 16H, $8NCH_2$ pip), 2.28 (s, 3H, NCH_3), 2.27 (s, 3H, NCH_3).

2,4-Bis{3-[(3-dimethylaminopropyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9s)

Pale-yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.94 (dd, 1H, J= 1.40 and 1.40 Hz, H-2′), 8.77 (ddd, 1H, J= 7.80, 1.40 and 1.40 Hz, H-6′), 8.48 (s, 1H, CH=N), 8.45 (s, 1H, CH=N), 8.21–8.17 (m, 2H, H-2″ and H-8), 8.11 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-5), 8.03–7.90 (m, 4H, H-6″, H-4′, H-4″ and H-7), 7.67 (dd,1H, J= 7.80 and 7.80 Hz, H-5″), 7.62–7.56 (m, 2H, H-5′ and H-6), 3.74–3.69 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.43–2.33 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.27 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.26 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.98–1.87 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{3-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline(9t)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.93 (dd, 1H, J= 1.35 and 1.35 Hz, H-2′), 8.76 (ddd, 1H, J= 7.80, 1.35 and 1.35 Hz, H-6′), 8.47 (s, 1H, CH=N), 8.44 (s, 1H, CH=N), 8.21–8.18 (m, 2H, H-2″ and H-8), 8.11 (dd, 1H, J= 8.40 and 1.50 Hz, H-5), 8.02–7.90 (m, 4H, H-6″, H-4′, H-4″ and H-7), 7.67 (dd,1H, J= 7.80 and 7.80 Hz, H-5″), 7.62–7.56 (m, 2H, H-5′ and H-6), 3.76–3.68 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.50–2.38 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$pip.), 2.30 (s, 3H, NCH_3), 2.29 (s, 3H, NCH_3), 1.98–1.90 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{3-[(3-morpholinopropyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9u)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.93 (dd, 1H, J= 1.50 and 1.50 Hz, H-2′), 8.76 (ddd, 1H, J= 7.80, 1.50 and 1.50 Hz, H-6′), 8.46 (s, 1H, CH=N), 8.43 (s, 1H, CH=N), 8.20–8.16 (m, 2H, H-2″ and H-8), 8.09 (dd, 1H, J= 8.60 and 1.20 Hz, H-5), 8.00–7.91 (m, 4H, H-6″, H-4′, H-4″ and H-7), 7.66 (dd,1H, J= 7.80 and 7.80 Hz, H-5″), 7.61–7.55 (m, 2H, H-5′ and H-6), 3.75–3.68 (m, 12H, $2NCH_2$ and $4OCH_2$), 2.48–2.37 (m, 12H, $2NCH_2$ and $4NCH_2$morph.), 1.96–1.87 (m, 4H, $2CH_2$).

2,4-Bis{3-[(2-morpholinoethyl)iminomethyl]phenyl}quinazoline (9v)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.95 (dd, 1H, J= 1.35 and 1.35 Hz, H-2′), 8.76 (ddd, 1H, J= 7.80, 1.35 and 1.35 Hz, H-6′), 8.49 (s, 1H, CH=N), 8.46 (s, 1H, CH=N), 8.21–8.18 (m, 2H, H-2″ and H-8), 8.10 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-5), 8.02–7.91 (m, 4H, H-6″, H-4′, H-4″ and H-7), 7.68 (dd,1H, J= 7.80 and 7.80 Hz, H-5″), 7.63–7.57 (m, 2H, H-5′ and H-6), 3.85 (t, 4H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 3.77–3.72 (m, 8H, $4OCH_2$), 2.79–2.73 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.61–2.57–1.87 (m, 8H, $4NCH_2$).

General procedure for 2,4-bis[(substituted-aminomethyl) phenyl]quinolines (1a-t), 1,3-bis[(substituted-aminomethyl) phenyl]isoquinolines (2a–l), and 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinazolines (3a–v)

To a solution of compound **7–9** (0.4 mmol) in methanol (10 ml) was added portion-wise at 0 °C sodium borohydride (3.2 mmol, 8 eq.). The reaction mixture was then stirred at room temperature for 1 h and subsequently heated under reflux for 1 h. Then it was evaporated to dryness under reduced pressure. After cooling, the residue was triturated in water and extracted with dichloromethane (40 ml). The organic layer was separated, dried over sodium sulphate and activated charcoal and evaporated to dryness. Oils were used without further purification to give compounds **1–3**.

2,4-Bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1a)

Yellow oil (89%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.23 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.50 Hz, H-8), 8.15 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 7.91 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.50 Hz, H-5), 7.80 (s, 1H, H-3), 7.72 (ddd,1H, J= 8.10, 6.70 and 1.50 Hz, H-7), 7.52–7.43 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″, H-3″, H-5″ and H-6), 3.91 (s, 2H, NCH_2), 3.87 (s, 2H, NCH_2),2.73 (t, 2H, J= 6.70 Hz, NCH_2), 2.67 (t, 2H, J= 6.70 Hz, NCH_2), 2.29 (t, 2H, J= 6.70 Hz, NCH_2), 2.26 (t, 2H, J = 6.70 Hz, NCH_2), 2.22 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.20 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.58–1.52 (m, 8H, $4CH_2$).13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 158.0 (C-2), 150.3 (C-4), 150.2 (C-8a), 143.1 (C-1″), 142.2 (C-1′), 139.7 (C-4″), 138.4 (C-4′), 131.4 (C-7), 131.0(C-

3″ and C-5″), 130.9 (C-8), 130.0 (C-3′ and C-5′), 129.7(C-2″ and C-6″), 129.0 (C-2′ and C-6′), 127.6 (C-5),127.2 (C-4a), 127.0 (C-6), 120.6 (C-3), 61.0 (NCH_2), 55.0 (NCH_2), 54.8 (NCH_2), 50.8 (NCH_2), 50.6 (NCH_2), 46.8 ($2N(CH_3)_2$), 29.4 ($2CH_2$), 26.9 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS *m/z* $[M+H]^+$ Calc for $C_{35}H_{48}N_5$: 538.391, Found: 538.250.

2,4-Bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1b)

Pale-yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.22 (dd, 1H, *J*= 8.40 and 1.50 Hz, H-8), 8.15 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 7.91 (dd, 1H, *J*= 8.40 and 1.50 Hz, H-5), 7.80 (s, 1H, H-3), 7.71 (ddd,1H, *J*= 8.40, 6.90 and 1.50 Hz, H-7), 7.55–7.42 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″, H-3″, H-5″ and H-6), 3.91 (s, 2H, NCH_2), 3.88 (s, 2H, NCH_2), 2.76 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 2.71 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 2.37 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 2.33 (t, 2H, *J* = 6.90 Hz, NCH_2), 2.24 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.22 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.80–1.68 (m, 4H, $2CH_2$). 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 158.0 (C-2), 150.3 (C-4), 150.2 (C-8a), 142.6 (C-1″), 141.9 (C-1′), 139.9 (C-4″), 138.4 (C-4′), 131.5 (C-7), 131.0 (C-3″ and C-5″), 130.9 (C-8), 130.0 (C-3′ and C-5′), 129.7 (C-2″ and C-6″), 129.0 (C-2′ and C-6′), 127.6 (C-5), 127.1(C-4a), 127.0 (C-6), 120.6 (C-3), 59.6 (NCH_2), 55.0 (NCH_2), 54.9 (NCH_2), 49.5 (NCH_2), 49.2 (NCH_2), 46.9 ($2N(CH_3)_2$), 29.3 (CH_2), 29.0 (CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{33}H_{44}N_5$: 510.360, Found: 510.384.

2,4-Bis{4-[(2-dimethylaminoethyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1c)

Yellow oil (76%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.23 (dd, 1H, *J*= 8.10 and 1.20 Hz, H-8), 8.16 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 7.91 (dd, 1H, *J*= 8.10 and 1.20 Hz, H-5), 7.80 (s, 1H, H-3), 7.72 (ddd,1H, *J*= 8.10, 6.90 and 1.20 Hz, H-7), 7.52–7.42 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″, H-3″, H-5″ and H-6), 3.94 (s, 2H, NCH_2), 3.90 (s, 2H, NCH_2), 2.79 (t, 2H, *J*= 6.30 Hz, NCH_2), 2.72 (t, 2H, *J*= 6.30 Hz, NCH_2), 2.50 (t, 2H, *J*= 6.30 Hz, NCH_2), 2.46 (t, 2H, *J*= 6.30 Hz, NCH_2), 2.25 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.22 (s, 6H, $N(CH_3)_2$). 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 156.7 (C-2), 149.0 (C-4), 148.8 (C-8a), 141.6 (C-1″), 140.7 (C-1′), 138.3 (C-4″), 137.0 (C-4′), 130.0 (C-7), 129.6 (C-3″ and C-5″), 129.7 (C-8), 128.6 (C-3′ and C-5′), 128.4 (C-2″ and C-6″), 127.6 (C-2′ and C-6′), 126.2 (C-5), 125.8 (C-4a), 125.6 (C-6), 119.2 (C-3), 59.0 (NCH_2), 53.7 (NCH_2), 53.6 (NCH_2), 46.7 (NCH_2), 46.4 (NCH_2), 45.5 ($2N(CH_3)_2$); MALDI-TOF MS *m/z* $[M+H]^+$ Calc for $C_{31}H_{40}N_5$: 482.328, Found: 482.584.

2,4-Bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1d)

Yellow oil (59%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.21 (dd, 1H, *J*= 8.40 and 1.20 Hz, H-8), 8.15 (d, 2H, *J*= 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 7.91 (dd, 1H, *J*= 8.40 and 1.20 Hz, H-5), 7.80 (s, 1H, H-3), 7.72 (ddd,1H, *J*= 8.40, 6.60 and 1.20 Hz, H-7), 7.55–7.43 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″, H-2′, H-6′ and H-6), 3.90 (s, 2H, NCH_2), 3.87 (s, 2H, NCH_2), 2.73 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 2.66 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 2.55–2.32 (m. 20H, $2NCH_2$ and 8 NCH_2pip.), 2.28 (s, 3H, NCH_3), 2.27 (s, 3H, NCH_3), 1.61–1.51 (m, 8H, $4CH_2$). 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 158.1 (C-2), 150.3 (C-4), 150.2 (C-8a), 143.1 (C-1″), 142.2 (C-1′), 139.7 (C-4″), 138.4 (C-4′), 131.4 (C-7), 131.0 (C-3″ and C-5″), 130.9 (C-8), 129.9 (C-3′ and C-5′), 129.7 (C-2″ and C-6″), 129.0 (C-2′ and C-6′), 127.6 (C-5), 127.2 (C-4a), 127.0 (C-6), 120.6 (C-3), 59.9 (NCH_2), 56.5 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 54.6 (NCH_2), 50.8 (NCH_2), 47.4 ($2NCH_3$), 29.5 ($2CH_2$), 26.1 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS *m/z* $[M+H]^+$ Calc for $C_{41}H_{58}N_7$: 648.475, Found: 648.451.

2,4-Bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1e)

Yellow oil (78%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.21(dd, 1H, *J*= 8.40 and 1.50 Hz, H-8), 8.15 (d, 2H, *J*= 8.10 Hz, H-3″ and H-5″), 7.88(dd, 1H, *J*= 8.40 and 1.50 Hz, H-5), 7.79 (s, 1H, H-3), 7.71 (ddd,1H, *J*= 8.40, 6.90 and 1.50 Hz, H-7), 7.54–7.41 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″, H-2′, H-6′ and H-6), 3.90 (s, 2H, NCH_2), 3.87 (s, 2H, NCH_2),) , 2.76 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 2.70 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 2.48–2.37 (m. 20H, $2NCH_2$ and 8NCH_2pip.), 2.26 (s, 3H, NCH_3), 2.25 (s, 3H, NCH_3), 1.81–1.68 (m, 4H, $2CH_2$). 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 158.0 (C-2), 150.3 (C-4), 150.2 (C-8a), 142.7 (C-1″), 142.0 (C-1′), 139.8 (C-4″), 138.4 (C-4′), 131.4 (C-7), 131.0 (C-3″ and C-5″), 130.9 (C-8), 130.0 (C-3′ and C-5′), 129.7 (C-2″ and C-6″), 129.0 (C-2′ and C-6′), 127.6 (C-5), 127.1 (C-4a), 127.0 (C-6), 120.6 (C-3), 58.4 (NCH_2), 56.5 (NCH_2), 55.0 (NCH_2), 54.9 (NCH_2), 54.6 (NCH_2), 49.7 (NCH_2), 49.5 (NCH_2), 47.4 ($2NCH_3$), 28.2 (CH_2), 28.0 (CH_2); MALDI-TOF MS *m/z* $[M+H]^+$ Calc for $C_{39}H_{54}N_7$: 620.444, Found: 620.560.

2,4-Bis{4-[(2–(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1f)

Orange oil (65%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.23 (dd, 1H, *J*= 8.50 and 1.20 Hz, H-8), 8.16 (d, 2H, *J*= 8.10 Hz, H-3′′′′ and H-5″), 7.92 (dd, 1H, *J*= 8.50 and 1.20 Hz, H-5), 7.81 (s, 1H, H-3), 7.81 (ddd,1H, *J*= 8.50, 6.70 and 1.20 Hz, H-7), 7.54–7.44 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″, H-2′, H-6′ and H-6),) , 3.94 (s, 2H, NCH_2), 3.91 (s, 2H, NCH_2), 2.81 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 2.74 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 2.61–2.40 (m. 20H, $2NCH_2$ and 8NCH_2pip.), 2.30 (s, 3H, NCH_3), 2.29 (s, 3H, NCH_3). 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 158.0 (C-2), 150.3 (C-4), 150.2 (C-8a), 142.7 (C-1″), 142.0 (C-1′), 139.9 (C-4″), 138.5 (C-4′), 131.5 (C-7), 131.0 (C-3″ and C-5″), 130.9 (C-8), 130.1 (C-3′ and C-5′), 129.8 (C-2″ and C-6″), 129.0 (C-2′ and C-6′), 127.6 (C-5), 127.2 (C-4a), 127.0 (C-6), 120.6 (C-3), 59.0 (NCH_2), 58.9(NCH_2), 56.5 (NCH_2), 55.0 (NCH_2), 54.9 (NCH_2), 54.5 (NCH_2), 47.4 (NCH_3), 47.1 (NCH_2), 46.7 (NCH_2); MALDI-TOF MS *m/z* $[M+H]^+$ Calc for $C_{37}H_{50}N_7$: 592.413, Found: 592.525.

2,4-Bis{4-[(3-morpholinopropyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1g)

Yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.21 (dd, 1H, *J*= 8.40 and 1.20 Hz, H-8), 8.14 (d, 2H, *J*= 8.10 Hz, H-3″ and H-5″), 7.89 (dd, 1H, *J*= 8.40 and 1.20 Hz, H-5), 7.79 (s, 1H, H-3), 7.70(ddd,1H, *J*= 8.40, 6.90 and 1.20 Hz, H-7), 7.53–7.41 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″, H-2′, H-6′ and H-6), 3.88 (s, 2H, NCH_2), 3.84 (s, 2H, NCH_2), 3.69 (t, 2H, *J*= 4.50 Hz, OCH_2), 3.67 (t, 2H, *J*= 4.50 Hz, OCH_2), 2.74 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 2.68 (t, 2H, *J*= 6.90 Hz, NCH_2), 2.45–2.35 (m, 12H, $6NCH_2$), 1.85 (bs, 2H, 2NH), 1.78–1.64 (m, 4H, $2CH_2$). 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 158.0 (C-2), 150.3 (C-4), 150.2 (C-8a), 143.2 (C-1″), 142.3 (C-1′), 139.6 (C-4″), 138.3 (C-4′), 131.4 (C-7), 131.0 (C-3″ and C-5″), 130.9 (C-8), 129.8 (C-3′ and C-5′), 129.6 (C-2″ and C-6″), 128.9 (C-2′ and C-6′), 127.6 (C-5), 127.1 (C-4a), 127.0 (C-6), 120.5 (C-3), 68.4 (OCH_2), 58.8 (NCH_2), 55.2 (NCH_2), 49.5 (NCH_2), 49.3 (NCH_2), 28.1 (CH_2); MALDI-TOF MS *m/z* $[M+H]^+$ Calc for $C_{37}H_{48}N_5O_2$: 594.381, Found: 594.465.

2,4-Bis{4-[(2-morpholinoethyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1h)

Pale-yellow oil (76%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.22 (dd, 1H, *J*= 8.10 and 1.20 Hz, H-8), 8.15 (d, 2H, *J*= 8.10 Hz, H-3″ and H-5″), 7.89 (dd, 1H, *J*= 8.10 and 1.20 Hz, H-5), 7.79 (s, 1H, H-3), 7.71 (ddd,1H, *J*= 8.10, 6.90 and 1.20 Hz, H-7), 7.54–7.41 (m, 7H, H-3′, H-5′, H-2″, H-6″, H-2′, H-6′ and H-6), 3.90 (s, 2H, NCH_2), 3.87 (s, 2H,

NCH_2), 3.69 (t, 2H, J= 4.70 Hz, OCH_2), 3.68 (t, 2H, J= 4.70 Hz, OCH_2), 2.77 (t, 2H, J= 6.20 Hz, NCH_2), 2.70 (t, 2H, J= 6.20 Hz, NCH_2), 2.53 (t, 2H, J= 6.20 Hz, NCH_2), 2.47 (t, 2H, J= 6.20 Hz, NCH_2), 2.45–2.39 (m, 8H, $4NCH_2$), 2.20 (bs, 2H, 2NH). 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 158.0 (C-2), 150.3 (C-4), 150.2 (C-8a), 143.1 (C-1″), 142.2 (C-1′), 139.7 (C-4″), 138.4 (C-4′), 131.4 (C-7), 131.0 (C-3″ and C-5″), 130.9 (C-8), 129.9 (C-3′ and C-5′), 129.7 (C-2″ and C-6″), 129.0 (C-2′ and C-6′), 127.6 (C-5), 127.1 (C-4a), 127.0 (C-6), 120.6 (C-3), 68.4 (OCH_2), 63.6 (NCH_2), 59.7 (NCH_2), 59.6 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 55.0 (NCH_2), 54.9 (NCH_2), 46.8 (NCH_2), 46.5 (NCH_2); MALDI-TOF MS *m/z* $[M+H]^+$ Calc for $C_{35}H_{44}N_5O_2$: 566.350, Found: 566.488.

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1i)

Yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.06 (m, 3H, H-2″ and H-6″, H-8), 7.69 (s, 1H, H-3), 7.46–7.37 (m, 6H, H-2′ and H-6′, H-3″ and H-5″, H-3′ and H-5′), 7.32–7.28 (m, 1H, H-7), 7.14–7.13 (m, 1H, H-5), 3.83 (s, 2H, NCH_2), 3.78 (s, 2H, NCH_2), 3.70 (s, 3H, CH_3O), 2.70–2.56 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.24–2.19 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.15 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.13 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.52–1.46 (m, 8H, $4CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 159.0 (C-6), 155.7 (C-2), 148.9 (C-4), 146.2 (C-8a), 142.7 (C-4′), 142.1 (C-4″), 139.7 (C-1′), 138.6 (C-1″), 132.9 (C-8), 130.7 (C-3′ and C-5′), 129.8 (C-3″and C-5″), 129.7 (C-2′ and C-6′), 128.6 (C-2″ and C-6″), 127.9 (C-4a), 123.1 (C-7), 120.8 (C-3), 105.0 (C-5), 61.0 ($2NCH_2$), 56.8 (CH_3O), 55.0 ($2NCH_2$), 50.9 (NCH_2), 50.6 (NCH_2), 46.8 ($2N(CH_3)_2$), 29.3 ($2CH_2$), 26.9 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS *m/z* $[M+H]^+$ Calc for $C_{36}H_{48}N_5O$: 566.386, Found: 566.285.

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1j)

Yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.07 (m, 3H, H-2″and H-6″, H-8), 7.71 (s, 1H, H-3), 7.49 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2′ and H-6′), 7.45 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-3″and H-5″), 7.41 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-3′ and H-5′), 7.32 (dd, 1H, J= 9.30 and 2.70 Hz, H-7), 7.16 (d, 1H, J= 2.70 Hz, H-5), 3.85 (s, 2H, NCH_2), 3.81 (s, 2H, NCH_2), 3.73 (s, 3H, CH_3O), 2.71 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.64 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.32 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.27 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.19 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.17 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.74–1.60 (m, 4H, $2CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 159.0 (C-6), 155.7 (C-2), 148.9 (C-4), 146.2 (C-8a), 142.8 (C-4′), 142.2 (C-4″), 139.7 (C-1′), 138.6 (C-1″), 133.9 (C-8), 130.7 (C-3′ and C-5′), 129.8 (C-3″and C-5″), 129.7 (C-2′ and C-6′), 128.6 (C-2″and C-6″), 127.9 (C-4a), 123.1 (C-7), 120.9 (C-3), 105.0 (C-5), 59.5 (NCH_2), 59.4 (NCH_2), 56.8 (CH_3O), 55.2 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 49.5 (NCH_2), 49.2 (NCH_2), 47.0 ($N(CH_3)_2$), 46.9 ($N(CH_3)_2$), 29.5 (CH_2), 29.4 (CH_2); MALDI-TOF MS *m/z* $[M+H]^+$ Calc for $C_{34}H_{44}N_5O$: 538.354, Found: 538.372.

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1k)

Pale yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.03 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2″and H-6″), 8.02 (d, 1H, J= 9.15 Hz, H-8), 7.66 (s, 1H, H-3), 7.45 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2′ and H-6′), 7.41 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-3″and H-5″), 7.36 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-3′ and H-5′), 7.28 (dd, 1H, J= 9.15 and 2.70 Hz, H-7), 7.11 (d, 1H, J= 2.70 Hz, H-5), 3.81 (s, 2H, NCH_2), 3.76 (s, 2H, NCH_2), 3.69 (s, 3H, CH_3O), 2.65–2.22 (m, 24H, $4NCH_2$ and $8NCH_2$ pip.), 2.18 (s, 3H, NCH_3), 2.17 (s, 3H, NCH_3), 1.49–1.42 (m, 8H, $4CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 159.0 (C-6), 155.6 (C-2), 148.9 (C-4), 146.2 (C-8a), 142.7 (C-4′), 142.2 (C-4″), 139.6 (C-1′), 138.5 (C-1″), 132.8 (C-8), 130.7 (C-3′ and C-5′), 129.8 (C-3″and C-5″), 129.7 (C-2′ and C-6′), 128.5 (C-2″and C-6″), 127.9 (C-4a), 123.0 (C-7), 120.8 (C-3), 105.0 (C-5), 59.8 ($2NCH_2$), 56.7 (CH_3O), 56.5 ($2NCH_2$ pip.), 55.0 ($2NCH_2$), 54.5 ($2NCH_2$ pip.), 50.9 (NCH_2), 50.5 (NCH_2), 47.4 ($2NCH_3$), 29.4 ($2CH_2$), 26.1 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{42}H_{60}N_7O$: 678.486, Found: 678.487.

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1l)

Yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.10 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-2″ and H-6″), 8.07 (d, 1H, J= 9.10 Hz, H-8), 7.72 (s, 1H, H-3), 7.51 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-2′ and H-6′), 7.47 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-3″ and H-5″), 7.41 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-3′ and H-5′), 7.34 (dd, 1H, J= 9.10 and 2.80 Hz, H-7), 7.17 (d, 1H, J= 2.80 Hz, H-5), 3.86 (s, 2H, NCH_2), 3.82 (s, 2H, NCH_2), 3.75 (s, 3H, CH_3O), 2.73 (t, 2H, J= 6.70 Hz, NCH_2), 2.65 (t, 2H, J= 6.70 Hz, NCH_2), 2.45–2.34 (m, 16H, $8NCH_2$ pip), 2.24 (s, 3H, NCH_3), 2.23 (s, 3H, NCH_3), 1.78–1.63 (m, 4H, $2CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 159.1 (C-6), 155.8 (C-2), 148.9 (C-4), 146.2 (C-8a), 142.7 (C-4′), 142.1 (C-4″), 139.7 (C-1′), 138.6 (C-1″), 132.8 (C-8), 130.7 (C-3′ and C-5′), 129.8 (C-3″and C-5″), 129.7 (C-2′ and C-6′), 128.6 (C-2″and C-6″), 128.0 (C-4a), 123.1 (C-7), 120.9 (C-3), 105.0 (C-5), 58.4 ($2NCH_2$), 56.8 (CH_3O), 56.5 ($2NCH_2$ pip.), 55.1 ($2NCH_2$), 54.6 ($2NCH_2$ pip.), 49.8 (NCH_2), 49.4 (NCH_2), 47.4 ($2NCH_3$), 28.3 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{40}H_{56}N_7O$: 650.454, Found: 650.442.

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1m)

Yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.07 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2″and H-6″), 7.73 (d, 1H, J= 9.25 Hz, H-5), 7.60 (s, 1H, H-3), 7.49 (d, 1H, J= 2.60 Hz, H-8), 7.42–7.38 (m, 6H, H-2′ and H-6′, H-3″ and H-5″, H-3′ and H-5′), 7.03 (dd, 1H, J= 9.25 and 2.60 Hz, H-6), 3.90 (s, 3H, CH_3O), 3.81 (s, 2H, NCH_2), 3.79 (s, 2H, NCH_2), 2.64 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.59 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.21 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.19 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.15 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.13 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.50–1.44 (m, 8H, $4CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{36}H_{50}N_5O$: 568.402, Found: 568.860.

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1n)

Pale yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.09 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2″ and H-6″), 7.75 (d, 1H, J= 9.15 Hz, H-5), 7.62 (s, 1H, H-3), 7.51 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-8), 7.46–7.40 (m, 6H, H-2′ and H-6′, H-3″ and H-5″, H-3′ and H-5′), 7.32 (dd, 1H, J= 9.15 and 2.40 Hz, H-6), 3.92 (s, 3H, CH_3O), 3.84 (s, 2H, NCH_2), 3.82 (s, 2H, NCH_2), 2.70 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.64 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.31 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.28 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.19 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.17 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.73–1.60 (m, 4H, $2CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 162.0 (C-7), 158.4 (C-2), 152.0 (C-4), 150.2 (C-8a), 142.9 (C-4′), 142.2 (C-4″), 139.8 (C-1′), 138.4 (C-1″), 130.9 (C-3′ and C-5′), 129.9 (C-3″and C-5″), 129.6 (C-2′ and C-6′), 128.9 (C-2″and C-6″), 128.1 (C-8), 122.2 (C-4a), 120.6 (C-6), 118.6 (C-3), 109.3 (C-5), 59.4 ($2NCH_2$), 56.9 (CH_3O), 55.0 ($2NCH_2$), 49.4 (NCH_2), 49.2 (NCH_2), 46.9 ($2N(CH_3)_2$), 29.3 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{34}H_{46}N_5O$: 540.370, Found: 540.292.

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1o)

Yellow oil (73%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.13 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2″and H-6″), 7.81 (d, 1H, J= 9.25 Hz, H-5), 7.67 (s, 1H,

H-3), 7.57 (d, 1H, J= 2.60 Hz, H-8), 7.51 (s, 4H, H-2′ and H-6′, H-3′′ and H-5′′), 7.47 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.13 (dd, 1H, J= 9.25 and 2.60 Hz, H-6), 4.00 (s, 3H, CH_3O), 3.91 (s, 2H, NCH_2), 3.88 (s, 2H, NCH_2), 2.74 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.68 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.47–2.36 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$ pip), 2.29 (s, 3H, NCH_3), 2.28 (s, 3H, NCH_3), 1.62–1.53 (m, 8H, $4CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 162.7 (C-7), 157.1 (C-2), 150.7 (C-4), 148.3 (C-8a), 141.6 (C-4′), 140.7 (C-4′′), 138.6 (C-1′), 137.2 (C-1′′), 129.6 (C-3′ and C-5′), 128.6 (C-3′′ and C-5′′), 128.3 (C-2′ and C-6′), 127.6 (C-2′′ and C-6′′), 126.8 (C-8), 120.9 (C-4a), 119.2 (C-6), 117.3 (C-3), 107.9 (C-5), 58.5 ($2NCH_2$), 55.6 (CH_3O), 55.1 ($2NCH_2$ pip.), 53.7 (NCH_2), 53.6 (NCH_2), 53.2 ($2NCH_2$ pip.), 49.4 (NCH_2), 49.2 (NCH_2), 46.0 ($2NCH_3$), 28.1 ($2CH_2$), 24.8 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{42}H_{60}N_7O$: 678.486, Found: 678.697.

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1p)

Yellow oil (92%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.03 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-2′′ and H-6′′), 7.69 (d, 1H, J= 9.20 Hz, H-5), 7.56 (s, 1H, H-3), 7.45 (d, 1H, J= 2.50 Hz, H-8), 7.39 (s, 4H, H-2′ and H-6′, H-3′′ and H-5′′), 7.36 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-3′ and H-5′), 7.00 (dd, 1H, J= 9.20 and 2.50 Hz, H-6), 3.86 (s, 3H, CH_3O), 3.78 (s, 2H, NCH_2), 3.75 (s, 2H, NCH_2), 2.64 (t, 2H, J= 6.75 Hz, NCH_2), 2.58 (t, 2H, J= 6.75 Hz, NCH_2), 2.37–2.28 (m, 16H, $8NCH_2$ pip), 2.17 (s, 3H, NCH_3), 2.16 (s, 3H, NCH_3), 1.69–1.57 (m, 4H, $2CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 162.0 (C-7), 158.3 (C-2), 152.0 (C-4), 150.1 (C-8a), 143.0 (C-4′), 142.2 (C-4′′), 139.7 (C-1′), 138.4 (C-1′′), 130.8 (C-3′ and C-5′), 129.8 (C-3′′ and C-5′′), 129.5 (C-2′ and C-6′), 128.8 (C-2′′ and C-6′′), 128.0 (C-8), 122.1 (C-4a), 120.5 (C-6), 118.5 (C-3), 109.2 (C-5), 58.3 ($2NCH_2$), 56.8 (CH_3O), 56.5 ($2NCH_2$ pip.), 55.0 ($2NCH_2$), 54.6 ($2NCH_2$ pip.), 49.6 (NCH_2), 49.4 (NCH_2), 47.4 ($2NCH_3$), 28.3 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{40}H_{56}N_7O$: 650.455, Found: 650.475.

2,4-Bis{3-[(3-dimethylaminopropyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1q)

Yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.22 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-8), 8.14 (dd, 1H, J= 1.50 and 1.50 Hz, H-2′), 8.06 (ddd, 1H, J= 7.20, 1.50 and 1.50 Hz, H-6′), 7.87 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-5), 7.83 (s, 1H, H-3), 7.70 (ddd,1H, J= 8.10, 6.90 and 1.20 Hz, H-7), 7.51–7.28 (m, 7H, H-6, H-2′′, H-6′′, H-4′, H-4′′, H-5′ and H-5′′), 3.90 (s, 2H, NCH_2), 3.89 (s, 2H, NCH_2), 2.72 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.70 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.31 (t, 4H, J= 7.20 Hz, $2NCH_2$), 2.19 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.18 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.69 (qt, 4H, J= 7.20 Hz, $2CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 158.2 (C-2), 150.6 (C-4), 150.1 (C-8a), 142.4 (C-1′′ and C-3′), 141.1 (C-3′′), 139.8 (C-1′), 131.4 (C-6′), 130.8 (C-6′′), 130.5 (C-2′ and C-4′′), 130.3 (C-2′′), 130.0 (C-4′), 129.5 (C-7 and C-5′′), 128.7 (C-5′), 127.6 (C-8 and C-5), 127.2 (C-4a), 127.0 (C-6), 120.8 (C-3), 59.4 (NCH_2), 55.5 (NCH_2), 55.3 (NCH_2), 49.4 (NCH_2), 46.9 (NCH_3), 29.4 (CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{33}H_{44}N_5$: 510.360, Found: 510.391.

2,4-Bis{3-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1r)

Pale-yellow oil (88%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.22 (dd, 1H, J= 8.40 and 1.20 Hz, H-8), 8.14 (dd, 1H, J= 1.50 and 1.50 Hz, H-2′), 8.06 (ddd, 1H, J= 7.20, 1.50 and 1.50 Hz, H-6′), 7.88 (dd, 1H, J= 8.40 and 1.20 Hz, H-5), 7.83 (s, 1H, H-3), 7.72 (ddd,1H, J= 8.40, 7.20 and 1.20 Hz, H-7), 7.51–7.36 (m, 7H, H-6, H-2′′, H-6′′, H-4′, H-4′′, H-5′ and H-5′′), 3.91 (s, 2H, NCH_2), 3.90 (s, 2H, NCH_2), 2.76–2.69 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.70 (t, 2H, J= 7.20 Hz, NCH_2), 2.31 (t, 4H, J= 7.20 Hz, $2NCH_2$), 2.19 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.18 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.57–2.28 (m, 20H, $10NCH_2$), 2.22 (s, 3H, NCH_3), 2.19 (s, 3H, NCH_3), 1.72 (qt, 4H, J= 6.90 Hz, $2CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 158.2 (C-2), 150.6 (C-4), 150.1 (C-8a), 142.4 (C-1′′ and C-3′), 141.1 (C-3′′), 139.8 (C-1′), 131.4 (C-6′), 130.9 (C-6′′), 130.5 (C-2′) 130.4 (C-4′′), 130.3 (C-2′′), 130.0 (C-4′ and C-7), 129.5 (C-5′′), 128.6 (C-5′ and C-8), 127.6 (C-5), 127.3 (C-4a), 127.0 (C-6), 120.8 (C-3), 58.4 (NCH_2), 56.5 (NCH_2), 55.4 (NCH_2), 55.3 (NCH_2), 54.6 (NCH_2), 49.8 (NCH_2), 49.6 (NCH_2), 47.4 (NCH_3), 28.3 (CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{39}H_{54}N_7$: 620.444, Found: 620.924.

2,4-Bis{3-[(3-morpholinopropyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1s)

Yellow oil (90%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.22 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.00 Hz, H-8), 8.15 (dd, 1H, J= 1.50 and 1.50 Hz, H-2′), 8.05 (ddd, 1H, J= 7.50, 1.50 and 1.50 Hz, H-6′), 7.87 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.00 Hz, H-5), 7.82 (s, 1H, H-3), 7.71 (ddd,1H, J= 8.10, 6.90 and 1.00 Hz, H-7), 7.52–7.39 (m, 7H, H-6, H-2′′, H-6′′, H-4′, H-4′′, H-5′ and H-5′′), 3.89 (s, 2H, NCH_2), 3.88 (s, 2H, NCH_2), 3.65 (t, 4H, J= 4.80 Hz, $2OCH_2$), 3.63 (t, 4H, J= 4.80 Hz, $2OCH_2$), 2.75–2.68 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.41–2.36 (m, 12H, $6NCH_2$), 1.71 (qt, 4H, J= 7.20 Hz, $2CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 158.1 (C-2), 150.6 (C-4), 150.1 (C-8a), 142.3 (C-1′′ and C-3′), 141.1 (C-3′′), 139.8 (C-1′), 131.4 (C-6′), 130.9 (C-6′′), 130.5 (C-2′ and C-4′′), 130.3 (C-2′′), 130.0 (C-4′), 129.5 (C-5′′ and C-7), 128.7 (C-5′), 127.7 (C-5 and C-8), 127.2 (C-4a), 127.0 (C-6), 120.7 (C-3), 68.3 (OCH_2), 58.8 (NCH_2), 55.4 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 49.5 (NCH_2), 49.4 (NCH_2), 27.9 (CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{37}H_{48}N_5O_2$: 594.381, Found: 594.324.

2,4-Bis{3-[(2-morpholinoethyl)aminomethyl]phenyl}quinoline (1t)

Orange oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.26 (dd, 1H, J= 8.40 and 1.20 Hz, H-8), 8.18 (dd, 1H, J= 1.50 and 1.50 Hz, H-2′), 8.09 (ddd, 1H, J= 7.40, 1.50 and 1.50 Hz, H-6′), 7.91 (dd, 1H, J= 8.40 and 1.20 Hz, H-5), 7.85 (s, 1H, H-3), 7.75 (ddd,1H, J= 8.40, 6.90 and 1.20 Hz, H-7), 7.54–7.44 (m, 7H, H-6, H-2′′, H-6′′, H-4′, H-4′′, H-5′ and H-5′′), 3.96 (s, 2H, NCH_2), 3.95 (s, 2H, NCH_2), 3.68 (t, 4H, J= 4.80 Hz, $2OCH_2$), 3.67 (t, 4H, J= 4.80 Hz, $2OCH_2$), 2.79 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.77 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.54 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.53 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.44–2.40 (m, 8H, $6NCH_2$), 2.22 (bs, 2H, 2NH); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 156.8 (C-2), 149.2 (C-4), 148.8 (C-8a), 140.9 (C-1′′ and C-3′), 139.8 (C-3′′), 138.5 (C-1′), 130.1 (C-6′), 129.6 (C-6′′), 129.2 (C-2′ and C-4′′), 128.9 (C-2′′), 128.6 (C-4′), 128.2 (C-5′′ and C-7), 127.4 (C-5′), 126.3 (C-5 and C-8), 125.9 (C-4a), 125.6 (C-6), 119.4 (C-3), 67.0 (OCH_2), 58.2 (NCH_2), 53.7 (NCH_2), 45.4 (NCH_2), 45.2 (NCH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{35}H_{44}N_5O_2$: 566.349, Found: 566.339.

1,3-Bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)aminomethyl]phenyl}isoquinoline (2a)

Yellow oil (88%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.15 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′′ and H-5′′), 8.10 (d, 1H, J= 8.40 Hz, H-8), 8.01 (s, 1H, H-4), 7.86 (d, 1H, J= 8.40 Hz, H-5), 7.76 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.62 (t, 1H, J= 8.40 Hz, H-6), 7.48 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′′ and H-6′′), 7.45 (t, 1H, J= 8.40 Hz, H-7), 7.41 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 3.88 (s, 2H, NCH_2), 3.83 (s, 2H, NCH_2), 2.69 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.64 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.29–2.22 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.20 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.18 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.55–1.48 (m, 8H, $4CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 161.5 (C-3), 151.3 (C-1), 142.3 (C-4′), 142.0 (C-4′′), 139.9 (C-1′), 139.7 (C-1′′), 139.2 (C-4a), 131.7 (C-2′ and C-6′), 131.3 (C-6), 129.8 (C-2′′ and C-6′′), 129.4 (C-3′ and C-5′), 128.9 (C-7), 128.8 (C5), 128.4 (C-3′′ and C-5′′), 128.1 (C-

8), 127.1 (C-8a), 116.7 (C-4), 61.1 (2NCH_2), 55.1 (NCH_2), 50.7 (NCH_2), 50.6 (NCH_2), 46.8 (2 $N(CH_3)_2$), 29.3 (2CH_2), 26.9 (2CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{35}H_{48}N_5$: 538.391, Found: 538.389.

1,3-Bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)aminomethyl]phenyl}isoquinoline (2b)

Yellow oil (83%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.17 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3″ and H-5″), 8.13 (d, 1H, J= 8.10 Hz, H-8), 8.05 (s, 1H, H-4), 7.91 (d, 1H, J= 8.10 Hz, H-5), 7.78 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.67 (t, 1H, J= 8.10 Hz, H-6), 7.51 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2″ and H-6″), 7.47 (t, 1H, J= 8.10 Hz, H-7), 7.44 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 3.92 (s, 2H, NCH_2), 3.86 (s, 2H, NCH_2), 2.75 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.70 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.36 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.33 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.24 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.22 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.79–1.65 (m, 4H, 2CH_2); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 161.5 (C-3), 151.4 (C-1), 142.3 (C-4′), 142.1 (C-4″), 139.9 (C-1′), 139.7 (C-1″), 139.2 (C-4a), 131.7 (C-2′ and C-6′), 131.4 (C-6), 129.8 (C-2″ and C-6″), 129.4 (C-3′ and C-5′), 128.9 (C-7), 128.8 (C5), 128.5 (C-3″ and C-5″), 128.2 (C-8), 127.1 (C-8a), 116.8 (C-4), 59.5 (2NCH_2), 55.2 (2NCH_2), 49.3 (2NCH_2), 46.9 (2NCH_2), 29.4 (2CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{33}H_{44}N_5$: 510.359, Found: 510.360.

1,3-Bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)aminomethyl]phenyl}isoquinoline (2c)

Yellow oil (65%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.14 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3″ and H-5″), 8.09 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-8), 8.00 (s, 1H, H-4), 7.86 (dd, 1H, J= 8.10 and 1.20 Hz, H-5), 7.74 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.61 (ddd, 1H, J= 8.10, 7.90 and 1.20 Hz, H-6), 7.46 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2″ and H-6″), 7.45 (ddd, 1H, J= 8.10, 7.90 and 1.20 Hz, H-7), 7.39 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 3.87 (s, 2H, NCH_2), 3.81 (s, 2H, NCH_2), 2.66 (t, 2H, J= 6.80 Hz, NCH_2), 2.62 (t, 2H, J= 6.80 Hz, NCH_2), 2.45–2.28 (m, 20H, 2NCH_2 and 8 NCH_2pip.), 2.24 (s, 3H, NCH_3), 2.23 (s, 3H, NCH_3), 1.57–1.48 (m, 8H, 4CH_2); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 161.5 (C-3), 151.3 (C-1), 142.3 (C-4′), 142.1 (C-4″), 139.9 (C-1′), 139.6 (C-1″), 139.2 (C-4a), 131.6 (C-2′ and C-6′), 131.3 (C-6), 129.8 (C-2″ and C-6″), 129.3 (C-3′ and C-5′), 128.8 (C-7), 128.7 (C5), 128.4 (C-3″ and C-5″), 128.1 (C-8), 127.1 (C-8a), 116.7 (C-4), 59.9 (NCH_2), 56.5 (NCH_2pip.), 55.1 (NCH_2), 54.6 (NCH_2pip.), 50.7 (NCH_2), 50.6 (NCH_2), 47.4 (NCH_3), 29.5 (CH_2), 26.1 (CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{41}H_{58}N_7$: 648.475, Found: 648.473.

1,3-Bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)aminomethyl]phenyl}isoquinoline (2d)

Yellow oil (87%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.17 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3″ and H-5″), 8.12 (d, 1H, J= 8.10 Hz, H-8), 8.04 (s, 1H, H-4), 7.91 (d, 1H, J= 8.10 Hz, H-5), 7.77 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.66 (t, 1H, J= 8.10 Hz, H-6), 7.50 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2″ and H-6″), 7.48 (t, 1H, J= 8.10 Hz, H-7), 7.42 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 3.90 (s, 2H, NCH_2), 3.85 (s, 2H, NCH_2), 2.75 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.69 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.50–2.37 (m, 20H, 2NCH_2 and 8 NCH_2pip.), 2.27 (s, 3H, NCH_3), 2.26 (s, 3H, NCH_3), 1.80–1.67 (m, 8H, 4CH_2); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 161.6 (C-3), 151.3 (C-1), 142.3 (C-4′), 142.1 (C-4″), 139.9 (C-1′), 139.7 (C-1″), 139.2 (C-4a), 131.7 (C-2′ and C-6′), 131.4 (C-6), 129.8 (C-2″ and C-6″), 129.3 (C-3′ and C-5′), 128.9 (C-7), 128.8 (C5), 128.4 (C-3″ and C-5″), 128.2 (C-8), 127.1 (C-8a), 116.7 (C-4), 58.4 (NCH_2), 56.5 (NCH2pip.), 55.1 (NCH_2), 54.7 (NCH_2pip.), 49.6 (NCH_2), 49.4 (NCH_2), 47.4 (NCH_3), 28.4 (CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{39}H_{54}N_7$: 620.444, Found: 620.441.

7-Methoxy-1,3-bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)aminomethyl]phenyl}isoquinoline (2e)

Orange oil (85%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.13 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3″ and H-5″), 7.97 (s, 1H, H-4), 7.81 (d, 1H,J= 9.00 Hz, H-5), 7.79 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.51 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2″ and H-6″), 7.43 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-8), 7.41 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 7.32 (dd, 1H, J= 9.00 and 2.40 Hz, H-6), 3.91 (s, 2H, NCH_2), 3.85 (s, 2H, NCH_2), 3.81 (s, 3H, CH_3O), 2.73 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.67 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.31–2.24 (m, 4H, 2NCH_2), 2.22 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.20 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.59–1.48 (m, 8H, 4CH_2); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 159.9 (C-1), 159.6 (C-7), 149.7 (C-3), 142.1 (C-4′), 141.6 (C-4″), 140.2 (C-1′), 139.8 (C-1″), 134.8 (C-4a and C-8a), 131.4 (C-2′ and C-6′), 130.4 (C-5), 129.8 (C-2″ and C-6″), 129.5 (C-3′ and C-5′), 128.1 (C-3″ and C-5″), 124.2 (C-6), 116.7 (C-4), 106.6 (C-8), 61.1 (NCH_2), 56.8 (OCH_3), 55.2 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 50.8 (NCH_2), 50.6 (NCH_2), 46.8 (2 $N(CH_3)_2$), 29.4 (2CH_2), 27.0 (2CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{36}H_{50}N_5O$: 568.401, Found: 568.435.

7-Methoxy-1,3-bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)aminomethyl]phenyl}isoquinoline (2f)

Yellow oil (70%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.14 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-3″ and H-5″), 8.00 (s, 1H, H-4), 7.84 (d, 1H, J= 8.90 Hz, H-5), 7.81 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-3′ and H-5′), 7.51 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-2″ and H-6″), 7.44 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-8), 7.42 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-2′ and H-6′), 7.35(dd, 1H, J= 8.90 and 2.40 Hz, H-6), 3.93 (s, 2H, NCH_2), 3.86 (s, 2H, NCH_2), 3.84 (s, 3H, CH_3O), 2.77 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.70 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.37 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.31 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.25 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.23 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.80–1.66 (m, 8H, 4CH_2); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 159.9 (C-1), 159.6 (C-7), 149.8 (C-3), 142.2 (C-4′), 141.8 (C-4″), 140.2 (C-1′), 139.8 (C-1″), 134.8 (C-4a and C-8a), 131.4 (C-2′ and C-6′), 130.3 (C-5), 129.8 (C-2″ and C-6″), 129.4 (C-3′ and C-5′), 128.2 (C-3″ and C-5″), 124.3 (C-6), 116.7 (C-4), 106.7 (C-8), 59.4 (NCH_2), 56.8 (OCH_3), 55.3 (NCH_2), 49.4 (NCH_2), 49.2 (NCH_2), 46.9 (2 $N(CH_3)_2$), 29.4 (2CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{34}H_{46}N_5O$: 540.370, Found: 540.367.

7-Methoxy-1,3-bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)aminomethyl]phenyl}isoquinoline (2g)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.10 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3″ and H-5″), 7.94 (s, 1H, H-4), 7.78 (d, 1H, J= 9.00 Hz, H-5), 7.76 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.47 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2″ and H-6″), 7.40 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-8),7.38 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 7.29 (dd, 1H, J= 9.00 and 2.40 Hz, H-6), 3.87 (s, 2H, NCH_2), 3.81 (s, 2H, NCH_2), 3.78 (s, 3H, CH_3O), 2.70 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.63 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.45–2.28 (m, 20H, 2NCH_2 and 8NCH2pip.), 2.24 (s, 3H, NCH_3), 2.23 (s, 3H, NCH_3), 1.55–1.45 (m, 8H, 4CH_2); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 159.9 (C-1), 159.5 (C-7), 149.7 (C-3), 142.0 (C-4′), 141.5 (C-4″), 140.2 (C-1′), 139.8 (C-1″), 134.8 (C-4a and C-8a), 131.4 (C-2′ and C-6′), 130.2 (C-5), 129.8 (C-2″ and C-6″), 129.4 (C-3′ and C-5′), 128.2 (C-3″ and C-5″), 124.2 (C-6), 116.6 (C-4), 106.6 (C-8), 59.8 (NCH_2), 56.8 (OCH_3), 56.4 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 55.0 (NCH_2), 54.5 (NCH2pip.), 50.7 (NCH_2), 50.5 (NCH_2), 47.4 (NCH_3), 29.4 (2CH_2), 26.1 (2CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{42}H_{60}N_7O$: 678.486, Found: 678.492.

7-Methoxy-1,3-bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)aminomethyl]phenyl}isoquinoline (2h)

Yellow oil (98%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.13 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′′ and H-5′′), 7.98 (s, 1H, H-4), 7.82 (d, 1H, J= 9.00 Hz, H-5), 7.79 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.50 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′′ and H-6′′), 7.42 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-8), 7.41 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 7.33 (dd, 1H, J= 9.00 and 2.40 Hz, H-6), 3.91 (s, 2H, NCH_2), 3.83 (s, 2H, NCH_2), 3.82 (s, 3H, CH_3O), 2.76 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.72 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.48–2.30 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$pip.), 2.28 (s, 3H, NCH_3), 2.27 (s, 3H, NCH_3), 1.81–1.67 (m, 8H, $4CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 159.9 (C-1), 159.6 (C-7), 149.8 (C-3), 142.1 (C-4′), 141.6 (C-4′′), 140.2 (C-1′), 139.8 (C-1′′), 134.8 (C-4a and C-8a), 131.4 (C-2′ and C-6′), 130.3 (C-5), 129.8 (C-2′′ and C-6′′), 129.4 (C-3′ and C-5′), 128.2 (C-3′′ and C-5′′), 124.2 (C-6), 116.7 (C-4), 106.7 (C-8), 58.4 (NCH_2), 56.8 (OCH_3), 56.5 (NCH_2pip.), 55.2 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 54.6 (NCH_2pip.), 49.7 (NCH_2), 49.4 (NCH_2), 47.4 (NCH_3), 28.2 ($2CH_2$), 28.1 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{40}H_{56}N_7O$: 650.454, Found: 650.451.

6-Methoxy-1,3-bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)aminomethyl]phenyl}isoquinoline (2i)

Yellow oil (95%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.14 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′′ and H-5′′), 8.00 (d, 1H, J= 9.30 Hz, H-8), 7.94 (s, 1H, H-4), 7.74 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.48 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′′ and H-6′′), 7.42 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 7.15 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-5), 7.09 (dd, 1H, J= 9.30 and 2.40 Hz, H-7), 3.94 (s, 3H, CH_3O),) , 3.89 (s, 2H, NCH_2), 3.84 (s, 2H, NCH_2),2.70 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.66 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.28–2.19 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.21 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.20 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.57–1.51 (m, 8H, $4CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 161.9 (C-3), 161.0 (C-6), 151.9 (C-1), 142.2 (C-4′), 142.0 (C-4′′), 141.2 (C-4a), 140.0 (C-1′), 139.9 (C-1′′), 131.6 (C-2′ and C-6′), 130.7 (C-7), 129.8(C-2′′ and C-6′′), 129.4 (C-3′ and C-5′), 128.5 (C-3′′ and C-5′′), 122.8 (C-8a), 120.9 (C-5), 116.2 (C-4), 106.3 (C-8), 61.1 ($2NCH_2$), 56.8 (OCH_3), 55.1 ($2NCH_2$), 50.6 ($2NCH_2$), 46.8 ($2\,N(CH_3)_2$), 29.3 ($2CH_2$), 26.9 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{36}H_{50}N_5O$: 568.401, Found: 568.407.

6-Methoxy-1,3-bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)aminomethyl]phenyl}isoquinoline (2j)

Pale-yellow oil (96%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.11 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′′ and H-5′′), 7.96 (d, 1H, J= 9.00 Hz, H-8), 7.89 (s, 1H, H-4), 7.71 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.45 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′′ and H-6′′), 7.38 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 7.10 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-5), 7.04 (dd, 1H, J= 9.00 and 2.40 Hz, H-7), 3.88 (s, 3H, CH_3O),) , 3.86 (s, 2H, NCH_2), 3.81 (s, 2H, NCH_2), 2.70 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.65 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.32 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.29 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.20 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.18 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.71–1.63 (m, 4H, $2CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 161.9 (C-3), 160.9 (C-6), 151.9 (C-1), 142.1 (C-4′), 141.9 (C-4′′), 141.2 (C-4a), 140.0 (C-1′), 139.8 (C-1′′), 131.5 (C-2′ and C-6′), 130.6 (C-7), 129.7 (C-2′′ and C-6′′), 129.3 (C-3′ and C-5′), 128.4 (C-3′′ and C-5′′), 122.8 (C-8a), 119.9 (C-5), 116.2 (C-4), 106.2 (C-8), 59.4 ($2NCH_2$), 56.7 (OCH_3), 55.1 ($2NCH_2$), 49.1 ($2NCH_2$), 46.9 ($2\,N(CH_3)_2$), 29.4 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{34}H_{46}N_5O$: 540.370, Found: 540.368.

6-Methoxy-1,3-bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)aminomethyl]phenyl}isoquinoline (2k)

Yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.11 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′′ and H-5′′), 7.97 (d, 1H, J= 9.30 Hz, H-8), 7.91 (s, 1H, H-4), 7.71 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.44 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′′ and H-6′′), 7.38 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 7.12 (d, 1H, J= 2.40 Hz, H-5), 7.06 (dd, 1H, J= 9.30 and 2.40 Hz, H-7), 3.91 (s, 3H, CH_3O),) , 3.86 (s, 2H, NCH_2), 3.81 (s, 2H, NCH_2), 2.67–2.62 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.41–2.30 (m, 20H, $2NCH_2$ and 8NCH2pip.), 2.24 (s, 3H, NCH_3), 2.23 (s, 3H, NCH_3), 1.53–1.48 (m, 8H, $4CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 161.9 (C-3), 161.0 (C-6), 151.9 (C-1), 142.3 (C-4′), 142.1 (C-4′′), 141.2 (C-4a), 140.0 (C-1′), 139.8 (C-1′′), 131.6 (C-2′ and C-6′), 130.7 (C-7), 129.7 (C-2′′ and C-6′′), 129.3 (C-3′ and C-5′), 128.4 (C-3′′ and C-5′′), 122.8 (C-8a), 120.9 (C-5), 116.2 (C-4), 106.2 (C-8), 59.9 (NCH_2), 56.8 (OCH_3), 55.2 (NCH_2), 54.6 (NCH_2pip.), 50.7 (NCH_2), 50.6 (NCH_2), 47.4 (NCH_3), 29.5 ($2CH_2$), 26.1 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{42}H_{60}N_7O$: 678.486, Found: 678.485.

6-Methoxy-1,3-bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-ylpropyl)aminomethyl]phenyl}isoquinoline (2l)

Yellow oil (59%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.14 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-3′′ and H-5′′), 8.00 (d, 1H, J= 9.20 Hz, H-8), 7.95 (s, 1H, H-4), 7.74 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-3′ and H-5′), 7.48 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2′′ and H-6′′), 7.42 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2′ and H-6′), 7.16 (d, 1H, J= 2.50 Hz, H-5), 7.10 (dd, 1H, J= 9.20 and 2.50 Hz, H-7), 3.96 (s, 3H, CH_3O),) , 3.89 (s, 2H, NCH_2), 3.84 (s, 2H, NCH_2), 2.73 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.69 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.47 (bs, 2H, 2NH), 2.46–2.38 (m, 16H, $8NCH_2$pip.), 2.44 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.41 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.27 (s, 3H, NCH_3), 2.26 (s, 3H, NCH_3), 1.79–1.67 (m, 4H, $2CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 162.0 (C-3), 161.0 (C-6), 152.0 (C-1), 142.2 (C-4′), 142.1 (C-4′′), 141.2 (C-4a), 140.0 (C-1′), 139.8 (C-1′′), 131.6 (C-2′ and C-6′), 130.7 (C-7), 129.7 (C-2′′ and C-6′′), 129.3 (C-3′ and C-5′), 128.4 (C-3′′ and C-5′′), 122.8 (C-8a), 120.9 (C-5), 116.2 (C-4), 106.2 (C-8), 58.4 (NCH_2), 56.8 (OCH_3), 56.5 (NCH_2pip.), 55.1 (NCH_2), 54.6 (NCH_2), 49.5 (NCH_2), 47.4 (NCH_3), 28.3 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{40}H_{56}N_7O$: 650.454, Found: 650.451.

2,4-Bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3a)

Yellow oil (83%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.69 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 8.17 (dd, 1H, J= 8.40 and 1.20 Hz, H-8), 8.14 (dd, 1H, J= 8.40 and 1.20 Hz, H-5), 7.91 (ddd, 1H, J= 8.40, 7.00 and 1.20 Hz, H-7), 7.89 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-2′′ and H-6′′), 7.63 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.57 (ddd, 1H, J= 8.40, 7.00 and 1.20 Hz, H-6), 7.55 (d, 2H, J= 8.10 Hz, H-3′′ and H-5′′), 3.99 (s, 2H, NCH_2), 3.96 (s, 2H, NCH_2), 2.79 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.77 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.37–2.32 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.26 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.19 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.76–1.52 (m, 8H, $4CH_2$). 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 169.5 (C-2), 161.5 (C-4), 153.3 (C-8a), 144.2 (C-4′′), 143.9 (C-4′), 138.4 (C-1′′), 137.7 (C-1′), 134.8 (C-7), 131.7 (C-3′′and C-5′′), 130.4 (C-8), 130.1 (C-3′, C-5′,C-2′′, C-6′′, C-2′ and C-6′), 128.4 (C-5), 128.2 (C-6), 123.0 (C-4a), 61.0 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 50.7 (NCH_2), 50.6(NCH_2), 46.8 ($2\,N(CH_3)_2$), 29.3 ($2CH_2$), 26.8 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS *m/z* $[M+H]^+$ Calc for $C_{34}H_{47}N_6$: 539.386, Found: 539.245.

2,4-Bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3b)

Yellow oil (97%); IR ν_{max} (KBr)/cm^{-1} 3290 (NH), 1610 (C = N); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.64 (d, 2H, J = 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 8.13 (d, 2H, J = 9.00 Hz, H-8 and H-5), 7.90–7.84 (m, 3H, H-7, H-2″ and H-6″), 7.57–7.46 (m, 5H, H-3′, H-5′, H-6, H-3″ and H-5″), 3.93 (s, 2H, NCH_2), 3.87 (s, 2H, NCH_2), 2.75 (t, 2H, J = 6.90 Hz, NCH_2), 2.70 (t, 2H, J = 6.90 Hz, NCH_2), 2.36 (t, 2H, J = 6.90 Hz, NCH_2), 2.33 (t, 2H, J = 6.90 Hz, NCH_2), 2.24 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.22 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.79–1.70 (m, 4H, $2CH_2$). 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 169.5 (C-2), 161.5 (C-4), 153.4 (C-8a), 144.3 (C-4″), 144.0 (C-4′), 138.4 (C-1″), 137.7 (C-1′), 134.9 (C-7), 131.7 (C-3″ and C-5″), 130.5 (C-8), 130.1 (C-3′, C-5′), 129.6 (C-2″, C-6″, C-2′ and C-6′), 128.4 (C-5), 128.2 (C-6), 123.0 (C-4a), 59.5 (NCH_2), 55.2 (NCH_2), 49.4 (NCH_2), 49.2 (NCH_2), 47.00 ($2N(CH_3)_2$), 29.4 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS *m/z* $[M+H]^+$ Calc for $C_{32}H_{43}N_6$: 511.355, Found: 511.400.

2,4-Bis{4-[(2-dimethylaminoethyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3c)

Yellow oil (85%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.64 (d, 2H, J = 8.20 Hz, H-2′ and H-6′), 8.14–8.10 (m, 2H, H-8 and H-5), 7.88–7.83 (m, 3H, H-7, H-2″ and H-6″), 7.56 (d, 2H, J = 8.20 Hz, H-3′ and H-5′), 7.49–7.45 (m, 3H, H-6, H-3″ and H-5″), 3.95 (s, 2H, NCH_2), 3.90 (s, 2H, NCH_2), 2.77 (t, 2H, J = 6.40 Hz, NCH_2), 2.71 (t, 2H, J = 6.40 Hz, NCH_2), 2.47 (t, 2H, J = 6.40 Hz, NCH_2), 2.44 (t, 2H, J = 6.40 Hz, NCH_2), 2.24 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.19 (s, 6H, $N(CH_3)_2$).13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 169.5 (C-2), 161.5 (C-4), 153.4 (C-8a), 144.4 (C-4″), 144.0 (C-4′), 138.3 (C-1″), 137.7 (C-1′), 134.8 (C-7), 131.7 (C-3″ and C-5″), 130.4(C-8), 130.1 (C-3′, C-5′), 129.7 (C-2″ and C-6″), 129.6 (C-2′ and C-6′), 128.4 (C-5), 128.2 (C-6), 123.0 (C-4a), 60.5 (NCH_2), 55.2 (NCH_2), 48.2 (NCH_2), 49.2 (NCH_2), 47.8 (NCH_2), 47.0 ($N(CH_3)_2$),46.9 ($N(CH_3)_2$); MALDI-TOF MS *m/z* $[M+H]^+$ Calc for $C_{30}H_{39}N_6$: 483.324, Found: 483.397.

2,4-Bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3d)

Yellow oil (73%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.63 (d, 2H, J = 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 8.15–8.10 (m, 2H, H-8 and H-5), 7.87 (ddd, 1H, J = 8.10, 7.20 and 1.50 Hz, H-7), 7.84 (d, 2H, J = 8.40 Hz, H-2″ and H-6″), 7.54 (d, 2H, J = 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.52 (ddd, 1H, J = 8.10, 7.20 and 1.50 Hz, H-6), 7.45 (d, 2H, J = 8.40 Hz, H-3″ and H-5″), 3.91 (s, 2H, NCH_2), 3.87 (s, 2H, NCH_2), 2.71–2.55 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.46–2.34 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$pip.), 2.27 (s, 3H, NCH_3), 2.26 (s, 3H, NCH_3), 1.57–1.50 (m, 8H, $4CH_2$). 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 169.5 (C-2), 161.5 (C-4), 153.3 (C-8a), 144.3 (C-4″), 143.9 (C-4′), 138.4 (C-1″), 137.7 (C-1′), 134.9 (C-7), 131.7 (C-3″ and C-5″), 130.5 (C-8), 130.1 (C-3′ and C-5′), 129.6 (C-2″, C-6″, C-2′ and C-6′), 128.7 (C-5), 128.3 (C-6), 123.0 (C-4a), 59.8 (NCH_2), 56.5 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 54.6 (NCH_2), 50.7 (NCH_2), 50.6 (NCH_2), 47.4 ($2NCH_3$), 29.4 ($2CH_2$), 26.1 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS *m/z* $[M+H]^+$ Calc for $C_{40}H_{57}N_8$: 649.471, Found: 649.291.

2,4-Bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3e)

Yellow oil (70%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.62 (d, 2H, J = 8.25 Hz, H-2′ and H-6′), 8.13–8.09 (m, 2H, H-8 and H-5), 7.87 (ddd, 1H, J = 8.10, 6.90 and 1.20 Hz, H-7), 7.83 (d, 2H, J = 8.25 Hz, H-2″ and H-6″), 7.53 (d, 2H, J = 8.25 Hz, H-3′ and H-5′), 7.51 (ddd, 1H, J = 8.10, 6.90 and 1.20 Hz, H-6), 7.45 (d, 2H, J = 8.25 Hz, H-3″ and H-5″), 3.90 (s, 2H, NCH_2), 3.86 (s, 2H, NCH_2), 2.73 (t, 2H, J = 6.90 Hz, NCH_2), 2.68 (t, 2H, J = 6.90 Hz, NCH_2), 2.46–2.35 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$pip.), 2.26 (s, 3H, NCH_3), 2.25 (s, 3H, NCH_3), 1.77–1.68 (m, 4H, $2CH_2$). 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 169.5 (C-2), 161.5 (C-4), 153.3 (C-8a), 144.2 (C-4″), 143.9 (C-4′), 138.4 (C-1″), 137.7 (C-1′), 134.9 (C-7), 131.7 (C-3″ and C-5″), 130.4 (C-8), 130.1 (C-3′ and C-5′), 129.6 (C-2″, C-6″, C-2′ and C-6′), 128.6 (C-5), 128.2 (C-6), 123.0 (C-4a), 58.4 (NCH_2), 56.5 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 54.6 (NCH_2), 49.6 (NCH_2), 49.5(NCH_2), 47.4 ($2NCH_3$), 28.2 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{38}H_{53}N_8$: 621.439, Found: 621.626.

2,4-Bis{4-[(3-morpholinopropyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3f)

Yellow oil (95%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.66 (d, 2H, J = 8.10 Hz, H-3″ and H-5″), 8.14 (dd, 1H, J = 8.10 and 1.20 Hz, H-8), 8.11 (dd, 1H, J = 8.10 and 1.20 Hz, H-5), 7.91 (ddd,1H, J = 8.10, 7.20 and 1.20 Hz, H-7), 7.86 (d, 2H, J = 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.59 (d, 2H, J = 8.10 Hz, H-2″ and H-6″), 7.54 (ddd,1H, J = 8.10, 7.20 and 1.20 Hz, H-6), 7.51 (d, 2H, J = 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 3.97 (s, 2H, NCH_2), 3.94 (s, 2H, NCH_2), 3.68 (t, 4H, J = 4.50 Hz, $2OCH_2$), 3.68 (t, 4H, J = 4.50 Hz, $2OCH_2$), 2.81 (t, 2H, J = 6.60 Hz, NCH_2), 2.80 (t, 2H, J = 6.60 Hz, NCH_2), 2.49–2.40 (m, 12H, $6NCH_2$), 1.85–1.75 (m, 4H, $2CH_2$). 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 169.4 (C-2), 161.2 (C-4), 153.3 (C-8a), 142.6 (C-4″), 142.0 (C-4′), 138.9 (C-1″), 138.0 (C-1′), 135.0 (C-7), 131.8 (C-3″ and C-5″), 130.5 (C-8), 130.3 (C-3′ and C-5′), 130.0 (C-2″ and C-6″), 129.8 (C-2″ and C-6′), 128.4 (C-5), 128.3 (C-6), 123.0 (C-4a), 68.3 (OCH_2), 58.8 (NCH_2), 58.7 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 54.7 (NCH_2), 54.5 (NCH_2), 49.2 (NCH_2), 27.4 (CH_2), 26.8 (CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{36}H_{47}N_6O_2$: 595.376, Found: 595.326.

2,4-Bis{4-[(2-morpholinoethyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3g)

Yellow oil (78%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.65 (d, 2H, J = 8.10 Hz, H-3″ and H-5″), 8.14 (dd, 1H, J = 8.40 and 1.50 Hz, H-8), 8.12 (dd, 1H, J = 8.40 and 1.50 Hz, H-5), 7.87 (ddd,1H, J = 8.40, 7.20 and 1.50 Hz, H-7), 7.86 (d, 2H, J = 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.58–7.46 (m, 5H, H-2″, H-6″,H-6, H-2′ and H-6′), 3.95 (s, 2H, NCH_2), 3.91 (s, 2H, NCH_2), 3.74–3.68 (m, 8H, $4OCH_2$), 2.79 (t, 2H, J = 6.30 Hz, NCH_2), 2.73 (t, 2H, J = 6.30 Hz, NCH_2), 2.57 (t, 2H, J = 6.30 Hz, NCH_2), 2.51 (t, 2H, J = 6.30 Hz, NCH_2), 2.47–2.38 (m, 8H, $4NCH_2$), 2.20 (bs, 2H, 2NH). 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 169.5 (C-2), 161.5 (C-4), 153.4 (C-8a), 144.3 (C-4″), 143.9 (C-4′), 138.4 (C-1″), 137.7 (C-1′), 134.9 (C-7), 131.7 (C-3″ and C-5″), 130.5 (C-8), 130.1 (C-3′ and C-5′), 129.6 (C-2″ and C-6″), 129.5 (C-2′ and C-6′), 128.4 (C-5), 128.3 (C-6), 123.0 (C-4a), 68.4 (OCH_2), 59.6 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 55.0 (NCH_2), 46.8 (NCH_2), 46.5 (NCH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{34}H_{43}N_6O_2$: 567.345, Found: 567.326.

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3h)

Yellow oil (96%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.58 (d, 2H, J = 8.10 Hz, H-2″ and H-6″), 8.00 (d, 1H, J = 9.20 Hz, H-8), 7.84 (d, 2H, J = 8.10 Hz, H-2′ and H-6′), 7.53 (d, 2H, J = 8.10 Hz, H-3″ and H-5″), 7.49 (dd, 1H, J = 9.20 and 2.80 Hz, H-7), 7.44 (d, 2H, J = 8.10 Hz, H-3′ and H-5′), 7.36 (d, 1H, J = 2.80 Hz, H-5), 3.90 (s, 2H, NCH_2), 3.86 (s, 2H, NCH_2), 3.81 (s, 3H, CH_3O), 2.71 (t, 2H, J = 7.00 Hz, NCH_2), 2.65 (t, 2H, J = 7.00 Hz, NCH_2), 2.26 (t, 2H, J = 7.00 Hz, NCH_2), 2.24 (t, 2H, J = 7.00 Hz, NCH_2), 2.20 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.17 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.56–1.48 (m, 8H, $4CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 167.6 (C-6), 159.7 (C-2), 159.4 (C-4), 149.5 (C-8a), 143.3 (C-4′), 143.1

(C-4″), 138.7 (C-1′), 138.1 (C-1″), 131.9 (C-8), 131.3 (C-3′ and C-5′), 129.8 (C-3″ and C-5″, C-2′ and C-6′, C-2″ and C-6″), 127.5 (C-7), 123.7 (C-4a), 105.7 (C-5), 60.9 (NCH_2), 60.8 (NCH_2), 57.0 (CH_3O), 54.9 (NCH_2), 54.8 (NCH_2), 50.7 (NCH_2), 50.4 (NCH_2), 46.7 ($N(CH_3)_2$), 46.5 ($N(CH_3)_2$), 29.1 ($2CH_2$), 26.9 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H^+]$ Calc for $C_{35}H_{49}N_6O$: 569.397, Found: 569.332.

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3i)

Yellow oil (97%); ^1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.55 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-2″ and H-6″), 7.96 (d, 1H, J= 9.30 Hz, H-8), 7.80 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-2′ and H-6′), 7.48 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-3″ and H-5″), 7.43 (dd, 1H, J= 9.30 and 2.80 Hz, H-7), 7.40 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-3′ and H-5′), 7.31 (d, 1H, J= 2.80 Hz, H-5), 3.85 (s, 2H, NCH_2), 3.81 (s, 2H, NCH_2), 3.75 (s, 3H, CH_3O), 2.69 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.64 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.30 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.26 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.18 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.16 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.72–1.59 (m, 4H, $2CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 167.6 (C-6), 159.8 (C-2), 159.2 (C-4), 149.4 (C-8a), 143.9 (C-4′), 143.8 (C-4″), 138.4 (C-1′), 137.9 (C-1″), 131.9 (C-8), 131.3 (C-3′ and C-5′), 129.7 (C-3″ and C-5″), 129.5 (C-2′ and C-6′, C-2″ and C-6″), 127.4 (C-7), 123.6 (C-4a), 105.7 (C-5), 59.4 ($2NCH_2$), 56.9 (CH_3O), 55.1 ($2NCH_2$), 49.4 (NCH_2), 49.2 (NCH_2), 46.9 ($2N(CH_3)_2$), 29.4 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{33}H_{45}N_6O$: 541.365, Found: 541.376.

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(2-dimethylaminoethyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3j)

Yellow oil (97%); ^1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.56 (d, 2H, J= 8.15 Hz, H-2″ and H-6″), 7.97 (d, 1H, J= 9.00 Hz, H-8), 7.82 (d, 2H, J= 8.15 Hz, H-2′ and H-6′), 7.51 (d, 2H, J= 8.15 Hz, H-3″ and H-5″), 7.44 (dd, 1H, J= 9.00 and 2.60 Hz, H-7), 7.42 (d, 2H, J= 8.15 Hz, H-3′ and H-5′), 7.32 (d, 1H, J= 2.60 Hz, H-5), 3.89 (s, 2H, NCH_2), 3.84 (s, 2H, NCH_2), 3.76 (s, 3H, CH_3O), 2.73 (t, 2H, J= 7.10 Hz, NCH_2), 2.66 (t, 2H, J= 6.00 Hz, NCH_2), 2.43 (t, 2H, J= 6.00 Hz, NCH_2), 2.39 (t, 2H, J= 6.00 Hz, NCH_2), 2.19 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.15 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 167.7 (C-6), 159.8 (C-2), 159.3 (C-4), 149.4 (C-8a), 143.9 (C-4′), 143.7 (C-4″), 138.4 (C-1′), 137.9 (C-1″), 131.9 (C-8), 131.3 (C-3′ and C-5′), 129.7 (C-3″ and C-5″, C-2′ and C-6′), 129.6 (C-2″ and C-6″), 127.5 (C-7), 123.7 (C-4a), 105.6 (C-5), 60.4 ($2NCH_2$), 56.9 (CH_3O), 55.2 ($2NCH_2$), 48.2 (NCH_2), 47.8 (NCH_2), 46.9 ($2N(CH_3)_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{31}H_{41}N_6O$: 513.334, Found: 513.316.

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3k)

Yellow oil (97%); ^1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.54 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-2″ and H-6″), 7.97 (d, 1H, J= 9.20 Hz, H-8), 7.81 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-2′ and H-6′), 7.49 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-3″ and H-5″), 7.47 (dd, 1H, J= 9.20 and 2.80 Hz, H-7), 7.39 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-3′ and H-5′), 7.33 (d, 1H, J= 2.80 Hz, H-5), 3.86 (s, 2H, NCH_2), 3.80 (s, 2H, NCH_2), 3.77 (s, 3H, CH_3O), 2.70 (t, 2H, J= 6.75 Hz, NCH_2), 2.63 (t, 2H, J= 6.75 Hz, NCH_2), 2.50–2.30 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$ pip.), 2.22 (s, 3H, NCH_3), 2.21 (s, 3H, NCH_3), 1.75–1.61 (m, 4H, $2CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 167.6 (C-6), 159.8 (C-2), 159.3 (C-4), 149.5 (C-8a), 143.9 (C-4′), 143.8 (C-4″), 138.4 (C-1′), 137.9 (C-1″), 131.9 (C-8), 131.3 (C-3′ and C-5′), 129.7 (C-3″ and C-5″, C-2′ and C-6′), 129.5 (C-2″ and C-6″), 127.4 (C-7), 123.7 (C-4a), 105.7 (C-5), 58.4 ($2NCH_2$), 56.9 (CH_3O), 56.5 ($2NCH_2$ pip.), 55.1 ($2NCH_2$), 54.6 ($2NCH_2$ pip.), 49.7 (NCH_2), 49.4 (NCH_2), 47.4 ($2NCH_3$), 28.4 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{39}H_{55}N_8O$: 651.450, Found: 651.394.

6-Methoxy-2,4-bis{4-[(2–(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3l)

Yellow oil (96%); ^1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.59 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2″ and H-6″), 8.04 (d, 1H, J= 9.20 Hz, H-8), 7.87 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2′ and H-6′), 7.55 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-3″ and H-5″), 7.52 (dd, 1H, J= 9.20 and 2.80 Hz, H-7), 7.44 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-3′ and H-5′), 7.39 (d, 1H, J= 2.80 Hz, H-5), 3.94 (s, 2H, NCH_2), 3.88 (s, 2H, NCH_2), 3.84 (s, 3H, CH_3O), 2.79 (t, 2H, J= 6.00 Hz, NCH_2), 2.71 (t, 2H, J= 6.00 Hz, NCH_2), 2.58–2.44 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$ pip.), 2.28 (s, 3H, NCH_3), 2.27 (s, 3H, NCH_3); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 167.7 (C-6), 159.8 (C-2), 159.3 (C-4), 149.5 (C-8a), 143.7 (C-4′, C-4″), 138.5 (C-1′), 138.0 (C-1″), 132.0 (C-8), 131.3 (C-3′ and C-5′), 129.7 (C-3″ and C-5″, C-2′ and C-6′, C-2″ and C-6″), 127.5 (C-7), 123.7 (C-4a), 105.7 (C-5), 59.1 ($2NCH_2$), 57.0 (CH_3O), 56.5 ($2NCH_2$ pip.), 55.1 (NCH_2), 54.8 (NCH_2), 54.5 ($2NCH_2$ pip.), 47.4 ($2NCH_2$), 47.2 (NCH_2), 46.8 (NCH_3); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{37}H_{53}N_8O$: 625.434, Found: 625.593.

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3 m)

Pale yellow oil (89%); ^1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.61 (d, 2H, J= 7.95 Hz, H-2″ and H-6″), 7.99 (d, 1H, J= 9.15 Hz, H-5), 7.82 (d, 2H, J= 7.95 Hz, H-2′ and H-6′), 7.53 (d, 2H, J= 7.95 Hz, H-3″ and H-5″), 7.46 (d, 2H, J= 7.95 Hz, H-3′ and H-5′), 7.41 (d, 1H, J= 2.10 Hz, H-8), 7.13 (dd, 1H, J= 9.15 and 2.10 Hz, H-6), 3.99 (s, 3H, CH_3O), 3.91 (s, 2H, NCH_2), 3.87 (s, 2H, NCH_2), 2.70 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.66 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.30–2.25 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.21 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.19 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.57–1.52 (m, 8H, $4CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 168.3 (C-7), 165.1 (C-2), 162.1 (C-4), 155.8 (C-8a), 143.7 (C-4′, C-4″), 138.7 (C-1′), 137.9 (C-1″), 131.6 (C-3′ and C-5′), 130.1 (C-3″ and C-5″), 129.7 (C-5, C-2′ and C-6′, C-2″ and C-6″), 121.4 (C-6), 118.4 (C-4a), 108.0 (C-8), 60.9 ($2NCH_2$), 57.1 (CH_3O), 55.0 ($2NCH_2$), 50.6 (NCH_2), 50.1 (NCH_2), 46.7 ($2N(CH_3)_2$), 29.7 ($2CH_2$), 26.9 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{35}H_{49}N_6O$: 569.397, Found: 569.455.

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(3-dimethylaminopropyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3n)

Yellow oil (96%); ^1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.59 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2″ and H-6″), 7.98 (d, 1H, J= 9.20 Hz, H-5), 7.80 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2′ and H-6′), 7.51 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-3″ and H-5″), 7.44 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-3′ and H-5′), 7.40 (d, 1H, J= 2.50 Hz, H-8), 7.11 (dd, 1H, J= 9.20 and 2.50 Hz, H-6), 3.97 (s, 3H, CH_3O), 3.89 (s, 2H, NCH_2), 3.85 (s, 2H, NCH_2), 2.71 (t, 2H, J= 7.05 Hz, NCH_2), 2.67 (t, 2H, J= 7.05 Hz, NCH_2), 2.33 (t, 2H, J= 7.05 Hz, NCH_2), 2.30 (t, 2H, J= 7.05 Hz, NCH_2), 2.22 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.20 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.76–1.63 (m, 4H, $2CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 168.3 (C-7), 165.0 (C-2), 162.1 (C-4), 155.8 (C-8a), 144.2 (C-4′), 143.8 (C-4″), 138.5 (C-1′), 137.8 (C-1″), 131.6 (C-3′ and C-5′), 130.0 (C-3″ and C-5″), 129.7 (C-5), 129.5 (C-2′ and C-6′, C-2″ and C-6″), 121.4 (C-6), 118.4 (C-4a), 107.8 (C-8), 59.4 (NCH_2), 59.3 (NCH_2), 57.1 (CH_3O), 55.2 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 49.3 (NCH_2), 49.2 (NCH_2), 46.9 ($N(CH_3)_2$), 46.8 ($N(CH_3)_2$), 29.4 (CH_2), 29.3 (CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{33}H_{45}N_6O$: 541.36, Found: 541.476.

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(2-dimethylaminoethyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3o)

Yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.60 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-2″ and H-6″), 7.98 (d, 1H, J= 9.20 Hz, H-5), 7.79 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-2′ and H-6′), 7.51 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-3″ and H-5″), 7.45 (d, 2H, J= 8.25 Hz, H-3′ and H-5′), 7.38 (d, 1H, J= 2.50 Hz, H-8), 7.10 (dd, 1H, J= 9.20 and 2.50 Hz, H-6), 3.96 (s, 3H, CH_3O), 3.90 (s, 2H, NCH_2), 3.87 (s, 2H, NCH_2), 2.72 (t, 2H, J= 6.10 Hz, NCH_2), 2.68 (t, 2H, J= 6.10 Hz, NCH_2), 2.44 (t, 2H, J= 6.10 Hz, NCH_2), 2.41 (t, 2H, J= 6.10 Hz, NCH_2), 2.20 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.17 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 168.3 (C-7), 165.0 (C-2), 162.1 (C-4), 155.8 (C-8a), 144.3 (C-4′), 143.8 (C-4″), 138.4 (C-1′), 137.8 (C-1″), 131.5 (C-3′ and C-5′), 130.0 (C-3″ and C-5″), 129.6 (C-5, C-2′ and C-6′, C-2″ and C-6″), 121.3 (C-6), 118.4 (C-4a), 108.0 (C-8), 60.5 ($2NCH_2$), 57.1 (CH_3O), 55.2 ($2NCH_2$), 48.1 (NCH_2), 47.7 (NCH_2), 46.9 ($2\,N(CH_3)_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{31}H_{41}N_6O$: 513.334, Found: 513.456.

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(4–(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3p)

Yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.52 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-2″ and H-6″), 7.89 (d, 1H, J= 9.30 Hz, H-5), 7.72 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-2′ and H-6′), 7.44 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-3″ and H-5″), 7.38 (d, 2H, J= 8.30 Hz, H-3′ and H-5′), 7.30 (d, 1H, J= 2.30 Hz, H-8), 7.02 (dd, 1H, J= 9.30 and 2.30 Hz, H-6), 3.88 (s, 3H, CH_3O), 3.81 (s, 2H, NCH_2), 3.78 (s, 2H, NCH_2), 2.60 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.57 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.40–2,21 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$ pip.), 2.17 (s, 3H, NCH_3), 2.16 (s, 3H, NCH_3), 1.48–1.44 (m, 8H, $4CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 168.1 (C-7), 164.9 (C-2), 161.8 (C-4), 155.7 (C-8a), 144.5 (C-4′), 143.2 (C-4″), 138.5 (C-1′), 137.8 (C-1″), 131.5 (C-3′ and C-5′), 130.0 (C-3″ and C-5″), 129.6 (C-5, C-2′ and C-6′, C-2″ and C-6″), 121.3 (C-6), 118.2 (C-4a), 107.9 (C-8), 59.7 ($2NCH_2$), 57.0 (CH_3O), 56.4 ($2NCH_2$ pip.), 54.8 ($2NCH_2$), 54.5 ($2NCH_2$ pip.), 50.5 (NCH_2), 50.4 (NCH_2), 47.3 ($2NCH_3$), 29.2 ($2CH_2$), 26.0 ($2CH_2$); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{41}H_{59}N_8O$: 679.481, Found: 679.506.

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3q)

Yellow oil (97%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.55 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2″ and H-6″), 7.92 (d, 1H, J= 9.10 Hz, H-5), 7.75 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-2′ and H-6′), 7.46 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-3″ and H-5″), 7.39 (d, 2H, J= 8.20 Hz, H-3′ and H-5′), 7.34 (d, 1H, J= 2.50 Hz, H-8), 7.05 (dd, 1H, J= 9.10 and 2.50 Hz, H-6), 3.92 (s, 3H, CH_3O), 3.84 (s, 2H, NCH_2), 3.80 (s, 2H, NCH_2), 2.67 (t, 2H, J= 7.05 Hz, NCH_2), 2.63 (t, 2H, J= 7.05 Hz, NCH_2), 2.38–2.34 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$ pip.), 2.21 (s, 3H, NCH_3), 2.20 (s, 3H, NCH_3), 1.71–1.63 (m, 4H, $2CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 168.3 (C-7), 165.0 (C-2), 162.2 (C-4), 155.8 (C-8a), 144.3 (C-4′), 143.9 (C-4″), 138.4 (C-1′), 137.8 (C-1″), 131.5 (C-3′ and C-5′), 130.0 (C-3″ and C-5″), 129.7 (C-5), 129.4 (C-2′ and C-6′, C-2″ and C-6″), 121.3 (C-6), 118.3 (C-4a), 107.9 (C-8), 58.4 (NCH_2), 58.3 (NCH_2), 57.1 (CH_3O), 56.5 ($2NCH_2$ pip.), 55.1 (NCH_2), 55.0 (NCH_2), 54.6 ($2NCH_2$ pip.), 49.5 (NCH_2), 49.4 (NCH_2), 47.4 ($2NCH_3$), 28.4 (CH_2), 28.3 (CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{39}H_{55}N_8O$: 651.450, Found: 651.654.

7-Methoxy-2,4-bis{4-[(2–(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3r)

Yellow oil (89%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.62 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2″ and H-6″), 7.99 (d, 1H, J= 9.30 Hz, H-5), 7.83 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-2′ and H-6′), 7.53 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3″and H-5″), 7.46 (d, 2H, J= 8.40 Hz, H-3′ and H-5′), 7.43 (d, 1H, J= 2.70 Hz, H-8), 7.14 (dd, 1H, J= 9.30 and 2.70 Hz, H-6), 4.01 (s, 3H, CH_3O), 3.93 (s, 2H, NCH_2), 3.90 (s, 2H, NCH_2), 2.77 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.72 (t, 2H, J= 6.90 Hz, NCH_2), 2.56–2,41 (m, 20H, $2NCH_2$ and $8NCH_2$ pip.), 2.29 (s, 3H, NCH_3), 2.27 (s, 3H, NCH_3); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 168.4 (C-7), 165.1 (C-2), 162.1 (C-4), 155.8 (C-8a), 144.3 (C-4′), 143.7 (C-4″), 138.5 (C-1′), 137.9 (C-1″), 131.6 (C-3′ and C-5′), 130.1 (C-3″ and C-5″), 129.7 (C-5), 129.6 (C-2′ and C-6′, C-2″and C-6″), 121.4 (C-6), 118.4 (C-4a), 108.0 (C-8), 59.1 ($2NCH_2$), 57.1 (CH_3O), 56.6 ($2NCH_2$ pip.), 55.1 ($2NCH_2$), 54.5 ($2NCH_2$ pip.), 47.4 ($2NCH_3$), 47.2 (NCH_2), 46.9 (NCH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{37}H_{51}N_8O$: 623.418, Found: 623.325.

2,4-Bis{3-[(3-dimethylaminopropyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3 s)

Yellow oil (60%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.21 (dd, 1H, J= 8.20 and 1.20 Hz, H-8), 8.17–8.13 (m, 2H, H-6′ and H-2′), 7.91 (dd, 1H, J= 8.20 and 1.20 Hz, H-5), 7.80 (dd, 1H, J= 1.40 and 1.40 Hz, H-2″), 7.72 (ddd, 1H, J= 8.20, 7.00 and 1.20 Hz, H-7), 7.55–7.43 (m, 6H, H-6, H-6″, H-4′, H-4″, H-5′ and H-5″), 3.90 (s, 2H, NCH_2), 3.87 (s, 2H, NCH_2), 2.73–2.64 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.45–2.32 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.28 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.27 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.61–1.52 (m, 4H, $2CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 158.1 (C-2), 150.3 (C-4), 150.2 (C-8a), 143.1 (C-3″), 142.2 (C-3′), 139.7 (C-1″), 138.4 (C-1′), 131.4 (C-6′), 131.0 (C-6″), 130.9 (C-2′ and C-2″), 129.9 (C-4′ and C-4″), 129.7 (C-5′ and C-5″), 129.0 (C-8), 127.6 (C-7), 127.1 (C-4a), 127.0 (C-5), 120.6 (C-6), 59.9 (NCH_2), 56.5 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 54.6 (NCH_2), 50.8 (NCH_2), 50.6 (NCH_2), 47.4 (NCH_3), 29.5 (CH_2), 26.1 (CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{32}H_{43}N_6$: 511.355, Found: 511.755.

2,4-Bis{3-[(3–(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline(3t)

Pale-yellow oil (88%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.56–8.52 (m, 2H, H-6′ and H-2′), 8.10 (dd, 1H, J= 8.40 and 1.20 Hz, H-8), 8.06 (dd, 1H, J= 8.40 and 1.20 Hz, H-5), 7.84 (ddd, 1H, J= 8.40, 7.20 and 1.20 Hz, H-7), 7.81 (dd, 1H, J= 1.40 and 1.40 Hz, H-2″), 7.73–7.69 (m, 1H, H-6″), 7.52–7.43 (m, 5H, H-6, H-4′, H-4″, H-5′ and H-5″), 3.90 (s, 2H, NCH_2), 3.88 (s, 2H, NCH_2), 2.70 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.68 (t, 2H, J= 6.60 Hz, NCH_2), 2.19 (s, 3H, NCH_3), 2.17 (s, 3H, NCH_3), 1.72–1.66 (m, 4H, $2CH_2$); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 169.8 (C-2), 161.5 (C-4), 153.2 (C-8a), 142.4 (C-3″), 142.0 (C-3′), 139.7 (C-1″), 139.0 (C-1′), 134.9 (C-8), 131.7 (C-6′), 131.0 (C-6″ and C-7), 130.4(C-2′ and C-2″), 130.0 (C-4′ and C-4″), 129.6 (C-5″), 128.8 (C-5′), 128.4 (C-5 and C-6), 123.1 (C-4a), 58.4 (NCH_2), 56.5 (NCH_2), 55.4 (NCH_2), 55.2 (NCH_2), 54.6 (NCH_2), 49.6 (NCH_2), 47.3 (NCH_3), 28.3 (CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{38}H_{53}N_8$: 621.439, Found: 621.478.

2,4-Bis{3-[(3-morpholinopropyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3 u)

Yellow oil (82%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.58 (dd, 1H, J= 1.50 and 1.50 Hz, H-2′), 8.56 (ddd, 1H, J= 7.80, 1.50 and 1.50 Hz, H-6′), 8.13 (dd, 1H, J= 8.70 and 1.10 Hz, H-8), 8.08 (dd, 1H, J= 8.70 and 1.10 Hz, H-5), 7.87 (ddd, 1H, J= 8.70, 7.20 and 1.10 Hz, H-7), 7.81 (dd, 1H, J= 1.50 and 1.50 Hz, H-2″), 7.76–7.71 (m, 1H, H-6″), 7.55–7.45 (m, 5H, H-6, H-4′, H-4″, H-5′ and H-5″), 3.93 (s, 2H, NCH_2), 3.91 (s, 2H, NCH_2), 3.69 (t, 4H, J= 4.80 Hz, $2OCH_2$), 3.64 (t, 4H, J= 4.80 Hz, $2OCH_2$), 2.75–2.66 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.42–2.31 (m, 12H, $2NCH_2$ and $4NCH_2$morph.), 1.71 (qt, 4H, J= 6.90 Hz, $2CH_2$);

13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 169.8 (C-2), 161.6 (C-4), 153.3 (C-8a), 142.4 (C-3″), 142.1 (C-3′), 139.7 (C-1″), 139.1 (C-1′), 135.0 (C-8), 131.7 (C-6′), 131.1 (C-6″), 131.0(C-7), 130.5 (C-2″), 130.2 (C-2′), 130.0 (C-4″), 129.9 (C-4′), 129.6 (C-5″), 128.8 (C-5′), 128.4 (C-5 and C-6), 123.1 (C-4a), 63.3 (OCH_2), 58.8 (NCH_2), 58.7 (NCH_2), 55.5 (NCH_2), 55.3 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 49.4 (NCH_2), 28.1 (CH_2), 28.0 (CH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{36}H_{47}N_6O_2$: 595.376, Found: 595.398.

2,4-Bis{3-[(2-morpholinoethyl)aminomethyl]phenyl}quinazoline (3v)

Yellow oil (66%); ^{1}H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.60–8.56 (m, 2H, H-2′ and H-6′), 8.14 (dd, 1H, J= 8.40 and 1.20 Hz, H-8), 8.08 (dd, 1H, J= 8.40 and 1.20 Hz, H-5), 7.88 (ddd, 1H, J= 8.40, 7.20 and 1.20 Hz, H-7), 7.82 (dd, 1H, J= 1.40 and 1.40 Hz, H-2″), 7.76–7.72 (m, 1H, H-6″), 7.56–7.46 (m, 5H, H-6, H-4′, H-4″, H-5′ and H-5″), 3.96 (s, 2H, NCH_2), 3.94 (s, 2H, NCH_2), 3.67–3.62 (m, 8H, $4OCH_2$), 2.79–2.71 (m, 4H, $2NCH_2$), 2.53–2.36 (m, 12H, $2NCH_2$ and $4NCH_2$morph.); 13C NMR δ (75 MHz, $CDCl_3$) 169.8 (C-2), 161.5 (C-4), 153.3 (C-8a), 142.4 (C-3″), 142.1 (C-3′), 139.7 (C-1″), 139.1 (C-1′), 135.0 (C-8), 131.8 (C-6′), 131.0 (C-6″), 130.5 (C-7), 130.1 (C-2′ and C-2″), 130.0 (C-4′ and C-4″), 129.6 (C-5″), 128.9 (C-5′), 128.4 (C-5 and C-6), 123.1 (C-4a), 68.3 (OCH_2), 59.6 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 46.8 (NCH_2), 46.5 (NCH_2); MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calc for $C_{34}H_{43}N_6O_2$: 567.345, Found: 567.377.

General procedure for 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinolines (1a–t · m(COOH)$_2$), 1,3-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]isoquinolines (2a–l · m(COOH)$_2$), and 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinazolines oxalate salts (3a–v · m(COOH)$_2$)

To a solution of compounds **1–3** (0.3 mmol) in isopropanol (11 ml) was added oxalic acid (2.4 mmol, 8 eq.). The reaction mixture was heated under reflux for 30 min. The precipitate was filtered, washed with isopropanol then with diethyl ether, and dried under reduced pressure to give the oxalate salts of **1–3**.

In vitro *antiplasmodial activity*

The *in vitro* antiplasmodial activities were tested over concentrations ranging from 39 to 40 μM against culture-adapted *P. falciparum* reference strains 3D7 and W2. The former strain is susceptible to CQ but displays a decreased susceptibility to MQ; the latter is considered resistant to CQ. The parasites were cultivated in RPMI medium (Sigma-Aldrich, Lyon, France) supplemented with 0.5% Albumax I (Life Technologies Corporation, Paisley, UK), hypoxanthine (Sigma-Aldrich), and gentamicin (Sigma-Aldrich) with human erythrocytes and were incubated at 37 °C in a candle jar, as described previously[43] .The *P. falciparum* drug susceptibility test was carried out in 96-well flat-bottom sterile plates in a final volume of 250 μl. After 48 h incubation period with the drugs, quantities of DNA in treated and control cultures of parasites in human erythrocytes were quantified using the SYBR Green I (Sigma-Aldrich) fluorescence-based method[44,45]. Briefly, after incubation, plates were frozen at −20 °C until use. Plates were then thawed for 2 h at room temperature, and 100 μl of each homogenised culture was transferred to a well of a 96-well flat-bottom sterile black plate (Nunc, Inc., Rochester, NY) that contained 100 μl of the SYBR Green I lysis buffer (2xSYBR Green, 20 mM Tris base pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.008% w/v saponin, 0.08% w/v Triton X-100). Negative controls treated with solvent (typically DMSO or H_2O), and positive controls (CQ and MQ) were added to each set of experiments. Plates were incubated for 1 h at room temperature and then read on a fluorescence plate reader (Tecan, Grödig, Austria) using excitation and emission wavelengths of 485 and 535 nm, respectively. IC_{50} values were calculated by non-linear regression analysis of data from dose-response curves, using TableCurve 2D version 5.0 software (Systat Software, San Jose, CA). IC_{50} values are reported as means calculated from three independent experiments[46].

In vitro *antileishmanial activity*

L. donovani (MHOM/IN/00/DEVI) used in this study was provided by the CNR *Leishmania* (Montpellier, France). The effects of the tested compounds on the growth of *L. donovani* (MHOM/IN/00/DEVI) promastigotes were assessed by MTT assay[47]. Briefly, promastigotes in log-phase in Schneider's medium supplemented with 20% foetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin), were incubated at an average density of 10^6 parasites/ml in sterile 96-well plates with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v), in duplicate. Appropriate controls treated with DMSO and amphotericin B (reference drug purchased from Sigma-Aldrich) were added to each set of experiments. After 72 h incubation period at 27 °C, parasite metabolic activity was determined. Each well was microscopically examined for precipitate formation. To each well was added 20 μl of 5 mg/ml MTT [3–(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)] solution followed by 4 h incubation time. The enzyme reaction was stopped by addition of 100 μl of 50% isopropanol/10% sodium dodecyl sulfate[48]. Plates were vigorously shaken (300 rpm) for 10 min, and the absorbance was measured at 570 nm in a BIO-TEK ELx808 Absorbance Microplate Reader. The IC_{50} was defined as the concentration of drug required to inhibit by 50% of the metabolic activity of *L. donovani* promastigotes compared to the control. IC_{50} of the parasite's growth (half maximal inhibitory concentration or IC_{50} values) were then calculated from the obtained experimental results using a previously described regression programme[46].

In vitro *antitrypanosomal activity*

The effects of the tested compounds on the growth of *T. brucei brucei* were assessed using an Alamar Blue® assay described by Räz et al.[49] *T. brucei brucei* AnTat 1.9 (IMTA, Antwerpen, Belgium) was cultured in MEM with Earle's salts, supplemented according to the protocol of Baltz et al.[50] with the following modifications: 0.5 mM mercaptoethanol (Sigma Aldrich), 1.5 mM L-cysteine (Sigma Aldrich), 0.05 mM bathocuproine sulphate (Sigma Aldrich), and 20% heat-inactivated horse serum (Gibco, France) at 37 °C and 5% CO_2. Samples were incubated at an average density of 2000 parasites/well in sterile 96-wells plates (Fisher, France) with various concentrations of compounds dissolved in 0.9% NaCl. All doses were tested in duplicate. Appropriate controls treated with solvents 0.9% NaCl or DMSO or with suramin, pentamidine, eflornithine, and fexinidazole (reference drugs purchased from Sigma Aldrich and Fluorochem, UK) were added to each set of experiments. After 69 h incubation period at 37 °C, 10 μl of the viability marker Alamar Blue (Fisher) was added to each well, and the plates were incubated for 5 h. The plates were read in a PerkinElmer ENSPIRE (Germany) microplate reader using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. The IC_{50} was defined as the concentration of drug

necessary to inhibit by 50% the activity of *T. brucei brucei* compared to the control. IC_{50} values were calculated using a nonlinear regression analysis of dose-response curves performed using GraphPad Prism software (La Jolla, CA). IC_{50} values were calculated from three independent experiments.

Cytotoxicity evaluation

A cytotoxicity evaluation was performed using the method reported by Mosmann[48] with slight modifications to determine the cytotoxic concentrations 50% (CC_{50}) and using doxorubicin as a cytotoxic reference compound. These assays were performed in human HepG2 cells purchased from ATCC (ref HB-8065). These cells are a commonly used human hepatocarcinoma-derived cell line that has characteristics similar to those of primary hepatocytes. These cells express many hepatocyte-specific metabolic enzymes, thus enabling the cytotoxicity of tested product metabolites to be evaluated. Briefly, cells in 100 µL of complete RPMI medium, [RPMI supplemented with 10% FCS, 1% L-glutamine (200 mM), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml)] were inoculated at 37 °C into each well of 96-well plates in a humidified chamber in 6% CO_2. After 24 h, 100 µl of medium with test compound at various concentrations dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v) were added, and the plates were incubated for 72 h at 37 °C. Duplicate assays were performed for each sample. Each well was microscopically examined for precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. After aspiration, 100 µl of MTT solution (0.5 mg/ml in medium without FCS) were then added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C. The MTT solution was removed, and DMSO (100 µl) was added to dissolve the resulting blue formazan crystals. Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 5 min. The absorbance was measured at 570 nm with 630 nm as reference wavelength in a BIO-TEK ELx808 Absorbance Microplate Reader. DMSO was used as blank and doxorubicin (Sigma Aldrich) as positive control. Cell viability was calculated as percentage of control (cells incubated without compound). The CC_{50} was determined from the dose-response curve using the TableCurve 2D version 5.0 software (Systat Software, San Jose, CA)

FRET melting experiments

The best bioactive compounds (**1b–c**, **1e–g**, **1s–t**, **2b**, **2e–f**, **2i–j**, **3b**, **3f–j**, **3m,** and **3v**) have been selected for the subsequent FRET melting experiments. These were performed with dual-labelled oligonucleotides mimicking the *Plasmodium* telomeric sequences FPf1T [FAM-5′(GGGTTTA)$_3$-GGG3′-TAMRA] and FPf8T [FAM-5′ (GGGTTCA)$_3$GGG3′-TAMRA], the *Trypanosoma* 9 and 11 chromosomic sequence FTrypBT (also named FEBR1T) [FAM-5′GGGCAGGGGGTGATGGGGAGGAGCCAGGG3′-TAMRA], the human telomeric sequence F21T [FAM-(GGGTTA)$_3$-GGG3′-TAMRA], and the human duplex sequence FdxT [FAM5′-TATAGCTATA-hexaethyleneglycol-TATAGCTATA3′-TAMRA][51,52]. The oligonucleotides were prefolded in 10 mM lithium cacodylate buffer (pH 7.2), with 10 mM KCl and 90 mM LiCl (K^+condition). The FAM emissions were recorded at 516 nm using a 492-nm excitation wavelength in the absence and presence of a single compound as a function of temperature (25–95 °C) in 96-well microplates by using a Stratagene MX3000P real-time PCR device at a rate of 1 °C·min^{-1}. Data were normalised between 0 and 1, and the required temperature for half-denaturation of oligonucleotides corresponding to the emission value of 0.5 was taken as the T_m. Each experiment was performed in duplicate with 0.2 µM of labelled oligonucleotide and 2 µM of compound under K^+ condition. For each compound, three independent experiments were carried out.

Data analysis

The 20 compounds (**1b–c**, **1e–g**, **1s–t**, **2b**, **2e–f**, **2i–j**, **3b**, **3f–j**, **3m,** and **3v**), previously selected for FRET assays due to their IC_{50} best results, have been then submitted to a statistical multivariate analysis in order to check consistent compound types. In particular, a Hierarchical Ascendant Classification (HAC) was performed on the first three principal components (accounting for the 97% of the total variance) of a Principal Component Analysis based on the FPf1T, FPf8T, F21T, and IC_{50} (against the *P. falciparum* 3D7 strain) variables. As well, the same analysis was carried out on FtryBT, F21T,I and IC_{50} (against *T. brucei brucei* strain) variables. To this end, a Ward's minimum variance clustering based on Euclidean distances was performed, and the number of retained clusters (Q) was chosen according to the growth of inertia, selecting Q in order to maximise the difference in inertia between (Q − 1, Q) and (Q, Q + 1). This analysis was chosen according to the normal data distribution evaluated with the Shapiro-Wilk normality test. All the analyses were performed within the R 3.0.1 programming environment using functions from the "FactoMineR," and "lmtest" packages[53–55].

Results and discussion

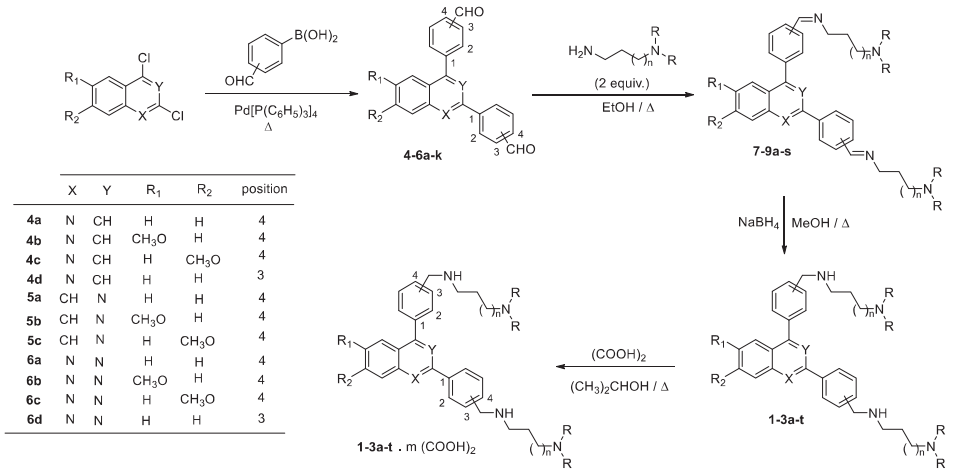
Chemistry

Novel 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinoline, 1,3-bis[(-substituted-aminomethyl)phenyl]isoquinoline and 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinazoline derivatives **1–3** were prepared starting from the commercially substituted 2,4-dichloroquinolines, 1,3-dichloroisoquinolines, or 1,4-dichloroquinazolines (Scheme 1). The intermediate *bis*-(formylphenyl)-quinolines, -isoquinolines, or -quinazolines **4–6** were synthesised by a double-Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction of dichloro-derivatives with 3-, or 4-formylphenylboronic acids in the presence of $Pd(PPh_3)_4$ as a catalyst and in the presence of sodium carbonate[35,56–58]. Condensation of primary amines with these latter dialdehydes **4–6** afforded the di-imines **7–9**, which were immediately reduced into the 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinolines **1a–t**, 1,3-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]isoquinolines **2a–l** and 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinazolines **3a–v** using sodium borohydride as reductive agent in refluxing methanol as previously described by our team[35]. All compounds were extensively characterised (Supplementary Material).

All quinolines, isoquinolines and quinazolines **1–3** were then converted into ammonium oxalate salts by treatment with oxalic acid in refluxing isopropanol. These oxalate salts were found less hygroscopic than the hydrochloride ones and also soluble in water. Table 1 summarises the physical properties of the new synthesised **1–3** oxalates.

In vitro *antimalarial activity*

All the new quinoline, isoquinoline, and quinazoline derivatives **1–3** were evaluated for their antimalarial activity *in vitro* by incubation with *P. falciparum* CQ-resistant strain W2 (IC_{50} CQ = 0.40 µM, IC_{50} MQ = 0.016 µM) and the strain 3D7, which is CQ sensitive and which has decreased sensitivity to MQ (IC_{50} CQ = 0.11 µM, MQ = 0.06 µM). As shown in Table 2, these new derivatives **1–3** showed IC_{50} values between 0.13 and 11.50 µM against



	X	Y	R_1	R_2	position
4a	N	CH	H	H	4
4b	N	CH	CH_3O	H	4
4c	N	CH	H	CH_3O	4
4d	N	CH	H	H	3
5a	CH	N	H	H	4
5b	CH	N	CH_3O	H	4
5c	CH	N	H	CH_3O	4
6a	N	N	H	H	4
6b	N	N	CH_3O	H	4
6c	N	N	H	CH_3O	4
6d	N	N	H	H	3

	X	Y	R_1	R_2	$-NR_2$	position	n	m
7a, 1a	N	CH	H	H	$-N(CH_3)_2$	4	2	4
7b, 1b	N	CH	H	H	$-N(CH_3)_2$	4	1	4
7c, 1c	N	CH	H	H	$-N(CH_3)_2$	4	0	4
7d, 1d	N	CH	H	H	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	2	6
7e, 1e	N	CH	H	H	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	1	6
7f, 1f	N	CH	H	H	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	0	6
7g, 1g	N	CH	H	H	$-N$(morpholine)	4	1	4
7h, 1h	N	CH	H	H	$-N$(morpholine)	4	0	4
7i, 1i	N	CH	CH_3O	H	$-N(CH_3)_2$	4	2	4
7j, 1j	N	CH	CH_3O	H	$-N(CH_3)_2$	4	1	4
7k, 1k	N	CH	CH_3O	H	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	2	6
7l, 1l	N	CH	CH_3O	H	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	1	6
7m, 1m	N	CH	H	CH_3O	$-N(CH_3)_2$	4	2	4
7n, 1n	N	CH	H	CH_3O	$-N(CH_3)_2$	4	1	4
7o, 1o	N	CH	H	CH_3O	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	2	6
7p, 1p	N	CH	H	CH_3O	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	1	6
7q, 1q	N	CH	H	H	$-N(CH_3)_2$	3	1	4
7r, 1r	N	CH	H	H	$-N$(piperazine)$-CH_3$	3	1	6
7s, 1s	N	CH	H	H	$-N$(morpholine)	3	1	4
7t, 1t	N	CH	H	H	$-N$(morpholine)	3	0	4

	X	Y	R_1	R_2	$-NR_2$	position	n	m
8a, 2a	CH	N	H	H	$-N(CH_3)_2$	4	2	4
8b, 2b	CH	N	H	H	$-N(CH_3)_2$	4	1	4
8c, 2c	CH	N	H	H	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	2	6
8d, 2d	CH	N	H	H	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	1	6
8e, 2e	CH	N	CH_3O	H	$-N(CH_3)_2$	4	2	4
8f, 2f	CH	N	CH_3O	H	$-N(CH_3)_2$	4	1	4
8g, 2g	CH	N	CH_3O	H	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	2	6
8h, 2h	CH	N	CH_3O	H	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	1	6
8i, 2i	CH	N	H	CH_3O	$-N(CH_3)_2$	4	2	4
8j, 2j	CH	N	H	CH_3O	$-N(CH_3)_2$	4	1	4
8k, 2k	CH	N	H	CH_3O	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	2	6
8l, 2l	CH	N	H	CH_3O	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	1	6
9a, 3a	N	N	H	H	$-N(CH_3)_2$	4	2	4
9b, 3b	N	N	H	H	$-N(CH_3)_2$	4	1	4
9c, 3c	N	N	H	H	$-N(CH_3)_2$	4	0	4
9d, 3d	N	N	H	H	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	2	6
9e, 3e	N	N	H	H	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	1	6
9f, 3f	N	N	H	H	$-N$(morpholine)	4	1	4
9g, 3g	N	N	H	H	$-N$(morpholine)	4	0	4
9h, 3h	N	N	CH_3O	H	$-N(CH_3)_2$	4	2	4
9i, 3i	N	N	CH_3O	H	$-N(CH_3)_2$	4	1	4
9j, 3j	N	N	CH_3O	H	$-N(CH_3)_2$	4	0	4
9k, 3k	N	N	CH_3O	H	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	1	6
9l, 3l	N	N	CH_3O	H	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	0	6
9m, 3m	N	N	H	CH_3O	$-N(CH_3)_2$	4	2	4
9n, 3n	N	N	H	CH_3O	$-N(CH_3)_2$	4	1	4
9o, 3o	N	N	H	CH_3O	$-N(CH_3)_2$	4	0	4
9p, 3p	N	N	H	CH_3O	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	2	6
9q, 3q	N	N	H	CH_3O	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	1	6
9r, 3r	N	N	H	CH_3O	$-N$(piperazine)$-CH_3$	4	0	6
9s, 3s	N	N	H	H	$-N(CH_3)_2$	3	1	4
9t, 3t	N	N	H	H	$-N$(piperazine)$-CH_3$	3	1	6
9u, 3u	N	N	H	H	$-N$(morpholine)	3	1	4
9v, 3v	N	N	H	H	$-N$(morpholine)	3	0	4

Scheme 1. Synthesis of 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinoline, 1,3-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]isoquinoline and 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)-phenyl]quinazoline derivatives **1–3**.

W2 and between 0.032 and 10.43 μM against 3D7 *P. falciparum* strains. These biological results could be analysed concerning the position on the phenyl ring of these polyamino side chains, the nature of the terminal amine, and also the influence of the length of the carbon chain between the two amino functions of the side-chain.

Against the *P. falciparum* CQ-sensitive strain 3D7, compound **1c** bearing dimethylaminoethylamino side chains at position 4 of

Table 1. Physical properties of amines **1a–t**, **2a–l**, and **3a–v**.

Compound		Salt[a]	Mp (°C)[b]	% Yield[c]
1a	White crystals	4 $(COOH)_2$	258–260	72
1b	White crystals	4 $(COOH)_2$	244–246	75
1c	Beige crystals	4 $(COOH)_2$	229–231	68
1d	White crystals	6 $(COOH)_2$	225–227	94
1e	White crystals	6 $(COOH)_2$	249–251	90
1f	White crystals	6 $(COOH)_2$	240–242	82
1g	Beige crystals	4 $(COOH)_2$	202–204	70
1h	White crystals	4 $(COOH)_2$	235–237	92
1i	Yellow crystals	4 $(COOH)_2$	227–229	79
1j	Pale-yellow crystals	4 $(COOH)_2$	224–226	73
1k	Pale-yellow crystals	6 $(COOH)_2$	235–237	89
1l	Yellow crystals	6 $(COOH)_2$	223–225	76
1m	Pale-yellow crystals	4 $(COOH)_2$	208–210	66
1n	Pale-yellow crystals	4 $(COOH)_2$	237–239	69
1o	Pale-yellow crystals	6 $(COOH)_2$	237–239	68
1p	Pale-yellow crystals	6 $(COOH)_2$	245–247	73
1q	Beige crystals	4 $(COOH)_2$	243–245	80
1r	White crystals	6 $(COOH)_2$	237–239	78
1s	White crystals	4 $(COOH)_2$	221–223	76
1t	Beige crystals	4 $(COOH)_2$	225–227	86
2a	Beige crystals	4 $(COOH)_2$	184–186	69
2b	Yellow crystals	4 $(COOH)_2$	186–188	76
2c	White crystals	6 $(COOH)_2$	181–183	80
2d	Pale-yellow crystals	6 $(COOH)_2$	217–219	77
2e	Yellow crystals	4 $(COOH)_2$	157–159	76
2f	Yellow crystals	4 $(COOH)_2$	178–180	85
2g	Pale-yellow crystals	6 $(COOH)_2$	172–174	75
2h	Yellow crystals	6 $(COOH)_2$	195–197	53
2i	Pale-yellow crystals	4 $(COOH)_2$	135–137	70
2j	White crystals	4 $(COOH)_2$	171–173	86
2k	White crystals	6 $(COOH)_2$	216–218	61
2l	Beige crystals	6 $(COOH)_2$	226–228	66
3a	Beige crystals	4 $(COOH)_2$	153–155	71
3b	White crystals	4 $(COOH)_2$	203–205	73
3c	Pale-yellow crystals	4 $(COOH)_2$	203–205	72
3d	White crystals	6 $(COOH)_2$	223–225	86
3e	Beige crystals	6 $(COOH)_2$	229–231	92
3f	Beige crystals	4 $(COOH)_2$	183–185	80
3g	Beige crystals	4 $(COOH)_2$	195–197	79
3h	Pale-yellow crystals	4 $(COOH)_2$	156–158	66
3i	Pale-yellow crystals	4 $(COOH)_2$	243–245	68
3j	Pale-yellow crystals	4 $(COOH)_2$	233–235	72
3k	Pale-yellow crystals	6 $(COOH)_2$	227–229	76
3l	Pale-yellow crystals	6 $(COOH)_2$	229–231	49
3m	Yellow crystals	4 $(COOH)_2$	216–218	30
3n	White crystals	4 $(COOH)_2$	223-225	75
3o	Pale-yellow crystals	4 $(COOH)_2$	234–236	71
3p	Pale-yellow crystals	6 $(COOH)_2$	222–224	72
3q	Pale-yellow crystals	6 $(COOH)_2$	229–231	75
3r	Yellow-orange crystals	6 $(COOH)_2$	238–240	57
3s	White crystals	4 $(COOH)_2$	>260	91
3t	White crystals	6 $(COOH)_2$	252–254	86
3u	White crystals	4 $(COOH)_2$	186–188	80
3v	Beige crystals	4 $(COOH)_2$	234–236	74

[a]The stoichiometry and composition of the salts were determined by elemental analyses and obtained values were within ±0.4% of the theoretical values.
[b]Crystallisation solvent: 2-PrOH–H_2O.
[c]The yields only included the conversions into the ammonium oxalates.

each of the benzyl moieties was found to be the most active derivative with an IC_{50} of 0.032 μM. In the non-substituted quinoline series, derivative **1c** bearing dimethylaminoethylamino side chains at position 4 of the benzyl rings displayed better activity than the analogues substituted with dimethylaminobutylamino or dimethylaminopropylamino side chains (IC_{50}=0.0.32 μM for **1c** *versus* IC_{50}=0.47 and 4.08 μM for **1b** and **1a**, respectively). In comparison, when we replaced the dimethylamino function by a methylpiperazine moiety (compounds **1d–f**), the quinoline **1f** bearing a C_2 side chains showed a decrease in antimalarial activity; i.e. IC_{50}=0.69 μM for **1d** and 0.47 μM for **1e** *versus* 2.42 μM for **1f**). In addition, the quinolines **1g–h** which are disubstituted with C_3 or C_2 morpholino chains on position 4 of its benzyl moieties, exhibited similar behaviour in the biological activity; i.e. morpholinopropylamino compound **1g** was found more active (up to 13.5 times) than its morpholinoethylamino analogue **1h** with IC_{50} of 0.099 *versus* 1.34 μM. The same observations could be done against the *P. falciparum* CQ-resistant strain W2 with the biological results obtained for these quinolines **1a–h**.

The introduction of a methoxy group substituted in position 6 or 7 of the quinoline ring (compounds **1i–p**) did not increase the antimalarial activity but seemed to decrease it when compared to the non-substituted quinoline (**1a–h** and **1q–t**). In these subseries in which the quinoline moiety was substituted by a methoxy, the biological activity was found more interesting with a substituted-aminopropylamino side chain (derivatives **1j**, **1l,** and **1n**) compared to a substituted-aminobutylamino side chain (derivatives **1i**, **1n**, and **1 m**), excepted for compounds **1o** *versus* **1p** (IC_{50}=2.41 μM for **1o** *versus* IC_{50}=4.34 μM for **1p**). Quinoline derivatives with polyamino side chains at position 3 of the benzyl moieties (compounds **1q–t**) were significantly less active than quinolines **1a–h** substituted in the position 4 of the benzyl rings, with the exception of compound **1t** which showed a better activity (IC_{50}=0.23 μM) than its counterpart bearing the morpholinoethylamino side chains at position 4 (compound **1 h**) for which the IC_{50} was found to be 1.34 μM.

Against the 3D7 strain, the non-substituted isoquinolines **2a–d** were generally the most active compounds in these series, except for **2d** (IC_{50}=5.77 μM) when compared to **2h** (IC_{50}=1.81 μM), and also for **2b** (IC_{50}=1.82 μM) *versus* **2f** (IC_{50}=1.47 μM). Thus, introduction of a methoxy substituent on the isoquinoline heterocyclic skeleton was not beneficial, meanly in position 6 (compounds **2i–l**) for which the IC_{50} were found between 7.21 and 9.66 μM. Moreover, quinolines **1** generally exhibited better antimalarial activities against the *P. falciparum* 3D7 strain than their isoquinolines analogues **2**, with the exception of compound **2a** which showed better antimalarial activity than **1a** (IC_{50}=4.08 μM for **1a** *versus* IC_{50}=1.74 μM for **2a**). Against the *P. falciparum* CQ-resistant strain W2, compound **2h** bearing methylpiperazinylpropylamino side chains at position 4 of each of the benzyl moieties was found to be the most active with an IC_{50} of 1.28 μM.

Among the newly substituted quinazolines **3a–r**, all derivatives bearing aminoethylamino side chains at position 4 of the benzyl rings generally displayed better activities against 3D7 and W2 strains than their analogues substituted with aminopropylamino or aminobutylamino side chains (for example: IC_{50}=0.56 μM for **3j** *versus* IC_{50}=3.84 and 4.05 μM against 3D7 strain for **3h** and **3i**, respectively; IC_{50}=1.23 μM for **3j** *versus* IC_{50}=3.68 and 4.34 μM against W2 strain for **3h** and **3i**, respectively). However, the aminopropylamino substituted compound **3b** was found more active than its analogue aminoethylamino quinazoline **3c** against the 3D7 strain (IC_{50}=0.62 μM for **3b** *versus* IC_{50}=1.06 for **3c**). The substitution of the amino-alkylamino side chains at position 3 of the benzyl nucleus in these quinazoline series was not found detrimental in comparison with the substitution in position 4 against both of the *P. falciparum* strains.

In vitro *antileishmanial activity against promastigote forms*

In order to better understand the biological profile of our new heterocycles **1–3**, some complementary antiparasitic analyses were also performed. Notably, *P. falciparum* belongs to the coccidian protozoan parasite family. Therefore, *in vitro* activity against flagellate protozoan parasite *L. donovani* was evaluated (Table 2).

Table 2. *In vitro* sensitivity of *P. falciparum*, *L. donovani* and *T. brucei brucei* strains to compounds **1a–t**, **2a–l** and **3a–v** and cytotoxicity of these compounds in HepG2 cells.

Compound	*P. falciparum strains* IC_{50} values (μM)[a] W2	3D7	*L. donovani* IC_{50} values (μM)[b]	*Trypanosoma brucei brucei* IC_{50} values (μM)[c] *Trypanos Antat 1.9*	Cytotoxicity to HepG2 cells CC_{50} values (μM)[d]
Chloroquine[e]	0.40 ± 0.04	0.11 ± 0.01	n.d.[h]	n.d.[h]	30
Mefloquine[e]	0.016 ± 0.002	0.06 ± 0.003	n.d.[h]	n.d.[h]	n.d.[h]
Pentamidine[f]	n.d.[h]	n.d.[h]	5.5 ± 0.8	0.0002 ± 0.00006	2.3 ± 0.5
Amphotericin B[f]	n.d.[h]	n.d.[h]	0.1 ± 0.04	n.d.[h]	8.8 ± 0.6
Suramine[g]	n.d.[h]	n.d.[h]	n.d.[h]	0.03 ± 0.003	n.d.[h]
Fexinidazole[g]	n.d.[h]	n.d.[h]	n.d.[h]	0.59 ± 0.039	n.d.[h]
Eflornithine[g]	n.d.[h]	n.d.[h]	n.d.[h]	15.19 ± 0.64	n.d.[h]
Doxorubicin	n.d.[h]	n.d.[h]	n.d.[h]	n.d.[h]	0.06 ± 0.02
1a	n.d.[h]	4.08 ± 0.488	≥10[i]	0.84 ± 0.033	5.91 ± 1.5
1b	0.88 ± 0.14	0.47 ± 0.06	≥10[i]	0.82 ± 0.022	4.09 ± 0.2
1c	0.34 ± 0.037	0.032 ± 0.004	≥10[i]	1.48 ± 0.085	3.10 ± 0.9
1d	n.d.[h]	0.69 ± 0.070	≥10[i]	1.22 ± 0.121	7.71±.4
1e	1.29 ± 0.063	0.47 ± 0.06	≥10[i]	1.78 ± 0.089	11.33 ± 0.5
1f	0.13 ± 0.024	2.42 ± 0.27	≥10[i]	0.99 ± 0.132	4.09 ± 0.3
1g	n.d.[h]	0.099 ± 0.007	≥10[i]	0.38 ± 0.045	1.47 ± 0.3
1h	n.d.[h]	1.34 ± 0.173	≥10[i]	1.59 ± 0.071	4.50 ± 0.4
1i	7.92 ± 0.64	3.09 ± 0.38	≥10[i]	0.67 ± 0.091	3.58 ± 0.3
1j	4.21 ± 0.31	2.65 ± 0.18	≥10[i]	0.62 ± 0.070	2.50 ± 0.2
1k	4.10 ± 0.54	2.59 ± 0.20	≥10[i]	0.98 ± 0.118	6.16 ± 0.4
1l	4.51 ± 0.71	1.80 ± 0.20	≥10[i]	1.54 ± 0.164	1.02 ± 0.1
1m	>40	8.98 ± 0.36	≥10[i]	1.08 ± 0.068	5.40 ± 0.3
1n	1.69 ± 0.24	3.18 ± 0.36	≥10[i]	1.20 ± 0.296	0.48 ± 0.1
1o	2.26 ± 0.48	2.41 ± 0.08	≥10[i]	1.12 ± 0.118	3.32 ± 0.5
1p	2.73 ± 0.76	4.34 ± 0.50	≥10[i]	1.01 ± 0.135	6.44 ± 0.6
1q	n.d.[h]	1.44 ± 0.128	≥10[i]	1.30 ± 0.101	6.74 ± 0.7
1r	n.d.[h]	1.95 ± 0.774	≥10[i]	1.36 ± 0.194	4.97 ± 0.3
1s	n.d.[h]	0.21 ± 0.040	≥10[i]	0.73 ± 0.264	2.63 ± 0.5
1t	n.d.[h]	0.23 ± 0.021	≥10[i]	0.46 ± 0.120	3.93 ± 1.1
2a	6.23 ± 0.80	1.74 ± 0.36	≥10[i]	0.64 ± 0.163	8.31 ± 1.0
2b	3.02 ± 0.25	1.82 ± 0.31	≥10[i]	0.35 ± 0.049	3.47 ± 0.3
2c	4.42 ± 0.56	1.96 ± 0.58	≥10[i]	1.10 ± 0.318	4.98 ± 0.5
2d	5.46 ± 0.44	5.77 ± 0.67	≥10[i]	1.28 ± 0.122	14.85 ± 1.1
2e	6.06 ± 0.64	4.41 ± 0.51	≥10[i]	0.55 ± 0.122	9.57 ± 1.0
2f	4.76 ± 0.66	1.47 ± 0.24	≥10[i]	0.52 ± 0.072	2.12 ± 0.2
2g	7.61 ± 0.94	3.27 ± 0.31	≥10[i]	1.00 ± 0.261	10.16 ± 0.9
2h	1.28 ± 0.34	1.81 ± 0.19	≥10[i]	0.81 ± 0.255	7.18 ± 0.6
2i	2.40 ± 0.49	8.46 ± 0.66	≥10[i]	0.64 ± 0.323	10.76 ± 0.8
2j	5.09 ± 0.76	7.21 ± 0.59	≥10[i]	0.59 ± 0.131	2.16 ± 0.2
2k	5.96 ± 0.54	8.91 ± 0.87	≥10[i]	0.99 ± 0.122	6.48 ± 0.6
2l	9.60 ± 0.99	9.66 ± 1.20	≥10[i]	1.34 ± 0.088	2.01 ± 0.2
3a	n.d.[h]	2.15 ± 0.106	≥10[i]	0.90 ± 0.054	4.23 ± 0.4
3b	n.d.[h]	0.62 ± 0.077	≥10[i]	1.18 ± 0.057	4.01 ± 0.8
3c	n.d.[h]	1.06 ± 0.103	≥10[i]	1.48 ± 0.178	15.87 ± 1.7
3d	n.d.[h]	2.35 ± 0.488	≥10[i]	1.86 ± 0.135	28.72 ± 1.9
3e	n.d.[h]	1.52 ± 0.172	≥10[i]	2.39 ± 0.129	15.87 ± 1.7
3f	n.d.[h]	0.42 ± 0.083	≥10[i]	0.81 ± 0.063	4.52 ± 0.4
3g	n.d.[h]	0.15 ± 0.027	≥10[i]	1.27 ± 0.632	4.08 ± 0.6
3h	3.68 ± 0.50	3.84 ± 0.38	≥10[i]	0.27 ± 0.035	11.67 ± 1.2
3i	4.34 ± 0.74	4.05 ± 0.95	≥10[i]	0.44 ± 0.084	1.93 ± 0.1
3j	1.23 ± 0.15	0.56 ± 0.02	≥10[i]	1.04 ± 0.085	3.12 ± 0.2
3k	4.84 ± 0.58	3.12 ± 0.23	≥10[i]	0.94 ± 0.089	22.62 ± 1.1
3l	1.34 ± 0.29	1.81 ± 0.25	≥10[i]	0.59 ± 0.057	6.53 ± 0.6
3m	4.22 ± 0.55	1.18 ± 0.43	≥10[i]	0.75 ± 0.060	25.13 ± 1.2
3n	n.d.[h]	2.52 ± 0.237	≥10[i]	1.05 ± 0.058	2.71 ± 0.3
3o	0.99 ± 0.09	0.61 ± 0.03	≥10[i]	0.75 ± 0.121	1.14 ± 0.4
3p	5.08 ± 0.48	6.56 ± 1.44	≥10[i]	1.02 ± 0.194	17.35 ± 1.2
3q	11.50 ± 1.05	10.43 ± 0.58	≥10[i]	1.71 ± 0.145	1.27 ± 0.5
3r	4.75 ± 0.31	4.34 ± 0.33	≥10[i]	1.07 ± 0.164	3.90 ± 0.9
3s	n.d.[h]	1.13 ± 0.107	≥10[i]	2.07 ± 0.196	1.14 ± 0.4
3t	n.d.[h]	2.24 ± 0.435	≥10[i]	2.05 ± 0.535	29.57 ± 2.2
3u	n.d.[h]	0.43 ± 0.142	≥10[i]	0.72 ± 0.070	2.64 ± 0.2
3v	n.d.[h]	0.36 ± 0.126	≥10[i]	1.37 ± 0.658	6.46 ± 1.0

[a]Values were measured against chloroquine-resistant and mefloquine-sensitive strain W2 and the chloroquine-sensitive and mefloquine-resistant strain 3D7.
[b]IC50 values were measured against the promastigotes of Leishmania donovani strain. The IC50 (μM) values correspond to the mean ± standard deviations from three independent experiments.
[c]IC50 values were measured against the slender bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.9 strain. The IC50 (μM) values correspond to the means ± standard deviations from 3 independent experiments with each concentration tested in duplicate in all experiments.
[d]CC50 values were measured against HepG2 cells. The CC50 (μM) values correspond to the means ± standard deviations from three independent experiments.
[e]Chloroquine and mefloquine were used as antiplasmodial compounds of reference.
[f]Pentamidine and amphotericin B were used as antileishmanial compounds of reference.
[g]Suramine, pentamidine, fexinidazole and eflornithine were used as antitrypanosomal compounds of reference.
[h]n.d.: not done.
[i]No activity noted at the highest concentration tested.

The reference drugs amphotericin B and pentamidine had IC_{50} values of 0.10 and 5.50 μM, respectively, against *L. donovani*. Unfortunately, none of our novel compounds showed any antileishmanial activity *in vitro* (all IC_{50} values $\geq$ 10 μM).

In vitro *activity against Trypanosoma brucei brucei*

These newly synthesised nitrogen heterocyclic derivatives **1–3** were evaluated against *T. brucei brucei*. Pentamidine, suramine, fexinidazole, and eflornithine were also used here as reference compounds. The screening data are presented in Table 2. All quinolines, isoquinolines, and quinazolines **1–3** were active against *T. brucei brucei* with IC_{50} values ranging from 0.27 to 2.39 μM; and most of them showed an antiparasitic activity around the μM value. Among them the quinazoline **3e** was found as the less active compound (IC_{50}=2.39 μM), while the best activity against the *T. brucei brucei* strain was observed with 6-methoxy substituted quinazoline **3h** with an IC_{50} of 0.27 μM. Surprisingly, as all these new tested nitrogen heterocycles **1–3** showed similar range of antiparasitic activities against *T. brucei brucei*, no relevant structure-activity relationships (SAR) could be deduced among these new derivatives. However, the quinoline **1g** which is disubstituted with C_3 morpholinopropyl chains on position 4 of its benzyl moieties, exhibited better antitrypanosomal activity than its C_2 analogue (compound **1h**), and was found four-time more active with IC_{50} of 0.38 *versus* 1.59 μM. In addition, the structural analogous **1a** and **1b**, bearing, respectively (dimethylaminobutyl)aminomethyl and (dimethylaminopropyl)aminomethyl side chains at position 4 of their phenyls, were found slightly more active than the (dimethylaminoethyl)aminomethyl compound **1c** (IC_{50}=0.84, 0.82, and 1.48 μM for **1a**, **1b,** and **1c**, respectively). In comparison, when we replaced the dimethylamino function by a methylpiperazine moiety (compounds **1d–f**), quinoline **1f** bearing a C_2 side chains at position 4 of the phenyls showed an increase in the antitrypanosomal activity; i.e. IC_{50}=1.22 μM for **1d** and 1.78 μM for **1e** *versus* 0.99 μM for **1f**). In the isoquinoline series (compounds **2**), derivatives **2a** and **2b** (IC_{50} of 0.64 and 0.35 μM) disubstituted with a C_4 or C_3 dimethylaminoalkyl chains on position 4 of the benzyl moieties, exhibited better antitrypanosomal activity than their methylpiperazinealkyl C_4 or C_3 analogues (compounds **2c** and **2d**) for which IC_{50} were noticed at 1.10 and 1.28 μM, respectively. Interestingly, a similar behaviour was also observed with their 6- and 7-methoxy substituted isoquinoline analogous (compounds **2e–h** and **2i–l**, respectively) for which the substitution of the dimethylamino terminal amine on the polyaminoalkyl side chains by a methylpiperazine moiety led to a decrease in the antitrypanosomal activity (IC_{50}=0.52–0.55 μM for **2e–f** *versus* 0.81–1.00 μM for **2g–h**, and IC_{50}=0.59–0.64 μM for **2i–j** *versus* 0.99–1.34 μM for **2k–l**). The influence of the length of the carbon chain in the polyaminoalkyl side-chain for the 6-methoxy substituted quinazolines **3h–j** seems also to be detrimental: a shorter alkyl chain (C_4 to C_2) led to a decreased antitrypanosomal activity (IC_{50}=0.27 μM for **3h** *versus* 1.04 and 0.44 μM for **3j** and **3i**, respectively).

Cytotoxicity and selectivity index

In order to assess selectivity of action, the cytotoxicities of these new synthesised antiparasitic heterocyclic compounds **1–3** were evaluated *in vitro* in the human cell line HepG2, which is a commonly used human-derived hepatocarcinoma cell line. These cells express many hepatocyte-specific metabolic enzymes. The aim of this assay using HepG2 cells was to evaluate the impact of metabolic activation of the tested compounds on cell viability. The cytotoxic concentrations 50% (CC_{50}) were determined, and selectivity indexes (SIs), defined as the ratios of cytotoxic to antiparasitic activities ($SI = CC_{50}/IC_{50}$) were calculated. The results of cytotoxicity assays and the associated SI values are presented in Table 3. Most of these "quinoline-like" derivatives that were found active against the different parasites showed significant cytotoxicity against the HepG2 cells with CC_{50} values ranging from 0.48 to 29.57 μM. Concerning the W2 strain, the calculated SIs were between 0.11 and 31.46. For the CQ sensitive strain 3D7, the SIs were noticed from 0.12 to 96.88. Analyses of SI values led us to identify the quinoline compound **1c** as a promising compound with a SI of 96.88 for the 3D7 strain. In addition, the quinazoline **3g** also had interesting SI value of 27.20 for the CQ sensitive strain 3D7. Against the *T. brucei brucei* strain, quinazolines **3h** and **3m** had SIs of 43.22 and 33.51, respectively. These SI values could indicate that these new nitrogen heterocyclic derivatives warrant further investigation into their potential use as antiparasitic drugs.

FRET-melting experiments

As the telomeres of the parasites *P. falciparum* and *Trypanosoma* could be potential targets of this kind of nitrogen heterocyclic compounds, we have also investigated stabilisation of the *P. falciparum* telomeric or *T. brucei brucei* chromosomic G-quadruplexes by our best bioactive compounds **1–3** through a FRET melting assays. We used a FRET melting assay to determine the degree to which the new quinoline, isoquinoline and quinazoline derivatives stabilise the G-quadruplexes formed by oligonucleotides with *P. falciparum* or *T. brucei brucei* as well as human telomeric sequences. For this purpose, we used two fluorescently labelled *P. falciparum* telomeric and one *T. brucei brucei* chromosomic sequences (FPf1T, FPf8T, and FtrypBT) and one human telomeric sequence (F21T).

To probe the G4 selectivity of our selected ligands **1–3** over duplex DNA, a FRET melting assay was performed using a duplex control sequence, FdxT. For comparison, we evaluated reference G4 ligand PhenDC3 and the antimalarial reference drugs CQ and MQ. To enable comparison of selectivities, we calculated the difference (ΔT_m) between the T_m of the G-quadruplex formed by FPf1T, FPf8T, FtrypBT (FEBR1T), F21T, or FdxT in the presence or absence of each selected compound. These ΔT_m values are presented in Table 4. For these selected compounds, the ΔT_m values ranged from 0.1 to 27.3 °C at 2 μM ligand concentration. The best ligands which stabilise all the four G-quadruplexes sequences were compounds **2e–f**, **3h,** and **3m** (Table 4). 7-Methoxy-1,3-bis{4-[(4-dimethylaminobutyl)aminomethyl]phenyl}isoquinoline **2e** strongly stabilised all the four G-quadruplex sequences with ΔT_m values ranged from 22.2 to 27.3 °C. These nitrogen heterocyclic compounds **2e–f**, **3h,** and **3m** which exhibited a strong stabilisation profile were all substituted by a methoxy function on the heterocyclic moiety and dimethylaminobutylamino or dimethylaminopropylamino side chains at position 4 of the benzyl rings. Among the tested compounds, derivatives **2e–f** and **3h** displayed a better stabilisation profile for both the *P. falciparum* telomeric sequences than the human telomeric G-quadruplex. Moreover, it could be noticed that all the selected quinoline derivatives **1** scarcely stabilised the G-quadruplex, whereas all the isoquinolines **2** strongly stabilised the protozoal and human G-quadruplex. In addition, the quinazoline ligands **3** showed low to moderate ranges of stabilisation on the different telomeric G-quadruplex. These last results could also confirm the importance of the position of the nitrogen atom in the isoquinoline and

Table 3. Selectivity indexes of compounds **1–3**.

Compound	Selectivity index[a]		
	HepG2/W2	HepG2/3D7	HepG2/*Tryp.*
Chloroquine	75	272	n.d.[b]
Pentamidine	n.d.[b]	n.d.[b]	11500
1a	n.d.[b]	1.45	7.03
1b	0.21	8.70	5.00
1c	9.11	96.88	2.09
1d	n.d.[b]	11.17	6.32
1e	8.78	24.10	6.36
1f	31.46	1.69	4.13
1g	n.d.[b]	14.85	3.87
1h	n.d.[b]	3.36	2.83
1i	0.45	1.16	5.34
1j	0.59	0.94	4.03
1k	1.50	2.38	6.28
1l	0.23	0.57	0.66
1m	0.13	0.60	5.00
1n	0.28	0.15	0.40
1o	1.47	1.38	2.96
1p	2.36	1.48	6.37
1q	n.d.[b]	4.68	5.18
1r	n.d.[b]	2.55	3.65
1s	n.d.[b]	12.52	3.60
1t	n.d.[b]	17.09	8.54
2a	1.33	4.78	12.98
2b	1.15	1.90	9.91
2c	1.13	2.54	4.53
2d	2.72	2.57	11.60
2e	1.58	2.17	17.4
2f	0.45	1.44	4.07
2g	1.33	3.11	10.16
2h	5.61	3.97	8.86
2i	4.48	1.27	16.81
2j	0.42	0.30	3.66
2k	1.09	0.73	6.54
2l	0.21	0.21	1.50
3a	n.d.[b]	1.96	4.70
3b	n.d.[b]	6.47	3.40
3c	n.d.[b]	14.97	10.72
3d	n.d.[b]	12.22	15.44
3e	n.d.[b]	10.44	6.64
3f	n.d.[b]	10.76	5.58
3g	n.d.[b]	27.20	3.21
3h	3.17	3.04	43.22
3i	0.44	0.48	7.15
3j	2.54	0.77	7.09
3k	4.67	7.25	24.06
3l	4.87	3.61	11.06
3m	5.95	21.30	33.51
3n	n.d.[b]	1.08	2.58
3o	1.15	1.87	1.52
3p	3.41	2.64	17.01
3q	0.11	0.12	0.74
3r	0.82	0.90	3.64
3s	n.d.[b]	1.01	0.55
3t	n.d.[b]	13.20	14.42
3u	n.d.[b]	6.14	3.67
3v	n.d.[b]	17.94	4.72

[a]SI was defined as the ratio between the CC_{50} value on the HepG2 cells and the IC_{50} value against the *P. falciparum* W2 or 3D7 or *Trypanosoma brucei brucei* strains.
[b] n.d.: not done.

quinazoline heterocycles. Concerning data noticed for the stabilisation of the *T. brucei brucei* non-telomeric G-quadruplexes (FtrypBT), the results showed the same profile as those obtained for the *P. falciparum* telomeric sequences (FPf1T, FPf8T) with slightly lower ΔT_m values. FRET assays showed there was no selectivity to duplex DNA sequence.

Table 4. FRET-melting values for the selected compounds **1–3**with FPf1T, FPf8T, FtryBT, F21T, and FdxT in K^+ conditions at 2 μM.

Compound	ΔT_m (°C)[a] FPf1T	ΔT_m (°C)[a] FPf8T	ΔT_m (°C)[a] FtrypBT	ΔT_m (°C)[a] F21T	ΔT_m (°C)[a] FdxT
PhenDC3	24.6 ± 0.1	24.7 ± 0.2	19.2 ± 0.2	26.3 ± 0.1	0.1 ± 0.2
CQ	1.9 ± 0.1	2.4 ± 1.2	n.d.[b]	2.4 ± 1.1	n.d.[b]
MF	3.1 ± 0.5	6.6 ± 2.3	n.d.[b]	2.6 ± 0.5	n.d.[b]
1b	8.4 ± 1.0	9.9 ± 0.1	7.8 ± 1.2	12.7 ± 0.6	0.0 ± 0.7
1c	2.3 ± 0.7	2.7 ± 0.2	2.6 ± 0.4	2.8 ± 1.3	−0.5 ± 0.4
1e	9.4 ± 0.6	9.2 ± 0.5	7.4 ± 0.1	11.3 ± 1.1	0.1 ± 0.1
1f	10.7 ± 1.0	11.0 ± 0.5	9.4 ± 0.6	9.5 ± 2.9	−0.1 ± 0.2
1g	3.7 ± 0.3	3.7 ± 0.6	2.0 ± 0.2	7.1 ± 2.7	−1.8 ± 0.4
1s	3.0 ± 0.4	2.8 ± 0.5	1.8 ± 0.7	2.5 ± 0.1	−1.5 ± 0.4
1t	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.7	0.6 ± 0.4	0.3 ± 0.3	−1.6 ± 0.4
2b	13.6 ± 1.3	13.0 ± 1.1	11.7 ± 0.6	12.7 ± 0.3	0.3 ± 0.2
2e	27.3 ± 1.1	26.6 ± 0.2	24.0 ± 0.3	22.2 ± 0.1	4.1 ± 0.3
2f	20.3 ± 1.1	18.5 ± 0.5	16.9 ± 1.1	15.8 ± 0.1	0.8 ± 0.3
2i	12.8 ± 1.3	12.9 ± 1.0	8.4 ± 0.3	23.2 ± 0.6	0.9 ± 0.1
2j	15.3 ± 0.7	15.0 ± 0.6	12.2 ± 1.1	13.9 ± 0.1	0.5 ± 0.3
3b	11.6 ± 1.1	11.2 ± 0.8	10.0 ± 0.4	13.2 ± 0.3	0.1 ± 0.1
3f	3.3 ± 0.3	2.9 ± 0.3	2.8 ± 0.1	3.1 ± 0.5	−0.2 ± 0.2
3g	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.5	4.2 ± 2.1	0.3 ± 0.2
3h	19.8 ± 0.6	18.8 ± 0.7	15.7 ± 0.3	16.4 ± 1.3	2.0 ± 0.2
3i	16.0 ± 0.3	15.6 ± 0.3	12.7 ± 0.7	12.6 ± 0.0	0.3 ± 0.3
3j	3.4 ± 0.4	3.1 ± 0.4	4.4 ± 0.5	7.2 ± 0.4	−0.4 ± 0.2
3m	18.3 ± 0.7	17.8 ± 0.5	13.8 ± 0.5	19.4 ± 0.4	1.7 ± 0.3
3v	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.4	0.6 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0

[a]ΔT_m of FPf1T, FPf8T, FtryBT, F21T and FdxT (0.2 μM) were recorded in 10 mM lithium cacodylate (pH 7.2), 10 mM KCl, 90 mM LiCl. PhenDC3 was tested at 0.5 μM, whereas CQ and MF at 1 μM. Error margins correspond to SD of three replicates.
[b]n.d.: not determined.

Classification of bioactive ligands

The selected compounds **1–3** were classified through HAC in two clusters (Figure 2(A)), defining consistent compound types in relation to *P. falciparum* variables (FPf1T, FPf8T, F21T, and IC_{50} against the 3D7 strain). Both clusters included ten compounds and were clearly separated. The red cluster was distinguished by an increase in F21T, FPf1T, FPf8T, and 3D7 values, defining a compound class mainly characterised by a high affinity for *P. falciparum* and human telomeric G-quadruplexes and with a scarce antimalarial activity. On the other hand, the blue cluster was characterised by a decrease in FRET-melting and IC_{50} values, mainly defining a compound class with lower affinity for the employed G-quadruplex sequences and higher antimalarial activity. Consequently, these results suggest that the ability of our compounds to target *P. falciparum* telomeric G-quadruplex sequences is not a desirable property for antimalarial activity.

These selected bioactive compounds were classified in two consistent clusters also in relation to *T. brucei brucei* variables (FtryBT, F21T, and IC_{50} against *T. brucei brucei* strain) (Figure 2(B)). In sharp contrast with *P. falciparum* (Figure 2(A)), the red cluster was characterised by the most active molecules showing also a higher selectivity for the tested G-quadruplex sequences contrarily to the blue ones. The latter classification highlights a positive correlation between the anti-trypanosomal activity and the ability of these compounds to stabilise telomeric G-quadruplexes.

Conclusions

In this report, we described the design, the synthesis, the antiprotozoal activities, and the *in vitro* cytotoxicity towards human cells of a novel series of 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinoline, 1,3-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]isoquinoline and 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinazoline derivatives. These new "quinoline-like" derivatives were tested for their *in vitro*

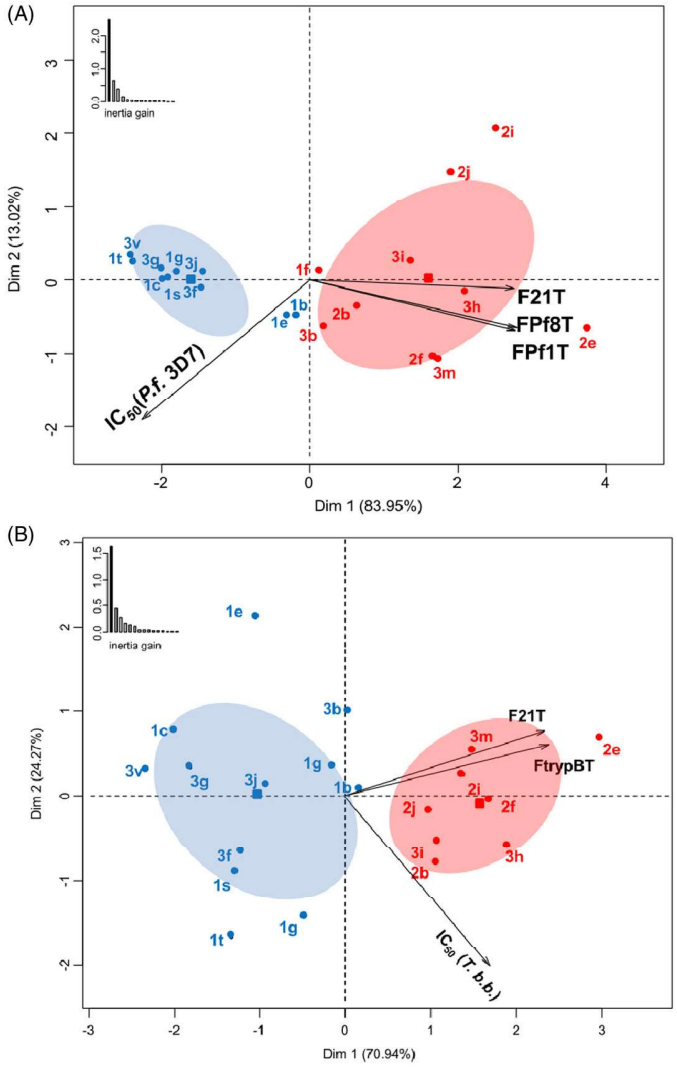


Figure 2. Principal Component Analysis biplots employed in Hierarchical Ascendant Classification (HAC) in relation to *P. falciparum* (A) and *T. brucei brucei* variables (B). Colours and confidence ellipses (for $\alpha = 0.05$) define the attribution of the selected twenty ligands **1–3** based on their IC_{50} best results to the two groups defined by HAC.

antiparasitic activity towards the CQ-sensitive 3D7 and CQ-resistant W2 *P. falciparum* strains, the promastigote form of *L. donovani*, and a *T. brucei brucei* strain. Among these new synthesised nitrogen heterocyclic molecules, a few of them were identified as potential *in vitro* antiplasmodial leads with IC_{50} ranging from 0.032 to 0.23 μM on the W2 and 3D7 strains of *P. falciparum*. The 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinoline **1c** was identified as the most potent antimalarial candidate with a ratio of cytotoxic to antiparasitic activities of 97 against the *P. falciparum* CQ-sensitive strain 3D7. In general, the quinoline and quinazoline derivatives **1** and **3** were found more active against both *Plasmodium* strains than their isoquinoline analogues **2**. Moreover, introduction of a methoxy substituent on the heterocyclic moieties generally did not led to an increase of the antimalarial activity. Unfortunately, none of our compounds showed activity against the promastigote forms of *L. donovani*. Moreover, the antiprotozoal activity spectrum of our new synthesised derivatives using a *T. brucei brucei* strain revealed IC_{50} values ranging from 0.27 to 2.39 μM, which warrant further investigations. The 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinazoline **3 h** was also identified as the most potent trypanosomal candidate with SI of 43 on *Trypanosoma brucei brucei* strain. In addition, the *in vitro* cytotoxicity of these new heterocyclic compounds was assessed on the human HepG2 cell line. Structure-activity relationships of these new synthetic compounds are here also discussed, as well as their relative ability of targeting *P. falciparum* or *Trypanosoma* telomeres as an hypothetical mechanism of action. Thus, as the telomeres of the parasites could constitute interesting targets, we have also investigated the possibility of targeting *Plasmodium* telomeres or *Trypanosoma* chromosomes by stabilising the *Plasmodium* or *Trypanosoma* G-quadruplexes sequences through FRET melting assays with our best bioactive compounds. Concerning the stabilisation of the parasitic G-quadruplex, the isoquinoline derivatives **2** seem to better stabilise the protozoal and human G-4 structures in comparison with their quinoline and quinazoline homologues **1** and **3**.

Acknowledgements

We thank the DGA and ANR (projects ANR-12-ASTR-003). The authors also thank Philippe Grellier for supplying the 3D7 and W2 strains (Museum National d'Histoire Naturelle collection, Paris, France).

Disclosure statement

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the article.

Funding

This work was supported by the SYMBIT project (reg. no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000477) financed by the ERDF. Pierre Laumaillé is the recipient of the Haut-de-France region grant.

References

1. World Health Organization. World malaria report 2018. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2018.
2. Yeung S, Socheat D, Moorthy VS, et al. Artemisinin resistance on the Thai-Cambodian border. Lancet 2009;374:1418–19.
3. Müller O, Sié A, Meissner P, et al. Artemisinin resistance on the Thai-Cambodian border. Lancet 2009;374:1419.
4. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. Nature 2014;505:50–5.
5. World Health Organization. Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2018.
6. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2015.
7. De D, Krogstad FM, Cogswell FB, et al. Aminoquinolines that circumvent resistance in *Plasmodium falciparum in vitro*. Am J Trop Med Hyg 1996;55:579–83.
8. Ridley RG, Hofheinz W, Matile H, et al. 4-aminoquinoline analogs of chloroquine with shortened side chains retain activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:1846–54.

9. Rout S, Mahapatra RK. *Plasmodium falciparum*: multidrug resistance. Chem Biol Drug Des 2019;93:737–59.
10. Ashley EA, Phyo AP. Drugs in development for malaria. Drugs 2018;78:861–79.
11. Hu YQ, Gao C, Zhang S, et al. Quinoline hybrids and their antiplasmodial and antimalarial activities. Eur J Med Chem 2017;139:22–47.
12. Hussaini SM. Therapeutic significance of quinolines: a patent review. Expert Opin Ther Pat 2016;26:1201–21.
13. Parhizgar AR, Tahghighi A. Introducing new antimalarial analogues of chloroquine and amodiaquine: a narrative review. Iran J Med Sci 2017;42:115–28.
14. Nqoro X, Tobeka N, Aderibigbe BA. Quinoline-based hybrid compounds with antimalarial activity. Molecules 2017;22: 2268.
15. Deshpande S, Kuppast B. 4-Aminoquinolines: an overview of antimalarial chemotherapy. Med Chem 2016;06:1–11.
16. Kumar S, Singh RK, Patial B, et al. Recent advances in novel heterocyclic scaffolds for the treatment of drug-resistant malaria. J Enzyme Inhib Med Chem 2016;31:173–86.
17. Manohar S, Tripathi M, Rawat DS. 4-aminoquinoline based molecular hybrids as antimalarials: an overview. Curr Top Med Chem 2014;14:1706–33.
18. O'Neill PM, Ward SA, Berry NG, et al. A medicinal chemistry perspective on 4-aminoquinoline antimalarial drugs. Curr Top Med Chem 2006;6:479–507.
19. Malmquist NA, Moss TA, Mecheri S, et al. Small-molecule histone methyltransferase inhibitors display rapid antimalarial activity against all blood stage forms in *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci USA 2012;109:16708–13.
20. Fröhlich T, Tsogoeva SB. *In Vivo* and *in vitro* optimization of screening antimalarial hits toward lead molecules for preclinical development. J Med Chem 2016;59:9668–71.
21. Gilson PR, Tan C, Jarman KE, et al. Optimization of 2-anilino 4-amino substituted quinazolines into potent antimalarial agents with oral *in vivo* activity. J Med Chem 2017;60: 1171–88.
22. Baragaña B, Norcross NR, Wilson C, et al. Discovery of a quinoline-4-carboxamide derivative with a novel mechanism of action, multistage antimalarial activity, and potent in vivo efficacy. J Med Chem 2016;59:9672–85.
23. Lubin AS, Rueda-Zubiaurre A, Matthews H, et al. Development of a photo-cross-linkable diaminoquinazoline inhibitor for target identification in *Plasmodium falciparum*. ACS Infect Dis 2018;13:523–30.
24. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. Lancet 2018; 392:951–70.
25. Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Clin Microbiol Rev 1997;10:298–319.
26. World Health Organization. WHO Technical report series n°975, research priorities for chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2012: 116.
27. World Health Organization. WHO interim guidelines for the treatment of gambiense human African trypanosomiasis. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2019.
28. Guillon J, Grellier P, Labaied M, et al. Synthesis, antimalarial activity, and molecular modeling of new pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines, bispyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines, bispyrido[3,2-*e*]pyrrolo[1,2-*a*]pyrazines, and bispyrrolo[1,2-*a*]thieno[3,2-*e*]pyrazines. J Med Chem 2004;47:1997–2009.
29. Guillon J, Forfar I, Mamani-Matsuda M, et al. Synthesis, analytical behaviour and biological evaluation of new 4-substituted pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines as antileishmanial agents. Bioorg Med Chem 2007;15:194–210.
30. Guillon J, Forfar I, Desplat V, et al. Synthesis of new 4-(*E*)-alkenylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines as antileishmanial agents by Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions. J Enzyme Inhib Med Chem 2007;22:541–9.
31. Guillon J, Moreau S, Mouray E, et al. New ferrocenic pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives: synthesis, and in vitro antimalarial activity. Bioorg Med Chem 2008;16:9133–44.
32. Guillon J, Mouray E, Moreau S, et al. New ferrocenic pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives: synthesis, and in vitro antimalarial activity-Part II. Eur J Med Chem 2011;46:2310–26.
33. Ronga L, Del Favero M, Cohen A, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-alkapolyenylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines as antileishmanial agents–part III. Eur J Med Chem 2014;81:378–93.
34. Guillon J, Cohen A, Gueddouda NM, et al. Design, synthesis and antimalarial activity of novel bis{*N*-[(pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl}amine derivatives. J Enzyme Inhib Med Chem 2017;32:547–63.
35. Guillon J, Cohen A, Das RN, et al. Design, synthesis, and antiprotozoal evaluation of new 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline derivatives. Chem Biol Drug Des 2018;91:974–95.
36. Calvo EP, Wasserman M. G-Quadruplex ligands: potent inhibitors of telomerase activity and cell proliferation in *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 2016;207: 33–8.
37. Tidwell R, Boykin D, Ismail M, et al. Dicationic compounds which selectively recognize G-quadruplex DNA, Patent EP-1792613-A2, 2007.
38. Leeder WM, Hummel NF, Göringer HU. Multiple G-quartet structures in pre-edited mRNAs suggest evolutionary driving force for RNA editing in trypanosomes. Sci Rep 2016;6: 29810.
39. Lombraña R, Álvarez A, Fernández-Justel JM, et al. Transcriptionally driven DNA replication program of the human parasite leishmania major. Cell Rep 2016;16:1774–86.
40. Bottius E, Bakhsis N, Scherf A. *Plasmodium falciparum* telomerase: de novo telomere addition to telomeric and non-telomeric sequences and role in chromosome healing. Mol Cell Biol 1998;18:919–25.
41. Raj DK, Das BR, Dash AP, et al. Identification of telomerase activity in gametocytes of *Plasmodium falciparum*. Biochem Biophys Res Commun 2003;309:685–8.
42. De Cian A, Grellier P, Mouray E, et al. *Plasmodium* telomeric sequences: structure, stability and quadruplex targeting by small compounds. ChemBioChem 2008;9:2730–9.
43. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, et al. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. Antimicrob Agents Chemother 1979;16:710–18.
44. Bennett TN, Paguio M, Gligorijevic B, et al. Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1807–10.
45. Bacon DJ, Latour C, Lucas C, et al. Comparison of a SYBR green I-based assay with a histidine-rich protein II enzyme-linked immunosorbent assay for *in vitro* antimalarial drug efficacy testing and application to clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1172–8.

46. Kaddouri H, Nakache S, Houzé S, et al. Assessment of the drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from africa by using a *Plasmodium* lactate dehydrogenase immunodetection assay and an inhibitory maximum effect model for precise measurement of the 50-percent inhibitory concentration. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:3343–9.
47. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55–63.
48. Emami SA, Zamanai Taghizadeh Rabe S, Ahi A, et al. Inhibitory activity of eleven artemisia species from Iran against *Leishmania* major parasites. Iran J Basic Med Sci 2012;15:807–11.
49. Räz B, Iten M, Grether-Bühler Y, et al. The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (T.b. rhodesiense and T.b. gambiense) *in vitro*. Acta Trop 1997;68:139–47.
50. Baltz T, Baltz D, Giroud C, et al. Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. EMBO J 1985;4:1273–7.
51. De Cian A, Guittat L, Kaiser M, et al. Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands. Methods 2007;42:183–95.
52. Belmonte-Reche E, Martínez-García M, Guédin A, et al. G-quadruplex identification in the genome of protozoan parasites points to naphthalene diimide ligands as new antiparasitic agents. J Med Chem 2018;61:1231–40.
53. Le S, Josse J, Husson F. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. J Stat Softw 2008;25:1–18.
54. Zeileis A, Hothorn T. Diagnostic checking in regression relationships. R News 2002;2:7–10.
55. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Vienna, Austria: R Core Team; 2013.
56. Achelle S, Rodríguez-López J, Robin-le Guen F. Synthesis and photophysical studies of a series of quinazoline chromophores. J Org Chem 2014;79:7564–71.
57. Jun JV, Petersson EJ, Chenoweth DM. Rational design and facile synthesis of a highly tunable quinoline-based fluorescent small-molecule scaffold for live cell imaging. J Am Chem Soc 2018;140:9486–93.
58. Kang D, Kim H, Shin C. Compound for organic optoelectric device, organic light emitting device containing same, and display device containing said organic light emitting device, Patent EP-2842954, 2015.

III.3. Autres séries

En se basant sur la série B, de nouvelles pharmacomodulations du système hétérocycliques en remplaçant les noyaux quinoléines, isoquinoléines et quinazolines par de nouveaux systèmes poly-condensés de type pyrrolopyrimidine ou thénopyrimidine (Série C) ont été réalisées (figure 80). Dans cette nouvelle série, l'équipe du Pr Guillon a préparé des composés monosubstitués ; et les résultats encourageants (Série C-1 présentant des IC_{50} = 20-50 nM) de ces derniers dérivés les ont conduits à envisager de synthétiser de nouveaux bio-isostères par chimie « click » (Série D). Malheureusement, ces nouvelles pharmacomodulations remplaçant la partie benzylamine par un système triazolométhylamine n'a pas conduit aux résultats escomptés, puisque les IC_{50} de cette dernière série sont compris entre 4,25 et 50,03 µM.

Une autre modulation, initiée à partir de la série A, concerne la série E et consiste en l'introduction des groupements phényles en positions 4 et 7 du noyau phénanthroline. Actuellement, la dernière série envisagée (série F) passait par l'introduction d'une chaine aminoalkylpyridine sur le noyau initial de la série A. Les premières données ont montré, une nouvelle fois, des IC_{50} très intéressants entre 0,047 et 4,13 µM.

Parmi ces nouvelles séries originales, certains composés présentent des activités trypanocides intéressantes permettant ainsi d'envisager des relations structure-activité en ce qui concerne le positionnement des substituants et leur nature en comparaison de leur activité antiparasitaire.

BY-NC-ND

Discussion

Les infections à kinétoplastidés se classent au 10ème rang des causes de mortalité et au 11ème rang des causes de morbidité des MTNs dans le monde, avec 20 000 décès par an (Chapman et al., 2018). En Afrique sub-saharienne, près de 9 millions d'individus humains comme animaux sont à risque de contracter la Trypanosomose Africaine. Cette parasitose « est en passe d'être éliminée » …tout comme on le pensait dans les années 20 puis dans les années 60 (Dramane, 2019). La vigilance doit rester de mise et les efforts consentis pour lutter contre cette maladie du bout de la piste doivent perdurer. Actuellement la prise en charge thérapeutique pour la Trypanosomose Humaine Africaine repose sur des antiparasitaires anciens, non dénués de toxicité et dont l'apparition croissante de résistances freinent leur utilisation. Des grands organismes tel le DND*i* poursuivent la lutte et développe de nouveaux produits. C'est ainsi qu'a vu le jour en 2018 le fexinidazole, dérivé nitroimidazolé, qui peut maintenant être délivré aux populations atteints de THA à *T.b.g*. (Torreele et al., 2010; "About Sleeping Sickness | DNDi,"). Un autre composé, l'acoziborole, candidat médicament prometteur, est quant à lui toujours en phase II/III des essais cliniques ("About Sleeping Sickness | DNDi,").

La recherche d'un nouveau médicament est longue, en moyenne 10 à 15 ans. Elle repose sur des études permettant d'obtenir le profil du produit cible (TPP, Target Product Profile) essentiel pour l'utilisation ultérieure du composé (Frearson et al., 2007). D'abord, le développement se base sur la découverte d'une molécule de départ, un « hit » *via* des screening moléculaires, ou des modifications structurales de molécules préexistantes. De ce « hit » sélectionné, des améliorations pharmacochimiques vont avoir lieu afin d'obtenir une molécule tête de file ou « lead ». Et à partir de ce « lead », une phase d'essai préclinique débute. Cette phase fait appel aux études *in vivo* sur l'animal afin de connaitre le comportement du candidat-médicament sur un organisme vivant entier. Ces études vont permettre d'engranger des données importantes sur la pharmacologique, la pharmacocinétique et la toxicologique de ces nouvelles générations de molécules (Chatelain and Ioset, 2011; Don and Ioset, 2014).

C'est tout le sens de notre travail de thèse au sein de l'UMR 1094 NET qui depuis 30 ans a voulu s'inscrire dans la recherche contre la THA. Les résultats présentés ici sont une partie d'un travail plus large sur les kinétoplastidae mis en place grâce à des collaborations transdisciplinaires. Ici l'objectif général est d'identifier de nouveaux composés chimiques capables d'agir sur des cibles spécifiques du trypanosome comme les NTRs ou encore ses télomérases afin d'inhiber sa réplication.

BY-NC-ND

Pour atteindra ces objectifs, nous nous sommes intéressées à 2 familles de composés chimiques capables d'interagir avec ses enzymes parasitaires (*i*) les nitroaromatiques substrats des NTRs avec plus précisément, les nitroquinoléinones et les nitroimidazopyridines et un nitroimidazolé, le mégazol ; (*ii*) et dans la deuxième partie de notre thèse nous avons initié un travail sur les hétérocycles azotés cibles des télomérases du trypanosome.

Dans un premier temps, nous nous sommes consacrés à l'étude de nouveaux nitromidazolés ciblant la nitroréductase du trypanosome appelée NTR1. Cette enzyme, absente des cellules des mammifères, aurait un rôle de détoxification pour éliminer les composés nitroaromatiques. Or, en réduisant ces composés nitrés, la NTR1 crée des intermédiaires toxiques pour le parasite (Hall et al., 2010). Elle est donc considérée comme une cible intéressante bien que son mécanisme d'action ne soit pas totalement élucidé. Les molécules étudiées sont classées en deux familles, les nitroquinoléinones et les nitroimidazopyridines, et ont été synthétisées à Toulouse et à Marseille au sein des équipes LCC-UPR CNRS 8241 et LPCR – UMR 7273 respectivement.

Concernant l'étude des nitroquinoléinones, différentes pharmacomodulations ont été initiées à partir d'un « hit », la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one en vue de réaliser des tests *in vitro* de détermination de la CC_{50}, de la CI_{50}, des tests de pharmacocinétiques, de mutagénicité ou de génotoxicité pour sélectionner le meilleur candidat pour des tests *in vivo* (Paloque et al., 2012; Pedron et al., 2018a, 2018b). De ces analyses *in vitro*, seule la molécule 76 a été sélectionnée avec une CC_{50} de l'ordre de 17,9 µM, une CI_{50} de 0,012 µM permettant ainsi d'avoir un IS de 1491. Sa capacité à franchir la BHE et une stabilité microsomale intéressante permettent d'envisager une absence de métabolisation qui sont des éléments clés pour de futurs tests sur modèle animal. Ces premiers tests *in vivo* ont mis en évidence une tolérance à la dose de 25 mg/kg. Pour les résultats de pharmacocinétique nous avons montré qu'après une administration *per os* de 25 mg/kg (soit 18 mg/mL), la molécule est capable de diffuser au travers de la barrière intestinale vers la circulation sanguine. Pour cette molécule l'exposition totale de l'organisme au médicament est de l'ordre de 0,12 mg.h/mL, avec une valeur de Cmax de 0,017 mg/mL, montrant de meilleurs résultats, que ceux du fexinidazole qui sont pour la valeur d'exposition de $4{,}24.10^{-4}$ mg.h/mL avec une Cmax de 5.10^{-4} mg/mL (figure 52) (Torreele et al., 2010). Ces données de distribution au niveau sanguin nous ont laissé espérer une bonne exposition du composé vis-à-vis des trypanosomes. A partir de là, nous avons considéré que le schéma d'administration le plus approprié était d'une dose par jour. Tenant compte de ces résultats et du développement parasitaire chez l'animal, nous avons initié une étude sur un

BY-NC-ND

modèle murin infecté par la souche *T.b.b*. AnTat 1.9 et traité à la dose de 25 mg/kg/jour pendant 5 jours. Des contrôles de la parasitémie ont été effectués quotidiennement et ont révélé une augmentation constante de la charge parasitaire indiquant une absence d'efficacité du composé. Malgré des résultats encourageants, nous nous sommes interrogés sur l'absence d'efficacité de cette molécule 76 *in vivo* ? Une première hypothèse peut être formulée sur une éventuelle métabolisation par des cytochromes intestinaux, hépatiques voire rénaux, bien que les analyses *in vitro* montrent que la molécule 76 possède une stabilité microsomale avec un $T_{1/2}$ supérieure à 40 minutes sur microsomes hépatiques murins. Pour vérifier cette hypothèse, une étude a consisté à inhiber la métabolisation des CYP450 avec l'utilisation de l'ABT. Ce dernier inhibe l'action de plusieurs isoformes permettant de comprendre les mécanismes de métabolisation (De Montellano, 2018). L'ABT a donc été administré par voie intrapéritonéale aux souris parasitées 1 h avant la prise de la molécule 76 à chaque jour de traitement. Comme précédemment, la parasitémie a été mesurée quotidiennement. Aucune amélioration n'a pu être mise en évidence. Ceci suggère que la molécule 76 n'est pas substrat des CYP450. Pour rappel, la molécule 76 est une nitroquinoléinone substituée en position 3 par un chlore et en position 6 par un brome. Sa structure laisse peu d'opportunité à la métabolisation, laissant présager une élimination sous forme inchangée dans les fèces après fixation aux protéines plasmatiques ou une réduction du nitro $–NO_2$ en amine $–NH_2$, seule cible de métabolisation possible, comme cela a été montré avec le métronidazole (Dingsdag and Hunter, 2018). A ce stade, il est difficile de conclure sans avoir recherché les éventuels métabolites issus d'autres voies enzymatiques dont la monoamine oxydase, l'alcool déhydrogénase, l'acétyl-transférase, ou la glutathion transférase (Guengerich, 1996). Nous savons néanmoins que la métabolisation des médicaments repose sur 2 phases. La phase 1 de métabolisation fait intervenir des enzymes principalement hépatiques regroupant notamment les CYP450, capables de réduire par oxydation les molécules pour les rendre plus hydrophiles. La métabolisation de phase 2 fait intervenir d'autres systèmes enzymatiques comme les UGT (UDP-glucuronyl-transférase) capables de glucuronoconjugaison. Les métabolites deviennent alors suffisamment polaires pour être éliminés dans la bile ou l'urine. Il arrive que certains composés présentent des structures pouvant directement être glucuronoconjuguées pour une élimination plus rapide (Guengerich, 1996). Ainsi, afin d'étudier les produits issus de la métabolisation de la molécule 76, une nouvelle étude a été menée. Des souris ont été traitées avec cette molécule, et des prélèvements (sang, urines, fèces) ont été réalisés. Un screening par méthode GUS a été initié, permettant la détection de la molécule 76, et un second composé non identifié, qui n'est pas le composé réduit $–NH_2$. Ce résultat est donc cohérent avec les résultats *in vitro* et avec

BY-NC-ND

ceux obtenus avec l'ABT montrant que la molécule 76 n'est pas substrat des CYP450. De plus, il a été montré que la molécule 76 est liée à plus de 99% aux protéines plasmatiques. Cette donnée associée aux résultats *in vivo* suggère que la molécule est éliminée en tant que tel par l'organisme par voie biliaire, sans que la fraction libre soit capable d'agir comme c'est le cas avec l'acénocoumarol, qui est lié à 99% aux protéines plasmatiques mais qui par son 1% actif est un médicament anticoagulant ("Interactions médicamenteuses et cytochromes - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé,"). Il reste donc à comprendre comment cette molécule 76, qui est présente en grande quantité dans le sang, n'arrive pas à inhiber la multiplication parasitaire. Une autre hypothèse pouvant expliquer ces résultats est en lien avec la technique que nous avons utilisée. En effet, l'analyse faite avec les QuEChERs rompt toutes les liaisons que la molécule peut avoir, dont celles avec les protéines plasmatiques, expliquant la forte concentration mesurée dans le sang et laissant présumer un bon passage plasmatique. Mais ceci biaise le ratio fraction libre/ fraction liée et donc les résultats obtenus en pharmacocinétique (Dulaurent et al., 2016). A l'inverse lors des analyses GUS faites sur les fèces, aucune liaison n'est rompue, nous retrouvons donc la quantité réellement éliminée de façon physiologique. Il serait donc judicieux d'effectuer une recherche d'albumine déplétée pour essayer de comprendre la relation fraction libre/fraction liée et l'efficacité de la molécule (Rai, 2007).

Un nouvel aspect à l'origine de ces résultats est la dose administrée. Nous aurions pu prendre le parti d'augmenter cette dose en allant jusqu'à 50 mg/kg avec le risque de voir apparaitre une toxicité marquée par les administrations répétées établies dans le protocole de traitement. Une autre option aurait été d'augmenter la fréquence d'administration journalière en prenant le risque là-aussi d'une augmentation de la toxicité avec un temps de demi-vie d'élimination allongé.

En complément de ces hypothèses, il serait intéressant de marquer la molécule 76 avec un carbone 13 afin de suivre par imagerie sa distribution dans l'organisme. Ce qui permettrait de comprendre si elle peut être séquestrée dans des cellules ou tissus extra-plasmatiques, et réaliser des dosages dans les différents organes (Fischman et al., 1993; Reif et al., 2017).

La deuxième famille de nitromidazolés, que nous avons étudiée, est celle des nitroimidazopyridines. Du « hit » initial, la 6,8-dibromo-3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine, différentes pharmacomodulations ont été initiées pour obtenir 3 composés ayant présenté les meilleurs profils *in vitro* et ayant été inclus dans des essais *in vivo* sur modèle murin. La première molécule est la molécule 41 issue d'une réaction de Sonogashira (Fersing, 2019 en cours de soumission). Les paramètres *in vitro* ont montré une absence de cytotoxicité avec

BY-NC-ND

une CC_{50} > 125 µM, une activité trypanocide intéressante avec une CI_{50} de 0,07 µM permettant d'obtenir un IS > 1894. Avec l'absence de mutagénicité et de génotoxicité, cette molécule remplit tous les critères pour être évaluée sur un modèle animal. Suivant donc le même protocole que pour la molécule 76 des nitroquinoléionones, la détermination de la dose maximale sans effet indésirable a été évaluée à 100 mg/kg. Par la suite l'ensemble des tests *in vivo* ont été réalisés à cette même dose. L'étude pharmacocinétique a permis de montrer que la molécule 41 présentait une AUC de 0,0014 mg.h/mL avec une Cmax de 4.10^{-4} mg/mL. Nous pouvons en conclure que cette molécule n'est pas assez longtemps exposée au niveau sanguin. Malgré tout, la clairance d'élimination de l'ordre de 2,44 mL/h suggère, que le composé est lentement éliminé de l'organisme. Ceci montre donc que la molécule 41 quitte probablement le sang pour se distribuer dans l'organisme. Toutefois avec un $T_{1/2}$ long, de l'ordre de 10h, nous avons décidé d'administrer la molécule suivant le schéma d'une dose par jour sur 5 jours de traitement (figure 61). Les souris parasitées ont donc reçu 100 mg/kg par gavage et un suivi de la parasitémie a été effectué quotidiennement. Toutes les souris sont mortes sans diminution de la charge parasitaire. Nous avons donc effectué une analyse après une administration d'ABT afin d'inhiber la possible métabolisation par les CYP450. Partant du même protocole que pour la molécule 76, l'administration a été effectuée avant chaque gavage de la molécule 41 et cela chaque jour du traitement. Le suivi parasitaire a révélé une absence d'efficacité malgré l'inhibition des CYP450. Pour compléter ces données, une recherche des métabolites a été menée. Un screening des fluides biologiques (sang total, sérum, urines et fèces) a permis de mettre en évidence la présence d'un composé réduit du $–NO_2$ en $–NH_2$, pouvant peut-être expliquer l'absence d'efficacité de cette molécule. En effet, une des caractéristiques de nos composés repose sur la présence du groupement nitro capable d'être reconnu par la NTR1 du trypanosome. Cinq autres métabolites ont aussi été détectés dans les fluides des souris dont le composé réduit et glucuronoconjugué (m/z 566). Ce composé serait donc issu d'une métabolisation de phase 1 et d'une métabolisation de phase 2 (Smith and Waterbeemd, 1999; Lentz et al., 2013). Ceci explique son élimination rapide et donc son défaut d'efficacité. Cette réduction ne semble pas être due à l'activité des CYP450 étant donné que même après leur inhibition avec l'emploi d'ABT, la molécule 41 n'est toujours pas efficace. Il faudrait effectuer une recherche des métabolites après traitement à l'ABT pour vérifier leur présence. Comme pour la molécule 76, il serait utile de marquer la molécule 41 pour analyser sa distribution.

La molécule 50, deuxième molécule nitroimidazopyridine étudiée, est issue d'une substitution radicalaire nucléophile faisant intervenir un 4-chlorothiophénol. Elle a été sélectionnée pour des études *in vivo* malgré une CI_{50} de l'ordre de 1,3 µM et une stabilité microsomale de 3

BY-NC-ND

minutes. En effet, la molécule 50 est une prodrogue qui est capable de donner des métabolites sulfoxides et sulfones (notés respectivement métabolites 99 et 100 d'après le tableau 44) bien plus actifs. Il a donc été intéressant de vérifier si *in vivo* nous pouvions retrouver une activité due à la molécule mère ou à ses métabolites. La dose maximale sans effet indésirable a été définie à 100 mg/kg. Les études de pharmacocinétique ont montré des résultats peu encourageants du fait d'une AUC de l'ordre de 4.10^{-5} mg.h/mL indiquant une faible exposition du composé dans l'organisme ce qui est confirmé par une Cmax de 4.10^{-5} mg/mL et une clairance totale d'élimination de 93 mL/h signifiant que la molécule est rapidement éliminée. Ce qui confirme les résultats *in vitro* du test PAMPA-GIT sur la très mauvaise diffusion de la molécule 50 au travers de la barrière intestinale, et donc de sa très faible exposition systémique. Les tests *in vivo* ont été menés avec 2 administrations par jour sur 5 jours de traitement. Aucune efficacité n'a pu être démontrée et les souris sont rapidement mortes. Une recherche des métabolites 99 et 100 dans les fluides biologiques a été menée. Aucun des 2 composés n'a été retrouvé. Nous avons uniquement mis en évidence le composé réduit $-NH_2$, et le composé –NO. Ceci pourrait s'expliquer par la faible quantité de molécule 50 qui arrive à diffuser au niveau sanguin et qui est directement réduit. Ainsi, le plus gros inconvénient de cette molécule 50, est sa trop faible diffusion au niveau systémique. Nous pourrions donc envisager d'étudier les métabolites sulfoxide et sulfone directement *in vivo* pour vérifier s'ils sont capables de diffuser dans l'organisme pour agir.

La dernière molécule étudiée des nitroimidazopyridines *in vivo* est la molécule 120, issue cette fois-ci de substitution à partir du « hit » initial. Elle présente un très bon profil *in vitro* avec une CC_{50} > 62,5 µM, une CI_{50} de 0,017 µM donnant donc un IS de 3676, et une liaison aux protéines plasmatiques de l'ordre de 77%. Elle a donc été testée sur un modèle murin. La dose maximale sans effet toxique a été évaluée à 100 mg/kg. Les résultats de l'étude de pharmacocinétique ont permis d'obtenir des résultats intéressants avec une exposition systémique de l'ordre de 0,007 mg.h/mL et une Cmax de 7.10^{-4} mg/mL. Faiblement éliminée de l'organisme avec une clairance de 0,513 mL/h, la molécule 120 a donc été administrée 1 fois par jour sur 5 jours de traitement. Les tests initiés sur les souris parasitées ont montré une absence d'efficacité avec une augmentation de la charge parasitaire et la mort des animaux. Avec cette molécule, l'hypothèse de l'absence d'efficacité due à la liaison aux protéines plasmatiques est réfutée avec un taux de fixation à 77%. Le problème pourrait donc être d'origine métabolique. Nous avons décidé d'effectuer comme pour les molécules 76 et 41, une étude avec l'inhibiteur enzymatique ABT. Un contrôle de la charge parasitaire quotidien a mis en évidence une diminution de la parasitémie dès le 3ème jour de traitement avec une élimination totale (aucun trypanosome n'a pu être décelé dans le sang) au 5ème jour de

BY-NC-ND

traitement. Malheureusement, 4 jours après la fin du traitement, des rechutes sont apparues. Encore une fois se pose le problème de la dose de molécule ou d'ABT à administrer, voire la fréquence d'administration qui pourraient être augmentées afin d'éliminer les parasites. Il faut toutefois garder à l'esprit qu'une augmentation de la dose d'ABT ou de sa fréquence d'administration au cours de la journée, signifie une inhibition totale de la métabolisation pouvant avoir des conséquences néfastes sur la santé de l'animal ou de l'Homme. Si le traitement venait à être proposé en médecine humaine, il serait nécessaire de s'interroger sur la possible interaction avec des traitements substrats des CYP450, comme certains anti-infectieux (ciprofloxacine, voriconazole…), l'amiodarone ou encore des anticonvulsivants (carbamazépine, phénobarbital) ("Interactions médicamenteuses et cytochromes - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé,"). Afin de comprendre cette activité de la molécule 120 après inhibition de CYP450, une nouvelle étude de pharmacocinétique a été menée sur de nouvelles souris recevant del'ABT puis de la molécule 120. Nous avons alors constaté une augmentation de l'AUC avec une valeur de 0,011 mg.h/mL (pour rappel sans ABT cette valeur était de 0,007 mg.h/mL), une Cmax de 0,0014 mg/mL (contre 7.10^{-4} mg/mL sans ABT). Ainsi la molécule 120 est plus longtemps présente dans l'organisme et peut donc agir. Ces résultats sont toutefois en contradiction avec les résultats *in vitro* obtenus sur microsomes hépatiques murins. Avec ces derniers, il a été montré une stabilité microsomale supérieure à 40 min. Pour aller plus loin dans cette étude, la recherche des métabolites a été menée concernant la molécule 120 avec et sans ABT. Lors de l'analyse des différents fluides biologiques (sang et sérum à 1 h post traitement, urines fèces sur 0-12 h puis 12-24 h), nous avons constaté la présence de plusieurs métabolites. Nous avons notamment retrouvé le composé réduit $-NH_2$, et le composé réduit glucuronoconjugué. D'autres molécules ont été détectées mais doivent encore être analysées. Les deux composés résultent d'une métabolisation de phase 1 ou de phase 1 et 2. Ceci explique probablement la perte d'activité de la molécule 120. Ils ont été retrouvés uniquement dans les urines et les fèces des 12 premières heures et des 12 suivantes. Dans le sang et le sérum 1 h post traitement, aucun de ces 2 métabolites n'a été détecté. Nous pouvons justifier ces résultats par le fait que le recueil des urines et des fèces se fait sur une durée cumulative permettant d'obtenir les composés produits sur plusieurs heures alors que celle du sang est à un temps fixe donnée. Nous pouvons envisager, qu'au bout d'un certain laps de temps, la quantité de molécule 120 libre dépasse la quantité d'ABT fixé sur les cytochromes. Ortiz de Montellano a montré que l'ABT avait un $T_{1/2}$ plasmatique de 9h et était présent dans le sang à une forte concentration pendant au moins 24 h chez le rat, le chien et le singe après une administration de 100 mg/kg (De Montellano, 2018). L'ABT étant un inhibiteur irréversible des CYP450, une

BY-NC-ND

fois lié, il le reste jusqu'à ce que l'enzyme se renouvelle. Mais il existe toujours un métabolisme résiduel si l'administration d'ABT ne se fait pas de façon répétée. Par exemple le CYP3A4, le plus connu des CYP450, a un $T_{1/2}$ entre 3 et 6 jours, il est donc nécessaire de saturer ces liaisons pour correctement les inhiber (Yang et al., 2008). Dans notre cas, l'action trypanocide de la molécule 120 a été révélée à la suite de l'action cumulative de l'ABT. La question se pose donc de la durée de 5 jours de traitement qui aurait pu être revue à la hausse pour éviter toute rechute. Il subsiste une interrogation sur le site de formation du composé réduit. En effet, soit il est produit par la flore digestive de l'animal et dans ce cas-là il est facile de bloquer l'action par des inhibiteurs de la flore de type antibiotique et antifongique, soit il est produit par le métabolisme de la souris une fois que la molécule 120 est passée au niveau systémique, et là il est nécessaire d'agir sur le métabolisme de l'animal voire de modifier la structure de la molécule au risque de changer ses propriétés. Pour confirmer cela, il sera nécessaire d'effectuer une nouvelle étude en utilisant cette fois-ci une voie IV pour comparer avec la voie PO et visualiser ou non la présence d'un composé réduit. Par la suite il faudra envisager en fonction des résultats obtenus, une étude en utilisant des bactéries de la flore digestive mises en contact avec notre molécule pour vérifier la formation du composé réduit et ainsi identifier la ou les bactéries incriminées pour réussir à sélectionner le bon antibiotique pour les inhiber ultérieurement (Zhang et al., 2018).

Un autre point important est la présence d'un composé m/z 404 dont la structure n'a pas pu être caractérisée et qui apparait dans les urines des souris seulement après traitement à l'ABT. Ce composé pourrait provenir d'une autre voie de métabolisation qu'il faudra étudier.

Cette molécule 120 reste prometteuse car malgré tout, elle réussit à faire disparaitre la parasitémie sanguine pendant 3-4 jours. Il reste à rechercher spécifiquement avec quel cytochrome elle peut interagir pour proposer une association médicamenteuse favorable à son action. Ce schéma thérapeutique est déjà utilisé, avec des antirétroviraux du VIH. Par exemple, le ritonavir est utilisé en association avec un autre inhibiteur de protéase (ex : darunavir) comme potentialisateur pharmacologique. Il est capable d'inhiber la P-gp intestinale ainsi que le système oxydatif hépatique du CYP3A4. C'est ce qu'on appelle l'effet booster du ritonavir (Zeldin and Petruschke, 2004). Il existe le même phénomène avec le cobicistat qui inhibe encore une fois les protéines du CYP3A4 permettant alors au médicament associé d'agir plus efficacement (Tseng et al., 2017).

Bien qu'aucune molécule issue des nitroquinoléinones et nitroimidazopyridines n'ait pu répondre favorablement à la recherche de nouveaux traitements trypanocides, les résultats obtenus dans ce travail de thèse permettent de comprendre et d'envisager de nouvelles

BY-NC-ND

pharmacomodulations. Comme cela a été le cas avec le nifurtimox et le fexinidazole, il faut envisager d'adapter les substituants pouvant plus facilement être substrat de cytochromes et protégeant ainsi le groupement -NO_2, pour trouver la molécule efficace.

La section 2 du chapitre 1 portant sur l'étude de nitroimidazolés et tout particulièrement sur l'étude du mégazol a permis de mettre en évidence son caractère de prodrogue. Cette molécule a montré dès les années 70 une activité antiparasitaire intéressante vis-à-vis des trypanosomes notamment (Winkelmann et al., 1977). Les études qui ont suivi ont permis de mettre en évidence une dose efficace à 80 mg/kg (Enanga et al., 1998). Malheureusement des travaux menés en 2004 ont montré une génotoxicité du composé à forte dose chez le rat, stoppant alors son développement (Nesslany et al., 2004). Pourtant, cette molécule est prometteuse, et la recherche de ses métabolites pourrait le confirmer. C'est dans cette optique que notre équipe a repris son étude pour identifier les métabolites d'intérêt afin d'envisager une utilisation en médecine vétérinaire notamment.

Lors de précédents travaux, nous avions pu mettre en évidence la présence d'au moins 14 métabolites potentiels du mégazol dans des urines de souris. Les analyses effectuées à partir des chromatogrammes ont permis de caractériser 11 d'entre eux en suivant leur temps de rétention, leur masse et leur fragmentation. Avec l'aide d'un logiciel d'analyse chimique, des structures ont été proposées (Boudot 2019, en cours de soumission). Malheureusement la synthèse chimique n'a pu être envisagée à partir du pool d'urines, nécessitant obligatoirement une séparation des composés pour une identification en RMN (Résonance magnétique nucléaire). Nous nous sommes donc tournés vers une approche de bioconversion. La collaboration avec le Dr Buisson du Museum National d'Histoire Naturelle de Paris a permis d'étudier la biosynthèse de composés dérivant du mégazol à partir de microorganismes d'intérêt. Nous avons cherché à retrouver les métabolites précédemment identifiés chez la souris pour pouvoir les isoler et les synthétiser. *Aspergillus terreus* a montré un intérêt dans l'identification d'un métabolite, l'ion *m/z* 239. Ce composé potentiellement réduit au niveau du –NO_2 et acétylé au niveau de l'amine tertiaire, est le composé majoritairement retrouvé lors de nos travaux. Or, à ce stade, aucune des analyses de purification n'a permis d'isoler ce composé. En effet lors des différentes CCM effectuées sur les fractions issues des colonnes de purification, nous observons une seule migration expliquant la présence d'un seul composé. Mais lors des analyses à Limoges en spectrométrie de masse, nous constatons toujours la présence de Mégazol en faible quantité dans les échantillons signifiant que ce dernier est

BY-NC-ND

difficilement dégradé. Cette différence s'explique probablement par la plus grande précision et sensibilité de la spectrométrie.

A ce jour, de nouveaux essais sont en cours pour essayer de trouver la méthode la plus adaptée pour isoler et caractériser ce composé.

Si le composé 239 est isolé il pourra être testé *in vitro* sur une souche de *T.b.b*. afin d'évaluer son activité trypanocide. Mais pour l'heure, il est nécessaire d'arriver à isoler ce composé par de nouvelles manipulations de purification en cherchant le meilleur solvant permettant de séparer les composés les uns des autres. De plus, il faudra envisager les études sur les autres champignons d'intérêt à savoir *M. isabelina* et *M. plumbeus* afin d'effectuer des purifications pour obtenir les éventuels métabolites.

Il est évident que l'étude du Mégazol reste un sujet à controverse. Mais l'industrie vétérinaire semble s'intéresser à ce composé afin de l'envisager comme substituant aux traitements actuels présentant également des toxicités avérées et des cas de résistances de plus en plus importants (Peregrine and Mamman, 1993).

Le deuxième chapitre de cette thèse a porté sur l'étude préliminaire d'hétérocycles azotés et sur leur intérêt trypanocide. Initialement développés pour lutter contre *Plasmodium spp*., des composés phénanthroliniques avaient montré un intérêt notable comme nouvelles solutions contre des souches chloroquinorésistantes avec des doses efficaces et non toxiques chez l'animal à 20 mg/kg/jour (Yapi et al., 2006).

Partant de ce constat, l'UMR INSERM U1212 / CNRS 5320 a cherché à étudier des pharmacomodulations à partir de synthons « quinoline-like » ou « pyridine-like ». Les premiers composés que nous avons testé *in vitro* possèdent un noyau phénanthrolinique. Les valeurs de CC_{50} relativement faibles sont expliquées par la cible des molécules. En effet, ces dernières ciblent spécifiquement les G-quadruplexes de l'ADN parasitaire afin d'inhiber la télomérase. Or cette dernière possède des motifs similaires aux télomérases humaines, rendant ainsi les composés toxiques. Toutefois les résultats que nous avons obtenus sur l'activité trypanocide était essentielle pour évaluer par la suite l'indice de sélectivité de ces molécules. Vingt-quatre molécules sur vingt-cinq ont présenté des CI_{50} comprises entre 0,05 et 3,5 µM, mais les indices de sélectivité se sont avérés peu intéressants avec pour les meilleurs des valeurs à peine supérieures à 10. A partir du noyau phénanthrolinique, de nouvelles pharmacomodulations ont été réalisées permettant d'obtenir différentes séries. La cytotoxicité et l'activité trypanocide ont été évaluées pour chaque composé. Au total, les résultats obtenus ont présenté une cytotoxicité avérée pour les 130 molécules testées. Certaines d'entre elles ont une activité

BY-NC-ND

trypanocide intéressante avec des CI_{50} comprises entre 0,022 et 10 µM, pour les autres les CI_{50} peuvent aller jusqu'à 50 µM, nuançant leur intérêt futur (Guillon, 2018, Guillon, 2019).

Actuellement aucune de ces molécules n'a été sélectionnée pour des tests *in vivo*. L'intérêt de ces hétérocycles azotés est évident mais la toxicité apparente et le manque de sélectivité vis-à-vis du parasite obligent à trouver des solutions pour envisager des administrations animales et humaines. Une des solutions pour cibler spécifiquement les télomérases parasitaires devra passer par des modifications fonctionnelles, en ajoutant par exemples des chaînes carbonées latérales afin de reconnaitre des régions adjacentes des G-quadruplexes parasitaires. (Pirota et al., 2019). Une autre piste de recherche pourrait être de coupler ces molécules avec des biomarqueurs (Anticorps, protéines) capables de spécifiquement cibler le parasite pour permettre alors à la molécule d'agir sur ce dernier sans risque d'induire une toxicité cellulaire. Il existe déjà des thérapies ciblées de ce type, notamment en cancérologie qui permettent grâce à des conjugués anticorps-médicaments (ADC) de reconnaitre la tumeur pour l'éliminer de façon sélective sans altérer les cellules saines avoisinantes (Bakhtiar, 2016; Beck et al., 2017; Li et al., 2018). Cette approche a été proposée avec de la pentamidine couplée à des nanoparticules et nanocorps capables de reconnaitre la surface du parasite et a ainsi permis d'obtenir des résultats encourageants avec une guérison totale des animaux à une dose 10 fois inférieure à la dose habituelle (Arias et al., 2015).

Une autre problématique concernant ces molécules est leurs poids moléculaires relativement élevés pouvant dépasser parfois 1 000 g/mol. Or le fait d'ajouter des chaines carbonées latérales, ou de les associer à d'autres molécules, risque d'augmenter le poids moléculaire des composés et ainsi limiter leur franchissement au travers de la BHE. En effet, une molécule dont la cible est le SNC doit répondre à des critères particuliers, à savoir : un faible poids moléculaire, une bonne lipophilie et la capacité à interagir avec des transporteurs spécifiques (Abbott et al., 2010; Sekhar et al., 2014). De plus, la structure moléculaire des dérivés phénanthroliniques comporte de longues chaines carbonées apportant une forte hydrophilie et permettant une bonne solubilité dans l'eau. Ce qui pose alors des problèmes de lipophilie et donc de franchissement des barrières. Pourtant l'intérêt de ces molécules est de pouvoir agir à la fois sur le stade 1 et le stade 2 de la Trypanosomose Africaine, ainsi si les molécules ne sont pas capables de franchir les barrières, il va être nécessaire de réévaluer leurs structures pour envisager un traitement.

A l'issue de notre travail de thèse, de nombreuses interrogations subsistent. En premier lieu, la limite du modèle *in vitro* dans la prédiction des futurs résultats *in vivo* est à considérer. Sans

BY-NC-ND

rejeter l'intérêt des études *in vitro*, celles-ci ne peuvent suffire au développement de nouveaux médicaments. C'est notamment le cas lors de l'étude de métabolisation qui ne peut être que restrictive *in vitro* (microsomes hépatiques, ou rénaux) quand *in vivo*, l'ensemble de l'organisme va alors jouer un rôle dans le devenir du composé. C'est ce que nous avons pu observer avec les molécules 76 et 120. Il est aussi nécessaire de se poser la question du choix de la souche parasitaire utilisée lors de ces travaux. En effet, la souche *T.b.b.* AnTat 1.9 mime une infection aiguë de la maladie chez les animaux. Il existe d'autres souches issues de cette sous-espèce qui sont fréquemment utilisées, à l'origine d'infection chronique et qui pourraient répondre différemment aux essais thérapeutiques. Par exemple, on peut noter que lors de tests *in vitro*, les valeurs de CI_{50} pour une même molécule peuvent varier en fonction des souches employées. C'est le cas pour la pentamidine présentant une CI_{50} de 0,00034 µM avec la souche *T.b.b*. 427 et 0,0015 µM avec la souche *T.b.b*. BS221 (Camacho et al., 2000; Wenzler et al., 2009). Il est donc nécessaire d'envisager de nouveaux tests notamment pour la molécule 120 vis-à-vis d'autres souches de trypanosomes. Nous pouvons aussi nous interroger sur les capacités des trypanosomes à « se cacher » dans des cellules, tissus ou organes pour réapparaitre plus tard (Nikolskaia et al., 2006; Bonnet et al., 2017). Il serait intéressant de doser les molécules présentes au sein des cellules pour comprendre leur distribution et leur capacité à diffuser en intracellulaire dans certains tissus.

BY-NC-ND

Conclusion générale

Ce travail de recherche de nouvelles molécules trypanocides reste un enjeu majeur autant pour la santé humaine que vétérinaire. Les phénomènes de résistance obligent les professionnels de santé à innover pour le développement de nouvelles stratégies de lutte contre ce parasite. Même si l'arrivée du fexinidazole, suscite de nouveaux espoirs, doit-on pour autant relâcher les efforts quant à la recherche de nouvelles molécules? Peut-on penser que ce composé va être la solution à l'éradication finale de la THA ? Dans d'autres domaines médicales comme la cancérologie ou la microbiologie, la recherche de nouveaux traitements ne s'arrête pas dès qu'une molécule voit le jour. Les cas de résistances, ou l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques permettent de proposer une meilleure réponse aux patients, obligent et encouragent la recherche. N'oublions pas que concernant la Trypanosomose Animale Africaine, le constat est tout aussi alarmant. Le diminazène ou l'isométamidium, deux des molécules les plus utilisées sur le bétail, ont vu un bouleversement de leur efficacité en raison des mésusages entrainant l'apparition de résistances. Or aucune nouvelle molécule n'est actuellement proposée, et seul l'AN11736, un benzoxaborole est en cours d'étude préclinique. Le rapport bénéfice/risque est un élément primordial à prendre en compte pour cette pathologie. Par exemple, dans le cas du mégazol, ne pourrait-on pas destiner cette molécule sujette à controverse à un usage strictement vétérinaire qui aurait l'avantage de traiter le réservoir animal en complément des thérapeutiques humaines pour une lutte intégrée de la THA dans un esprit One Health.

Plus largement, les nitroimidazolés restent de bons candidats médicaments pour lutter contre les trypanosomes africains, mais un travail devra être mené pour concevoir leur formulation permettant d'éviter les pertes d'activité dues au métabolisme de l'individu ou un développement de toxicité. Une problématique reste toujours en suspens : arrivera-t-on à trouver une molécule commune efficace sur tous les kinétoplastidés.

Au cours des travaux que j'ai menés sur les nitroquinoléiones et nitroimidazopyridines, j'ai recherché les candidats les plus prometteurs lors d'études *in vitro* puis *in vivo*. Sur 250 molécules testées *in vitro* dont 100 sur *T.b.b.*, 4 ont été sélectionnées comme prometteuses pour des études *in vivo*. Malheureusement les premiers résultats obtenus n'ont pas été concluants et aucun des composés n'a pu être envisagé comme un LEAD. Toutefois, la molécule 120 qui est la plus pertinente, correspond à un HIT à partir duquel nous devrons ajuster de nouvelles pharmacomodulations pour rendre les futurs composés actifs sur l'animal. Sur ces mêmes 4 molécules, aucune n'a pu être envisagée chez les leishmanies et les études sont en cours pour *Trypanosoma cruzi*. Les similitudes retrouvées chez ces 3 protozoaires ne

BY-NC-ND

semblent pas suffire au développement d'une molécule unique. Les nitroréductases peuvent être une solution, mais l'absence de données concernant leur fonctionnement et leur structure limitent les recherches pour les cibler.

Concernant les dérivés phénanthroliniques nous avons pu montrer qu'ils sont capables de proposer une réponse *in vitro* intéressante mais qu'il sera nécessaire de jouer sur leur structure en les couplant avec des molécules de reconnaissance spécifiques ciblant les parasites. Agir au niveau de l'ADN pourrait être une solution mais renvoie à la question de la spécificité de chaque parasite et à l'absence d'interaction avec des éléments communs aux cellules des mammifères.

L'ensemble de ces molécules s'inscrit dans une volonté de lutte des maladies à kinétoplastidés pour un jour ne plus avoir à les considérer comme des maladies tropicales négligées.

BY-NC-ND

Références bibliographiques

Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., Begley, D.J., 2010. Structure and function of the blood–brain barrier. Neurobiology of Disease, Special Issue: Blood Brain Barrier 37, 13–25. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030

About Chagas Disease | DNDi [WWW Document], n.d. . Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi). URL https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/ (accessed 9.5.19).

About Sleeping Sickness | DNDi [WWW Document], n.d. . Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi). URL https://www.dndi.org/diseases-projects/hat/ (accessed 4.9.19).

Acosta-Serrano, A., Vassella, E., Liniger, M., Renggli, C.K., Brun, R., Roditi, I., Englund, P.T., 2001. The surface coat of procyclic Trypanosoma brucei: Programmed expression and proteolytic cleavage of procyclin in the tsetse fly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 1513–1518. https://doi.org/10.1073/pnas.041611698

African Animal Trypanosomiasis, 2018.

Agrawal, S., Anderson, P., Durbeej, M., van Rooijen, N., Ivars, F., Opdenakker, G., Sorokin, L.M., 2006. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Exp. Med. 203, 1007–1019. https://doi.org/10.1084/jem.20051342

Akama, T., Zhang, Y.-K., Freund, Y.R., Berry, P., Lee, J., Easom, E.E., Jacobs, R.T., Plattner, J.J., Witty, M.J., Peter, R., Rowan, T.G., Gillingwater, K., Brun, R., Nare, B., Mercer, L., Xu, M., Wang, J., Liang, H., 2018. Identification of a 4-fluorobenzyl l-valinate amide benzoxaborole (AN11736) as a potential development candidate for the treatment of Animal African Trypanosomiasis (AAT). Bioorg. Med. Chem. Lett. 28, 6–10. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.11.028

Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS One 7, e35671. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671

Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D., 1973. Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2281–2285. https://doi.org/10.1073/pnas.70.8.2281

Amin, D.N., Rottenberg, M.E., Thomsen, A.R., Mumba, D., Fenger, C., Kristensson, K., Büscher, P., Finsen, B., Masocha, W., 2009. Expression and role of CXCL10 during the encephalitic stage of experimental and clinical African trypanosomiasis. J. Infect. Dis. 200, 1556–1565. https://doi.org/10.1086/644597

Arias, J.L., Unciti-Broceta, J.D., Maceira, J., Del Castillo, T., Hernández-Quero, J., Magez, S., Soriano, M., García-Salcedo, J.A., 2015. Nanobody conjugated PLGA nanoparticles for active targeting of African Trypanosomiasis. J. Control. Release 197, 190–198. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.11.002

Authié, E., Boulangé, A., Muteti, D., Lalmanach, G., Gauthier, F., Musoke, A.J., 2001. Immunisation of cattle with cysteine proteinases of Trypanosoma congolense: targetting the disease rather than the parasite. Int. J. Parasitol. 31, 1429–1433. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00266-1

BY-NC-ND

Bacchi, C.J., Nathan, H.C., Livingston, T., Valladares, G., Saric, M., Sayer, P.D., Njogu, A.R., Clarkson, A.B., 1990. Differential susceptibility to DL-alpha-difluoromethylornithine in clinical isolates of Trypanosoma brucei rhodesiense. Antimicrob. Agents Chemother. 34, 1183–1188. https://doi.org/10.1128/aac.34.6.1183

Baker, N., Glover, L., Munday, J.C., Aguinaga Andrés, D., Barrett, M.P., de Koning, H.P., Horn, D., 2012. Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in African trypanosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 10996–11001. https://doi.org/10.1073/pnas.1202885109

Bakhtiar, R., 2016. Antibody drug conjugates. Biotechnol. Lett. 38, 1655–1664. https://doi.org/10.1007/s10529-016-2160-x

Balani, S.K., Zhu, T., Yang, T.J., Liu, Z., He, B., Lee, F.W., 2002. Effective dosing regimen of 1-aminobenzotriazole for inhibition of antipyrine clearance in rats, dogs, and monkeys. Drug Metab. Dispos. 30, 1059–1062. https://doi.org/10.1124/dmd.30.10.1059

Baltz, T., Baltz, D., Giroud, C., Crockett, J., 1985. Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of Trypanosoma brucei, T. equiperdum, T. evansi, T. rhodesiense and T. gambiense. EMBO J. 4, 1273–1277.

Baral, T.N., 2010. Immunobiology of African trypanosomes: need of alternative interventions. J. Biomed. Biotechnol. 2010, 1–24. https://doi.org/10.1155/2010/389153

Barrett, M.P., Boykin, D.W., Brun, R., Tidwell, R.R., 2007. Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. Br. J. Pharmacol. 152, 1155–1171. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707354

Barrett, M.P., Fairlamb, A.H., Rousseau, B., Chauvière, G., Perié, J., 2000. Uptake of the nitroimidazole drug megazol by African trypanosomes. Biochemical Pharmacology 59, 615–620. https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00368-8

Barrett, M.P., Vincent, I.M., Burchmore, R.J.S., Kazibwe, A.J.N., Matovu, E., 2011. Drug resistance in human African trypanosomiasis. Future Microbiol. 6, 1037–1047. https://doi.org/10.2217/fmb.11.88

Barrett, S.V., Barrett, M.P., 2000. Anti-sleeping Sickness Drugs and Cancer Chemotherapy. Parasitology Today 16, 7–9. https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01560-4

Barry, J.D., 1997. The relative significance of mechanisms of antigenic variation in African trypanosomes. Parasitology Today 13, 212–218. https://doi.org/10.1016/S0169-4758(97)01039-9

Bassarak, B., Uzcátegui, N.L., Schönfeld, C., Duszenko, M., 2011. Functional Characterization of Three Aquaglyceroporins from Trypanosoma brucei in Osmoregulation and Glycerol Transport. CPB 27, 411–420. https://doi.org/10.1159/000327968

Beaman, A.G., Tautz, W., Gabriel, T., Duschinsky, R., 1965. The Synthesis of Azomycin. J. Am. Chem. Soc. 87, 389–390. https://doi.org/10.1021/ja01080a048

Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C., Corvaïa, N., 2017. Strategies and challenges for the next generation of antibody–drug conjugates. Nat. Rev. Drug Discov. 16, 315–337. https://doi.org/10.1038/nrd.2016.268

Begovic, B., Ahmedtagic, S., Calkic, L., Vehabović, M., Kovacevic, S.B., Catic, T., Mehic, M., 2016. Open Clinical Trial on Using Nifuroxazide Compared to Probiotics in Treating Acute Diarrhoeas in Adults. Mater. Sociomed. 28, 454–458. https://doi.org/10.5455/msm.2016.28.454-458

BY-NC-ND

Benaim, G., Lopez-Estraño, C., Docampo, R., Moreno, S.N., 1993. A calmodulin-stimulated Ca2+ pump in plasma-membrane vesicles from Trypanosoma brucei; selective inhibition by pentamidine. Biochem. J. 296 (Pt 3), 759–763. https://doi.org/10.1042/bj2960759

Bengaly, Z., Vitouley, S.H., Somda, M.B., Zongo, A., Têko-Agbo, A., Cecchi, G., Adam, Y., Sidibé, I., Bayala, B., Belem, A.M.G., Van Den Abbeele, J., Delespaux, V., 2018. Drug quality analysis of isometamidium chloride hydrochloride and diminazene diaceturate used for the treatment of African animal trypanosomosis in West Africa. BMC Vet. Res. 14, 361. https://doi.org/10.1186/s12917-018-1633-7

Berg, S.S., 1960. Structure of Isometamidium (M. and B. 4180A), 7-m-Amidinophenyldiazoamino-2-amino-10-ethyl-9-phenylphenanthridinium Chloride Hydrochloride, the Red Isomer present in Metamidium. Nature 188, 1106–1107. https://doi.org/10.1038/1881106a0

Berger, B.J., Fairlamb, A.H., 1994. Properties of melarsamine hydrochloride (Cymelarsan) in aqueous solution. Antimicrob. Agents Chemother. 38, 1298–1302. https://doi.org/10.1128/aac.38.6.1298

Berkelhammer, G., Asato, G., 1968. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3, 4-thiadiazole: a new antimicrobial agent. Science 162, 1146. https://doi.org/10.1126/science.162.3858.1146

Bern, C., 2015. Chagas' Disease. N. Engl. J. Med. 373, 456–466. https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150

Berthier, D., Quéré, R., Thevenon, S., Belemsaga, D., Piquemal, D., Marti, J., Maillard, J.-C., 2003. Serial analysis of gene expression (SAGE) in bovine trypanotolerance: preliminary results. Genet. Sel. Evol. 35 Suppl 1, S35-47. https://doi.org/10.1051/gse:2003015

Bisser, S., Lejon, V., Preux, P.M., Bouteille, B., Stanghellini, A., Jauberteau, M.O., Büscher, P., Dumas, M., 2002. Blood-cerebrospinal fluid barrier and intrathecal immunoglobulins compared to field diagnosis of central nervous system involvement in sleeping sickness. J. Neurol. Sci. 193, 127–135. https://doi.org/10.1016/s0022-510x(01)00655-4

Bitonti, Alan J., Bacchi, C.J., McCann, P.P., Sjoerdsma, A., 1986. Uptake of α-difluoromethylornithine by Trypanosoma brucei brucei. Biochemical Pharmacology 35, 351–354. https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90539-3

Bitonti, A J, Dumont, J.A., McCann, P.P., 1986. Characterization of Trypanosoma brucei brucei S-adenosyl-L-methionine decarboxylase and its inhibition by Berenil, pentamidine and methylglyoxal bis(guanylhydrazone). Biochem. J. 237, 685–689. https://doi.org/10.1042/bj2370685

Bitonti, A. J., McCann, P.P., Sjoerdsma, A., 1986. Necessity of antibody response in the treatment of African trypanosomiasis with alpha-difluoromethylornithine. Biochem. Pharmacol. 35, 331–334. https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90534-4

Black, S.J., Mansfield, J.M., 2016. Prospects for vaccination against pathogenic African trypanosomes. Parasite Immunology 38, 735–743. https://doi.org/10.1111/pim.12387

Blum, J., Nkunku, S., Burri, C., 2001. Clinical description of encephalopathic syndromes and risk factors for their occurrence and outcome during melarsoprol treatment of human African trypanosomiasis. Trop. Med. Int. Health 6, 390–400. https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00710.x

BY-NC-ND

Bonnet, J., Boudot, C., Courtioux, B., 2017. Does Trypanosoma brucei brucei have the Ability to Invade Human Microglial Cells? Archives of Parasitology 1.

Bonnet, J., Boudot, C., Courtioux, B., 2015. Overview of the Diagnostic Methods Used in the Field for Human African Trypanosomiasis: What Could Change in the Next Years? Biomed. Res. Int. 2015, 1–10. https://doi.org/10.1155/2015/583262

Bonnet, J., Garcia, C., Leger, T., Couquet, M.-P., Vignoles, P., Vatunga, G., Ndung'u, J., Boudot, C., Bisser, S., Courtioux, B., 2018. Proteome characterization in various biological fluids of Trypanosoma brucei gambiense-infected subjects. J. Proteomics 196, 150–161. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.11.005

Boudot, C., 2015. Activité trypanocide du mégazol sur deux modèles humains et murins et identification de ses métabolites (Thèse d'exercice de Pharmacie). Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse.

Boyt, W.P., 1998. A Field Guide for Diagnosis, Treatment and Prevention of African Animal Trypanosomiasis. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.

Bray, P.G., Barrett, M.P., Ward, S.A., Koning, H.P. de, 2003. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. Trends in Parasitology 19, 232–239. https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00069-2

Bronner, Brun, Doua, Ericsson, Burri, Keiser, Miézan, Boa, Rombo, Gustafsson, 1998. Discrepancy in plasma melarsoprol concentrations between HPLC and bioassay methods in patients with T. gambiense sleeping sickness indicates that melarsoprol is metabolized. TMIH 3, 913–917. https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1998.00327.x

Brown, K.N., Hill, J., Holland, A.E., 1961. Anti-trypanosomal activity of certain phenyldiazoamino- and phenylazoamino-phenanthridinium compounds. Brit. J. Pharmacol. Chemother. 17, 396–405. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1961.tb01125.x

Browning, C.H., Morgan, G.T., Robb, J.V.M., Walls, L.P., 1938. The trypanocidal action of certain phenanthridinium compounds. The Journal of Pathology and Bacteriology 46, 203–204. https://doi.org/10.1002/path.1700460121

Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., Burri, C., 2010. Human African trypanosomiasis. The Lancet 375, 148–159. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60829-1

Brun, R., Hecker, H., Lun, Z.-R., 1998. Trypanosoma evansi and T. equiperdum: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). Veterinary Parasitology 79, 95–107. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00146-0

Buguet, A., Bourdon, L., Bisser, S., Chapotot, F., Radomski, M.W., Dumas, M., 2001. Sleeping sickness: major disorders of circadian rhythm. Med. Trop. 61, 328–339.

Bujard, A., Petit, C., Carrupt, P.-A., Rudaz, S., Schappler, J., 2017. HDM-PAMPA to predict gastrointestinal absorption, binding percentage, equilibrium and kinetics constants with human serum albumin and using 2 end-point measurements. Eur. J. Pharm. Sci. 97, 143–150. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.11.001

Büscher, P., Bart, J.-M., Boelaert, M., Bucheton, B., Cecchi, G., Chitnis, N., Courtin, D., Figueiredo, L.M., Franco, J.-R., Grébaut, P., Hasker, E., Ilboudo, H., Jamonneau, V., Koffi, M., Lejon, V., MacLeod, A., Masumu, J., Matovu, E., Mattioli, R., Noyes, H., Picado, A., Rock, K.S., Rotureau, B., Simo, G., Thévenon, S., Trindade, S., Truc, P., Van Reet, N., 2018. Do Cryptic Reservoirs Threaten Gambiense-Sleeping Sickness Elimination? Trends Parasitol. 34, 197–207. https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.11.008

BY-NC-ND

Caljon, G., Van Reet, N., De Trez, C., Vermeersch, M., Pérez-Morga, D., Van Den Abbeele, J., 2016. The Dermis as a Delivery Site of Trypanosoma brucei for Tsetse Flies. PLoS Pathog. 12, e1005744. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005744

Camacho, M.R., Kirby, G.C., Warhurst, D.C., Croft, S.L., Phillipson, J.D., 2000. Oxoaporphine alkaloids and quinones from Stephania dinklagei and evaluation of their antiprotozoal activities. Planta Med. 66, 478–480. https://doi.org/10.1055/s-2000-8597

Camara, Mariame, Ouattara, E., Duvignaud, A., Migliani, R., Camara, O., Leno, M., Solano, P., Bucheton, B., Camara, Mamadou, Malvy, D., 2017. Impact of the Ebola outbreak on Trypanosoma brucei gambiense infection medical activities in coastal Guinea, 2014-2015: A retrospective analysis from the Guinean national Human African Trypanosomiasis control program. PLoS Negl. Trop. Dis. 11, e0006060. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006060

Capewell, P., Cren-Travaillé, C., Marchesi, F., Johnston, P., Clucas, C., Benson, R.A., Gorman, T.-A., Calvo-Alvarez, E., Crouzols, A., Jouvion, G., Jamonneau, V., Weir, W., Stevenson, M.L., O'Neill, K., Cooper, A., Swar, N.K., Bucheton, B., Ngoyi, D.M., Garside, P., Rotureau, B., MacLeod, A., 2016. The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne African trypanosomes. eLife 5, e17716. https://doi.org/10.7554/eLife.17716

Carter, N.S., Berger, B.J., Fairlamb, A.H., 1995. Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen-sensitive and -resistant Trypanosoma brucei brucei. J. Biol. Chem. 270, 28153–28157. https://doi.org/10.1074/jbc.270.47.28153

Carter, N.S., Fairlamb, A.H., 1993. Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. Nature 361, 173–176. https://doi.org/10.1038/361173a0

Castera-Ducros, C., Paloque, L., Verhaeghe, P., Casanova, M., Cantelli, C., Hutter, S., Tanguy, F., Laget, M., Remusat, V., Cohen, A., Crozet, M.D., Rathelot, P., Azas, N., Vanelle, P., 2013. Targeting the human parasite Leishmania donovani: Discovery of a new promising anti-infectious pharmacophore in 3-nitroimidazo[1,2-a]pyridine series. Bioorganic & Medicinal Chemistry 21, 7155–7164. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.09.002

Cayla, M., Rojas, F., Silvester, E., Venter, F., Matthews, K.R., 2019. African trypanosomes. Parasit. Vectors 12, 1–8. https://doi.org/10.1186/s13071-019-3355-5

Cecchelli, R., 2001. Physiopathologie de la barrière hémato-encéphalique (rapport de recherche). Institut Pasteur de Lille.

Chapman, D.N., Doubell, A., Oversteegen, L., Barnsley, D.P., Chowdhary, D.V., Rugarabamu, D.G., Ong, M., Borri, J., 2018. Neglected disease research and development: reaching new heights, Policy Cures Research. G-Finder.

Chappuis, F., 2018. Oral fexinidazole for human African trypanosomiasis. The Lancet 391, 100–102. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30019-9

Chappuis, F., Loutan, L., Simarro, P., Lejon, V., Büscher, P., 2005. Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. Clin. Microbiol. Rev. 18, 133–146. https://doi.org/10.1128/CMR.18.1.133-146.2005

Chartier, C., 2000. Précis de parasitologie vétérinaire tropicale, Tec & Doc Lavoisier. ed, Universités francophones.

Chatelain, E., Ioset, J.-R., 2011. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. Drug Des. Devel. Ther. 5, 175–181. https://doi.org/10.2147/DDDT.S16381

BY-NC-ND

Collins, A.R., 2015. The comet assay: a heavenly method! Mutagenesis 30, 1–4. https://doi.org/10.1093/mutage/geu079

Coura, J.R., Castro, S.L. de, 2002. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97, 3–24. https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000100001

Croft, S.L., Brazil, R.P., 1982. Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of Leishmania mexicana amazonensis in vitro. Ann. Trop. Med. Parasitol. 76, 37–43. https://doi.org/10.1080/00034983.1982.11687502

Cunningham, M.L., Zvelebil, M.J., Fairlamb, A.H., 1994. Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. Eur. J. Biochem. 221, 285–295. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18740.x

Curd, F.H.S., Davey, D.G., 1950. "Antrycide"—a new trypanocidal drug. Brit. J. Pharmacol. Chemother. 5, 25–32. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1950.tb00573.x

Damper, D., Patton, C.L., 1976. Pentamidine Transport and Sensitivity in brucei-Group Trypanosomes*. The Journal of Protozoology 23, 349–356. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1976.tb03787.x

Das, R.N., Chevret, E., Desplat, V., Rubio, S., Mergny, J.-L., Guillon, J., 2017. Design, Synthesis and Biological Evaluation of New Substituted Diquinolinyl-Pyridine Ligands as Anticancer Agents by Targeting G-Quadruplex. Molecules 23, 81. https://doi.org/10.3390/molecules23010081

Dayo, G.K., Gautier, M., Berthier, D., Poivey, J.P., Sidibe, I., Bengaly, Z., Eggen, A., Boichard, D., Thevenon, S., 2012. Association studies in QTL regions linked to bovine trypanotolerance in a West African crossbred population. Anim. Genet. 43, 123–132. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02227.x

De Koning, H. P., 2001. Uptake of pentamidine in Trypanosoma brucei brucei is mediated by three distinct transporters: implications for cross-resistance with arsenicals. Mol. Pharmacol. 59, 586–592. https://doi.org/10.1124/mol.59.3.586

De Koning, Harry P, 2001. Transporters in African trypanosomes: role in drug action and resistance. Int. J. Parasitol., The Third Internet Conference on Salivarian Trypanosomes and Trypanosomatids 31, 512–522. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00167-9

De Koning, H.P., Jarvis, S.M., 1999. Adenosine Transporters in Bloodstream Forms of Trypanosoma brucei brucei: Substrate Recognition Motifs and Affinity for Trypanocidal Drugs. Mol. Pharmacol. 56, 1162–1170. https://doi.org/10.1124/mol.56.6.1162

de Koning, H.P., MacLeod, A., Barrett, M.P., Cover, B., Jarvis, S.M., 2000. Further evidence for a link between melarsoprol resistance and P2 transporter function in African trypanosomes. Mol. Biochem. Parasitol. 106, 181–185. https://doi.org/10.1016/s0166-6851(99)00206-6

De Montellano, P.R.O., 2018. 1-Aminobenzotriazole: A Mechanism-Based Cytochrome P450 Inhibitor and Probe of Cytochrome P450 Biology. Med. Chem. 8, 1–73. https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000495

Desquesnes, M., 2004. Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America. OIE.

Desquesnes, M., Bengaly, Z., Millogo, L., Meme, Y., Sakande, H., 2001. The analysis of the cross-reactions occurring in antibody-ELISA for the detection of trypanosomes can improve identification of the parasite species involved. Ann. Trop. Med. Parasitol. 95, 141–155. https://doi.org/1080/00034980120050251

BY-NC-ND

Desquesnes, M., Holzmuller, P., Lai, D.-H., Dargantes, A., Lun, Z.-R., Jittaplapong, S., 2013. Trypanosoma evansi and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. BioMed Research International 22. https://doi.org/10.1155/2013/194176

Desquesnes, M., Tresse, L., 1996. [Evaluation of the sensitivity of the Woo test for the detection of Trypanosoma vivax]. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 49, 315–321.

Diamond, L., Kruszewski, F., Aden, D.P., Knowles, B.B., Baird, W.M., 1980. Metabolic activation of benzo[a]pyrene by a human hepatoma cell line. Carcinogenesis 1, 871–875. https://doi.org/10.1093/carcin/1.10.871

Dingsdag, S.A., Hunter, N., 2018. Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms. J. Antimicrob. Chemother. 73, 265–279. https://doi.org/10.1093/jac/dkx351

Docampo, R., Moreno, S.N., 1984. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on Trypanosoma cruzi. Rev. Infect. Dis. 6, 223–238. https://doi.org/10.1093/clinids/6.2.223

Don, R., Ioset, J.-R., 2014. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. Parasitology 141, 140–146. https://doi.org/10.1017/S003118201300142X

Dramane, K., 2019. L'Afrique veut en finir avec la maladie du sommeil. Le Monde.fr.

Duggan, A.J., Hutchinson, M.P., 1966. Sleeping sickness in Europeans: a review of 109 cases. J. Trop. Med. Hyg. 69, 124–131.

Dulaurent, S., El Balkhi, S., Poncelet, L., Gaulier, J.-M., Marquet, P., Saint-Marcoux, F., 2016. QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood. Anal. Bioanal. Chem. 408, 1467–1474. https://doi.org/10.1007/s00216-015-9248-3

Ebhodaghe, F., Isaac, C., Ohiolei, J.A., 2018. A meta-analysis of the prevalence of bovine trypanosomiasis in some African countries from 2000 to 2018. Preventive Veterinary Medicine 160, 35–46. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.09.018

Ekwanzala, M., Pépin, J., Khonde, N., Molisho, S., Bruneel, H., Wals, P.D., 1996. In the heart of darkness: sleeping sickness in Zaire. The Lancet 348, 1427–1430. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)06088-6

El-Kattan, A.F., Poe, J., Buchholz, L., Thomas, H.V., Brodfuehrer, J., Clark, A., 2008. The use of 1-aminobenzotriazole in differentiating the role of CYP-mediated first pass metabolism and absorption in limiting drug oral bioavailability: a case study. Drug. Metab. Lett. 2, 120–124.

Enanga, B., Boudra, H., Chauvière, G., Labat, C., Bouteille, B., Dumas, M., Houin, G., 1999. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megazol, a new potent trypanocidal drug in animals. Arzneimittelforschung 49, 441–447. https://doi.org/10.1055/s-0031-1300440

Enanga, B., Keita, M., Chauvière, G., Dumas, M., Bouteille, B., 1998. Megazol combined with suramin: a chemotherapy regimen which reversed the CNS pathology in a model of human African trypanosomiasis in mice. Trop. Med. Int. Health 3, 736–741. https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1998.00291.x

Enanga, B., Ndong, J.M., Boudra, H., Debrauwer, L., Dubreuil, G., Bouteille, B., Chauvière, G., Labat, C., Dumas, M., Périé, J., Houin, G., 2000. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megazol in a Trypanosoma brucei gambiense primate model of human

BY-NC-ND

African trypanosomiasis. Preliminary study. Arzneimittelforschung 50, 158–162. https://doi.org/10.1055/s-0031-1300182

Eperon, G., Balasegaram, M., Potet, J., Mowbray, C., Valverde, O., Chappuis, F., 2014. Treatment options for second-stage gambiense human African trypanosomiasis. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 12, 1407–1417. https://doi.org/10.1586/14787210.2014.959496

Fairlamb, A.H., 2003. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. Trends Parasitol. 19, 488–494.

Fairlamb, A.H., 1990. Interaction of trypanocidal drugs with the metabolism and functions of trypanothione. Chemotherapy for trypanosomiasis. Proceedings of a workshop held at ILRAD, Nairobi, Kenya, 21-24 August, 1989. 25–31.

Fairlamb, A.H., Bowman, I.B., 1980. Trypanosoma brucei: maintenance of concentrated suspensions of bloodstream trypomastigotes in vitro using continuous dialysis for measurement of endocytosis. Exp. Parasitol. 49, 366–380. https://doi.org/10.1016/0014-4894(80)90072-7

Fairlamb, A.H., Bowman, I.B., 1977. Trypanosoma brucei: suramin and other trypanocidal compounds' effects on sn-glycerol-3-phosphate oxidase. Exp. Parasitol. 43, 353–361. https://doi.org/10.1016/0014-4894(77)90040-6

Fairlamb, A.H., Henderson, G.B., Cerami, A., 1989. Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2607–2611. https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2607

Fairlamb, A.H., Horn, D., 2018. Melarsoprol Resistance in African Trypanosomiasis. Trends in Parasitology 34, 481–492. https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.04.002

Fersing, C., 2018. Synthèse et étude des relations structure-activité de nouvelles 3-nitroimidazo (1,2-a) pyridines anti-kinétoplastidés (Thèse d'Université). Aix-Marseille, Marseille.

Fersing, C., Basmaciyan, L., Boudot, C., Pedron, J., Hutter, S., Cohen, A., Castera-Ducros, C., Primas, N., Laget, M., Casanova, M., Bourgeade-Delmas, S., Piednoel, M., Sournia-Saquet, A., Belle Mbou, V., Courtioux, B., Boutet-Robinet, É., Since, M., Milne, R., Wyllie, S., Fairlamb, A.H., Valentin, A., Rathelot, P., Verhaeghe, P., Vanelle, P., Azas, N., 2019. Nongenotoxic 3-Nitroimidazo[1,2-a]pyridines Are NTR1 Substrates That Display Potent in Vitro Antileishmanial Activity. ACS Med. Chem. Lett. 10, 34–39. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.8b00347

Fersing, C., Boudot, C., Pedron, J., Hutter, S., Primas, N., Castera-Ducros, C., Bourgeade-Delmas, S., Sournia-Saquet, A., Moreau, A., Cohen, A., Stigliani, J.-L., Pratviel, G., Crozet, M.D., Wyllie, S., Fairlamb, A., Valentin, A., Rathelot, P., Azas, N., Courtioux, B., Verhaeghe, P., Vanelle, P., 2018. 8-Aryl-6-chloro-3-nitro-2-(phenylsulfonylmethyl)imidazo[1,2-a]pyridines as potent antitrypanosomatid molecules bioactivated by type 1 nitroreductases. Eur. J. Med. Chem. 157, 115–126. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.064

Field, M.C., Carrington, M., 2009. The trypanosome flagellar pocket. Nat. Rev. Microbiol. 7, 775–786. https://doi.org/10.1038/nrmicro2221

Figarella, K., Rawer, M., Uzcategui, N.L., Kubata, B.K., Lauber, K., Madeo, F., Wesselborg, S., Duszenko, M., 2005. Prostaglandin D_2 induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. Cell Death and Differentiation 12, 335–346. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401564

BY-NC-ND

Finelle, P., 1969. African animal trypanosomiasis: Part I. disease and chemotherapy. International Laboratory for Research on Animal Diseases (ILRAD), Kenya.

Fischman, A.J., Alpert, N.M., Livni, E., Ray, S., Sinclair, I., Callahan, R.J., Correia, J.A., Webb, D., Strauss, H.W., Rubin, R.H., 1993. Pharmacokinetics of 18F-labeled fluconazole in healthy human subjects by positron emission tomography. Antimicrob. Agents Chemother. 37, 1270–1277. https://doi.org/10.1128/aac.37.6.1270

Flynn, I.W., Bowman, I.B., 1974. The action of trypanocidal arsenical drugs on Trypanosoma brucei and Trypanosoma rhodesiense. Comp. Biochem. Physiol., B 48, 261–273. https://doi.org/10.1016/0305-0491(74)90203-x

Franco, J.R., Cecchi, G., Priotto, G., Paone, M., Diarra, A., Grout, L., Simarro, P.P., Zhao, W., Argaw, D., 2018. Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis: Update to 2016. PLoS Negl. Trop. Dis. 12, e0006890. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006890

Franco, J.R., Simarro, P.P., Diarra, A., Jannin, J.G., 2014. Epidemiology of Human African Trypanosomiasis. Clin. Epidemiol. 6, 257–275. https://doi.org/10.2147/CLEP.S39728

Frearson, J.A., Wyatt, P.G., Gilbert, I.H., Fairlamb, A.H., 2007. Target assessment for antiparasitic drug discovery. Trends Parasitol. 23, 589–595. https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.08.019

Fromentin, Y., Gaboriaud-Kolar, N., Lenta, B.N., Wansi, J.D., Buisson, D., Mouray, E., Grellier, P., Loiseau, P.M., Lallemand, M.-C., Michel, S., 2013. Synthesis of novel guttiferone A derivatives: In-vitro evaluation toward Plasmodium falciparum, Trypanosoma brucei and Leishmania donovani. Eur. J. Med. Chem. 65, 284–294. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.04.066

Geerts, S., Holmes, P.H., Eisler, M.C., Diall, O., 2001. African bovine trypanosomiasis: the problem of drug resistance. Trends Parasitol. 17, 25–28. https://doi.org/10.1016/S1471-4922(00)01827-4

Gentilini, M., Danis, M., Caumes, E., Touze, J.-E., 2012. Médecine Tropicale, Lavoisier. ed. Médecine Sciences Publications.

GIORDANI, F., MORRISON, L.J., ROWAN, T.G., DE KONING, H.P., BARRETT, M.P., 2016. The animal trypanosomiases and their chemotherapy: a review. Parasitology 143, 1862–1889. https://doi.org/10.1017/S0031182016001268

Girgis-Takla, P., James, D.M., 1974. In Vitro Uptake of Isometamidium and Diminazene by Trypanosoma brucei. Antimicrob. Agents Chemother. 6, 372–374. https://doi.org/10.1128/aac.6.3.372

Glei, M., Schneider, T., Schlörmann, W., 2016. Comet assay: an essential tool in toxicological research. Arch. Toxicol. 90, 2315–2336. https://doi.org/10.1007/s00204-016-1767-y

González, V.M., Pérez, J.M., Alonso, C., 1997. The berenil ligand directs the DNA binding of the cytotoxic drug Pt-berenil. J. Inorg. Biochem. 68, 283–287.

Gooding, R.H., Krafsur, E.S., 2005. Tsetse Genetics: Contributions to Biology, Systematics, and Control of Tsetse Flies. Annu. Rev. Entomol. 50, 101–123. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130443

Grab, D.J., Garcia-Garcia, J.C., Nikolskaia, O.V., Kim, Y.V., Brown, A., Pardo, C.A., Zhang, Y., Becker, K.G., Wilson, B.A., de A Lima, A.P.C., Scharfstein, J., Dumler, J.S., 2009. Protease activated receptor signaling is required for African trypanosome traversal of human brain microvascular endothelial cells. PLoS Negl. Trop. Dis. 3, e479. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000479

BY-NC-ND

Gueddouda, N.M., Hurtado, M.R., Moreau, S., Ronga, L., Das, R.N., Savrimoutou, S., Rubio, S., Marchand, A., Mendoza, O., Marchivie, M., Elmi, L., Chansavang, A., Desplat, V., Gabelica, V., Bourdoncle, A., Mergny, J.-L., Guillon, J., 2017. Design, Synthesis, and Evaluation of 2,9-Bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline Derivatives as G-Quadruplex Ligands. ChemMedChem 12, 146–160. https://doi.org/10.1002/cmdc.201600511

Guengerich, F.P., 1996. In vitro techniques for studying drug metabolism. J. Pharmacokinet. Biopharm. 24, 521–533. https://doi.org/10.1007/bf02353478

Guillon, J., Cohen, A., Boudot, C., Valle, A., Milano, V., Das, R.N., Guédin, A., Moreau, S., Ronga, L., Savrimoutou, S., Demourgues, M., Reviriego, E., Rubio, S., Ferriez, S., Agnamey, P., Pauc, C., Moukha, S., Dozolme, P., Nascimento, S.D., Laumaillé, P., Bouchut, A., Azas, N., Mergny, J.-L., Mullié, C., Sonnet, P., Courtioux, B., 2020. Design, synthesis, and antiprotozoal evaluation of new 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinoline, 1,3-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]isoquinoline and 2,4-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]quinazoline derivatives. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 35, 432–459. https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1706502

Guillon, J., Cohen, A., Das, R.N., Boudot, C., Gueddouda, N.M., Moreau, S., Ronga, L., Savrimoutou, S., Basmaciyan, L., Tisnerat, C., Mestanier, S., Rubio, S., Amaziane, S., Dassonville-Klimpt, A., Azas, N., Courtioux, B., Mergny, J.-L., Mullié, C., Sonnet, P., 2018. Design, synthesis, and antiprotozoal evaluation of new 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline derivatives. Chem. Biol. Drug Des. 91, 974–995. https://doi.org/10.1111/cbdd.13164

Guillon, J., Cohen, A., Gueddouda, N.M., Das, R.N., Moreau, S., Ronga, L., Savrimoutou, S., Basmaciyan, L., Monnier, A., Monget, M., Rubio, S., Garnerin, T., Azas, N., Mergny, J.-L., Mullié, C., Sonnet, P., 2017. Design, synthesis and antimalarial activity of novel bis{N-[(pyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl}amine derivatives. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 32, 547–563. https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1268608

Hall, B.S., Bot, C., Wilkinson, S.R., 2011. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. J. Biol. Chem. 286, 13088–13095. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.230847

Hall, B.S., Wu, X., Hu, L., Wilkinson, S.R., 2010. Exploiting the drug-activating properties of a novel trypanosomal nitroreductase. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 1193–1199. https://doi.org/10.1128/AAC.01213-09

Harrington, J.M., Howell, S., Hajduk, S.L., 2009. Membrane permeabilization by trypanosome lytic factor, a cytolytic human high density lipoprotein. J. Biol. Chem. 284, 13505–13512. https://doi.org/10.1074/jbc.M900151200

Hill, K.L., Hutchings, N.R., Grandgenett, P.M., Donelson, J.E., 2000. T lymphocyte-triggering factor of african trypanosomes is associated with the flagellar fraction of the cytoskeleton and represents a new family of proteins that are present in several divergent eukaryotes. J. Biol. Chem. 275, 39369–39378. https://doi.org/10.1074/jbc.M006907200

Holt, H.R., Selby, R., Mumba, C., Napier, G.B., Guitian, J., 2016. Assessment of animal African trypanosomiasis (AAT) vulnerability in cattle-owning communities of sub-Saharan Africa. Parasit Vectors 9, 1–12. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1336-5

Hope-Rapp, E., Moussa Coulibaly, O., Klement, E., Danis, M., Bricaire, F., Caumes, E., 2009. Chancres cutanés révélant une trypanosomose africaine à Trypanosoma brucei

BY-NC-ND

gambiense chez un résident français au Gabon. Annales de Dermatologie et de Vénéréologie 136, 341–345. https://doi.org/10.1016/j.annder.2008.09.023

Hotez, P., Aksoy, S., 2017. PLOS Neglected Tropical Diseases: Ten years of progress in neglected tropical disease control and elimination … More or less. PLoS Negl. Trop. Dis. 11, e0005355. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005355

Huppert, J.L., Balasubramanian, S., 2005. Prevalence of quadruplexes in the human genome. Nucleic Acids Res. 33, 2908–2916. https://doi.org/10.1093/nar/gki609

Hutchings, N.R., Donelson, J.E., Hill, K.L., 2002. Trypanin is a cytoskeletal linker protein and is required for cell motility in African trypanosomes. J. Cell Biol. 156, 867–877. https://doi.org/10.1083/jcb.200201036

ICH Official web site : ICH [WWW Document], n.d. . ICH. URL https://www.ich.org/home.html (accessed 8.6.19).

Interactions médicamenteuses et cytochromes - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [WWW Document], n.d. URL https://ansm.sante.fr/Dossiers/Interactions-medicamenteuses/Interactions-medicamenteuses-et-cytochromes/(offset)/1 (accessed 10.4.19).

Ioset JR, Brun R, Wenzler T, Kaiser M,, Yardley V, 2009. Drug screening for kinetoplastid diseases: A training manual for screening in neglected diseases. DNDi.

Iten, M., Mett, H., Evans, A., Enyaru, J.C., Brun, R., Kaminsky, R., 1997. Alterations in ornithine decarboxylase characteristics account for tolerance of Trypanosoma brucei rhodesiense to D,L-alpha-difluoromethylornithine. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 1922–1925.

Jacobs, R.T., Nare, B., Wring, S.A., Orr, M.D., Chen, D., Sligar, J.M., Jenks, M.X., Noe, R.A., Bowling, T.S., Mercer, L.T., Rewerts, C., Gaukel, E., Owens, J., Parham, R., Randolph, R., Beaudet, B., Bacchi, C.J., Yarlett, N., Plattner, J.J., Freund, Y., Ding, C., Akama, T., Zhang, Y.-K., Brun, R., Kaiser, M., Scandale, I., Don, R., 2011. SCYX-7158, an orally-active benzoxaborole for the treatment of stage 2 human African trypanosomiasis. PLoS Negl. Trop. Dis. 5, e1151. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001151

Jamonneau, V., Truc, P., Garcia, A., Magnus, E., Büscher, P., 2000. Preliminary evaluation of LATEX/T. b. gambiense and alternative versions of CATT/T. b. gambiense for the serodiagnosis of human african trypanosomiasis of a population at risk in Côte d'Ivoire: considerations for mass-screening. Acta Trop. 76, 175–183. https://doi.org/10.1016/s0001-706x(00)00095-4

Jones, D.C., Foth, B.J., Urbaniak, M.D., Patterson, S., Ong, H.B., Berriman, M., Fairlamb, A.H., 2015. Genomic and Proteomic Studies on the Mode of Action of Oxaboroles against the African Trypanosome. PLoS Negl. Trop. Dis. 9, e0004299. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004299

Joyeau, R., Planchon, M., Abessolo, J., Aissa, K., Bance, C., Buisson, D., 2013. Combinatorial approach to the selection of active microorganisms in biotransformation: Application to sinomenine. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 85–86, 65–70. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.08.003

Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K., 1998. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. J. Med. Chem. 41, 1007–1010. https://doi.org/10.1021/jm970530e

BY-NC-ND

Kappagoda, S., Singh, U., Blackburn, B.G., 2011. Antiparasitic therapy. Mayo Clin. Proc. 86, 561–583. https://doi.org/10.4065/mcp.2011.0203

Katsuno, K., Burrows, J.N., Duncan, K., van Huijsduijnen, R.H., Kaneko, T., Kita, K., Mowbray, C.E., Schmatz, D., Warner, P., Slingsby, B.T., 2015. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. Nature Reviews Drug Discovery 14, 751–758. https://doi.org/10.1038/nrd4683

Keiser, J., Ericsson, Ö., Burri, C., 2000. Investigations of the metabolites of the trypanocidal drug melarsoprol. Clinical Pharmacology & Therapeutics 67, 478–488. https://doi.org/10.1067/mcp.2000.105990

Keita, M., Bouteille, B., Enanga, B., Vallat, J.M., Dumas, M., 1997. Trypanosoma brucei brucei: a long-term model of human African trypanosomiasis in mice, meningo-encephalitis, astrocytosis, and neurological disorders. Exp. Parasitol. 85, 183–192. https://doi.org/10.1006/expr.1996.4136

Kennedy, P.G.E., 2010. Novel Biomarkers for Late-Stage Human African Trypanosomiasis—The Search Goes On. Am. J. Trop. Med. Hyg. 82, 981–982. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0172

Kieffer, C., Cohen, A., Verhaeghe, P., Paloque, L., Hutter, S., Castera-Ducros, C., Laget, M., Rault, S., Valentin, A., Rathelot, P., Azas, N., Vanelle, P., 2015. Antileishmanial pharmacomodulation in 8-nitroquinolin-2(1H)-one series. Bioorg. Med. Chem. 23, 2377–2386. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.064

Kinabo, L.D.B., 1993. Pharmacology of existing drugs for animal trypanosomiasis. Acta Tropica 54, 169–183. https://doi.org/10.1016/0001-706X(93)90091-O

Kinabo, L.D.B., Bogan, A., 1988. The pharmacology of isometamidium. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 11, 233–245. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1988.tb00148.x

Kohagne Tongue, L., 2014. PATTEC n°1, Glossines et trypanosomoses.

Kovacic, P., Somanathan, R., 2014. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. Journal of Applied Toxicology 34, 810–824. https://doi.org/10.1002/jat.2980

Krafsur, E.S., 2009. Tsetse flies: Genetics, evolution, and role as vectors. Infection, Genetics and Evolution 9, 124–141. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.09.010

Krauth-Siegel, R.L., Schöneck, R., 1995. Flavoprotein structure and mechanism. 5. Trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design. FASEB J. 9, 1138–1146. https://doi.org/10.1096/fasebj.9.12.7672506

Kristensson, K., Nygård, M., Bertini, G., Bentivoglio, M., 2010. African trypanosome infections of the nervous system: Parasite entry and effects on sleep and synaptic functions. Progress in Neurobiology, Neglected Infectious Diseases of the Nervous System: Pathogenesis and Global Impact 91, 152–171. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.12.001

Kuriakose, S., Uzonna, J.E., 2014. Diminazene aceturate (Berenil), a new use for an old compound? Int. Immunopharmacol. 21, 342–345. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.05.027

Kuriakose, S.M., Singh, R., Uzonna, J.E., 2016. Host Intracellular Signaling Events and Pro-inflammatory Cytokine Production in African Trypanosomiasis. Front. Immunol. 7, 1–10. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00181

BY-NC-ND

La Greca, F., Magez, S., 2011a. Vaccination against trypanosomiasis. Hum Vaccin 7, 1225–1233. https://doi.org/10.4161/hv.7.11.18203

La Greca, F., Magez, S., 2011b. Vaccination against trypanosomiasis: can it be done or is the trypanosome truly the ultimate immune destroyer and escape artist? Hum. Vaccin. 7, 1225–1233. https://doi.org/10.4161/hv.7.11.18203

Lachenal, G., 2014. Le médicament qui devait sauver l'Afrique. La découverte.

Lanteri, C.A., Tidwell, R.R., Meshnick, S.R., 2008. The mitochondrion is a site of trypanocidal action of the aromatic diamidine DB75 in bloodstream forms of Trypanosoma brucei. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 875–882. https://doi.org/10.1128/AAC.00642-07

Laurencé, C., Rivard, M., Martens, T., Morin, C., Buisson, D., Bourcier, S., Sablier, M., Oturan, M.A., 2014. Anticipating the fate and impact of organic environmental contaminants: a new approach applied to the pharmaceutical furosemide. Chemosphere 113, 193–199. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.036

Laveissière, C., Penchenier, C., 2017. Manuel de lutte contre la maladie du sommeil, Didactiques. IRD Éditions.

Le Trant, N., Meshnick, S.R., Kitchener, K., Eaton, J.W., Cerami, A., 1983. Iron-containing superoxide dismutase from Crithidia fasciculata. Purification, characterization, and similarity to Leishmanial and trypanosomal enzymes. J. Biol. Chem. 258, 125–130.

Leach, T.M., Roberts, C.J., 1981. Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of animal trypanosomiasis in the eastern hemisphere. Pharmacology & Therapeutics 13, 91–147. https://doi.org/10.1016/0163-7258(81)90069-3

Leak, S.G., Colardelle, C., D'Ieteren, G., Dumont, P., Feron, A., Jeannin, P., Minengu, M., Mulungu, M., Ngamuna, S., Ordner, G., 1991. Glossina fusca group tsetse as vectors of cattle trypanosomiasis in Gabon and Zaire. Med. Vet. Entomol. 5, 111–120. https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1991.tb00528.x

Leeder, W.-M., Hummel, N.F.C., Göringer, H.U., 2016. Multiple G-quartet structures in pre-edited mRNAs suggest evolutionary driving force for RNA editing in trypanosomes. Sci. Rep. 6, 1–9. https://doi.org/10.1038/srep29810

Lefèvre, P.-C., Blancou, J., Chermette, R., Uilenberg, G., 2010. Infectious and parasitic diseases of livestock, Tec & Doc. ed. Lavoisier.

Lejon, V., Büscher, P., 2005. Review Article: cerebrospinal fluid in human African trypanosomiasis: a key to diagnosis, therapeutic decision and post-treatment follow-up. Trop. Med. Int. Health 10, 395–403. https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01403.x

Lentz, K., Raybon, J., Sinz, M.W., 2013. Drug Metabolism and Pharmacokinetics in Drug Discovery, in: Drug Discovery. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 99–139. https://doi.org/10.1002/9781118354483.ch4

Li, R., Chiguru, S., Li, L., Kim, Dongyoung, Velmurugan, R., Kim, David, Devanaboyina, S.C., Tian, H., Schroit, A., Mason, R., Ober, R.J., Ward, E.S., 2018. Targeting Phosphatidylserine with Calcium-dependent Protein-Drug Conjugates for the Treatment of Cancer. Mol. Cancer Ther. 17, 169–182. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0092

Li, S.-Q., Yang, W.-B., Lun, Z.-R., Ma, L.-J., Xi, S.-M., Chen, Q.-L., Song, X.-W., Kang, J., Yang, L.-Z., 2009. Immunization with recombinant actin from Trypanosoma evansi induces protective immunity against T. evansi, T. equiperdum and T. b. brucei infection. Parasitol. Res. 104, 429–435. https://doi.org/10.1007/s00436-008-1216-9

BY-NC-ND

Liochev, S.I., Hausladen, A., Fridovich, I., 1999. Nitroreductase A is regulated as a member of the soxRS regulon of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 3537–3539. https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3537

Liu, G., Sun, D., Wu, H., Zhang, M., Huan, H., Xu, J., Zhang, X., Zhou, H., Shi, M., 2015. Distinct Contributions of CD4+ and CD8+ T Cells to Pathogenesis of Trypanosoma brucei Infection in the Context of Gamma Interferon and Interleukin-10. Infect. Immun. 83, 2785–2795. https://doi.org/10.1128/IAI.00357-15

Loiseau, P.M., Bories, C., 2006. Mechanisms of drug action and drug resistance in Leishmania as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. Curr Top Med Chem 6, 539–550. https://doi.org/10.2174/156802606776743165

Losos, G.J., Crockett, E., 1969. Toxicity of beril in the dog. Vet. Rec. 85, 196. https://doi.org/10.1136/vr.85.7.196

Lubega, G.W., Byarugaba, D.K., Prichard, R.K., 2002. Immunization with a tubulin-rich preparation from Trypanosoma brucei confers broad protection against African trypanosomosis. Exp. Parasitol. 102, 9–22. https://doi.org/10.1016/s0014-4894(02)00140-6

Lundkvist, G.B., Kristensson, K., Bentivoglio, M., 2004. Why Trypanosomes Cause Sleeping Sickness. Physiology 19, 198–206. https://doi.org/10.1152/physiol.00006.2004

Lutje, V., Seixas, J., Kennedy, A., 2013. Chemotherapy for second-stage human African trypanosomiasis. Cochrane Database Syst. Rev. CD006201. https://doi.org/10.1002/14651858.CD006201.pub3

Lutumba, P., Robays, J., Miaka, C., Kande, V., Mumba, D., Büscher, P., Dujardin, B., Boelaert, M., 2006. Validité, coût et faisabilité de la mAECT et CTC comme tests de confirmation dans la détection de la Trypanosomiase Humaine Africaine. Tropical Medicine & International Health 11, 470–478. https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01591.x

Mackey, T.K., Liang, B.A., Cuomo, R., Hafen, R., Brouwer, K.C., Lee, D.E., 2014. Emerging and reemerging neglected tropical diseases: a review of key characteristics, risk factors, and the policy and innovation environment. Clin. Microbiol. Rev. 27, 949–979. https://doi.org/10.1128/CMR.00045-14

MacLean, L., Reiber, H., Kennedy, P.G.E., Sternberg, J.M., 2012. Stage progression and neurological symptoms in Trypanosoma brucei rhodesiense sleeping sickness: role of the CNS inflammatory response. PLoS Negl. Trop. Dis. 6, e1857. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001857

Manna, P.T., Kelly, S., Field, M.C., 2013. Adaptin evolution in kinetoplastids and emergence of the variant surface glycoprotein coat in African trypanosomatids. Mol. Phylogenet. Evol. 67, 123–128. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.01.002

Mansfield, J.M., Paulnock, D.M., 2008. Genetic manipulation of African trypanosomes as a tool to dissect the immunobiology of infection. Parasite Immunol. 30, 245–253. https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.01003.x

Mansfield, J.M., Paulnock, D.M., 2005. Regulation of innate and acquired immunity in African trypanosomiasis. Parasite Immunol. 27, 361–371. https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00791.x

Mansfield, J.M., Paulnock, D.M., Hedberg, G.M., 2014. Bridging Innate and Adaptive Immunity in African Trypanosomiasis, in: Magez, S., Radwanska, M. (Eds.), Trypanosomes and Trypanosomiasis. Springer Vienna, Vienna, pp. 89–114. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5_4

BY-NC-ND

Marcus, S.L., Kopelman, R., Koll, B., Bacchi, C.J., 1982. Effects of exogenous polyamine and trypanocides on the DNA polymerase activities from Trypanosoma brucei brucei, mouse thymus and murine leukemia virus. Mol. Biochem. Parasitol. 5, 231–243. https://doi.org/10.1016/0166-6851(82)90032-9

Marie-Daragon, A., Rouillard, M.C., Bouteille, B., Bisser, S., de Albuquerque, C., Chauvière, G., Périé, J., Dumas, M., 1994. [An efficacy trial on Trypanosoma brucei brucei of molecules permeating the blood-brain barrier and of megazol]. Bull. Soc. Pathol. Exot. 87, 347–352.

Mäser, P., Sütterlin, C., Kralli, A., Kaminsky, R., 1999. A nucleoside transporter from Trypanosoma brucei involved in drug resistance. Science 285, 242–244. https://doi.org/10.1126/science.285.5425.242

Masocha, W., Robertson, B., Rottenberg, M.E., Mhlanga, J., Sorokin, L., Kristensson, K., 2004. Cerebral vessel laminins and IFN-gamma define Trypanosoma brucei brucei penetration of the blood-brain barrier. J. Clin. Invest. 114, 689–694. https://doi.org/10.1172/JCI22104

Masocha, W., Rottenberg, M.E., Kristensson, K., 2007. Migration of African trypanosomes across the blood–brain barrier. Physiology & Behavior 92, 110–114. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.045

Mathieu, C., Salgado, A.G., Wirdnam, C., Meier, S., Grotemeyer, M.S., Inbar, E., Mäser, P., Zilberstein, D., Sigel, E., Bütikofer, P., Rentsch, D., 2014. Trypanosoma brucei eflornithine transporter AAT6 is a low-affinity low-selective transporter for neutral amino acids. Biochemical Journal 463, 9–18. https://doi.org/10.1042/BJ20140719

Matovu, E., Seebeck, T., Enyaru, J.C.K., Kaminsky, R., 2001. Drug resistance in Trypanosoma brucei spp., the causative agents of sleeping sickness in man and nagana in cattle. Microbes and Infection 3, 763–770. https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01432-0

Matovu, E., Stewart, M.L., Geiser, F., Brun, R., Mäser, P., Wallace, L.J.M., Burchmore, R.J., Enyaru, J.C.K., Barrett, M.P., Kaminsky, R., Seebeck, T., de Koning, H.P., 2003. Mechanisms of arsenical and diamidine uptake and resistance in Trypanosoma brucei. Eukaryotic Cell 2, 1003–1008. https://doi.org/10.1128/ec.2.5.1003-1008.2003

Matthews, K.R., McCulloch, R., Morrison, L.J., 2015. The within-host dynamics of African trypanosome infections. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 370. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0288

McVay, C.S., Rolfe, R.D., 2000. In vitro and in vivo activities of nitazoxanide against Clostridium difficile. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 2254–2258. https://doi.org/10.1128/aac.44.9.2254-2258.2000

Mdachi, R.E., Thuita, J.K., Kagira, J.M., Ngotho, J.M., Murilla, G.A., Ndung'u, J.M., Tidwell, R.R., Hall, J.E., Brun, R., 2009. Efficacy of the Novel Diamidine Compound 2,5-Bis(4-Amidinophenyl)- Furan-Bis-O-Methlylamidoxime (Pafuramidine, DB289) against Trypanosoma brucei rhodesiense Infection in Vervet Monkeys after Oral Administration. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 953–957. https://doi.org/10.1128/AAC.00831-08

Mespoulet, E., 2012. Activité trypanocide du mégazol sur le modèle murin à Trypanosoma brucei brucei : recherche d'une dose efficace et identification des métabolites (thèse d'exercice de Pharmacie). Université de Limoges, Limoges.

Mesu, V.K.B.K., Kalonji, W.M., Bardonneau, C., Mordt, O.V., Blesson, S., Simon, F., Delhomme, S., Bernhard, S., Kuziena, W., Lubaki, J.-P.F., Vuvu, S.L., Ngima, P.N., Mbembo, H.M., Ilunga, M., Bonama, A.K., Heradi, J.A., Solomo, J.L.L., Mandula, G.,

BY-NC-ND

Badibabi, L.K., Dama, F.R., Lukula, P.K., Tete, D.N., Lumbala, C., Scherrer, B., Strub-Wourgaft, N., Tarral, A., 2018. Oral fexinidazole for late-stage African Trypanosoma brucei gambiense trypanosomiasis: a pivotal multicentre, randomised, non-inferiority trial. The Lancet 391, 144–154. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32758-7

Metcalf, B.W., Bey, P., Danzin, C., Jung, M.J., Casara, P., Vevert, J.P., 1978. Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E.C.4.1.1.17) by substrate and product analogs. J. Am. Chem. Soc. 100, 2551–2553. https://doi.org/10.1021/ja00476a050

Mkunza, F., Olaho, W.M., Powell, C.N., 1995. Partial protection against natural trypanosomiasis after vaccination with a flagellar pocket antigen from Trypanosoma brucei rhodesiense. Vaccine 13, 151–154. https://doi.org/10.1016/0264-410X(95)93128-V

Mogk, S., Boßelmann, C.M., Mudogo, C.N., Stein, J., Wolburg, H., Duszenko, M., 2017. African trypanosomes and brain infection - the unsolved question. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 3, 1675–1687. https://doi.org/10.1111/brv.12301

Molina-Portela, M. del P., Lugli, E.B., Recio-Pinto, E., Raper, J., 2005. Trypanosome lytic factor, a subclass of high-density lipoprotein, forms cation-selective pores in membranes. Mol. Biochem. Parasitol. 144, 218–226. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.08.018

Moncayo, Á., Silveira, A.C., 2017. 4 - Current epidemiological trends of Chagas disease in Latin America and future challenges: epidemiology, surveillance, and health policies, in: Telleria, J., Tibayrenc, M. (Eds.), American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition). Elsevier, London, pp. 59–88. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00004-6

Morgan, H.P., McNae, I.W., Nowicki, M.W., Zhong, W., Michels, P.A.M., Auld, D.S., Fothergill-Gilmore, L.A., Walkinshaw, M.D., 2011. The trypanocidal drug suramin and other trypan blue mimetics are inhibitors of pyruvate kinases and bind to the adenosine site. J. Biol. Chem. 286, 31232–31240. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.212613

Morrison, L.J., Marcello, L., McCulloch, R., 2009. Antigenic variation in the African trypanosome: molecular mechanisms and phenotypic complexity. Cellular Microbiology 11, 1724–1734. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01383.x

Morrison, L.J., Vezza, L., Rowan, T., Hope, J.C., 2016. Animal African Trypanosomiasis: Time to Increase Focus on Clinically Relevant Parasite and Host Species. Trends Parasitol. 32, 599–607. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.012

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55–63. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4

Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., Wu, J.R., 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)n, present at the telomeres of human chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6622–6626. https://doi.org/10.1073/pnas.85.18.6622

Mullin, C.A., Rashid, K.A., Mumma, R.O., 1987. Mutagenic potency of some conjugated nitroaromatic compounds and its relationship to structure. Mutation Research/Genetic Toxicology 188, 267–274. https://doi.org/10.1016/0165-1218(87)90003-6

Munday, J.C., Eze, A.A., Baker, N., Glover, L., Clucas, C., Aguinaga Andrés, D., Natto, M.J., Teka, I.A., McDonald, J., Lee, R.S., Graf, F.E., Ludin, P., Burchmore, R.J.S., Turner, C.M.R., Tait, A., MacLeod, A., Mäser, P., Barrett, M.P., Horn, D., De Koning, H.P.,

BY-NC-ND

2014. Trypanosoma brucei aquaglyceroporin 2 is a high-affinity transporter for pentamidine and melaminophenyl arsenic drugs and the main genetic determinant of resistance to these drugs. J. Antimicrob. Chemother. 69, 651–663. https://doi.org/10.1093/jac/dkt442

Munday, J.C., Tagoe, D.N.A., Eze, A.A., Krezdorn, J.A.M., Rojas López, K.E., Alkhaldi, A.A.M., McDonald, F., Still, J., Alzahrani, K.J., Settimo, L., De Koning, H.P., 2015. Functional analysis of drug resistance-associated mutations in the Trypanosoma brucei adenosine transporter 1 (TbAT1) and the proposal of a structural model for the protein. Mol. Microbiol. 96, 887–900. https://doi.org/10.1111/mmi.12979

Mungube, E.O., Vitouley, H.S., Allegye-Cudjoe, E., Diall, O., Boucoum, Z., Diarra, B., Sanogo, Y., Randolph, T., Bauer, B., Zessin, K.-H., Clausen, P.-H., 2012. Detection of multiple drug-resistant Trypanosoma congolense populations in village cattle of south-east Mali. Parasit Vectors 5, 155. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-155

Murilla, G.A., Mdachi, R.E., Ismail, A.A., Karanja, W.M., 1996. Bioavailability, pharmacokinetics, and tissue distribution of 14C homidium after parenteral administration to Boran cattle. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 19, 142–148. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1996.tb00027.x

Navizet, I., Liu, Y.-J., Ferré, N., Roca-Sanjuán, D., Lindh, R., 2011. The Chemistry of Bioluminescence: An Analysis of Chemical Functionalities. ChemPhysChem 12, 3064–3076. https://doi.org/10.1002/cphc.201100504

N'Djetchi, M.K., Ilboudo, H., Koffi, M., Kaboré, J., Kaboré, J.W., Kaba, D., Courtin, F., Coulibaly, B., Fauret, P., Kouakou, L., Ravel, S., Deborggraeve, S., Solano, P., Meeûs, T.D., Bucheton, B., Jamonneau, V., 2017. The study of trypanosome species circulating in domestic animals in two human African trypanosomiasis foci of Côte d'Ivoire identifies pigs and cattle as potential reservoirs of Trypanosoma brucei gambiense. PLoS Negl. Trop. Dis. 11, e0005993. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005993

Nesslany, F., Brugier, S., Mouriès, M.-A., Le Curieux, F., Marzin, D., 2004. In vitro and in vivo chromosomal aberrations induced by megazol. Mutat. Res. 560, 147–158. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.02.013

Newton, B.A., 1972. Recent studies on the mechanism of action of berenil (diminazene) and related compounds, in: Comparative Biochemistry of Parasites. Academic Press New York and London, pp. 127–138.

Ng'ayo, M.O., Njiru, Z.K., Kenya, E.U., Muluvi, G.M., Osir, E.O., Masiga, D.K., 2005. Detection of trypanosomes in small ruminants and pigs in western Kenya: important reservoirs in the epidemiology of sleeping sickness? Kinetoplastid Biology and Disease 4, 5. https://doi.org/10.1186/1475-9292-4-5

Nikolskaia, O.V., de A Lima, A.P.C., Kim, Y.V., Lonsdale-Eccles, J.D., Fukuma, T., Scharfstein, J., Grab, D.J., 2006. Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. J. Clin. Invest. 116, 2739–2747. https://doi.org/10.1172/JCI27798

Njagu, Z., Mihok, S., Kokwaro, E., Verloo, D., 1999. Isolation of Trypanosoma brucei from the monitor lizard (Varanus niloticus) in an endemic focus of rhodesian sleeping sickness in Kenya. Acta Tropica 72, 137–148. https://doi.org/10.1016/S0001-706X(98)00092-8

Nok, A.J., 2003. Arsenicals (melarsoprol), pentamidine and suramin in the treatment of human African trypanosomiasis. Parasitol. Res. 90, 71–79. https://doi.org/10.1007/s00436-002-0799-9

BY-NC-ND

Núñez, M., Borrull, F., Fontanals, N., Pocurull, E., 2015. Determination of pharmaceuticals in bivalves using QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 407, 3841–3849. https://doi.org/10.1007/s00216-015-8617-2

Odeniran, P.O., Ademola, I.O., 2018. A meta-analysis of the prevalence of African animal trypanosomiasis in Nigeria from 1960 to 2017. Parasit. Vectors 11, 12. https://doi.org/10.1186/s13071-018-2801-0

Okwor, I., Uzonna, J., 2016. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 94, 489–493. https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0408

Olvera-Vargas, H., Leroy, S., Rivard, M., Oturan, N., Oturan, M., Buisson, D., 2016. Microbial biotransformation of furosemide for environmental risk assessment: identification of metabolites and toxicological evaluation. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 23, 22691–22700. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7398-2

OMS | Listes modèles OMS des médicaments essentiels [WWW Document], n.d. . WHO. URL https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/fr/ (accessed 10.7.19).

Orenge, C.O., Munga, L., Kimwele, C.N., Kemp, S., Korol, A., Gibson, J.P., Hanotte, O., Soller, M., 2012. Trypanotolerance in N'Dama x Boran crosses under natural trypanosome challenge: effect of test-year environment, gender, and breed composition. BMC Genet. 13, 87. https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-87

Ormerod, W.E., 1951. The mode of action of antrycide. Br. J. Pharmacol. Chemother. 6, 325–333. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1951.tb00646.x

Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 123, 291–298. https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90411-X

Otranto, D., Dantas-Torres, F., 2013. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. Trends Parasitol. 29, 339–345. https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.05.003

Overath, P., Ruoff, J., Stierhof, Y.D., Haag, J., Tichy, H., Dyková, I., Lom, J., 1998. Cultivation of bloodstream forms of Trypanosoma carassii, a common parasite of freshwater fish. Parasitol. Res. 84, 343–347. https://doi.org/10.1007/s004360050408

Owens, T., Bechmann, I., Engelhardt, B., 2008. Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 67, 1113–1121. https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31818f9ca8

Paloque, L., Bouhlel, A., Curti, C., Dumètre, A., Verhaeghe, P., Azas, N., Vanelle, P., 2011. Synthesis and evaluation of monoamidoxime derivatives: toward new antileishmanial compounds. Eur. J. Med. Chem. 46, 2984–2991. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.04.026

Paloque, L., Verhaeghe, P., Casanova, M., Castera-Ducros, C., Dumètre, A., Mbatchi, L., Hutter, S., Kraiem-M'Rabet, M., Laget, M., Remusat, V., Rault, S., Rathelot, P., Azas, N., Vanelle, P., 2012. Discovery of a new antileishmanial hit in 8-nitroquinoline series. Eur. J. Med. Chem. 54, 75–86. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.04.029

Patterson, S., Wyllie, S., 2014. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. Trends Parasitol. 30, 289–298. https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.003

BY-NC-ND

Pays, E., 2006. The variant surface glycoprotein as a tool for adaptation in African trypanosomes. Microbes Infect. 8, 930–937. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.10.002

Pedron, J., 2018. Synthèse et étude de l'activité anti-kinétoplastidés de nouvelles 8-nitroquinoléin-2(1H))-ones bioactivées par les nitroréductases de type 1 (phd). Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier.

Pedron, J., Boudot, C., Bourgeade-Delmas, S., Sournia-Saquet, A., Paloque, L., Rastegari, M., Abdoulaye, M., El-Kashef, H., Bonduelle, C., Pratviel, G., Wyllie, S., Fairlamb, A.H., Courtioux, B., Verhaeghe, P., Valentin, A., 2018a. Antitrypanosomatid Pharmacomodulation at Position 3 of the 8-Nitroquinolin-2(1H)-one Scaffold Using Palladium-Catalysed Cross-Coupling Reactions. ChemMedChem 13, 2217–2228. https://doi.org/10.1002/cmdc.201800456

Pedron, J., Boudot, C., Brossas, J.-Y., Pinault, E., Bourgeade-Delmas, S., Sournia-Saquet, A., Boutet-Robinet, E., Destere, A., Tronnet, A., Bergé, J., Bonduelle, C., Deraeve, C., Pratviel, G., Stigliani, J.-L., Paris, L., Mazier, D., Corvaisier, S., Since, M., Malzert-Fréon, A., Wyllie, S., Milne, R., Fairlamb, A.H., Valentin, A., Courtioux, B., Verhaeghe, P., 2020. New 8-Nitroquinolinone Derivative Displaying Submicromolar in Vitro Activities against Both Trypanosoma brucei and cruzi. ACS Med. Chem. Lett. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00566

Pedron, J., Boudot, C., Hutter, S., Bourgeade-Delmas, S., Stigliani, J.-L., Sournia-Saquet, A., Moreau, A., Boutet-Robinet, E., Paloque, L., Mothes, E., Laget, M., Vendier, L., Pratviel, G., Wyllie, S., Fairlamb, A., Azas, N., Courtioux, B., Valentin, A., Verhaeghe, P., 2018b. Novel 8-nitroquinolin-2(1H)-ones as NTR-bioactivated antikinetoplastid molecules: Synthesis, electrochemical and SAR study. Eur. J. Med. Chem. 155, 135–152. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.001

Penchenier, L., Grébaut, P., Njokou, F., Eboo Eyenga, V., Büscher, P., 2003. Evaluation of LATEX/T.b.gambiense for mass screening of Trypanosoma brucei gambiense sleeping sickness in Central Africa. Acta Trop. 85, 31–37. https://doi.org/10.1016/s0001-706x(02)00232-2

Pépin, J., Méda, H.A., 2001. The epidemiology and control of Human African Trypanosomiasis. Adv. Parasitol. 49, 71–132.

Peregrine, A.S., Mamman, M., 1993. Pharmacology of diminazene: a review. Acta Trop. 54, 185–203. https://doi.org/10.1016/0001-706x(93)90092-p

Pérez-Molina, J.A., Molina, I., 2018. Chagas disease. Lancet 391, 82–94. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4

Phillips, M.A., Coffino, P., Wang, C.C., 1988. Trypanosoma brucei ornithine decarboxylase: enzyme purification, characterization, and expression in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 263, 17933–17941.

Phillips, M.A., Coffino, P., Wang, C.C., 1987. Cloning and sequencing of the ornithine decarboxylase gene from Trypanosoma brucei. Implications for enzyme turnover and selective difluoromethylornithine inhibition. J. Biol. Chem. 262, 8721–8727.

Pirota, V., Nadai, M., Doria, F., Richter, S.N., 2019. Naphthalene Diimides as Multimodal G-Quadruplex-Selective Ligands. Molecules 24, 426. https://doi.org/10.3390/molecules24030426

Polak, A., Richle, R., 1978. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. Ann. Trop. Med. Parasitol. 72, 45–54. https://doi.org/10.1080/00034983.1978.11719278

BY-NC-ND

Poot, M., Kausch, K., Köhler, J., Haaf, T., Hoehn, H., 1990. The Minor-Groove Binding DNA-Ligands Netropsin, Distamycin A and Berenil Cause Polyploidisation via Impairment of the G2 Phase of the Cell Cycle. Cell Structure and Function 15, 151–157. https://doi.org/10.1247/csf.15.151

Priotto, G., Kasparian, S., Mutombo, W., Ngouama, D., Ghorashian, S., Arnold, U., Ghabri, S., Baudin, E., Buard, V., Kazadi-Kyanza, S., Ilunga, M., Mutangala, W., Pohlig, G., Schmid, C., Karunakara, U., Torreele, E., Kande, V., 2009. Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African Trypanosoma brucei gambiense trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. Lancet 374, 56–64. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61117-X

Radwanska, M., Magez, S., Dumont, N., Pays, A., Nolan, D., Pays, E., 2000. Antibodies raised against the flagellar pocket fraction of Trypanosoma brucei preferentially recognize HSP60 in cDNA expression library. Parasite Immunology 22, 639–650. https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2000.00348.x

Rai, A.J., 2007. La déplétion des protéines abondantes à la recherche de biomarqueurs protéiques. Med. Sci. 23, 5–8. https://doi.org/10.1051/medsci/2007231s5

Rassi, A., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. The Lancet 375, 1388–1402. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X

Rau, J., Stolz, A., 2003. Oxygen-insensitive nitroreductases NfsA and NfsB of Escherichia coli function under anaerobic conditions as lawsone-dependent Azo reductases. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3448–3455. https://doi.org/10.1128/aem.69.6.3448-3455.2003

Räz, B., Iten, M., Grether-Bühler, Y., Kaminsky, R., Brun, R., 1997. The Alamar Blue® assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (T.b. rhodesiense and T.b. gambiense) in vitro. Acta Tropica 68, 139–147. https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00079-X

Redin, G.S., Kuck, N.A., Forbes, M., 1968. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole, a new antimicrobial age. VI. Antibacterial efficacy in mice and in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 8, 534–537.

Reguera, R.M., Morán, M., Pérez-Pertejo, Y., García-Estrada, C., Balaña-Fouce, R., 2016. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. Vet. Parasitol. 227, 98–114. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.011

Reif, R., Ghallab, A., Beattie, L., Günther, G., Kuepfer, L., Kaye, P.M., Hengstler, J.G., 2017. In vivo imaging of systemic transport and elimination of xenobiotics and endogenous molecules in mice. Arch. Toxicol. 91, 1335–1352. https://doi.org/10.1007/s00204-016-1906-5

Rhodes, D., Lipps, H.J., 2015. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. Nucleic Acids Res. 43, 8627–8637. https://doi.org/10.1093/nar/gkv862

Richardson, J.P., 1973. Mechanism of ethidium bromide inhibition of RNA polymerase. Journal of Molecular Biology 78, 703–714. https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90290-8

Rijal, S., Ostyn, B., Uranw, S., Rai, K., Bhattarai, N.R., Dorlo, T.P.C., Beijnen, J.H., Vanaerschot, M., Decuypere, S., Dhakal, S.S., Das, M.L., Karki, P., Singh, R., Boelaert, M., Dujardin, J.-C., 2013. Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. Clin. Infect. Dis. 56, 1530–1538. https://doi.org/10.1093/cid/cit102

BY-NC-ND

Roe, A.L., Snawder, J.E., Benson, R.W., Roberts, D.W., Casciano, D.A., 1993. HepG2 Cells: An in Vitro Model for P450-Dependent Metabolism of Acetaminophen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 190, 15–19. https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1003

Rogers, D.J., 1985. Trypanosomiasis “risk” or “challenge”: a review. Acta Trop. 42, 5–23.

Rossignol, J.F., Maisonneuve, H., Cho, Y.W., 1984. Nitroimidazoles in the treatment of trichomoniasis, giardiasis, and amebiasis. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 22, 63–72.

Roy Chowdhury, A., Bakshi, R., Wang, J., Yildirir, G., Liu, B., Pappas-Brown, V., Tolun, G., Griffith, J.D., Shapiro, T.A., Jensen, R.E., Englund, P.T., 2010. The Killing of African Trypanosomes by Ethidium Bromide. PLoS Pathog. 6, e1001226. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001226

Sanderson, L., Dogruel, M., Rodgers, J., De Koning, H.P., Thomas, S.A., 2009. Pentamidine Movement across the Murine Blood-Brain and Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers: Effect of Trypanosome Infection, Combination Therapy, P-Glycoprotein, and Multidrug Resistance-Associated Protein. J. Pharmacol. Exp. Ther. 329, 967–977. https://doi.org/10.1124/jpet.108.149872

Sauvage, F.-L., Saint-Marcoux, F., Duretz, B., Deporte, D., Lachatre, G., Marquet, P., 2006. Screening of drugs and toxic compounds with liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry. Clin. Chem. 52, 1735–1742. https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.067116

Schillinger, D., Maloo, S.H., Röttcher, D., 1985. The toxic effect of intravenous application of the trypanocide isometamidium (Samorin). Zentralbl Veterinarmed A 32, 234–239. https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1985.tb01939.x

Sekhar, G.N., Watson, C.P., Fidanboylu, M., Sanderson, L., Thomas, S.A., 2014. Delivery of antihuman African trypanosomiasis drugs across the blood-brain and blood-CSF barriers. Adv. Pharmacol. 71, 245–275. https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.06.003

Shapiro, T.A., Englund, P.T., 1990. Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 950–954. https://doi.org/10.1073/pnas.87.3.950

Shaw, A.P.M., Cecchi, G., Wint, G.R.W., Mattioli, R.C., Robinson, T.P., 2014. Mapping the economic benefits to livestock keepers from intervening against bovine trypanosomosis in Eastern Africa. Preventive Veterinary Medicine 113, 197–210. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.10.024

Simarro, P.P., Diarra, A., Ruiz Postigo, J.A., Franco, J.R., Jannin, J.G., 2011. The Human African Trypanosomiasis Control and Surveillance Programme of the World Health Organization 2000–2009: The Way Forward. PLoS Negl. Trop. Dis. 5, e1007. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001007

Simarro, P.P., Louis, F.J., Jannin, J., 2003. [Sleeping sickness, forgotten illness: what are the consequences in the field?]. Med. Trop. 63, 231–235.

Sköld, M., Gnarpe, H., Hillström, L., 1977. Ornidazole: a new antiprotozoal compound for treatment of Trichomonas vaginalis infection. Br. J. Vener. Dis. 53, 44–48. https://doi.org/10.1136/sti.53.1.44

Smith, D.A., Di, L., Kerns, E.H., 2010. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov. 9, 929–939. https://doi.org/10.1038/nrd3287

BY-NC-ND

Smith, D.A., Waterbeemd, H. van de, 1999. Pharmacokinetics and metabolism in early drug discovery. Curr. Opin. Chem. Biol. 3, 373–378. https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)80056-8

Smith, D.H., Pepin, J., Stich, A.H., 1998. Human African trypanosomiasis: an emerging public health crisis. Br. Med. Bull. 54, 341–355. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a011692

Sokolova, A.Y., Wyllie, S., Patterson, S., Oza, S.L., Read, K.D., Fairlamb, A.H., 2010. Cross-Resistance to Nitro Drugs and Implications for Treatment of Human African Trypanosomiasis. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 2893–2900. https://doi.org/10.1128/AAC.00332-10

Somerville, C.C., Nishino, S.F., Spain, J.C., 1995. Purification and characterization of nitrobenzene nitroreductase from Pseudomonas pseudoalcaligenes JS45. J. Bacteriol. 177, 3837–3842. https://doi.org/10.1128/jb.177.13.3837-3842.1995

Speck, W.T., Blumer, J.L., Rosenkranz, E.J., Rosenkranz, H.S., 1981. Effect of Genotype on Mutagenicity of Niridazole in Nitroreductase-deficient Bacteria. Cancer Res. 41, 2305–2307.

Spinks, A., 1950a. Absorption and persistence of antrycide. Br. J. Pharmacol. Chemother. 5, 445–454. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1950.tb00595.x

Spinks, A., 1950b. Determination of antrycide. Biochem. J. 47, 299–306. https://doi.org/10.1042/bj0470299

Stanghellini, A., Josenando, T., 2001. The situation of sleeping sickness in Angola: a calamity. Tropical Medicine & International Health 6, 330–334. https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00724.x

Stevens, J., Brisse, S., 2004. Systematics of Trypanosomes of Medical and Veterinary Importance. ResearchGate 22. https://doi.org/10.1079/9780851994758.0001

Steverding, D., 2014. The history of Chagas disease. Parasit. Vectors 7, 317. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-317

Stijlemans, B., Guilliams, M., Raes, G., Beschin, A., Magez, S., De Baetselier, P., 2007. African trypanosomosis: From immune escape and immunopathology to immune intervention. Veterinary Parasitology 148, 3–13. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.05.005

Strategic and Technical Advisory Group on NTDs (STAG), 2017. 10th meeting of the Strategic and Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases. WHO, Geneva, Switzerland.

Sun, Q., Harper, T.W., Dierks, E.A., Zhang, L., Chang, S., Rodrigues, A.D., Marathe, P., 2011. 1-Aminobenzotriazole, a Known Cytochrome P450 Inhibitor, Is a Substrate and Inhibitor of N-Acetyltransferase. Drug Metab Dispos 39, 1674–1679. https://doi.org/10.1124/dmd.111.039834

Sun, T., Zhang, Y., 2008. Pentamidine binds to tRNA through non-specific hydrophobic interactions and inhibits aminoacylation and translation. Nucleic Acids Res. 36, 1654–1664. https://doi.org/10.1093/nar/gkm1180

Sundar, S., More, D.K., Singh, M.K., Singh, V.P., Sharma, S., Makharia, A., Kumar, P.C., Murray, H.W., 2000. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. Clin. Infect. Dis. 31, 1104–1107. https://doi.org/10.1086/318121

BY-NC-ND

Sutcliffe, O.B., Skellern, G.G., Araya, F., Cannavan, A., Sasanya, J.J., Dungu, B., van Gool, F., Münstermann, S., Mattioli, R.C., 2014. Animal trypanosomosis: making quality control of trypanocidal drugs possible. Rev. - Off. Int. Epizoot. 33, 813–830. https://doi.org/10.20506/rst.33.3.2320

Take, Y., Inouye, Y., Nakamura, S., Allaudeen, H.S., Kubo, A., 1989. Comparative studies of the inhibitory properties of antibiotics on human immunodeficiency virus and avian myeloblastosis virus reverse transcriptases and cellular DNA polymerases. J. Antibiot. 42, 107–115. https://doi.org/10.7164/antibiotics.42.107

Tarral, A., Blesson, S., Mordt, O.V., Torreele, E., Sassella, D., Bray, M.A., Hovsepian, L., Evène, E., Gualano, V., Felices, M., Strub-Wourgaft, N., 2014. Determination of an optimal dosing regimen for fexinidazole, a novel oral drug for the treatment of human African trypanosomiasis: first-in-human studies. Clin Pharmacokinet 53, 565–580. https://doi.org/10.1007/s40262-014-0136-3

Taylor, K.A., 1998. Immune responses of cattle to African trypanosomes: protective or pathogenic? Int. J. Parasitol. 28, 219–240. https://doi.org/10.1016/s0020-7519(97)00154-9

Thomson, R., Samanovic, M., Raper, J., 2009. Activity of trypanosome lytic factor: a novel component of innate immunity. Future Microbiol. 4, 789–796. https://doi.org/10.2217/FMB.09.57

Torreele, E., Bourdin Trunz, B., Tweats, D., Kaiser, M., Brun, R., Mazué, G., Bray, M.A., Pécoul, B., 2010. Fexinidazole--a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e923. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000923

Trindade, S., Rijo-Ferreira, F., Carvalho, T., Pinto-Neves, D., Guegan, F., Aresta-Branco, F., Bento, F., Young, S.A., Pinto, A., Van Den Abbeele, J., Ribeiro, R.M., Dias, S., Smith, T.K., Figueiredo, L.M., 2016. Trypanosoma brucei Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice. Cell Host Microbe 19, 837–848. https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.002

Truc, P., Nzoumbou-Boko, R., Desquesnes, M., Semballa, S., Vincendeau, P., 2014. Les trypanosomoses humaines atypiques. Médecine et Santé Tropicales 24, 249–252. https://doi.org/10.1684/mst.2014.0346

Tseng, A., Hughes, C.A., Wu, J., Seet, J., Phillips, E.J., 2017. Cobicistat versus Ritonavir: Similar Pharmacokinetic Enhancers But Some Important Differences. Ann Pharmacother 51, 1008–1022. https://doi.org/10.1177/1060028017717018

Tshimungu, K., Okenge, L.N., Mukeba, J.N., de Mol, P., 2010. Réémergence de la trypanosomiase humaine africaine dans la province ville de Kinshasa, République démocratique du Congo (RDC). Médecine et Maladies Infectieuses 40, 462–467. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2009.12.007

Turrens, J.F., Watts, B.P., Zhong, L., Docampo, R., 1996. Inhibition of Trypanosoma cruzi and T. brucei NADH fumarate reductase by benznidazole and anthelmintic imidazole derivatives. Molecular and Biochemical Parasitology 82, 125–129. https://doi.org/10.1016/0166-6851(96)02722-3

Tweats, D., Bourdin Trunz, B., Torreele, E., 2012. Genotoxicity profile of fexinidazole--a drug candidate in clinical development for human African trypanomiasis (sleeping sickness). Mutagenesis 27, 523–532. https://doi.org/10.1093/mutage/ges015

Urade, Y., Hayaishi, O., 2011. Prostaglandin D2 and sleep/wake regulation. Sleep Medicine Reviews 15, 411–418. https://doi.org/10.1016/j.smrv.2011.08.003

BY-NC-ND

Uzcategui, N.L., Szallies, A., Pavlovic-Djuranovic, S., Palmada, M., Figarella, K., Boehmer, C., Lang, F., Beitz, E., Duszenko, M., 2004. Cloning, Heterologous Expression, and Characterization of Three Aquaglyceroporins from Trypanosoma brucei. J. Biol. Chem. 279, 42669–42676. https://doi.org/10.1074/jbc.M404518200

Uzureau, P., Uzureau, S., Lecordier, L., Fontaine, F., Tebabi, P., Homblé, F., Grélard, A., Zhendre, V., Nolan, D.P., Lins, L., Crowet, J.-M., Pays, A., Felu, C., Poelvoorde, P., Vanhollebeke, B., Moestrup, S.K., Lyngsø, J., Pedersen, J.S., Mottram, J.C., Dufourc, E.J., Pérez-Morga, D., Pays, E., 2013. Mechanism of *Trypanosoma brucei gambiense* resistance to human serum. Nature 501, 430–434. https://doi.org/10.1038/nature12516

Vaidya, T., Bakhiet, M., Hill, K.L., Olsson, T., Kristensson, K., Donelson, J.E., 1997. The Gene for a T Lymphocyte Triggering Factor from African Trypanosomes. J. Exp. Med. 186, 433–438. https://doi.org/10.1084/jem.186.3.433

Vanhamme, L., Pays, E., 2004. The trypanosome lytic factor of human serum and the molecular basis of sleeping sickness. Int. J. Parasitol. 34, 887–898. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.04.008

Vansterkenburg, E.L., Coppens, I., Wilting, J., Bos, O.J., Fischer, M.J., Janssen, L.H., Opperdoes, F.R., 1993. The uptake of the trypanocidal drug suramin in combination with low-density lipoproteins by Trypanosoma brucei and its possible mode of action. Acta Trop. 54, 237–250. https://doi.org/10.1016/0001-706x(93)90096-t

Vercesi, A.E., Moreno, S.N., Docampo, R., 1994. Ca2+/H+ exchange in acidic vacuoles of Trypanosoma brucei. Biochem. J. 304, 227–233. https://doi.org/10.1042/bj3040227

Verma, A., Manchanda, S., Kumar, N., Sharma, A., Goel, M., Banerjee, P.S., Garg, R., Singh, B.P., Balharbi, F., Lejon, V., Deborggraeve, S., Singh Rana, U.V., Puliyel, J., 2011. Trypanosoma lewisi or T. lewisi-like Infection in a 37-Day-Old Indian Infant. Am. J. Trop. Med. Hyg. 85, 221–224. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0002

Vickerman, K., 1985. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. Br. Med. Bull. 41, 105–114. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072036

Vickerman, K., Tetley, L., Hendry, K.A., Turner, C.M., 1988. Biology of African trypanosomes in the tsetse fly. Biol. Cell 64, 109–119. https://doi.org/10.1016/0248-4900(88)90070-6

Videau, D., Niel, G., Siboulet, A., Catalan, F., 1978. Secnidazole. A 5-nitroimidazole derivative with a long half-life. Br J Vener Dis 54, 77–80. https://doi.org/10.1136/sti.54.2.77

Vincendeau, P., Gobert, A.P., Daulouède, S., Moynet, D., Mossalayi, M.D., 2003. Arginases in parasitic diseases. Trends Parasitol. 19, 9–12. https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)00010-7

Vincent, I.M., Creek, D., Watson, D.G., Kamleh, M.A., Woods, D.J., Wong, P.E., Burchmore, R.J.S., Barrett, M.P., 2010. A Molecular Mechanism for Eflornithine Resistance in African Trypanosomes. PLoS Pathog. 6, e1001204. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001204

Viodé, C., Bettache, N., Cenas, N., Krauth-Siegel, R.L., Chauvière, G., Bakalara, N., Périé, J., 1999. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. Biochem. Pharmacol. 57, 549–557. https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00324-4

Wagner, T., 1971. Physical Studies on the Interaction of Lysergic Acid Diethylamide and Trypanocidal Dyes with DNA and DNA-Containing Genetic Material, in: Proceedings of the Research Symposium on Complexes of Biologically Active Substances with Nucleic Acids and Their Modes of Action. pp. 152–162.

BY-NC-ND

Wall, R.J., Rico, E., Lukac, I., Zuccotto, F., Elg, S., Gilbert, I.H., Freund, Y., Alley, M.R.K., Field, M.C., Wyllie, S., Horn, D., 2018. Clinical and veterinary trypanocidal benzoxaboroles target CPSF3. PNAS 115, 9616–9621. https://doi.org/10.1073/pnas.1807915115

Wamwiri, F.N., Changasi, R.E., 2016. Tsetse Flies (Glossina) as Vectors of Human African Trypanosomiasis: A Review. Biomed. Res. Int. 2016, 6201350. https://doi.org/10.1155/2016/6201350

Waring, M.J., 1965. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. J. Mol. Biol. 13, 269–282. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80096-1

Watanabe, A., Mayumi, K., Nishimura, K., Osaki, H., 2016. In vivo use of the CYP inhibitor 1-aminobenzotriazole to increase long-term exposure in mice. Biopharmaceutics & Drug Disposition 37, 373–378. https://doi.org/10.1002/bdd.2020

Welburn, S.C., Picozzi, K., Fèvre, E.M., Coleman, P.G., Odiit, M., Carrington, M., Maudlin, I., 2001. Identification of human-infective trypanosomes in animal reservoir of sleeping sickness in Uganda by means of serum-resistance-associated (SRA) gene. The Lancet 358, 2017–2019. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)07096-9

Wenzler, T., Boykin, D.W., Ismail, M.A., Hall, J.E., Tidwell, R.R., Brun, R., 2009. New Treatment Option for Second-Stage African Sleeping Sickness: In Vitro and In Vivo Efficacy of Aza Analogs of DB289. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 4185–4192. https://doi.org/10.1128/AAC.00225-09

Westland, J.L., Dorman, F.L., 2013. QuEChERS extraction of benzodiazepines in biological matrices. J. Pharm. Anal. 3, 509–517. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.04.004

WHO, 2013. Control and surveillance of human African trypanosomiasis: report of a WHO expert committee. World Health Organization, Switzerland.

WHO | 10th meeting of the Strategic and Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases [WWW Document], n.d. . WHO. URL http://www.who.int/neglected_diseases/events/tenth_stag/en/ (accessed 6.4.19).

WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis) [WWW Document], n.d. . WHO. URL http://www.who.int/chagas/en/ (accessed 9.5.19).

WHO | Human African trypanosomiasis [WWW Document], n.d. . WHO. URL http://www.who.int/trypanosomiasis_african/en/ (accessed 4.9.19).

WHO | Leishmaniasis [WWW Document], n.d. . WHO. URL http://www.who.int/leishmaniasis/en/ (accessed 6.3.19).

Wilkinson, S.R., Bot, C., Kelly, J.M., Hall, B.S., 2011. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. Curr. Top. Med. Chem. 11, 2072–2084. https://doi.org/10.2174/156802611796575894

Wilkinson, S.R., Taylor, M.C., Horn, D., Kelly, J.M., Cheeseman, I., 2008. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 5022–5027. https://doi.org/10.1073/pnas.0711014105

Williamson, J., 1976. Chemotherapy of African trypanosomiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 70, 117–119. https://doi.org/10.1016/0035-9203(76)90166-8

Winkelmann, E., Raether, W., Gebert, U., Sinharay, A., 1977. Chemotherapeutically active nitro compounds. 4. 5-Nitroimidazoles (Part I). Arzneimittelforschung 27, 2251–2263.

Wyllie, S., Foth, B.J., Kelner, A., Sokolova, A.Y., Berriman, M., Fairlamb, A.H., 2016. Nitroheterocyclic drug resistance mechanisms in Trypanosoma brucei. J. Antimicrob. Chemother. 71, 625–634. https://doi.org/10.1093/jac/dkv376

BY-NC-ND

Yang, J., Liao, M., Shou, M., Jamei, M., Yeo, K.R., Tucker, G.T., Rostami-Hodjegan, A., 2008. Cytochrome p450 turnover: regulation of synthesis and degradation, methods for determining rates, and implications for the prediction of drug interactions. Curr. Drug Metab. 9, 384–394. https://doi.org/10.2174/138920008784746382

Yanto, Y., Hall, M., Bommarius, A.S., 2010. Nitroreductase from Salmonella typhimurium: characterization and catalytic activity. Org. Biomol. Chem. 8, 1826–1832. https://doi.org/10.1039/B926274A

Yapi, A.-D., Valentin, A., Chezal, J.-M., Chavignon, O., Chaillot, B., Gerhardt, R., Teulade, J.-C., Blache, Y., 2006. In Vitro and in Vivo Antimalarial Activity of Derivatives of 1,10-Phenanthroline Framework. Archiv der Pharmazie 339, 201–206. https://doi.org/10.1002/ardp.200500246

Yaro, M., Munyard, K.A., Stear, M.J., Groth, D.M., 2016. Combatting African Animal Trypanosomiasis (AAT) in livestock: The potential role of trypanotolerance. Vet. Parasitol. 225, 43–52. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.003

Zahler, A.M., Williamson, J.R., Cech, T.R., Prescott, D.M., 1991. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. Nature 350, 718–720. https://doi.org/10.1038/350718a0

Zeldin, R.K., Petruschke, R.A., 2004. Pharmacological and therapeutic properties of ritonavir-boosted protease inhibitor therapy in HIV-infected patients. J. Antimicrob. Chemother. 53, 4–9. https://doi.org/10.1093/jac/dkh029

Zhang, Juanhong, Zhang, Junmin, Wang, R., 2018. Gut microbiota modulates drug pharmacokinetics. Drug Metab. Rev. 50, 357–368. https://doi.org/10.1080/03602532.2018.1497647

Zillmann, U., Albiez, E.J., 1986. The Testryp CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis): a field study on gambiense sleeping sickness in Liberia. Trop. Med. Parasitol. 37, 390–392.

BY-NC-ND

Annexes

Annexe 1. Méthode de validation pour l'étude de pharmacocinétique de la molécule 76.....342
Annexe 2. Méthode de validation pour l'étude de pharmacocinétique des molécules 41 et 120 .344
Annexe 3. Article : Identification of metabolites derived from the anti-trypanosomal drug megazol 345

BY-NC-ND

Annexe 1. Méthode de validation pour l'étude de pharmacocinétique de la molécule 76

Une phase d'optimisation des différents paramètres chromatographiques et spectrométriques a été initialement réalisée. Le composé 76 et le mégazol, utilisé comme standard interne, ont été séparés sur une colonne EC-C8 (Poroshell 120, 2,1 mm x 75 mm, 2,7 µM; Agilent) chauffée à 60°C grâce à un gradient d'élution de 8 min avec les phases mobiles (A) H_2O avec 0,1% d'acide acétique et (B) 50% acétonitrile 50% méthanol contenant 0,1% d'acide acétique. La méthode a été développée sur une gamme de concentration de 10 ng/mL (LDQ) à 1000 ng/mL avec 2 contrôles qualité à 75 (LQC) et 625 ng/ml (HQC).

Jour	**Linéarité + incertitude** n = 5	**Répétabilité** n = 5	**Reproductibilité** n = 5	**Rendements** n = 3	**Épreuves de dilution** n = 3
1	Gamme (9pts)	LDQ × 5	LDQ × 1 LQC × 1 HQC × 1	LDQ × 3	
2	Gamme (9pts)	LQC × 5	LDQ × 1 LQC × 1 HQC × 1	LQC × 3	
3	Gamme (9pts)	HQC × 5	LDQ × 1 LQC × 1 HQC × 1	HQC × 3	
4	Gamme (9pts)		LDQ × 1 LQC × 1 HQC × 1		
5	Gamme (9pts)		LDQ × 1 LQC × 1 HQC × 1		5000 ng/ml dilution 1/10 × 3 20000 ng/ml dilution 1/10 × 3 20000 ng/ml dilution 1/40 × 3
Critère d'acceptabilité	$r^2 \geq 0,99$	CV ≤ 20% Biais ≤ 20%	CV ≤ 20% Biais ≤ 20%	Rendement > 50% CV ≤ 20%	Biais ≤ 20%

Paramètres testés :

- **Linéarité :** chaque jour, la courbe de calibration est construite en reportant les ratios d'aires composé / standard interne par rapport aux concentrations théoriques. Dans notre analyse, la régression utilisée est une régression quadratique avec un facteur de poids $1/x^2$. Il faut que le coefficient de détermination r^2 soit supérieur à 0,99 pour chaque série de validation.

BY-NC-ND

- **Précision et Exactitude**. La précision permet de savoir à quel point les valeurs expérimentales sont proches les unes des autres et est définie par le calcul du coefficient de variation (CV = écart type / moyenne $\times$ 100) lors des analyses de répétabilité (5 réplicats le même jour) et de reproductibilité (1 réplicat par jour pendant 5 jours). L'exactitude permet de déterminer à quel point les valeurs expérimentales sont proches de la valeur théorique et correspond au pourcentage de déviation entre les valeurs théorique et expérimentales. La précision (CV) et l'exactitude (biais) pour la limite basse de quantification (10ng/ml) et pour les 2 contrôles qualité en répétabilité et reproductibilité doivent être inférieures à 20%.

- **Intervalle de mesure**. La limite basse de quantification (LDQ) correspond à la concentration minimale pour laquelle la précision et l'exactitude (répétabilité et reproductibilité) sont inférieures à 20%, soit le point le plus faible de la gamme. La limite de détection (LDD) correspond à la concentration pour laquelle le signal obtenu pour le composé JP1079 est supérieur à 3 fois le bruit de fond.

- **Rendement**. Les rendements d'extraction sont déterminés en comparant les répétabilités (n=5) de la limite basse de quantification et des contrôles qualité avec des échantillons surchargés après extraction à la concentration attendue si 100% de rendement d'extraction (n=3). Le rendement doit être supérieur à 50% avec un CV inférieur à 20%.

- L'**effet dilution** a été étudié (n=3) à 2 niveaux de concentrations (5000ng/ml et 20 000 ng/ml) avec 2 dilutions (au dixième et au quarantième). Ce paramètre est validé si le biais entre valeur théorique et moyenne des valeurs expérimentales est inférieur à 20%.

- L'**effet mémoire (ou contamination inter-échantillons)** a été testé en injectant de l'eau juste après le point le plus élevé de la gamme (1000ng/ml) et en vérifiant l'absence de signal pour le composé JP1079 et le standard interne. Cette évaluation se fait après chaque gamme.

- La **sélectivité** a été évaluée par l'analyse de différents échantillons de sang total vierge en vérifiant l'absence de signal pour les composés analysés.

- La **spécificité** a été testée en surchargeant du sang total vierge et en vérifiant que le signal détecté est spécifique des composés analysés.

BY-NC-ND

Annexe 2. Méthode de validation pour l'étude de pharmacocinétique des molécules 41 et 120

La méthode a été développée sur une gamme de concentration de 5 ng/mL (LDQ) à 1000 ng/mL avec 3 contrôles qualité à 10 (LQC), 75 (MQC) et 625 ng/ml (HQC).

Série	Linéarité + incertitude n ≥ 5	Répétabilité n ≥ 5	Reproductibilité n ≥ 5	Rendements	Épreuves de dilution
1	Gamme (10pts)	LDQ × 5	LDQ × 1 LQC × 1 MQC × 1 HQC × 1	LDQ × 3	
2	Gamme (10pts)	LQC × 5	LDQ × 1 LQC × 1 MQC × 1 HQC × 1	LQC × 3	
3	Gamme (10pts)	MQC × 5	LDQ × 1 LQC × 1 MQC × 1 HQC × 1	MQC × 3	
4	Gamme (10pts)	HQC × 5	LDQ × 1 LQC × 1 MQC × 1 HQC × 1	HQC × 3	
5	Gamme (10pts)		LDQ × 1 LQC × 1 MQC × 1 HQC × 1		MQC dilution 1/1,25 × 3 MQC dilution 1/2 × 3 MQC dilution 1/4 × 3 HQC dilution 1/1,25 × 3 HQC dilution 1/2 × 3 HQC dilution 1/4 × 3
Critère d'acceptabilité	$r^2 \geq 0,99$	CV ≤ 20% Biais ≤ 20%	CV ≤ 20% Biais ≤ 20%	Rendement > 50% CV ≤ 20%	Biais ≤ 20%

BY-NC-ND

Annexe 3. Article : Identification of metabolites derived from the anti-trypanosomal drug megazol

BY-NC-ND

Identification of metabolites derived from the anti-trypanosomal drug megazol

C. Boudot[a,*], E. Pinault[b], E. Lebrault[a], J. Bonnet[a], V. Sol[c], and B. Courtioux [a]

[a] INSERM, Univ. de Limoges, CHU Limoges, UMR 1094, Tropical Neuroepidemiology, Institute of Epidemiology and Tropical Neurology, GEIST, Facultés de Médecine et de Pharmacie, 2 rue du Docteur Raymond Marcland, 87000 Limoges, France

[b] Univ. de Limoges, BISCEm Mass Spectrometry Platform, CBRS, 2 rue du Pr. Descottes, F-87025 Limoges, France

[c] Univ. de Limoges, Laboratoire PEIRENE EA 7500, Faculté des Sciences et Techniques, 123 avenue Albert Thomas, F-87060 Limoges, France

Abbreviations: HR-MS, High-Resolution Mass Spectrometry

[*] Corresponding author : address: Clotilde BOUDOT, Faculté de Pharmacie, 2, rue du Dr Raymond Marcland, 87025 Limoges cedex, FRANCE, E-mail address: clotilde.boudot@unilim.fr (C. Boudot)

E-mail addresses: clotilde.boudot@unilim.fr (C. Boudot), emilie.pinault@unilim.fr (E. Pinault), eden.lebrault@unilim.fr (E. Lebrault), julien.bonnet.tlse@gmail.com (J. Bonnet), vincent.sol@unilim.fr (V. Sol), bertrand.courtioux@unilim.fr (B. Courtioux)

Abstract

BACKGROUND: African Trypanosomiasis is an endemic vector-borne parasitic disease in sub-Saharan Africa. It is caused by different parasites of the genus *Trypanosoma* and is transmitted through a tsetse fly (*Glossina sp*.) bite during a blood meal. This neglected tropical disease remains difficult to control due to the complexity of treatment protocols and use of toxic drugs. Over the decades, nitroimidazole compounds have been promising molecules for anti-parasite therapy. One of them, megazol, has proven to be an effective anti-trypanosomal drug, but interest dropped after reports were published concerning its mutagenic properties.

OBJECTIVES: We therefore decided to characterize and identify megazol metabolites, with the hypothesis that they could be less toxic.

METHODS: We treated groups of mice with different derivatives and then detected metabolites by high performance liquid chromatography combined with mass spectrometry in urine, feces, and plasma samples from mice.

FINDINGS: *In vivo* results showed that eleven metabolites were detected in urine (M1 to M11); six metabolites were detected in plasma (M1a/b, M2a/b, M5, M7a/b M9, andM10a/b) and in feces, only two (M1 a/b and M5) were found.

MAIN CONCLUSIONS: The structures of metabolites were deduced using chromatograms and mass spectra data combined with usual metabolic patterns.

Keywords: megazol, metabolites, HPLC-MS/MS, mice fluids

1. Introduction

African Trypanosomiasis is an endemic Neglected Tropical Disease in 36 sub-Saharan Africa countries. It is a zoonosis, called either Human African Trypanosomiasis (HAT) or Animal African Trypanosomiasis (AAT). The disease is transmitted by the bite of a tsetse fly and different *Trypanosoma* species can cause pathology. Both disease forms are fatal if left untreated [1]. For HAT, 2 subspecies are responsible for 2 different disease forms: (*i*) Gambian sleeping sickness corresponds to an infection by *Trypanosoma brucei (T. b.) gambiense*, characterized by chronic disease with the average infection lasting around 3 years, and (*ii*) Rhodesian sleeping sickness corresponds to an infection by *T. b. rhodesiense*, characterized by an acute disease in which death can occur within weeks of infection. The infection progresses from the haemolymphatic stage where parasites spread to the lymphatics, blood, and peripheral organs, to the late encephalitic stage where parasites invade the central nervous system (CNS) to cause a serious meningo-encephalitis that can result in death. For AAT, there is a diversity of parasites and animals, but the symptomatology is the same [2].

Until 2018, chemotherapy for HAT relied on five drugs including 2 drugs (Suramin, Pentamidine) that are active in the early disease stage and 3 drugs (Melarsoprol, Eflornithine and Nifurtimox–Eflornithine combination therapy (NECT)) that are effective during CNS invasion. These drugs are available for patients through a donation from SANOFI (a global biopharmaceutical company focused on human health), but there are still many drawbacks to their use. The main drawbacks are: (1) high toxicity for the hosts, which is mainly due to their poor selectivity for parasite cells compared to mammalian cells; (2) route of administration (intramuscular or intravenous injections); (3) very narrow anti-trypanosomal spectrum; and (4) high cost of hospitalization [3]. Overall, although active, these drugs are not ideal for use in rural settings, drug resistances are spreading and there is a need for an oral form of a drug that

could be used for both disease stages. Clearly, improved chemotherapy with better selectivity for trypanosomes is needed to control this disease. Unfortunately, very few new drugs were proposed; only two candidates were selected. Fexinidazole, 2-substituted 5-nitroimidazole, belonging to the nitroimidazole class of drugs, exhibits trypanocidal properties, and has the potential to become a safe, short-course oral treatment for both HAT stages [4]. Its *in vivo* activity is most likely due to its two major metabolites, oxide and sulfone [5]. The other potential candidate, Acoziborole or SCYX-7158 has proven highly effective as a single dose oral treatment for both HAT stages [6] and is in phase 2 of clinical trials [7]. Since November 2018, the European Medicines Agency (EMA) agency recommends the approval of fexinidazole as the first line of treatment by oral administration against *T.b.g* [7], but nothing has been proposed against *T.b.r*. For AAT, the therapy is old and numerous resistances occur, but no new treatment exists. It is important to develop new medications to treat HAT and AAT to reduce cases of resistance and work towards the elimination of the disease.

Among nitro-heterocyclic compounds known for their anti-trypanosomal activity and their abilities to be selectively activated by parasitic nitroreductases (NTRs) to generate cytotoxic metabolites, megazol, was a promising compound that diffused easily into the CNS and could be used orally. However, its development was discontinued due to reports of *in vitro* mutagenicity [8], and genotoxicity [9] [10], but its pharmacological mechanism of action still remains. In fact we only know that trypanocidal and mutagenic effects of megazol are due to the parent drug and/or its metabolites [11]. The few tests done on 3 *Salmonella* strains with murine plasma and urine containing metabolites of megazol showed that two were mutagenic in plasma and three in urine, suggesting that megazol metabolites present in the systemic circulation and in urine might differ and be associated with different effects. Recently, Enanga *et al.* [12] found 4 different metabolites of megazol in primate urine, but further identification could not be performed.

The aim of the present was to determine megazol metabolites and, notably, characterize these metabolites in biological fluids of mice for futures studies.

2. Materials/Methods

2.1. Animals and protocol administration

Twenty-five female mice (weighing 30g) were clinically healthy 1 month prior to experimentation.

(i) The first group (n = 10) was treated with a suspension of ^{13}C megazol. It was administered *per os* in a 50 µL final volume of an aqueous solution of 2% low viscosity carboxymethylcellulose (Merck, Germany) at a dose of 60 mg/kg body weight. ^{13}C-megazol was used to control the structure of detected metabolites.

(ii) The second group (n = 10) was treated by the same dose of unlabeled megazol.

(iii) The third group (n = 5) only received the suspension of carboxymethylcellulose without megazol. It is used like a control.

All animals were kept under the same conditions according to laboratory animal care guidelines (European convention SPE123). The Ethical Committee of Limousin approved all the procedures. The number of mice is established with the 3R (Reduce, Replace, Refine) principle for the animal experimentation.

Megazol (CAS: 19622-55-0) powder was synthesized as previously described [13] [14].

2.2. Sample collection

Urine and feces were collected from a metabolism cage (Tecniplast® Italy). These samples were gathered prior to treatment, after megazol administration to animals on the first 12h and then for the last 12 h (a total of 24 h). For each group, urines and feces of all mice were pooled to generate a single sample and were stored at -20°C until analysis. Blood samples (0.5 mL) were collected by sinus retro-orbital puncture prior to treatment and 3h after first and last administration of megazol to animals. Blood was immediately centrifuged at 1630×*g* for 10 min at 5°C to obtain the serum samples.

2.3. Sample extraction for megazol metabolites

We optimized an extraction method previously established by Enanga *et al.* [15], replacing dichloromethane solvent by butan-2-ol in order to obtain better metabolite recovery. Urine (100 µL) was vortexed with 20 µL NaOH (1N, AVS Titrinorm®; Fontenay-sous-Bois, France) then left to stand 5 min. Butan-2-ol (5mL)(Prolabo Rhone Poulenc, Paris, France) were added and the mixture was kept under rotary stirring (25 rpm, 65°C; Rotator SB3, Stuart®, Stone, Staffordshire, United Kingdom) for 20 min and then centrifuged for 10 min at 3 500 rpm. The homogeneous liquid was further collected (alkaline extract) and the precipitate underwent an acid extraction by the addition of 65 µL HCl (1N AVS TITRINORM®, Fontenay-sous-Bois, France) followed by vortexing. Samples were then left to stand for 5 min and 5 mL of butan-2-ol were added, kept under rotary stirring for 20 min, centrifuged 10 min, and the non-precipitated acid extract was transferred. The alkaline and acid extracts were evaporated to dryness using a Speed-Vac® (Thermo-Fisher, Les Ulis, France) and reconstituted in 100 µL methanol/water/acetic acid (50:50:0.1 v/v/v) by vortex agitation, just before liquid chromatography / mass spectrometry (LC-MS) analysis. For feces, the same protocol was used, with the first step consisting of adding water to dissolve feces and vortexing the product to homogenize the samples.

For the MRM method, we used the same extraction method except that we added 20 µL internal standard (Metronidazole (a nitro-heterocyclic family) at 25 ng/µL in methanol) to 100 µL initial samples.

2.4. Detection of megazol metabolites by reverse-phase chromatography MS/MS

The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) system consisted of a Shimadzu LC 10 ADvp pump with an SIL-Ht autoinjector and a CTO-10ASvp column oven. Chromatographic separation was performed on a Nucleosil C18 column (125 x 2.1 mm i.d., 100Å-5 µm, Macherey-Nagel; Germany). The flow rate was 0.2 mL/min. The mobile phase was a gradient of 0.1 % acetic acid in water (A) and 0.1 % acetic acid in methanol (B) programmed as follows: initial, 5 % B, increased to 50 % in 19 min, then increased to 100 % B in 1.5 min, maintained at 100 % for 2.5 min, and finally, decreased to 5% B in the last 10.5 min. The injection volume was 20 µL except for samples prepared from urine (3 µL).

Exploration and detection were carried out with a 4 000 QTRAP hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer (SCIEX, Framingham, MA, USA) equipped with a Turbo Ion Spray electrospray ionization (ESI) source and controlled by the Analyst software version 1.6.2 (SCIEX). Ionization was achieved with electrospray in the positive ionization mode with the following settings: ion spray voltage, 5 500 V; curtain gas, 15 arbitrary units; ion source gas 1 and 2, 20 and 30 arbitrary units, respectively; collision cell exit potential, 16 V; declustering potential, 46 V. The settings of the GUS (General Unknown Screening) procedure were previously reported in details, [16] [17], [18]. Briefly, acquisition was performed in the IDA (Information-Dependent Acquisition) mode, in which MS/MS continuously switched between a survey scan acquired in the enhanced-MS mode and up to three dependent scans obtained in the enhanced product ion (EPI) scan mode.

Detection of the putative metabolites was carried out using the PeakView 2.2 software (SCIEX). The total ion current chromatogram of urine samples collected from mice receiving 60 mg/kg megazol was compared to that of the controls (0 mg/kg megazol) for additional peaks. Potential metabolites were named **M1** to **M11** according to their retention time and major fragments (n = 2-3) were selected for each metabolite. Collision energy (CE) settings were automatically optimized for megazol and metronidazole (SI) transitions and were set at 35 or 50 V, depending on the metabolite transitions. The MRM transitions of metronidazole (Internal Standard), megazol and potential metabolites were simultaneously monitored in the urines of the megazol (60 mg/kg) and control group in parallel for confirmation.

The same protocol was used with feces and blood.

The same protocol was used with ^{13}C-megazol to confirm the presence of metabolites with a mass delta +1 (Δ+1) for each compound.

2.5. Confirmation of the raw formula of putative metabolites by micro-LC QTOF

Urine samples were analysed by microLC-MS/MS using a nanoLC 425 in a micro-flow mode (Eksigent, Dublin, CA) system coupled with a TripleTOF 5 600+ (SCIEX, Framingham, MA). The chromatography was performed on a HALOfused C18 column (50 x 0.5 mm i.d., 2.7 µm; SCIEX) at a 20 µL/min flow rate. The mobile phase was water/acetonitrile/formic acid 95:0:0.1 v/v/v (A) and 5:95:0.1 v/v/v (B) gradient programed as follows: initial, 5 % B, increased to 50 % in 16 min, then increased to 95 % B in 2 min, maintained at 95 % for 3 min, and finally, decreased to 5 % B for reequilibration.

The TTOF 5 600+ was operated in an information-dependent acquisition (IDA) mode with Analyst 1.7TF software (SCIEX). MS and MS/MS data were continuously recorded with up to 15 precursors selected for fragmentation from each MS survey scan. Precursor selection was based upon ion intensity and whether or not the precursor had been previously selected for fragmentation (dynamic exclusion). Collision energies were set at 40 ± 15 eV.

Both molecular formula identification and structure elucidation were performed using the latest Sirius software (Version 4.0.1, https://bio.informatik.uni-jena.de/sirius/). First, megazol and metabolite high resolution MS/MS spectra were converted to a text file containing fragment *m/z* and intensities. The top 10 best formulas with a tolerance of 20 ppm and minimum 5 nitrogen atoms were retained for structural elucidation.

3. Results and discussion

3.1. Identification of megazol metabolites

After extraction by butan-2-ol in either alkaline medium for the majority or acid medium for the rest, fifteen megazol metabolites were detected in mice urine by the GUS method and confirmed by MRM on control and megazol groups (Figure 1). The same protocol, used with ^{13}C-megazol, had shown all metabolites with a Δ mass+1 corresponding to the presence of one ^{13}C in the megazol structure which confirmed they were related to megazol.

Once the metabolites of interest were identified and confirmed by the shift of mass due to the ^{13}C, Sirius software used MS/MS data to propose elemental composition and fragmentation pathways for the top 10 best results. Structural formula were proposed according to Sirius results and to specific neutral loss on MS/MS spectra and confronted to fragmentation patterns

of structural formula generated using Mass Frontier 8.0 (Thermo Electron, San Jose, CA). Comparisons between theoretical and experimental fragmentation spectra further aided in the identification of metabolite structures and site(s) of biotransformation with the parent megazol.

Some fragmentation losses that are characteristic of nitroimidazole compounds are the following: $[M-16]^+$ corresponds to –O loss; $[M+H-30]^+$ to –NO loss; $[M+H-46]^+$ to $–NO_2$ loss; $[M+H-47]^+$ to $–HNO_2$ loss; and $[M+H-73]^+$ to $–NO_2–HCN$ loss.

According to MS losses and chromatographic mobility obtained with the 4000QTRAP, the metabolites were produced via one to three combined biotransformations targeting four preferred sites $-NH_2$, $-CH_3$, and $-NO_2$ with or without involvement of the imidazolyl-conjugated π-bond.

3.1.1. Megazol [m/z 227]

The fragmentation spectrum of megazol was established by infusing pure compound. The drug at *m/z* 227 ($[M+H]^+$) with an elemental composition of $C_6H_6N_6O_2S$ H^+ eluted at 17.8 min. The MS/MS spectrum of $[M+H]^+$ megazol displays the signature fragmentation pattern of nitroimidazole compounds ($[M-16]^+$, $[M+H-30]^+$, $[M+H-46]^+$, $[M+H-47]^+$, $[M+H-73]^+$). Sirius computation proposed megazol molecular formula as TOP 1 result with a 90.7% score, explaining 47 over 60 peaks and 93.5% of total ions intensities. After confronting Sirius and Mass Frontier results, we really assigned 58% of global ion intensities of megazol MS/MS spectrum (Figure 2).

3.1.2. Megazol metabolites

Table 1 lists the detailed information of these metabolites, including retention times, proposed elemental compositions, and mass errors (table 1). Spectra obtained from low and high-resolution mass spectrometry for each compound can be found in Supplementary Table.

Metabolites **M3**, **M9** and **M11** were generated by modifications targeting a single site of the parent drug.

M9 was characterized by $[M+H]^+$ *m/z* 213, corresponding to a difference of 14 Da with megazol $[M+H]^+$ *m/z* 227, generally associated with a demethylation. Such a structure was in full agreement with the reverse phase HPLC elution order, pointing to a higher mobility for **M9** (T_r 13.9 min), more polar than the parent compound (T_r 17.8 min) which was obviously slowed down by the original methyl group. The MS/MS spectrum of **M9** at *m/z* 213 $[M+H]^+$ showed the presence of nitroimidazole-specific product ions ($[M-16]^+$, $[M+H-46]^+$, $[M+H-47]^+$, $[M+H-73]^+$) and like megazol, *m/z* 127. The elemental composition of *m/z* 213 proposed by Sirius was $C_5H_4N_6O_2S$ H^+ with an error of -11.4ppm and 85% of total ion intensities were assigned comparing with Mass Frontier.

QTRAP data suggested that **M3** and **M11** $[M+H]^+$ *m/z* 243 could be structural isomers, but HR-MS data did not corroborate this hypothesis as the exact masses were too different (162.9ppm).

M3 was characterized by $[M+H]^+$ *m/z* 243, corresponding to a difference of 16 Da with megazol $[M+H]^+$ *m/z* 227 induced by an extra hydroxyl group. In comparison with megazol and **M9**, **M3** (T_r 7.6 min) was eluted faster, must have distant OH and NH_2 polar groups to enhance aqueous solvation, so we proposed that **M3** was hydroxylated on the methyl group. The MS/MS spectrum of M3 at $[M+H]^+$ *m/z* 243 showed some nitroimidazole-specific fragments ($[M+H-46]^+$, $[M+H-47]^+$ and $[M+H-73]^+$) and highly abundant product ions at *m/z* 226 $[M+H-OH]^+$,

m/z 168 and low abundance product ions at *m/z* 141. The elemental composition of **M3** *m/z* 243 proposed from HR-MS spectrum was $C_6H_6N_6O_3S\ H^+$ with an error of -9.4ppm.

M11 which had the same $[M+H]^+$ *m/z* 243 with a T_r 15.5 min, eluted more slowly than **M9** and **M3**, meaning **M11** was less polar than the two others. The MS/MS spectrum of **M11** at *m/z* 243 $[M+H]^+$ showed product ions at *m/z* 228, *m/z* 213 ($[M+H-30]^+$), *m/z* 186, *m/z* 157. Its elemental composition proposed from HR-MS spectrum was $C_7H_{10}N_6O_2S\ H^+$ with an error of 3.8ppm.

Currently, conjugation reactions occurring with glucuronic acid, serine, alanine and acetic acid resulted in eleven metabolites: **M1a,b**, **M2a**,**b**, **M4**, **M5**, **M6**, **M7a**,**b, M8**, and **M10a,b**.

M2a,**b** $[M+H]^+$ *m/z* 403 and **M7a**,**b** $[M+H]^+$ *m/z* 419, each exhibited an abundant daughter ion $[M+H-176]^+$ arising from the characteristic neutral loss of anhydroglucuronic acid or equivalent. The *m/z* 227 $[M+H-176]^+$ for glucuronides **M2a**,**b** corresponded to a protonated megazol moiety yielding, as did megazol itself, the same lower fragment ion pattern. As the parent drug offers only the outer amino group to conjugation, the two isomers –major **M2a** and minor **M2b–** would appear to differ through the major pyrano- and the minor furanoglucuronyl parts. With 16 Da more, **M7a**,**b** were also deduced to be the pyrano- and the furano-glucuronides derived from one of the two reported metabolites **M3** or **M11** with $[M+H-176]^+$ *m/z* 243. **M3** was selected according to the significant $[M+H-176-17]^+$ *m/z* 226 and the low fragmentation pattern. Attachment of the glucuronyl unit could occur on the amino or hydroxymethyl groups. As **M7a,b** had a lower mobility (**M7a**: T_r 11.7 min; **M7b**: T_r 14.4 min) when compared to that of **M2a,b** (**M2a**: T_r 6.9 min; **M2b**: T_r 11.8 min), attachment to the hydroxymethyl group was discarded because, with an additional free OH group, **M7a**,**b** should have been more polar than glucuronides **M2a**,**b**. The elementary composition proposed from HR-MS data was $C_{12}H_{14}N_6O_8S\ H^+$ with an error of -1.9ppm for **M2** and $C_{12}H_{14}N_6O_9S\ H^+$ with an error of -1,4ppm for **M7**.

Metabolites **M4** $[M+H]^+$ *m/z* 316 (T_r 10.7 min) and **M8** $[M+H]^+$ *m/z* 358 (T_r 13 min) both showed the abundant daughter ion *m/z* 229 giving the same low fragmentation pattern in each case (*m/z* 227, *m/z* 196, *m/z* 168, *m/z* 141) which tended to prove that **M4** and **M8** belong to the same compound class. The presence of a minor fragment at *m/z* 316 $[M+H-42]^+$ on HR-MS spectrum of **M8** could imply that **M8** was an acetylated **M4**. The amino acid residue identified in the conjugation could be respectively serine ($[M+H-87]^+$ *m/z* 229) and acetylserine ($[M+H-42-87]^+$ *m/z* 229) for **M4** and **M8**, but the *m/z* 229 derivative of megazol was not identified. The elemental composition proposed from HR-MS data with the lowest error is $C_{14}H_{11}N_7O_3S\ H^+$ (7.6ppm) for **M8**. The precursor peak on HR-MS spectrum was too low for **M4** to be informative for elemental composition. However, using the minor fragment at *m/z* 316 on **M8** HR-MS spectrum, we suggested that the elemental composition of **M4** corresponded to $C_{12}H_9N_7O_2S\ H^+$ (16.7ppm).

Like **M4** and **M8**, isomer conjugates **M10a,b** $[M+H]^+$ *m/z* 343 (**a**, T_r 15.1 min and **b**, T_r 17.3 min) and **M6** $[M+H]^+$ *m/z* 301 (T_r 11.6 min) exhibited respectively a loss of acetylserine (-42-87 Da) and serine moiety (- 87 Da) resulting in the same abundant fragment *m/z* 214 (not identified). Both MS/MS spectrum showed product ions at *m/z* 255 $[\mathbf{M6}+H-NO_2]^+$, *m/z* 212, *m/z* 140. The elemental composition proposed from HR-MS data with the lowest error was $C_{14}H_{10}N_6O_3S\ H^+$ (7.3ppm) for **M10** and $C_{12}H_8N_6O_2S\ H^+$ (7.9ppm) for **M6**.

M5 $[M+H]^+$ *m/z* 239 (T_r 11.2 min) did not exhibit nitroimidazole-specific fragments, but a fragment at *m/z* 197 $[M+H-42]^+$, *m/z* 141, *m/z* 123. The elemental composition proposed from HR-MS spectrum with the lowest error (-7.8ppm) was $C_8H_{10}N_6OS\ H^+$. This composition with only one oxygen was in accordance with the absence of nitroimidazole-specific fragments. Metabolite **M5** was tentatively identified as acetylated reduced megazol.

The metabolites **M1a/b** $[M+H]^+$ *m/z* 310 were detected at T_r 6.7 and 10.8 min. The MS/MS spectrum of **M1** was more informative from the ^{13}C-analysis at *m/z* 311 $[^{13}C\text{-}M+H]^+$ and showed a highly abundant product ion at $[M+H-71]^+$, and low abundant product ions probably corresponding to low mass fragmentation of **M5**. This could suggest some parenthood between **M5** and **M1**, which differed from a mass of 71 Da, potentially corresponding to alanine loss. The precursor peak on HR-MS spectrum was too low for **M1** to be informative for elemental composition, but considering the possible parenthood between **M5** and **M1**, we could propose $C_{11}H_{15}N_7O_2S\ H^+$, corresponding to an alanine conjugate of acetylated reduced megazol, but the accurate site of conjugation could not be confirmed

As a result, the reported megazol metabolites found in mouse urine were formed via either a single biotransformation or two combined biotransformations and even three.

In parallel with the analysis of megazol metabolites in mouse urine, the same analysis was conducted in feces and serum samples. The results showed fifteen metabolites (**M1** to **M11**) in urine, five metabolites in serum and two metabolites in feces (table 2).

4. Conclusion & prospects

Although the chemical configuration (imidazole and thidazole cycles) is rigid, the fragmentation of megazol is complex. For the first time, we identified, fifteen metabolites of megazol in Swiss mice urines by using micro LC-MS/MS and some of their structures were elucidated based on the fragmentation patterns. Among these compounds, some of them could be phase I metabolites with oxidation or reduction of some groups, and the others with glucuronidate addition could be phase II metabolites. The structural identification of these

metabolites might provide essential information about the toxicity and activity of megazol. Their role must be elucidated to provide prospects for a new, effective and convenient treatment where megazol has failed in African Trypanosomiasis.

Acknowledgments

The authors thank M. F.L. Sauvage, research engineer from IPPRITT Laboratory (U1248 Limoges), M. A. Mailleau, technician from BISCEm platform (GEIST Institute Limoges), Dr D. Buisson from the Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris), for facilities and their cooperation and advice and Dr J. Cook-Moreau from Limoges University for her English corrections and advice.

Sponsorships

This work was supported by grants from UMR INSERM 1094. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Declaration of interest:

All authors declare that they have no conflict of interest.

Authors contributions

Clotilde Boudot: conceptualization, formal analysis, investigation, methodology, roles/writing-original draft**, Emilie Pinault:** conceptualization, formal analysis, investigation, methodology, roles/writing-original draft**, Eden Lebrault:** conceptualization, investigation**, Julien Bonnet:** conceptualization**, Vincent Sol:** conceptualization, roles/writing-original draft**,** reviewing**, Bertrand Courtioux:** conceptualization, roles/writing-original draft**,** reviewing, funding acquisition.

References

[1] P. Büscher, G. Cecchi, V. Jamonneau, G. Priotto, Human African trypanosomiasis, Lancet Lond. Engl. (2017). https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31510-6.

[2] J.R. Franco, G. Cecchi, G. Priotto, M. Paone, A. Diarra, L. Grout, R.C. Mattioli, D. Argaw, Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis: Update to 2014, PLoS Negl. Trop. Dis. 11 (2017). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005585.

[3] WHO | Human African trypanosomiasis, WHO. (n.d.). http://www.who.int/trypanosomiasis_african/en/ (accessed April 9, 2019).

[4] E. Torreele, B. Bourdin Trunz, D. Tweats, M. Kaiser, R. Brun, G. Mazué, M.A. Bray, B. Pécoul, Fexinidazole--a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness, PLoS Negl. Trop. Dis. 4 (2010) e923. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000923.

[5] M. Kaiser, M.A. Bray, M. Cal, B. Bourdin Trunz, E. Torreele, R. Brun, Antitrypanosomal activity of fexinidazole, a new oral nitroimidazole drug candidate for treatment of sleeping

sickness, Antimicrob. Agents Chemother. 55 (2011) 5602–5608. https://doi.org/10.1128/AAC.00246-11.

[6] R.T. Jacobs, B. Nare, S.A. Wring, M.D. Orr, D. Chen, J.M. Sligar, M.X. Jenks, R.A. Noe, T.S. Bowling, L.T. Mercer, C. Rewerts, E. Gaukel, J. Owens, R. Parham, R. Randolph, B. Beaudet, C.J. Bacchi, N. Yarlett, J.J. Plattner, Y. Freund, C. Ding, T. Akama, Y.-K. Zhang, R. Brun, M. Kaiser, I. Scandale, R. Don, SCYX-7158, an orally-active benzoxaborole for the treatment of stage 2 human African trypanosomiasis, PLoS Negl. Trop. Dis. 5 (2011) e1151. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001151.

[7] About Sleeping Sickness | DNDi, Drugs Neglected Dis. Initiat. DNDi. (n.d.). https://www.dndi.org/diseases-projects/hat/ (accessed April 9, 2019).

[8] R.C. Ferreira, L.C. Ferreira, CL 64,855, a potent anti-Trypanosoma cruzi drug, is also mutagenic in the Salmonella/microsome assay, Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 81 (1986) 49–52.

[9] P. Poli, M. Aline de Mello, A. Buschini, R.A. Mortara, C. Northfleet de Albuquerque, S. da Silva, C. Rossi, T.M.A.D. Zucchi, Cytotoxic and genotoxic effects of megazol, an anti-Chagas' disease drug, assessed by different short-term tests, Biochem. Pharmacol. 64 (2002) 1617–1627.

[10] F. Nesslany, S. Brugier, M.-A. Mouriès, F. Le Curieux, D. Marzin, In vitro and in vivo chromosomal aberrations induced by megazol, Mutat. Res. 560 (2004) 147–158. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.02.013.

[11] M.A. de Morais Jr., R. de C.C. Ferreira, L.C. de S. Ferreira, Mutagenic activation of CL64,855, an anti-Trypanosoma cruzi nitroderivant, by bacterial nitroreductases, Genet. Mol. Biol. 21 (1998). https://doi.org/10.1590/S1415-47571998000400026.

[12] B. Enanga, J.M. Ndong, H. Boudra, L. Debrauwer, G. Dubreuil, B. Bouteille, G. Chauvière, C. Labat, M. Dumas, J. Périé, G. Houin, Pharmacokinetics, metabolism and

excretion of megazol in a Trypanosoma brucei gambiense primate model of human African trypanosomiasis. Preliminary study, Arzneimittelforschung. 50 (2000) 158–162. https://doi.org/10.1055/s-0031-1300182.

[13] G. Chauviere, B. Rousseau, F. Pillon, J. Perie, Synthesis of 2-amino-5-(1-methyl-5-nitro-[4-3H]-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole, J. Label. Compd. Radiopharm. 41 (1998) 47–51. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1344(199801)41:1<47::AID-JLCR52>3.0.CO;2-C.

[14] G. Chauvière, B. Bouteille, B. Enanga, C. de Albuquerque, S.L. Croft, M. Dumas, J. Périé, Synthesis and biological activity of nitro heterocycles analogous to megazol, a trypanocidal lead, J. Med. Chem. 46 (2003) 427–440. https://doi.org/10.1021/jm021030a.

[15] B. Enanga, C. Labat, H. Boudra, G. Chauvière, M. Keita, B. Bouteille, M. Dumas, G. Houin, Simple high-performance liquid chromatographic method to analyse megazol in human and rat plasma, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App. 696 (1997) 261–266.

[16] F.-L. Sauvage, F. Saint-Marcoux, B. Duretz, D. Deporte, G. Lachatre, P. Marquet, Screening of drugs and toxic compounds with liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry, Clin. Chem. 52 (2006) 1735–1742. https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.067116.

[17] F.-L. Sauvage, N. Picard, F. Saint-Marcoux, J.-M. Gaulier, G. Lachâtre, P. Marquet, General unknown screening procedure for the characterization of human drug metabolites in forensic toxicology: applications and constraints, J. Sep. Sci. 32 (2009) 3074–3083. https://doi.org/10.1002/jssc.200900092.

[18] N. Picard, D. Dridi, F.-L. Sauvage, N.A. Boughattas, P. Marquet, General unknown screening procedure for the characterization of human drug metabolites: Application to loratadine phase I metabolism, J. Sep. Sci. 32 (2009) 2209–2217. https://doi.org/10.1002/jssc.200900099.

Figures

Figure 1*. MRM method (A) used to detect the megazol (MGZ), its potential metabolites and the internal standard (IS, metronidazole) in control mice urines (B) and megazol (60mg/kg) mice urines (C)*

Figure 2*. Proposed fragmentation pathway of megazol*

Figure 1

A

Compound no.	t_R(min)	Q1 ions	Q3 ions	CE (V)	DP (V)
Metronidazole	9.1	172.0	128.0	21	46
SI			98.0	50	46
			82.0	35	46
Megazol	18.0	227.0	181.0	27	60
MGZ			197.0	25	60
			154.0	31	60
M1a	6.5	310.0	239.0	35	46
			197.0	35	46
			141.0	35	46
M2a	6.9	403.0	181.0	50	60
			269.0	35	60
			227.0	35	60
M3	8.5	243.0	226.0	35	60
			168.0	35	60
			141.0	35	60
M4	10.6	316.0	229.0	35	60
			196.0	50	60
			141.0	35	60
M1b	11.0	310.0	239.0	35	46
			197.0	35	46
			141.0	35	46
M5	11.2	239.0	197.0	50	60
			141.0	35	60
			123.0	50	60
M6	11.5	301.0	214.0	35	46
			255.0	35	46
			194.0	35	46
M7a	11.7	419.0	157.0	35	60
			243.0	35	60
			170.0	35	60
M2b	11.8	403.0	181.0	50	60
			269.0	35	60
			227.0	35	60
M8	13.2	358.0	141.0	35	60
			229.0	35	60
			196.0	35	60
M9	14.0	213.0	196.0	35	60
			167.0	35	60
			127.0	35	60
M7b	14.3	419.0	157.0	35	60
			243.0	35	60
			170.0	35	60
M10a	15.2	343.0	214.0	35	60
			140.0	35	60
M11	15.4	243.0	228.0	35	60
			213.0	35	60
			157.0	35	60
M10b	17.2	343.0	214.0	35	60
			140.0	35	60

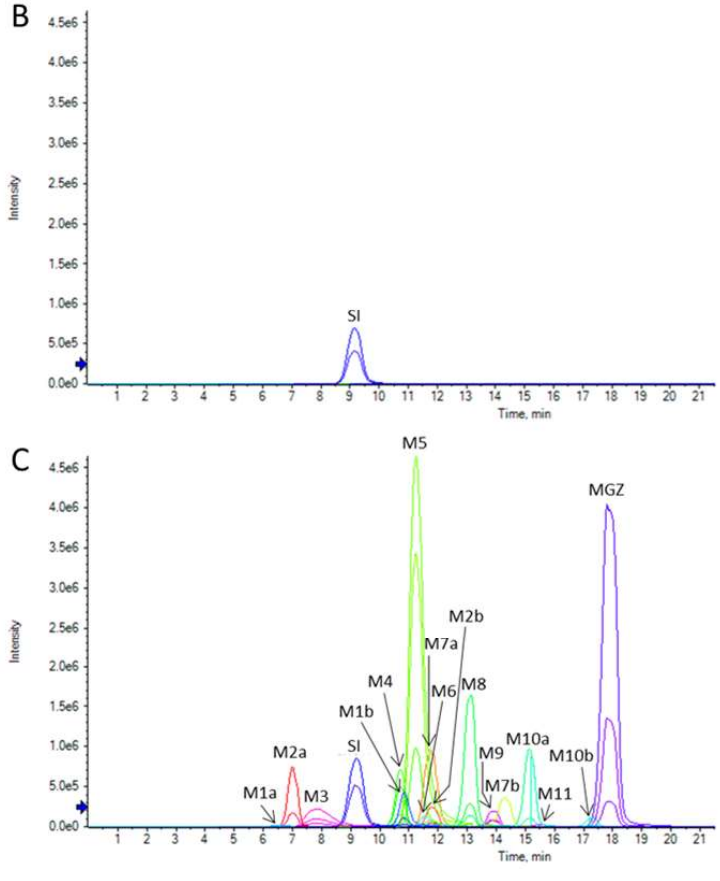
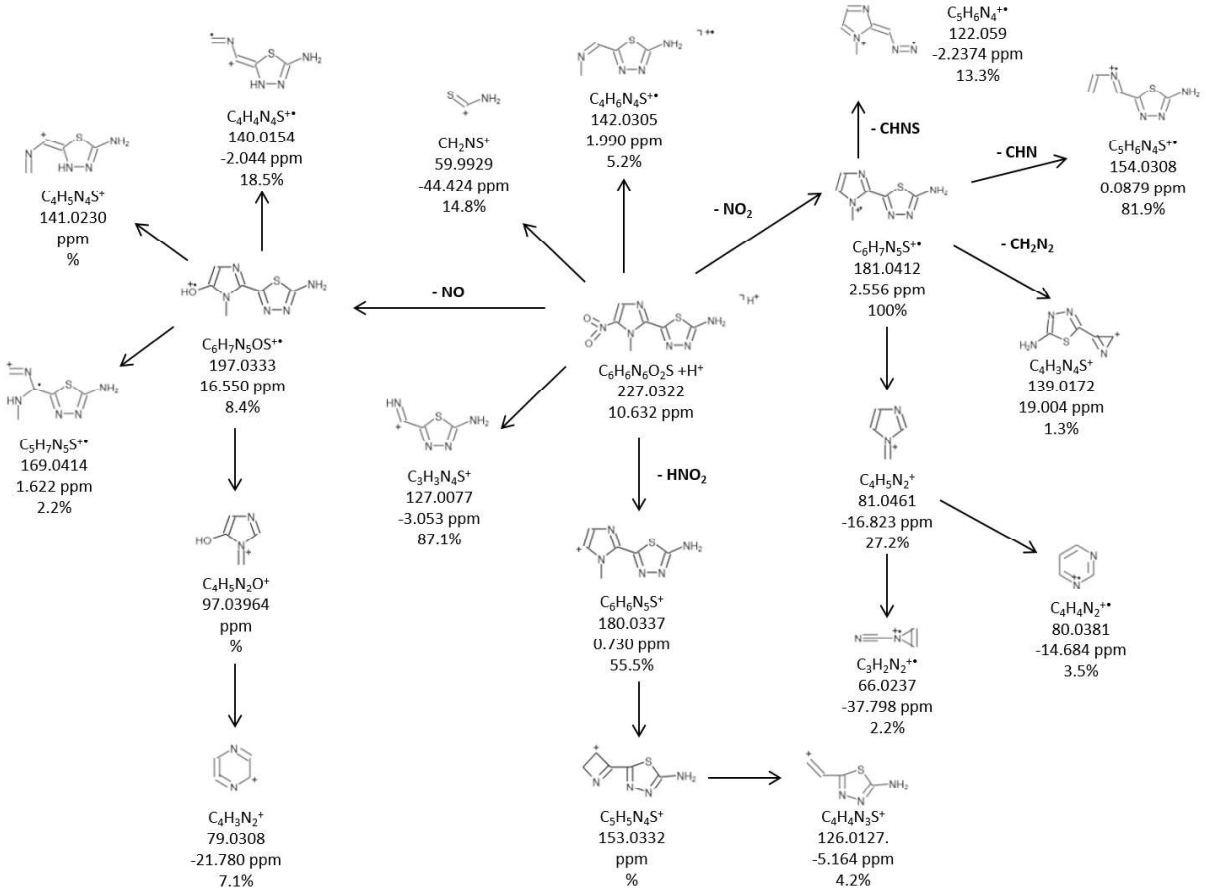


Figure 2


C4H4N4S+•
140.0154
-2.044 ppm
18.5%
C4H5N4S+
141.0230
ppm
%
CH2NS+
59.9929
-44.424 ppm
14.8%
C4H6N4S+•
142.0305
1.990 ppm
5.2%
C5H6N4+•
122.059
-2.2374 ppm
13.3%
- CHNS
- CHN
C5H6N4S+•
154.0308
0.0879 ppm
81.9%
- NO2
- NO
C6H7N5S+•
181.0412
2.556 ppm
100%
- CH2N2
C6H7N5OS+•
197.0333
16.550 ppm
8.4%
C6H6N6O2S +H+
227.0322
10.632 ppm
C4H3N4S+
139.0172
19.004 ppm
1.3%
C5H7N5S+•
169.0414
1.622 ppm
2.2%
C3H3N4S+
127.0077
-3.053 ppm
87.1%
- HNO2
C4H5N2+
81.0461
-16.823 ppm
27.2%
C4H5N2O+
97.03964
ppm
%
C6H6N5S+
180.0337
0.730 ppm
55.5%
C4H4N2+•
80.0381
-14.684 ppm
3.5%
C3H2N2+•
66.0237
-37.798 ppm
2.2%
C4H3N2+
79.0308
-21.780 ppm
7.1%
C5H5N4S+
153.0332
ppm
%
C4H4N3S+
126.0127.
-5.164 ppm
4.2%

Tables

***Table 1**. The predicted elemental composition of megazol and metabolites with measured m/z and mass errors. **M1** and **M4** m/z on HR-MS were too low to be informative. **M1** formula was proposed by extrapolation with parent compound (**M5**) and **M4** m/z (*) was reported from **M8** HR-MS spectrum by homology with **M6**/**M10**.*

***Table 2**. The metabolites in different biological mouse samples (+: found / -: not found)*

Table 1

Compound no.	Mesured *m/z*	Proposed formula	Error (mDa)	Error (ppm)
Megazol MGZ	227.0326	$C_6H_6N_6O_2S$ H+	-2.0	-8.7
M1a/b	N/A	$C_{11}H_{15}N_7O_2S$ H+	N/A	N/A
M2a/b	403.0659	$C_{12}H_{14}N_6O_8S$ H+	-0.8	-1.9
M3	243.0272	$C_6H_6N_6O_3S$ H+	-2.3	-9.4
M4	316.0664 (*)	$C_{12}H_9N_7O_2S$ H+	5.3	16.7
M5	239.0691	$C_8H_{10}N_6OS$ H+	-1.9	-7.8
M6	301.0526	$C_{12}H_8N_6O_2S$ H+	2.4	7.9
M7a/b	419.0610	$C_{12}H_{14}N_6O_9S$ H+	-0.6	-1.4
M8	358.0744	$C_{14}H_{11}N_7O_3S$ H+	2.7	7.6
M9	213.0165	$C_5H_4N_6O_2S$ H+	-2.4	-11.4
M10a/b	343.0633	$C_{14}H_{10}N_6O_3S$ H+	2.5	7.3
M11	243.0668	$C_7H_{10}N_6O_2S$ H+	0.9	3.8

Table 2

	Formula	Urine	Serum	Feces
Megazol	$C_6H_6N_6O_2S\ H^+$	+	+	+
M1 a/b	$C_{11}H_{15}N_7O_2S\ H^+$	+	+	+
M2 a/b	$C_{12}H_{14}N_6O_8S\ H^+$	+	+	-
M3	$C_6H_6N_6O_3S\ H^+$	+	-	+
M4	$C_{12}H_9N_7O_2S\ H^+$	+	-	-
M5	$C_8H_{10}N_6OS\ H^+$	+	+	+
M6	$C_{12}H_8N_6O_2S\ H^+$	+	-	-
M7 a/b	$C_{12}H_{14}N_6O_9S\ H^+$	+	+	-
M8	$C_{14}H_{11}N_7O_3S\ H^+$	+	-	-
M9	$C_5H_4N_6O_2S\ H^+$	+	+	-
M10 a/b	$C_{14}H_{10}N_6O_3S\ H^+$	+	+	-
M11	$C_7H_{10}N_6O_2S\ H^+$	+	-	-

Recherche de nouvelles molécules trypanocides

Les maladies à kinétoplastidés sont des parasitoses vectorielles dues à des protozoaires flagellés sanguicoles. Parmi celles-ci, la Trypanosomose Africaine due à un parasite du genre *Trypanosoma* touche à la fois les Hommes et les animaux. Chez l'Homme, cette maladie, plus connue sous le nom de maladie du sommeil, évolue classiquement en 2 stades. Le stade hémolymphatique où le parasite se multiplie dans le sang et la lymphe et le stade nerveux caractérisé par la présence du parasite au niveau cérébral. En l'absence d'une thérapeutique adapté, la mort est inéluctable. Actuellement les traitements proposés en médecine humaine comme vétérinaire sont anciens, non dénués de toxicité et sont à l'origine de cas de résistances de plus en plus marqués. La recherche de nouvelles molécules est donc primordiale pour pouvoir espérer maitriser cette pathologie. C'est dans ce contexte que nous avons étudié deux familles de molécules capables de reconnaitre des sites parasitaires : (*i*) Les nitroimidazolés qui vont interagir avec les nitroréductases pour générer des intermédiaires toxiques, et (*ii*) les dérivés phénanthroliniques ciblant les télomérases afin de perturber la synthèse d'ADN du trypanosome. Notre travail de thèse a permis d'évaluer le pouvoir trypanocide de différentes molécules de ces deux familles à la fois par des tests *in vitro* mais aussi sur un modèle murin infecté par une souche de *Trypanosoma brucei brucei.* La finalité de ce travail étant d'identifier de nouveaux candidats médicaments. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence des composés d'intérêt qui ouvrent de nouvelles voies de recherche pour lutter contre cette parasitose, mais aussi plus largement contre tous les kinétoplastidés.

Mots-clés : Kinétoplastidés, Trypanosoma, nitroimidazolés, phénanthrolines, traitements

Screening of new trypanocid molecules

Kinetoplastid diseases are vectorial parasitoses caused by flagellated blood protozoa. Among these, African Trypanosomiasis, due to a parasite of the genus *Trypanosoma,* affects both humans and animals. In humans, this disease, known as sleeping sickness, progresses classically in 2 stages: the hemolymphatic stage characterized by multiplication of the parasite in blood and lymph and the nervous stage characterized by the presence of the parasite in the brain. In the absence of appropriate therapy, death is inevitable. Currently, the treatments proposed in human and veterinary medicine are old, toxic and at the origin of cases of resistance. The search for new molecules is therefore essential to control this pathology. It is in this context that we studied two families of molecules which recognize parasitic sites: (*i*) Nitroimidazoles that interact with nitroreductases to generate toxic intermediates, and (*ii*) Phenanthroline derivatives targeting telomerases to disrupt trypanosome DNA synthesis. Our thesis research evaluated the trypanocidal power of different molecules from these two families both by *in vitro* tests and in a mouse model infected with a strain of *Trypanosoma brucei brucei*. The purpose of this work was to identify new drug candidates. The results obtained have made it possible to identify compounds of interest that open up new pathways of research to control this parasite, as well as all kinetoplastidae.

Keywords: Kinetoplastid, Trypanosoma, nitroimidazole, phenanthroline, treatments