

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR  
DOMINIC BASTIEN**

**SYNTHÈSE DE NOUVEAUX ANALOGUES DE LA TESTOSTÉRONE POUR  
LE TRAITEMENT DU CANCER DE LA PROSTATE**

**NOVEMBRE 2008**

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier grandement mon directeur de recherche, Dr. Gervais Bérubé, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Au cours des deux dernières années, il m'a donné de nombreux conseils sur mon projet et sur ce qu'est la recherche. Il m'a permis d'obtenir une bonne expérience dans le domaine de la chimie organique et de la chimie médicinale. Il a su me faire confiance dès le début de cette aventure.

Je tiens à remercier mon co-directeur, Dr. Éric Asselin, qui m'a permis de bien comprendre le côté biologique de tout mon projet. De plus, un membre de son équipe, Valérie Leblanc, participe présentement aux analyses biologiques des molécules synthétisées pendant ce projet de maîtrise. Je lui dois énormément pour la fin de ma maîtrise. Elle a beaucoup travaillé pour me permettre d'ajouter à temps les résultats biologiques dans ce mémoire. Il ne faut pas oublier, aussi, Céline Van Themsche, qui m'a donné de nombreuses explications concernant les cancers hormono-dépendants.

Je remercie également tous les membres de mon laboratoire pour m'avoir aidé autant sur le côté technique que sur le côté théorique de la recherche. Je tiens, personnellement, à remercier Caroline Descôteaux et Manon Lebel pour m'avoir supporté et aidé à traverser ces deux années de travail intense.

Finalement, je voudrais souligner le support de toute ma famille et surtout mon grand-père pour m'avoir fourni une aide financière me permettant de réaliser mes études, une grande aventure de ma vie. Un gros merci.

## Résumé

Le cancer de la prostate est le troisième cancer en importance au Canada. Il est celui qui cause le plus haut taux de mortalité chez les hommes. Les médicaments utilisés en clinique agissent sur les cellules cancéreuses, mais aussi sur les cellules saines. Ils provoquent, alors, de nombreux effets secondaires indésirables et affectent la santé globale des patients atteints de cette maladie. Dans le but de tenter de diminuer ces effets secondaires et la dose de médicament prescrite au patient, le ciblage thérapeutique semble être une solution envisageable. Nous avons, donc, synthétisé une molécule cytotoxique composé de testostérone et de chlorambucil, une molécule chimiothérapeutique. Étant donné que les cellules cancéreuses de la prostate possèdent une expression plus élevée du récepteur des androgènes, nous espérons qu'en étant combiné à une molécule de testostérone, le chlorambucil pourra agir de façon plus spécifique sur les cellules cancéreuses de la prostate. En effet, la testostérone aura, alors, comme fonction d'apporter la molécule chimiothérapeutique à un endroit plus précis dans l'organisme. En parallèle, nous avons aussi synthétisé deux dimères de testostérone, *cis* et *trans*, ayant un potentiel antiandrogénique. Nous pensons que la longueur de la chaîne liante située entre les deux molécules de testostérone sera suffisante pour empêcher la dimérisation du récepteur et ainsi bloquer son activation. Des tests de prolifération cellulaire ont, aussi, été effectués pour vérifier l'effet réel de ces molécules sur deux lignées cellulaires (AR<sup>+</sup> et AR<sup>-</sup>) du cancer de la prostate. Les résultats révèlent une plus grande spécificité de la molécule testostérone-chlorambucil envers la lignée hormono-dépendante. Elle possède, aussi, une IC<sub>50</sub> plus faible que celle de la chlorambucil. L'évaluation biologique des dimères de testostérone démontre que l'isomère *cis* possède une plus grande cytotoxicité que l'isomère *trans*. Ce présent mémoire présente la synthèse de ces nouveaux composés ainsi que les résultats obtenus lors de l'analyse de l'activité biologique de ces derniers.

**Mots clés :** Androgènes, cancer, chlorambucil, dimères, prostate, testostérone.

# Table des matières

<b>Remerciements .....</b>	<b>ii</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>iii</b>
<b>Liste des tableaux et graphiques.....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des spectres .....</b>	<b>x</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1    Le cancer .....	1
1.2    Le cancer de la prostate .....	2
1.3    La prostate : l'organe.....	3
1.4    Les androgènes et leur récepteur .....	5
1.5    La biosynthèse des androgènes .....	6
1.6    Le récepteur des androgènes (RA) .....	8
1.7    Les traitements utilisés en clinique .....	11
1.8    Le cisplatine .....	14
1.9    Le chlorambucil.....	17
1.10    Les antiandrogènes .....	19
1.11    La résistance envers la chimiothérapie.....	22
<b>2. Objectifs du projet.....</b>	<b>24</b>
2.1    Synthèse d'un composé hybride testostérone-chlorambucil cytotoxique .....	24
2.2    Synthèse des dimères de testostérone.....	27
2.3    Activité biologique .....	30
<b>3. Résultats et discussion .....</b>	<b>32</b>
3.1    Synthèse de l'hybride cytotoxique testostérone-chlorambucil.....	32
3.1.1    Préparation de la testostérone en position 7 du noyau stéroïde .....	33

3.1.2	Fonctionnalisation de la position 7 $\alpha$ de la testostérone .....	35
3.1.3	La métathèse de Grubbs et son optimisation.....	36
3.1.4	Substitution nucléophile de l'atome de chlore .....	40
3.1.5	Couplage de la molécule de chlorambucil .....	44
3.2	Synthèse des dimères de testostérone.....	46
3.3	Activité biologique .....	53
<b>4.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>58</b>
<b>5.</b>	<b>Méthodologie .....</b>	<b>61</b>
5.1	Méthodes générales .....	61
5.2	Synthèse de l'hybride testostérone-chlorambucil .....	63
5.2.1	Synthèse du diacétate de 3,5-androstadièn-3,17 $\beta$ -diol ( <b>2</b> ).....	63
5.2.2	Synthèse de l'acétate de 4,6-androstadièn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>3</b> ) .....	64
5.2.3	Synthèse de l'acétate de 7 $\alpha$ -allyl-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>4</b> ) ....	65
5.2.4	Synthèse de 7 $\alpha$ -allyl-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>13</b> ) .....	66
5.2.5	Synthèse de l'acétate de 7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>5</b> ).....	67
5.2.6	Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>6</b> ) .....	68
5.2.7	Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-iodo-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>7</b> ) .....	69
5.2.8	Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-methoxy-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>8</b> ) .....	70
5.2.9	Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-acétoxy-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>9</b> ) .....	71
5.2.10	Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-{4-[bis-(2-chloro-éthyl)-amino]-phényl-éthylacétoxy}-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>10</b> ).....	73
5.3	Synthèse des dimères de testostérone.....	74
5.3.1	Synthèse des dimères de testostérone protégés ( <i>trans</i> - <b>11</b> ) ( <i>cis</i> - <b>12</b> ) .....	74

5.3.2 Synthèse des dimères de testostérone protégés ( <i>trans</i> -11') ( <i>cis</i> -12').....	76
<b>6. Spectres.....</b>	<b>78</b>
<b>7. Références.....</b>	<b>107</b>

## Liste des tableaux et graphiques

Tableau 3.1	Rendements obtenus lors de quelques essais effectués de la métathèse de Grubbs (transformation <b>4</b> → <b>5</b> ) ..... 39
Tableau 3.2	Rendements obtenus lors de quelques essais effectués de la métathèse de Grubbs pour la synthèse des dimères de testostérone ( <b>trans-11</b> et <b>cis-12</b> ) ..... 49
Tableau 3.3	Essais de cytotoxicité au MTT des composés <b>10</b> , <b>trans-11'</b> et <b>cis-12'</b> sur des lignées cellulaires hormono-dépendantes (LNCaP) et hormono-indépendantes (PC3) ..... 57
Graphique 3.1	Résultats des analyses de cytotoxicité par test MTT du chlorambucil pour deux lignées cellulaires ..... 54
Graphique 3.2	Résultats des analyses de cytotoxicité par test MTT de la molécule <b>10</b> pour deux lignées cellulaires ..... 54
Graphique 3.3	Résultats des analyses de cytotoxicité par test MTT de l'acétate de cyprotérone pour deux lignées cellulaires ..... 56
Graphique 3.4	Résultats des analyses de cytotoxicité par test MTT de la molécule <b>trans-11'</b> pour deux lignées cellulaires ..... 56
Graphique 3.5	Résultats des analyses de cytotoxicité par test MTT de la molécule <b>cis-12'</b> pour deux lignées cellulaires ..... 57



## Liste des figures

Figure 1.1	Différents stades du cancer de la prostate (Tirée de <a href="http://www.cancer.gov">www.cancer.gov</a> , 2008) .....	3
Figure 1.2	Système reproducteur masculin (Tirée de <a href="http://www.liv.ac.uk">www.liv.ac.uk</a> , 2008).....	4
Figure 1.3	Structure moléculaire des principaux androgènes .....	5
Figure 1.4	Mécanisme d'action des androgènes (Tirée de Feldman, 2001) .....	6
Figure 1.5	Réduction enzymatique de la testostérone en dihydrotestostérone.....	7
Figure 1.6	Métabolisme des androgènes (Tirée de Labrie, 1993).....	8
Figure 1.7	Domaines principaux du récepteur des androgènes.....	9
Figure 1.8	Représentation 3D du récepteur des androgènes et de la testostérone dans le site du récepteur (Tirée de Protein Data Bank (PDB), # 2AM9) ....	10
Figure 1.9	Molécules utilisées pour le traitement du cancer de la prostate.....	12
Figure 1.10	Cisplatine et ses analogues .....	14
Figure 1.11	Mécanisme d'action du cisplatine dans une cellule (Tirée de Ott, 2006)...	15
Figure 1.12	Différentes conformations adoptées par le cisplatine et l'ADN (Tirée de Jung, 2007).....	16
Figure 1.13	Structure moléculaire du chlorambucil.....	17
Figure 1.14	Formation de l'ion aziridinium.....	18
Figure 1.15	Mécanisme d'action du chlorambucil .....	19
Figure 1.16	Mode d'action des antiandrogènes (Tirée de <a href="http://www.prostateinfo.com">www.prostateinfo.com</a> ).....	20
Figure 1.17	Différents antiandrogènes, stéroïdiens et non-stéroïdiens, utilisés en clinique.....	21
Figure 1.18	Mécanismes de résistance du cisplatine (Tirée de Kelland, 2007) .....	23
Figure 2.1	Complexes estradiol-platinum(II) synthétisés dans le laboratoire du professeur Gervais Bérubé.....	24
Figure 2.2	Rétrosynthèse du composé testostérone-chlorambucil .....	26

Figure 2.3	Mode d'action des molécules dimériques sur le récepteur (Adaptée de Bérubé, 2006).....	28
Figure 2.4	Rétrosynthèse des dimères de testostérone .....	29
Figure 3.1	Synthèse globale de la molécule hybride testostérone-chlorambucil .....	32
Figure 3.2	Synthèse du diacétate de 3,5-androstadièn-3,17 $\beta$ -diol ( <b>2</b> ).....	33
Figure 3.3	Synthèse de l'acétate de 4,6-androstadièn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>3</b> ) .....	34
Figure 3.4	Synthèse de l'acétate de 7 $\alpha$ -allyl-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>4</b> ) .....	35
Figure 3.5	Synthèse de l'acétate de 7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>5</b> ).....	36
Figure 3.6	Mécanisme d'action de la cross-métathèse .....	37
Figure 3.7	Catalyseurs utilisés au cours de la métathèse de Grubbs.....	38
Figure 3.8	Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>6</b> ) .....	40
Figure 3.9	Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-iodo-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>7</b> ) .....	41
Figure 3.10	Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-methoxy-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>8</b> ) et de 7 $\alpha$ -(4-acétoxy-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>9</b> ) .....	42
Figure 3.11	Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-acétoxy-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>9</b> ) via la molécule chlorée ( <b>6</b> ).....	44
Figure 3.12	Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-{4-[bis-(2-chloro-éthyl)-amino]-phényl-éthylacétoxy}-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one .....	45
Figure 3.13	Synthèse des dimères de testostérone protégés <i>trans</i> - <b>11</b> et <i>cis</i> - <b>12</b> .....	47
Figure 3.14	Synthèse des dimères de testostérone protégés <i>trans</i> - <b>11'</b> et <i>cis</i> - <b>12'</b> .....	50
Figure 3.15	Modèle des dimères de testostérone <i>cis</i> (A) et <i>trans</i> (B) obtenus par Chem 3D .....	52

## Liste des spectres

RMN- <sup>1</sup> H Molécule <b>2</b> .....	79
RMN- <sup>13</sup> C molécule <b>2</b> .....	80
RMN- <sup>1</sup> H Molécule <b>3</b> .....	81
RMN- <sup>13</sup> C Molécule <b>3</b> .....	82
RMN- <sup>1</sup> H Molécule <b>4</b> .....	83
RMN- <sup>13</sup> C Molécule <b>4</b> .....	84
RMN- <sup>1</sup> H Molécule <b>5</b> .....	85
RMN- <sup>13</sup> C Molécule <b>5</b> .....	86
RMN- <sup>1</sup> H Molécule <b>6</b> .....	87
RMN- <sup>13</sup> C Molécule <b>6</b> .....	88
RMN- <sup>1</sup> H Molécule <b>7</b> .....	89
RMN- <sup>13</sup> C Molécule <b>7</b> .....	90
RMN- <sup>1</sup> H Molécule <b>8</b> .....	91
RMN- <sup>13</sup> C Molécule <b>8</b> .....	92
RMN- <sup>1</sup> H Molécule <b>9</b> .....	93
RMN- <sup>13</sup> C Molécule <b>9</b> .....	94
RMN- <sup>1</sup> H Molécule <b>10</b> .....	95
RMN- <sup>13</sup> C Molécule <b>10</b> .....	96
RMN- <sup>1</sup> H Molécule <b>11</b> .....	97
RMN- <sup>13</sup> C Molécule <b>11</b> .....	98
RMN- <sup>1</sup> H Molécule <b>12</b> .....	99
RMN- <sup>13</sup> C Molécule <b>12</b> .....	100
RMN- <sup>1</sup> H Molécule <b>11'</b> .....	101
RMN- <sup>13</sup> C Molécule <b>11'</b> .....	102
RMN- <sup>1</sup> H Molécule <b>12'</b> .....	103
RMN- <sup>13</sup> C Molécule <b>12'</b> .....	104
RMN- <sup>1</sup> H Molécule <b>13</b> .....	105
RMN- <sup>13</sup> C Molécule <b>13</b> .....	106

## Liste des abréviations

ACTH	Adrénocorticotropine
ADN	Acide désoxyribonucléique
APS	Antigène prostatique spécifique
aq.	Aqueux
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
Asn	Asparagine
ATP	Adénosine triphosphate
CCM	Chromatographie sur couche mince
CPA	Acétate de cyprotérone
d	Doublet
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
dd	Doublet de doublet
DHT	Dihydrotestostérone
DMF	Diméthylformamide
ERA	Élément de réponse aux androgènes
g	Gramme
Glu	Glutamine
h	Heures
HBP	Hypertrophie bénigne de la prostate
IR	Infrarouge
LBD	Domaine de liaison au ligand
LH	Hormone lutéinisante
LHRH	Hormone gonadolibérine
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazoline
m	Multiplet
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mmol	Millimole

NBS	N-bromosuccinimide
NER	Réparation par excision de nucléotides
RA	Récepteur des androgènes
RE	Récepteur des estrogènes
RG	Récepteur des glucocorticoïdes
RM	Récepteur des minéralocorticoïdes
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RVD	Récepteur de la vitamine D
s	Singulet
SM	Spectre de masse
T	Testostérone
t	Triplet
Thr	Thréonine

# **1. Introduction**

En 2008, le nombre total estimé de nouveaux cas de cancer, au Canada, a augmenté comparativement à l'année 2007. Effectivement, le nombre de nouveaux cas a passé de 159 900 à 166 400 pour l'année 2008, selon Statistiques Canada. (Statistiques canadiennes sur le cancer, 2008) Quatre cancers particuliers sont responsables d'au moins 55% des nouveaux cas, à savoir le cancer du poumon, le cancer colorectal, le cancer de la prostate chez l'homme et le cancer du sein chez la femme. De plus, en 2008, le nombre de décès causé par cette maladie a aussi augmenté totalisant 73 800 décès. Le cancer du poumon demeure la principale cause de décès par cancer au Canada pour cette même année. On estime en effet que 20 200 décès seront attribuables à ce type de cancer comparativement à 5 400 pour le cancer du sein ou 4 300 pour le cancer de la prostate. Le cancer est donc une maladie en continuelle progression. L'augmentation de nouveaux cas de cancer est partiellement en relation avec le vieillissement de la population. Chez l'homme, le cancer de la prostate est le cancer le plus diagnostiqué tandis que chez la femme, le cancer du sein est prédominant. Le cancer de la prostate se classe alors au troisième rang de mortalité. La recherche est donc l'espoir de demain pour contrer cette maladie qui crée tant de dommages.

## **1.1 Le cancer**

Une cellule cancéreuse possède plusieurs caractéristiques particulières qui la distingue d'une cellule normale. Tout d'abord, on retrouve dans ces cellules une perte des mécanismes qui contrôlent la croissance et la prolifération cellulaire. Il y a aussi une perte de la balance entre la naissance et la mort d'une cellule en réponse à des signaux de croissance, des signaux d'inhibition de croissance ou des signaux de mort cellulaire. Cette perte de régulation est causée par des dommages génétiques. De plus, pour croître, une tumeur cancéreuse doit obtenir un support sanguin plus élevé qu'un organe sain. Il se produit, donc, une croissance du nombre de vaisseaux sanguins dans la tumeur. Ce

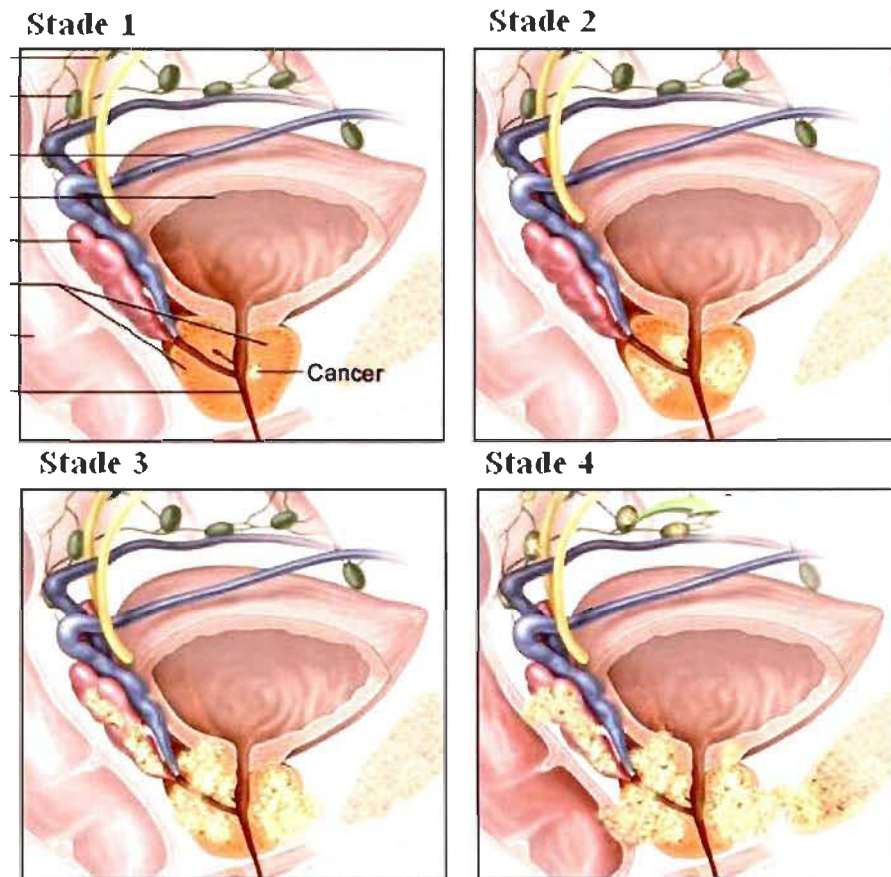
processus est appelé angiogénèse. Lorsqu'une cellule acquiert toutes ces caractéristiques, elle devient immortelle et est capable de se reproduire indéfiniment. En outre, une cellule peut acquérir la capacité de quitter la tumeur primaire, atteindre la circulation sanguine et, de là, envahir les tissus environnants. Des études récentes suggèrent que ce phénomène, la métastase, est le résultat des cellules tumorales à conditionner les tissus pour la colonisation en établissant un environnement pré-métastatique. (Eccles et Welch, 2007)

## **1.2 Le cancer de la prostate**

Le cancer hormono-dépendant de la prostate atteint surtout les hommes âgés de 60 ans et plus. Il n'y a pas de cause principale mais certains facteurs (obésité, inactivité physique, antécédents familiaux) peuvent accroître le risque de développer cette maladie. Le développement du cancer de la prostate est divisé en quatre stades (1 à 4). Plus le stade augmente, plus la tumeur localisée à la prostate a tendance à augmenter de taille allant jusqu'à s'étendre vers les organes voisins ou d'autres parties du corps au cours du stade 4 (figure 1.1). (Société canadienne du cancer, 2008) Heureusement, il existe différentes méthodes de détection permettant un diagnostic à un stade précoce. Parmi ces méthodes, on retrouve le touché rectal, le dosage de l'APS, la sonde à ultrason et la biopsie.

Malheureusement, un cancer de la prostate peut, après 18 à 24 mois, ne plus répondre aux traitements sous lequel il est soumis. Le cancer devient alors réfractaire et se développe sans la présence des androgènes. Le développement de la tumeur hormono-indépendante est un des événements les plus significatifs dans la progression du cancer de la prostate causant un plus haut risque de mortalité chez les patients. (Edwards et Bartlett, 2005) Cela peut être expliqué par des modifications moléculaires dans le récepteur des androgènes (AR). En effet, plusieurs mutations dans le gène de ce récepteur ont été identifiées. (Heinlein et Chang, 2004) Des mutations dans le domaine de liaison au ligand (LBD) du gène pourrait expliquer quelques cas de ce cancer. L'hormono-indépendance du cancer de la prostate est aussi associé avec l'amplification du gène du récepteur entraînant une hausse du niveau de la quantité de cette protéine. (Koivisto et Helin, 1999) Parmi

d'autres causes se retrouvent l'augmentation de la phosphorylation du récepteur des androgènes par certaines kinases. (Edwards et Bartlett, 2005) La phosphorylation protège le récepteur de la dégradation protéolytique et stabilise le récepteur après son activation.



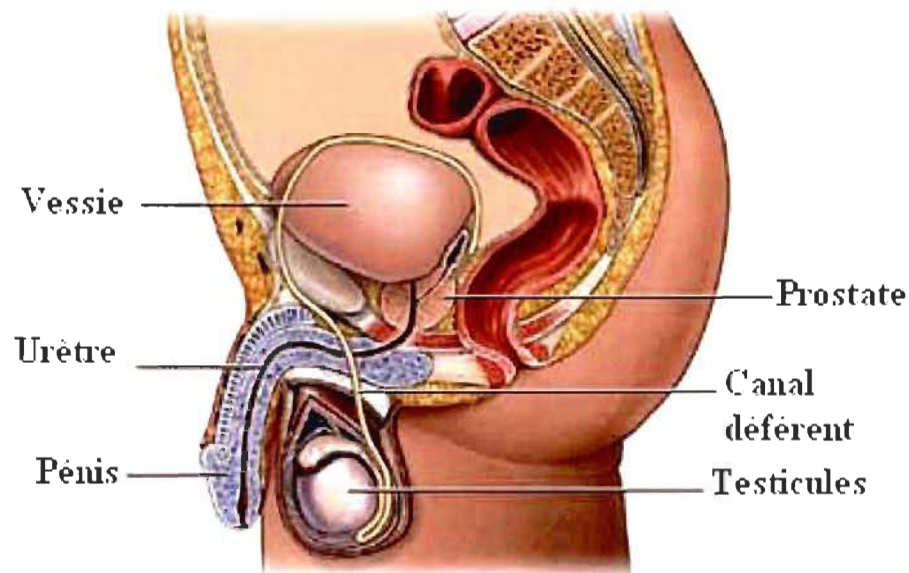
**Figure 1.1: Différents stades du cancer de la prostate (Tirée de [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov), 2008)**

### **1.3 La prostate : l'organe**

La prostate est un organe exclusivement masculin situé près du rectum, sous la vessie et à la base du pénis (figure 1.2). Cet organe de la taille d'une grosse noix sert à produire le liquide séminale qui est combiné au spermatozoïde et le sperme. La prostate



entoure l'urètre, un canal qui transporte l'urine et le sperme jusqu'au bout du pénis. (Société canadienne du cancer, 2008)



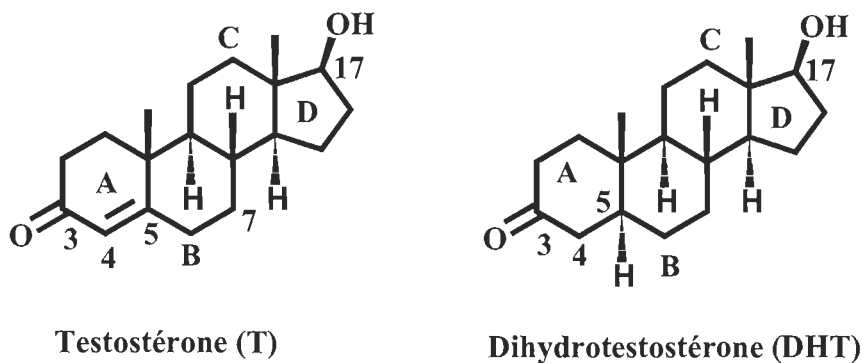
**Figure 1.2: Système reproducteur masculin (Tirée de [www.liv.ac.uk](http://www.liv.ac.uk), 2008)**

De plus, la prostate sécrète l'APS, l'antigène prostatique spécifique, une protéine qui sert à liquéfier le sperme pour faciliter le passage des spermatozoïdes dans l'urètre. Bien que le niveau d'APS dans le sang de l'homme varie légèrement selon l'âge, cette protéine constitue le principal marqueur du cancer de la prostate dans le sérum humain. (Fondation canadienne de recherche sur le cancer de la prostate, 2008) Le taux limite d'APS qui permet de soupçonner la présence d'une tumeur cancéreuse est 4 ng/mL. (Loeb et Catalona, 2007) Par contre, une valeur supérieure à ce seuil ne signifie pas automatiquement la présence d'un cancer. En effet, la prostate peut développer une autre maladie n'ayant aucun lien avec le cancer de la prostate, l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP), et causant aussi l'augmentation de cette protéine. Cette maladie entraîne une hypertrophie de la prostate créant une pression sur la vessie et l'urètre et interférant sur l'écoulement de l'urine à travers les conduits.

## 1.4 Les androgènes et leur récepteur

Le développement de la prostate et des organes sexuels masculins requière la présence des androgènes, les hormones sexuelles masculines. Les deux androgènes principaux sont la testostérone et la dihydrotestostérone. (Heinlein et Chang, 2004) La testostérone, l'androgène le plus abondant dans le sérum humain, est utile à la différenciation sexuelle et au maintien de la libido et des fonctions sexuelles. De son côté, la dihydrotestostérone, l'androgène le plus actif chez l'homme, sert à la virilisation de l'homme; c'est-à-dire au développement des parties génitales, de l'urètre, de la prostate et à la croissance des poils.

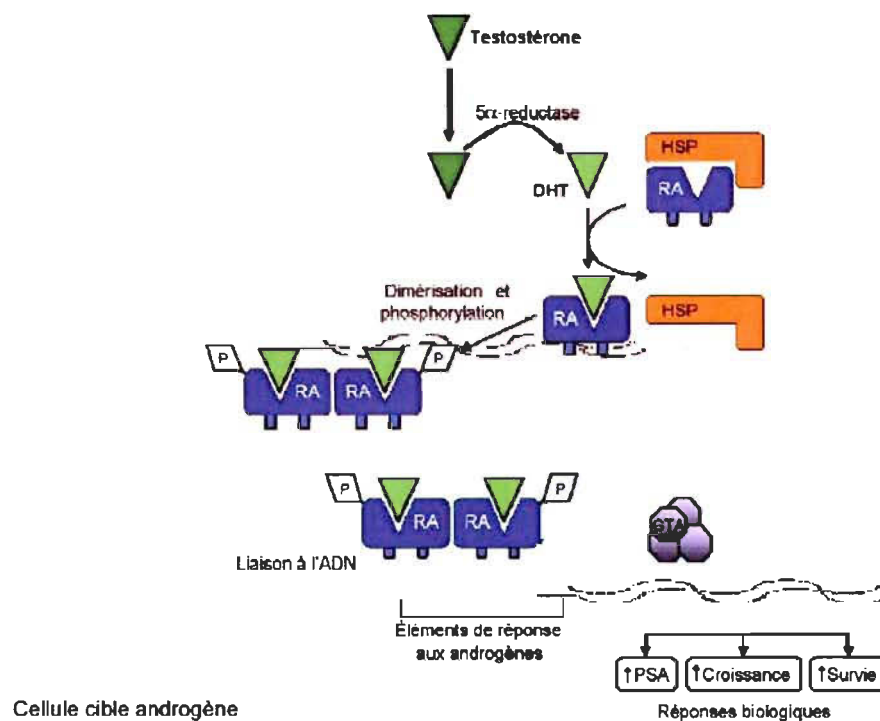
Les deux molécules possèdent 4 cycles de carbones (A, B, C, D) ainsi qu'un groupement cétone sur le carbone 3 et un groupement alcool sur le carbone 17. La seule différence moléculaire entre ces deux hormones est la présence d'une double liaison entre les carbones 4 et 5 dans la molécule de testostérone (voir figure 1.3).



**Figure 1.3: Structure moléculaire des principaux androgènes**

L'activité biologique de ces hormones est due à la fixation de l'androgène sur le récepteur des androgènes (RA). En effet, ce récepteur nucléaire lie le stéroïde de façon spécifique dans le cytoplasme de la cellule. À ce moment, la protéine de choc thermique (HSP) liée au récepteur se dissocie de ce dernier. Cette protéine maintient le récepteur dans une conformation étant capable de lier l'hormone et protège aussi le récepteur contre la protéolyse. La dimérisation et la phosphorylation du récepteur se produit alors. Le

complexe androgène-récepteur peut enfin entrer dans le noyau, se lier aux ERA (éléments de réponses aux androgènes) et ainsi activer les gènes impliqués dans la croissance et la survie cellulaire. Des coactivateurs sont impliqués dans ce processus. Une augmentation de la quantité de la APS est aussi observable. La figure 1.4 (Feldman et Feldman, 2001) présente l'activation du récepteur et son interaction avec l'ADN. Ce modèle est celui qui est le plus décrit dans la littérature. En effet, des études démontrent que le récepteur inactif peut aussi se retrouver dans le noyau et y être activé. (Carson-Jurica et al., 1990)

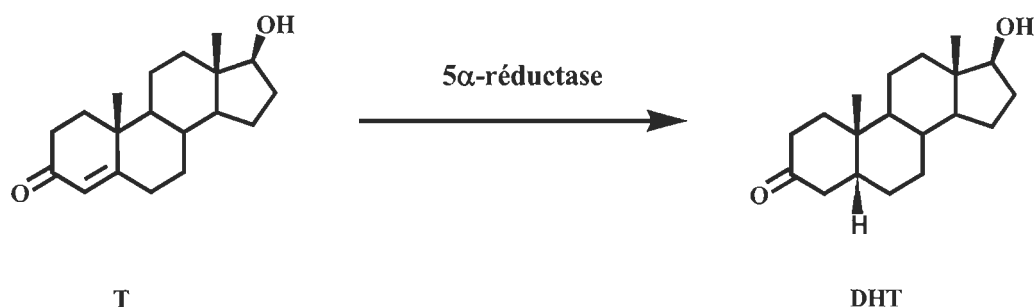


**Figure 1.1: Mécanisme d'action des androgènes (Tirée de Feldman, 2001)**

## 1.5 La biosynthèse des androgènes

Les hormones androgènes sont synthétisées, à partir du cholestérol, par les testicules qui sont directement responsables de 60% de la production totale de testostérone chez l'homme. Les glandes surrénales sont quant à elles responsables du 40% restant de la

production totale. (Labrie et al., 1993) Tout d'abord, les testicules sécrètent de la testostérone dans le sang où elle circule jusqu'à la prostate. Les cellules prostatiques réduisent ensuite de façon irréversible la testostérone en dihydrotestostérone à l'aide d'une enzyme, la 5 $\alpha$ -réductase (figure 1.5). Cette enzyme NADPH-dépendante agit sur tous les stéroïdes (androgènes, glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes) possédant une cétone sur le carbone 3 et une double liaison entre le carbone 4 et 5. (Jin et Penning, 2001)



**Figure 1.5: Réduction enzymatique de la testostérone en dihydrotestostérone**

Les stéroïdes masculins peuvent aussi être fabriqués via l'androstènedione, une hormone produite par les glandes surrénales. Cette hormone circule dans la circulation sanguine jusqu'à la prostate où les cellules prostatiques transforment l'androstènedione en testostérone et dihydrotestostérone à l'aide d'enzymes. (voir figure 1.6) (Labrie et al., 1993) Cela explique pourquoi le niveau de dihydrotestostérone dans le tissu est beaucoup plus élevé que celui de la testostérone mais que le niveau de testostérone sanguin est plus élevé que celui de la DHT. Le DHT est principalement produit dans le tissu prostatique. (Hsing, 2001)

De plus, la fonction des testicules est régulée par l'hormone lutéinisante (LH), et celle des glandes surrénales par l'adrénocorticotropine (ACTH), toutes deux produites par les cellules gonadotropes de l'hypophyse comme le démontre la figure suivante. (McConnell, 1991)

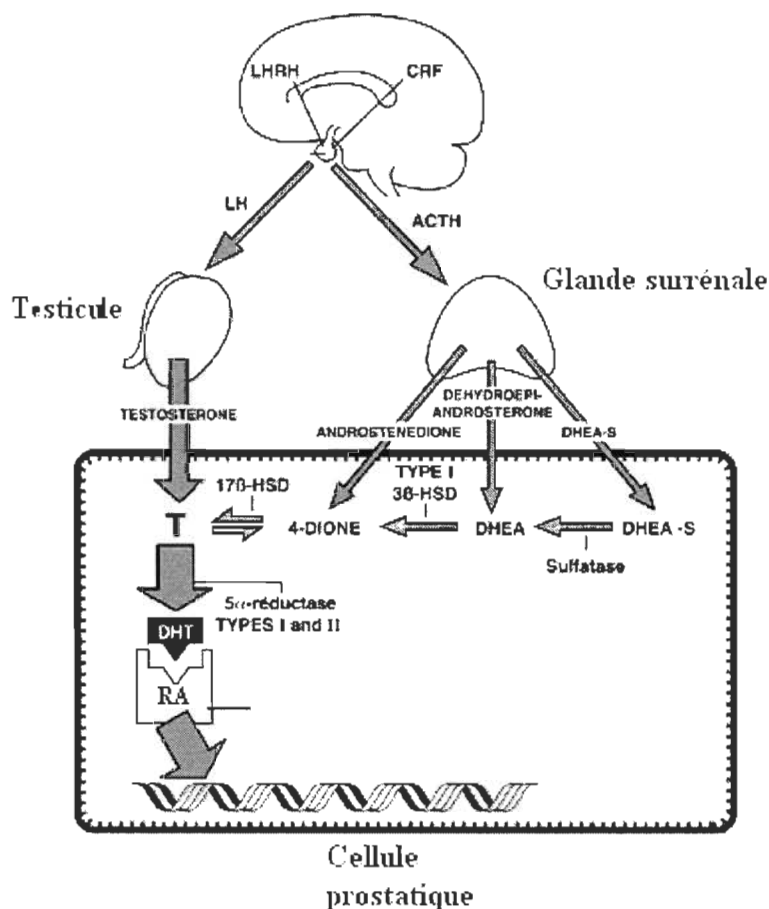


Figure 1.6: Métabolisme des androgènes (Tirée de Labrie, 1993)

## 1.6 Le récepteur des androgènes (RA)

Le récepteur des androgènes est une protéine faisant partie de la superfamille des récepteurs nucléaires qui inclut aussi le récepteur des glucocorticoïdes (RG), minéralocorticoïdes (RM), estrogènes (RE), progestérone (RP), vitamine D (RVD) et vitamine A (RAR). Il est constitué de trois principaux domaines fonctionnels (figure 1.7) : le domaine N-terminal variable, le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine de liaison au ligand (LBD). (Shaffer et al., 2004) Le domaine de liaison à l'ADN est composé de deux motifs à doigt de zinc qui déterminent les séquences d'ADN qui seront reconnues par le récepteur. Le domaine de liaison au ligand, situé à l'extrémité C-terminal du récepteur, contient une région appelée la fonction d'activation 2 (AF-2) qui est

important pour l'activité transcriptionnelle du récepteur. L'extrémité N-terminal, la région la moins conservée, contient le domaine de transcription AF-1. On retrouve aussi entre les domaines de liaison à l'ADN et au ligand une région correspondant à une séquence de localisation nucléaire. (Agoulnik et Weigel, 2006)

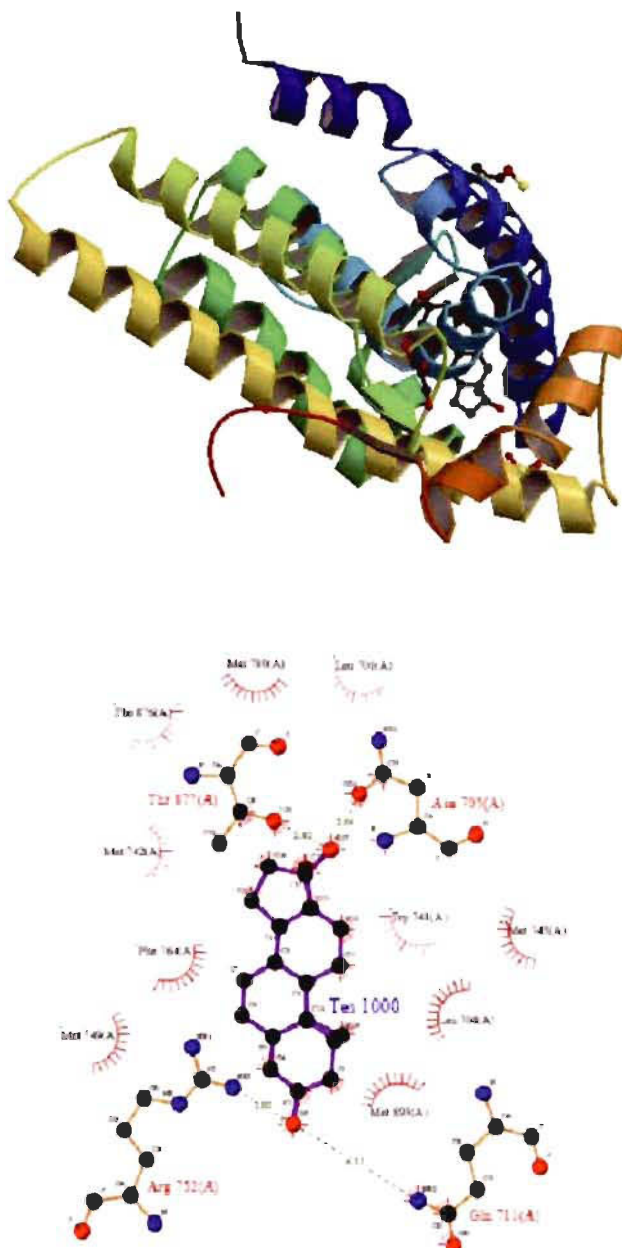


**Figure 1.7 Domaines principaux du récepteur des androgènes**

Ce récepteur fixe les androgènes à l'aide de quatre acides aminés spécifiques situés dans le domaine de liaison au ligand. La glutamine 711 (Glu 711) et l'arginine 752 (Arg 752) lient la cétone du carbone 3 tandis que l'asparagine 705 (Asn 705) et la thréonine 877 (Thr 877) lient l'alcool du carbone 17 du noyau stéroïde (figure 1.8). La cétone possède une paire d'électrons libres qui pourraient agir comme accepteur d'un pont hydrogène capable d'établir une forte interaction avec un acide aminé polaire ou chargé. L'atome d'hydrogène du groupement alcool du carbone 17 supporte une charge positive partielle qui permet une interaction avec un atome électronégatif sur un acide aminé adjacent. Ces ponts hydrogènes sont beaucoup plus forts que les forces van der Waals. Cela constitue, donc, l'élément principal expliquant pourquoi le récepteur fixe les androgènes si fortement avec des affinités dans l'ordre des nanomolaires. (Pereira de Jesus-Tran et al., 2006)

Bien que la testostérone (T) et la dihydrotestostérone (DHT) se lient au même récepteur et possèdent presque la même structure moléculaire (voir figure 1.3, page 5), elles possèdent une affinité très différente sur le récepteur des androgènes. La testostérone a une affinité de  $10^{-10}$  M tandis que sa forme réduite (DHT) a une affinité de  $10^{-11}$  M. Cela signifie que la liaison du DHT sur son récepteur est plus forte que celle de la testostérone. (Jin et Penning, 2001) Cette différence d'affinité peut être expliquée par la présence de l'insaturation entre le carbone 4 et 5 du cycle A dans la molécule de la

testostérone. Cette double liaison change la géométrie du cycle A et l'orientation de la cétone (C3) ce qui pourrait modifier la force du pont hydrogène réalisé avec le résidu Arg 752.



**Figure 1.8: Représentation 3D du récepteur des androgènes et de la testostérone dans le site du récepteur (Tirée de Protein Data Bank (PDB), # 2AM9)**

## 1.7 Les traitements utilisés en clinique

Il existe plusieurs traitements pouvant être utilisés en clinique pour traiter les cancers. Tout d'abord, on retrouve la chirurgie. Cette méthode permet le retrait de la prostate ou des testicules en ce qui concerne le cancer de la prostate. En plus de pouvoir subir une castration physique des testicules, les patients atteints de ce cancer peuvent avoir recours à une castration chimique en utilisant des antagonistes de l'hormone gonadolibérine (ou de l'anglais, luteinising-hormone releasing hormone, LHRH). Ces antagonistes provoquent une réduction de 95 % de la concentration de testostérone dans le sérum.

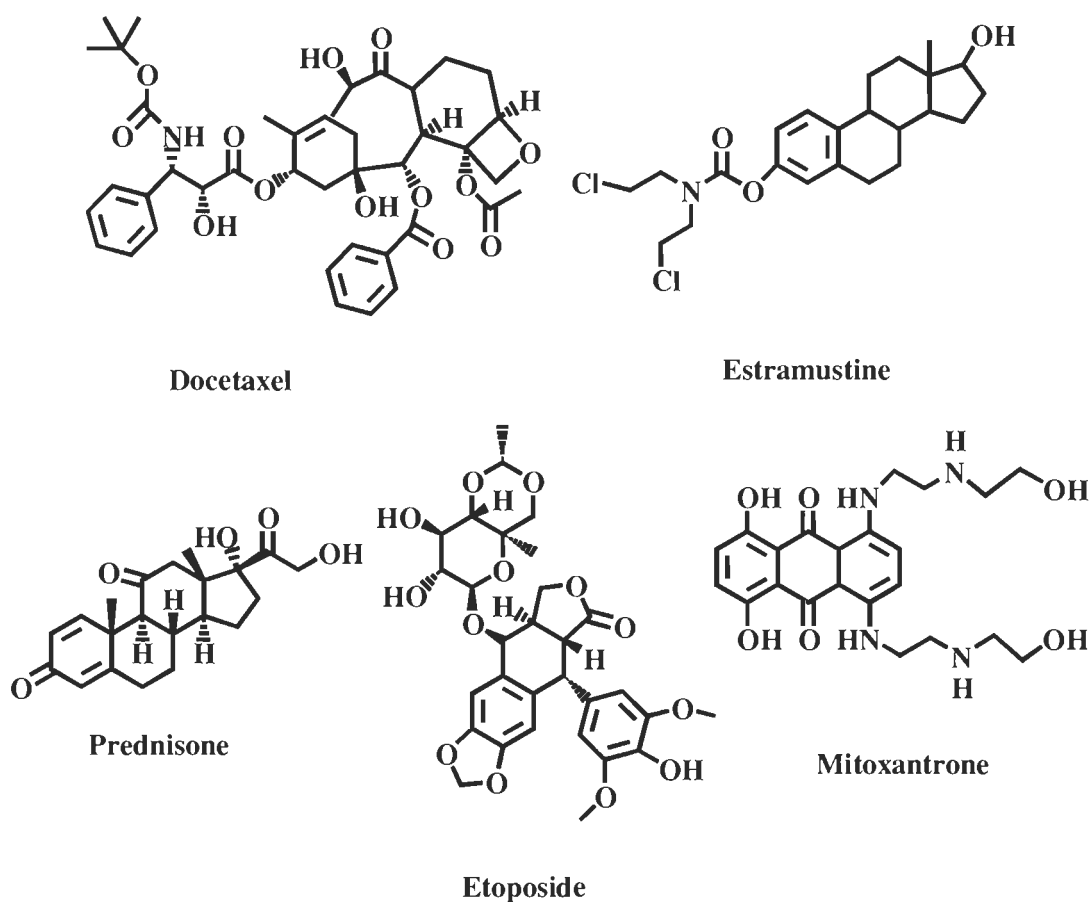
Nous retrouvons aussi, parmi les traitements, la radiothérapie. Cette méthode consiste à l'utilisation de radiations à haute énergie (rayons X ou autres radiations) pour éliminer les cellules cancéreuses ou inhiber leur progression. Deux types de radiothérapie existent : les radiations externes ou internes. La radiothérapie peut entraîner l'impuissance et des problèmes urinaires ainsi que d'autres effets secondaires tels que les nausées.

L'hormonothérapie est aussi beaucoup utilisée dans le cas du cancer de la prostate. Ce traitement permet d'éliminer les hormones ou de bloquer l'action de celles-ci dans le but d'arrêter la progression des cellules cancéreuses. Comme mentionné ci-haut, des antagonistes de la LHRH peuvent être utilisés. Les hormones sexuelles féminines sont aussi utilisées pour prévenir les testicules de produire de la testostérone. Les cliniciens ont aussi recours à plusieurs antiandrogènes dans le but de bloquer l'action des androgènes sur leur récepteur. Une section sera réservée aux antiandrogènes plus loin dans ce chapitre.

Parmi les techniques souvent employées, on retrouve la chimiothérapie qui a recours à des médicaments spécifiques pour détruire les cellules cancéreuses. Ces médicaments sont en général cytotoxiques. Ils appartiennent à différentes familles de molécules qui agissent sur les diverses phases du cycle cellulaire en créant des dommages à l'ADN, en inhibant sa synthèse ou en interférant avec les mécanismes de la division



cellulaire. Les médicaments les plus fréquemment utilisés pour traiter le cancer de la prostate sont le docetaxel, qui favorise le maintien des microtubules en inhibant leur dépolymérisation par liaison stable à la tubuline et entraîne un blocage de la mitose, ou une combinaison de mitoxantrone et de prednisone ou d'estrामustine et d'étoposide (figure 1.9). La combinaison de mitoxantrone et de prednisone permet d'améliorer la qualité de la vie du patient mais ne peut la prolonger. En effet, les effets secondaires de ces médicaments sont minimes ce qui permet d'améliorer l'humeur et l'appétit. (Société canadienne du cancer, 2008)



**Figure 1.9: Molécules utilisées pour le traitement du cancer de la prostate**

D'autres médicaments sont des agents alkylants qui ajoutent des groupements alkyle à des groupements électronégatifs qu'on retrouve dans la cellule. Les acides nucléiques sont leurs principales cibles, mais ils peuvent aussi se lier à des protéines. Ils

arrêtent la croissance des tumeurs grâce à une liaison covalente avec les régions riches en électrons des bases azotées de l'ADN. (Neidle et Thurston, 2005) Ce mécanisme empêche les brins d'ADN de se séparer et prévient la réplication de l'ADN. Cela entraîne, alors, un arrêt de la division cellulaire. Parmi ce genre de médicaments se retrouve le cisplatine, le chlorambucil, le carboplatine et l'oxaliplatine.

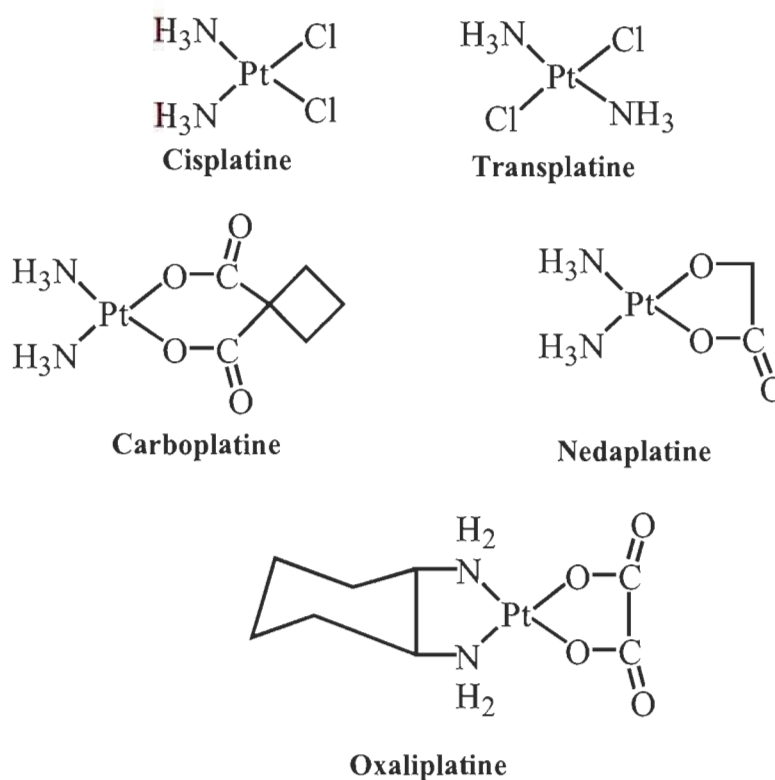
Malheureusement, les médicaments utilisés en chimiothérapie possèdent de nombreux effets secondaires. Ces derniers ciblent les cellules en voie de prolifération rapide comme les cellules de cheveux ou les cellules épithéliales. Donc, en plus des cellules cancéreuses, ils détruisent les cellules normales des tissus en renouvellement permanent. Cela explique pourquoi leur mode d'action provoque des effets qui sont très désagréables chez une personne subissant un traitement chimiothérapeutique. La liste d'effets secondaires peut s'avérer longue : nausées, vomissements, perte de cheveux, chute du taux des cellules sanguines, diarrhées et troubles cutanés.

Malgré tous les médicaments connus, la chimiothérapie n'a pas encore pu faire ses preuves dans le traitement du cancer de la prostate comme pour d'autres cancers. En effet, les cellules cancéreuses de la prostate ne croissent pas aussi rapidement que d'autres types de cellules tumorales.

Finalement, plusieurs autres nouveaux types de traitement sont présentement en études cliniques selon le *National Cancer Institute*. La cryochirurgie permet l'utilisation d'un instrument qui gèle et détruit les cellules prostatiques cancéreuses. La thérapie biologique utilise directement le système immunitaire pour combattre le cancer. En effet, des nouvelles molécules sont injectées au patient pour stimuler ou rétablir les défenses naturelles de l'organisme. Ce type de traitement est aussi appelé immunothérapie. Les ultrasons sont aussi utilisés pour détruire les cellules cancéreuses. Une sonde est alors nécessaire pour créer les ultrasons. De plus, beaucoup de recherches sont réalisées pour créer de nouveaux médicaments qui seraient utilisables en chimiothérapie.

## 1.8 Le cisplatine

Rosenberg, un chercheur américain, et son équipe ont découvert il y a 40 ans les propriétés anticancéreuses du cisplatine (cis-diamminedichloroplatine(II)). (Kelland, 2007) Depuis ce temps, plusieurs drogues dérivées du platine (carboplatine, nedaplatine et oxaliplatine) ont été synthétisées et utilisées en cliniques (voir figure 1.10). (Coluccia et Natile, 2007) Le cisplatine est surtout utilisé pour les tumeurs solides des ovaires, des testicules, de la tête et du cou et du col de l'utérus. Par contre, il possède de nombreux effets secondaires tel que la néphrotoxicité, la neurotoxicité, l'ototoxicité et la perte de cheveux. (Cepeda et al., 2007) Bien que son utilisation clinique est limitée à cause des effets non-désirés qu'il provoque, il reste que cette drogue ainsi que son activité biologique sont l'objet de recherches les plus intenses qui existent dans le domaine.



**Figure 1.10: Cisplatine et ses analogues**

Le cisplatine est un agent alkylant bifonctionnel qui a comme principale cible la molécule d'ADN. Il peut induire deux différents modes de mort cellulaire, la nécrose ou l'apoptose. La nécrose est caractérisée par un gonflement cytosolique et une perte de l'intégrité de la membrane plasmique. De son côté, l'apoptose induit la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et la perte du volume cellulaire. L'apoptose est le résultat de l'activation de protéines faisant partie de la famille des caspases. Elle est la principale réponse des cellules au traitement chimiothérapeutique. (Wang et Lippard 2005)

Le cisplatine entre dans la cellule par diffusion passive selon un gradient de concentration. La concentration en ions chlore dans le sang est d'environ 100 mM et est plus élevée que dans la cellule où la concentration est d'environ 4 mM. Dans le sang, le cisplatine demeure dans une forme stable à cause de la haute concentration en ions chlore. Par contre, dans la cellule, la concentration plus faible en chlore facilite l'hydrolyse du cisplatine au cours de laquelle les ions chlore sont remplacés par des molécules d'eau. La configuration *cis* est toujours maintenue. (figure 1.11) (Ott et Gust, 2006) La perte des ions chlore entraîne la formation de complexes cationiques mono et diaqua. Ces complexes aqua sont beaucoup plus réactifs envers les molécules nucléophiles puisque l'eau ( $H_2O$ ) est un meilleur groupe sortant que le chlore.

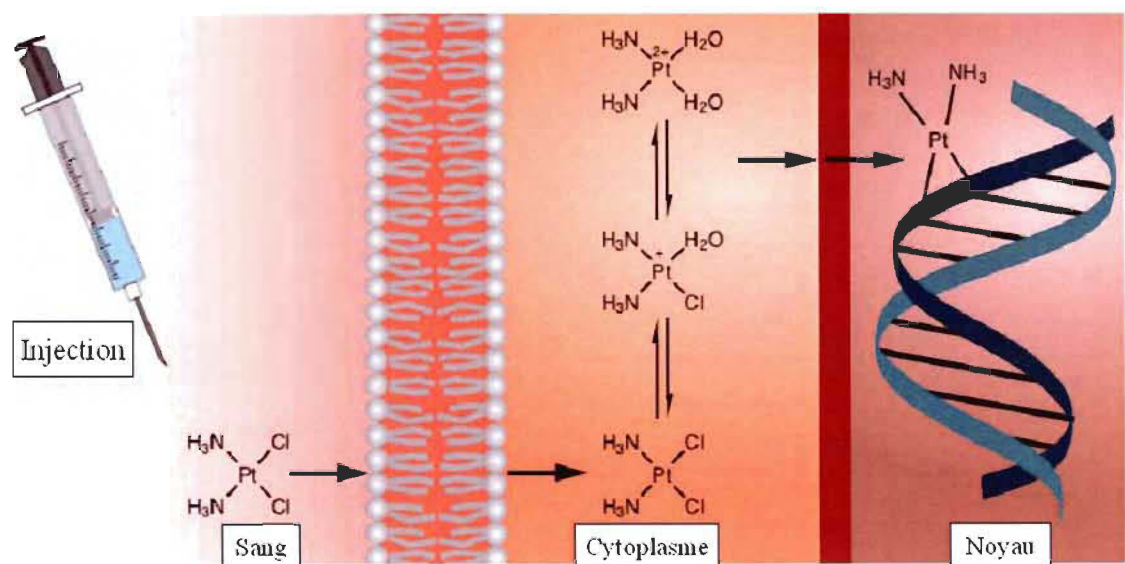
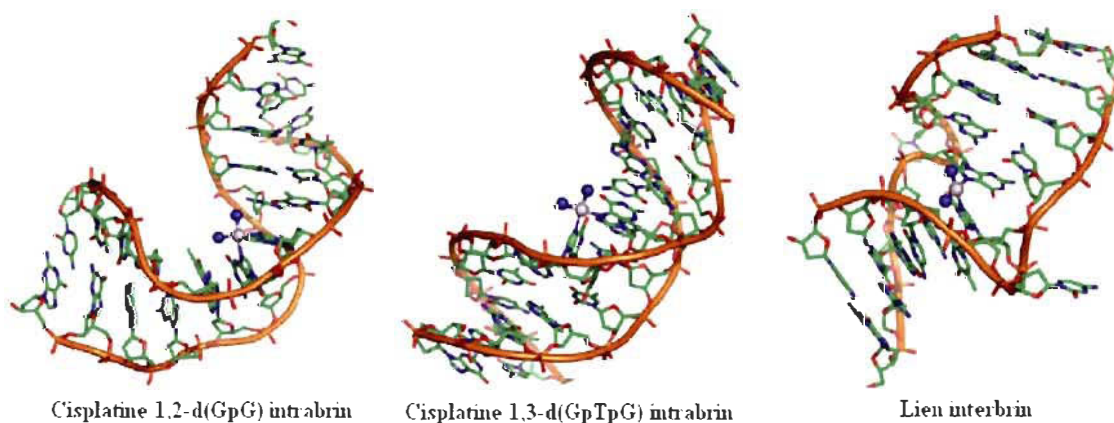


Figure 1.11: Mécanisme d'action du cisplatine dans une cellule (Tirée de Ott, 2006)

Le dérivé hydrolysé du cisplatine ne rediffuse pas rapidement à l'extérieur de la cellule avant de se lier à des cibles intracellulaires telles que l'ADN, l'ARN et des thiols comme la glutathione. Cette conversion du cisplatine en une forme incapable de quitter la cellule représente une excellente contribution à la cytotoxicité de la molécule. (Jung et Lippard, 2007) Des études récentes démontrent qu'une protéine transmembranaire de transport de cuivre, CTR1, aurait aussi un rôle à jouer dans le transport du cisplatine dans la cellule. (Kelland, 2007)

À cause de la haute concentration de nucléotides dans le noyau, l'ADN est le nucléophile qui réagira le premier avec le cisplatine une fois qu'il sera entré dans le noyau. L'azote 7 des bases de guanine situé dans le grand sillon de la double hélice est le site nucléophile le plus accessible et le plus nucléophile pour la coordination du platine. (Cepeda et al. 2007) Le cisplatine forme tout d'abord un lien monofonctionnel avec l'ADN et ensuite il réagit une seconde fois avec cette molécule pour former des liens bifonctionnels interbrins ou intrabrins (figure 1.12). Par conséquent, l'analyse d'échantillons d'ADN traité avec le cisplatine démontrent que 60% à 65% de ces liens sont des liens intrabrins 1,2-d(GpG), 20% à 25% sont des liens intrabrins 1,2-d(ApG) et 5% à 10% sont des liens intrabrins 1,3-d(GpNpG) (N représente un nucléotide quelconque). Un faible pourcentage de liens interbrins bifonctionnels ou de liens monofonctionnels est aussi retrouvé. (Cepeda et al., 2007)



**Figure 1.12: Différentes conformations adoptées par le cisplatine et l'ADN (Tirée de Jung, 2007)**

Il est généralement indiqué que le lien intrabrin-1,2 est celui qui est responsable de la cytotoxicité du cisplatine malgré que ce ne soit pas un fait prouvé. Cette hypothèse est basée sur la découverte que certaines protéines reconnaissent spécifiquement ce type de liens sur l'ADN et peuvent réguler la formation des liens intrabrins-1,2 formés par le cisplatine. De plus, le système de réparation par excision de nucléotides (NER), un important système de réparation de l'ADN, réparerait les liens intrabrins-1,3 avec une plus haute efficacité que les liens intrabrins-1,2.

La géométrie du cisplatine joue un rôle important dans son action envers l'ADN. La disposition des atomes de chlore est essentielle pour sa cytotoxicité connue. En effet, l'isomère *trans* (voir figure 1.10, page 14), le transplatine, s'avère inactif *in vivo* sur des modèles tumoraux. Deux principaux facteurs pourraient contribuer à cette différence d'activité anticancéreuse des deux isomères, *cis* et *trans*. (Coluccia et Natile, 2007) Premièrement, les espèces de chlore *trans* sont cinétiquement plus réactives que celles de l'isomère *cis*. Les réactions non-désirées pourraient contribuer à la perte de l'activité pharmacologique. De plus, la lésion cytotoxique majeure formée de l'ADN et du cisplatine, les liens intrabrins-1,2 entre les purines, est stéréochimiquement inaccessible à l'isomère *trans*.

## 1.9 Le chlorambucil

Ce médicament est une moutarde azotée aromatique qui a fait son apparition dans les années 50. Les moutardes azotées sont des analogues du gaz moutarde à base de soufre qui ont été utilisés pendant la Première Guerre Mondiale. Le chlorambucil (figure 1.13) est moins toxique que d'autres moutardes azotées. Ces effets secondaires sont la nausée, la suppression de la moelle osseuse et des éruptions cutanées. (Montserrat et Rozman, 1993) De plus, il est surtout utilisé pour traiter la leucémie lymphoïde chronique.

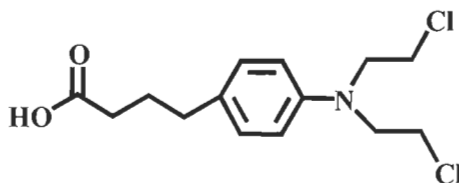
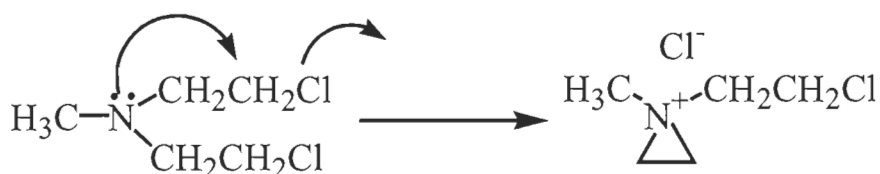


Figure 1.13: Structure moléculaire du chlorambucil



Comme le cisplatine, le chlorambucil est un agent alkylant, une des premières drogues anticancéreuses développées, qui réagit avec l'azote 7 des guanines de la molécule d'ADN. Le groupement déficient en électron (acide de Lewis) d'un azote moutarde réagit avec le groupement riche en électron (base de Lewis) de la molécule cible (ADN). Il est démontré dans la figure 1.14 qu'une moutarde azotée aliphatique forme rapidement un ion aziridinium par déplacement intramoléculaire d'un atome de chlore par un atome d'azote. (Neidle et Thurston, 2005)

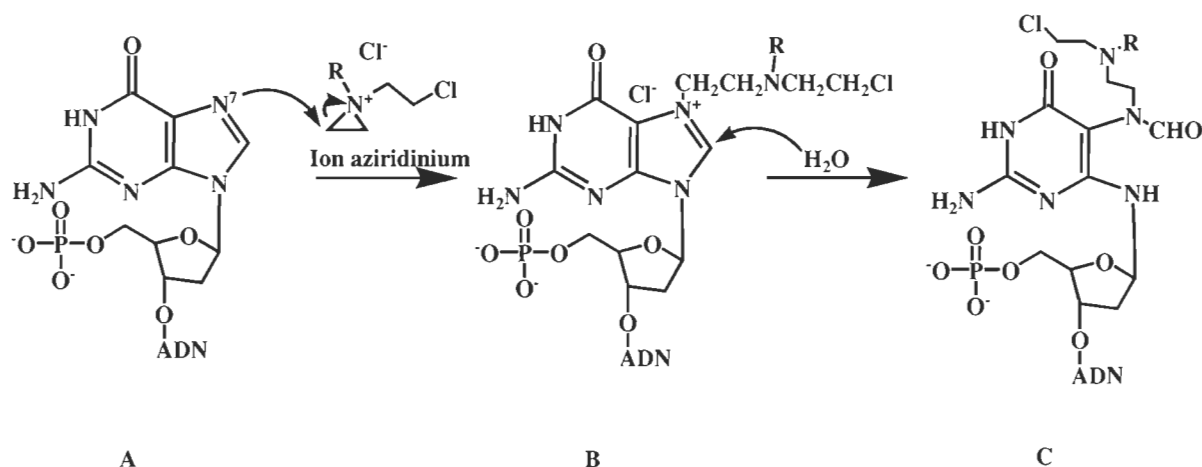


**Figure 1.14: Formation de l'ion aziridinium**

Par contre, le chlorambucil, une moutarde azotée aromatique, ne forme pas rapidement cet ion aziridinium à cause de la faible nucléophilicité de son atome d'azote. L'atome d'azote d'un composé moutarde aromatique n'est pas assez basique pour former un ion aziridinium rapidement parce que la paire d'électrons sur l'azote est délocalisée par l'interaction avec les électrons  $\pi$  du cycle aromatique. Cette plus grande stabilité explique pourquoi ce médicament peut être donné aux patients par voie orale. Il est résistant dans une solution aqueuse ou dans un environnement acide comme celui de l'estomac. (Hernandez et Rathinavelu, 2006)

Le chlorambucil entre à l'intérieur de la cellule par diffusion passive selon un gradient de concentration. La concentration en ions chlore est plus élevée dans la circulation sanguine (100 mM) que dans le cytoplasme (4 mM). Une fois dans la cellule, l'agent chimiothérapeutique peut former sa forme active, l'ion aziridinium, où il réagira avec l'azote 7 d'une base azotée, principalement la guanine (figure 1.15; **A**→**B**). Par la suite, une molécule d'eau attaquera le produit d'addition dans le but d'ouvrir ce cycle et de le désactiver (figure 1.15; **B**→**C**). Ces liens monofonctionnels formés du chlorambucil et de l'ADN constituent l'effet cytotoxique de ce médicament qui inhibe la réplication et la transcription. Le chlorambucil peut aussi se lier à l'ARN, des protéines et même la

membrane cellulaire. (Begleiter et al., 1996) La figure suivante présente le mécanisme par lequel la molécule chimiothérapeutique se lie sur l'ADN.

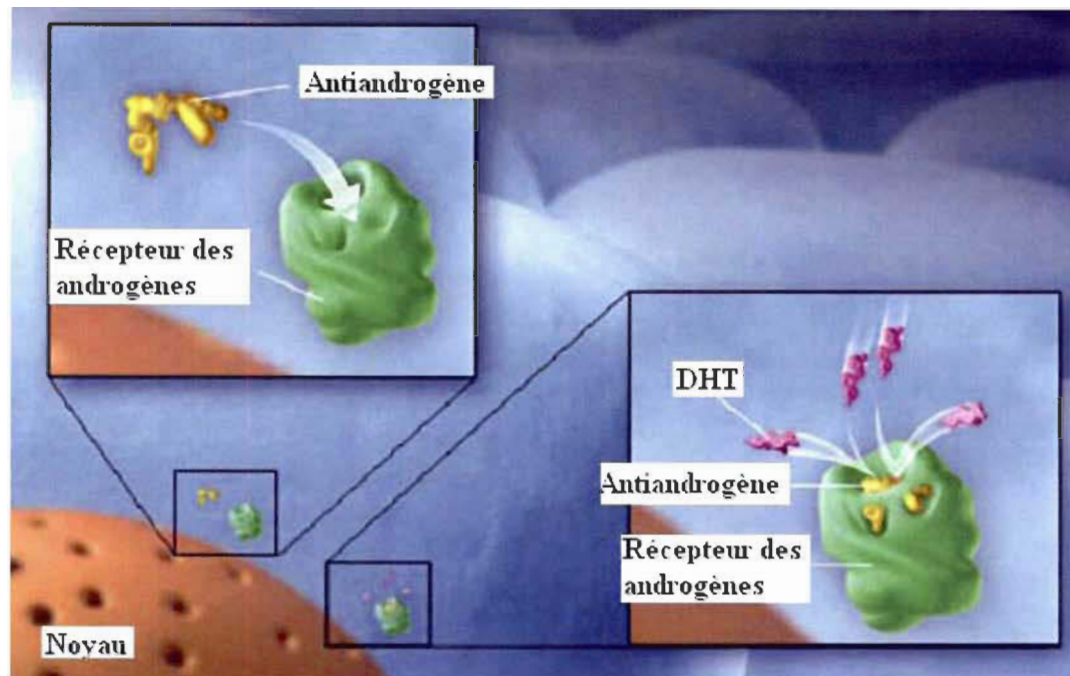


**Figure 1.15: Mécanisme d'action du chlorambucil**

## 1.10 Les antiandrogènes

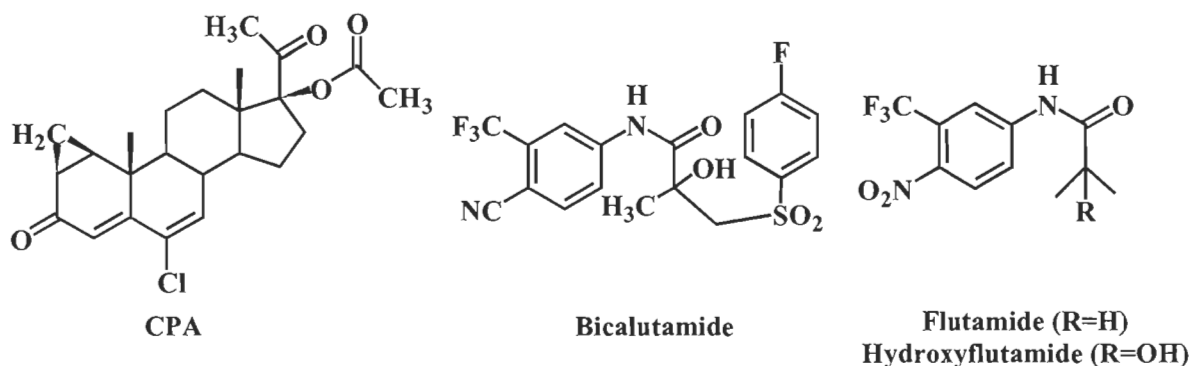
Les antiandrogènes font partie du groupe des antagonistes du récepteur des androgènes (AR) capables de prévenir ou d'inhiber les effets biologiques des androgènes, les hormones sexuelles masculines. Ils empêchent, donc, les androgènes de se fixer sur le site de liaison des récepteurs des androgènes (AR) ce qui prévient le récepteur d'obtenir sa forme active entraînant l'inhibition de la transcription des gènes (figure 1.16). Ils sont utilisés pour traiter l'hypertrophie bénigne de la prostate et le cancer de la prostate. Un antiandrogène doit, alors, posséder une haute affinité envers le récepteur des androgènes sans pour autant avoir une activité hormonale ou une action envers d'autres récepteurs nucléaires. (Labrie et al., 1993)





**Figure 1.16: Mode d'action des antiandrogènes (Tirée de [www.prostateinfo.com](http://www.prostateinfo.com))**

Il existe deux types d'antiandrogènes : stéroïdiens et non-stéroïdiens. Parmi les antiandrogènes stéroïdiens, nous retrouvons l'acétate de cyprotérone (CPA). La structure moléculaire de l'acétate de cyprotérone ressemble fortement à celle de la testostérone (figure 1.17). Il cause une réduction de la grosseur de la tumeur cancéreuse, une élimination de l'hormone lutéinisante et une diminution du niveau de testostérone. (Isurugi et al., 1980) Les effets secondaires de ce médicament sont l'impuissance et l'infertilité. Puisqu'il possède une structure moléculaire ressemblant aux androgènes, le CPA stimule l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes à de hautes concentrations. Évidemment, cette caractéristique limite son utilisation clinique dans le traitement du cancer de la prostate. (Culig et al., 2004 )



**Figure 1.17: Différents antiandrogènes, stéroïdiens et non-stéroïdiens, utilisés en clinique**

Parmi les antiandrogènes non-stéroïdiens, nous retrouvons le bicalutamide et le flutamide (voir figure 1.17). Ces molécules sont appelées des antiandrogènes purs puisqu'ils possèdent peu d'activité hormonale lorsqu'ils se lient au récepteur des androgènes, ont une haute affinité envers son récepteur et ne se lient pas aux autres récepteurs stéroïdiens. De plus, ces ligands sont administrés de manière orale et ont une demi-vie de 8 heures à 6 jours chez les humains. Le flutamide est absorbé, le lien amide ( $\text{O}=\text{C}-\text{NH}$ ) de la molécule est hydrolysé et le 2-hydroxyflutamide, le métabolite actif est synthétisé. In vivo, l'hydroxyflutamide est un antiandrogène plus puissant que le flutamide avec sa plus haute affinité sur le AR. Puisque le flutamide possède une faible affinité envers le récepteur des androgènes, il peut être administré à de fortes doses dans le but de bloquer complètement le récepteur. (Gao et al., 2006)

De son côté, le bicalutamide a remplacé le flutamide comme antiandrogène de choix pour le traitement du cancer de la prostate puisqu'il possède une plus faible hépatotoxicité et une plus grande demi-vie. Cela permet une administration à plus faible dose. Bien que le lien amide se retrouve aussi dans la structure du bicalutamide, l'hydrolyse de ce lien n'est pas observée chez l'humain ce qui pourrait prolonger sa demi-vie. Le remplacement du groupement nitrile par un groupement cyanure permet d'éviter la réduction du groupement nitrile qui serait associé avec l'hépatotoxicité chez l'homme spécialement à de fortes doses. (Gao et al., 2006)

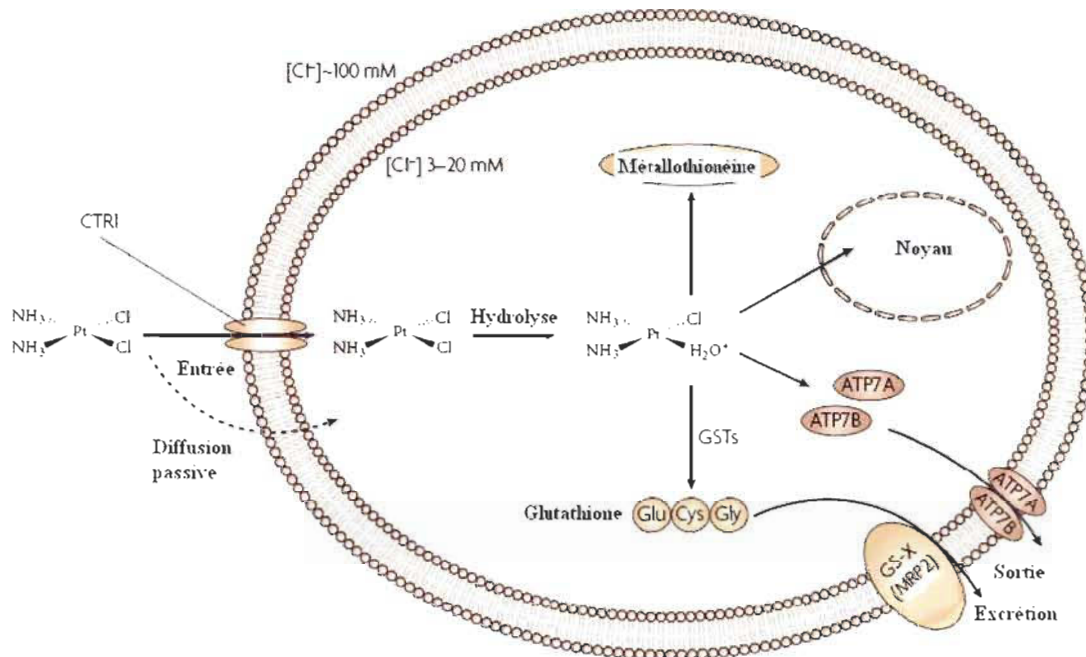
La plus grande spécificité et les caractéristiques pharmacologiques des antiandrogènes non-stéroïdiens procurent à ces médicaments une meilleure efficacité pour le traitement du cancer de la prostate. Malheureusement, un problème majeur apparaît pour le développement de nouveaux antiandrogènes. En effet, les stades avancés de ce cancer sont hormono-indépendants ce qui veut dire que la tumeur croît malgré le traitement avec des antiandrogènes. Plusieurs recherches sont en cours pour synthétiser des molécules qui seraient actives simultanément dans les deux types de lignées tumorales, hormono-dépendants et hormono-indépendants.

### **1.11 La résistance envers la chimiothérapie**

La résistance des cellules cancéreuses envers les agents chimiothérapeutiques est un problème majeur dont les cliniciens peuvent avoir à faire face lors d'un traitement. Les mécanismes par lesquels une cellule peut devenir résistante au cisplatine ou au chlorambucil sont semblables. Cette résistance peut être causée par deux principaux mécanismes : le manque de cisplatine atteignant l'ADN et l'échec de la cellule à démarrer le processus de la mort cellulaire, l'apoptose. (Kelland, 2007) Tout d'abord, les cellules tumorales sont capables de réduire l'accumulation du cisplatine dans le cytoplasme en comparaison avec les cellules normales. Le cisplatine est hautement polaire et entre dans la cellule assez lentement. Son entrée est influencée par plusieurs facteurs comme le pH, la concentration en sodium et potassium, la présence d'agents réducteurs et l'action d'une protéine transporteuse du cuivre (CTR1).

Par contre, d'autres molécules sont responsables de la sortie du cisplatine à l'extérieur de la cellule (figure 1.18). La surexpression d'une glycoprotéine-P (Pgp) ATP-dépendante représente une barrière importante du traitement chimiothérapeutique. MRP1 et MRP2 (multidrug resistance proteins) sont aussi impliqués dans la résistance. (Sharma et Piwnicka-Worms, 1999) Des protéines transporteuses du cuivre, ATP7A et ATP7B, ont démontré avoir un lien avec la résistance du cisplatine. En effet, une surexpression d'ATP7B est associée avec un échec (diminution du succès) du traitement du cisplatine chez des patients. Cette protéine serait impliquée dans la sortie du médicament hors de la

cellule. (Stewart, 2007) De plus, le cisplatine peut aussi se lier fortement à des groupements soufrés. Ces molécules, comme le tripeptide glutathion et les métallothionéines, sont riches en cystéine et méthionine, des acides aminés soufrés. Sa liaison avec le glutathion, catalysée par la glutathion-S-transférase, rend le cisplatine plus anionique et ce complexe est plus rapidement exporté à l'extérieur de la cellule par des protéines transporteuses (GS-X, MRP2). (Kelland, 2007)



**Figure 1.18: Mécanismes de résistance du cisplatine (Tirée de Kelland, 2007)**

La deuxième raison principale pour laquelle une cellule peut devenir résistante envers le cisplatine est liée à la réparation des lésions de l'ADN. Le système de réparation par excision de nucléotides (NER) reconnaît certaines liaisons cisplatine-ADN mais ne répare pas la liaison intrabrin-1,2, la lésion principale créée par le cisplatine. Cela entraîne, normalement, le déclenchement de l'apoptose. Par contre, une surexpression des gènes NER entraîne une résistance à ce médicament dans les cellules tumorales. (Rabik et Dolan, 2007) L'implication de la voie de la réparation des mauvais appariements (mismatch repair, MMR) a aussi été proposée dans la résistance chimiothérapeutique. Les cellules déficientes en ce mécanisme sont 2 à 3 fois plus résistantes aux traitements avec le cisplatine. (Stojic et al., 2004)

## 2. Objectifs du projet

### 2.1 Synthèse d'un composé hybride testostérone-chlorambucil anticancéreux

Les travaux de l'équipe du laboratoire de M. Gervais Bérubé, professeur et chercheur à l'Université du Québec à Trois-Rivières, consistent à tenter de fabriquer des nouveaux types de molécules anticancéreuses ciblant les cancers féminins du sein, de l'utérus et des ovaires. En effet, son équipe fait appel au ciblage thérapeutique du cisplatine en liant ce médicament à l'hormone sexuelle féminine, l'estradiol, la molécule transporteuse qui permettra d'apporter le cisplatine à un endroit plus précis dans l'organisme.

Cette hormone active un récepteur spécifique dans les cellules, le récepteur des estrogènes, et par conséquent, la croissance de plusieurs organes féminins tels que les seins, l'utérus et les ovaires. D'autres cellules possèdent aussi ce récepteur, mais les cellules des organes sexuels féminins possèdent un plus grand nombre de ce récepteur. Ce récepteur important représente donc une cible intéressante pour la conception de nouveaux médicaments anticancéreux. Plusieurs molécules ont alors été synthétisées en combinant le cisplatine et l'estradiol par une chaîne alkyle en position 16 du noyau stéroïde (figure 2.1). (Descôteaux, 2006) (Perron et al., 2005)

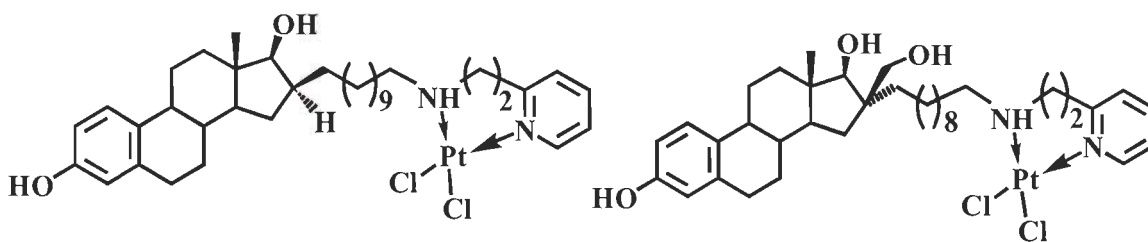


Figure 2.1: Complexes estradiol-platinum(II) synthétisés dans le laboratoire du professeur Gervais Bérubé

La collaboration avec l'équipe du Dr Éric Asselin est aussi très importante. Il a été possible de vérifier l'activité biologique de ces complexes sur des lignées cellulaires cancéreuses. Ces molécules se sont avérées plus cytotoxiques *in vitro* et *in vivo* que le cisplatine seul.

Les travaux de ce mémoire porteront sur la synthèse de nouvelles molécules anticancéreuses dans le but de traiter le cancer de la prostate. En effet, nous avons voulu appliquer, aux cancers masculins, nos connaissances du ciblage thérapeutique des cancers féminins. Le premier objectif a consisté à synthétiser un hybride cytotoxique composé de la testostérone et du chlorambucil, un médicament utilisé en chimiothérapie. L'endroit le plus stratégique pour ajouter la molécule chimiothérapeutique sur la testostérone est le carbone 7. Effectivement, ce carbone est situé à mi-distance entre les deux groupements, la cétone (carbone 3) et l'alcool (carbone 17) qui interagissent avec le récepteur des androgènes. Des études ont démontré que modifier l'encombrement stérique des groupements alcool de l'estradiol changeait l'affinité de l'hormone sur le récepteur des estrogènes. (Hsieh et al., 2006) Il ne faut donc pas modifier ces deux groupements fonctionnels ou augmenter l'encombrement stérique autour de ces derniers car ils sont importants pour la liaison au récepteur des androgènes.

Par contre, le problème majeur de cette position est l'absence de groupement fonctionnel permettant des transformations chimiques. Il n'y a pas vraiment de site de réaction près de la position 7 comme une double liaison ou un autre groupement fonctionnel. Donc, ce genre de groupement doit être introduit avant d'ajouter une chaîne sur ce carbone.

Premièrement, la préparation de la position 7 du stéroïde a été effectuée en deux étapes. Une chaîne allyle a, alors, été ajoutée de façon stéréospécifique dans le but de fonctionnaliser cette position. Le couplage du chlorure d'allyle et de cette chaîne allyle à l'aide de la métathèse de Grubbs a eu lieu dans le but d'obtenir un halogène (un atome de chlore) en bout de chaîne constituant un bon groupe sortant. Ensuite, des essais de substitution nucléophile de l'atome de chlore ont été effectués pour vérifier la capacité ou



l'habileté de cet atome à se faire substituer ou remplacer par différents nucléophiles. Enfin, le couplage de la testostérone (T) et du chlorambucil a été réalisé pour obtenir la molécule hybride finale contenant une chaîne liante composée d'une double liaison et d'un groupement ester. La rétrosynthèse de cet hybride testostérone-chlorambucil est représentée à la figure suivante.

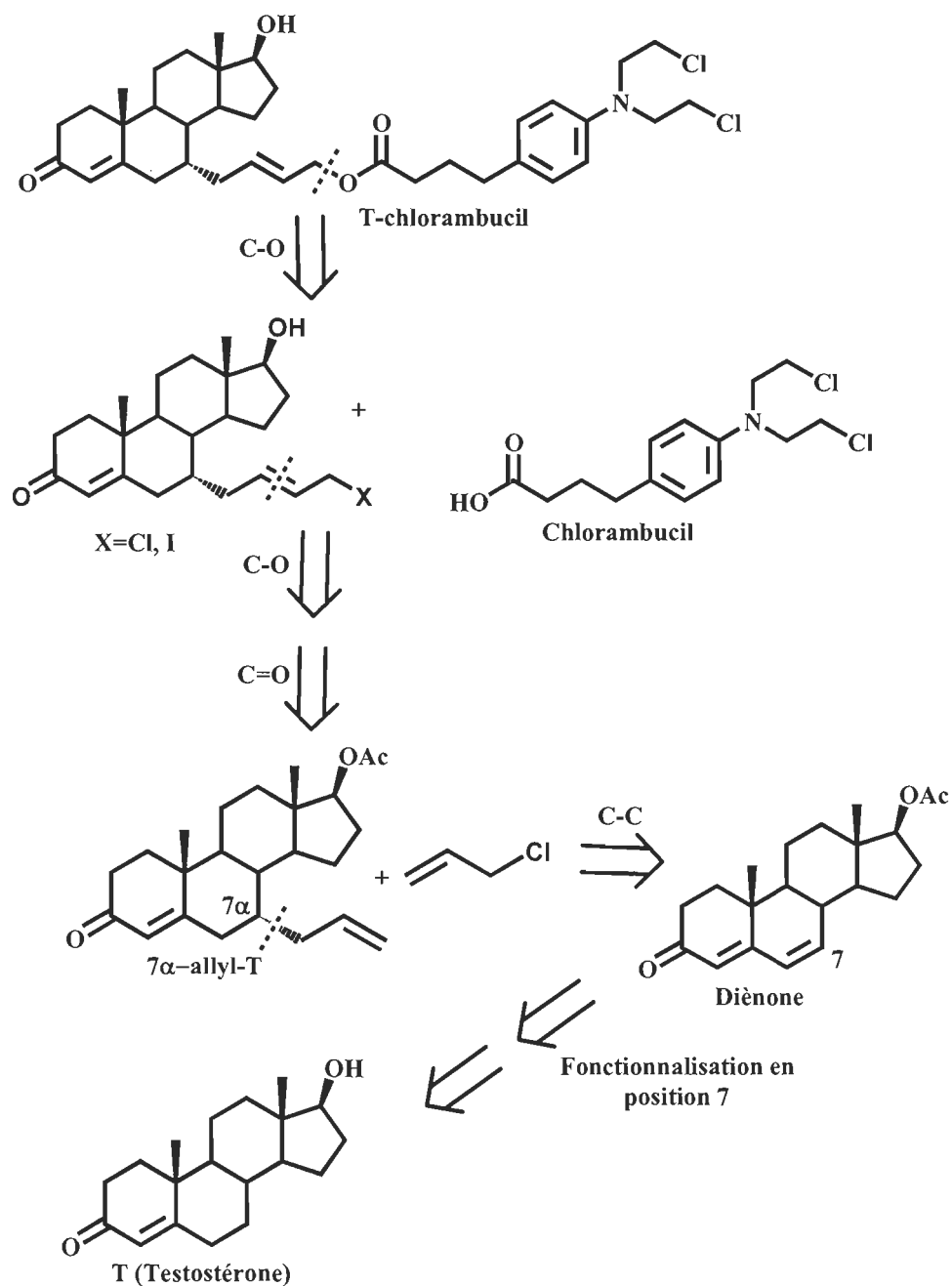


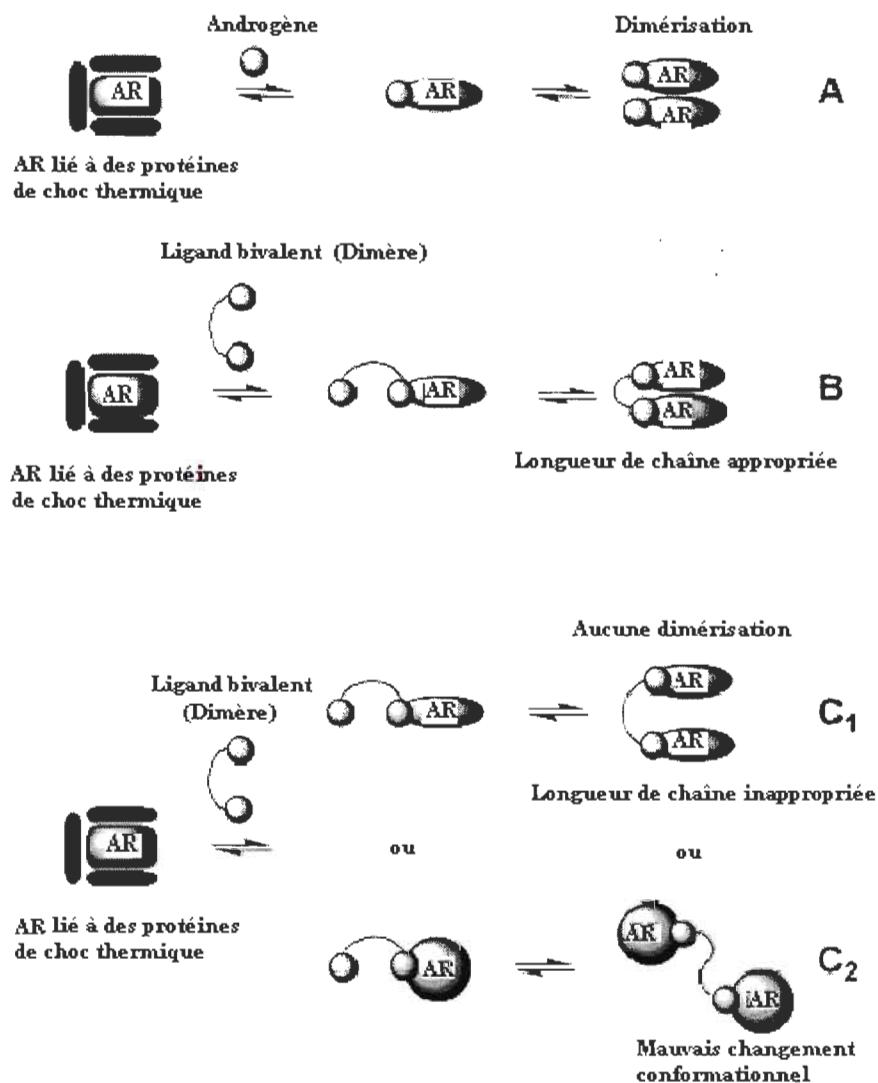
Figure 2.2 :Rétrosynthèse du composé testostérone-chlorambucil

## 2.2 Synthèse des dimères de testostérone

La seconde partie de ce projet a consisté à la synthèse de dimères de testostérone. Nous espérons que ces nouvelles molécules auraient une activité antiandrogénique. En biologie, les dimères sont très fréquents dans les mécanismes cellulaires. En effet, plusieurs récepteurs (ex. : récepteurs nucléaires) doivent se dimériser pour devenir actifs. La théorie suggère que l'augmentation de la sélectivité ou de l'activité biologique est causée par la présence de deux sites voisins de liaison et que ces sites peuvent être situés sur deux récepteurs distincts. (Portoghese, 1992) Nous avons, donc, trouvé intéressant le concept des dimères de testostérone. Ces dimères sont conçus pour lier simultanément deux récepteurs des androgènes. La dimension de l'espaceur entre les deux molécules de testostérone joue un rôle important dans l'activité du dimère. La longueur, la géométrie, la mobilité conformationnelle de cet espaceur influencent grandement l'orientation de la molécule de testostérone du dimère non-lié au récepteur.

En d'autres termes, cela signifie que si le dimère (le ligand) possède la bonne longueur de chaîne liante, il se fixera au récepteur et la dimérisation (activation) du récepteur aura lieu comme prévu (figure 2.3; situation B). Par contre, si la chaîne liante est plus longue, elle permettra au dimère d'éloigner les deux récepteurs à une distance suffisante pour empêcher la dimérisation du récepteur (figure 2.3; situation C<sub>1</sub>). De plus, si le ligand bivalent n'induit pas le bon changement conformationnel, aucune dimérisation du récepteur sera possible (figure 2.3; situation C<sub>2</sub>). (Bérubé, 2006)





**A :** Situation classique; **B :** Dimère avec une chaîne liante de longueur appropriée; **C<sub>1</sub> :** Dimère avec une chaîne liante de longueur inappropriée; **C<sub>2</sub> :** Dimère induisant un changement conformationnel différent

**Figure 2.3 : Mode d'action des molécules dimériques sur le récepteur (Adaptée de Bérubé, 2006)**

Donc, nous avons appliqué ces connaissances dans le cadre de la synthèse des dimères de testostérone. Comme pour la 1<sup>ère</sup> partie du projet, la molécule de départ utilisée a été la testostérone. De plus, les trois premières réactions sont aussi les mêmes c'est-à-dire, la fonctionnalisation de la position 7 du stéroïde et l'ajout de la chaîne allyle

sur ce carbone. Ensuite, le couplage de la testostérone sur elle-même a été effectué à l'aide de la métathèse de Grubbs pour obtenir les dimères de testostérone. En principe, sur des alcènes simples, la métathèse de Grubbs donne presque exclusivement un alcène *trans*. Théoriquement, deux dimères de la testostérone pourraient être formés via la métathèse de Grubbs soient le *trans*-T<sub>2</sub> et le *cis*-T<sub>2</sub>. La figure suivante présente la rétrosynthèse des dimères de testostérone.

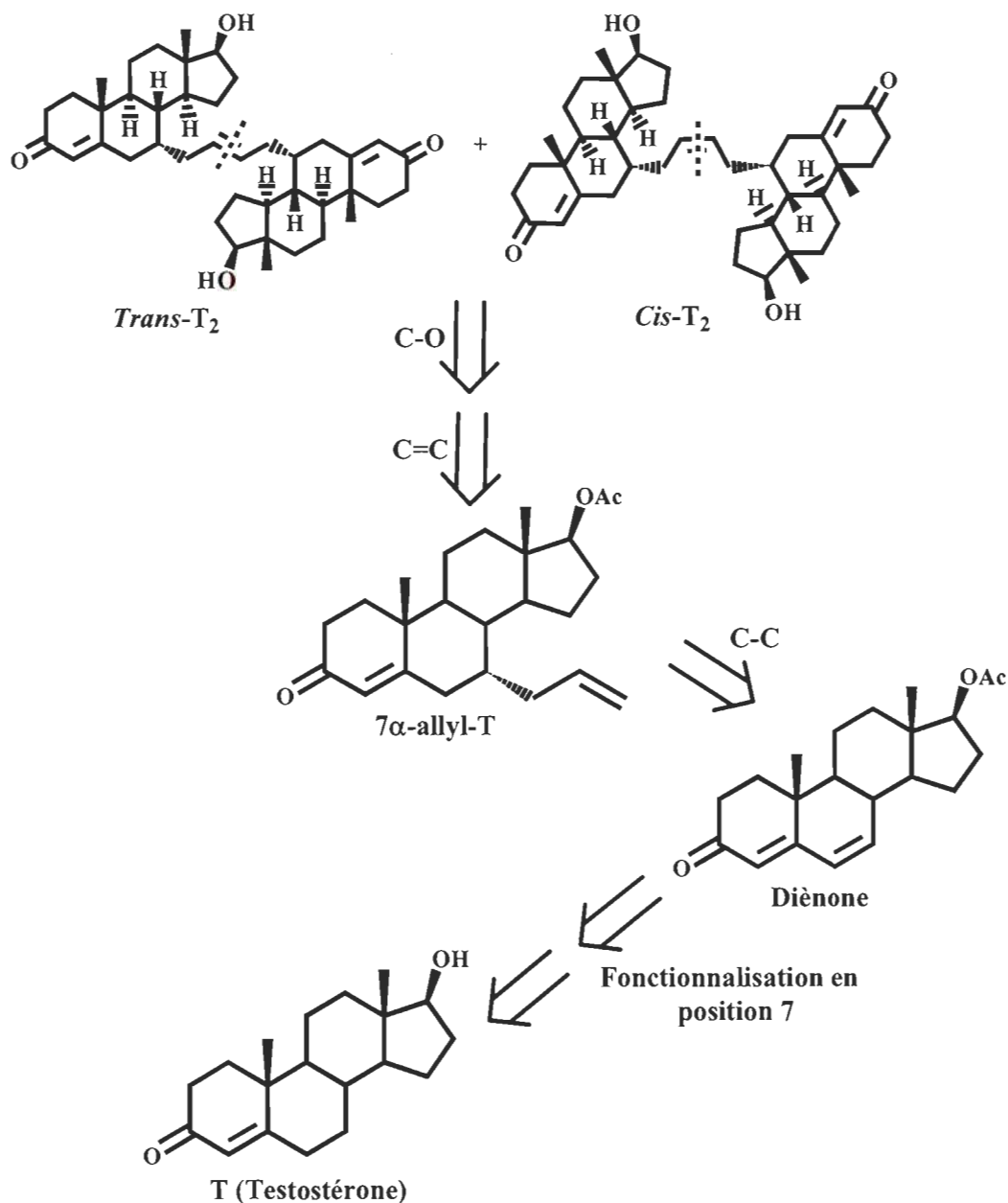


Figure 2.4: Rétrosynthèse des dimères de testostérone

## 2.3 Activité biologique

Le prochain objectif a consisté à l'évaluation biologique des trois molécules synthétisées au cours de ce projet. Ces tests ont été effectués sur des lignées cellulaires cancéreuses de la prostate hormono-dépendantes (LnCaP, AR<sup>+</sup>) et hormono-indépendantes (PC3, AR<sup>-</sup>). Ces lignées cellulaires sont celles qui sont le plus utilisées dans la littérature et constituent les modèles idéals pour étudier l'effet biologique d'un composé anticancéreux ou antiandrogénique sur ce genre de cancer.

Des tests *in vitro* ont, donc, été réalisés sur ces cellules en culture. Nous avons effectué des essais colorimétriques de prolifération de cellulaire au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazoline) à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> et à un temps d'incubation de 72 heures. Si les cellules sont encore vivantes après un traitement avec une molécule toxique, en d'autres termes si elles prolifèrent, nous pouvons observer un changement de couleur de l'indicateur MTT passant du jaune au bleu par réduction au niveau des mitochondries. Cela nous donne un paramètre mesurable et quantifiable de l'activité cytotoxique des molécules testées.

Pour ce faire, nous avons utilisé deux types cellulaires différents comme mentionné ci-dessus. La lignée cellulaire LnCaP (AR<sup>+</sup>) provient d'un carcinome de ganglions lymphatiques de la prostate. [ATCC] Bien que ces cellules ne contiennent aucun récepteur de stéroïde autre que le récepteur des androgènes, leur croissance peut être stimulée par d'autres hormones telles que l'estradiol ou la progestérone. De plus, ce récepteur possède une mutation dans le domaine de liaison au ligand au niveau de l'acide aminé 868 entraînant le remplacement d'une thréonine par une alanine. Cette lignée est la seule lignée cellulaire humaine disponible qui présente une dépendance aux hormones et une croissance continue *in vitro*. (Veldscholte et al., 1992)

La seconde lignée utilisée (PC3, AR<sup>-</sup>) d'un stade 4 d'adénocarcinome de la prostate et possède une faible activité de l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase. [ATCC] Cette lignée présente aussi une faible expression du récepteur des androgènes. (Alimirah et al., 2006)

L'évaluation biologique des 2 dimères de testostérone a été complétée avec 4 essais (n=4). En ce qui concerne l'hybride testostérone-chlorambucil, 3 essais (n=3) ont été suffisants pour compléter les analyses biologiques de cette molécule.

Dans la partie résultat, nous verrons en détails la synthèse des différentes molécules ainsi que les résultats de l'évaluation biologique des nouveaux composés.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1 Synthèse de l'hybride cytotoxique testostérone-chlorambucil

La figure suivante présente la synthèse complète de la molécule **10** anticancéreuse. Les prochaines sections détailleront chacune des étapes chimiques.

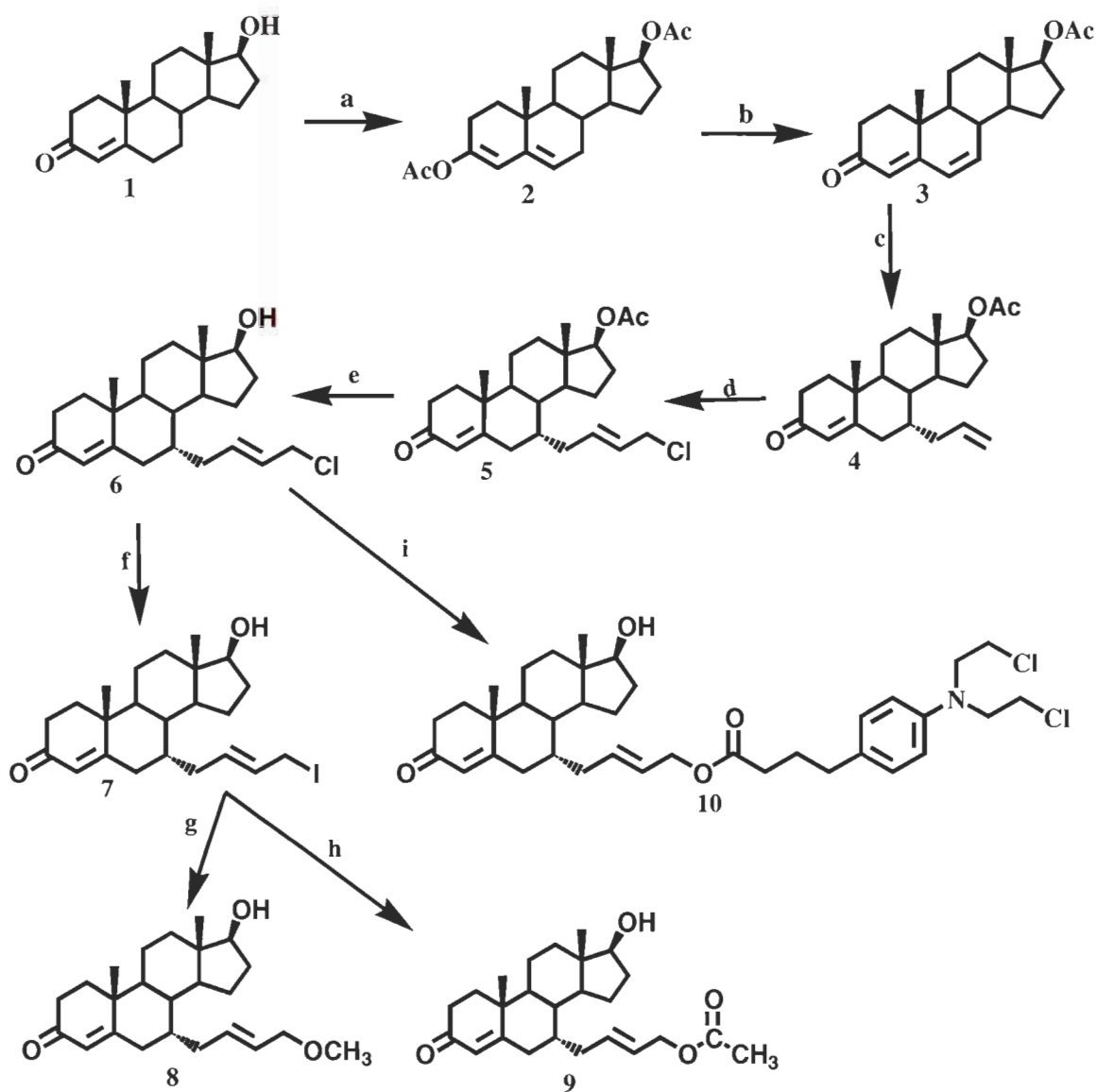
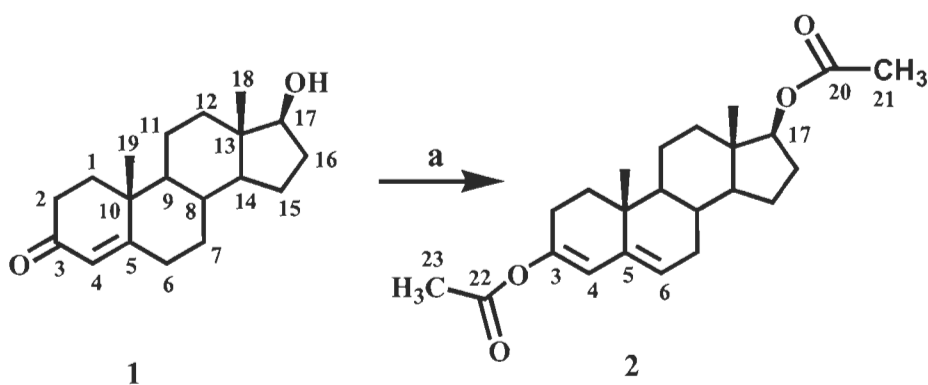


Figure 3.1 : Synthèse globale de la molécule hybride testostérone-chlorambucil

### 3.1.1 Préparation de la testostérone en position 7 du noyau stéroïde

Tout d'abord, la préparation de la position 7 se fait en deux étapes. La première étape consiste à la synthèse d'un diacétate permettant de protéger les deux groupes fonctionnels de la testostérone, de déplacer la double liaison du cycle A sur le carbone précédent et de créer une seconde double liaison dans le cycle B (figure 3.2). La testostérone a été transformée en diacétate de 3,5-androstadièn-3,17 $\beta$ -diol (**2**) (Bucourt et al., 1978) en présence de chlorure d'acétyl et de pyridine dans l'anhydride acétique. Le rendement de cette réaction est de 90%.



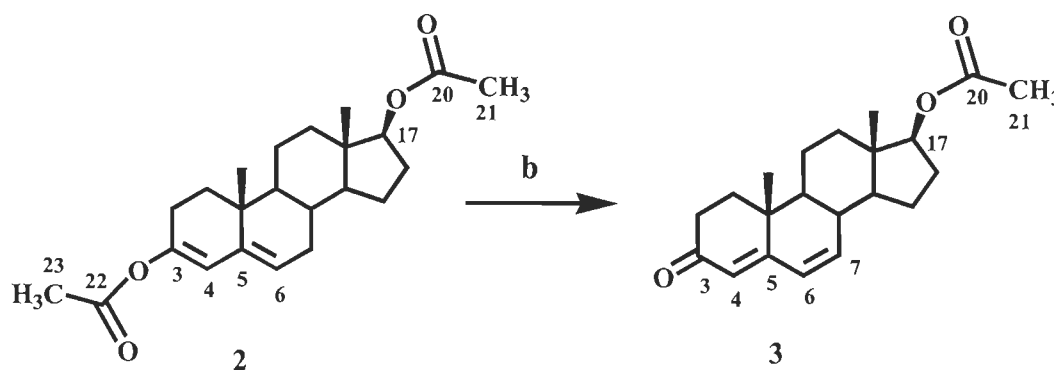
Réactifs: a) AcCl, Ac<sub>2</sub>O, Pyr, reflux, 4 h, 90%

**Figure 3.2:** Synthèse du diacétate de 3,5-androstadièn-3,17 $\beta$ -diol (**2**)

Les spectres RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C confirment la structure de la molécule **2**. Comparativement au spectre de la molécule de testostérone (**1**), deux singulets, situés à 2,02 ppm et 2,11 ppm et correspondant aux groupements CH<sub>3</sub> des acétates apparaissent sur le spectre RMN-<sup>1</sup>H. De plus, un nouveau triplet se situe à 5,36 ppm correspondant au proton alcénique du carbone 6. L'environnement du proton en position 17 change d'un groupement alcool (3,62 ppm) à un groupement acétate (4,60 ppm). Le spectre RMN-<sup>13</sup>C démontre la disparition du signal du carbone 3 à 199,7 ppm (carbone d'une cétone) et le déplacement de ce signal à 147,3 ppm (carbone portant un acétate). Nous observons aussi l'apparition de nouveaux carbones correspondant aux carbones des carbonyles des

groupements acétate à 169,58 ppm et 171,45 ppm ainsi que le déplacement de la position des carbones C-17 de 81,9 ppm à 82,94 ppm et C-5 de 171,4 ppm à 139,66 ppm.

Par la suite, le diacétate **2** est mis en contact avec le *N*-bromosuccinimide (NBS) dans le diméthylformamide (DMF) dans un premier temps et avec le carbonate de lithium ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) et le bromure de lithium (LiBr) dans un deuxième temps (figure 3.3). Elle a permis d'obtenir l'acétate de 4,6-androstadièn-17 $\beta$ -ol-3-one (**3**) avec un rendement de 76%. (Bucourt et al., 1978) Cette réaction permet de déprotéger le groupement cétone situé sur le carbone 3 et de déplacer les deux doubles liaisons sur le carbone suivant. La molécule **3** possède, alors, un site réactionnel nous permettant d'ajouter une chaîne allyle à l'étape subséquente.



Réactifs: b) 1. NBS, DMF, 0°C, 1,5 h; 2.  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ , LiBr, 92°C, 4 h, 76%

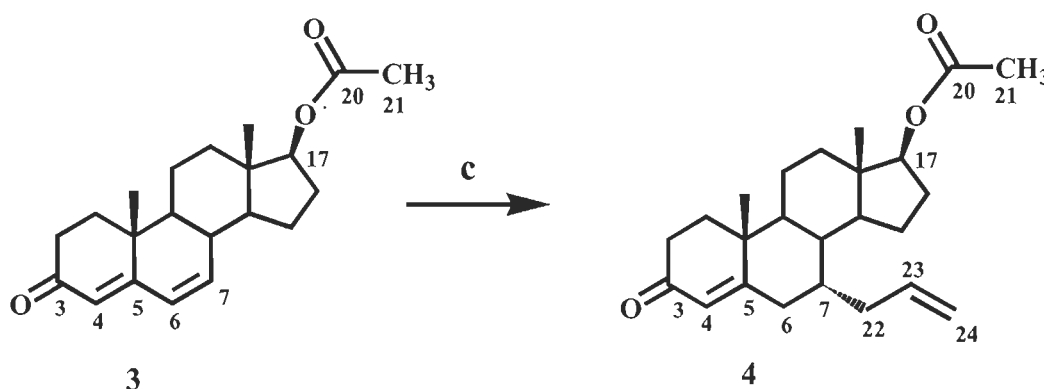
**Figure 3.3: Synthèse de l'acétate de 4,6-androstadièn-17 $\beta$ -ol-3-one (**3**)**

Le RMN- $^1\text{H}$  montre l'apparition d'un singulet à 6,09 ppm correspondant aux deux protons oléfiniques des carbones 6 et 7 et la disparition du signal à 2,11 ppm du méthyle du groupement acétate situé sur le carbone 3 dans la molécule **2**. De son côté, le spectre RMN- $^{13}\text{C}$  permet de confirmer la structure de la molécule **3** puisque nous voyons l'apparition du signal de la cétone sur le carbone 3 à 199,78 ppm et la disparition du pic du groupement carbonyle de l'acétate à 169,58 ppm. De plus, nous observons une

modification du déplacement chimique de la position des signaux des carbones 4 et 5 allant respectivement de 117,13 ppm à 128,41 ppm et de 139,66 ppm à 163,76 ppm.

### 3.1.2 Fonctionnalisation de la position 7 $\alpha$ de la testostérone

La troisième étape consiste à la fonctionnalisation de la position 7 du noyau stéroïde dans le but d'obtenir l'acétate de 7 $\alpha$ -allyl-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one (**4**). (Laurent, 1988) La diènone **3** est traitée, à basse température, avec le tétrachlorure de titane (TiCl<sub>4</sub>) et l'allyltriméthylsilane dans le dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) en présence de pyridine (figure 3.4). Le rendement de cette réaction est de 65%. La chaîne allyle ajoutée sur le carbone de façon stéréospécifique en position  $\alpha$  constitue une sorte de « bras » nous permettant d'introduire à la molécule différents groupements fonctionnels. Ces groupements nous aideront, plus tard, à coupler une molécule chimiothérapeutique à la molécule de testostérone.



Réactifs: c) 1. TiCl<sub>4</sub>, Pyr, DCM, -78°C, 5 min;  
2. Allyltriméthylsilane, -30°C, 1,5 h, 65%

**Figure 3.4: Synthèse de l'acétate de 7 $\alpha$ -allyl-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one (**4**)**

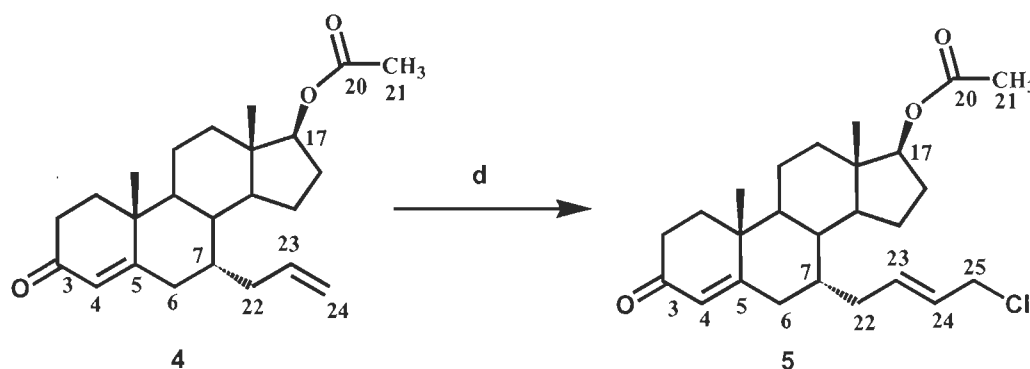
Nous remarquons sur le spectre RMN-<sup>1</sup>H la présence de deux doublets à 5,02 et 4,97 ppm et d'un multiplet à 5,60 ppm correspondant aux trois protons de la double liaison de la chaîne allyle. Le singulet des protons des carbones 6 et 7 à 6,09 ppm disparaît



sur ce spectre puisque la double liaison a disparu dans la molécule **4**. L'analyse du spectre RMN- $^{13}\text{C}$  permet l'observation de la disparition des signaux des carbones 6 et 7 à 124,0 ppm et 140,27 ppm respectivement. Par contre, nous constatons la présence des deux nouveaux signaux des carbones de la chaîne oléfinique à 117,05 ppm et à 137,01 ppm. La déprotection de l'alcool en position 17 peut se réaliser à partir de la molécule **4** en présence de HCl dans le méthanol. Cependant, pour faciliter la purification des molécules suivantes, la déprotection a été effectuée après la réaction suivante (métathèse de Grubbs).

### 3.1.3 La métathèse de Grubbs et son optimisation

L'étape suivante est le couplage de la chaîne allyle du composé **4** avec le chlorure d'allyle dans le dichlorométhane en présence d'un catalyseur à base de ruthénium, le catalyseur Hoveyda-Grubbs 2<sup>e</sup> génération (figure 3.5). Cette réaction (métathèse de Grubbs) permet d'obtenir l'acétate de 7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2-ényl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one (**5**) avec un rendement de 90%. (Yee et al., 2006) La molécule **5** est un chlorure allylique possédant une grande réactivité. En effet, la substitution du chlore par des nucléotides est plus facile sur un chlorure allylique que sur un chlorure d'alkyle. La présence de la liaison double en  $\beta$  de l'atome de chlore est, donc, avantageuse. C'est pour cette raison que nous voulions garder cette double liaison et que nous n'avons pas réduit l'alcène au cours des prochaines réactions.

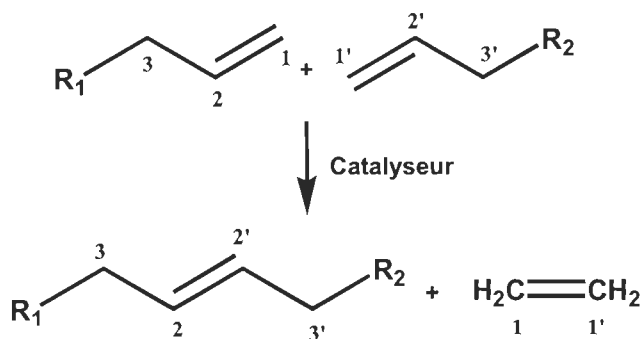


Réactifs: d) Chlorure d'allyle, cat. Hoveyda-Grubbs 2e gén.,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , reflux, 8 h, 90%

**Figure 3.5:** Synthèse de l'acétate de 7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2-ényl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one (**5**)

À ce moment-ci du mémoire, il a été jugé bon de faire une parenthèse pour expliquer la théorie de la métathèse de Grubbs. La découverte de la métathèse des oléfines (alcènes) a été faite au milieu des années 50, mais l'utilisation des catalyseurs à base de ruthénium (catalyseurs de Grubbs) a fait son apparition au début des années 90. Par contre, leur usage plus courant en chimie organique a dû attendre jusqu'aux années 2000 où la recherche a permis la fabrication de nouveaux catalyseurs de Grubbs plus performants. (Trnka et Grubbs, 2001) La métathèse des alcènes est une redistribution de carbone au cours de laquelle les liaisons carbone-carbone des insaturations sont réarrangées en présence d'un complexe de carbène métallique. La métathèse des oléfines est utilisée dans trois types de réactions : la métathèse d'ouverture de cycle, la métathèse de fermeture de cycle et la cross-métathèse (le type de réaction utilisé au cours de ce projet de maîtrise). (Grubbs et Chang, 1998)

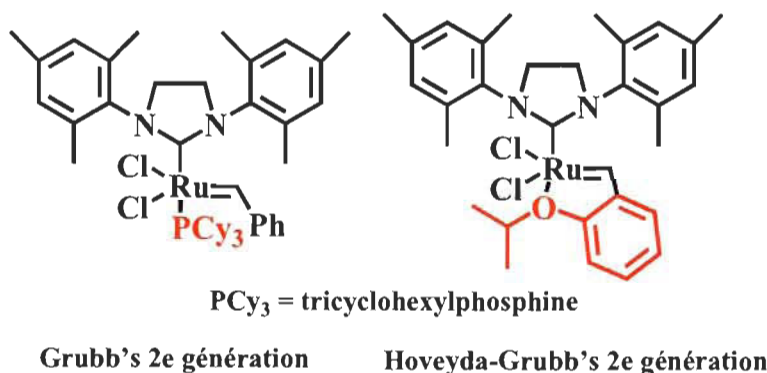
Au cours de cette réaction, les doubles liaisons terminales des deux molécules réagissent avec le catalyseur pour libérer de l'éthène ( $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ ) dans le but de former une chaîne alkyle possédant deux carbones en moins et une nouvelle double liaison (figure 3.6).



**Figure 3.6: Mécanisme d'action de la cross-métathèse**

Les deux catalyseurs utilisés pendant ce projet de maîtrise pour réaliser la métathèse sont représentés à la figure suivante (figure 3.7). Ces catalyseurs possèdent une activité toute particulière envers les oléfines, mais ils sont incompatibles avec les groupements basiques tels que les amides et les nitriles. La seule différence entre ces deux catalyseurs est la présence d'un groupement isopropoxybenzène (en rouge) dans la

structure du catalyseur Hoveyda-Grubbs 2<sup>e</sup> génération. La plus grande basicité de ce groupement comparativement à l'autre groupement (PCy<sub>3</sub>) apporte une plus grande activité catalytique à cette molécule. (Trnka et Grubbs, 2001)



**Figure 3.7: Catalyseurs utilisés au cours de la métathèse de Grubbs**

La métathèse de Grubbs a, donc, été optimisée avec les catalyseurs Hoveyda-Grubbs 2<sup>e</sup> génération. Le tableau 3.1 présente quelques essais réalisés avec ces deux catalyseurs. Dans tous les cas, le solvant utilisé a été le dichlorométhane. Comme le démontre ce tableau, si le catalyseur de Grubbs 2<sup>e</sup> génération était utilisé, le rendement de réaction demeurerait à moins de 20% peu importe si le temps de reflux ou si la quantité de réactif (chlorure d'allyle) étaient augmentés. Par contre, dès l'utilisation du catalyseur Hoveyda-Grubbs 2<sup>e</sup> génération, le rendement de réaction passait à 90%. Nous avons même obtenu un rendement supérieur à 90% dans les derniers essais effectués.

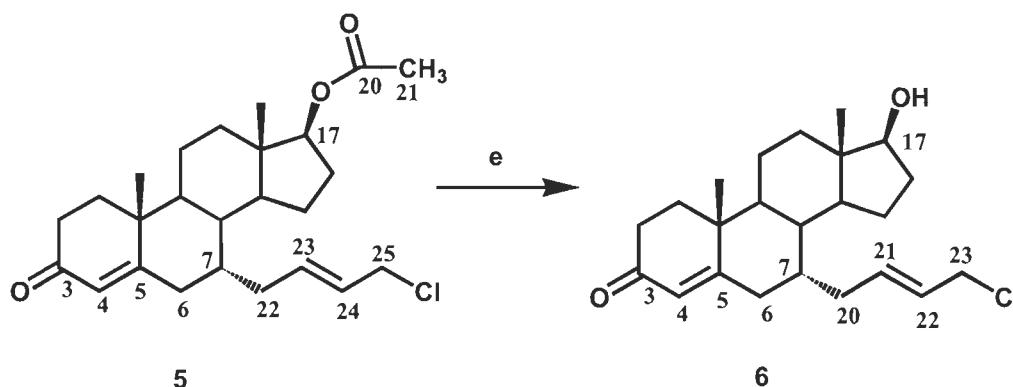
**Tableau 3.1 Rendements obtenus lors de quelques essais effectués de la métathèse de Grubbs (transformation 4→5)**

Conditions expérimentales	Rendement (%)
Solvant : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Catalyseur Grubbs 2 <sup>e</sup> génération 2 éq. Chlorure d'allyle 9 heures reflux	< 20
Solvant : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Catalyseur Grubbs 2 <sup>e</sup> génération 2 éq. Chlorure d'allyle 15 heures reflux	< 20
Solvant : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Catalyseur Grubbs 2 <sup>e</sup> génération 8 éq. Chlorure d'allyle + 2 éq. + 2 éq. + 2 éq. 9 heures reflux	< 20
Solvant : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Catalyseur Hoveyda-Grubbs 2 <sup>e</sup> génération 8 éq. Chlorure d'allyle 9 heures reflux	90

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H démontre bien l'addition du chlorure d'allyle sur la molécule **4**. Nous pouvons observer la présence d'un multiplet à 5,59 ppm correspondant aux deux protons oléfiniques de la chaîne allyle. De plus, nous retrouvons le signal, sous forme de multiplet, du CH<sub>2</sub> à 4,00 ppm, situé à côté de l'atome de chlore. Nous remarquons, aussi, la disparition du signal (5,02 - 4,97 ppm) des protons terminaux de la chaîne allyle de la molécule **4**. Le changement majeur que nous pouvons constater sur le spectre RMN-<sup>13</sup>C est le déplacement du signal du carbone 22 allant de 117,05 ppm à 126,47 ppm pour la molécule **5**.

À partir de la molécule **5**, nous avons effectué la déprotection du groupement alcool à la position 17. Cette molécule a été traitée avec le HCl aqueux 5N dans le méthanol pour obtenir le 7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2-ényle)-4-androstène-17 $\beta$ -ol-3-one (**6**) (figure 3.8) possédant le noyau de testostérone de départ. Le rendement de cette réaction est de 100%. Le spectre RMN-<sup>1</sup>H démontre bien l'hydrolyse de l'acétate sur ce carbone puisque le signal des protons du CH<sub>3</sub> de l'acétate à 2,02 ppm disparaît. Nous constatons, aussi,

avec le RMN- $^{13}\text{C}$  la disparition du signal du carbonyle de l'acétate à 171,32 ppm. De plus, nous remarquons le déplacement du signal du proton du carbone 17 passant de 4,58 ppm à 3,63 ppm sur le RMN- $^1\text{H}$ .

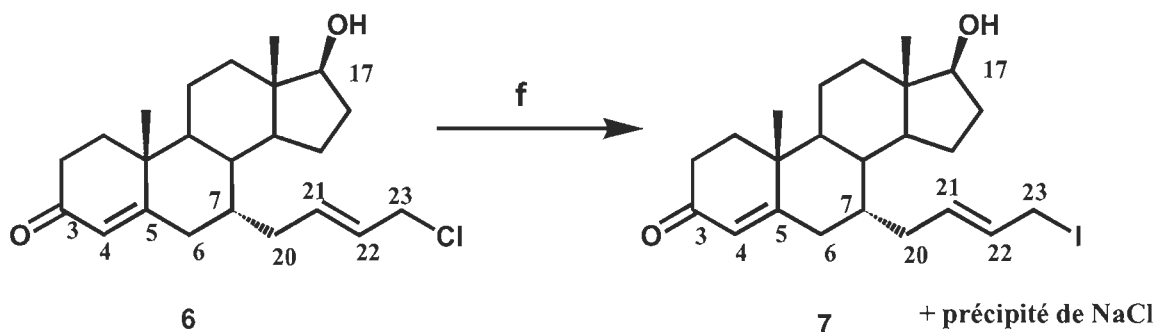


Réactifs: e) HCl aqueux 5 N, MeOH, reflux léger, 2 h, 95%

**Figure 3.8: Synthèse du 7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2-ènyle)-4-androstène-17 $\beta$ -ol-3-one (6)**

### 3.1.4 Substitution nucléophile de l'atome de chlore

Par la suite, des essais de substitution nucléophile,  $\text{S}_{\text{N}}2$ , ont été réalisés dans le but de vérifier la capacité de l'halogène à se faire substituer (remplacer) par un groupement nucléophile. Tout d'abord, l'atome de chlore a été substitué avec un atome d'iode (figure 3.9) en traitant la molécule **6** avec de l'iodure de sodium (NaI) dans l'acétone pour donner le 7 $\alpha$ -(4-iodo-but-2-ènyle)-4-androstène-17 $\beta$ -ol-3-one (**7**) avec un rendement de 90%. Étant donné que l'iode est un meilleur groupe sortant que le chlore, la présence de l'iode en bout de chaîne augmentera, théoriquement, la vitesse des réactions  $\text{S}_{\text{N}}2$  subséquentes. En effet, l'aptitude nucléofuge d'un groupe sortant est proportionnelle à la force de son acide conjugué. L'acide conjugué de l'atome d'iode, HI, possède un  $\text{pK}_{\text{a}}$  de -5,2 comparativement à celui de l'atome de chlore, HCl, qui est de -2,2. (Vollhardt et Schore, 2004) Autrement dit, l'anion  $\text{I}^-$  est moins basique que l'anion  $\text{Cl}^-$  et donc un meilleur groupement sortant.

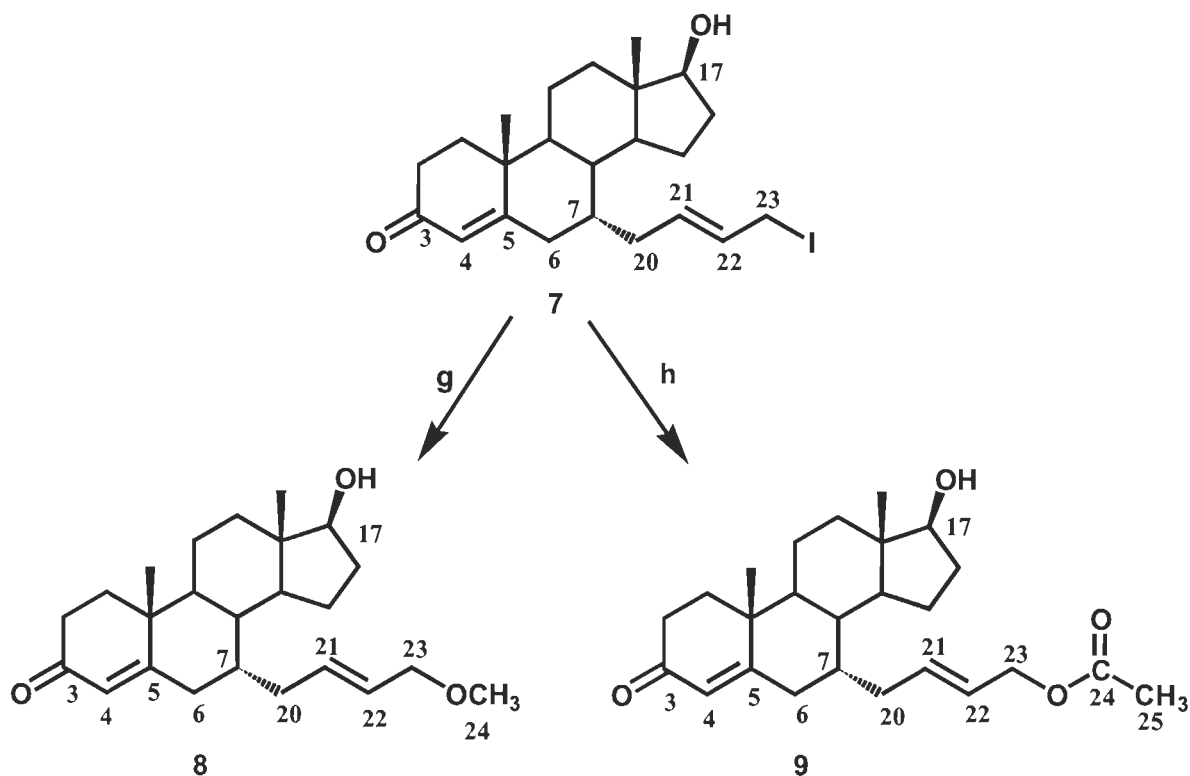


Réactifs: f) NaI, acétone sec, reflux, 3 h, 90%

**Figure 3.9: Synthèse du 7 $\alpha$ -(4-iodo-but-2-ényl)-4-androst-17 $\beta$ -ol-3-one (7)**

L'identification des signaux du spectre RMN- $^1\text{H}$  du composé **7** nous permet de voir un changement de l'apparence du multiplet situé à 5,65 ppm et correspondant aux protons oléfiniques de la chaîne en 7 $\alpha$ . Ce changement est causé par la présence de l'atome d'iode. Par conséquent, le signal devient plus complexe. De plus, nous avons observé que la molécule **7** se décompose assez rapidement avec le temps (1 ou 2 mois).

Par la suite, nous avons effectué deux essais de substitution nucléophile de l'atome d'iode pour vérifier, encore une fois, la capacité de cet atome à se faire substituer par d'autres nucléophiles, les groupements méthoxy et acétate (figure 3.10). Premièrement, la molécule **7** a été mise en contact avec un excès de méthoxyde de sodium dans le méthanol à reflux pour obtenir le 7 $\alpha$ -(4-methoxy-but-2-ényl)-4-androst-17 $\beta$ -ol-3-one (**8**) avec un rendement de 55%. Ce résultat est un rendement non-optimisé puisque la réaction n'a été effectuée qu'une seule fois et à très petite échelle (10 mg). À petite échelle, la perte d'une quantité minime de produit lors des manipulations affecte grandement le rendement final de la réaction. Par contre, il pourrait être amélioré en utilisant une plus grande quantité de la molécule de départ (50 à 100 mg).



Réactifs: g) Méthoxyde de sodium, MeOH, reflux, 2 h, 55%  
 h) Acétate de sodium, DMF, reflux, 4 h, 55%

**Figure 3.10: Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-methoxy-but-2-ényl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one (8) et de 7 $\alpha$ -(4-acétoxy-but-2-ényl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one (9)**

Le spectre RMN- $^1\text{H}$  confirme la structure de la molécule 8. Le signal des protons de l'alcène se retrouve à nouveau sous forme de triplet à 5,54 ppm dû au remplacement de l'atome d'iode par le groupement méthoxy. Nous observons la présence d'un singulet à 3,32 ppm correspondant au groupement méthoxy. De plus, nous voyons apparaître le carbone du groupement méthoxy à 58,08 ppm sur le spectre RMN- $^{13}\text{C}$  ainsi que le carbone du  $\text{CH}_2$  voisin de ce groupement à 73,12 ppm.

Par la suite, la molécule iodée (7) a été traitée avec l'acétate de sodium en excès dans le méthanol à reflux pour donner le 7 $\alpha$ -(4-acétoxy-but-2-ényl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one (9) avec un rendement non-optimisé de 55% (figure 3.10). L'acétate de sodium est un nucléophile plus faible que le méthoxyde de sodium. Encore une fois, cette réaction a été

effectuée à très petite échelle (10 mg) ce qui affecte fortement le rendement de la réaction pour les mêmes raisons déjà mentionnées. Par contre, il pourrait être optimisé en effectuant la réaction à plus grande échelle (50 à 100 mg).

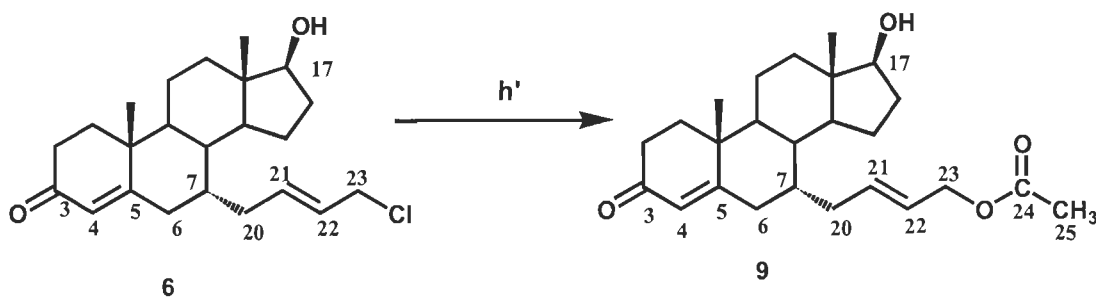
Nous pouvons identifier, sur le spectre RMN- $^1\text{H}$ , les protons du méthyle de l'acétate à 2,07 ppm. Nous voyons, aussi, le déplacement du doublet correspondant aux protons voisins au groupement acétate allant de 3,85 ppm pour la molécule iodée (7) à 4,50 ppm pour la molécule 9. Ce déplacement peut être expliqué par la présence de la cétone à proximité qui permet de déblinder les protons du méthyle et entraîner le signal à un plus haut déplacement chimique. De plus, le spectre RMN- $^{13}\text{C}$  nous permet de voir l'apparition du carbone du carbonyle du groupement acétate à 171,07 ppm et le méthylène du carbone 23 à 65,10 ppm.

Ces essais de substitution nucléophile nous ont permis de vérifier la réactivité du groupement sortant situé en bout de chaîne. À présent, nous savons que l'atome de chlore peut facilement se faire remplacer par un nucléophile assez fort, un atome d'iode, dans le but d'améliorer encore d'avantage l'aptitude nucléofuge du groupement sortant. Nous savons, aussi, que l'atome d'iode peut se faire remplacer par d'autres nucléophiles dont l'anion méthoxyde et l'anion carboxylate. En sachant cela, nous pourrions effectuer avec la molécule iodée (7), le couplage du chlorambucil. Même si cette molécule chimiothérapeutique possède un groupement acide représentant un faible nucléophile sous sa forme de sel de sodium, nous savons maintenant que la substitution est possible. Par contre, en chimie organique, il est primordial d'avoir le moins d'étape possible dans une synthèse dans le but d'obtenir un rendement global optimal.

Pour cette raison, nous avons effectué un essai de substitution nucléophile de l'atome de chlore (molécule 6) en utilisant l'acétate de sodium, un nucléophile faible déjà utilisé, pour vérifier si nous pouvons sauver une étape. La molécule 6 a donc été traitée avec un excès d'acétate de sodium dans le méthanol à reflux (figure 3.11). La molécule obtenue est la même que celle obtenue avec la méthode précédente : 7 $\alpha$ -(4-acétoxy-but-2-ényl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one (9). Le rendement non-optimisé de cette réaction est 55%.



Ce résultat pourrait aussi être amélioré en effectuant la réaction à plus grande échelle. Ce résultat nous indique, aussi, qu'il n'est pas nécessaire de transformer le chlorure allylique **6** en iodure allylique **7** pour faire la réaction  $S_N2$  avec un carboxylate de sodium.



Réactifs: h') Acétate de sodium, DMF, reflux, 4 h, 55%

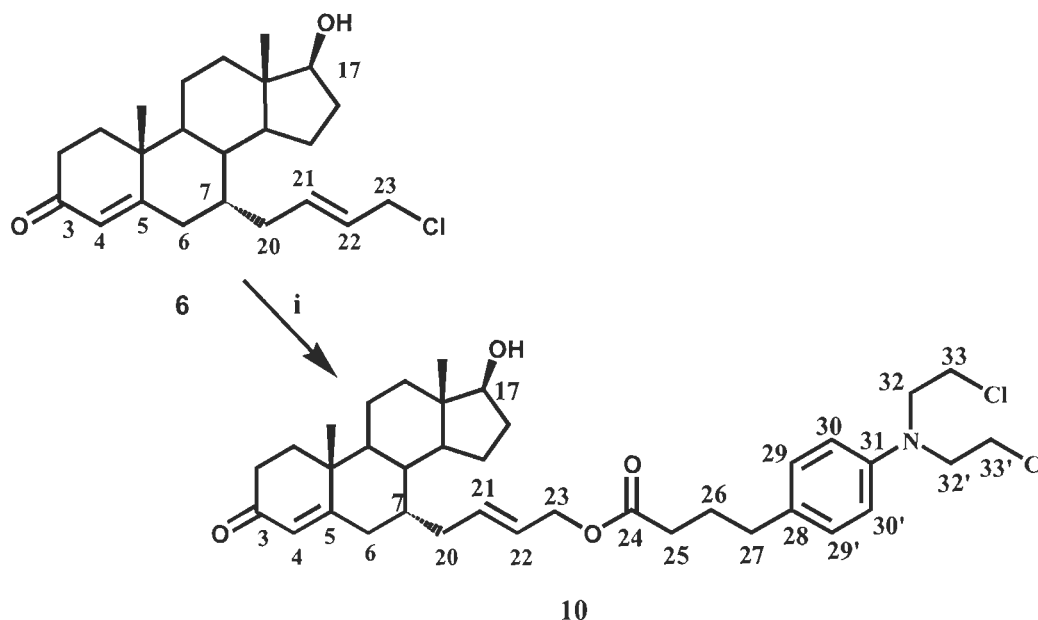
**Figure 3.11: Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-acétoxy-but-2-ényl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one (**9**) via la molécule chlorée (**6**)**

### 3.1.5 Couplage de la molécule de chlorambucil

En sachant que la substitution nucléophile de l'atome de chlore peut se réaliser à partir de nucléophile plutôt faible, nous avons effectué le couplage du chlorambucil à partir de la molécule **6** au lieu de la molécule **7**. De cette manière, nous fabriquons la molécule désirée en moins d'étapes. Cette réaction finale se réalise sous l'action du carboxylate de sodium du chlorambucil couplé au chlorure allylique **6**.

Tout d'abord, le chlorambucil est traité avec un sel, le carbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) dans le DMF pour former son sel de sodium. L'activation est nécessaire avant le couplage. En effet, l'acide carboxylique est un faible nucléophile et il est prouvé que sous sa forme carboxylate, sa nucléophilie est améliorée. L'attaque nucléophile se définit par la formation d'une liaison avec un carbone électrophile. Il est donc normal que plus l'espèce qui attaque ce carbone sera négative plus la réaction sera rapide. (Vollhardt et Schore, 2004)

Par la suite, le stéroïde **6** est mis en contact avec le mélange chlorambucil/ $\text{NaHCO}_3$ . Cette réaction donne la molécule **10**,  $7\alpha$ -(4-{4-[bis-(2-chloroéthyl)-amino]-phényl-éthylacétoxy}-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one, avec un rendement de 30% (figure 3.12). Ce rendement peut paraître faible, mais il est non-optimisé. Il pourrait sûrement être amélioré en utilisant soit une autre méthode de couplage ou en utilisant la molécule iodée (**7**) comme produit de départ. Nous parvenons, donc, à synthétiser la molécule finale désirée prête à être testée in vitro.



Réactifs: i) Chlorambucil,  $\text{NaHCO}_3$ , DMF,  $\text{H}_2\text{O}$ , reflux, 9 h, 30%

**Figure 3.12: Synthèse de  $7\alpha$ -(4-{4-[bis-(2-chloroéthyl)-amino]-phényl-éthylacétoxy}-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one**

Le spectre RMN- $^1\text{H}$  confirme la structure de la molécule **10**. Nous observons à 7,07 ppm et 6,60 ppm les quatre protons aromatiques du chlorambucil sous la forme de deux doublets. Nous voyons, aussi, le doublet correspondant aux protons du  $\text{CH}_2$  situé entre l'alcène et le groupement ester ( $\text{CH}_2$ -23) situé à 4,48 ppm. Le multiplet situé à 3,65 ppm représente les huit protons du groupement actif du chlorambucil ( $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$ ) ainsi que le proton du carbone 17. Grâce au spectre RMN- $^{13}\text{C}$ , nous pouvons identifier le signal du carbonyle de l'ester à 173,57 ppm. De plus, les six carbones du groupement aromatique du chlorambucil sortent à 144,48 ppm, 129,94 ppm et 112,48 ppm. La hauteur

des pics indique que les deux derniers signaux mentionnés représentent 3 et 2 carbones respectivement du noyau de l'aromatique. Il est important de noter que le résultat des analyses par spectroscopie de masse pour la molécule **10** (644,3260) indique la masse théorique calculée (644,3268).

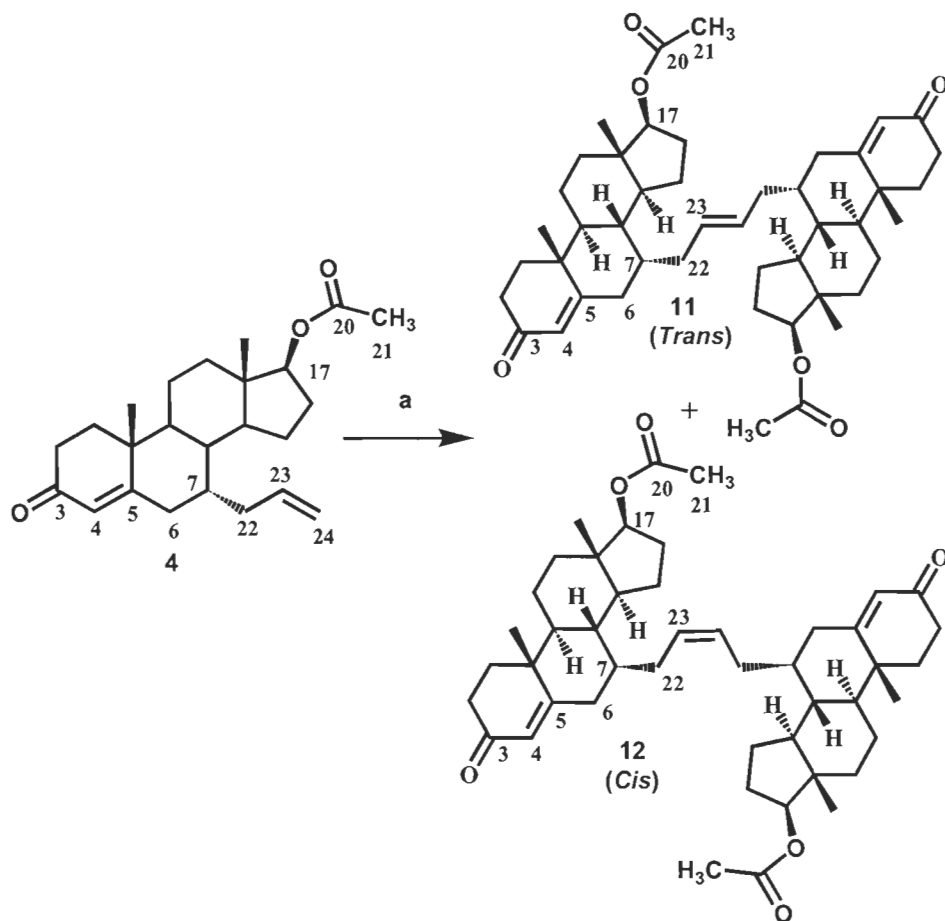
### 3.2 Synthèse des dimères de testostérone

Comme mentionné précédemment, les trois premières réactions sont les mêmes que pour la synthèse du composé cytotoxique. L'explication de ces réactions ne sera pas répétée, mais un petit rappel peut être fait. La molécule de départ est encore la testostérone. Nous voulons ajouter une chaîne allyle à la position  $7\alpha$  du stéroïde. Par contre, il n'y a pas vraiment de site réactionnel à cette position. Nous avons, donc, réussi à créer une double liaison à cet endroit à l'aide de deux réactions avant d'ajouter la chaîne allyle via une addition conjuguée 1,6-.

Par la suite, la métathèse de Grubbs a été effectuée. Le stéroïde **4** a été traité avec le catalyseur à base de ruthénium Hoveyda-Grubbs 2<sup>e</sup> génération dissous dans le dichlorométhane. La métathèse entraîne cette molécule à réagir sur elle-même. La réaction a donné deux produits avec un rendement total de 75%. La première molécule est l'isomère **trans-11** ( $R_f=0,66$ ), majoritaire, et la seconde molécule est l'isomère **cis-12** ( $R_f=0,74$ ) minoritaire (figure 3.13). Ces isomères ont été obtenus avec des rendements de 50% et 25% respectivement. Le produit le plus polaire entre les deux isomères est le produit *trans* puisqu'il est celui qui migre le moins lors de son élution sur couche mince.

Les spectres RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C et IR ne nous permettent pas d'identifier clairement la géométrie des dimères de la testostérone. Ils ne contiennent pas de différences significatives entre les deux isomères pour bien identifier l'isomère correctement. Nous avons, donc, déduit que le produit majoritaire était l'isomère *trans* grâce à la lecture de plusieurs articles concernant la métathèse de Grubbs. La majorité des résultats compilés dans ces articles identifiaient le produit majoritaire comme le produit *trans*. Alors, nous pouvons conclure de façon presque certaine que notre produit

majoritaire est le produit *trans*. Par contre, pour en être certain à 100%, il serait nécessaire d'effectuer une analyse par spectroscopie au rayon X dans le but de déterminer la géométrie exacte de la double liaison. De plus, quelques essais de modélisation moléculaire devraient aussi être faits pour représenter de manière 3D ces deux molécules.



Réactifs: a) Cat. Hoveyda-Grubbs 2e gén., CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, reflux, 15 h, 75%

**Figure 3.13 : Synthèse des dimères de testostérone protégés *trans*-11 et *cis*-12**

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H identifie clairement le dimère de testostérone. La description des déplacements chimiques de ces composés sera faite avec la molécule *cis*-12. Nous vous rappelons que la molécule est symétrique. Pour cette raison, les signaux démontrent cette symétrie en ne présentant pas de dédoublement. Nous voyons disparaître le multiplet à 5,60 ppm pour laisser la place à un autre multiplet d'allure différente à 5,30 ppm correspondant au proton de l'alcène de la chaîne liante. De plus, les protons

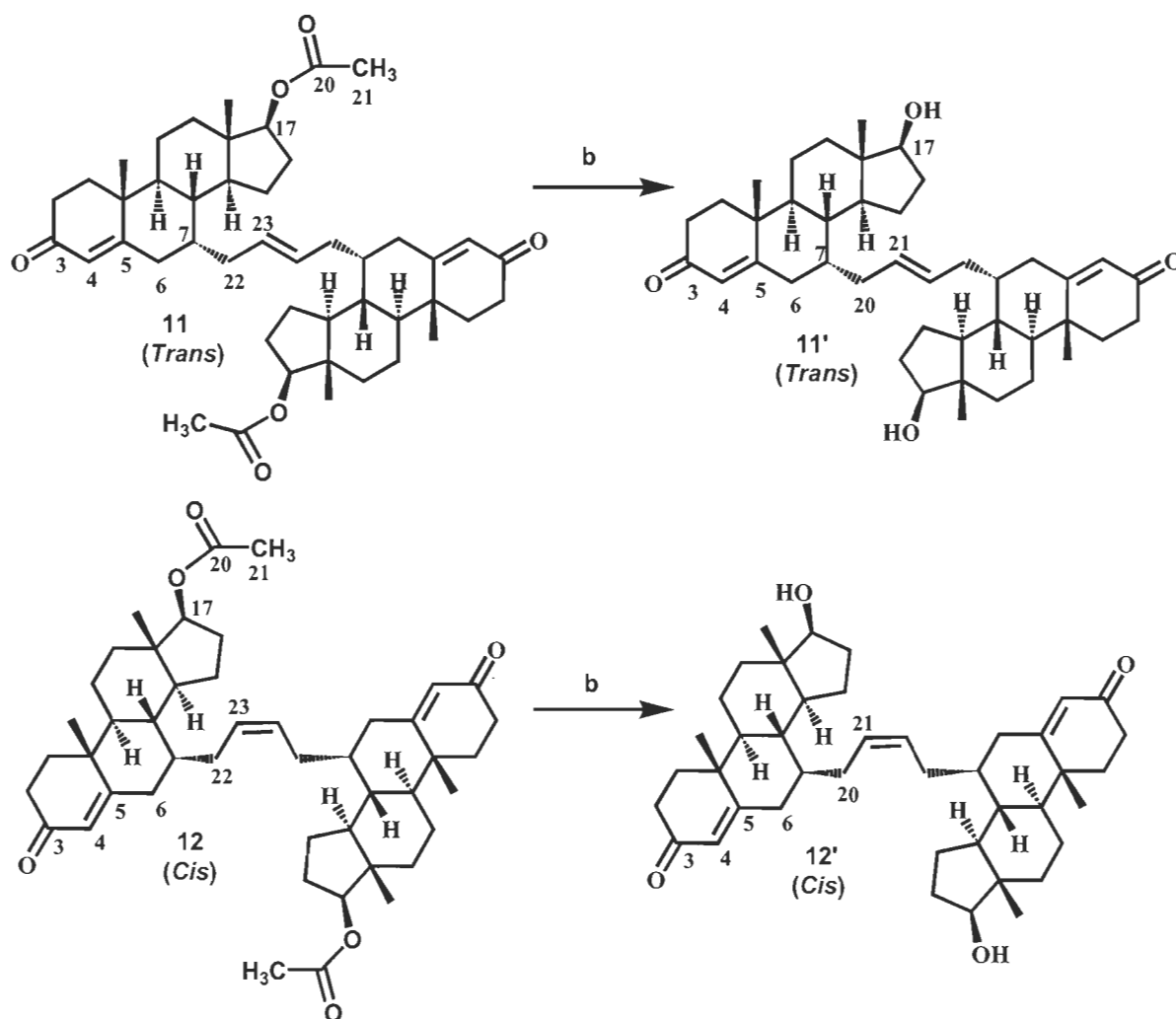
terminaux de la double liaison (5,02 – 4,97 ppm) disparaissent du au couplage de la molécule sur elle-même conduisant à la formation d'une molécule d'éthène. Le spectre RMN-<sup>13</sup>C confirme la structure de ce dimère. Le signal du carbone 21 se déplace de 137,01 ppm à 129,82 ppm démontrant que l'environnement de ce signal est modifié. Nous constatons, aussi, la disparition du signal du carbone 22 à 117,05 ppm. Il faut noter que le nombre de carbone (23 carbones) identifié sur ce spectre correspond bien au dimère de testostérone et non à la molécule **4** (24 carbones). De plus, les résultats obtenus en spectroscopie de masse pour les dimères *cis* (629,4558) et *trans* (629,4563) nous indiquent la masse théorique calculée (629,4564).

Cette réaction de dimérisation a du être optimisée pour obtenir le rendement de 75%. Le tableau 3.2 ne présente que quelques-uns des essais effectués lors de l'optimisation. Lors des premiers essais, le catalyseur utilisé était le catalyseur de Grubbs 2<sup>e</sup> génération. Nous avons essayé plusieurs conditions avec celui-ci. Peu importe si on augmentait la quantité de catalyseur ou bien le nombre d'heures de reflux, le rendement total demeurerait à 55% (30% pour le produit majoritaire et 25% pour le produit minoritaire). Par contre, lorsque le catalyseur Hoveyda-Grubbs 2<sup>e</sup> génération était utilisé le rendement total augmentait à 75%. De plus, un essai a été effectué dans le benzène (non mentionné dans le tableau), mais aucune réaction n'a eu lieu. Cela laisse croire que le choix du solvant est important pour réaliser cette réaction.

**Tableau 3.2 Rendements obtenus lors de quelques essais effectués de la métathèse de Grubbs pour la synthèse des dimères de testostérone (*trans*-11 et *cis*-12)**

Conditions expérimentales	Rendement total (%)
Solvant : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Catalyseur Grubbs 2 <sup>e</sup> génération (0,1 éq.) 9 heures reflux	55
Solvant : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Catalyseur Grubbs 2 <sup>e</sup> génération (0,1 éq.) 15 heures reflux	55
Solvant : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Catalyseur Grubbs 2 <sup>e</sup> génération (0,5 éq.) 9 heures reflux	55
Solvant : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Catalyseur Hoveyda-Grubbs 2 <sup>e</sup> génération (0,1 éq.) 9 heures reflux	75

Par la suite, la déprotection du groupement alcool en position 17 a dû être effectuée pour obtenir l'alcool libre en 17 (figure 3.14). Les deux isomères (*trans*-11 et *cis*-12) ont été traités séparément avec une solution aqueuse de HCl dans le méthanol. Le spectre RMN-<sup>1</sup>H confirme l'hydrolyse de l'acétate et l'obtention des dimères *trans*-11' (Rf= 0,28) et *cis*-12' (Rf=0,34). Nous vous rappelons que l'analyse des signaux sera réalisée avec la molécule *cis*-12' seulement. Nous voyons disparaître le signal du méthyle de l'acétate à 2,03 ppm et le déplacement du triplet correspondant au proton du carbone 17 passant de 4,65 ppm à 3,78 ppm. Le signal du carbonyle à 171,3 ppm disparaît, lui aussi, dans le spectre RMN-<sup>13</sup>C. De plus, le nombre de carbones (21 carbones) correspond bien au nombre de carbone des dimères de testostérone déprotégés en tenant compte de la symétrie de ces molécules. De plus, la spectroscopie de masse confirme ces structures (629,4558 (*cis*) et 629,4563 (*trans*)).



Réactifs: b) HCl aqueux 5 N, MeOH, reflux, 4,5 h, 95%

**Figure 3.14: Synthèse des dimères de testostérone déprotégés *trans*-11' et *cis*-12'**

Ce qui est le plus surprenant avec ces quatre molécules est leur différence de propriétés physico-chimiques, plus précisément la solubilité. Les molécules *trans*-11 et *cis*-12 sont solubles dans les solvants couramment utilisés dans notre laboratoire comme le chloroforme, l'acétone, le dichlorométhane et l'éther. Nous faisons face à aucun problème de solubilité lors de la réaction ou bien lors de la purification. De son côté, la molécule *cis*-12' ne présente pas, elle non plus, de difficulté de solubilisation.

Par contre, la solubilité diminue énormément avec la molécule ***trans-11'***. Cet isomère devient presque insoluble dans les solvants mentionnés ci-dessus. Lors de la réaction de déprotection, un précipité blanc est formé ce qui entraîne une difficulté à effectuer le parachèvement par la suite puisque les deux phases (organique et aqueuse) ne se séparent pas bien. De plus, cette molécule devient difficile à caractériser. Elle est peu soluble dans le chloroforme ou l'acétone deutéré ce qui cause certains problèmes techniques lors de la prise des spectres par résonance magnétique nucléaire.

Pour le moment, nous ne pouvons pas expliquer cette différence de solubilité entre les deux isomères ***trans-11'*** et ***cis-12'***. C'est pourquoi nous voulons effectuer du modelage moléculaire pour expliquer leurs différences structurales en 3D. Présentement, notre hypothèse repose sur la plus petite distance de la cétone et l'alcool entre les deux molécules de testostérone du dimère ***trans-11'***. Il y aurait, alors, la présence de liaisons intramoléculaires (ponts hydrogène entre les groupements alcool et cétone). Cela entraînerait une diminution de liaisons intermoléculaires avec les molécules de solvant disponibles pour la solubilisation. La figure 3.15 présente un modèle des deux molécules faite par le logiciel Chem3D. Pour obtenir un meilleur modèle moléculaire, de meilleurs logiciels informatiques devraient être utilisés pour effectuer la modélisation.



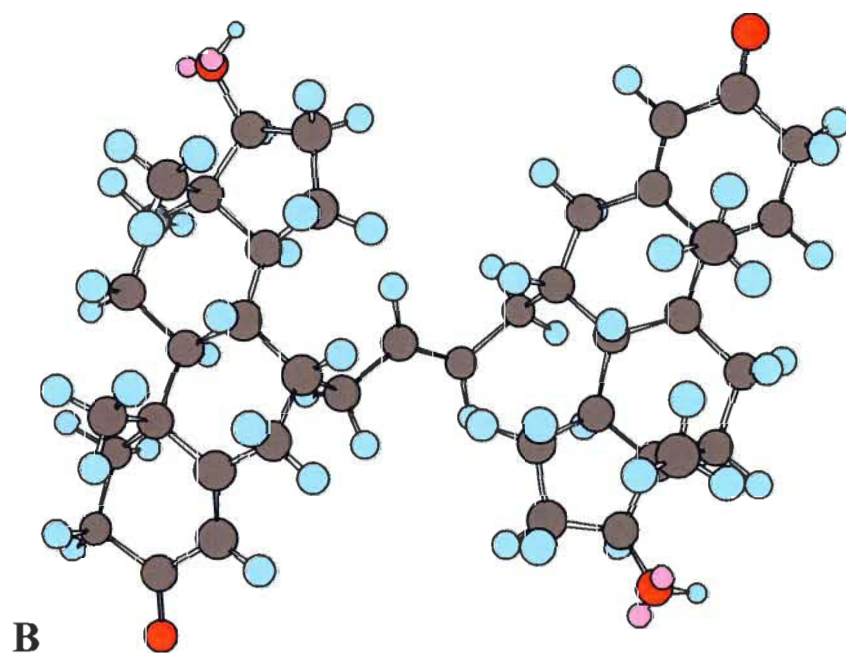
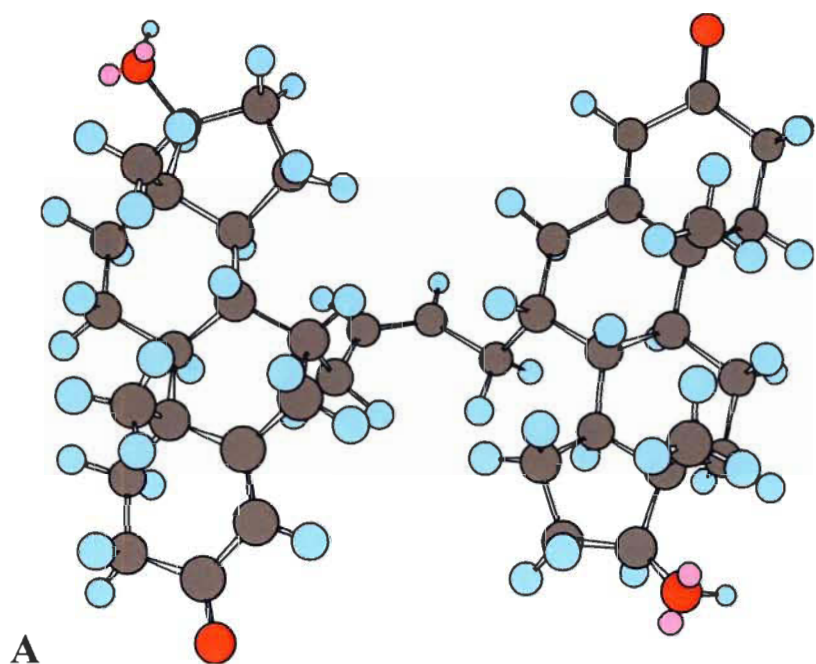


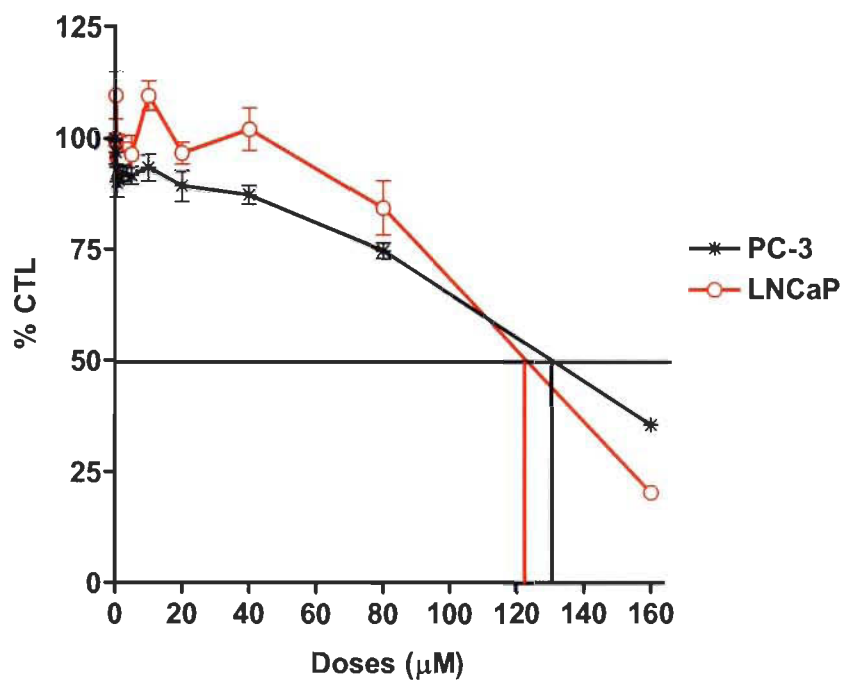
Figure 3.15 : Modèle des dimères de testostérone *cis* (A) et *trans* (B) obtenus par Chem 3D

### 3.3 Activité biologique

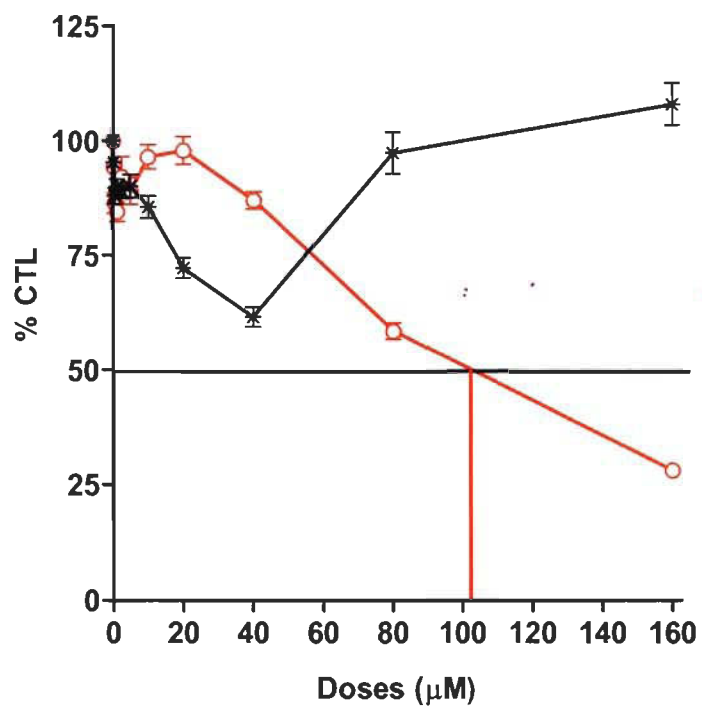
Les analyses biologiques au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazoline) ont été effectuées avec les trois molécules synthétisées au cours de ce projet de maîtrise. Trois essais ont été réalisés pour la molécule **10** tandis que quatre essais ont été nécessaires pour les molécules *trans*-**11'** et *cis*-**12'**. Les deux lignées cellulaires du cancer de la prostate utilisées sont LNCaP, hormono-dépendant (AR<sup>+</sup>), et PC3, hormono-indépendant (AR<sup>-</sup>).

Les résultats de l'activité biologique de l'hybride testostérone-chlorambucil (**10**) sont prometteurs. En effet, malgré que la molécule chimiothérapeutique (chlorambucil) présente une activité cytotoxique sur les deux lignées cellulaires, nos résultats démontrent, que la molécule **10** possède une plus grande activité anticancéreuse que le chlorambucil. En effet, les valeurs de IC<sub>50</sub> sont de 131,81 µM pour le chlorambucil et de 111,79 µM pour la molécule hybride **10** (tableau 3.3). De plus, nous constatons que la molécule **10** agit de façon plus spécifique sur les cellules de la lignée hormono-dépendante, LNCaP, que sur celles de la lignée hormono-indépendante, PC3 (graphique 3.2). Le chlorambucil, quant-à-lui, ne présente pas une aussi grande spécificité envers l'une ou l'autre des lignées. Malgré que les deux IC<sub>50</sub> du chlorambucil se ressemblent fortement (124,35 µM et 131,27 µM), cette molécule semble être plus active sur la lignée hormono-indépendante comme le démontre le graphique 3.1 et le tableau 3.3.

Nous observons, aussi, que la prolifération cellulaire diminue, en présence de la molécule **10**, de manière considérable pour les cellules AR<sup>+</sup> (graphique 3.2). Par contre, la prolifération augmente pour les cellules AR<sup>-</sup>. Ces résultats confirment ce que nous espérons. Puisque ces cellules possèdent peu ou pas de récepteurs des androgènes, elles ne sont, donc, pas affectées par la présence de la molécule chimiothérapeutique **10**. Ces données représentent des résultats forts prometteurs pour ce nouveau genre de médicament anticancéreux.



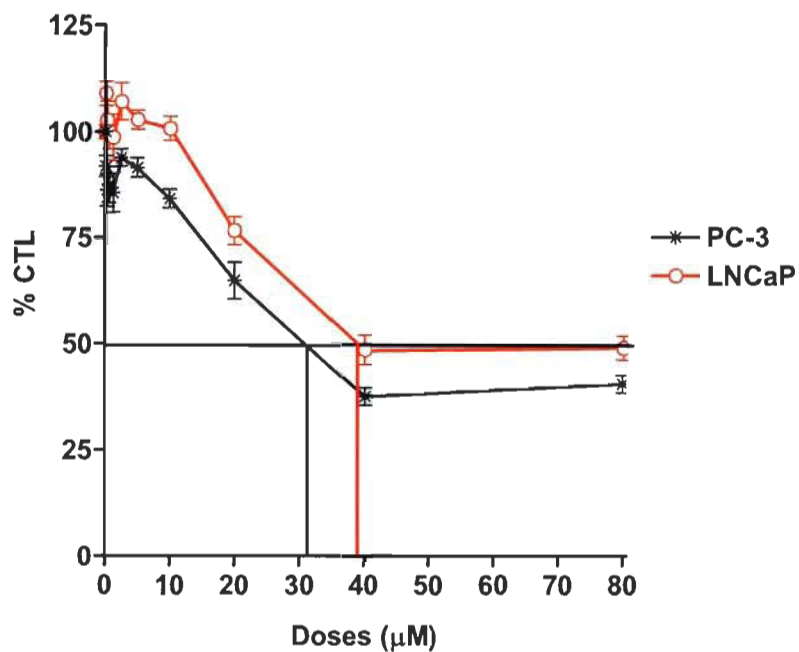
Graphique 3.1 : Résultats des analyses de cytotoxicité par test MTT du chlorambucil pour deux lignées cellulaires



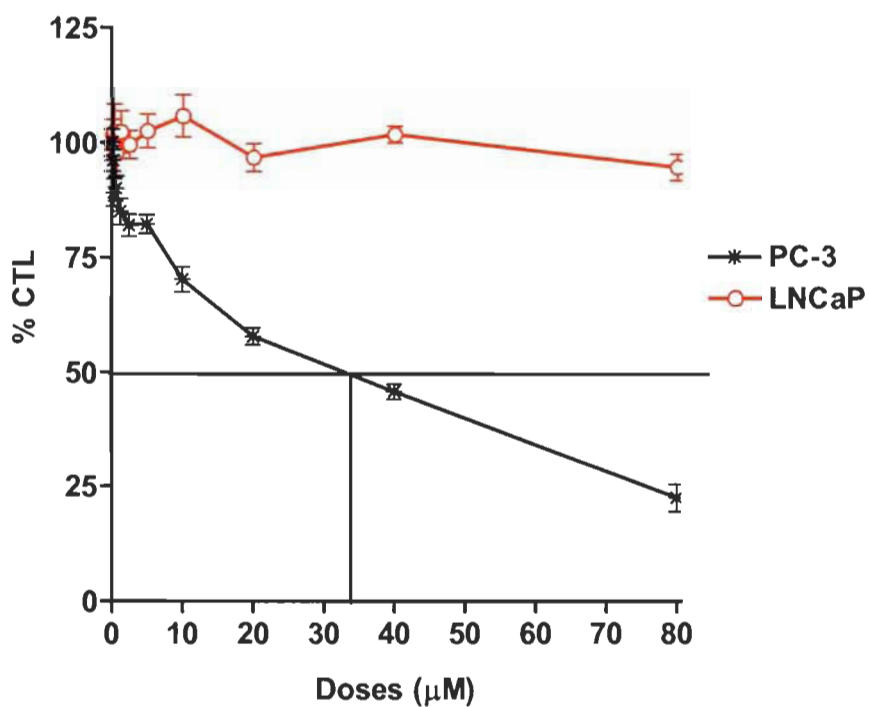
Graphique 3.2 : Résultats des analyses de cytotoxicité par test MTT de la molécule 10 pour deux lignées cellulaires

Comme le démontre les trois graphiques suivants, la molécule ***cis*-12'** présente une plus grande cytotoxicité envers les deux lignées cellulaires que la molécule ***trans*-11'**. Cela suggère que la géométrie de la double liaison de la chaîne liante affecterait l'activité biologique du dimère. En effet, nous observons des valeurs de  $IC_{50}$  pour la molécule ***cis*-12'** de 30,34 et 24,74  $\mu M$  pour LNCaP et PC3, respectivement, tandis que la molécule ***trans*-11'** présente une valeur de 35,65  $\mu M$  pour la lignée PC3 (tableau 3.3). Ce dimère n'a jamais atteint une valeur de  $IC_{50}$  pour la lignée cellulaire hormono-dépendante, LNCaP. Autrement dit, la molécule ***trans*-11'** n'a aucun effet sur la prolifération de cette lignée cellulaire.

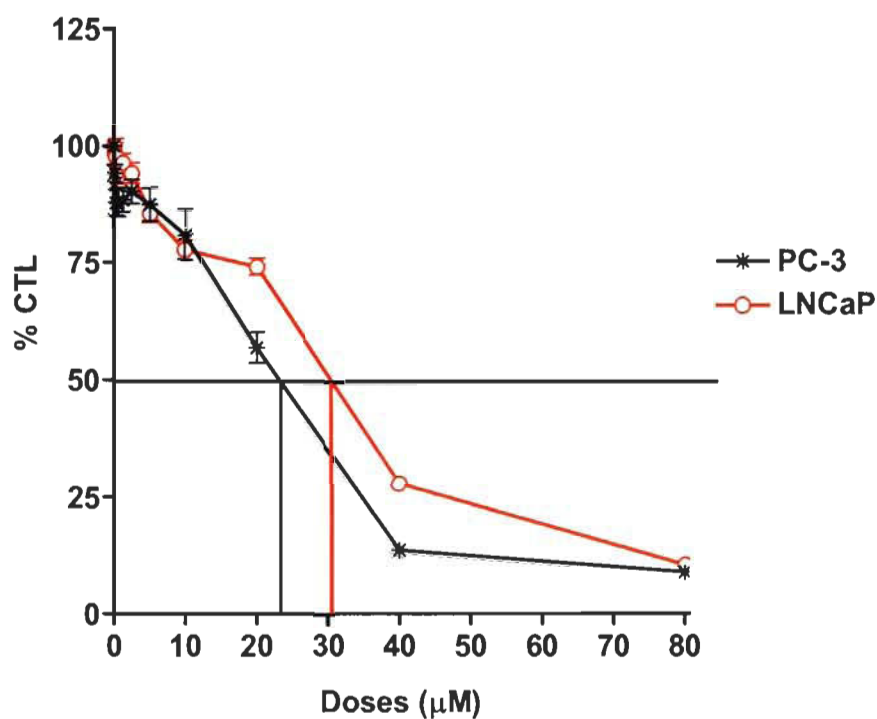
Nous observons, aussi, que les deux dimères sont plus actifs envers la lignée cellulaire hormono-indépendante, PC3. Ce n'est pas ce que nous nous attendions. Par contre, ce résultat peut être expliqué par le fait que les dimères sont de très grosses molécules par rapport à la molécule de testostérone. Leur affinité sur le récepteur peut, donc, être modifiée du à l'encombrement stérique. De plus, les cellules de la lignée LNCaP sont plus fragiles en milieu de culture. Elles prolifèrent beaucoup plus lentement. Par conséquent, ces cellules sont moins affectées par les composés antiandrogéniques. Il faut ajouter, aussi, que le récepteur des androgènes de ces cellules possède une mutation dans le domaine de liaison au ligand. (Veldscholte et al., 1992) Les molécules dimériques posséderaient, possiblement, une plus faible affinité sur ce récepteur. Cette hypothèse pourrait être vérifiée à l'aide d'un test d'affinité des molécules sur le récepteur des androgènes. Dans le cas d'une plus faible affinité, la longueur de la chaîne liante serait à être optimisé dans le but de permettre une plus forte liaison. Toutes ces caractéristiques combinées permettraient d'expliquer cette plus grande activité biologique envers la lignée cellulaire PC3. Nous constatons, aussi, que les dimères de testostérone présentent la même tendance d'activité que l'acétate de cyprotérone. En effet, ce dernier est plus actif sur les cellules PC3 ( $AR^-$ ) que sur les cellules LNCaP ( $AR^+$ ). Le dimère ***cis*-12'** est, quant-à-lui, plus actif que l'acétate de cyprotérone, ce qui constitue un résultat fort prometteur. Seuls les essais biologiques *in vivo* permettraient de vraiment vérifier la sélectivité de ces composés envers des tumeurs hormono-dépendantes.



Graphique 3.3 : Résultats des analyses de cytotoxicité par test MTT de l'acétate de cyprotérone pour deux lignées cellulaires



Graphique 3.4 : Résultats des analyses de cytotoxicité par test MTT de la molécule *trans*-11' pour deux lignées cellulaires



**Graphique 3.5 : Résultats des analyses de cytotoxicité par test MTT de la molécule *cis-12'* pour deux lignées cellulaires**

**Tableau 3.3 Essais de cytotoxicité au MTT des composés 10, *trans-11'* et *cis-12'* sur des lignées cellulaires hormono-dépendantes (LNCaP) et hormono-indépendantes (PC3)**

Lignées cellulaires	RA	Concentration inhibitrice sur les cellules cancéreuses de la prostate				
		Chlorambucil (n=3)	10 (n=3)	Acétate de cyprotérone (n=4)	<i>Trans-11'</i> (n=4)	<i>Cis-12'</i> (n=4)
		IC <sub>50</sub> * (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
LNCaP	+	124,35 ± 7,48	101,01 ± 12,73	43,07 ± 2,51	-	30,34 ± 0,65
PC3	-	131,27 ± 3,14	-	32,28 ± 3,72	35,65 ± 1,94	24,74 ± 1,50

\* Concentration inhibitrice (IC<sub>50</sub>, μM) obtenue par l'essai MTT. Les expériences ont été réalisées en duplicata et les résultats sont la moyenne de 3 ou 4 expériences (n) indépendantes. Les cellules étaient incubées pendant une période de 72 h.

## 4. Conclusion

Au cours de ce projet de recherche, une molécule à potentiel cytotoxique (**10**) et deux molécules à potentiel antiandrogénique (*trans*-**11'** et *cis*-**12'**) ont été synthétisées. Le produit **10** est composé d'une hormone sexuelle masculine, la testostérone, et d'une molécule chimiothérapeutique, le chlorambucil. Cette synthèse a été réalisée en six étapes et le rendement global est de 12%. Cette molécule, espérons le, permettra de traiter les cancers hormono-dépendants de la prostate.

Tout d'abord, la molécule de testostérone a été utilisée comme produit de départ. Nous l'avons donc transformée en diacétate dans le but de protéger les deux groupements fonctionnels et par le fait même ajouter une seconde liaison double dans la structure de cette molécule. Par la suite, nous avons formé une diènone et ainsi déplacer l'alcène nouvellement formé sur les carbones 6 et 7 de la testostérone. Ce lieu de réaction nous a permis d'ajouter de façon stéréospécifique une chaîne allyle sur le carbone 7. La métathèse de Grubbs a alors eu lieu pour ajouter une nouvelle fonction, un chlore allylique. Nous avons conservé l'alcène de cette chaîne puisque le chlore (ou un autre groupement sortant) est un meilleur groupe sortant en présence de cette liaison double. Enfin, le couplage du chlorambucil et de la testostérone ayant une chaîne allylique chlorée en position 7 a été réalisé avec un faible rendement non-optimisé de 33%.

Nous avons, aussi, effectué des essais de substitutions nucléophiles de l'atome situé au bout de la chaîne allyle. Le chlore a donc été substitué avec un atome d'iode avec un excellent rendement. Ensuite, cet atome d'iode a été substitué soit par un groupement méthoxy ou acétoxy. De plus, un essai de substitution de l'atome de chlore avec un groupement acétoxy a été effectué. Ces essais nous ont permis de connaître l'habileté de l'atome de chlore et d'iode à se faire substituer par des nucléophiles de force variable. Grâce à ces résultats, nous avons grandement espoir d'augmenter le rendement du couplage du chlorambucil. Nous pourrions utiliser la molécule iodée **7** au lieu de la molécule chlorée **6** ou une autre méthode de couplage plus efficace. Des essais de synthèse sont en cours avec le carbonate de césium pour le couplage du chlorambucil sur

les halogénures allyliques **6** et **7**. Des résultats ont déjà démontré une plus grande efficacité de cette base pour ce genre de réaction.

En parallèle avec cette synthèse, nous avons fabriqué deux dimères de testostérone soit les isomères *trans*-**11'** et *cis*-**12'**. Cette synthèse a fait appel aux trois premières réactions de la synthèse précédente, c'est-à-dire jusqu'à l'obtention de la chaîne allyle en position 7. Par la suite, la métathèse de Grubbs a eu lieu dans le but de coupler la molécule **4** sur elle-même et obtenir les dimères de testostérone. Cette métathèse a permis d'obtenir un isomère *trans* majoritaire et *cis* minoritaire en 5 étapes avec des rendements de 50% et 25% pour chacun des isomères respectifs. La géométrie exacte de la liaison double n'est pas encore confirmée de manière absolue. Nous avons déduit que le produit majoritaire est *trans* grâce à des références bibliographiques qui identifient le produit majoritaire de la métathèse de Grubbs comme étant *trans*.

Par contre, il serait intéressant d'effectuer une analyse par rayon X dans le but d'obtenir la structure en trois dimensions de ces dimères. De plus, la modélisation effectuée avec le logiciel Chem3D nous a permis d'obtenir une structure tridimensionnelle préliminaire des dimères. Par contre, il serait utile d'effectuer la modélisation avec des outils informatiques plus sophistiqués tel que Spartan ou Arguslab. Ces logiciels donneraient sûrement des modèles plus juste de la structure 3D des molécules dimériques.

Enfin, des analyses biologiques ont été réalisés avec les molécules **10**, *trans*-**11'** et *cis*-**12'**. Nous avons, donc, effectué des tests *in vitro* de prolifération cellulaire au MTT des lignées de cellules cancéreuses de la prostate hormono-dépendantes, LNCaP, et hormono-indépendantes, PC3.

Les résultats de l'analyse biologique de la molécule hybride testostérone-chlorambucil **10** démontrent que cette molécule est plus active envers la lignée cellulaire hormono-dépendante. Elle présente, alors, une plus grande spécificité que le chlorambucil. En effet, nous observons que la prolifération cellulaire diminue pour la



lignée AR<sup>+</sup> mais augmente pour la lignée AR<sup>-</sup>. De plus, cette nouvelle molécule présente une plus grande activité biologique que le chlorambucil. Ces observations constituent des résultats très prometteurs pour le traitement du cancer de la prostate.

Les résultats obtenus nous ont permis de constater que la molécule *cis-12'* possède une plus grande cytotoxicité que la molécule *trans-11'*. Il semblerait que la géométrie de l'alcène de la chaîne liante influence l'activité biologique des dimères. Par contre, nous observons que ces deux molécules sont plus actives envers la lignée AR<sup>-</sup> ce qui est, aussi, le cas pour l'acétate de cyprotérone. Nous ne nous attendions pas à ce résultat, mais nous pouvons expliquer ces observations par le fait que les cellules AR<sup>+</sup> possèdent un récepteur des androgènes muté au niveau de du domaine de liaison au ligand. Ces cellules prolifèrent plus lentement et sont plus fragiles que les cellules AR<sup>-</sup>. De plus, une plus faible affinité des dimères sur le récepteur est probable du à l'encombrement stérique de ces composés. Cela affecterait sans doute l'activité biologique des molécules exposées à ces cellules.

Dans un proche avenir, il serait intéressant d'effectuer des analyses d'affinité de ces molécules sur le récepteur des androgènes dans le but de vérifier la réelle liaison sur le récepteur de ces nouveaux composés. De plus, il serait utile de fabriquer un hybride testostérone-chlorambucil composé d'un groupement amide (plus stable) dans la chaîne liante au lieu d'un groupement ester (moins stable). En effet, les amides sont plus stables contre l'hydrolyse que les esters. De plus, nous les retrouvons souvent inchangés dans l'urine. (Foye, 1989) Nous pourrions alors vérifier l'effet de ces groupements sur l'activité biologique de la molécule. Pour terminer, nous devons mentionner que des travaux sont en cours dans le but d'obtenir un complexe testostérone-platine(II).

## 5. Méthodologie

### 5.1 Méthodes générales

Les réactions ont été effectuées dans des solvants de marques Fisher ou Aldrich et étaient certifiés ACS (« American Chemical Society »). Les solvants sont souvent utilisés tels quels. Dans le cas contraire, ils sont purifiés avant leur utilisation par des méthodes classiques. (Perrin et Armarego, 1988) Quelques réactions nécessitaient un courant d'azote (milieu anhydre). L'azote était, donc, séché sur drierite dans ces cas. La progression des réactions était suivie par chromatographie sur couche mince (CCM). Les produits du milieu réactionnel étaient déposés au bas de plaques en verre recouvertes d'une couche de gel de silice de 0,25 mm d'épaisseur (Sigma T 6145 , 60 Å). L'élution se faisait avec un mélange de solvants hexanes/acétone dont les proportions variaient selon la polarité des produits. La plaque était, ensuite, exposée à une radiation ultra-violette ou à une vapeur d'iode dans le but de révéler les différents produits séparés par la couche mince.

La prochaine étape consistait à un parachèvement effectué dans une ampoule à décantation. Tout d'abord, la phase organique était lavée, une ou plusieurs fois, avec une solution aqueuse saturée en un sel quelconque, une solution acide ou basique ou tout simplement avec de l'eau. Elle était ensuite séchée à l'aide d'un agent séchant comme le sulfate de magnésium ou le sulfate de sodium. Une filtration permettait de récupérer le produit dissous dans le solvant organique et d'éliminer l'agent séchant. Le solvant était évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Une pompe sous vide consistait à l'étape finale du parachèvement et permettait de rendre le produit complètement sec.

La majorité des produits nécessitaient une purification. Cette dernière consistait à une chromatographie éclair selon la méthode de Still. (Still et al., 1978) Une phase stationnaire, un gel de silice de maille de 40-63  $\mu\text{m}$  fourni par la compagnie Silicycle permettait la séparation du produit élué à l'aide d'un mélange d'hexanes et d'acétone

distillés. Le produit était, tout d'abord, adsorbé avec de l'acétone ou d'éther sur une petite quantité de silice et déposé sur le dessus de la colonne avant son élution.

Les produits devaient être caractérisés par trois techniques spectroscopiques. Tout d'abord, la spectroscopie infrarouge permet d'identifier la présence des différents groupements fonctionnels dans une molécule. Les spectres ont été réalisés grâce à l'appareil Impact 420 de Nicolet. Les produits sont dissous dans du chloroforme et déposés entre deux pastilles de NaCl.

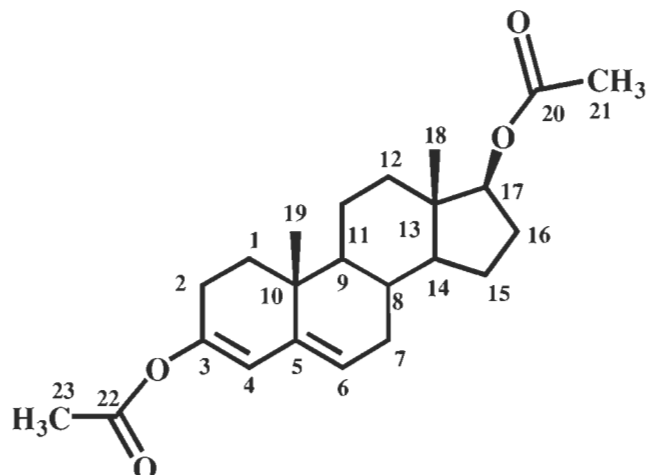
La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire a permis d'identifier l'environnement et le nombre de protons et de carbones dans les molécules analysées. Les spectres de protons (RMN- $^1\text{H}$ ) et de carbone (RMN- $^{13}\text{C}$ ) ont été obtenus avec un appareil RMN 200 MHz de Varian. Les produits étaient dissous dans du chloroforme deutéré ( $\text{CDCl}_3$ ) ou de l'acétone hexadeutérée ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ). Le  $\text{CDCl}_3$  contenait 0,2% de  $\text{CHCl}_3$  comme référence interne tandis que l'acétone- $\text{d}_6$  renfermait 0,5% d'acétone. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) étaient exprimés en partie par millions (ppm). Certains solvants peuvent être identifiées dans les spectres RMN- $^1\text{H}$  dont le chloroforme (7,26 ppm), le dichlorométhane (5,28 ppm) et l'eau (1,59 ppm).

La spectrométrie de masse (SM) a permis d'identifier le poids moléculaire des composés. Les produits ont été analysés, par SM basse et haute résolution, à l'Université du Québec à Montréal par LC-MS (chromatographie liquide couplée à un spectre de masse) avec le modèle 6210 d'Agilent technologies. Les échantillons ont nécessité une dilution dans le dichlorométhane et l'élution pour la chromatographie utilisait une phase mobile composée d'un mélange acétonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  50% avec 0,1% d'acide formique. L'Université de Sherbrooke a, aussi, contribué à l'analyse de certaines molécules en utilisant un spectromètre VG Micromass 7070 HS à bombardement électronique de 70 év.

Les points de fusion (PF) ont été mesurés sur un appareil Electrothermal et n'ont pas été corrigés.

## 5.2 Synthèse de l'hybride testostérone-chlorambucil

### 5.2.1 Synthèse du diacétate de 3,5-androstadièn-3,17β-diol (2) :



La testostérone (**1**) (5,57 g, 19,3 mmol) est dissoute dans le chlorure d'acétyle (20 mL, 281,53 mmol). L'anhydride acétique (6,24 mL, 77,2 mmol) et la pyridine (1,82 mL, 19,3 mmol) sont ensuite ajoutés dans cet ordre. La solution est portée à reflux pendant 4 heures suivi de 30 min à la température de la pièce. Les solvants du mélange réactionnel sont évaporés à sec. Le produit est ensuite solubilisé dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La solution est passée sur une colonne de silice avec le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  comme éluant dans le but d'éliminer le plus d'impuretés possibles. Finalement, le solvant est évaporé pour donner 6,46 g de la molécule **2** avec un rendement de 90%. Ce diacétate de couleur jaune n'a pas nécessité de purification. La CCM ne montrait qu'une seule tache.

**PF:** 142-147 °C.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1736 (C=O, acétate), 1666 (C=C), 1248 (C-O).

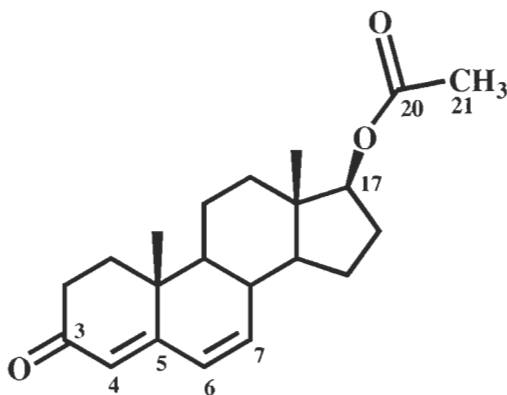
**RMN- $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 5,67 (1H, s, **4-CH**), 5,36 (1H, m, **6-CH**), 4,59 (1H, t apparent,  $J=8,2$  Hz, **17-CH**), 2,11 (3H, s, **23-CH<sub>3</sub>**), 2,02 (3H, s, **21-CH<sub>3</sub>**), 0,99 (3H, s, **19-CH<sub>3</sub>**), 0,81, (3H, s, **18-CH<sub>3</sub>**).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 171,4 (C-20), 169,6 (C-22), 147,3 (C-3), 139,7 (C-5), 123,7 (C-6), 117,1 (C-4), 82,9 (C-17), 51,4, 48,1, 42,7, 36,9, 35,2, 33,9, 31,8, 31,6, 27,7, 25,0, 23,7, 21,4, 21,3, 20,9, 19,1, 12,3.

**SM (m/e):** 372 (M<sup>+</sup>), 330 (M<sup>+</sup> - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O).

**Masse exacte:** calculée pour C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub> = 372,2300; trouvée = 372,2297.

### 5.2.2 Synthèse de l'acétate de 4,6-androstadièn-17 $\beta$ -ol-3-one (3) :



Sous atmosphère d'azote, le diacétate **2** (6,46 g, 17,3 mmol) est dissous dans le DMF (70 mL) et l'eau (3 mL). Le mélange est alors refroidi sur glace à 0°C. Le NBS préalablement solubilisé dans 1 mL de DMF est ajouté en 50 min suivi d'une agitation de 40 min toujours à 0°C. À ce mélange réactionnel, le carbonate de lithium (Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (2,87 g, 38,9 mmol) et le bromure de lithium (LiBr) (1,69 g, 19,4 mmol) sont ajoutés à la température de la pièce. La solution est chauffée à 95°C pendant 4 heures et refroidie. La solution est versée sur un mélange composé de 150 mL eau/glace et de 10 mL d'acide acétique glacial puis agitée jusqu'à la fonte de la glace. Le solide en suspension est ensuite filtré, lavé à l'eau, dissous dans l'éther et séché. Le produit récupéré a été purifié par chromatographie éclair (hexanes:acétone; 92:8) pour obtenir la diènone **3** (4,33 g) avec un rendement de 76%.

**PF:** 144-147 °C.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1735 (C=O, acétate), 1664 (C=O), 1613 (C=C, ènone), 1252 (C-O).

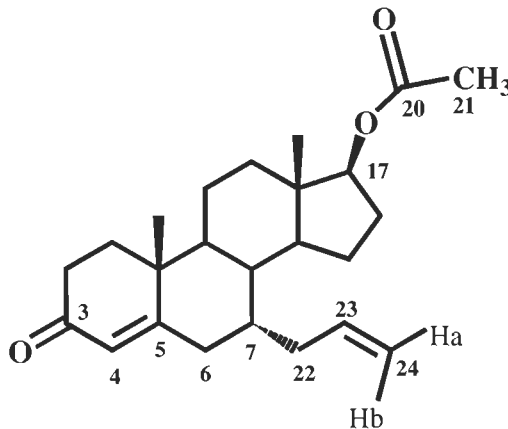
**RMN- $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 6,09 (2H, s, **6-CH** et **7-CH**), 5,65 (1H, s, **4-CH**), 4,61 (1H, t apparent,  $J=7,81$  Hz, **17-CH**), 2,03 (3H, s, **21-CH<sub>3</sub>**) 1,10 (3H, s, **19-CH<sub>3</sub>**), 0,86 (3H, s, **18-CH<sub>3</sub>**).

**RMN- $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 199,3 (**C-3**), 171,3 (**C-20**), 163,8 (**C-5**), 140,3 (**C-7**), 128,4 (**C-4**), 124,0 (**C-6**), 82,3 (**C-17**), 50,8, 48,3, 43,6, 37,6, 36,8, 36,7, 36,3, 34,1, 27,7, 23,3, 21,3, 20,4, 16,5, 12,2.

**SM** ( $m/e$ ): 328 ( $M^+$ ), 286 ( $M^+ - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ )

**Masse exacte:** calculée pour  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_3 = 328,2038$ ; trouvée = 328,2032.

### 5.2.3 Synthèse de l'acétate de 7 $\alpha$ -allyl-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one (4) :



Sous atmosphère d'azote, le stéroïde **3** (2,10 g, 6,39 mmol) est dissous dans du dichlorométhane sec (60 mL) et est amené à -78°C avec de l'azote liquide. La pyridine (0,65 mL, 6,39 mmol) est ajoutée à la solution suivi du tétrachlorure de titane ( $\text{TiCl}_4$ ) (3,58 mL, 32,6 mmol). Le mélange est agité durant 5 min suivi de l'ajout de l'allyltriméthylsilane ( $(\text{C}_3\text{H}_5)\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ) (6,21 mL, 39,1 mmol) dilué dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sec (10 mL). La solution bleue noire est agitée à -78°C pendant 1,5 heures et ensuite à -30°C pendant 1,25 heures. Le mélange est dilué dans de l'éther et lavé une première fois avec

une portion de HCl 3,7% et lavé ensuite avec 4 portions d'eau. La phase organique est récupérée, séchée, filtrée et évaporée. Le produit brut a été purifié par chromatographie éclair (hexanes:acétone, 90:10) pour obtenir le produit **4** (1,67 g) avec un rendement de 70%.

**PF:** 148-150 °C.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 1736 (C=O, acétate), 1678 (C=O, ènone), 1616 (C=C), 1243 (C-O).

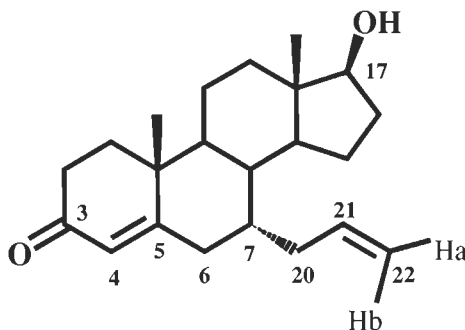
**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 5,70 (1H, s, **4-CH**), 5,60 (1H, m, **23-CH**), 5,02-4,97 (2H, dd, J=3,1 Hz et J=1,2 Hz, **24-CH<sub>a</sub>** et dt, J=11,3 Hz et J=2,0 Hz, **24-CH<sub>b</sub>**), 4,60 (1H, t, J=16,80 Hz, **17-CH**), 2,03 (3H, s, **20-CH<sub>3</sub>**), 1,20 (3H, s, **19-CH<sub>3</sub>**), 0,84 (3H, s, **18-CH<sub>3</sub>**).

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 199,3 (**C-3**), 171,3 (**C-20**), 169,4 (**C-5**), 137,0 (**C-23**), 126,4 (**C-4**), 117,0 (**C-24**), 82,6 (**C-17**), 47,2, 46,2, 42,8, 38,9, 38,5, 36,7, 36,3, 36,2, 36,1, 34,2, 30,4, 27,6, 23,1, 21,4, 20,9, 18,2, 12,1.

**SM (m/e):** 370 (M<sup>+</sup>), 312 (M<sup>+</sup> - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

**Masse exacte:** calculée pour C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub> = 370,2508; trouvée = 370,2505.

#### 5.2.4 Synthèse de 7α-allyl-4-androstèn-17β-ol-3-one (13) :



Le stéroïde **4** (0,71 g, 1,9 mmol) est dissous dans le méthanol (15 mL). Une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 5 N (5 mL) est ajoutée au mélange et ce dernier

est porté à reflux pendant 2 heures. La solution est refroidie à la température de la pièce et de l'éther est ajouté. La phase organique est lavée avec une portion de solution aqueuse saturée de carbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ). La phase organique est récupérée et lavée 4 fois avec de l'eau. L'éther est ensuite séché, filtré et évaporé. Cette réaction n'a pas nécessité de purification et a donné le produit pur **13** (0,60 g) avec un rendement de 95%.

**PF:** 195-200 °C.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3449 (O-H), 1656 (C=O), 1615 (C=C), 1077 (C-O).

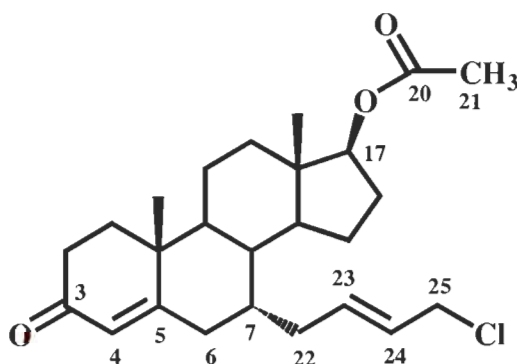
**RMN- $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 5,69 (1H, s, **4-CH**), 5,60 (1H, m, **21-CH**), 5,02-4,94 (2H, dd,  $J=3,1$  Hz et  $J=1,2$  Hz, **22-CH<sub>a</sub>** et dt,  $J=11,3$  Hz et  $J=2,0$  Hz, **22-CH<sub>b</sub>**), 3,64 (1H, t,  $J=16,80$  Hz, **17-CH**), 1,19 (3H, s, **19-CH<sub>3</sub>**), 0,78 (3H, s, **18-CH<sub>3</sub>**).

**RMN- $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 199,4 (**C-3**), 169,8 (**C-5**), 137,1 (**C-21**), 126,4 (**C-4**), 117,0 (**C-22**), 81,8 (**C-17**), 47,4, 46,4, 43,1, 38,9, 38,7, 36,5, 36,3, 36,2, 36,1, 34,3, 30,5, 30,4, 22,9, 21,1, 18,2, 11,2.

**SM** ( $m/e$ ): 328 ( $M^+$ ), 287 ( $M^+ - \text{C}_3\text{H}_5$ ).

**Masse exacte:** calculée pour  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2 = 328,2402$ ; trouvée = 328,2395.

### 5.2.5 Synthèse de l'acétate de 7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2-ényl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one (5)





Sous atmosphère d'azote, le stéroïde **4** (0,65 g, 1,75 mmol) est dissous dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sec. Le catalyseur Hoveyda-Grubbs 2e génération (0,11 g, 0,17 mmol) dissous préalablement dans 1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sec est ajouté au mélange. Le chlorure d'allyle (1,15 mL, 13,9 mmol) est ensuite ajouté à la solution. Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 9 heures. Par la suite, le solvant organique est évaporé à sec. Le produit brut brun-noir est purifié par chromatographie éclair (hexanes:acétone, 95:5) pour donner le stéroïde **5** (0,64 g) de produit pur avec un rendement de 90%.

**PF:** 87-91 °C.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1728 (C=O, acétate), 1669 (C=O, ènone), 1614 (C=C), 1250 (C-O).

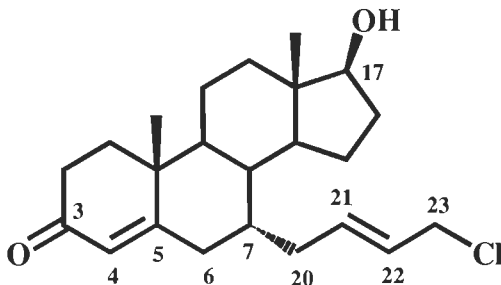
**RMN- $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 5,69 (1H, s, **4-CH**), 5,59 (2H, m, **23-CH** et **24-CH**), 4,58 (1H, t,  $J=8,2$  Hz, **17-CH**), 4,00 (2H, m, **25-CH<sub>2</sub>**), 2,02 (3H, s, **21-CH<sub>3</sub>**), 1,18 (3H, s, **19-CH<sub>3</sub>**), 0,82 (3H, s, **18-CH<sub>3</sub>**).

**RMN- $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 199,2 (**C-3**), 171,3 (**C-20**), 169,1 (**C-5**), 134,1 (**C-23**), 128,5 (**C-24**), 126,5 (**C-4**), 82,6 (**C-17**), 47,2, 46,2, 45,2 (**C-25**), 42,8, 38,8, 38,5, 36,6, 36,4, 36,3, 36,1, 34,2, 28,7, 27,5, 23,1, 21,4, 20,9, 18,2, 12,1.

**SM** ( $m/e$ ): 419,2 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**Masse exacte:** calculée pour  $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{ClO}_3$  = 419,2348; trouvée = 419,2346 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^+$ .

### 5.2.6 Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one (**6**)



Le stéroïde **5** (0,65 g, 1,55 mmol) est dissous dans le méthanol (12 mL). Une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 5 N (4 mL) est ajoutée au mélange et ce dernier est porté à reflux très léger (ou à la température de la pièce) pendant 2 heures. La solution est refroidie à la température de la pièce et de l'éther est ajouté. La phase organique est lavée avec une portion de solution aqueuse saturée de carbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ). La phase organique est récupérée et lavée 4 fois avec de l'eau. L'éther est ensuite séché, filtré et évaporé. Cette réaction n'a pas nécessité de purification et a donné le produit **6** (0,54 g), déprotégé en position 17, avec un rendement de 94%.

**PF:** 142-145 °C.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3423 (O-H), 1663 (C=O), 1611 (C=C).

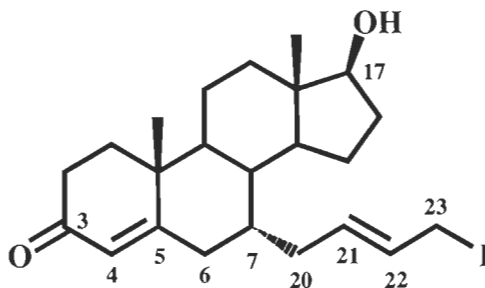
**RMN- $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 5,69 (1H, s, **4-CH**), 5,61 (2H, m, **21-CH** et **22-CH**), 3,99 (2H, m, **23-CH<sub>2</sub>**), 3,63 (1H, t,  $J=8,2$  Hz, **17-CH**), 1,19 (3H, s, **19-CH<sub>3</sub>**), 0,78 (3H, s, **18-CH<sub>3</sub>**).

**RMN- $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 199,3 (**C-3**), 169,4 (**C-5**), 134,2 (**C-21**), 128,4 (**C-22**), 126,4 (**C-4**), 81,8 (**C-17**), 47,4, 46,4, 45,2 (**C-23**), 43,2, 38,9, 38,8, 36,9, 36,5, 36,4, 36,2, 34,2, 30,5, 28,8, 23,0, 21,1, 18,2, 11,2.

**SM** ( $m/e$ ): 377,2 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**Masse exacte:** calculée pour  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{ClO}_2$  = 377,2242; trouvée = 377,2240 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

### 5.2.7 Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-iodo-but-2-ényl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one (7)



L'iodure de sodium (NaI) (70 mg, 0,44 mmol) est ajouté au stéroïde **6** (0,11 g, 0,29 mmol) préalablement dissous dans l'acétone sec. Le mélange est agité à reflux pendant 3 heures. Par la suite, l'acétone est évaporée et de l'éther est ajouté. Quatre lavages avec de l'eau sont réalisés. La phase organique est séchée, filtrée et évaporée. Une chromatographie éclair (hexanes:acétone, 85:15) a permis de purifier le produit iodé **7** (120 mg). La molécule a été obtenue avec un rendement de 90%.

**PF:** 117-122 °C.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3414 (O-H), 1656 (C=O), 1617 (C=C).

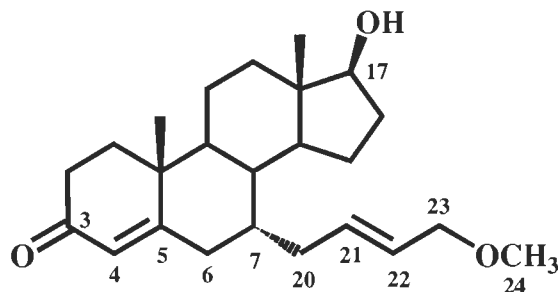
**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 5,74 (1H, s, **4-CH**), 5,65 (2H, m, **21-CH** et **22-CH**), 3,85 (2H, d apparent, J=7,03 Hz, **23-CH<sub>2</sub>**), 3,64 (1H, t, J=8,4 Hz, **17-CH**), 1,19 (3H, s, **19-CH<sub>3</sub>**), 0,78 (3H, s, **18-CH<sub>3</sub>**).

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 199,4 (**C-3**), 169,4 (**C-5**), 133,3 (**C-21**), 130,4 (**C-22**), 126,5 (**C-4**), 81,8 (**C-17**), 47,3, 46,4, 43,2, 38,9, 38,8, 36,4, 36,2, 34,2, 34,1, 30,5, 28,8, 23,0, 21,1, 21,0, 18,2, 11,2, 6,3 (**C-23**).

**SM (m/e) :** 469,2 (M+H)<sup>+</sup>.

**Masse exacte:** calculée pour C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>IO<sub>2</sub> = 469,1598; trouvée = 469,1591 (M+H)<sup>+</sup>.

### 5.2.8 Synthèse de 7α-(4-methoxy-but-2-ényl)-4-androstèn-17β-ol-3-one (8)



Le produit **7** (12 mg, 0,03 mmol) est dissous dans le méthanol (3 mL). Par la suite, le méthoxyde de sodium ( $\text{CH}_3\text{ONa}$ ) (10 mg, 0,21 mmol) est ajouté au milieu réactionnel. La solution est portée à reflux pendant 2 heures. Une fois le mélange refroidi, l'éther est ajouté. La phase organique est lavée 6 fois avec de l'eau, séchée, filtrée et évaporée. La purification a été réalisée par chromatographie éclair (hexanes:acétone, 80:20) et a donné le stéroïde **8** pur (5 mg) avec un rendement de 55%. Note: Des pertes importantes de produit sont probables à cette petite échelle réactionnelle.

**PF:** 90-95 °C.

**IR** ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3433 (O-H), 1670 (C=O), 1112 (C-O-C).

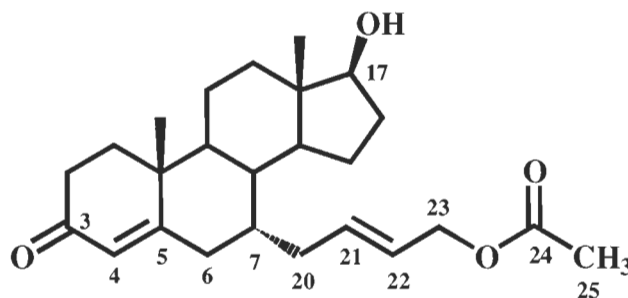
**RMN- $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 5,71 (1H, s, **4-CH**), 5,54 (2H, t apparent,  $J=2,3$  Hz, **21-CH** et **22-CH**), 3,86 (2H, d apparent,  $J=3,91$  Hz, **23-CH<sub>2</sub>**), 3,66 (1H, t,  $J=8,4$  Hz, **17-CH<sub>3</sub>**), 3,32 (3H, s, **24-CH<sub>3</sub>**), 1,21 (3H, s, **19-CH<sub>3</sub>**), 0,80 (3H, s, **18-CH<sub>3</sub>**).

**RMN- $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 199,3 (**C-3**), 169,6 (**C-5**), 132,3 (**C-21**), 128,7 (**C-22**), 126,4 (**C-4**), 81,9 (**C-17**), 73,1 (**C-23**), 58,1 (**C-24**), 47,3, 46,4, 43,1, 39,0, 38,8, 36,5, 36,4, 36,2, 34,2, 30,6, 28,8, 23,0, 21,1, 18,2, 11,1.

**SM** ( $m/e$ ): 373,3 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

**Masse exacte:** calculée pour  $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{O}_3 = 373,2737$ ; trouvée = 373,2740 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

### 5.2.9 Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-acétoxy-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one (9)



Le stéroïde iodé **7** est dissous dans le diméthylformamide (DMF) (2,5 ml) et l'acétate de sodium (4 mg, 0,03 mmol) est ajouté au milieu réactionnel. La solution est portée à reflux pendant 4 heures. Une fois le mélange refroidi, l'éther est ajouté. La phase organique est lavée 6 fois avec de l'eau, séchée, filtrée et évaporée. La purification a été réalisée par chromatographie éclair (hexanes:acétone, 90:10) et a donné le produit pur **9** (5 mg) avec un rendement de 55%. Cette réaction a aussi été réalisée à partir de la molécule chlorée **6** dans les mêmes proportions et en obtenant le même rendement qu'avec la molécule iodée **7**. Note: Des pertes importantes de produit sont probables à cette petite échelle réactionnelle.

**PF:** 158-162 °C.

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):** 3440 (O-H), 1740 (C=O, acétate), 1665 (C=O, ènone), 1239 (C-O).

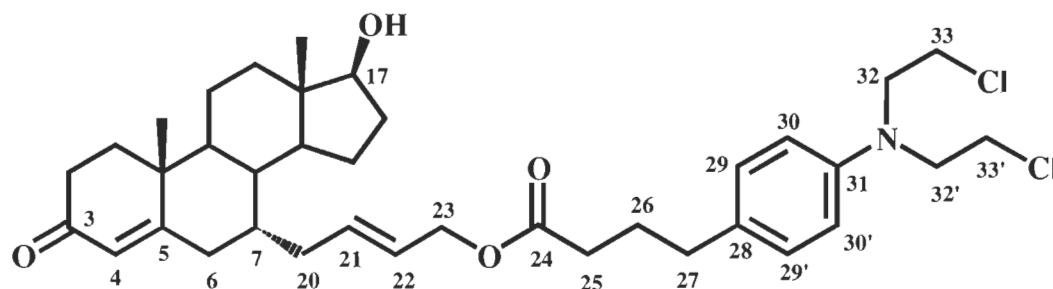
**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 5,69 (1H, s, **4-CH**), 5,56 (2H, m, **21-CH** et **22-CH**), 4,50 (2H, d, J=4,67 Hz, **23-CH<sub>2</sub>**), 3,66 (3H, t, J=8,0 Hz, **17-CH<sub>3</sub>**), 2,07 (3H, s, **25-CH<sub>3</sub>**), 1,21 (3H, s, **19-CH<sub>3</sub>**); 0,80 (3H, s, **18-CH<sub>3</sub>**).

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 199,3 (**C-3**), 171,1 (**C-24**), 169,3 (**C-5**), 134,3 (**C-21**), 126,4 (**C-4** et **C-22**), 81,9 (**C-17**), 65,1 (**C-23**), 47,4, 46,4, 43,2, 38,9, 38,8, 36,4, 36,3, 36,3, 34,2, 30,5, 29,9, 28,9, 23,0, 21,2, 21,1, 18,2, 11,2.

**SM (m/e) :** 401,3 (M+H)<sup>+</sup>.

**Masse exacte:** calculée pour C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>O<sub>4</sub> = 401,2886; trouvée = 401,2679 (M+H)<sup>+</sup>.

### 5.2.10 Synthèse de 7 $\alpha$ -(4-{4-[bis-(2-chloro-éthyl)-amino]-phényl-éthylacétoxy}-but-2-ènyl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one (10)



Le stéroïde **6** (50 mg, 0,133 mmol) est, tout d'abord, dissous dans le DMF (1 mL) dans un ballon. Dans un autre ballon, le chlorambucil (50 mg, 0,164 mmol) et le NaHCO<sub>3</sub> (10 mg, 0,16 mmol) sont dissous dans le DMF (4 mL) et l'eau (0,15 mL). Un léger chauffage de ce ballon est nécessaire dû à la faible solubilité du sel. Le stéroïde dissous est alors ajouté au mélange réactionnel et est porté à reflux pendant 9 heures. La solution est alors refroidie et de l'éther est ajouté. La phase organique est lavée 6 fois avec de l'eau, séchée, filtrée et évaporée. Une chromatographie éclair (hexanes:acétone, 95:5) a été effectuée pour donner le produit final pur **10** (50 mg) avec un rendement de 58%.

**PF:** 47-50 °C.

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):** 3422 (O-H), 1730 (C=O, ester), 1664 (C=O, ènone), 1242 (C-O).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 7,07 (2H, d, J=8,6 Hz, **29-CH** et **29'-CH**), 6,60 (2H, d, J=8,60 Hz, **30-CH** et **30'-CH**), 5,68 (1H, s, **4-CH**), 5,54 (2H, m, **21-CH** et **22-CH**), 4,48 (2H, d, J=4,69 Hz, **23-CH<sub>2</sub>**), 3,65 (9H, m, **17-CH**, **32-CH<sub>2</sub>**, **32'-CH<sub>2</sub>**, **33-CH<sub>2</sub>** et **33'-CH<sub>2</sub>**), 1,19 (3H, s, **19-CH<sub>3</sub>**), 0,78 (3H, s, **18-CH<sub>3</sub>**).

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 199,3 (C-3), 173,6 (C-24), 169,52 (C-5), 144,5 (C-31), 134,3 (C-21), 129,9 (C-28, C-29 et C-29'), 126,5 (C-22), 126,4 (C-4), 112,5 (C-30 et C-30'), 81,8 (C-17), 64,9 (C-23), 53,9, 53,7, 47,4, 46,4, 43,1, 40,7, 38,9, 38,7, 36,5, 36,4, 36,2,

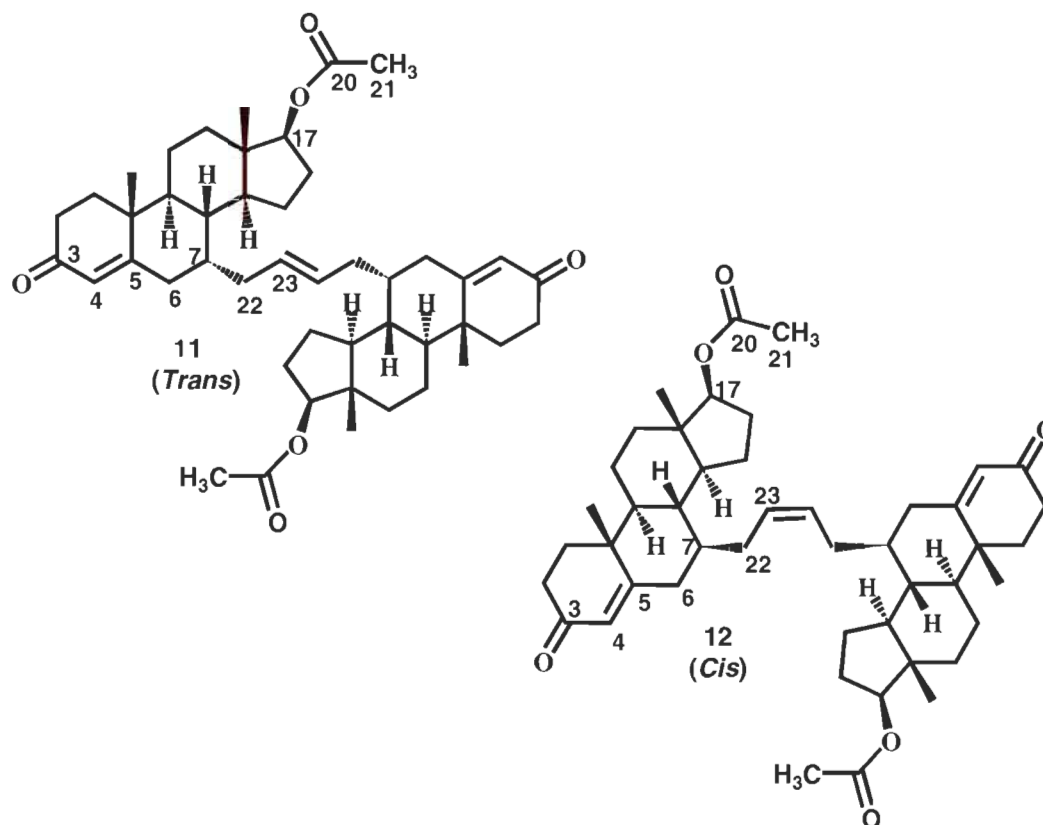
34,2, 33,8, 30,5, 28,9, 26,9, 22,9, 21,1, 18,2, 11,2.

**SM (m/e):** 644,3 (M+H)<sup>+</sup>.

**Masse exacte:** calculée pour C<sub>37</sub>H<sub>52</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>4</sub> = 644,3268; trouvée = 644,3260 (M+H)<sup>+</sup>.

### 5.3 Synthèse des dimères de testostérone

#### 5.3.1 Synthèse des dimères de testostérone protégés (*trans*-11) (*cis*-12)



Sous atmosphère d'azote, le stéroïde **4** (0.56 g, 1,51 mmol) est dissous dans le dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) sec (8 mL). Ensuite, le catalyseur Hoveyda-Grubbs 2<sup>e</sup> génération (90 mg, 0,15 mmol) préalablement dissous dans le dichlorométhane (1 mL) est ajouté au mélange réactionnel toujours sous azote. La solution est portée à reflux pendant 15 heures. Par la suite, le solvant est évaporé à sec. Le produit brun-noir est purifié par chromatographie éclair (hexanes:acétone, 95:5). Cette réaction a donné deux produits

purs. L'isomère majoritaire (**trans-11**) (0,26 g) a été obtenu avec un rendement de 50% tandis que l'isomère minoritaire (**cis-12**) (0,13 g) a été obtenu avec un rendement de 25%.

### Isomère **trans-11**

**PF:** 123-126 °C.

**IR (NaCl,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 1734 (C=O, acétate), 1673 (C=O, ènone), 1611 (C=C), 1250 (C-O).

**RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 5,63 (1H, s, **4-CH**), 5,14 (1H, m, **23-CH**), 4,59 (1H, t,  $J=8,2$  Hz, **17-CH**), 2,03 (3H, s, **21-CH<sub>3</sub>**), 1,19 (3H, s, **19-CH<sub>3</sub>**), 0,83 (3H, s, **18-CH<sub>3</sub>**).

**RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 199,3 (**C-3**), 171,4 (**C-20**), 169,8 (**C-5**), 131,1 (**C-23**), 126,3 (**C-4**), 82,7 (**C-17**), 47,1, 46,2, 42,7, 38,9, 38,3, 36,6, 36,4, 36,1, 34,2, 31,2, 29,3, 27,6, 23,1, 21,4, 20,9, 18,2, 12,1.

**SM (m/e):** 713,5 (M+H)<sup>+</sup>.

**Masse exacte:** calculée pour  $\text{C}_{46}\text{H}_{65}\text{O}_6 = 713,4776$ ; trouvée = 713,4773 (M+H)<sup>+</sup>.

### Isomère **cis-12**

**PF:** 241-244 °C.

**IR (NaCl,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 1734 (C=O, acétate), 1673 (C=O, ènone), 1250 (C-O).

**RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 5,61 (1H, s, **4-CH**), 5,30 (1H, m, **23-CH**), 4,65 (1H, t,  $J=8,2$  Hz, **17-CH**), 2,03 (3H, s, **21-CH<sub>3</sub>**), 1,17 (3H, s, **19-CH<sub>3</sub>**), 0,83 (3H, s, **18-CH<sub>3</sub>**).

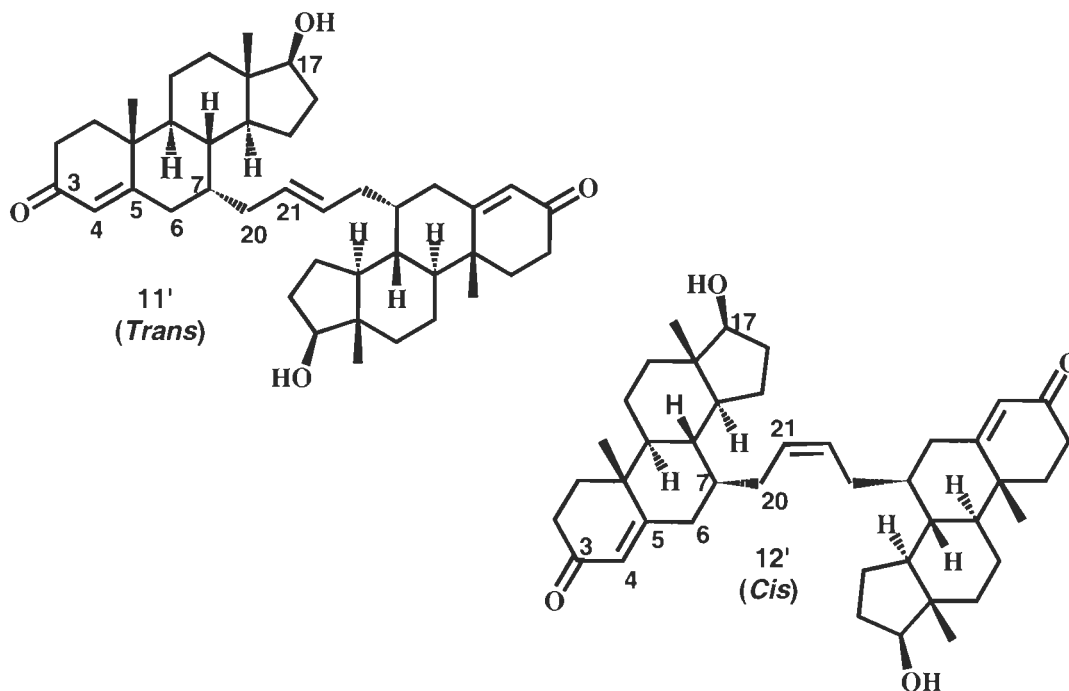
**RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 198,9 (**C-3**), 171,3 (**C-20**), 169,8 (**C-5**), 129,8 (**C-23**), 126,6 (**C-4**), 82,8 (**C-17**), 47,0, 46,1, 42,7, 38,8, 38,5, 37,0, 36,4, 36,7, 36,1, 34,2, 27,7, 24,7, 23,2, 21,4, 21,0, 18,3, 12,1.

**SM (m/e):** 713,5 (M+H)<sup>+</sup>.

**Masse exacte:** calculée pour  $\text{C}_{46}\text{H}_{65}\text{O}_6 = 713,4776$ ; trouvée = 713,4773 (M+H)<sup>+</sup>.



### 5.3.2 Synthèse des dimères de testostérone déprotégés (*trans*-11') (*cis*-12')



Chacun des isomères (isomère *trans*-11: 45 mg, 0,063 mmol; isomère *cis*-12: 70 mg 0,1 mmol) est traité séparément dans le but d'hydrolyser le groupement acétate en position 17. Les isomères sont, tout d'abord, dissous dans le méthanol (3 mL). Ensuite, une solution aqueuse de HCl 5N (1 mL) est ajoutée au mélange réactionnel. Les mélanges sont portés à reflux 4,5 heures. Les solutions sont refroidies à la température de la pièce et de l'éther est ajouté. Les phases organiques sont lavées avec une portion de solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub>. Les phases organiques sont récupérées et lavées 4 fois avec de l'eau. L'éther est ensuite séché, filtré et évaporé. Ces réactions n'ont pas nécessité de purification et ont donné les produits purs *trans*-11' (30 mg) et *cis*-12' (6 mg) avec un rendement de 95%.

#### Isomère *trans*-11'

**PF:** 225-228 °C.

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):** 3422 (O-H), 1656 (C=O), 1217 (C-O).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 5,65 (1H, s, **4-CH**), 5,17 (1H, m, **21-CH**), 3,65 (1H, t, J=5,1 Hz, **17-CH**), 1,21 (3H, s, **19-CH<sub>3</sub>**), 0,80 (3H, s, **18-CH<sub>3</sub>**).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 199,3 (**C-3**), 169,9 (**C-5**), 131,1 (**C-21**), 126,3 (**C-4**), 81,9 (**C-17**), 47,3, 46,4, 43,1, 39,0, 38,6, 36,6, 36,4, 36,1, 34,2, 30,6, 29,9, 29,3, 23,0, 21,1, 18,2, 11,1.

**SM (m/e)**: 629,5 (M+H)<sup>+</sup>.

**Masse exacte**: calculée pour C<sub>42</sub>H<sub>61</sub>O<sub>4</sub> = 629,4564; trouvée = 629,4563 (M+H)<sup>+</sup>.

### **Isomère *cis*-12'**

**PF**: 127-131 °C.

**IR** (NaCl, cm<sup>-1</sup>): 3424 (O-H), 1658 (C=O), 1217 (C-O).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 5,60 (1H, s, **4-CH**), 5,29 (1H, m, **21-CH**), 3,78 (1H, t, J=6,9 Hz, **17-CH**), 1,18 (3H, s, **19-CH<sub>3</sub>**), 0,79 (3H, s, **18-CH<sub>3</sub>**).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 199,0 (**C-3**), 170,5 (**C-5**), 129,9 (**C-21**), 126,6 (**C-4**), 81,6 (**C-17**), 47,3, 46,3, 43,1, 38,84, 38,80, 36,9, 36,7, 36,2, 34,2, 30,4, 29,9, 24,9, 23,0, 21,1, 18,3, 11,2.

**SM (m/e)**: 629,5 (M+H)<sup>+</sup>.

**Masse exacte**: calculée pour C<sub>42</sub>H<sub>61</sub>O<sub>4</sub> = 629,4564; trouvée = 629,4558 (M+H)<sup>+</sup>.

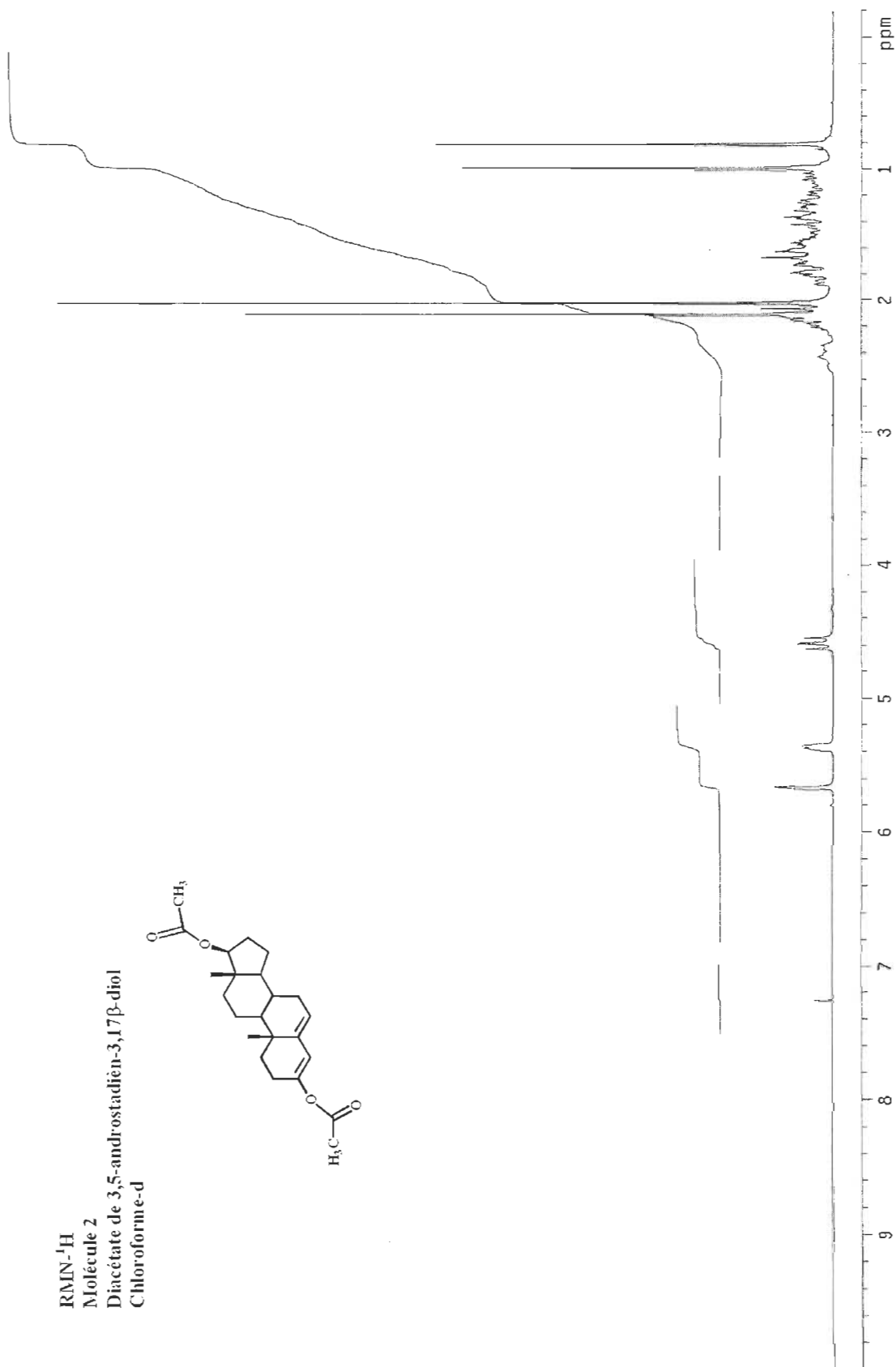
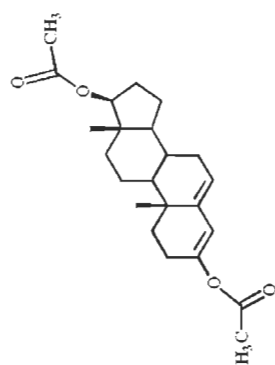
## **6. Spectres de résonance magnétique nucléaire de proton et de carbone**

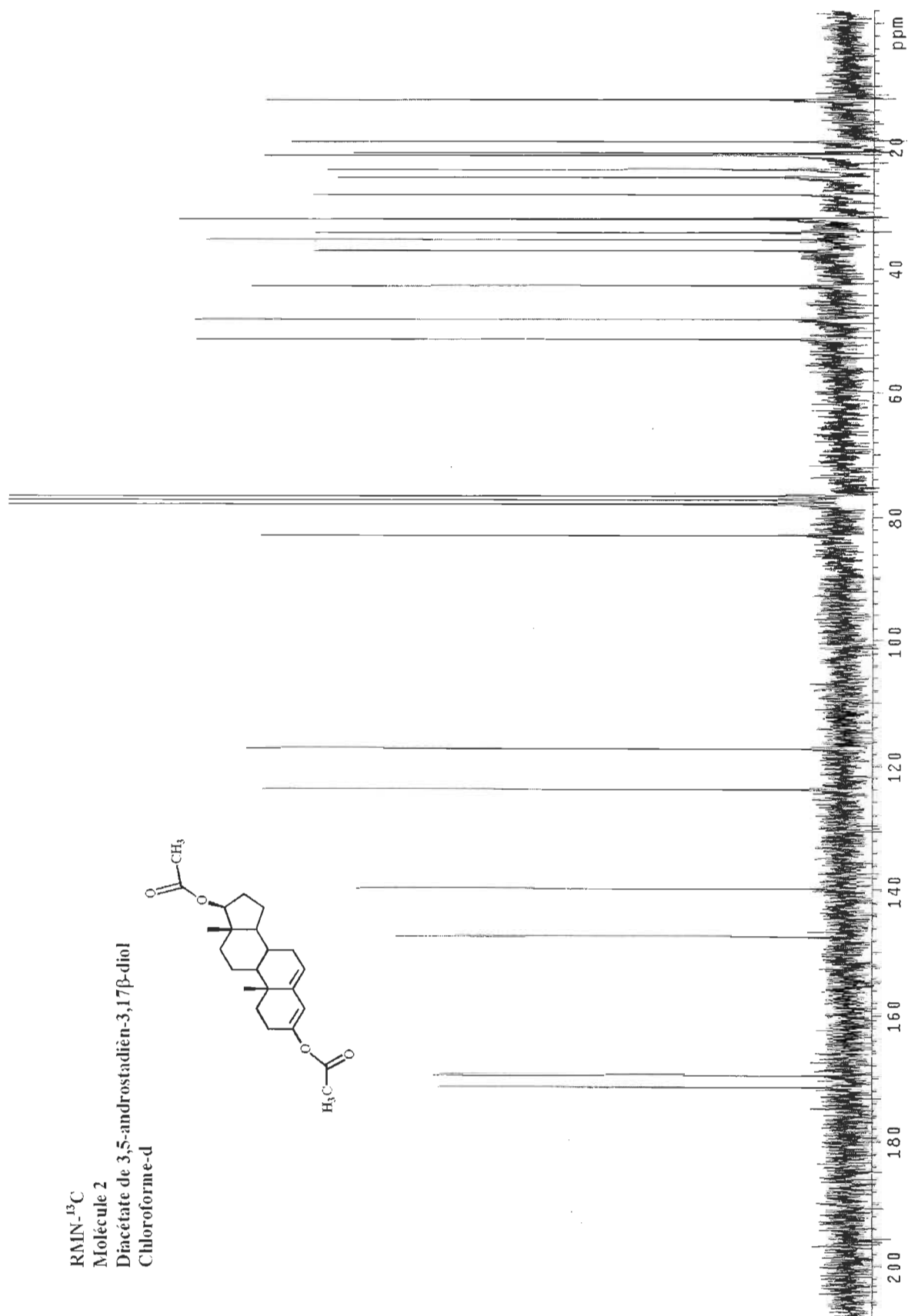
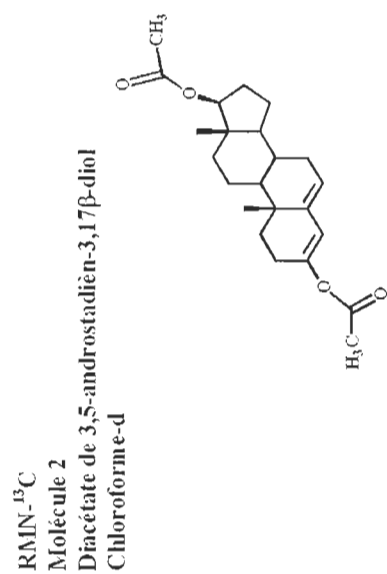
RMN-<sup>1</sup>H

## Molécule 2

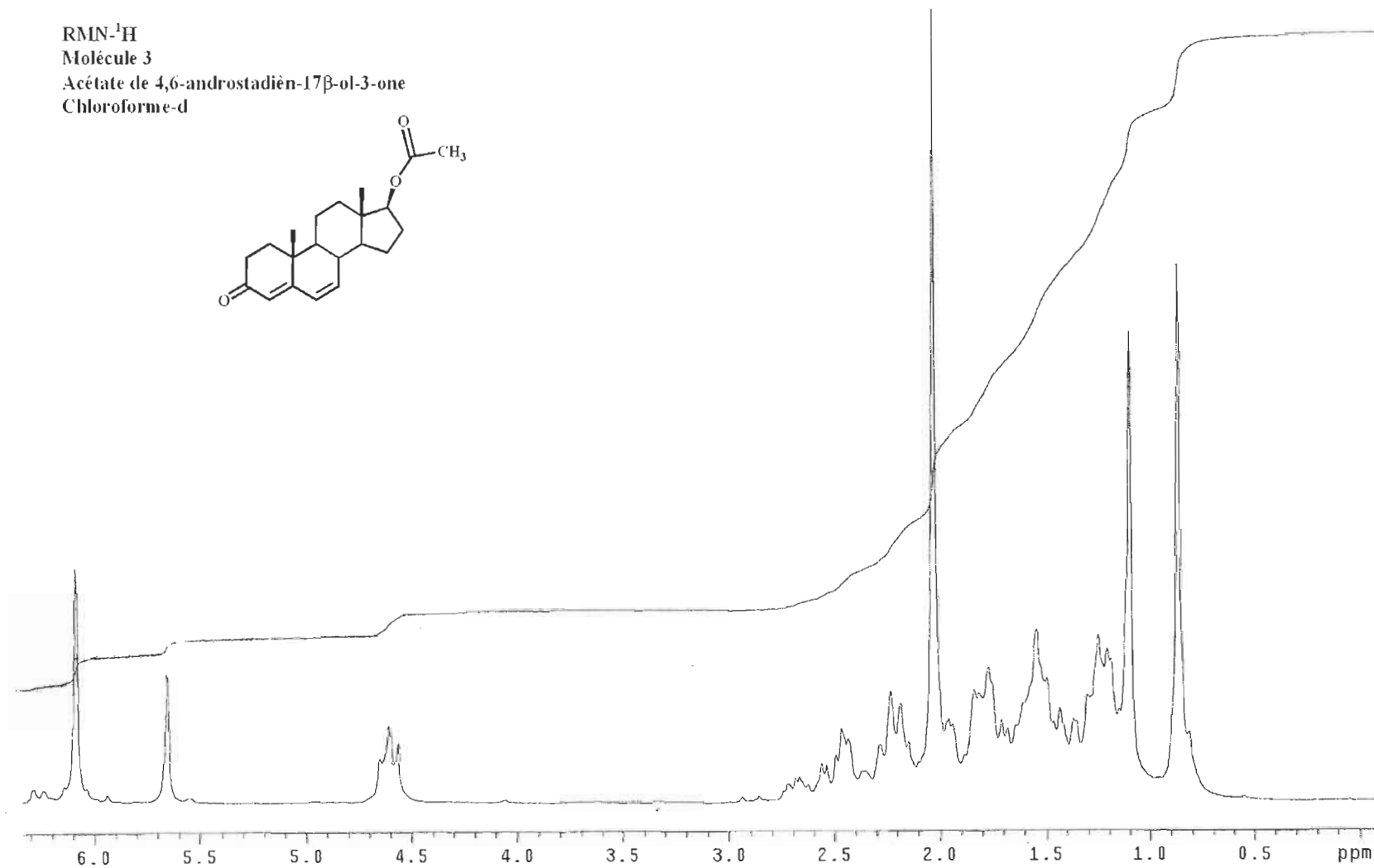
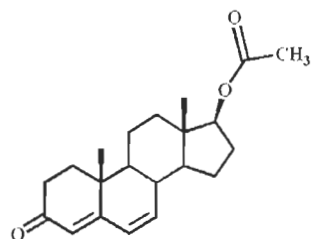
Diacétate de 3,5-androstadièn-3,17 $\beta$ -diol

Chloroform-d

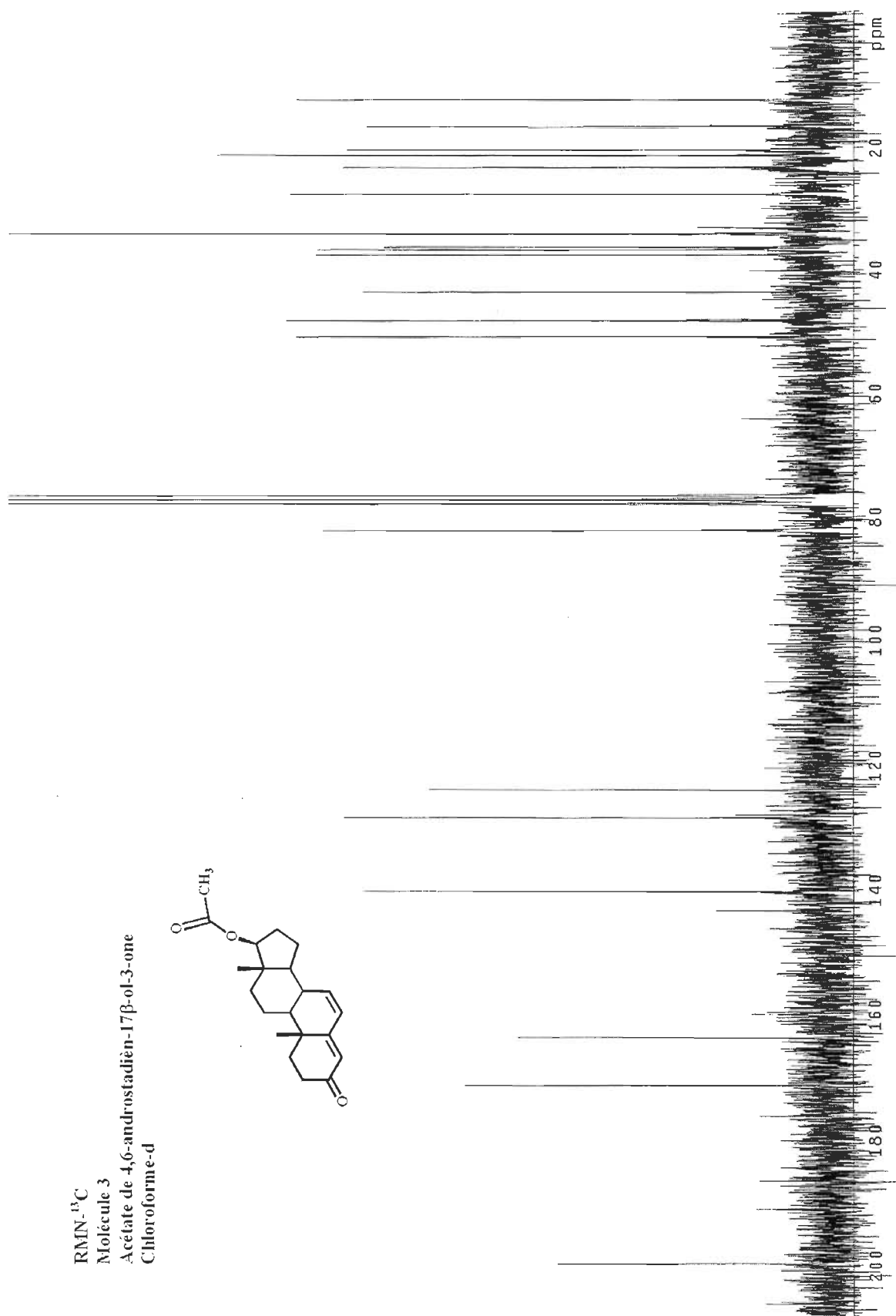
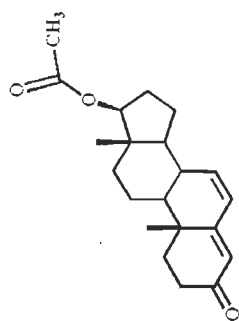




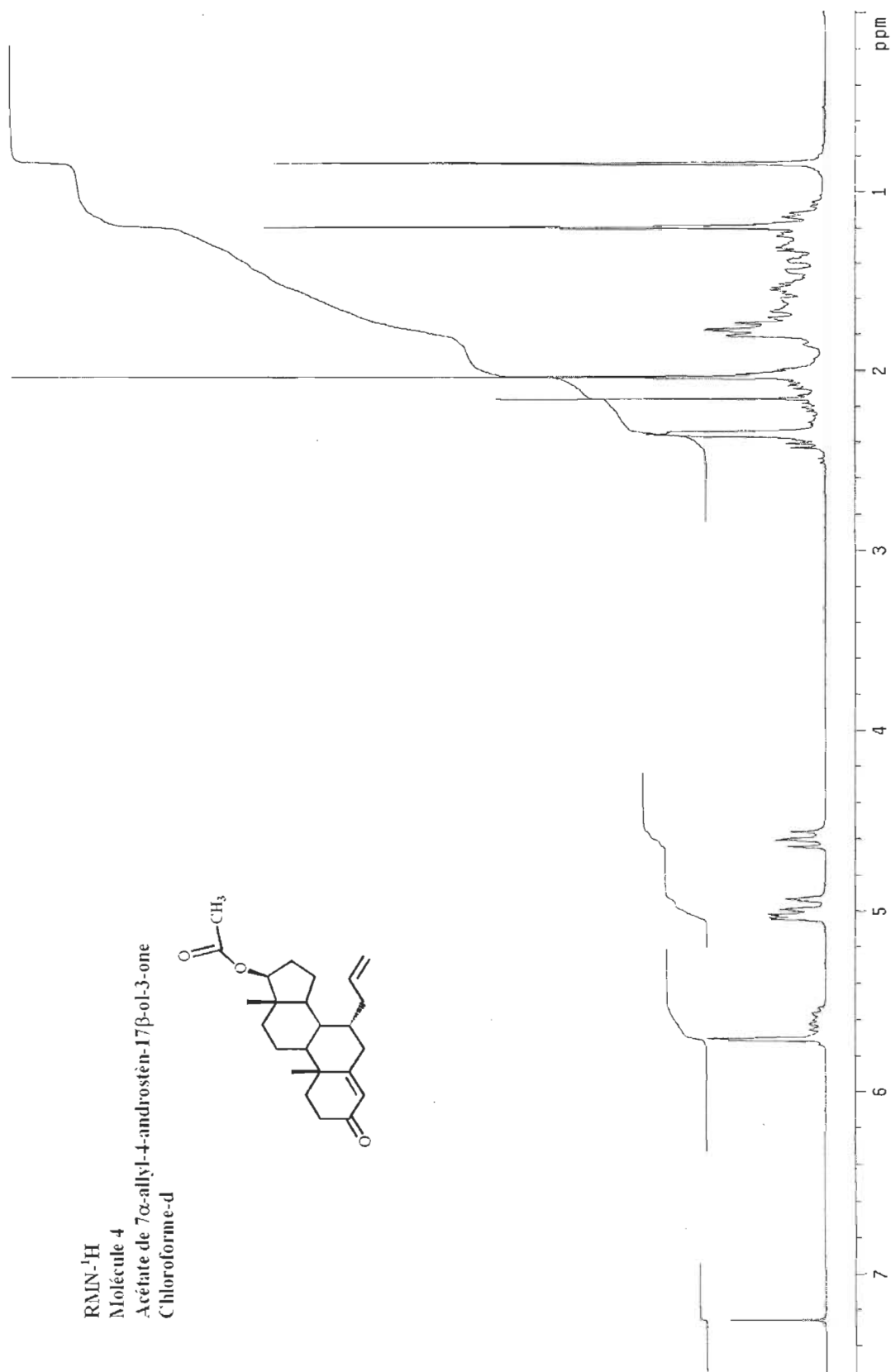
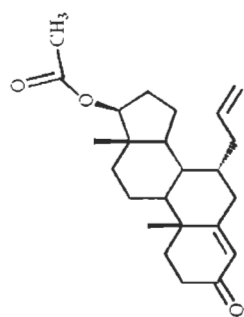
RMN-<sup>1</sup>H  
Molécule 3  
Acétate de 4,6-androstadién-17β-ol-3-one  
Chloroforme-d



RMN-<sup>13</sup>C  
Molécule 3  
Acétate de 4,6-androstadièn-17β-ol-3-one  
Chloroforme-d

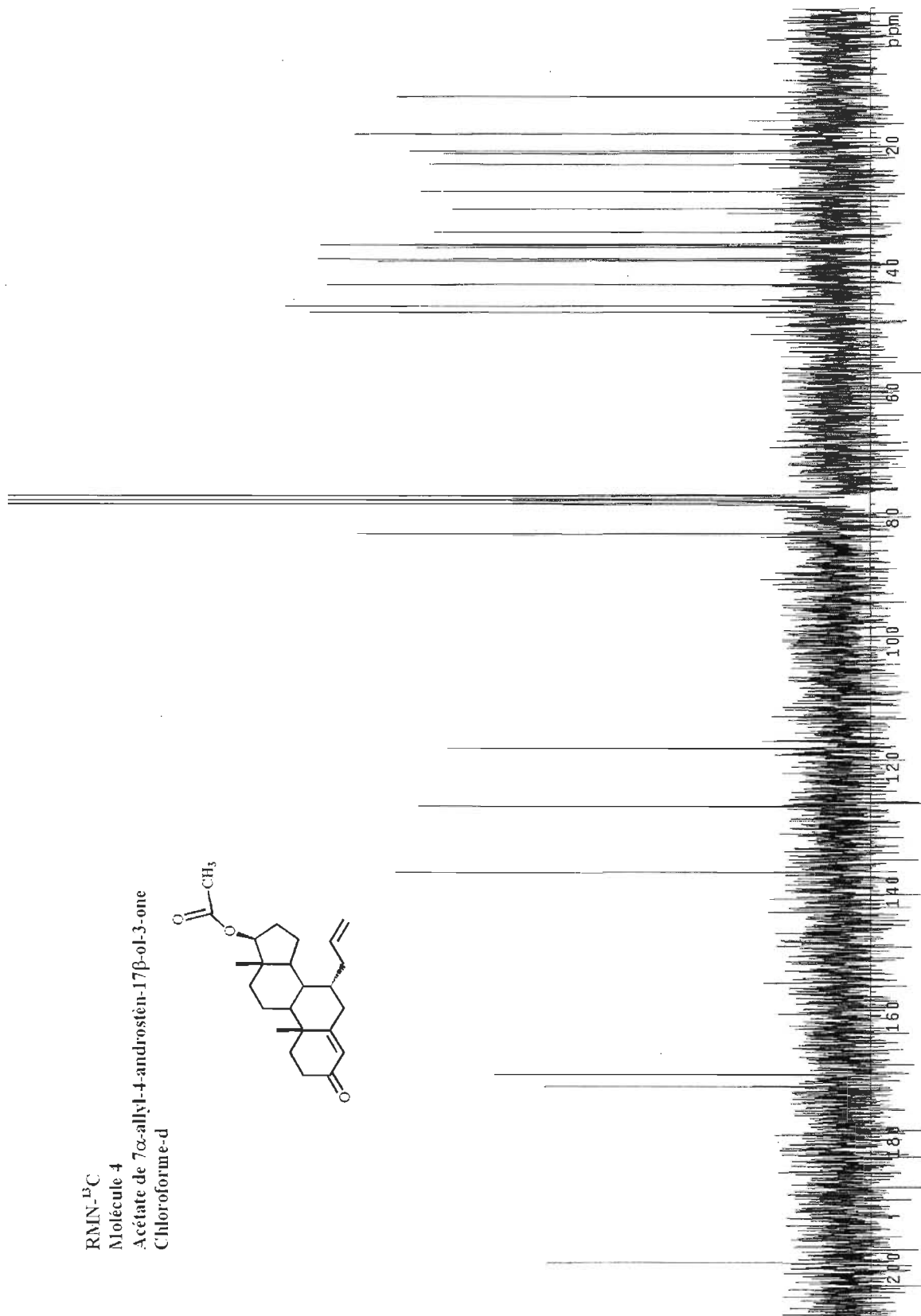
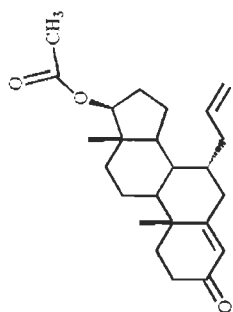


RMN- $^1\text{H}$   
Molécule 4  
Acétate de 7 $\alpha$ -allyl-4-androstén-17 $\beta$ -ol-3-one  
Chloroforme- $d$

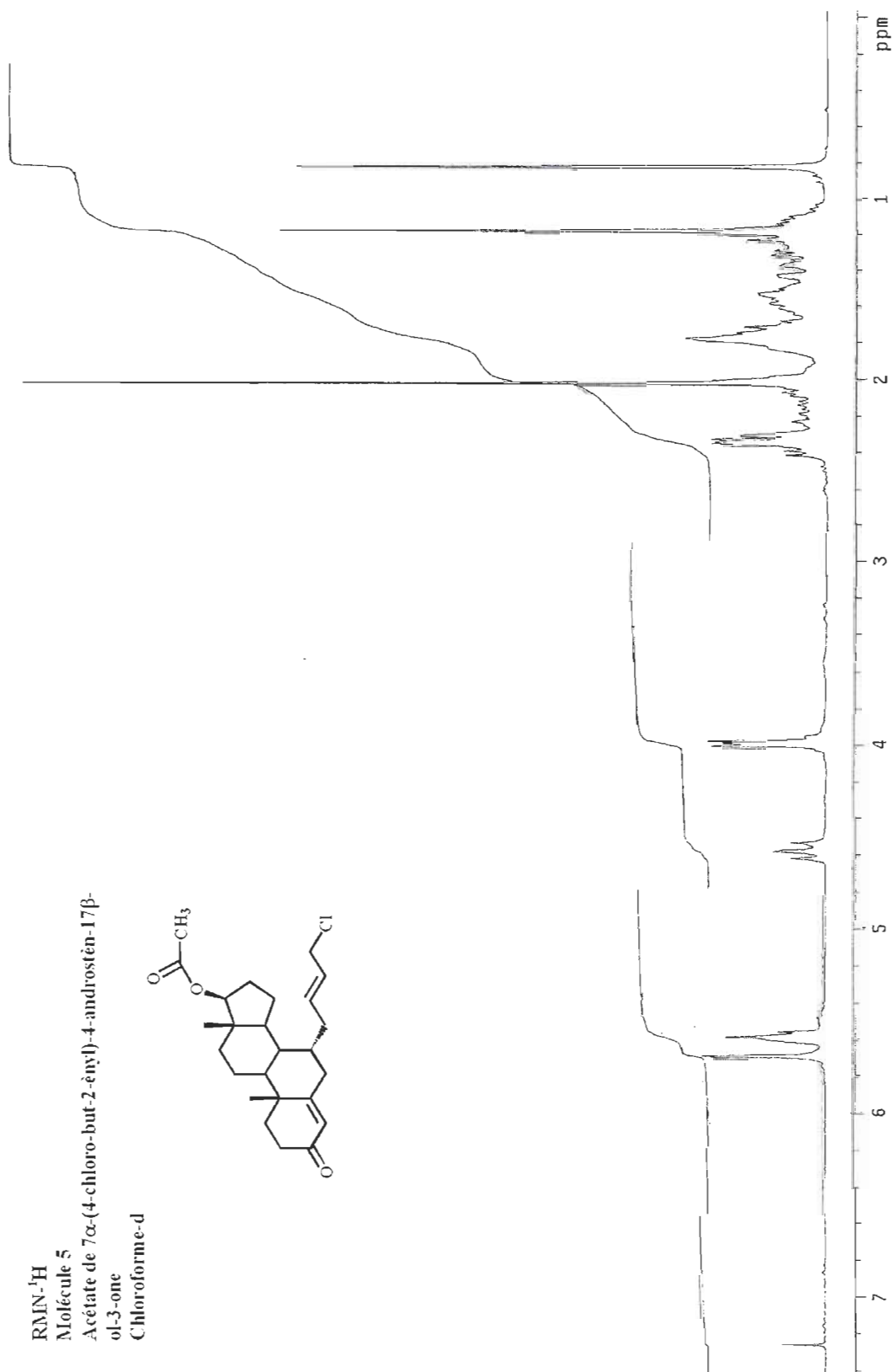
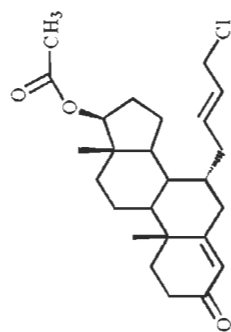




RMN- $^{13}\text{C}$   
Molécule 4  
Acétate de 7 $\alpha$ -allyl-4-androstén-17 $\beta$ -ol-3-one  
Chloroforme-d



RMN- $^1\text{H}$   
Molécule 5  
Acétate de 7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2-ène)-4-androstén-17 $\beta$ -  
ol-3-one  
Chloroforme-d

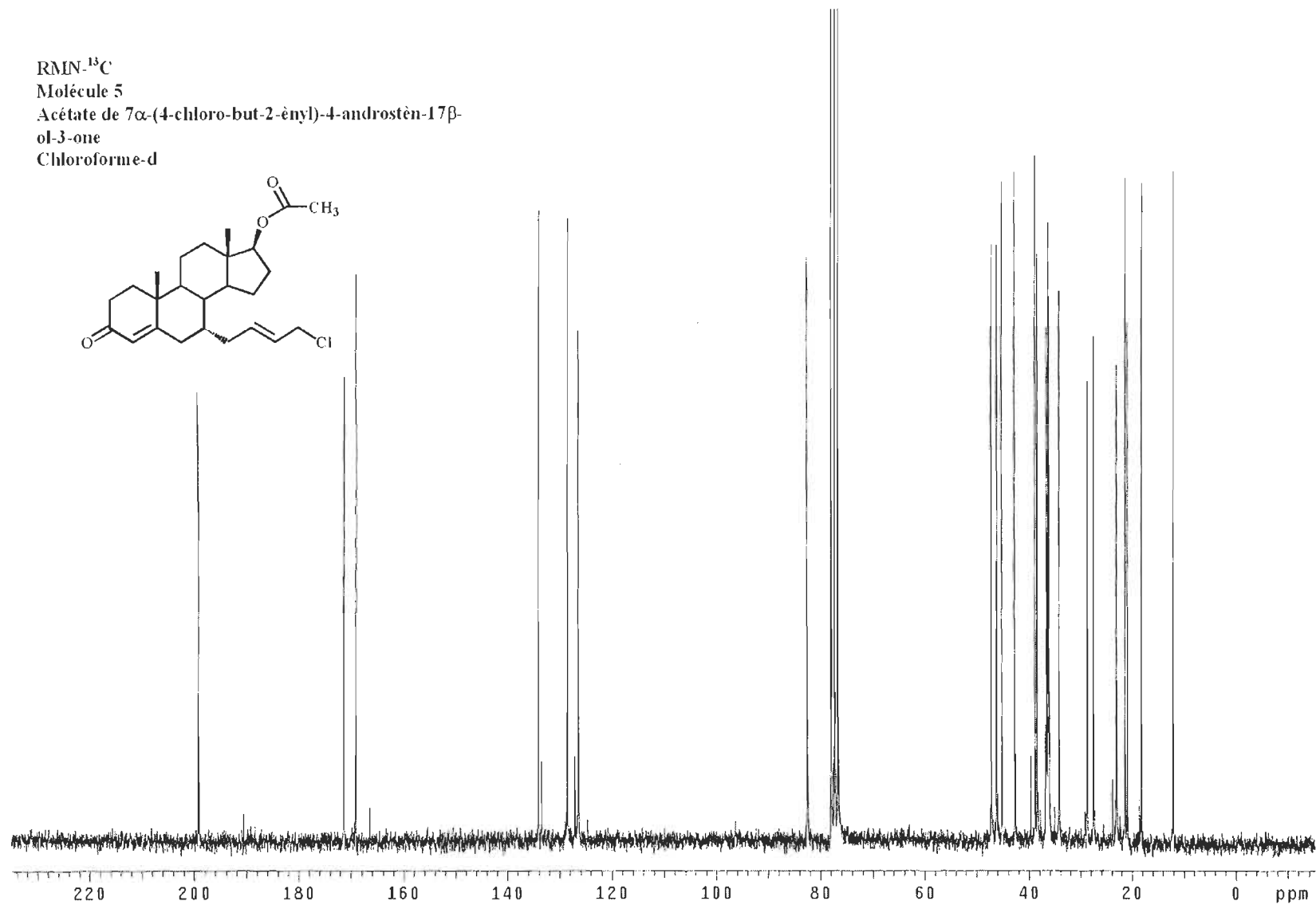
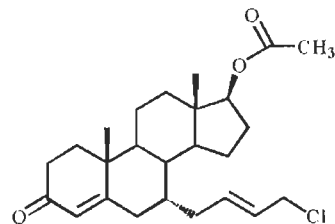


RMN- $^{13}\text{C}$

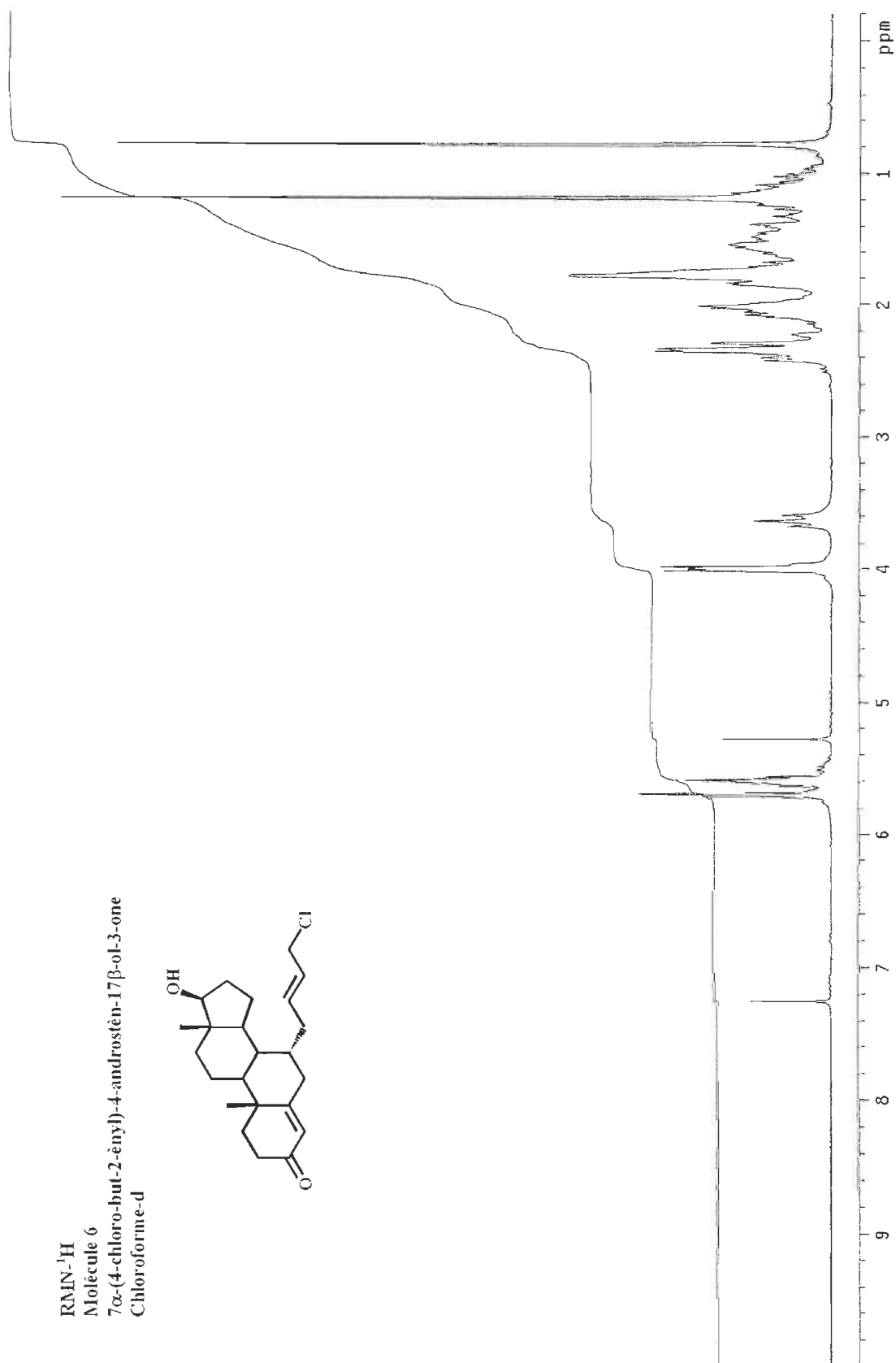
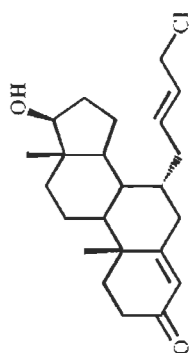
Molécule 5

Acétate de 7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2-ényl)-4-androstèn-17 $\beta$ -  
ol-3-one

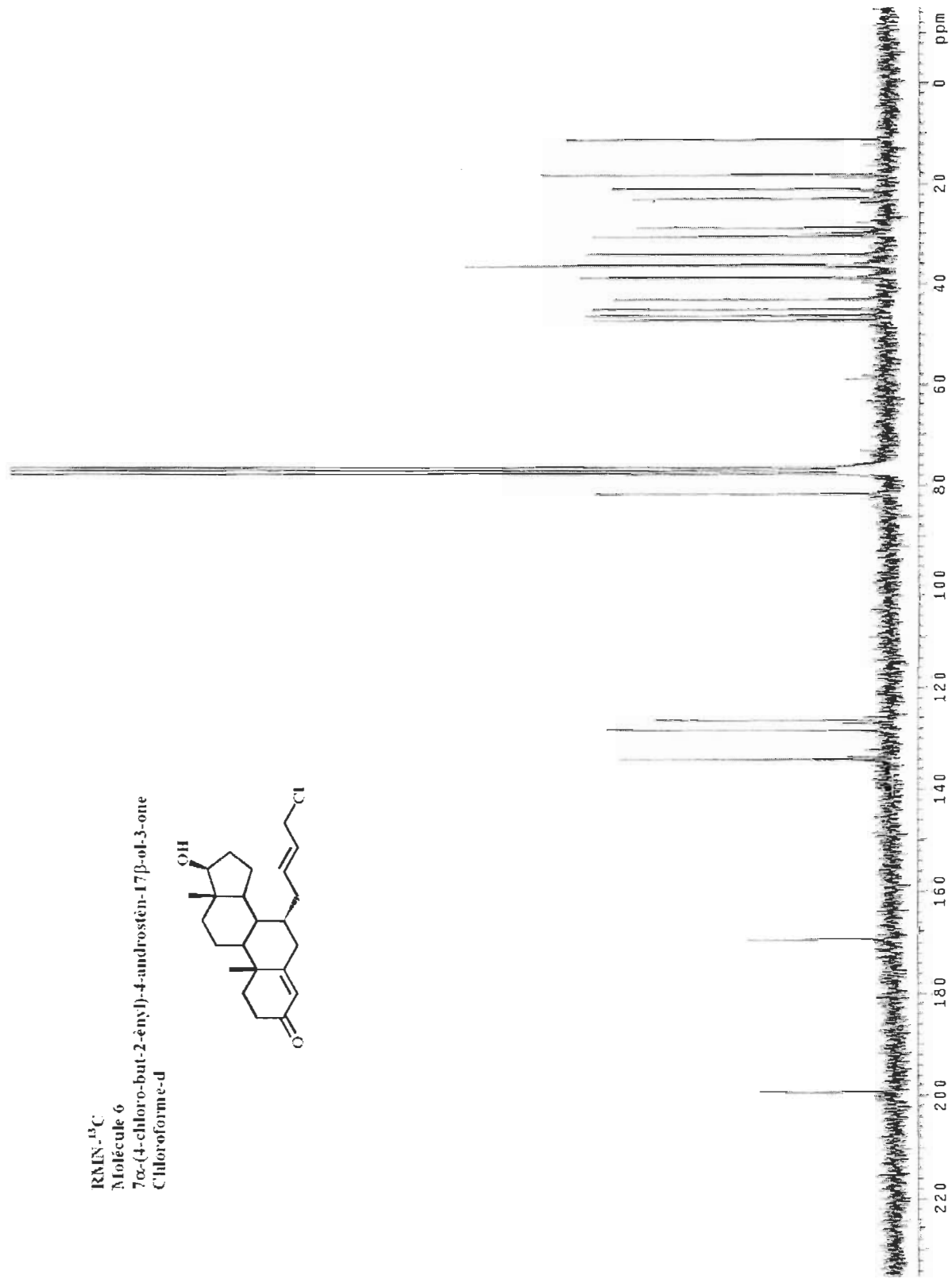
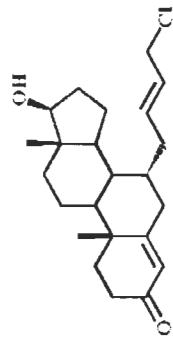
Chloroforme-d



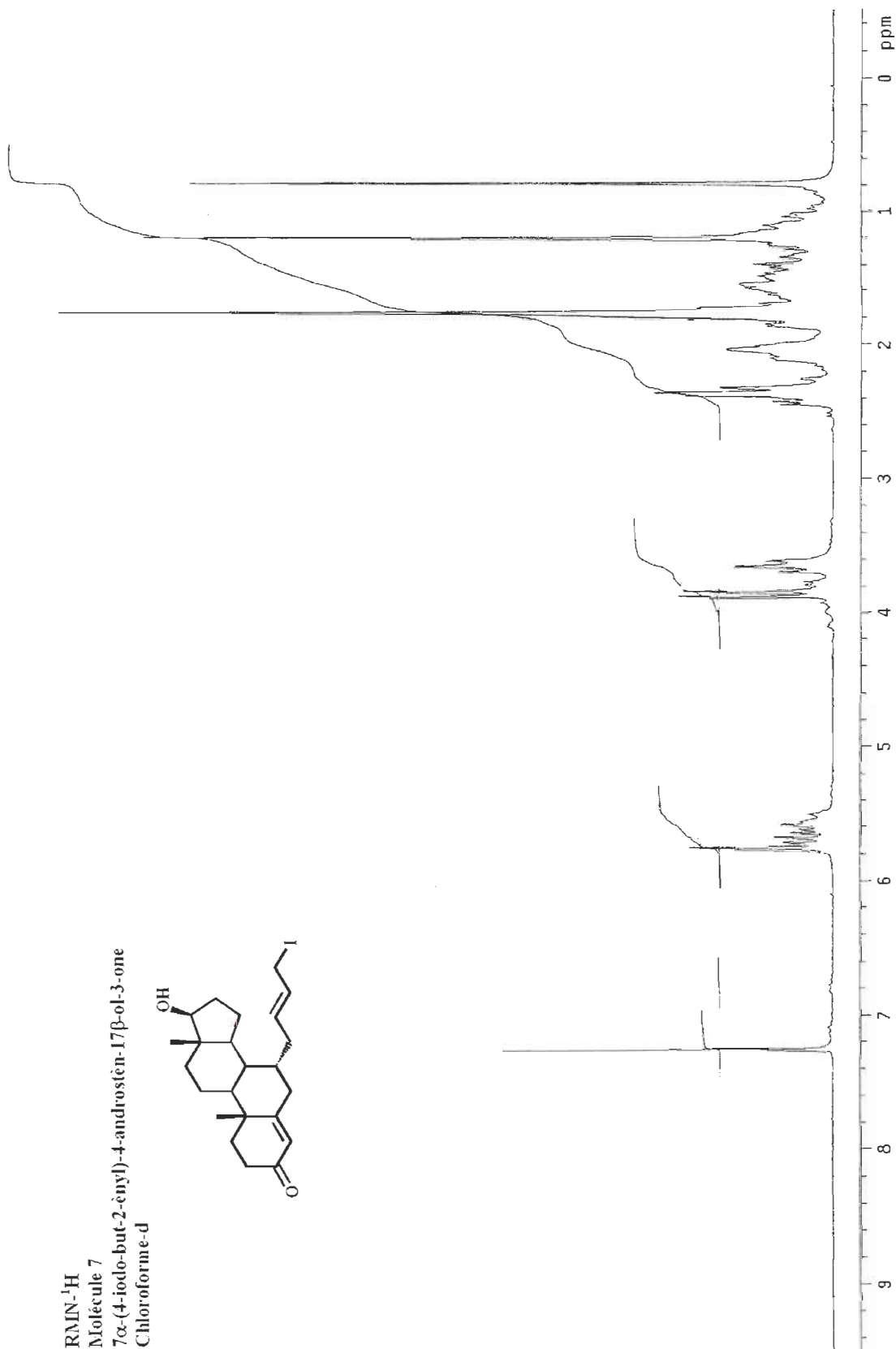
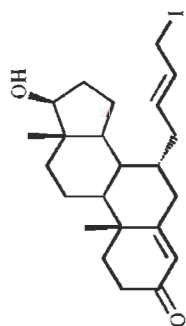
RMN- $^1\text{H}$   
Molécule 6  
7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2-ényl)-4-androstén-17 $\beta$ -ol-3-one  
Chloroforme- $d$



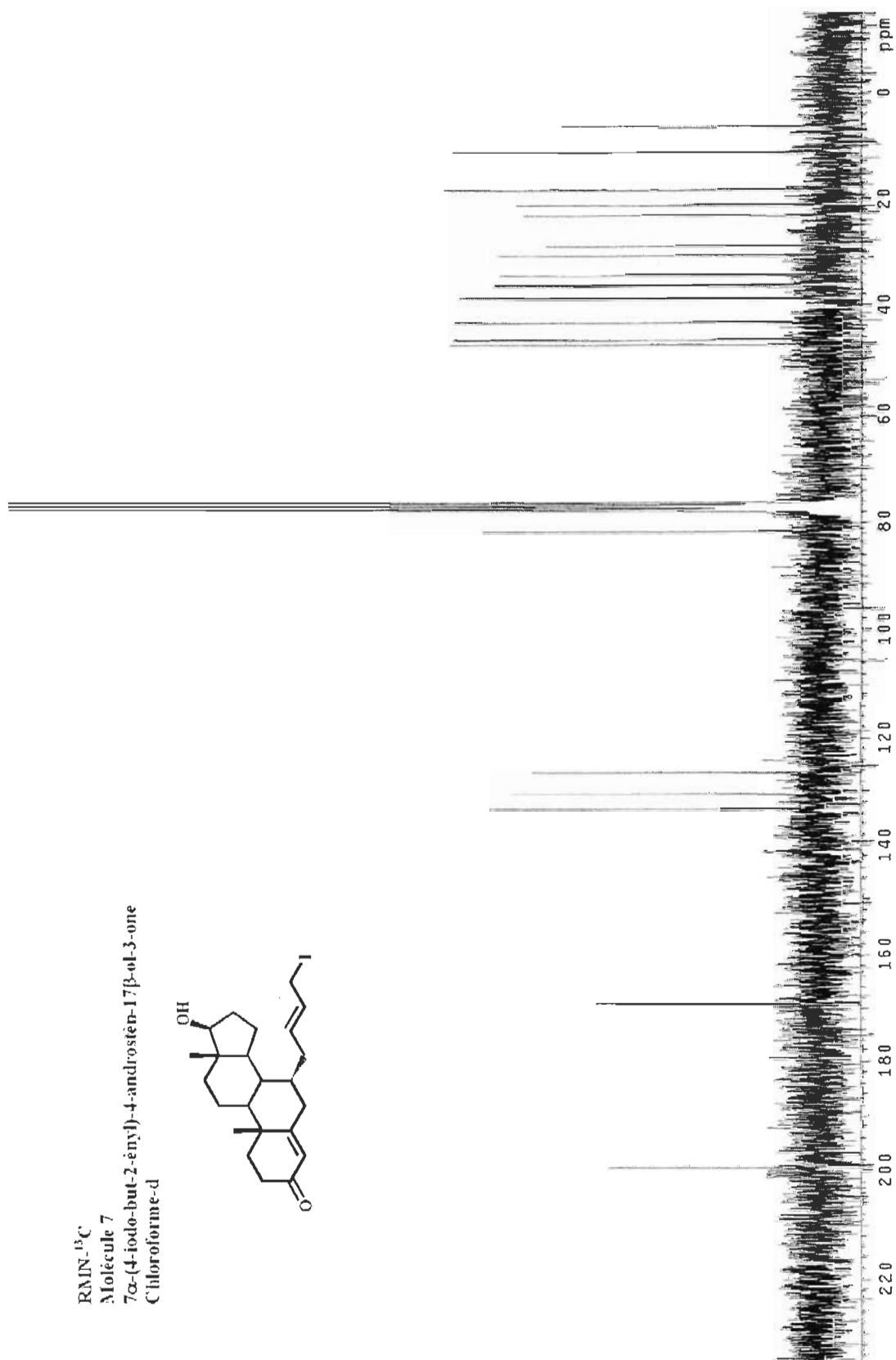
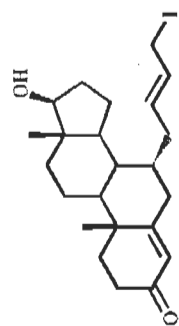
RMN-<sup>13</sup>C  
Molécule 6  
7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2- $\acute{e}$ nyl)-4-androst $\acute{e}$ n-17 $\beta$ -ol-3-one  
Chloroforme-d



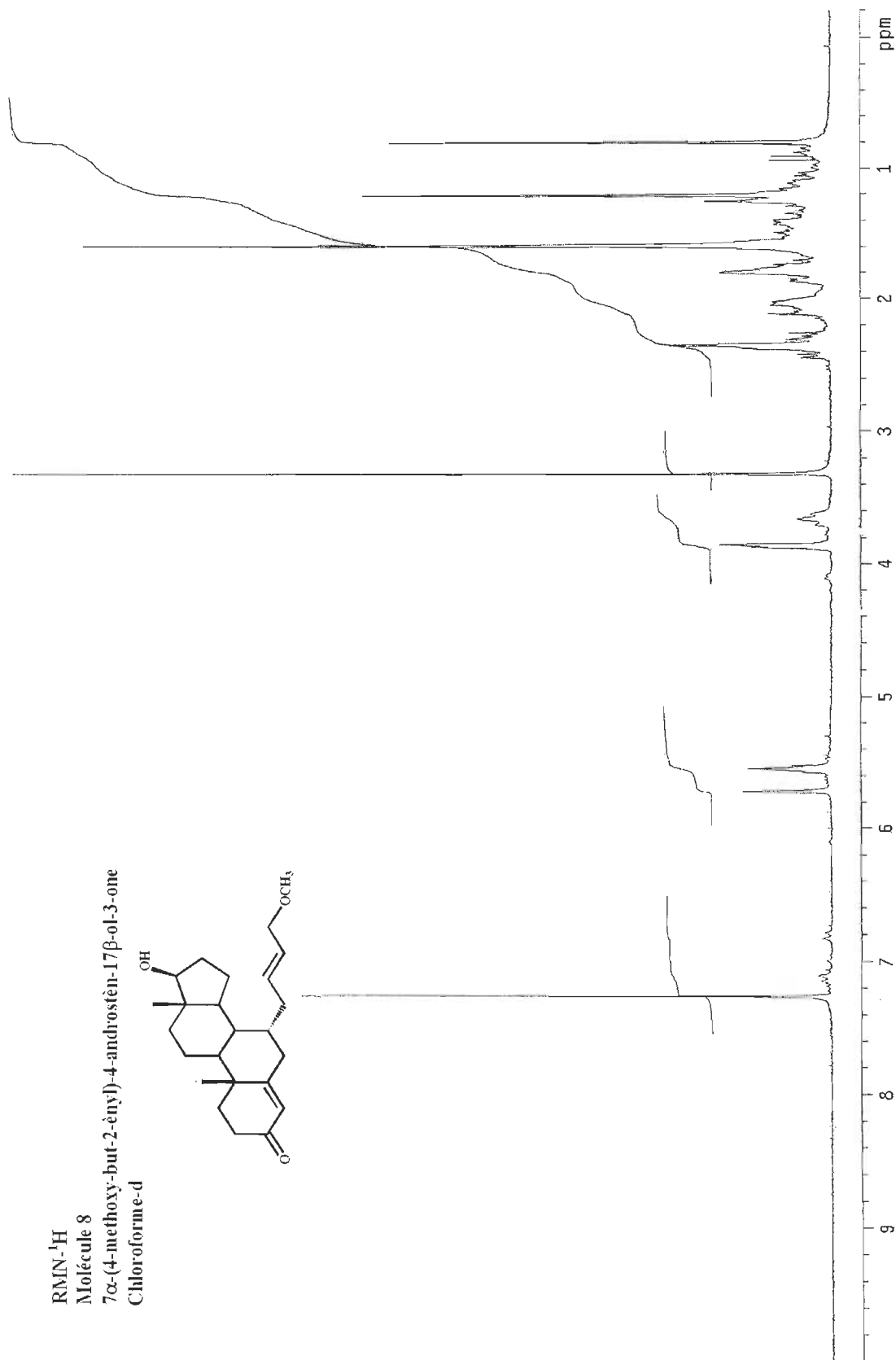
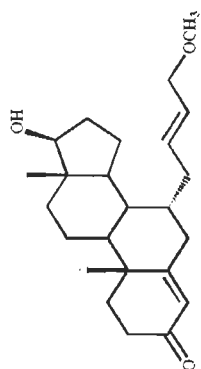
RMN- $^1\text{H}$   
Molécule 7  
7 $\alpha$ -(4-iodo-but-2-ényl)-4-androstén-17 $\beta$ -ol-3-one  
Chloroforme-d



RMN- $^{13}\text{C}$   
Molécule 7  
7 $\alpha$ -(4-iodo-but-2-ényl)-4-androstén-17 $\beta$ -ol-3-one  
Chloroforme- $d$

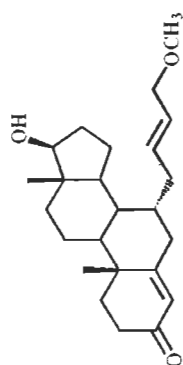


RMN-<sup>1</sup>H  
Molécule 8  
7α-(4-methoxy-but-2-ène)-4-androstène-17β-ol-3-one  
Chloroforme-d

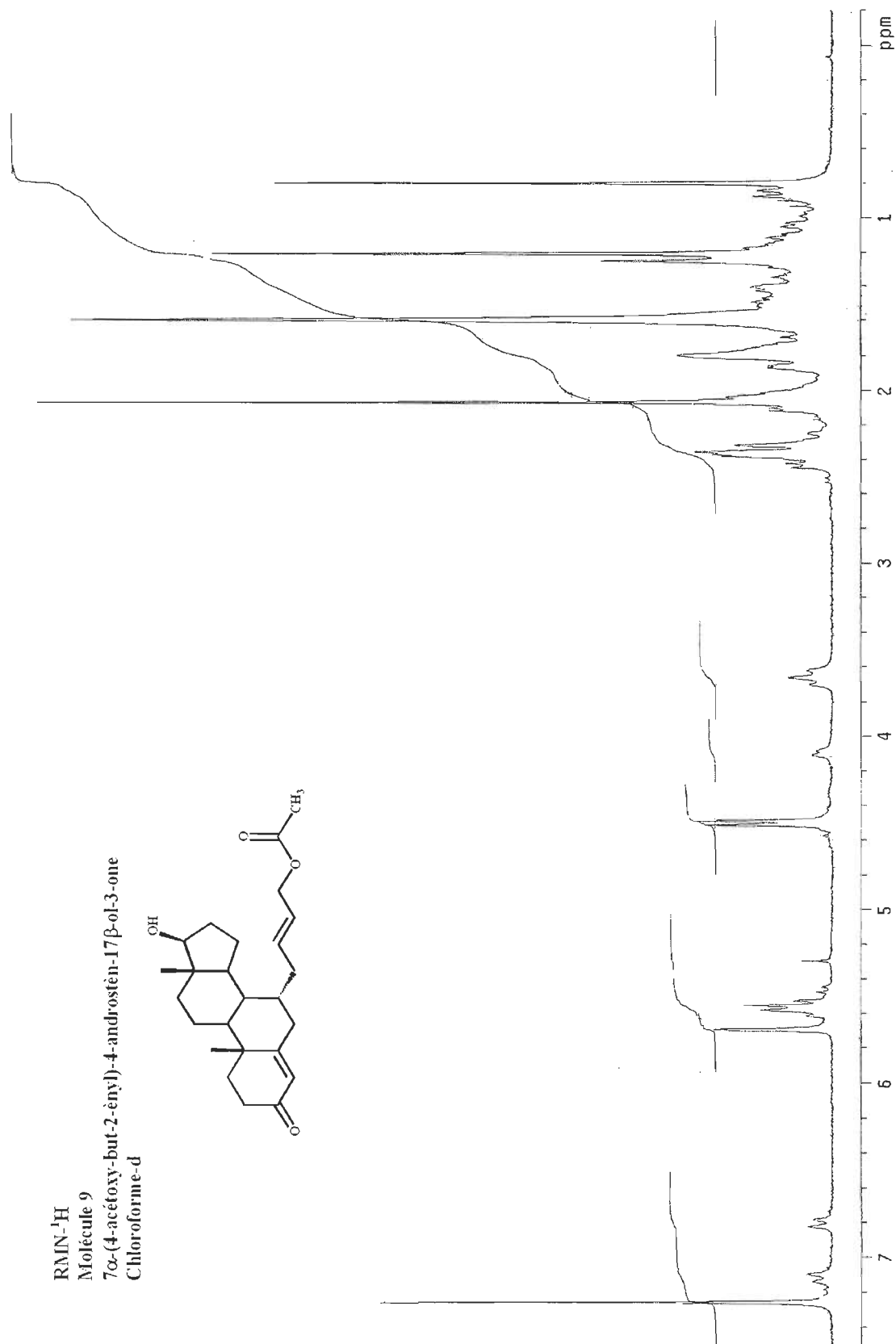
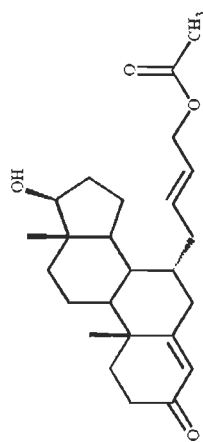




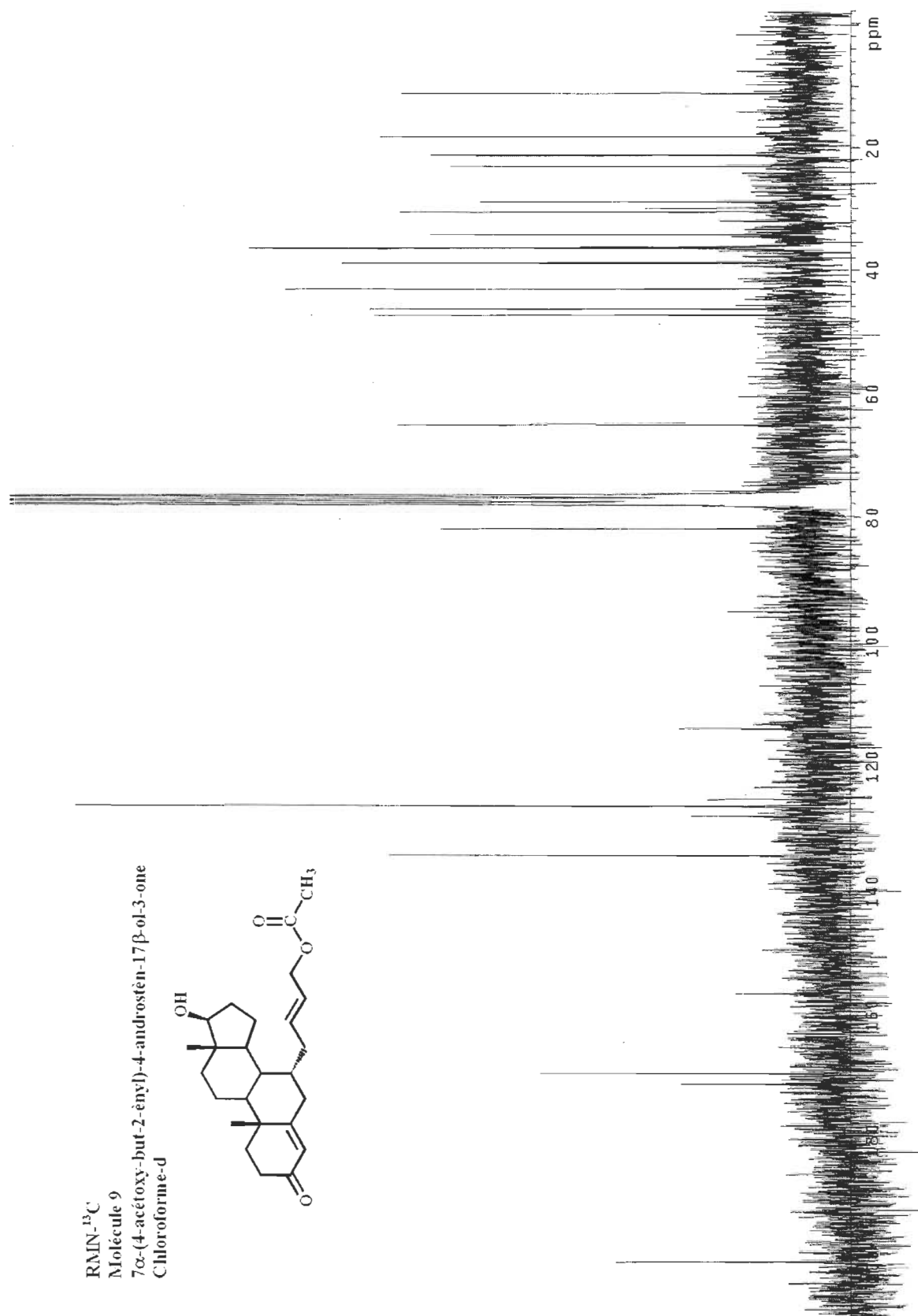
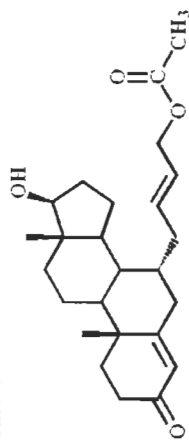
RMN-<sup>13</sup>C  
Molécule 8  
7 $\alpha$ -(4-methoxy-but-2-ényl)-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one  
Chloroforme-d



RMN- $^1\text{H}$   
Molécule 9  
7 $\alpha$ -(4-acétoxy-but-2-ényl)-4-androstén-17 $\beta$ -ol-3-one  
Chloroforme- $d$



RMN- $^{13}\text{C}$   
Molécule 9  
7 $\alpha$ -(4-acétoxy-but-2-ényl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one  
Chloroforme-d

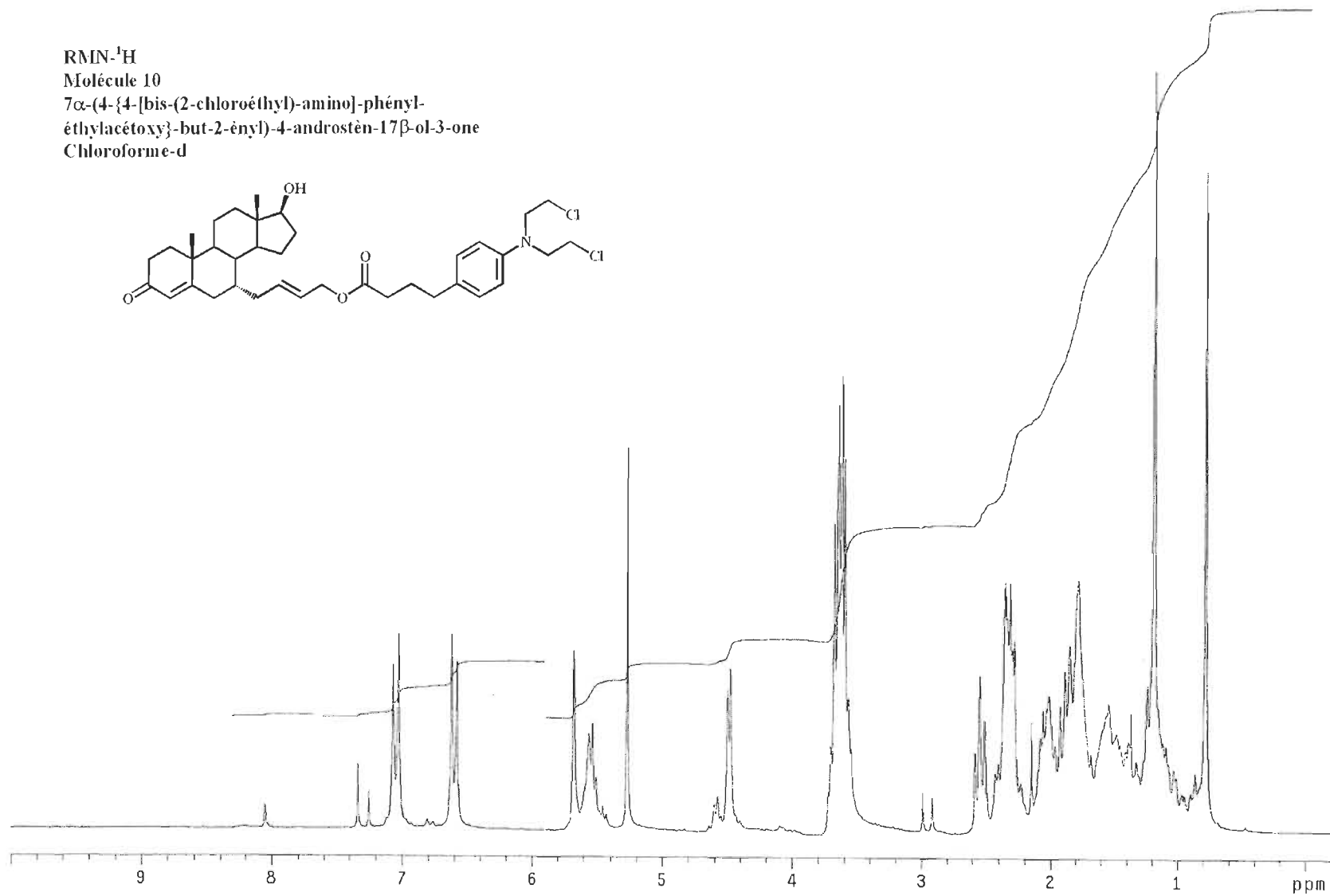
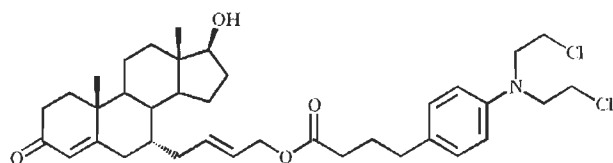


RMN-<sup>1</sup>H

Molécule 10

7 $\alpha$ -(4-{4-[bis-(2-chloroéthyl)-amino]-phényl-  
éthylacétoxy}-but-2-ényl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one

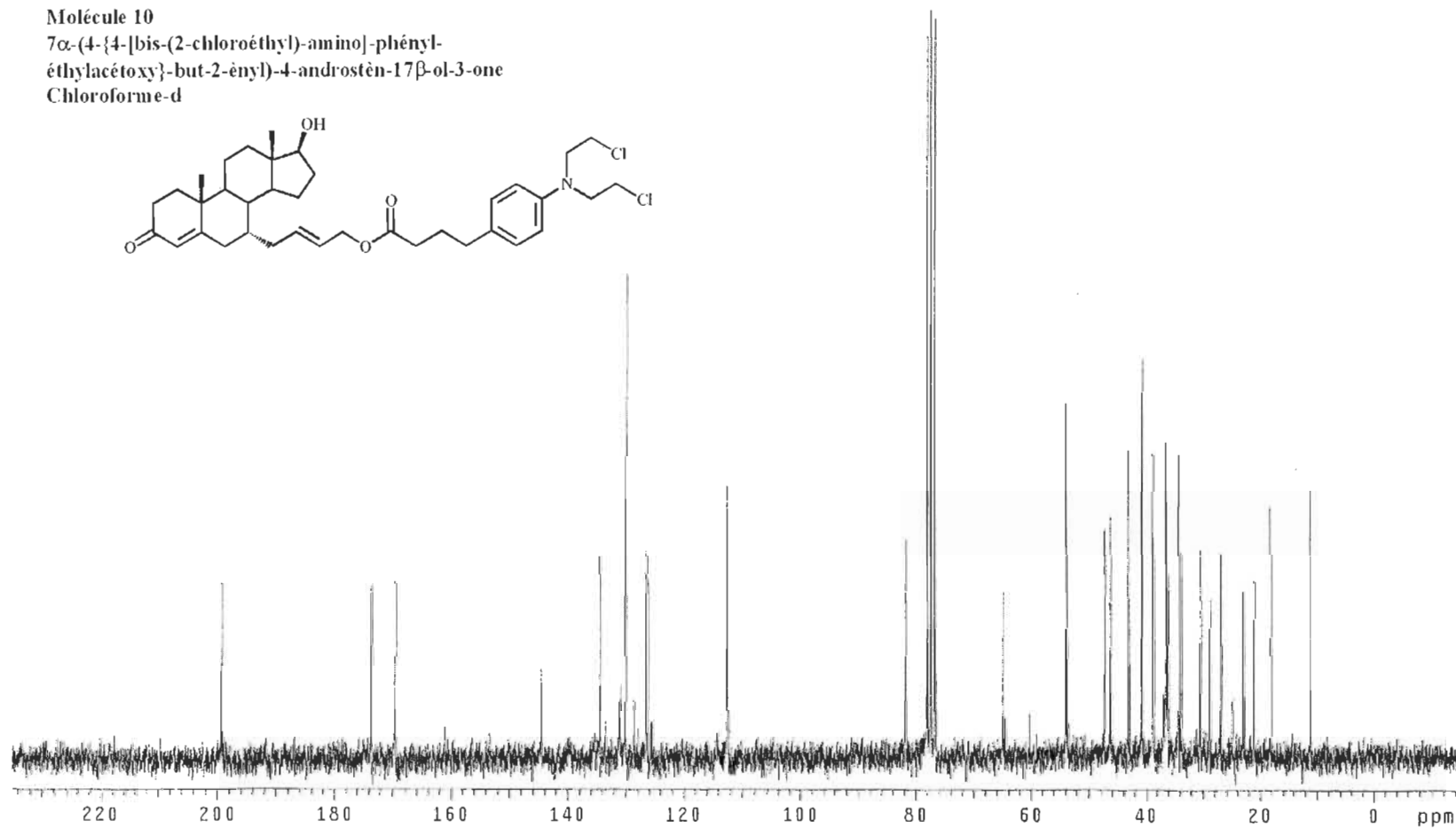
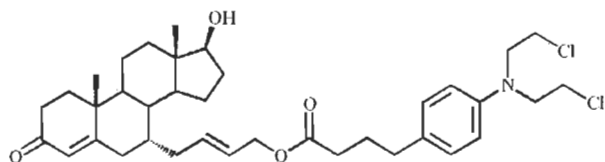
Chloroforme-d



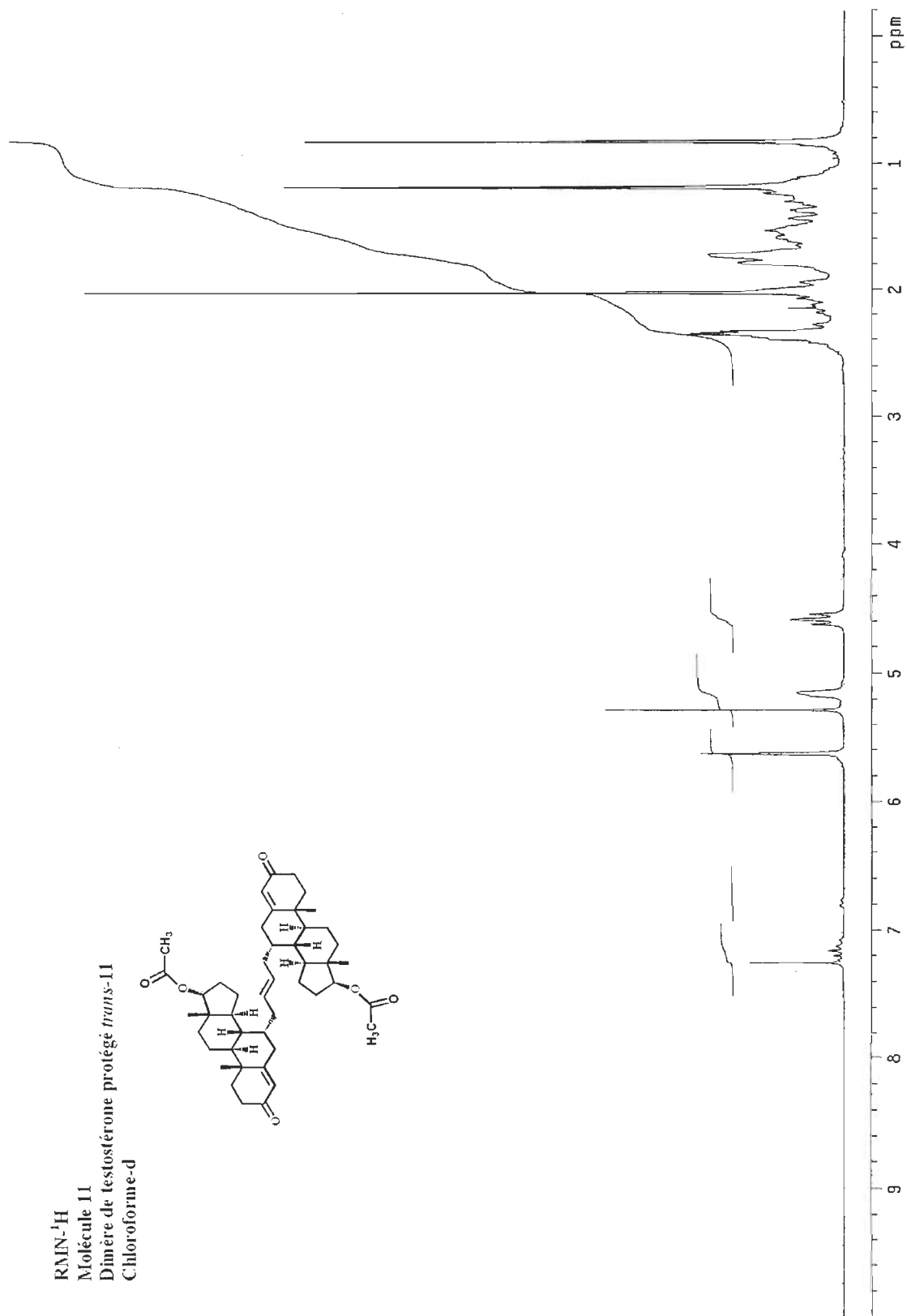
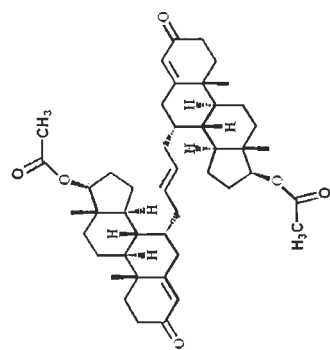
RMN-<sup>13</sup>C

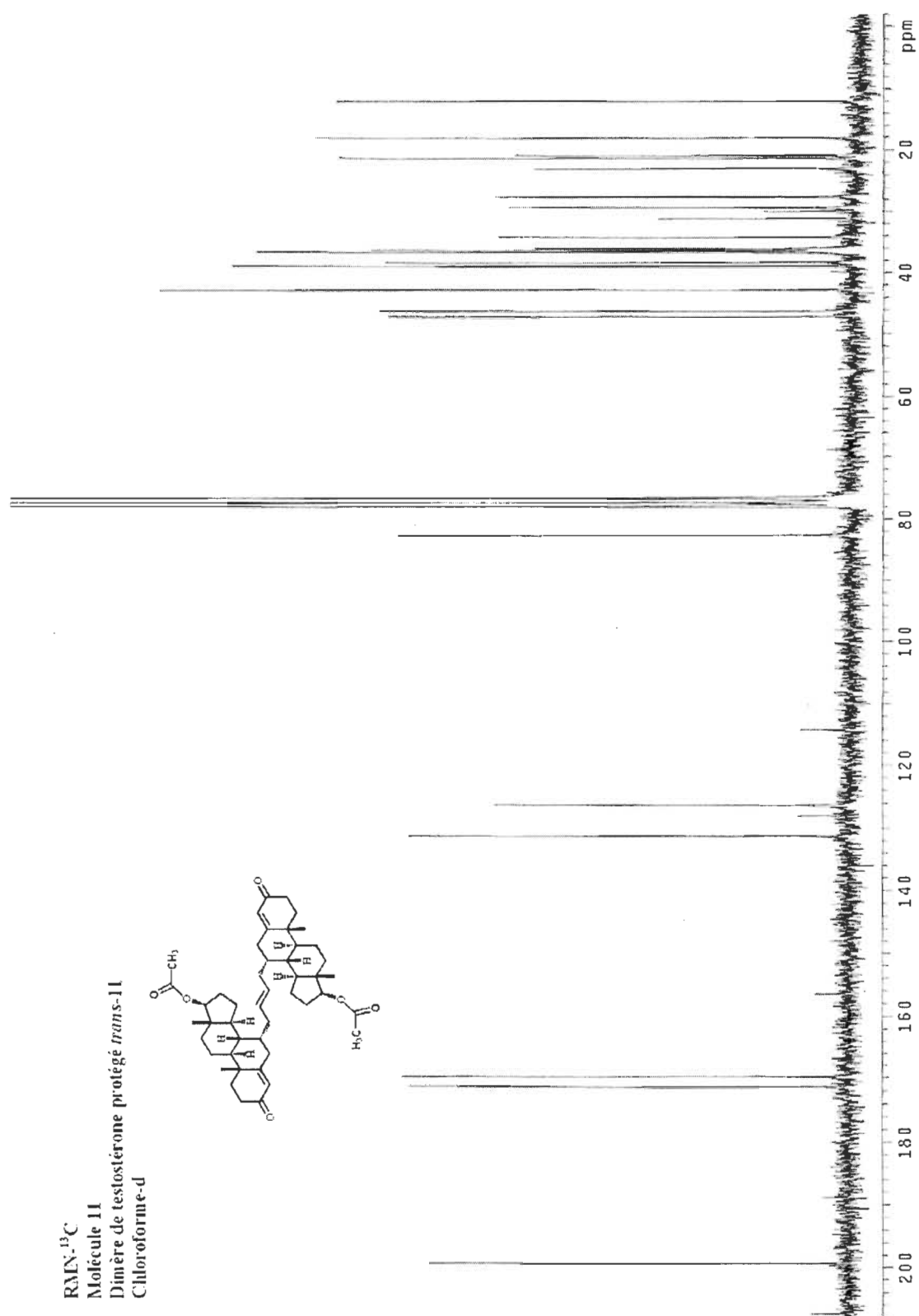
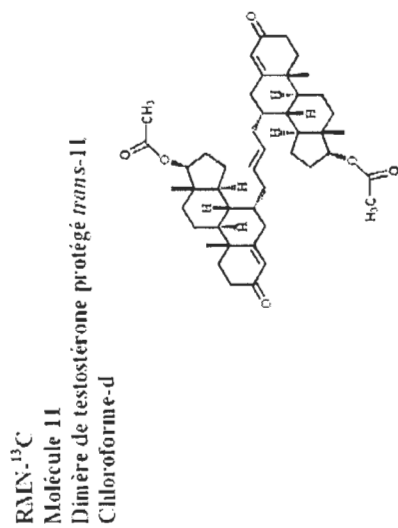
Molécule 10

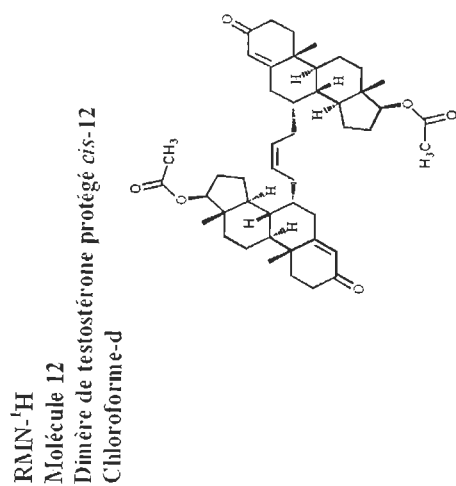
7 $\alpha$ -(4-{4-[bis-(2-chloroéthyl)-amino]-phényl-  
éthylacétoxy}-but-2-ényl)-4-androstèn-17 $\beta$ -ol-3-one  
Chloroforme-d



RMN-<sup>1</sup>H  
Molécule 11  
Dimère de testostérone protégé *trans*-11  
Chloroforme-d







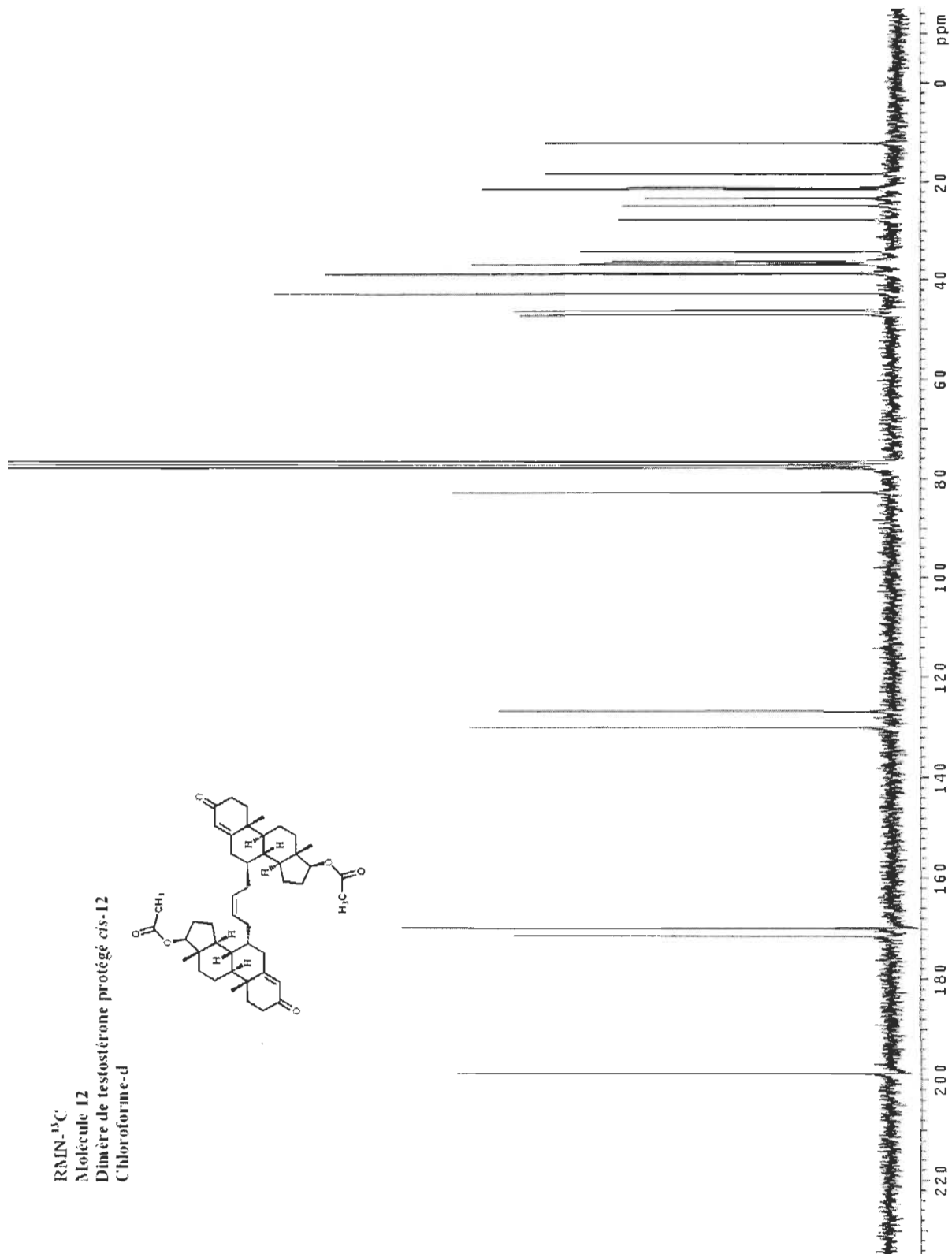
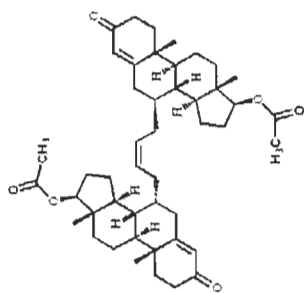


RMN-<sup>13</sup>C

Molécule 12

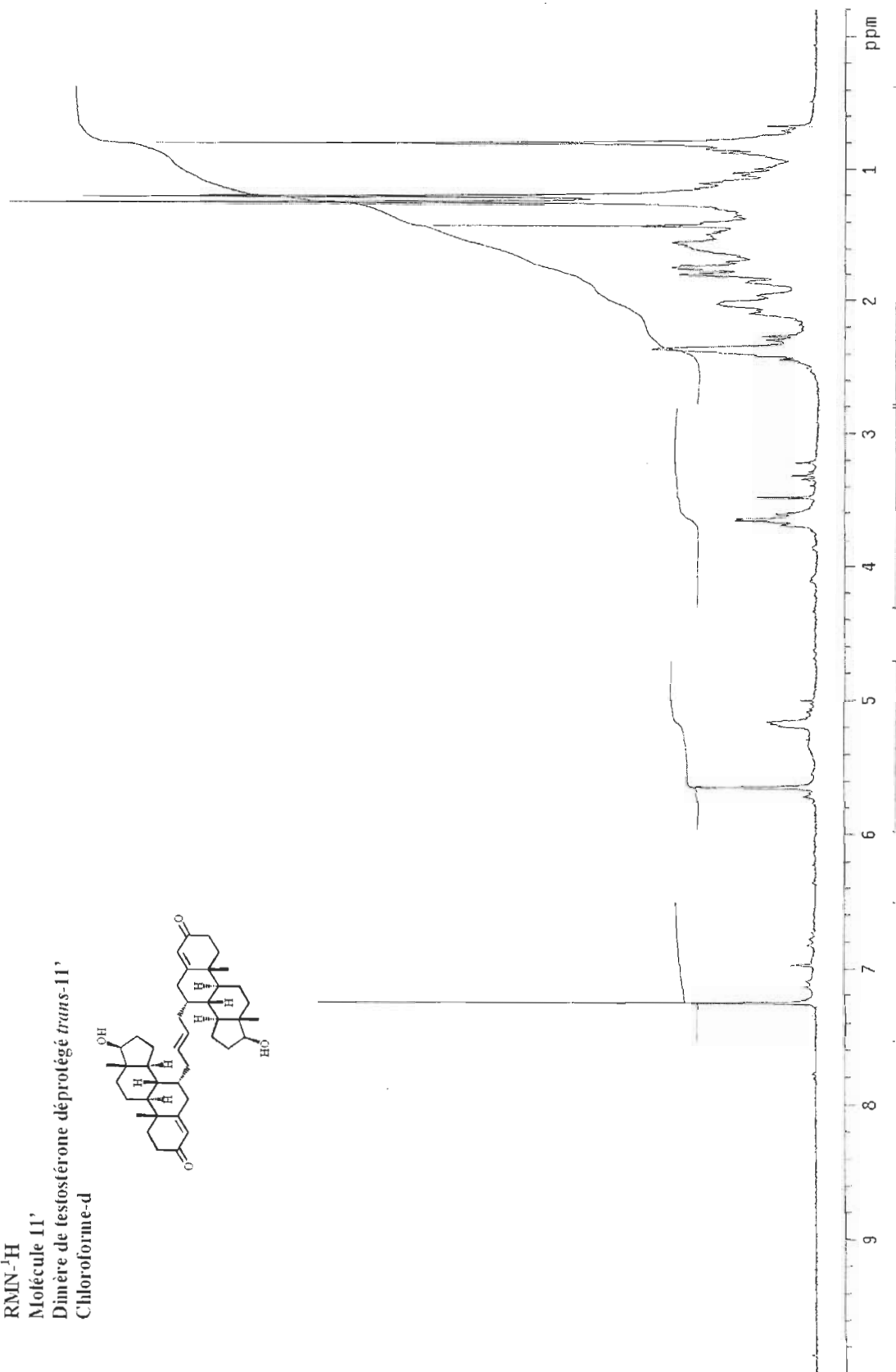
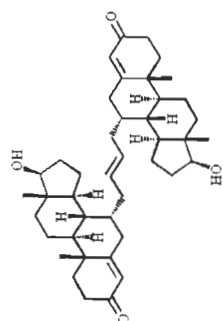
Dimère de testostérone protégé *cis*-12

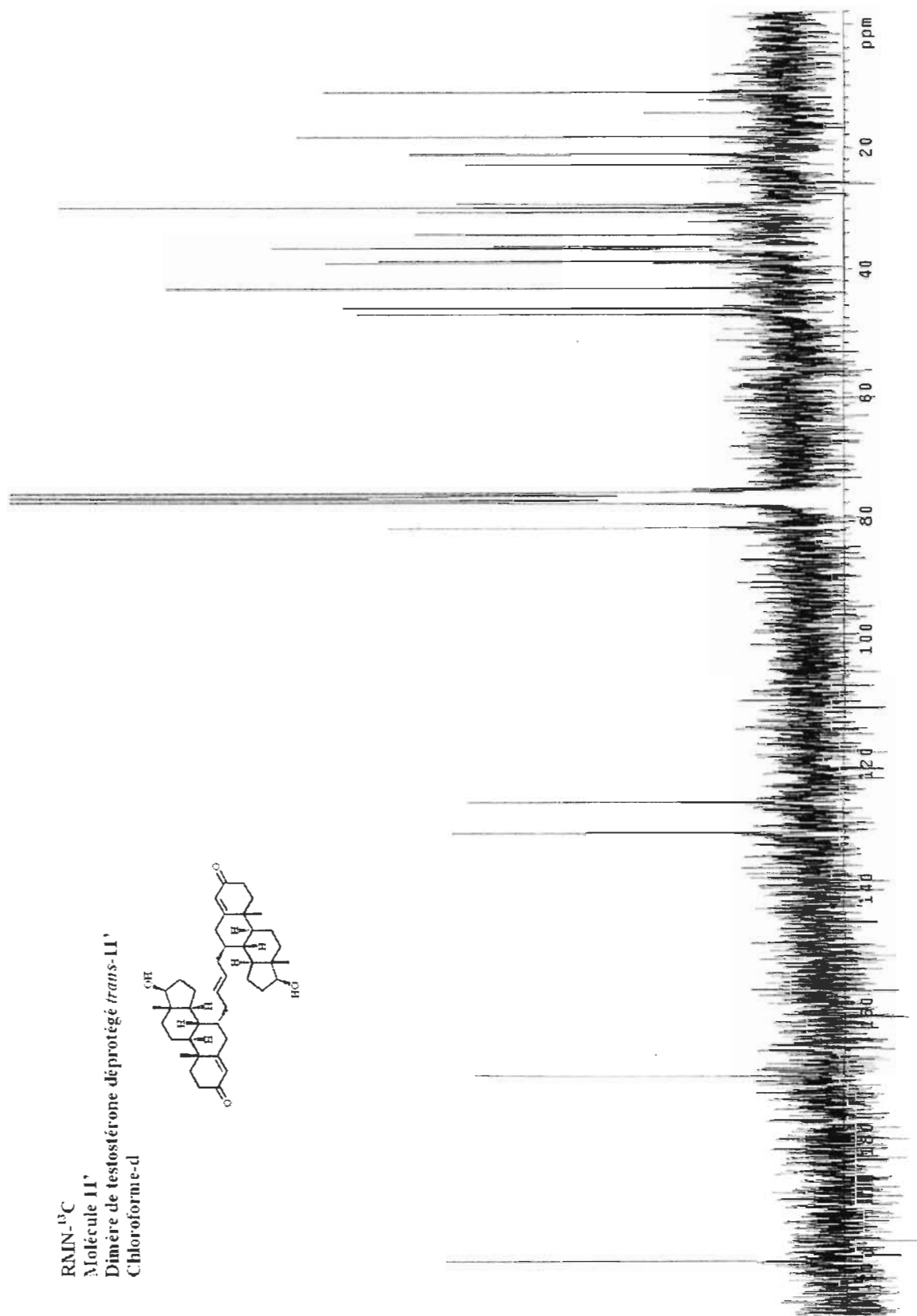
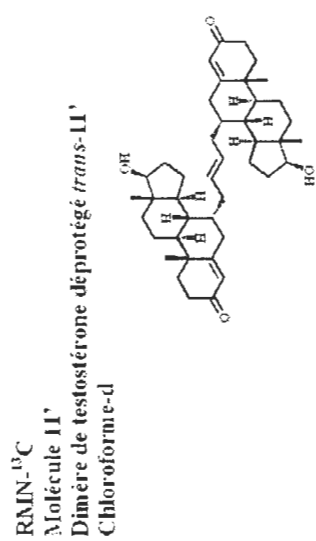
Chloroforme-d

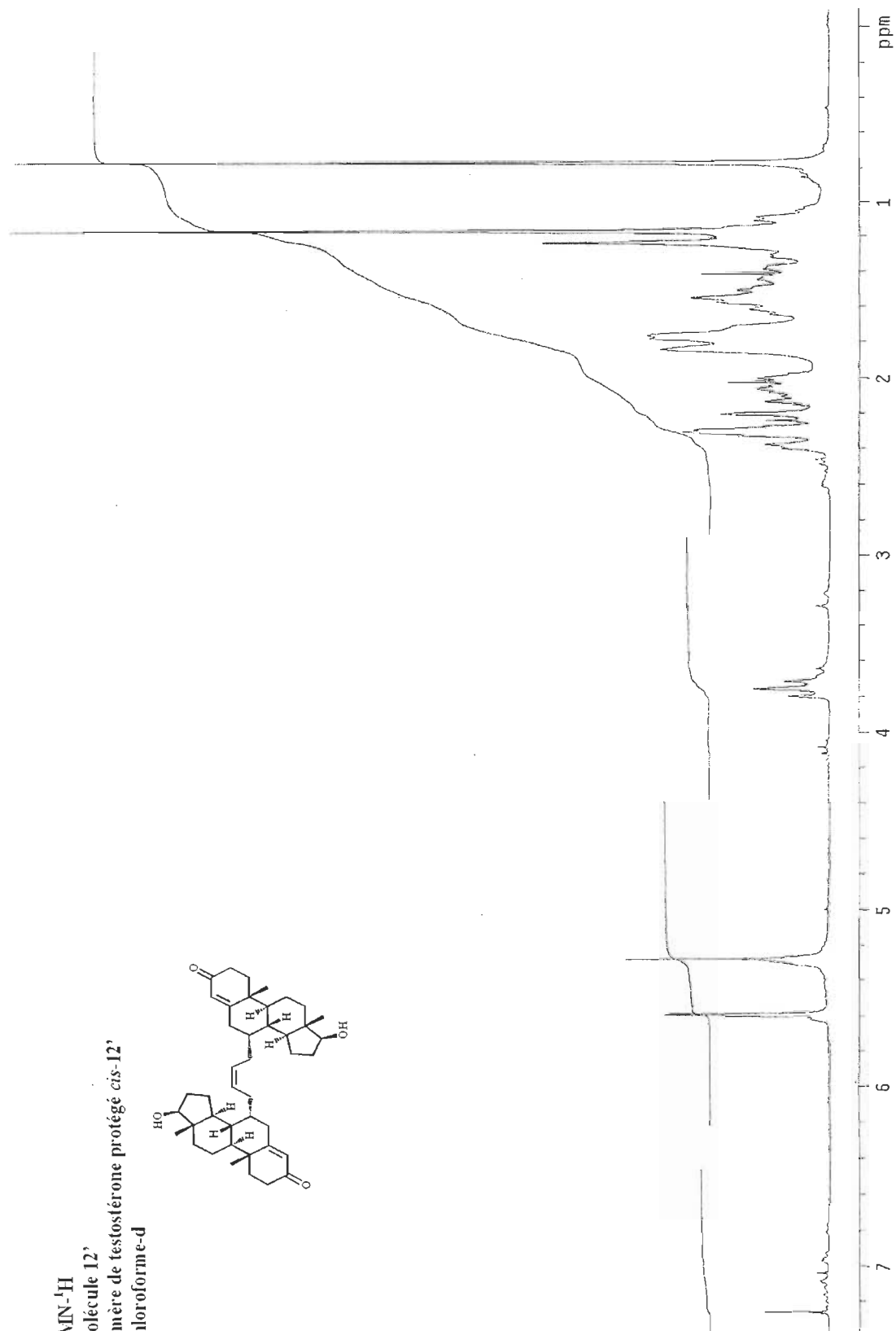
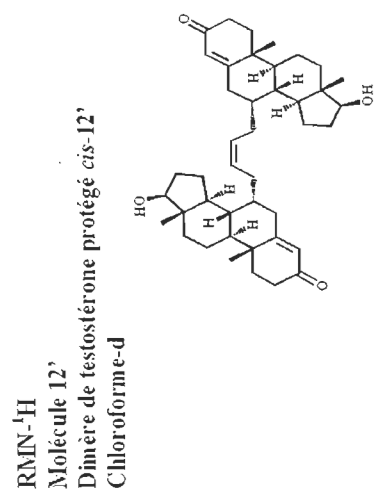


RMN- $^1\text{H}$ 

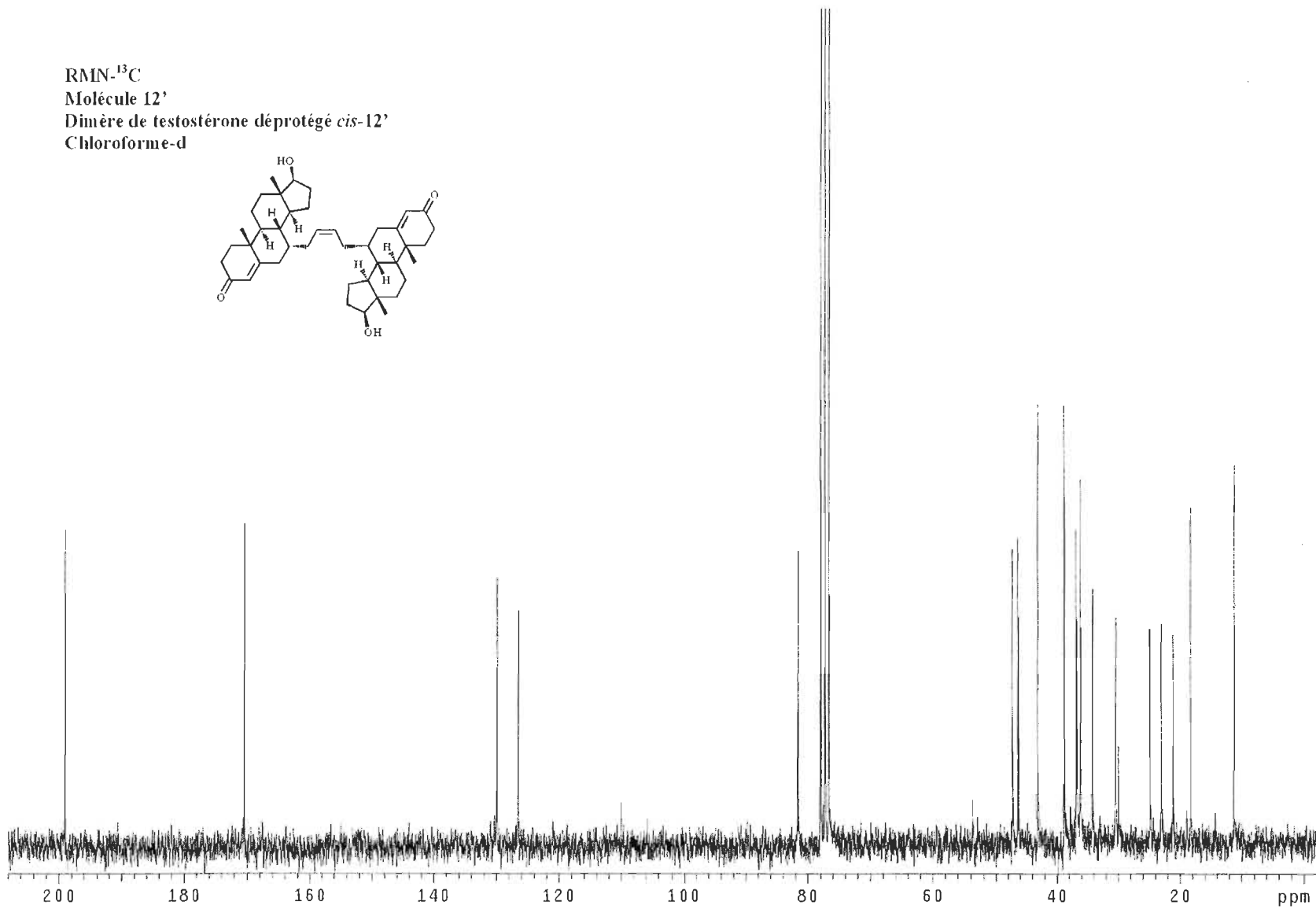
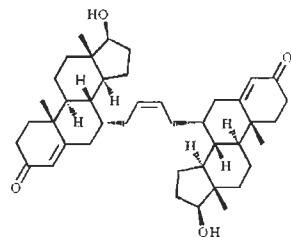
Molécule 11'

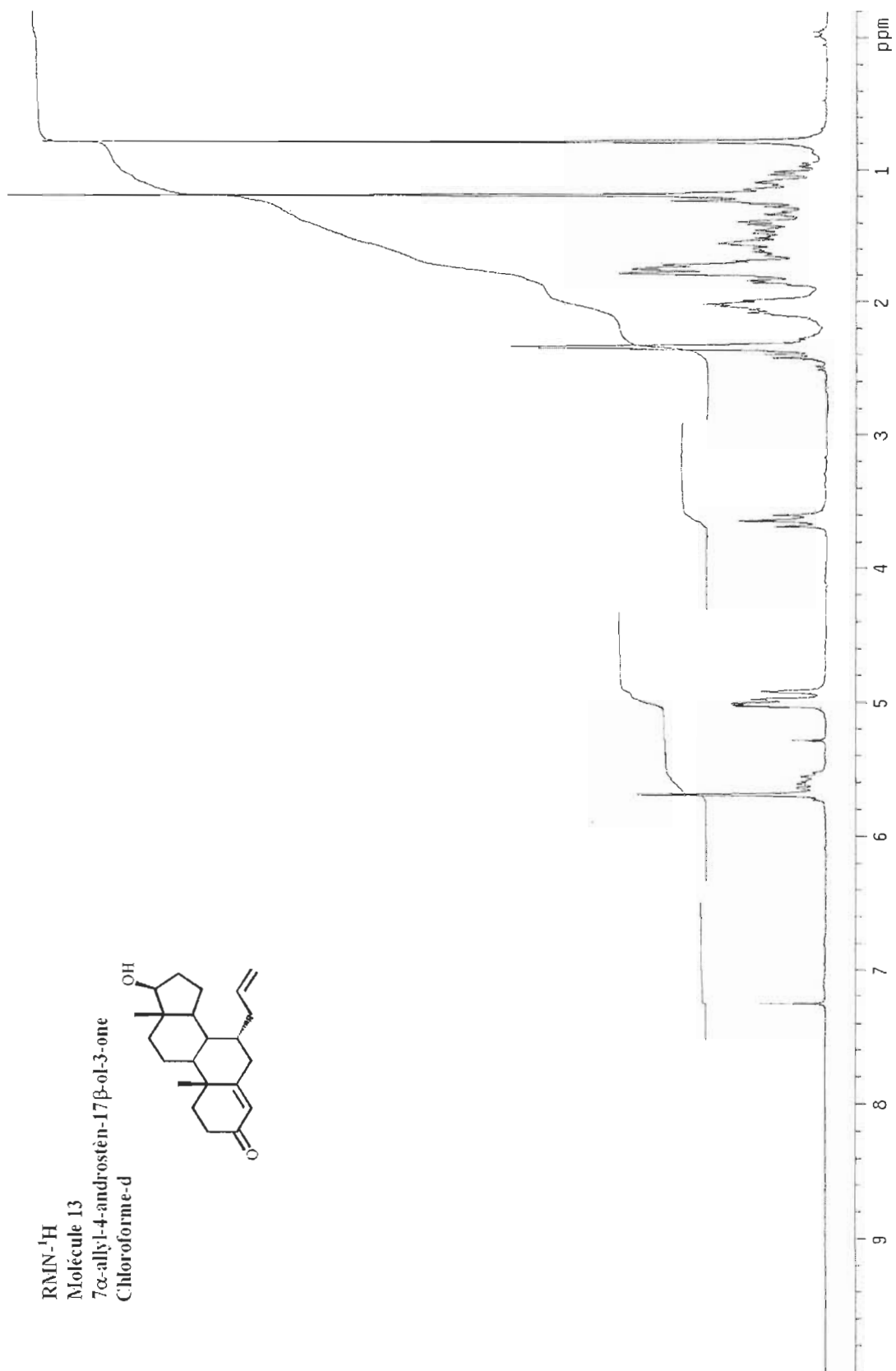
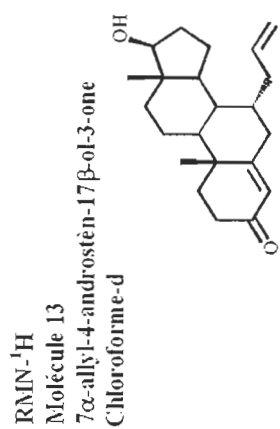
Dimère de testostérone déprotégé *trans*-11'Chloroforme- $d$ 

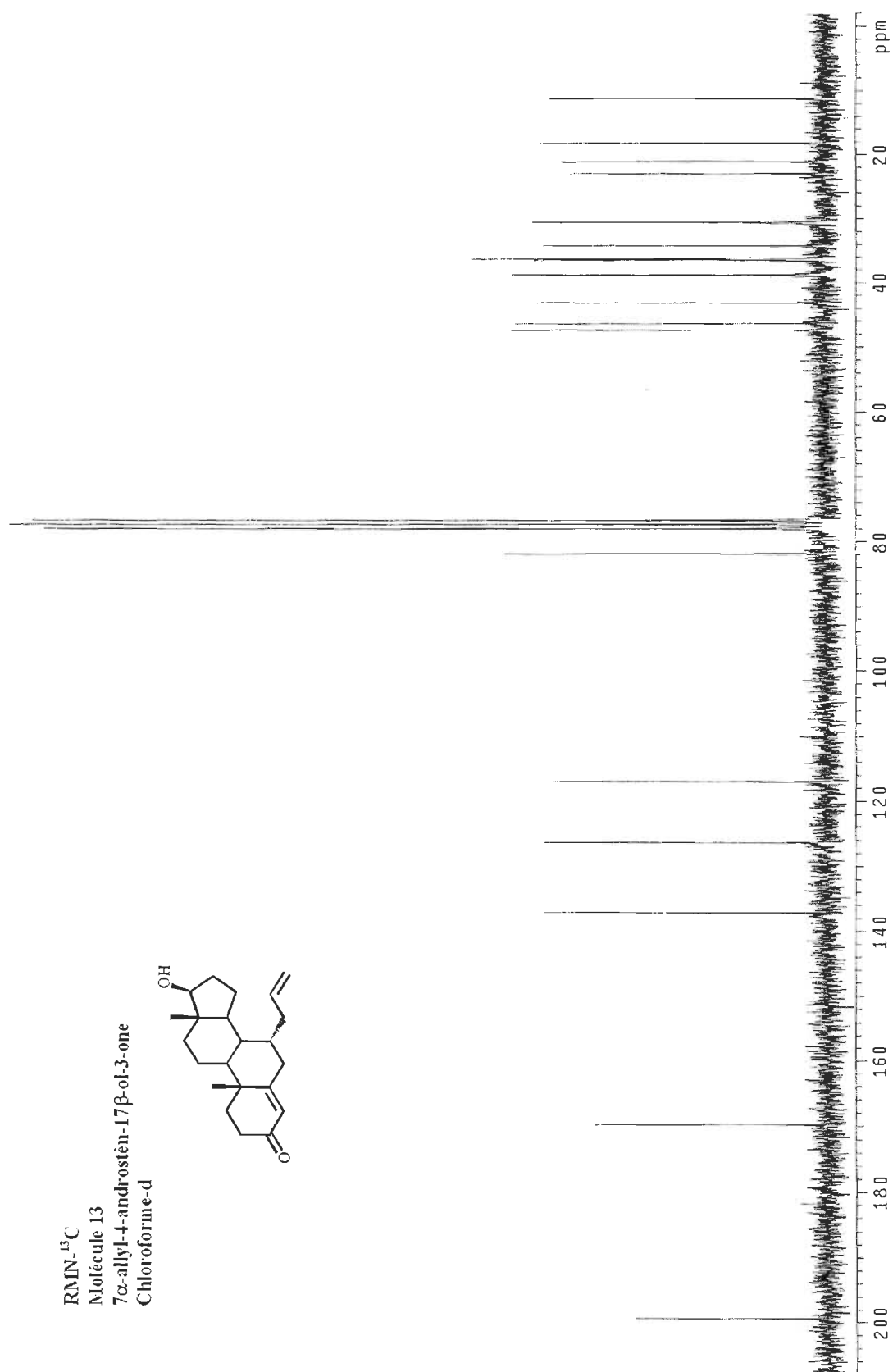
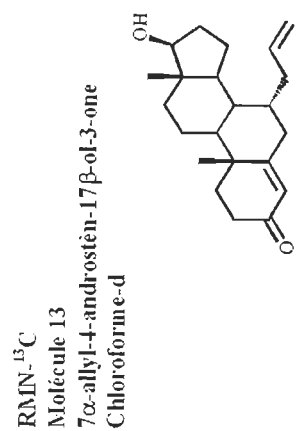




RMN- $^{13}\text{C}$   
Molécule 12'  
Dimère de testostérone déprotégé *cis*-12'  
Chloroforme- $d$







## 7. Références

- AgoulNIK, I. U., N. Weigel L. (2006) "Androgen receptor action in hormone-dependent and recurrent prostate cancer" *J Cell Biochem* 99(2): 362-72.
- Alimirah, F., Chen J. (2006) "DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation" *FEBS Lett* 580(9): 2294-300.
- Begleiter, A., Mowat M. (1996). "Chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia: mechanism of action" *Leuk Lymphoma* 23(3-4): 187-201.
- Berube, G. (2006) "Natural and synthetic biologically active dimeric molecules: anticancer agents, anti-HIV agents, steroid derivatives and opioid antagonists" *Curr Med Chem* 13(2): 131-54.
- Bucourt, R., Vignau M., Torelli, V., Richard-Foy, H., Geynet, C., Secco-Millet, C., Redeuilh, G., Baulieu, E.-E. (1978) "New biospecific adsorbents for the purification of estradiol receptor" *J Biol Chem* 253(22): 8221-8.
- Canada, Statistiques Canada (2008) Statistiques canadiennes sur le cancer (2008).
- Carson-Jurica, M. A., Schrader W. T. (1990) "Steroid receptor family: structure and functions" *Endocr Rev* 11(2): 201-20.
- Cepeda, V., Fuertes M. A. (2007) "Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity" *Anticancer Agents Med Chem* 7(1): 3-18.
- Coluccia, M., Natile G. (2007) "Trans-platinum complexes in cancer therapy" *Anticancer Agents Med Chem* 7(1): 111-23.
- Culig, Z., Bartsch G. (2004) "Antiandrogens in prostate cancer endocrine therapy" *Curr Cancer Drug Targets* 4(5): 455-61.
- Descôteaux, C. (2006) "Synthèse améliorée de molécules hybrides estradiol-Pt(II) pour le traitement des cancers féminins" Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières.
- Eccles, S. A., Welch D. R. (2007) "Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies" *Lancet* 369(9574): 1742-57.
- Edwards, J., Bartlett J. M. (2005) "The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 1: Modifications to the androgen receptor" *BJU Int* 95(9): 1320-6.



Fédération canadienne de recherche sur le cancer de la prostate (2008).

Feldman, B. J., Feldman D. (2001) "The development of androgen-independent prostate cancer" *Nature Cancer Reviews* 1(3): 34-45.

Foye, W. O., (1989), "Principles of medicinal chemistry", Third edition, Lea & Febiger, p.95

Gao, W., Kim J. (2006) "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nonsteroidal androgen receptor ligands" *Pharm Res* 23(8): 1641-58.

Grubbs, R. H., Chang S. (1998) "Recent advances on olefin metathesis and its application in organic synthesis" *Tetrahedron* 54: 4413-4450.

Heinlein, C. A., Chang C. (2004) "Androgen receptor in prostate cancer" *Endocr Rev* 25(2): 276-308.

Hernandez, M. A., Rathinavelu A. (2006) *Basic Pharmacology Understanding Drug Actions and Reactions*, Taylor & Francis.

Hsieh, R. W., Rajan S. S. (2006) "Identification of ligands with bicyclic scaffolds provides insights into mechanisms of estrogen receptor subtype selectivity" *J Biol Chem* 281(26): 17909-19.

Hsing, A. W. (2001) "Hormones and prostate cancer: what's next?" *Epidemiol Rev* 23(1): 42-58.

Isurugi, K., Fukutani K., (1980) "Endocrine effects of cyproterone acetate in patients with prostatic cancer" *J Urol* 123(2): 180-3.

Jin, Y., Penning T. M. (2001) "Steroid 5 $\alpha$ -reductases and 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism" *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15(1): 79-94.

Jung, Y., Lippard S. J. (2007) "Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage" *Chem Rev* 107(5): 1387-407.

Kelland, L. (2007) "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy" *Nat Rev Cancer* 7(8): 573-84.

Koivisto, P. A., Helin H. J. (1999) "Androgen receptor gene amplification increases tissue PSA protein expression in hormone-refractory prostate carcinoma" *J Pathol* 189(2): 219-23.

Labrie, F., Belanger A. (1993) "Science behind total androgen blockade: from gene to combination therapy" *Clin Invest Med* 16(6): 475-92.

Loeb, S., Catalona W. J. (2007) "Prostate-specific antigen in clinical practice" *Cancer Lett* 249(1): 30-9.

McConnell, J. D. (1991) "Physiologic basis of endocrine therapy for prostatic cancer" *Urol Clin North Am* 18(1): 1-13.

Montserrat, E., Rozman C. (1993) "Chronic lymphocytic leukaemia treatment" *Blood Rev* 7(3): 164-75.

Neidle, S., Thurston D. E. (2005) "Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies" *Nat Rev Cancer* 5(4): 285-96.

Nickisch, K., Laurent, H. (1988) "Stereoselektive synthese von 7-allyl-und-7-propylsteroiden" *Tetrahedron Letters* 29(13): 1533-1536.

Ott, I., Gust R. (2006) "Medizinische Chemie der Platinkomplexe" *Pharmazie in unserer zeit* 35(2): 124-133.

Pereira de Jesus-Tran, K., Cote P. L. (2006) "Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity" *Protein Sci* 15(5): 987-99.

Perrin, D. D., Armarego W. L. F. (1988) *Purification of Laboratory Chemicals*. Oxford.

Perron, V., Rabouin D., (2005). "Synthesis of 17beta-estradiol-linked platinum(II) complexes and their cytotoxic activity on estrogen-dependent and -independent breast tumor cells" *Bioorg Chem* 33(1): 1-15.

Portoghese, P. S. (1992) "Edward E. Smissman-Bristol-Myers Squibb Award Address. The role of concepts in structure-activity relationship studies of opioid ligands" *J Med Chem* 35(11): 1927-37.

Rabik, C. A., Dolan M. E. (2007) "Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents" *Cancer Treat Rev* 33(1): 9-23.

Shaffer, P. L., Jivan A., (2004) "Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements" *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14): 4758-63.

Sharma, V., Piwnicka-Worms D. (1999) "Metal complexes for therapy and diagnosis of drug resistance" *Chem Rev* 99(9): 2545-60.

Stewart, D. J. (2007) "Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin" *Crit Rev Oncol Hematol* 63(1): 12-31.

Still, W. C., Kahn M. (1978) "Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution" *Journal of Organic Chemistry* 43(14): 2923.

Stojic, L., Brun R. (2004) "Mismatch repair and DNA damage signalling" *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 1091-101.

Trnka, T. M., Grubbs R. H. (2001) "The development of  $L_2X_2Ru=CHR$  olefin metathesis catalysts: an organometallic success story" *Acc Chem Res* 34(1): 18-29.

Veldscholte, J., Berrevoets C. A., (1992) "Anti-androgens and the mutated androgen receptor of LNCaP cells: differential effects on binding affinity, heat-shock protein interaction, and transcription activation" *Biochemistry* 31(8): 2393-9.

Vollhardt, K. P. C., Schore N. E. (2004) "Traité de chimie organique", 4<sup>e</sup> édition, deBoeck University, p. 223-225.

Wang, D., Lippard S. J. (2005) "Cellular processing of platinum anticancer drugs" *Nat Rev Drug Discov* 4(4): 307-20.

Yee, N. K., Farina V. (2006) "Efficient Large-Scale Synthesis of BILN 2061, a Potent HCV Protease Inhibitor, by a Convergent Approach Based on Ring-Closing Metathesis" *Journal of Organic Chemistry* 71: 7133-7145.