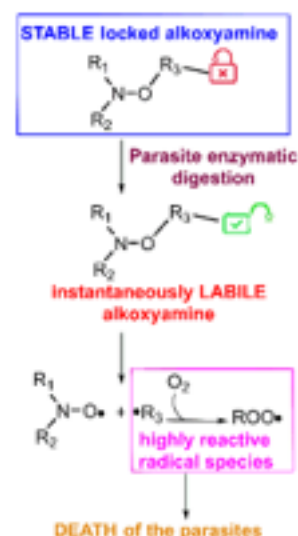


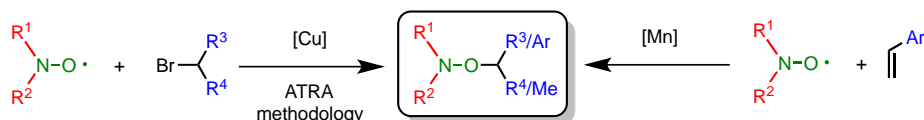
Titre de la thèse : Composés activés par des enzymes, possédant une structure alkoxyamine, pour le traitement des maladies parasitaires

Projet de thèse : L'originalité de ce projet réside dans le développement d'une plateforme de prodrogues stables dont l'action repose sur une activation enzymatique. Ce projet est en complète rupture avec la *doxa* actuelle utilisée en sciences du médicament. En effet, la majorité des approches reposent sur la synthèse de molécules inhibant l'activité enzymatique ; ce qui conduit à des phénomènes de résistance ou des effets négatifs inattendus. Malheureusement, cette méthodologie est impuissante face au processus de contournement engendrant cette résistance. Notre approche repose sur l'activité spécifique d'enzymes générées lors de pathologies sur une prodrogue attachée à un vecteur. Après activation enzymatique, une alkoxyamine labile sera libérée et s'homolysera spontanément en deux espèces radicalaires dont l'une est toxique. Ces radicaux réagiront aléatoirement sur tout système à proximité évitant tout phénomène de résistance. Il est à noter que cette approche peut être appliquée à la plupart des pathologies à condition qu'une activité enzymatique spécifique y soit associée et qu'un effet cytotoxique est requis. Ce projet fera une percée importante dans le concept de traitements antiparasitaires à travers le développement d'une plateforme permettant une production contrôlée de radicaux dont le ciblage sera facilement modifié en changeant le vecteur à notre convenance. Le concept de ce projet a été validé par des résultats biologiques très encourageants obtenus sur différentes pathologies. Notre projet consiste à la préparation d'alkoxyamines stables sélectivement bio-activables par les enzymes spécifiques présentes dans le microenvironnement ciblé pour une application thérapeutique.



Synthèse des alkoxyamines :

Les alkoxyamines seront préparées par des méthodes courantes; la méthode la plus utilisée est

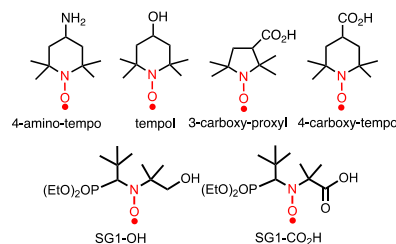


l'addition radicale par transfert d'atome (ATRA).¹ Cette procédure implique le couplage croisé d'un radical alkyle avec un radical nitroxyde. Le radical alkyle est généré *in situ* par l'action d'un catalyseur de cuivre complexé par une amine et un halogénure d'alkyle, généralement un bromure d'alkyle. Il est ensuite piégé par un nitroxyde pour donner une alkoxyamine. Une autre méthode efficace peut être utilisée qui consiste à utiliser des complexes métalliques à base de manganèse en présence d'un dérivé vinylique.² Dans cette approche, le complexe de manganèse est d'abord oxydé en une espèce manganèse-oxo qui réagit avec les alcènes pour donner un radical intermédiaire. Ce radical est ensuite piégé par le nitroxyde pour obtenir l'alkoxyamine après réduction par NaBH₄.

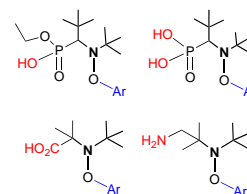
Pour optimiser le potentiel du radical alkyle libéré après activation enzymatique, l'alcoxyamine basée sur le fragment nitroxyde SG1 sera d'abord préparée. Cela nous aidera à développer la partie alkyle très labile et permettre d'élaborer la procédure de préparation. En effet, nous profiterons de la présence de l'atome de phosphore pour contrôler la préparation et la réactivité des alcoxyamines. Ensuite, nous préparerons des alcoxyamines basées sur le nitroxyde tempo et DBNO car ces nitroxydes sont disponibles dans le commerce. Ensuite, nous nous concentrerons sur des nitroxydes possédant des fonctions hydrosolubles et également encombrées accélérant ainsi l'homolyse des alcoxyamines et donc la formation des radicaux toxiques.

Alcoxyamines hautement solubles dans le milieu physiologique.

Pour augmenter la solubilité des alcoxyamines, nous envisageons d'insérer plus de charges ou de groupes polaires dans le fragment nitroxyde ($\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$, COO^- , OH ...). De nombreux nitroxydes fonctionnalisés avec des fonctions acides carboxyliques, alcools ou amines sont disponibles dans le commerce et seront utilisés dans ce projet (4-amino-tempo, tempol, 3-carboxy proxyl, 3-carbamoyl proxyl, carboxy-tempo ...). La synthèse de SG1-OH et SG1-CO₂H est déjà décrite par notre équipe.³



Pour augmenter la solubilité des nitroxydes, nous envisageons également d'hydrolyser totalement ou partiellement les groupes éthoxy⁴ de la partie phosphonate du nitroxyde SG1 et/ou d'insérer plus de charges dans la partie alkyle du DBNO. D'autres nitroxydes hydrosolubles seront également préparés.



Grâce aux résultats préliminaires déjà obtenus mettant en oeuvre les alcoxyamines basées sur l'anilide⁵ pour la partie alkyle et le TEMPO pour la partie nitroxyde, nous allons étudier la synthèse de différentes alcoxyamines portant différents systèmes aromatiques cycliques à 6 chaînons diversement substitués. Ensuite, nous nous concentrerons sur la synthèse d'alcoxyamines à base de cycles aromatiques à 5 chaînons. Enfin, la synthèse d'alcoxyamines portant plusieurs substituants sur le cycle aromatique notamment des groupement nitro sera effectuée. De nombreuses autre famille seront également préparée possédant des stéréocentre (**acétal mixte, des éthers d'énol,...**).

Evaluations biologiques:

Les résultats biologiques seront réalisés sur l'expertise de plusieurs groupes. Ainsi, l'étude enzymologique sera réalisée par le Dr Mellet (biochimiste, biologiste, INSERM) à l'université de Bordeaux. L'étude de nos molécules antipaludiques, les mécanismes de résistance des parasites et les modes d'action in vivo sera effectuée par le Dr Pradine et Pr. Azas (Université d'Aix-Marseille) ainsi que le Pr. Florent (Muséum national d'Histoire naturelle).

Toxicité : Les pro-médicaments doivent également être inoffensives pour les cellules humaines. Les alkoxyamines qui se sont avérées efficaces contre diverses agents pathogènes seront donc testées pour leur toxicité sur les cellules eucaryotes.

Compétences acquises : Les compétences qu'acquerra le doctorant durant cette thèse seront multiples avec une expérience à acquérir en synthèse multi-étapes, en chimie des radicaux libres, en analyse RMN et RPE, en enzymologie, et des bases pour l'aspect biologique.

Présentation laboratoire d'accueil (Université d'Aix-Marseille). L'activité de recherche de l'équipe CRAB se situe essentiellement dans le domaine de la chimie radicalaire fondamentale et de ses applications dans de nouveaux champs d'investigation en biologie. Cette activité se décline en plusieurs thèmes originaux qui impliquent l'élaboration d'espèces radicalaires stables, appartenant à la famille des nitroxydes, ou formées in situ, obtenues à partir d'alkoxyamines. Dans ces thèmes, l'équipe a une excellente visibilité nationale et internationale se situant parmi les experts mondiaux dans l'élaboration des radicaux impliqués dans la mise au point d'agents polarisants pour la PDN in vivo pour la détection précoce de diverses maladies, dans le développement de marqueurs de spin pour l'étude de la dynamique des protéines, dans la synthèse de d'alkoxyamines utilisées pour la thérapie, la théranostique, la polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes (NMP) et la polymérisation radicalaire conventionnelle. L'équipe CRAB s'appuie sur une excellente expertise en synthèse organique (synthèse multiétapes et synthèse totale) et en physico-chimie et en spectroscopie de type résonance paramagnétique électronique (RPE).

Information candidat : Le(a) candidat(e) aura en charge le développement de la partie organique du projet. L'évaluation biologique sera réalisée dans différentes institutions de recherche. Le(a) candidat(e) devra obtenir son Master Recherche en chimie organique avec une mention assez bien (ou équivalent). Le(a) candidat(e) devra posséder une solide expérience en synthèse organique pour réaliser des réactions sous atmosphère inerte, pour purifier les composés organiques et pour effectuer les analyses usuelles en chimie organique (¹H, ¹³C, DEPT, HMBC ...).

Le(a) candidat(e) enverra par e-mail 1- une lettre de motivation, 2- les notes obtenues dans le master 2 et 3- un CV détaillé au Pr. Gérard Audran (g.audran@univ-amu.fr) et au Dr. Sophie Thetiot-Laurent (sophie.thetiot-laurent@univ-amu.fr).

Salaire (ca. 2300 €/mois) : financement ANR

¹ Audran, G. *et al.* Chemically Triggered C—ON Bond Homolysis in Alkoxyamines. Part 8. Quaternization and Steric Effects *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 9914.

² Audran, G. *et al.* Chemical modifications of imidazole-containing alkoxyamines increase C—ON bond homolysis rate: effects on their cytotoxic properties in glioblastoma cells *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, 27, 1942.

³ Audran, G. *et al.* C-ON Bond Homolysis of Alkoxyamines, Part 11: Activation of the Nitroxyl Fragment. *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 1981.

⁴ Sanzhaeva, U. *et al.* Imaging of Enzyme Activity by Electron Paramagnetic Resonance: Concept and Experiment Using a Paramagnetic Substrate of Alkaline Phosphatase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 11701.

⁵ Audran, G. *et al.* Hybrid Peptide-Alkoxyamine Drugs: A Strategy for the Development of a New Family of Antiplasmodial Drugs *Molecules* **2024**, 29, 1397.