



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences Exactes
Département de Chimie

N° d'ordre: 125/Ds/2018

Série :25/Ch/2018

THESE

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} Cycle (LMD)

OPTION

Chimie organique

Thème

**Synthèse de composés hétérocycliques à visée
anticancéreuse**

Par :

M^{lle} NORA CHOUHA

Le 11/11/2018 devant le Jury

Président	Salah RHOUATI	Professeur, Université des Frères Mentouri Constantine
Directrice	Taoues BOUMOUD	Professeure, Université des Frères Mentouri Constantine
Co-directeur	Laurent DESAUBRY	Directeur de recherche, Université de Strasbourg
Examineurs	Hassina Harkat	Professeure, Université de Batna
	Boudjemaa BOUMOUD	Professeur, Université des Frères Mentouri Constantine

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

A mes parents pour ces longues années de soutien inconditionnel, pour leur confiance permanente et l'acceptation de mes choix parfois ambitieux. Ils m'ont offert la possibilité de réaliser mon rêve. Ils ont toujours fait preuve de la plus grande des patiences et de la plus grande des compréhensions. Malgré toutes les difficultés qu'ont pu représenter ces longues années d'études, ils m'ont toujours facilité ce parcours, au prix de nombreux efforts.

Il me sera impossible de rendre tout ce qui m'a été offert. Rien n'aurait été possible sans eux, cette réussite est donc un peu la mienne, mais surtout beaucoup la leur. Aucun remerciement ne serait être suffisant

A mes grands parents. Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'aviez cessé de formuler dans vos prières. Qu'Allah vous préserve santé et longue vie.

Mes frères et mes sœurs, pour l'amour, l'aide et le soutien qu'ils m'ont toujours apporté aussi bien dans les moments difficiles que radieux.

Remerciement

Remerciement

Ce travail a été réalisé, dans le cadre d'une thèse en co-encadrement entre Laboratoire de synthèse des molécules d'intérêts biologiques (SYMBIO) de l'Université des frères Mentouri Constantine 1 sous la direction de la professeure **Taoues BOUMOU**D et laboratoire d'innovation thérapeutique de l'université de Strasbourg sous la direction du directeur de recherche au CNRS le docteur **Laurent DESAUBRY**.

Tout d'abord je voudrais exprimer mes remerciements à madame **Taoues BOUMOU**D, qui m'a fait le grand honneur de bien vouloir m'encadrer dans ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour toute l'attention, la patience et le temps qu'elle m'a consacré.

Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à Monsieur **Laurent DESAUBRY**. Grand merci pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, je le remercie également pour tous les moments passés à discuter du projet. Sa confiance, ses conseils, son expérience et son accompagnement durant 16 mois de stage passé à l'université de Strasbourg.

Je remercie également le Pr.**Abdelmadjid DEBACHE**, pour m'avoir donnée la possibilité de rejoindre son groupe de recherche, pour sa disponibilité et pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Je tiens à remercier le Pr. **Salah RHOUATI** de m'avoir honorée en acceptant la présidence de ce jury. Je tiens à exprimer également mes sincères remerciements à Madame **Hassina HARKAT**, professeure à l'université de Batna, et **Boudjemaa BOUMOU**D, professeur à l'université des frères Mentouri Constantine 1, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je n'oublie pas de remercier Mr. Kamel SOUIHER, directeur de l'établissement privé de formation paramédicale EL-YASSAMINE Batna Algérie, pour m'avoir financées trois premiers mois de mon séjour en France.

Remerciement

Je suis très reconnaissante à tous les chercheurs du laboratoire de synthèse des molécules d'intérêts biologiques (SYMBIO) de la Faculté des Sciences Constantine 1, je tiens à remercier en particulier Dr. Faiza Boukezzoula, pour les encouragements et les conseils qu'elle m'a réservés.

Mes remerciements s'adressent aussi au Dr. Hassan HAMMOUD pour l'aide qu'il m'a apporté, sa disponibilité et ses conseils qui m'ont permis de mener à bien ces travaux.

Je remercie tous mes collègues de l'équipe du Dr. Désaubry Laurent.

Je n'oublie pas de remercier mon collègue Redouane Tabti pour les encouragements et les conseils qu'il m'a réservés.

Mention spéciale à Mariame Rachedi qui m'a supportée et m'a permise de me lever motivée, le cœur léger et l'esprit tranquille depuis le début de mon séjour en France, ton aide à ce moment est un véritable cadeau.

Je ne peux terminer cette page sans remercier mes chères amies pour leur soutien permanent: Ghania, Zeineb, Ratiba et Aude.

Généralités expérimentales

Introduction Générale1

Chapitre I Nouvelles voies catalytiques de synthèse des 2,4,5-triarylimidazoles et spirooxindoles *via* des réactions multicomposants4

I.1 Les triphénylimidazoles4

I.1.1. Détermination des conditions optimales7

I.1.2. Applications des nouvelles conditions à la préparation des triphénylimidazoles9

I.1.3. Influence de la nature de substituant porté par le benzène10

I.1.4. Étude spectrale11

I.1.5. Mécanisme réactionnel proposé11

I.2. Les spirooxindoles12

I.2.1. Détermination des conditions optimales15

I.2.2. Applications des nouvelles conditions dans la préparation des spirooxindoles17

I.2.3. Étude spectrale18

I.2.4. Mécanisme réactionnel proposé18

I.3. Conclusion19

I.4. Partie expérimentale20

I.4.1. Triphénylimidazoles20

I.4.2. Spirooxindoles25

Chapitre II Synthèse des iminobenzimidazoles et dérivés de la Fluorizoline à visée anticancéreuse30

II.1. Les inhibiteurs de la traduction cap dépendante30

II.1.1 Synthèse des iminobenzimidazoles35

II.1.2. Etude pharmacologique d'imino benzimidazoles36

II.2. La fluorizoline38

II.2.1 découverte et synthèse38

II.2.2 Relation structure activité38

II.2.3 Propriété pharmacologique39

II.2.4 Synthèse de la fluorizoline40

II.2.5 Mécanisme réactionnel de la fluoration de diarylthiazole42

II.2.6 Etude Pharmacologique de la fluorizoline43

II.2.7 Inhibition de l'activation de C-RAF par les dérivés de la fluorizoline45

II.3. Conclusion	46
II.4 Partie expérimentale 1	47
II.4.1 Les iminobenzimidazoles.....	47
II.4.2 La fluorizoline.....	62
Conclusion Générale	72
Référence	73
Annexe 1 Enregistrements spectroscopiques.....	79
Annexe 2 publication	
Résumé	
Abstract	
Molakhs	

Abréviation et Symboles utilisés

Abréviation & Symboles utilisés

Ar Aryle

ARN Acide ribonucléique

ARNm Acide ribonucléique messenger

ASO Oligonucleotides anti-sens

ATP Adénosine tri-phosphate

Bmim Butyl méthyl hexafluorophosphate

BRAF v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

DMF Diméthyleformamide.

DMSO Diméthyle sulfoxyde.

DBU 1,8-Diazabicyclo [5.4.0]-undec-7-ène

DCC N, N'-Dicyclohexyl-carbodiimide

DCE 1,2-Dichloroéthane

CCM Chromatographie sur couche mince

DDQ 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone

EIF4 Eukaryotic initiation factors

EGF Epidermal Growth Factor

EMT Transition épithélio-mésenchymateuse

Et Ethyle

Et₃N Triéthylamine

Eq Equivalent

IC50 Concentration inhibitrice 50%.

KRAS Kirsten rat sarcoma viral oncogene

MAP Mitogen activated proteins

MAPK Mitogen-activated protein kinases

Abréviation et Symboles utilisés

MDM2	Murine double minute 2
Mcl-1	Myeloid cell leukemia protein 1
Me	Méthyle
MEK	Mitogen-activated protein kinase
m-CPBA	Acide meta-chloroperoxybenzoïque
NCS	N-Chlorosuccinimide
NH ₄ OAc	Acétate d'ammonium
PABP	protéine de liaison poly A
Pd/C	Palladium sur charbon
Ph	Phényle
PHB	Prohibitine
PPh ₃	Triphénylphosphine
Ppm	Partie par million
Rdt.	Rendement.
RMN	Résonance magnétique nucléaire
TBAB	Bromure de tétrabutylammonium
TGFβ	Facteur de croissance transformant
THF	Tétrahydrofurane
p-TsOH	Acide para toluène sulfonique
4E-BP1	4E-Binding Protein)
5' UTR	untranslated région

Généralités expérimentales

Généralités expérimentales

1. Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de gelde silice Merck 60 F254 sur feuilles d'aluminium. Les purifications par chromatographie flash ont été effectuées sur un appareil Armen Spot II.

2. Les points de fusion ont été déterminés à l'aide d'un banc Köfler du département de chimie de l'université des Frères Mentouri-Constantine et du laboratoire d'innovation thérapeutique de l'université de Strasbourg.

3. Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés sur un spectromètre Brüker avance DPX 250 au service de RMN du département de Chimie de l'université des Frères Montouri-Constantine, et sur un spectromètre Brüker Advance 400 MHz, RMN 500 MHz au service de RMN de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, par rapport au TMS pris comme référence interne. Les constantes de couplage J sont exprimées en Hertz. La multiplicité des signaux de résonance est indiquée par les abréviations : (s) singulet, (d) doublet, (dd) doublet de doublet, (t) triplet, (q) quadruplet, (m) multiplet.

Les spectres de masse de basse résolution (LC-MS) sont réalisés à l'aide d'un spectromètre *Agilent Technologies MSD 1200 SL* simple qudripôle à sourcemultimode ESI/APCI équipé d'une colonne *Thermo Hypersil GOLD 1.9 μm , 1x30 m*

Introduction Générale

Introduction Générale

Introduction Générale

Le cancer représente aujourd'hui la seconde cause de décès dans le monde. On estime qu'il touche un homme sur deux et une femme sur trois. Le cancer constitue ainsi un véritable problème de santé publique dans les pays industrialisés; de plus, depuis plus d'une trentaine d'année, le nombre de cas rapportés augmente constamment.¹

Le cancer se caractérise par une prolifération incontrôlée des cellules dans un tissu normal de l'organisme. Toutes ces cellules sont des clones issus d'une même cellule souche à l'origine du cancer. Cette cellule a initialement subi des modifications aléatoires conférant des caractéristiques qui lui permettent notamment de se diviser indéfiniment, ce qui conduit à la formation de métastases.

Le corps humain est composé d'un grand nombre de cellules qui s'organisent et s'assemblent pour former des tissus ou des organes et se renouvellent en permanence. Au cours du développement normal et tout au long de la vie adulte, des mécanismes complexes de contrôle génétique régulent le nombre de cellules en réponse à des signaux qui induisent, inhibent leur prolifération ou entraînent leur mort.

Différents modes de traitements du cancer sont possibles, comme la chimiothérapie. Cette méthode a souvent besoin d'être associée à d'autres traitements pour être totalement efficace. De plus, elle engendre des effets secondaires dus au manque de sélectivité des médicaments utilisés. Il est donc essentiel de poursuivre la recherche de nouveaux composés anticancéreux afin d'améliorer l'efficacité des traitements actuels.

Les composés hétérocycliques azotés, en particulier les hétérocycles azotés à cinq chaînons, sont des molécules majeures de la chimie organique en raison de leurs activités pharmaceutiques remarquables, notamment leurs propriétés anticancéreuses. Ainsi, dans le cadre de nos recherches, nous allons examiner quatre types de composés hétérocycliques: les triphéylimidazoles, les spirooxindoles, les iminobenzimidazoles et la fluorizoline qui semblent être des candidats prometteurs pour la découverte de nouveaux médicaments pour traiter le cancer (Figure I).

Introduction Générale

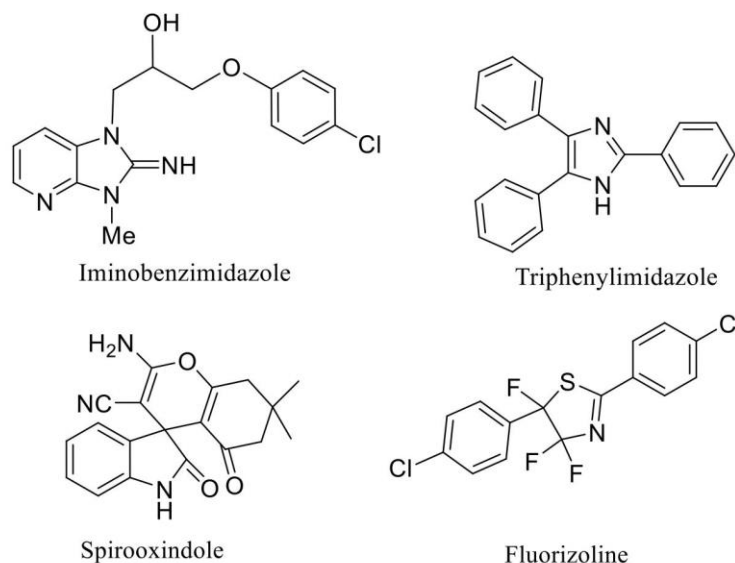


Figure I: Types de composés faisant l'objet de cette thèse.

Notre laboratoire de Synthèse des Molécules d'Intérêts Biologiques (SYMBIO) de la Faculté des Sciences Exactes, Université des Frères Mentouri-Constantine 1, s'est intéressé au développement de réactions multicomposants, tant du point de vue de synthèse de nouvelles molécules hétérocycliques *via* ces réactions que du point de vue de leur activité. Ainsi, il m'a été confiée un travail de synthèse et de caractérisation en série triphénylimidazoles et spirooxindoles faisant appel à des réactions à composants multiples dans des conditions propres.

Dans la continuité des travaux réalisés au sein de notre laboratoire SYMBIO, durant mon séjours en France au sein de laboratoire d'innovation thérapeutique de l'université de Strasbourg sous la direction du directeur de recherche au CNRS le docteur Laurent DESAUBRY, et dans le cadre d'un co-encadrement de thèse, il m'a été confiée la synthèse d'iminoenzimidazoles et de dérivés de la fluorizoline. Ce manuscrit s'articule donc en deux grands chapitres:

Le premier chapitre intitulé: «Nouvelles voies catalytiques de synthèse des 2,4,5-triphénylimidazoles et spirooxindoles *via* des réactions multicomposants» traitera dans:

-*Une première partie* l'amélioration de la synthèse de triphénylimidazoles présentant des activités anticancéreuses putatives,

-*Une deuxième partie* l'amélioration de la synthèse de spirooxindoles d'intérêt biologique, en particulier pour le traitement des cancers.

Ledeuxième chapitre portera sur: «Synthèse, caractérisation et l'étude biologique des iminoenzimidazoles et de la fluorizoline».

Introduction Générale

- *La première partie* de ce chapitre sera consacrée à l'examen des requis structuraux d'une nouvelle famille d'iminoenzimidazoles pour leur cytotoxicité sur des cellules cancéreuses,

- *La deuxième partie* traitera la préparation de la fluorizoline pour des études pharmacologiques approfondies et synthétiser des analogues de ce composé pour déterminer ses relations structure-activité.

Nous terminerons cette thèse par une conclusion générale et des perspectives.

Chapitre I

**Nouvelles voies catalytiques de synthèse
des 2,4,5-triarylimidazoles et spirooxindoles *via*
des réactions multicomposants**

I.1. Les triphénylimidazoles

Le noyau d'imidazole est présent dans divers produits bioactifs naturels comme la Biotine (vit B8 ou H, jouant un rôle important dans l'équilibre adaptatif du corps humain), l'Histidine (un des 22 acides α -aminés qui entrent dans la composition des protéines), l'Histamine (une amine de signalisation du système immunitaire) et les alcaloïdes de la Pilocarpine (utilisée contre le glaucome en ophtalmologie), et les composés synthétiques comme la Cimétidine (un antihistaminique) et Losartan (un antihypertensif) (Figure I.1).

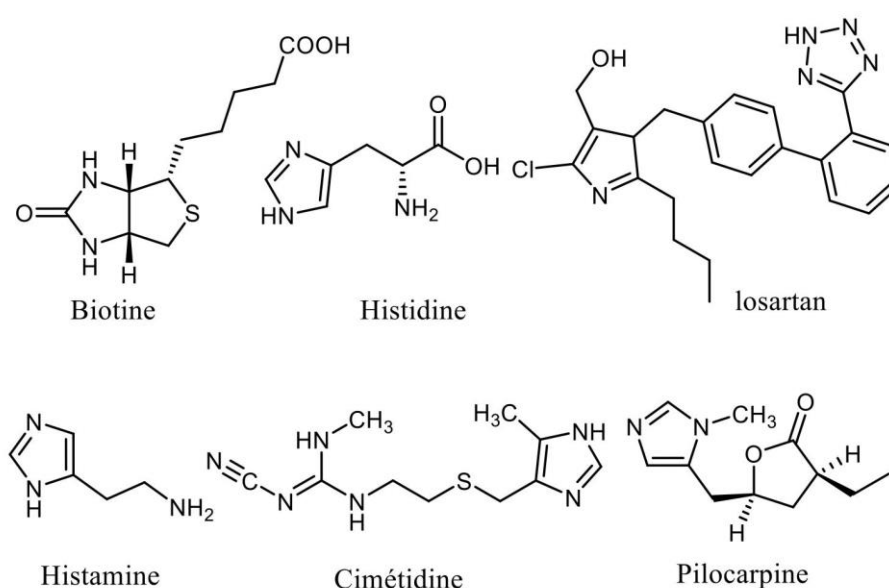


Figure I.1: Divers dérivés bioactifs naturels et synthétiques.

Divers imidazoles substitués agissent comme inhibiteurs de la MAP kinase P38 et B-Raf kinase, récepteurs du glucagon, pesticides, fongicides, herbicides, antitumoraux, anti-inflammatoires et antithrombotiques.

Les triphénylimidazoles forment un groupe important des imidazoles substitués, ils sont présents dans bon nombre de molécules anti-inflammatoires, analgésiques, anti-hypertensifs et surtout anticancéreuses.^{2,3} Par exemple : le **SB-431542** inhibe la transcription induite par TGF β , la croissance, l'EMT induite par le TGF β , la motilité cellulaire, la migration, l'invasion, la sécrétion du facteur de croissance endothéliale vasculaire dans les lignées cellulaires cancéreuses humaines,⁴ le **SB203580** est un inhibiteur de la p38 MAPK,⁵ le **OC 144-93** un inhibiteur de la résistance multidrogue médiée par la P-glycoprotéine,⁶ et le triphénylimidazole **SB590885** présente une inhibition

Chapitre I: Nouvelles voies catalytiques de synthèse des 2,4,5-triphénylimidazoles et spirooxindoles via des réactions multicomposants

sélective de BRAF et inhibe préférentiellement la prolifération des cellules cancéreuses mutantes pour BRAF⁷ (Figure I.2).

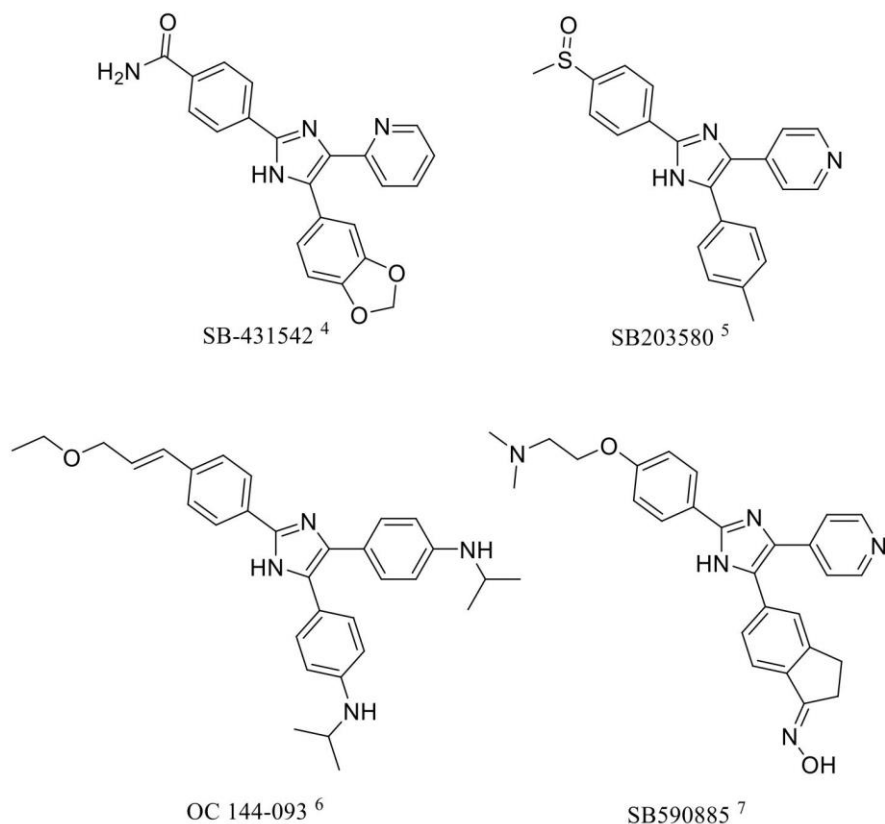


Figure I.2: Exemples de triphénylimidazoles anticancéreux.⁴⁻⁷

Les activités biologiques des triphénylimidazoles ont attiré l'attention des chimistes organiciens, ainsi, plusieurs méthodes ont été rapportées pour préparer ces produits parmi lesquelles on cite: la condensation monotope (one-pot) d'un α -dicarbonyle, d'un aldéhyde et de deux équivalents de l'ammoniac dans un milieu alcoolique, rapportée pour la première fois par Debus en 1858,⁸ développée ensuite par Japp et Robinson,⁹ et par Radziszewski en 1882,¹⁰ et finalement modifiée par Weidenhagen en 1935.¹¹ Cette réaction est ainsi connue sous différents noms.¹²

En cherchant à optimiser les conditions réactionnelles pour préparer des 2,4,5-triphénylimidazoles, avec des rendements meilleurs, les chimistes ont utilisé de certaines variables: la concentration des réactifs, la température, le solvant, le catalyseur, les moyens de chauffage...etc. Parmi ces variables, le catalyseur est le plus impliqué dans le conditionnement de la réaction car il permet, non seulement, d'optimiser les rendements réactionnels, mais aussi, d'économiser le temps et l'énergie.

Un coup d'œil sur la littérature dans la synthèse des triphénylimidazoles via la RCM de Radziszewski nous fait constater qu'une très grande variété de voies catalytiques

Chapitre I: Nouvelles voies catalytiques de synthèse des 2,4,5-triphénylimidazoles et spirooxindoles via des réactions multicomposants

«minérale, organométallique, enzymatique ou organique» a été utilisée. Nous citons à titre d'exemple :

- L'utilisation du bromure de tétrabutylammonium (TBAB, 10 mol%) comme catalyseur¹⁰ (Schéma I.1).

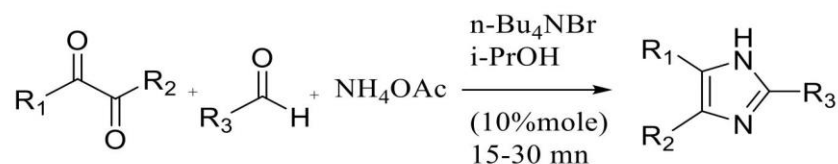


Schéma I.1 : TBAB comme catalyseur.¹⁰

- L'utilisation de NiCl₂·6H₂O comme catalyseur rapportée par Marcelo et son équipe en 2012¹³ (Schéma I.2).

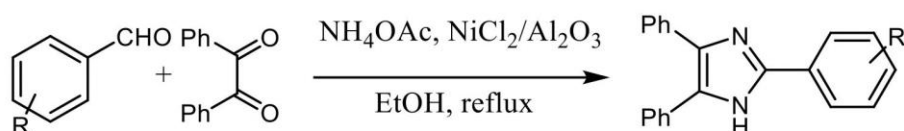
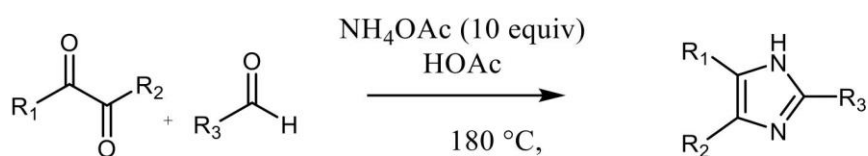


Schéma I.2. NiCl₂·6H₂O comme catalyseur

- L'acide acétique a été utilisé comme catalyseur par Scott E. Wolkenberg et son équipe sous irradiation micro-ondes¹⁴ (Schéma I.3).



R = alkyl, aryl, hétéroaryle

Schéma I.3 : HOAc comme catalyseur sous MO

- S. Elumalai *et coll.* ont rapporté l'utilisation de la glycine dans la réaction de Radziszewski en milieu concentré¹⁵ (Schéma I.4).

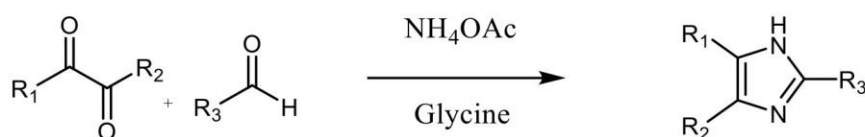


Schéma I.4 : La glycine comme catalyseur.

Chapitre I: Nouvelles voies catalytiques de synthèse des 2,4,5-triphényylimidazoles et spirooxindoles via des réactions multicomposants

- En 2013, il a été rapportée l'utilisation d'une enzyme « la lipaze » comme catalyseur dans la réaction de Radziszewski.¹⁶

En raison de la diversité des activités pharmacologiques et biologiques des triphénylimidazoles, la mise au point de protocoles sans danger pour l'environnement, efficaces, à haut rendement, économiques et propres est toujours souhaitable et en demande. Dans ce contexte, notre choix fut porté sur la catalyse organique étant donné que les protocoles opératoires développés, en l'absence de métaux de transition, sont en accord avec le principe de la chimie respectueuse de l'environnement «chimie verte» et particulièrement attractifs pour des extensions en chimie médicinale.

Un criblage bibliographique rapide de la large diversité de catalyseurs décrite dans la littérature pour effectuer la réaction de Radziszewski, a orienté notre choix sur l'utilisation de *l'acide citrique* comme nouveau catalyseur organique dans le but d'améliorer les rendements de cette réaction.

I.1.1. Détermination des conditions optimales

Afin d'obtenir les conditions optimales de la réaction, nous avons examiné tout d'abord la possibilité de synthétiser le 2,4,5-triphénylimidazole «Lophine» (**4a**) par une condensation entre un mélange équimolaire de benzaldéhyde (**1a**), du benzile (**2**) et deux équivalents d'acétate d'ammonium (**3**) sous différentes conditions réactionnelles (Schéma I.5).

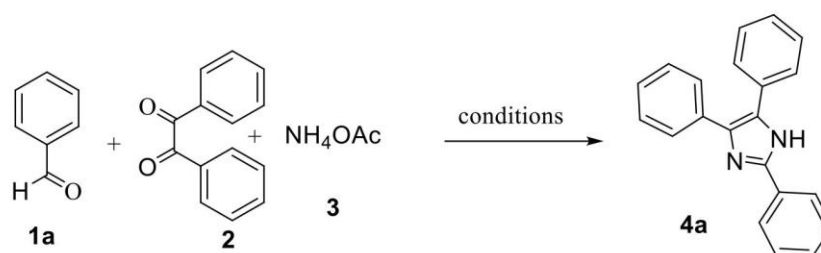


Schéma I.5: Réaction modèle.

I.1.1a. Détermination du solvant approprié

Ce liquide, dans lequel la réaction est menée, joue un rôle capital, c'est lui qui détermine la température du reflux, donc de la réaction. Tout comme il solubilise les réactifs et par conséquent augmente la surface de contact entre les réactifs. Ainsi, nous avons examiné la réaction modèle (Schéma I.5) à reflux de différents solvants: EtOH,

Chapitre I: Nouvelles voies catalytiques de synthèse des 2,4,5-triphénylimidazoles et spirooxindoles via des réactions multicomposants

CH₃CN, H₂O, CHCl₃, CH₂Cl₂, et sans solvant à 80°C en présence d'une quantité catalytique de l'acide citrique (10 mol% à l'égard de l'aldéhyde).

Les résultats, réunis dans le Tableau I.1, montrent que le meilleur rendement est obtenu en utilisant l'éthanol comme milieu réactionnel (Tableau I.1, entrée 1).

I.1.1b. Etude de la température

Dans les conditions sans catalyseur et à température ambiante, la réaction n'a donné aucun produit. Sachant que la température a un effet cinétique, nous avons mené la réaction modèle (Schéma I.5) dans l'EtOH en présence de 10 mol% du catalyseur à des différentes températures. Au vu des résultats obtenus, la réaction à reflux a montré une amélioration du rendement par rapport à d'autres températures. En effet, 85% de rendement a été obtenu après 50 minutes de reflux (Tableau I.1, entrée 1).

I.1.1c. Etude de l'influence de la quantité du catalyseur

Initialement, nous avons examiné la réaction modèle en absence du catalyseur en milieu concentré à température ambiante, à 80°C, et dans l'éthanol à reflux. Cependant, la réaction n'a donné aucun produit dans ces conditions (Tableau I.1, entrées 8-10). En rajoutant 10 mol% du catalyseur et en chauffant à 80°C dans des conditions concentrées, le produit est obtenu avec 80% de rendement (Tableau I.1, entrée 12). Afin d'améliorer les résultats de ces premiers essais, nous avons repris la même réaction modèle sous différentes quantités de l'acide citrique dans l'éthanol. Le meilleur rendement est obtenu en utilisant 15 mol% de cet acide à reflux de l'éthanol (Tableau I.1, entrée 14). On remarque qu'au-delà de 15 mol%, le rendement décroît (Tableau I.1, entrée 15), ceci est probablement dû à la formation des sels d'imidazolium citrate qui peuvent s'organiser dans la solution et former des agrégats dont la taille peut varier selon la concentration.

Tableau I.1: Optimisation des conditions de la réaction.

Entrée	Catalyseur (mol%)	Solvant	Température (°C)	Temps (min)*	Rendement (%)
1	10	EtOH	Reflux	50	85
2	10	CH ₃ CN	Reflux	50	56
3	10	CH ₂ Cl ₂	Reflux	50	-
4	10	CHCl ₃	Reflux	50	-
5	10	H ₂ O	Reflux	50	-
6	10	EtOH	T.amb	180	16
7	10	EtOH	50	180	35
8	–	–	T.amb	240	-
9	–	–	80	240	-
10	–	EtOH	Reflux	120	-
11	10	–	T.amb	180	traces
12	10	–	80	50	80
13	5	EtOH	Reflux	50	39
14	15	EtOH	Reflux	50	92
15	20	EtOH	Reflux	50	89

*La réaction est suivie par CCM

I.1.2. Applications des nouvelles conditions à la préparation des triphénylimidazoles

Après avoir déterminé les conditions optimales de la réaction de Radziszewski, et pour examiner l'efficacité et la reproductibilité de ce protocole, la réaction a été étendue à d'autres aldéhydes aromatiques substitués. Les réactions se sont déroulées efficacement pour fournir les dérivés d'imidazole correspondants (**4a-1**) dans des rendements compris entre 64 et 92% (Tableau I.2).

Chapitre I: Nouvelles voies catalytiques de synthèse des 2,4,5-triphénylimidazoles et spirooxindoles via des réactions multicomposants

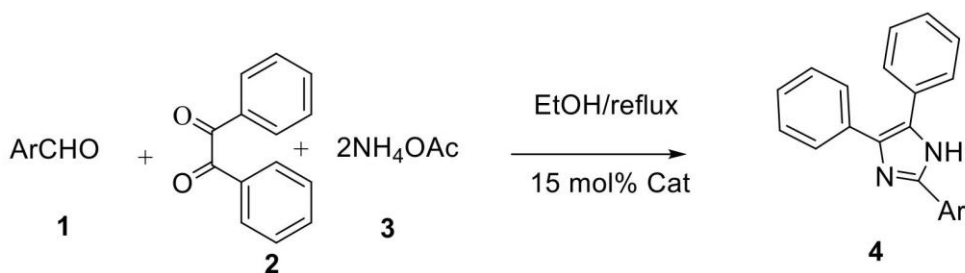


Tableau I.2: Extension des conditions de la réaction avec divers aldéhydes aromatiques.

Entrée	Aryle	Temps (min)*	composé	Rdt (%)	Point de fusion(°C)
					Trouvé rapporté ^{réf}
1	C ₆ H ₅	50	4a	92	273-275/274-275 ¹⁷
2	4-CH ₃ -C ₆ H ₆	75	4b	82	229-232/230-232 ¹⁷
3	3-CH ₃ O- C ₆ H ₆	70	4c	80	257-258/266-286 ¹⁸
4	2-NO ₂ - C ₆ H ₆	100	4d	65	227-229/230-231 ¹⁸
5	2-CH ₃ - C ₆ H ₆	80	4e	75	208-210/205-207 ¹⁹
6	2-CH ₃ O- C ₆ H ₆	70	4f	81	211-213/212-214 ¹⁷
7	2,4-Cl ₂ - C ₆ H ₃	115	4g	70	174-175/170-172 ²⁰
8	4-Cl- C ₆ H ₆	120	4h	78	263-264/264-266 ¹⁷
9	4-Et- C ₆ H ₆	360	4i	86	242-244/223-224 ²¹
10	3-Cl- C ₆ H ₆	210	4j	75	279-281/285-287 ²¹
11	4- CH ₃ O- C ₆ H ₆	180	4k	90	238-240/230-233 ¹⁷
12	3-OH-4-CH ₃ O- C ₆ H ₆	300	4l	64	192-194/217-216 ²²

*Le temps de la réaction est déterminé par CCM

I.1.3. Influence de la nature de substituants portés par le noyau benzénique

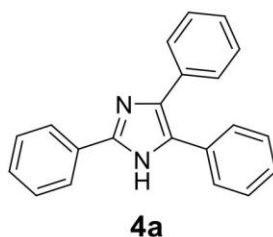
Comme il est bien montré dans le Tableau I.2, les aldéhydes portant des substituants électro-attracteurs ou donneurs, en position *ortho*, *méta* ou *para* sur le noyau benzénique mènent facilement aux 2,4,5-triphénylimidazoles correspondants (**4a-l**) avec de bons rendements, mais avec des petites nuances:

- Le rendement est excellent avec le benzaldéhyde non-substitué (92%)
- Avec le (3-OH, 4-OMe)-benzaldéhyde, le rendement est moyen (64%) probablement à cause de l'effet électro-donneur des groupements qui désactive la fonction carbonyle.

I.1.4. Étude spectrale.

Tous les composés préparés présentent en spectroscopie IR une forte absorption dans l'intervalle 3200-3500 cm^{-1} correspondant à la présence de la fonction NH.

Les résultats spectroscopiques, en résonance magnétique nucléaire (RMN ^1H et ^{13}C) sont en parfait accord avec les structures proposées. En effet, l'analyse spectrale en RMN ^1H du composé (**4a**), par exemple, montre un signal caractéristique à 12.70 ppm sous forme d'un singulet d'intégration 1H attribué au proton porté par l'azote N-H (s, 1H).



I.1.5. Mécanisme réactionnel proposé.

Le premier équivalent de NH_3 réagit avec l'aldéhyde, activé par l'acide citrique pour donner l'aldimine (**I**); le deuxième équivalent réagit avec le benzile pour donner l' α -carbonylimine (**II**). Ces deux intermédiaires réagissent ensemble pour donner le produit désiré après une cyclisation du à une attaque nucléophile intramoléculaire suivie d'une déshydratation et un réarrangement pour donner le produit désiré (Schéma I.6).

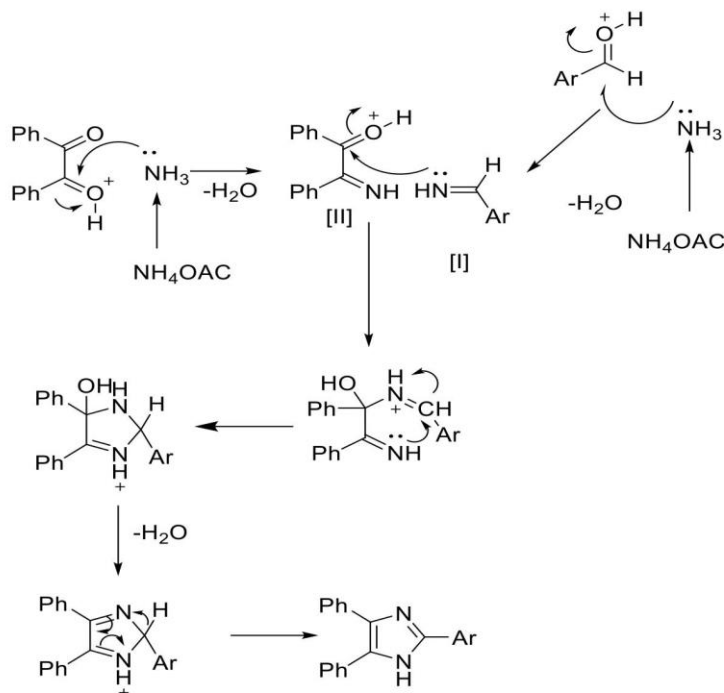


Schéma I.6: Mécanisme réactionnel proposé.

En conclusion, ce procédé présente plusieurs avantages, notamment l'utilisation d'un catalyseur non dangereux et peu coûteux, un traitement aisé, des conditions de réaction propres et des rendements élevés.

I.2. Les spirooxindoles

Les spirocycles sont des outils chimiques intéressants qui connaissent actuellement un regain d'intérêt important puisqu'ils permettent l'introduction de cycles et de fonctions chimiques de réactivités différentes par le biais de stratégies de synthèse variées. Leur nom est issu de la fusion entre le terme «spiranique», qui définit cette jonction de cycle *si particulière*, et le motif oxindolique. La configuration sp^3 du carbone de jonction explique la géométrie tridimensionnelle particulière des structures spiraniques. Par conséquent, l'arrangement tétraédrique des liaisons autour du carbone de jonction implique que les deux cycles se retrouvent dans des plans perpendiculaires. Ainsi, certains composés spiro présentent une chiralité axiale.

Le concept de tridimensionnalité est réservé aux spirocycles. En effet, pour des structures aromatiques ou hétéroaromatiques issues de l'espace chimique traditionnel, la troisième dimension n'est accessible que par l'enchaînement de plusieurs motifs. Au contraire, la nature des spirocycles est telle que les trois vecteurs de l'espace sont aisément accessibles.²³ De ce fait, des interactions significatives d'un ligand avec les trois

Chapitre I: Nouvelles voies catalytiques de synthèse des 2,4,5-triphényylimidazoles et spirooxindoles via des réactions multicomposants

dimensions d'un site de liaison peuvent être réalisées plus facilement en utilisant un noyau spirocyclique qu'avec des systèmes (hétéro)aromatiques plans. Par la mise en œuvre de ces composés, l'accès à certaines zones spatiales dans des protéines cibles sont envisageables. Plus important encore, la tridimensionnalité apportée par le carbone hybridé sp^3 peut également entraîner une plus grande sélectivité et donc diminuer certains effets secondaires.²⁴

Les dérivés spirooxindoles présentent diverses activités biologiques telles que les activités antivirales, antibactériennes, antifongiques, anti-inflammatoires, analgésiques, diurétiques, anticonvulsive, anti-hypertensive et anticancéreuse. On cite, par exemple, les composés donnés par la figure I.3: le **MI-219** et le **MI-5** sont des agents anticancéreux qui inhibent l'interaction entre les protéines p53 et MDM2^{25,26} (cible thérapeutique en oncologie), le **SOID-8** a été développé pour le traitement des mélanomes (cancers de la peau) et a montré qu'il était capable d'induire la mort programmée des cellules cancéreuses.²⁷ Parmi les spiro(pyrrolidine-3,3'-oxindole) naturels et non naturels, on trouve aussi la **spirotryptostatine A** qui inhibe la polymérisation de la **Tubuline** (une protéine hétérodimérique constitutive des microtubules) dans la cellule cancéreuse et la **spirotryptostatine B** qui inhibe les cellules cancéreuses à la phase G2 / M du cycle cellulaire (Figure I.4).

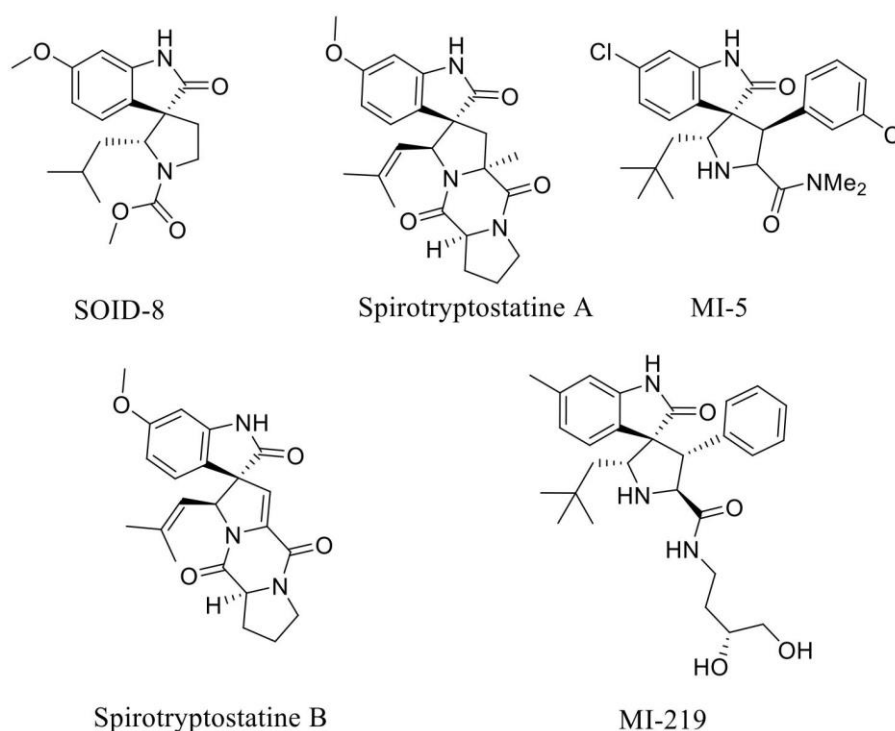


Figure I.3: Exemples représentatifs des pirooxindoles anticancéreux.²⁵⁻²⁸

Chapitre I: Nouvelles voies catalytiques de synthèse des 2,4,5-triphénylimidazoles et spirooxindoles via des réactions multicomposants

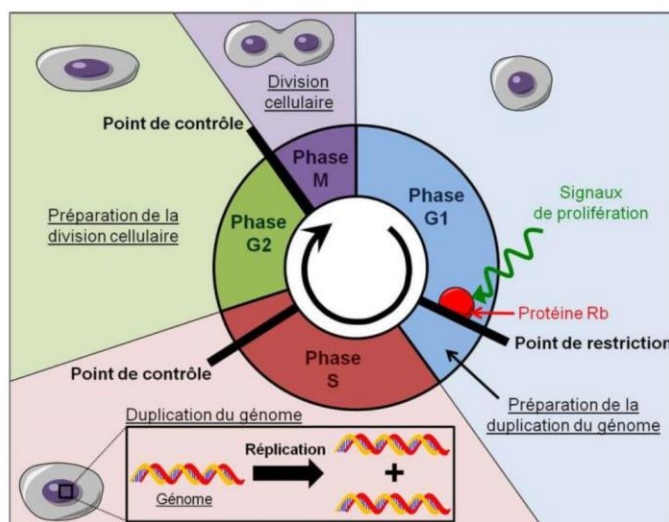


Figure I.4. Le cycle cellulaire. Durant la phase G1, les signaux de prolifération désactivent la protéine Rb ce qui permet de lever le point de restriction du cycle cellulaire. La cellule entre en phase S où elle duplique son génome. Ensuite elle entre en phase G2 où elle se prépare à se diviser et enfin elle termine son cycle cellulaire par la phase M qui correspond à la division cellulaire. © Grégory Ségala

La structure typique des spirooxindoles de même que les multiples activités biologiques caractérisant les membres de cette famille, ont retenu l'attention des chercheurs industriels et académiques et justifie la nécessité de développer de nouvelles méthodologies de synthèse pour accéder à ces spirocycles.

Dans la littérature on retrouve plusieurs approches pour la synthèse des spirooxindoles parmi lesquelles on cite à titre d'exemple la réaction à composants multiples «pseudo Biginelli ou Biginelli-like» utilisée pour la synthèse chirale des spiro(indoline-pyrimidine)-diones à partir de l'isatine, l'urée et des β -cétocesters en présence de l'acide BINOL phosphorique comme catalyseur rapportée par Stocchi *et coll.*²⁹ (Schéma I.7).

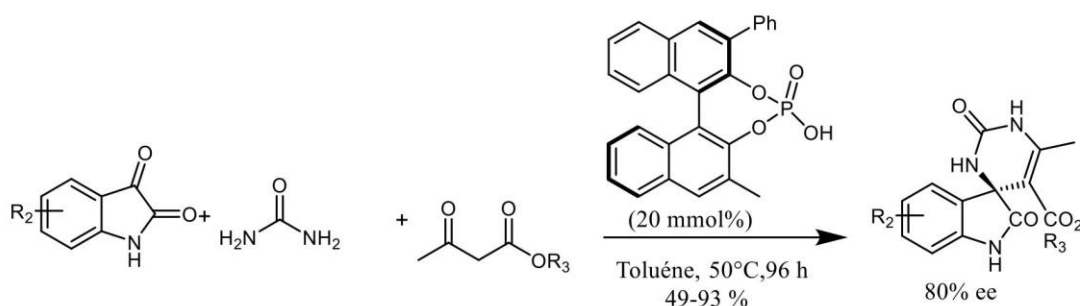


Schéma I.7: Synthèse des spirooxindoles par la méthode de Stocchi *et coll.*²⁹

Chapitre I: Nouvelles voies catalytiques de synthèse des 2,4,5-triphényylimidazoles et spirooxindoles via des réactions multicomposants

L'isatine a également été utilisée avec l'acide barbiturique et la dimédone pour préparer des spiro[chromeno[2,3-d]pyrimidine-5,3'-indoline]-tétraones, par catalyse K-10 en présence d'un liquide ionique³⁰ (Schéma I.8).

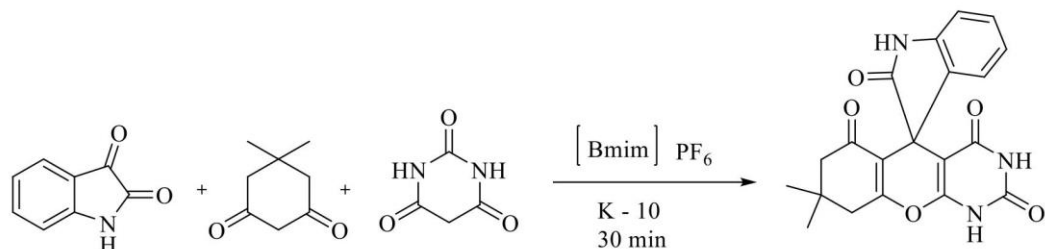


Schéma I.8: K-10 catalyse la synthèse des spirooxindoles via pseudo-Biginelli.³⁰

Un coup d'œil sur la littérature dans la synthèse des spirooxindoles via une réaction monotope, nous a fait constater qu'une très grande variété de catalyseurs a été utilisée, parmi lesquelles les acides de Lewis ont largement démontré leur potentiel catalytique au cours de ces dernières années³¹. Ce criblage bibliographique, sur les différents catalyseurs rapportés dans la littérature, a orienté notre choix sur l'emploi d'un nouveau catalyseur acide de Lewis «trifluorure de bore étherate» $\text{BF}_3(\text{OEt})_2$ dans le but d'améliorer les rendements et le temps de cette réaction.

I.2.1. Détermination des conditions optimales.

Afin d'obtenir les conditions optimales de la réaction, nous avons examiné tout d'abord la possibilité de synthétiser le produit (**5a**) par une condensation entre un mélange équimolaire de l'isatine (**1'a**), du malononitrile (**2'a**) et de la dimédone (**3'a**) sous différentes conditions réactionnelles (Schéma I.9).

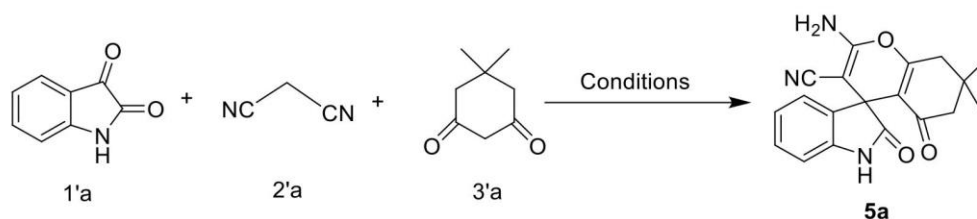


Schéma I.9: Réaction modèle.

I.2.1.a. Etude de l'influence du solvant.

La réaction modèle (Schéma I.9) est menée à reflux dans des solvants usuels comme: l'éthanol, l'acétonitrile, l'eau, le tétrahydrofurane et un mélange eau/éthanol avec des quantités de réactifs bien définies en présence de 10 mol% de $\text{BF}_3.\text{OEt}_2$ (Tableau I.3).

Tableau I.3: Optimisation des conditions de réaction.

Entrée	Solvant	Catalyse (mol %)	Temperature (°C)	Temps (h)*	Rendement (%)
1	CH ₃ CN	10	Reflux	24	/
2	THF	10	Reflux	24	/
3	EtOH	10	Reflux	12	32
4	H ₂ O	10	Reflux	4	81
5	H ₂ O/EtOH	10	T. amb	24	50
6	EtOH/H ₂ O	10	80	2	95
7	EtOH/H ₂ O	-	80	4	Traces
8	EtOH/H ₂ O	5	80	2.5	85
9	EtOH/H ₂ O	15	80	3	87
10	EtOH/H ₂ O	20	80	2	93
11	EtOH/H ₂ O	30	80	2	89

*La réaction est suivie par CCM

Cette étude montre que le solvant joue un rôle majeur dans la réaction. L'utilisation des solvants polaires aprotiques comme l'acétonitrile ou le THF donnent 0% de rendement (Tableau I.3, entrées 1,2). Par contre les solvants protiques comme l'EtOH et l'eau à reflux donnent de meilleurs rendements (Tableau I.3, entrées 3,4). Le mélange EtOH/H₂O (50/50 %) constitue le meilleur solvant en terme de rendement et de temps (Tableau I.3, entrée 6).

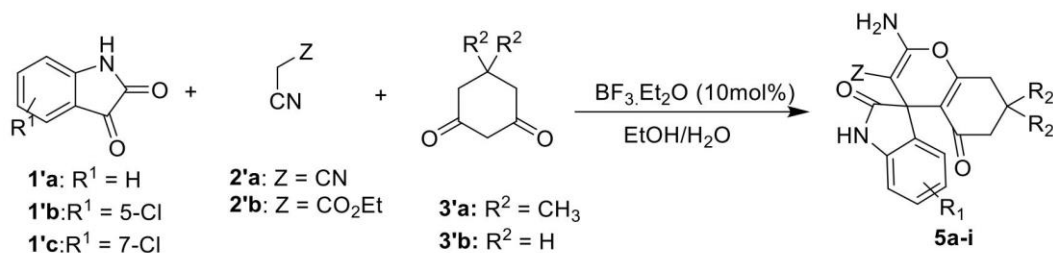
1.2.1b. Etude de l'influence de la quantité du catalyseur.

L'étude précédente nous a permis de déterminer le milieu favorable (éthanol/eau) que nous allons utiliser pour déterminer la quantité optimale de catalyseur (BF₃.OEt₂) *vis-à-vis* de la réaction modèle. Pour cela, nous avons fait varier la quantité du catalyseur de 0 % à 20 mol%.

On a pu constater que lorsqu'on augmente la quantité de BF₃.OEt₂ de 0 à 5 mol%, le rendement croît de 0 à 85%. Le meilleur rendement (95%) est obtenu avec 10 mol% de BF₃.OEt₂ (Tableau I.3, entrée 6). Nous constatons, qu'au-delà de 10 mol%, le rendement décroît (Tableau I.3, entrées 9-11).

I.2.2.Applications des nouvelles conditions dans la préparation des spirooxindoles.

Après avoir déterminé les conditions optimales de la réaction, un mélange de solvant EtOH/H₂O (5 ml, 1:1), à 80 °C et 10 mol% de BF₃.OEt₂, nous avons procédé à leurs applications pour préparer quelques spirooxindoles par variation des trois bibliothèques de réactifs.



Les différents spirooxindoles obtenus sont réunis dans le tableau I.4 suivant:

Tableau I.4: Synthèse des spirooxindoles catalysée par BF₃.OEt₂.

Entrée	R ¹	Z	Cétone	Produit	Temps* (h)	Rdt (%)	Pf(°C)
							Trouvé rapporté ^{réf}
1	H	CN	3'a	5a	2.0	95	> 300305-307 ³²
2	7-Cl	CN	3'a	5b	0.5	82	296-298291-293 ³³
3	5-Cl	CN	3'a	5c	1.0	64	290-292293-295 ³³
4	H	CN	3'b	5d	15	67	> 300312-313 ³²
5	H	CO ₂ Et	3'a	5e	3.0	72	284-286279-281 ³³
6	H	CO ₂ Et	3'b	5f	6.0	62	268-270 262-264 ³⁴
7	5-Cl	CO ₂ Et	3'a	5g	2.0	72	295-298292-293 ³³
8	5-Cl	CO ₂ Et	3'b	5h	12	70	280-282271-273 ³⁴
9	5-Cl	CN	3'b	5i	1.0	89	> 300293-294 ³⁵

*La réaction est suivie par CCM

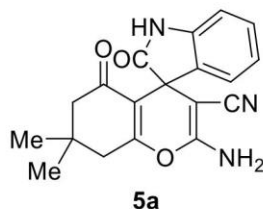
L'étude du tableau ci-dessus montre que l'utilisation de la dimédone donne de meilleurs rendements et des temps plus courts en général par rapport à l'utilisation du cyclohexandione ceci s'explique par l'acidité de deux substrats (dimédone: pK_a = 5.23 sous sa forme énol pure/ cyclohexandione: pK_a = 5.26).

I.2.3. Étude spectrale

Tous les composés préparés présentent en spectroscopie IR des fortes absorptions à 3359, 3155, 2256 et 1733 cm^{-1} correspondantes respectivement à la présence des fonctions NH, NH_2 , CN et CO.

Les résultats spectroscopiques, en résonance magnétique nucléaire (RMN du proton et du carbone-13) sont en accord avec les structures proposées. En effet, l'analyse spectrale en RMN ^1H du composé **5a**, par exemple, montre deux signaux caractéristiques à:

- 10.35 ppm sous forme d'un singulet d'intégration 1H attribué au proton N-H (s, 1H);
- 7.00 ppm sous forme d'un singulet d'intégration 2H attribué au protons NH_2 .



I.2.4. Mécanisme réactionnel proposé.

Le mécanisme proposé pour la synthèse de spirooxindoles représente une réaction en cascade dans laquelle l'isatine se condense en premier lieu avec le malononitrile (ou le malonate d'éthyle) pour donner l'intermédiaire (**I**) via une condensation type Knoevenagel. Puis, cet intermédiaire est attaqué via une addition de Michael par le composé 1,3-dicarbonylé, sous sa forme énol, pour donner un deuxième intermédiaire (**II**). Une cycloaddition et un réarrangement donne le produit désiré (Schéma I.10).

Chapitre I: Nouvelles voies catalytiques de synthèse des 2,4,5-triphénylimidazoles et spirooxindoles via des réactions multicomposants

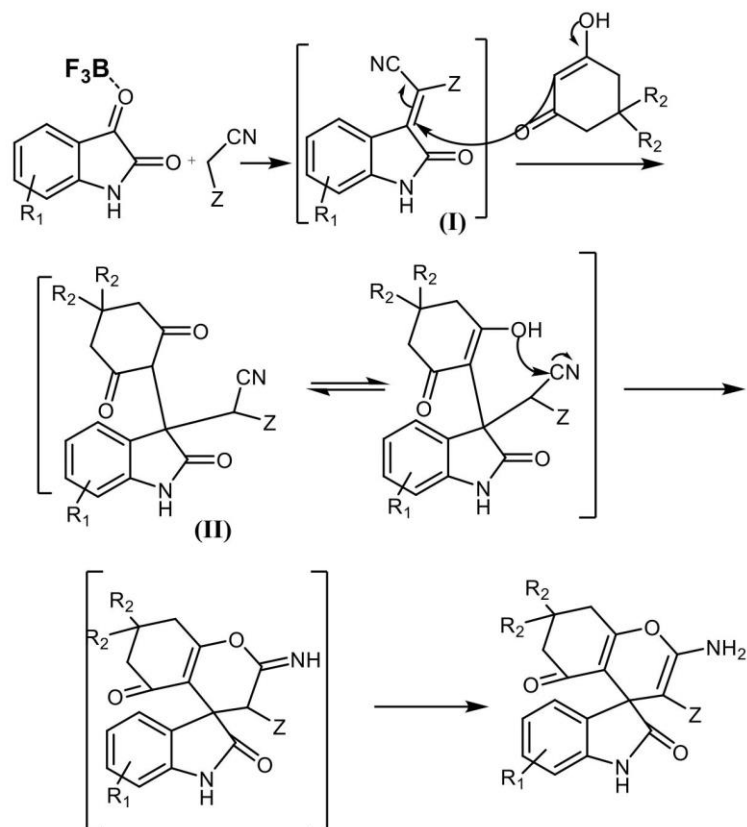


Schéma I.10: Mécanisme réactionnel proposé.

I.3. Conclusion

En conclusion, nous avons pu développer des méthodes efficaces pour la synthèse des triphénylimidazoles et spirooxindoles différemment substitués selon des méthodes monotopes catalysées respectivement par l'acide citrique et du trifluorure de bore éthérate en utilisant le chauffage classique. Ces protocoles présentent plusieurs avantages remarquables, tels que la simplicité de la manipulation et la rentabilité. L'utilisation de ces deux catalyseurs sous des conditions réactionnelles douces a engendré l'importance d'introduire nos méthodes aux travaux existants dans le domaine de la synthèse des triphénylimidazoles et des spirooxindoles.

Ces deux parties ont fait l'objet de deux publications.

Partie expérimentale I

Chapitre I :Partie Expérimentale

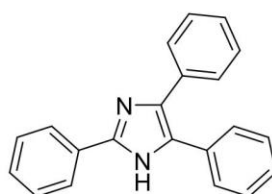
I.4. Partie expérimentale I

I.4.1.Triphénylimidazoles.

Procédure générale pour la préparation des triphénylimidazoles:

Un mélange d'aldéhyde (10 mmol), de benzile (10 mmol), 2 équivalents d'acétate d'ammonium (20 mmol) et de l'acide citrique (15 mol%) est agité à reflux d'éthanol (5 ml) pendant un temps approprié (l'évolution de la réaction est suivie par CCM). Ensuite, le mélange réactionnel est versé sur de la glace pillée sous agitation magnétique pendant quelques minutes afin de faire précipiter le produit. Le solide formé est filtré, lavé à l'eau et purifié par recristallisation dans un mélange acétone/eau (9:1).

2, 4, 5 -Triphényl-1H-imidazole (4a).



Aspect: Solide blanc

Rendement: 92%

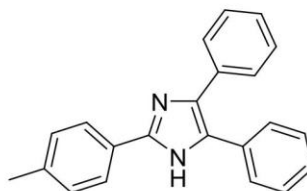
Point de fusion: 273-275 °C

IR (KBr): $\nu = 3429.2$ (N-H), 3043.5 (CH arom.), 1600 (C=C), 1492.8 (C=N) cm^{-1} .

^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$): δ 7.22-7.60 (m, 13H), 8.10 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 12.70 (s, 1H) ppm

^{13}C NMR ($\text{DMSO-d}_6/\text{CDCl}_3$): δ 125.3, 126.7, 127.2, 127.9, 128.4, 128.6, 128.8, 130.4, 131.2, 135.2, 137.2, 145.7 ppm.

2-(4-Méthyl-phényl)-4, 5-diphényl-1H-imidazole(4b).



Aspect: Solide blanc

Rendement: 82%

Point de fusion : 229-232 °C

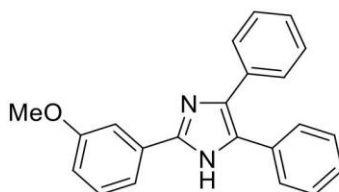
IR (KBr): $\nu = 3417.6$ (N-H), 3039.6 (CHarom.), 1604.7 (C=C), 1490.8 (C=N) cm^{-1}

Chapitre I :Partie Expérimentale

¹H NMR (CDCl₃/ DMSO-d₆): δ 2.30 (s, 3H), 7.49-7.93 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz), 7.18-7.30 (m, 12H), 12.40 (s, 1H) ppm.

¹³C NMR (CDCl₃/ DMSO-d₆): δ 20.9, 125.1, 127.1, 127.6, 127.8, 128.2, 128.9, 137.4, 145.7 ppm.

2-(3-Méthoxy-phényl)-4, 5-diphényl-1H-imidazole (4c).



Aspect: Solide blanc

Rendement: 80%

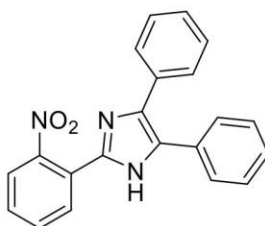
Point de fusion: 258 °C;

IR (KBr):ν = 3290.3 (NH), 2966.3 (C-H arom), 1631.7 (C=N), 1542.1 (C=C), 1028 (C-O) cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃/ DMSO-d₆): δ 3.80 (s, 3H), 6.85 (dd, 1H, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.7 Hz), 6.29-7.72 (m, 13H), 12.50 (s, 1H) ppm.

¹³C NMR (CDCl₃/ DMSO-d₆): δ 54.9, 110.1, 113.9, 117.5, 119.7, 127.9, 129.2, 131.5, 145.5, 159.3 ppm.

2-(2-Nitro-phényl)-4,5-diphényl-1H-imidazole (4d).



Aspect: Solide marron,

Rendement: 65%

Point de fusion: 227-229 °C

IR (KBr):ν = 3421 (NH), 2928 (C-H arom), 1596 (C=N), 1515 (NO₂), 1345 (NO₂) cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃/ DMSO-d₆): δ 7.25-8.01 (m, 14H), 12.98 (s, 1H) ppm.

¹³C NMR (CDCl₃/ DMSO-d₆): δ: 123.9, 124.5, 127.2, 127.5, 128.5, 128.7, 129.1, 129.2, 130.0, 130.3, 131.0, 132.6, 135.2, 138.0, 141.4, 148.8 ppm.

2-(2-éMthyl-phényl)-4,5-diphényl-1H-imidazole (4e)



Aspect: Solide blanc

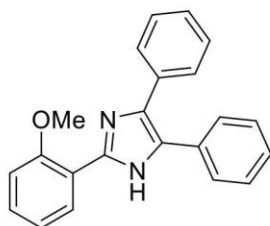
Rendement: 75%

Point de fusion: 208-210 °C

IR (KBr): $\nu = 3433.1$ (NH), 3028.0 (C-Harom), 1596.9 (C=N) cm^{-1} .

^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$): δ 2.70 (s, 3H), 7.15-7.71 (m, 14H), 12.35 (s, 1H) ppm.

2-(2-Méthoxy-phényl)-4,5-diphényl-1H-imidazole (4f)



Aspect: Solide blanc

Rendement: 81%

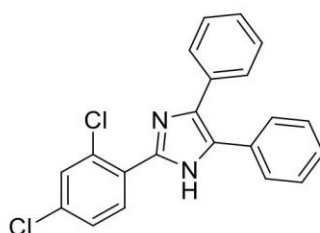
Point de fusion: 210-212 C;

IR (KBr): $\nu = 3433.1$ (N-H), 3070.5 (C-Harom), 2356.9 , 1598.1 (C=C), 1463.6 (C=N), 1030 (C-O) cm^{-1} .

^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$): δ 3.90 (s, 3H), 7.05-8.09 (m, 14H), 11.90 (s, 1H) ppm.

^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$): δ 55.3, 111.1, 118.2, 120.4, 126.8, 127.7, 128.0, 128.6, 129.5, 132.8, 155.8 ppm.

2-(2, 4-Dichloro-phényl)-4,5-diphényl-1H-imidazol (4g)



Aspect: Solide blanc

Chapitre I :Partie Expérimentale

Rendement: 70%

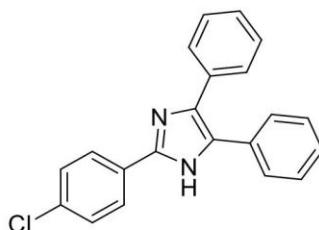
Point de fusion: 174-175 °C;

IR (KBr): $\nu = 3433.1$ (N-H), 3062.7 (C-H arom), 1679 (C=C), 1598.9 (C=N) cm^{-1} .

^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$): δ 7.21-7.56 (m, 12H), 7.82 (dd, 1H, $J^1 = 8.3$ Hz, $J^2 = 1.7$ Hz), 12.60 (s, 1H) ppm.

^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$): δ 119.2, 126.4, 127.0, 127.1, 127.5, 127.9, 128.1, 128.3, 128.7, 129.5, 132.2, 132.4, 133.9, 137.1, 142.3 ppm.

2-(4-Chloro-phényl)-4,5-diphényl-1H-imidazole (4h).



Aspect: Solide blanc

Rendement: 78%

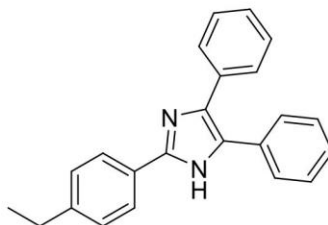
Point de fusion: 263-264 °C

IR (KBr): $\nu = 3294.2$ (N-H), 2846.7 (C-H arom), 1635.5 (C=C), 1368.4 (C=N) cm^{-1}

^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$): δ 7.20-7.55 (m, 12H), 8.10 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 12.80 (s, 1H) ppm.

^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$): δ 125.4, 126.9, 127.2, 128.0, 128.3, 128.5, 128.8, 128.9, 129.0, 129.2, 130.9, 132.9, 137.4, 144.5 ppm.

2-(4-Ethyl-phényl)-4,5-diphényl-1H-imidazole (4i).



Aspect: Solide blanc

Rendement: 86%

Point de fusion: 242-244°C;

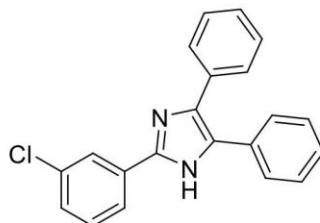
IR (KBr): $\nu = 3500$ (N-H), 2966.3 (C-H arom), 2356.9 , 1635.5 (C=C), 1468.2 (C=N) cm^{-1} .

^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$): δ 1.20 (t, 3H, $J = 7.6$ Hz), 2.65 (q, 2H, $J = 7.5$ Hz) 7.20-7.60 (m, 12H), 8.02 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz), 12.60 (s, 1H) ppm.

Chapitre I :Partie Expérimentale

^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$): δ 15.5,28.1, 119.7, 125.4, 126.6, 127.2, 127.8, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.5, 128.8, 131.2, 135.3, 137.0, 144.1, 145.8 ppm.

2-(3-Chloro-phényl)-4, 5-diphényl-1H-imidazole (4j).



Aspect: Solide blanc

Rendement: 75%

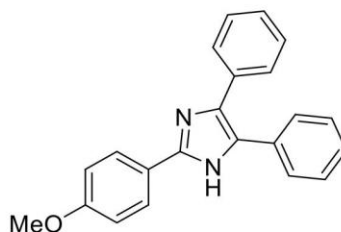
Point de fusion: 280 °C;

IR (KBr): $\nu = 3440.8$ (N-H), 3062.7 (C-H arom), 1589.2 (C=C) cm^{-1} .

^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$): δ 7.32-7.55 (m, 12H), 8.07 (d, 1H, $J = 6.9$ Hz), 8.18 (s, 1H), 12.85 (s, 1H) ppm.

^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO d}_6$): δ 126.6, 126.8, 127.1, 127.9, 128.2, 128.4, 128.6, 128.7, 128.8, 129.2, 130.9, 132.7, 135.0, 137.3, 144.4 ppm.

2-(4-Méthoxy-phényl)-4,5-diphényl-1H-imidazole(4k).



Aspect: Solide blanc

Rendement: 90%

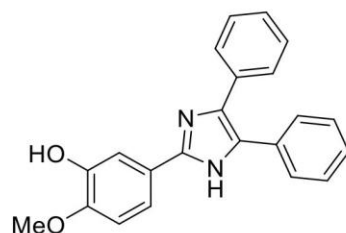
Point de fusion: 238-240 °C

IR (KBr): $\nu = 3421.5$ (N-H), 3024.2 (C-H arom), 2299.0, 1608.9 (C=C), 1149.8 (C-O) cm^{-1} .

^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$): δ 3.90 (s, 3H), 7.00-8.05 (m, 14H), 12.50 (s, 1H) ppm.

^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$): δ 56.1, 114.3, 123.1, 126.3, 126.6, 128.0, 128.3, 134.2, 146.0, 158.9 ppm.

2-(3-Hydroxyl-4-méthoxy-phényl)-4,5-diphényl-1H-imidazole (4l).



Aspect: Solide blanc

Rendement: 64%

Point de fusion: 192-194 °C

IR (KBr): $\nu = 3417.6$ (N-H), 3062.7 (C-H arom), 1604.7 (C=C), 1257.5 (C-O) cm^{-1} .

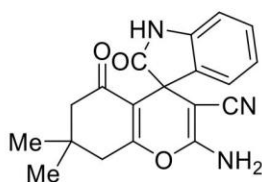
^1H NMR (CDCl_3 / DMSO-d_6) δ : 3.80 (s, 3H) 7.02 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.19-7.58 (m, 12H), 9.20 (s, 1H), 12.45 (s, 1H) ppm.

I.4.2. Spirooxindoles :

Procédure générale pour la préparation des spirooxindoles:

Un mélange d'isatine (1.0 mmol), malononitrile ou cyanoacétate d'éthyle (1.0 mmol), 1,3 dicétone (1.0 mmol) et de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (10 mol%) dans 10 ml d'éthanol /eau (5:5) est agité à reflux pendant un temps approprié (déterminé par CCM). Le mélange réactionnel est ensuite versé sur la glace pillée sous agitation magnétique pendant quelques minutes afin de faire précipiter le produit. Le solide formé est filtré, lavé à l'eau et purifié par recristallisation dans l'éthanol (si nécessaire).

2-Amino-7,7-diméthyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tétrahydrospiro [chromène-4,3'-indoline]-3-carbonitrile (5a):



Aspect: Solide blanc

Rendement: 95%

Point de fusion: 300°C

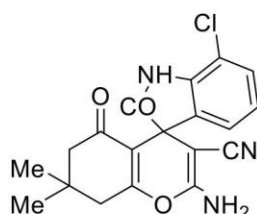
FT-IR ν_{max} (KBr): 3359 (NH), 3155 (NH₂), 2256 (CN), 1733 (CO) cm^{-1} .

Chapitre I :Partie Expérimentale

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6 et CDCl_3): δ 1.00 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 2.05 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 2.17 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 2.50 (s, 2H), 6.79 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.93 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 7.11 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.00 (s, 2H), 10.35 (s, 1H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6 - CDCl_3): δ 25.7 , 26.5 , 30.4 , 48.7 , 56.2 , 107.8 , 118.4 , 120.0, 121.4, 126.5, 132.8, 140.5, 157.3, 162.4 , 176.7 , 193.1 ppm.

2-Amino-7-chloro-7,7-diméthyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tétrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile (5b).



Aspect: Solide blanc

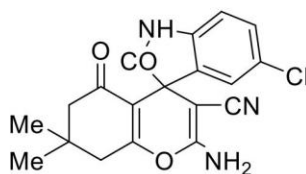
Rendement: 82%

Point de fusion: 296-298°C

FT-IR ν_{max} (KBr): 3309 (NH), 3139 (NH_2), 2252 (CN), 1720 (CO) cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6 et CDCl_3): δ 1.00 (s, 3H, CH_3), 1.09 (s, 3H, CH_3), 2.05 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz), 2.18 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz), 2.40-2.52 (m, 2H), 6.66 (s, 2H), 6.81-7.12 (m, 3H), 10.60 (s, 1H) ppm.

2-Amino-5-chloro-7,7-diméthyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tétrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile (5c).



Aspect: Solide blanc

Rendement: 64%;

Point de fusion: 290-292°C

FT-IR ν_{max} (KBr): 3371 (NH), 3155.3 (NH_2), 2191 (CN), 1724 (CO) cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6 et CDCl_3): δ 1.00 (s, 3H) 1.01 (s, 3H), 2.10 (s, 2H), 2.40-2.6.0 (m, 2H), 6.78 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 7.00 (s, 2H, NH_2), 7.10 (dd, $J^1 = 1.3$, $J^2 = 8.0$ Hz), 10.50 (s, 1H) ppm.

2-Amino-2',5-dioxo-5,6,7,8-tétrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile (5d).



Aspect: Solide blanc

Rendement: 67%

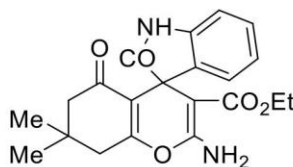
Point de fusion: 300°C

FT-IR v_{max} (KBr): 3382 (NH), 33217 (NH₂), 1724 (CO)cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆ et CDCl₃): δ 1.90 (m, 2H), 2.22 (m, 2H), 2.65 (m, 2H), 6.80 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.89 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.15 (td, *J*¹ = 1.3, *J*² = 7.5 Hz, 1H), 7.23 (s, 2H, NH₂), 10.40 (s, 1H) ppm.

¹³C NMR (250 MHz, DMSO-d₆-CDCl₃): δ 19.9, 26.9, 36.5, 47.0, 57.6, 109.3, 112.0, 117.5, 121.8, 123.3, 128.3, 134.7, 142.1, 158.8, 166.2, 178.3, 195.2 ppm.

Ethyl-2-amino-7,7-diméthyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tétrahydrospiro [chromene-4,3'-indoline]-3-carboxylate (5e).



Aspect: Solide blanc

Rendement: 72%

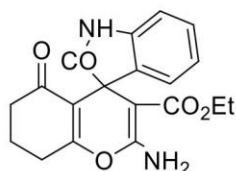
Point de fusion: 284-286°C

FT-IR v_{max} (KBr): 3367 (NH), 3178 (NH₂), 1681(CO) cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆ et CDCl₃): δ 0.81 (t, 3H), 0.95 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 2.10 (d, *J* = 15.3, 1H), 2.17 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 2.52 (m, 2H), 3.7 (m, 2H), 6.68 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.70-6.89 (m, 2H), 7.05 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.88 (s, 2H), 10.25 (s, 1H) ppm.

¹³C NMR (250 MHz, DMSO-d₆-CDCl₃): δ 13.2, 26.8, 27.9, 31.7, 46.7, 50.8, 59.0, 76.4, 108.3, 113.2, 120.7, 122.4, 127.34, 144.1, 159.2, 162.6, 167.8, 180. 194.9 ppm.

Ethyl-2-amino-2',5-dioxo-5,6,7,8-tétrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carboxylate (5f).



Aspect: Solide marron;

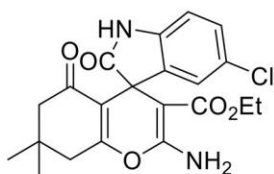
Rendement: 62% ;

Point de fusion: 268-270°C

FT-IR v_{max} (KBr): 3359 (NH), 3155 (NH₂), 1720 (CO cm⁻¹).

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆ et CDCl₃): δ 0.9 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.90 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.20 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.52 (m, 2H), 3.70 (m, 2H), 6.67 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.00 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.65 (s, 2H), 10.05 (s, 1H) ppm.

Ethyl-2-amino-5'-chloro-7,7-diméthyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tétrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carboxylate (5g).



Aspect: Solide blanc

Rendement: 72%;

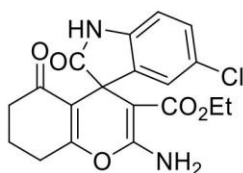
Point de fusion: 295-29 °C

FT-IR v_{max} (KBr): 3359 (NH), 3182 (NH₂), 1701 (CO)cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆ et CDCl₃): δ 0.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.00 (s, 3H, CH₃), 1.01 (s, 3H, CH₃), 2.10 (m, 2H), 2.50 (m, 2H), 3.80 (m, 2H), 6.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 7.00 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.66 (s, 2H), 10.20 (s, 1H) ppm.

¹³C NMR (250 MHz, DMSO-d₆-CDCl₃): δ 14.0, 27.9, 28.3, 32.4, 40.3, 51.4, 59.8, 110.2, 113.3, 123.2, 125.2, 127.8, 139.0, 144.0, 160.0, 163.7, 168.3, 180.4, 195.7 ppm.

Ethyl-2-amino-5-chloro-2',5-dioxo-5,6,7,8-tétrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carboxylate (5h).



Chapitre I :Partie Expérimentale

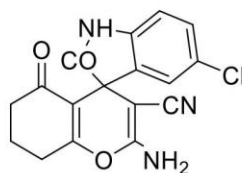
Aspect: Solide blanc

Rendement: 70%;

Point de fusion: 280-282°C

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆ et CDCl₃): δ 0.80 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.90 (m, 2H), 2.20 (m, 2H, CH₂), 2.60 (m, 2H), 3.70 (m, 2H), 6.67 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.70 (s, 2H), 10.20 (s, 1H) ppm.

2-Amino-5-chloro-2',5-dioxo-5,6,7,8-tétrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile (5i).



Aspect: Solide blanc

Rendement: 89%

Point de fusion: 300°C

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆ et CDCl₃): δ 1.95 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.25 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.70 (m, 2H), 6.82 (dd, *J*¹ = 2.4, *J*² = 8.2 Hz, 1H), 7.02 (m, 1H), 7.12 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.16 (s, 2H), 10.55 (s, 1H) ppm.

Chapitre II

Synthèse des iminobenzimidazoles et dérivés de la Fluorizoline à visée anticancéreuse

II.1. Les inhibiteurs de la traduction cap dépendante.

La traduction est le processus par lequel une protéine est synthétisée par un ribosome à partir de l'information contenue dans un ARNm. C'est un processus qui se décompose en trois différentes phases: l'initiation, l'élongation et la terminaison de la traduction.

L'initiation de la traduction chez les eucaryotes débute par l'interaction entre eIF4F et la «coiffe» 7-méthylguanosine (m7G) (Figure II.1), située à l'extrémité 5' de tous les ARNm, qui est essentielle pour recruter directement la sous-unité ribosomale 40S aux ARNm par un ensemble d'interactions protéine-protéine et pour dérouler les structures secondaires d'ARN situées dans la région non traduite 5' (5' UTR) des ARNm. Le complexe eIF4F comprend la protéine de liaison à la coiffe eIF4E, l'hélicase eIF4A et la protéine d'échafaudage eIF4G. EIF4A utilise l'hydrolyse de l'ATP pour dérouler la structure secondaire des ARN (Figure II.2).

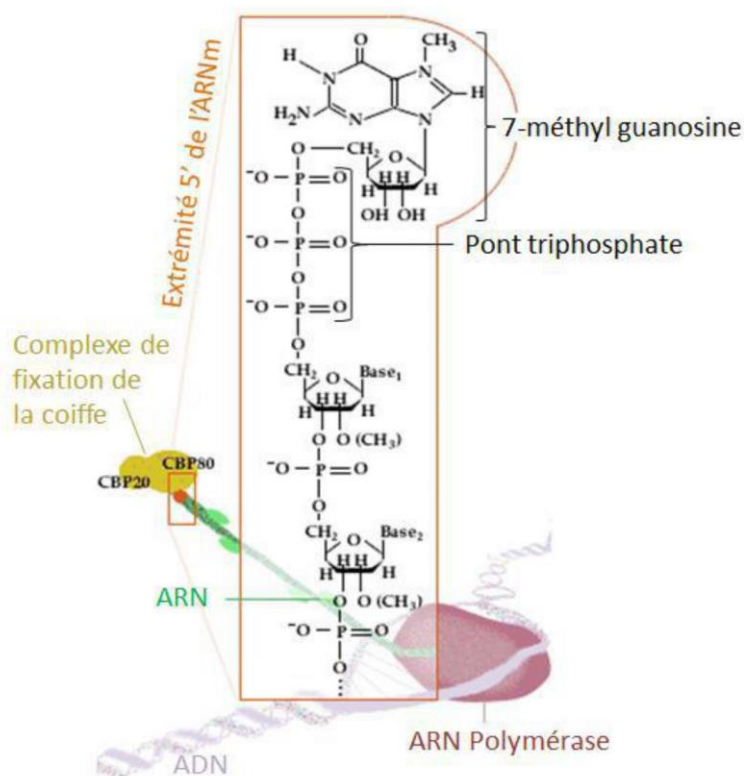


Figure II.1: Représentation de la structure chimique de la coiffe 7-méthyl guanosine triphosphate (7mGTP) des ARNm. Sur cette illustration, sont représentés l'ADN en cours de transcription dans le noyau, par l'ARN polymérase, ainsi que l'ARNm transcrit. L'extrémité 5' de cet ARNm, ici agrandie dans le rectangle orange, est reconnue par le complexe de fixation de la coiffe (CBP) grâce à sa coiffe 7mGTP. La 7- méthyl guanosine est reliée à l'ARN par un pont triphosphate. La méthylation en N7 de la guanosine confère une charge positive à la coiffe. (D'après le site officiel du prix Nobel www.nobelprize.org).

Chapitre II : Synthèse des iminobenzimidazoles et dérivés de la Fluorizoline à visée anticancéreuse

médicament dans le traitement de l'hépatite C chronique. La séquestration d'eIF4E par la Ribavirine dont la structure mime celle du motif 7mG⁴³ a pour effet de relocaliser eIF4E du noyau vers le cytoplasme, ce qui se traduit par une réponse clinique chez des patients atteints de leucémie myéloïde.⁴⁴

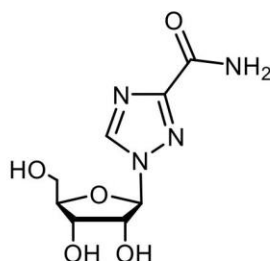


Figure II.3: Structure de la Ribavirine.

Deuxième stratégie: Empêcher l'interaction eIF4E-eIF4G

Dans la plupart des cancers, l'interaction eIF4E-eIF4G est suractivée en amont au niveau de la voie PI3K / Akt / mTOR, qui augmente la phosphorylation de 4E-BP1. Des inhibiteurs de la phosphorylation de 4E-BP1 ralentissent à la fois la croissance des tumeurs *in vivo* dans un modèle murin. C'est ainsi que l'équipe de Wagner et *coll.* a identifié un peptide synthétique (eIF4GI-1 ou 4EGi-1) inhibant l'association eIF4E / eIF4G. Ce peptide a permis d'empêcher la traduction cap-dépendante, de bloquer l'association entre eIF4E et 4E-BP1 et de diminuer les taux protéiques de c-MYC et de Bcl-xL, et ceci en montrant un effet préférentiel sur les cellules transformées, y compris celles de lymphome et de cancer pulmonaire.⁴⁵ Toujours est-il que le 4EGi-1 a une toxicité indépendante de ses effets sur la traduction cap-dépendante⁴⁶ et ce manque de spécificité reste limitant. Récemment, Cencic et *coll.* ont aussi identifié des inhibiteurs de l'interaction eIF4E-eIF4G par criblage, dont les plus puissants étaient les composés 4E1RCat et 4E2RCat.⁴⁷

Le 4E1RCat bloque spécifiquement la traduction cap-dépendante, et est pharmacologiquement actif *in vitro* et *in vivo*. Dans un modèle de lymphome Em-myc chez la souris, le 4E1RCat a amélioré la réponse à la chimiothérapie et a ainsi allongé la survie sans tumeur. Cette capacité de combinaison était probablement liée à la propension du 4E1RCat à diminuer les taux de Mcl-1, une incidence commune à d'autres inhibiteurs de la traduction *in vivo*.

Troisième stratégie: Diminuer la production d'eIF4E

Cette stratégie a pour objectif de diminuer les quantités disponibles d'eIF4E dans la cellule en bloquant sa synthèse, par le biais d'oligonucléotides anti-sens (ASO) spécifiques.

Les premiers ASO testés étaient très sensibles aux nucléases, ce qui limitait fortement leur biodisponibilité. Fort heureusement, les ASO de seconde génération dans lesquels ont été rajoutés des groupements phosphates, sont plus résistants aux nucléases et subséquemment plus stables dans les tissus. Un ASO spécifique d'eIF4E, « 4EASO4 », a réduit efficacement l'expression d'eIF4E (de plus de 80), et a permis de bloquer la croissance des xénogreffes de cancer prostatique et mammaire dans des souris nuds.⁴⁸ La réduction de l'expression d'eIF4E paraissait ne pas avoir d'effet sur les tissus normaux, suggérant que les tissus cancéreux sont plus sensibles à l'inhibition d'eIF4E que les tissus normaux. Les résultats du premier essai clinique de phase 1 à la fin 2011 ciblant eIF4E par l'intermédiaire d'un ASO (LY2275796 ou eIF4ERx) ont été publiés fin 2011.⁴⁹ Le traitement consistait en une première injection intraveineuse du LY2275796, 3 jours consécutifs, puis une injection hebdomadaire, en escalade de dose. La réduction effective des quantités d'eIF4E dans les biopsies tumorales des patients a pu être visualisée par immunohistochimie. Parmi les 30 patients atteints de cancer stade IV traités, sept ont eu une stabilisation de leur maladie de plus de 6 semaines. Parmi eux, deux patients ont vu leur maladie stabilisée plus de 3 mois, dont un patient atteint de mélanome. La tolérance clinique était relativement bonne. Le LY2275796 a donc été testé en essai thérapeutique de phase 2, mais les résultats de cette étude ont été décevants.⁵⁰

L'eIF4E est une deuxième cible:

L'eIF4E est surexprimé dans 30% des cancers. Des souris mutantes haploïdes pour eIF4E ont un phénotype normal, et résistent mieux à la formation de tumeurs. Un antiviral, la Ribavirine, se lie sur du 5' 7-méthyl guanosine cap sur eIF4E et inhibe la liaison de l'ARNm, induisant ainsi des effets anticancéreux dans plusieurs modèles murins de cancer. La Ribavirine est actuellement en phase I-II chez des patients souffrant d'un cancer du sein métastatique et de leucémie myéloïde aiguë (NCT01056757, NCT01056523). La Ribavirine diminue la TEM et la métastatisation de tumeurs pulmonaires et mammaires.⁵¹

Notre collaborateur Simone Brogi à l'Université de Sienne a construit un modèle tridimensionnel d'eIF4E. Il a ensuite fait un criblage virtuel de 3.4 millions de composés et identifié 33 ligands putatifs du site de liaison au 5' 7-méthylguanosine cap sur eIF4E. Ces composés ont été achetés et testés. Malheureusement aucun d'eux n'a montré d'effet inhibiteur significatif de la traduction cap-dépendante. En revanche, le composé chembridge 5657657 a montré un effet cytotoxique sur des cellules de mélanome A375.

Quatrième stratégie: Bloquer l'activité d'eIF4A

Le facteur d'initiation de la traduction eIF4A est une hélicase à ARN dépendante d'ATP. EIF4A se fixe à eIF4G et à l'ARNm où elle exerce alors son activité d'hélicase sur le 5'UTR permettant ainsi de dérouler l'ARN en défaisant toute éventuelle structure secondaire. Cela permet alors de favoriser la fixation de la 40S au facteur eIF3 et cela permet le scannage ultérieur du 5'UTR jusqu'au site d'initiation de la traduction au codon AUG.⁵²

Plusieurs composés d'origine naturelle sont puissants inhibiteurs d'eIF4A. Parmi eux, on distingue les Flavaglines, extraites d'arbres asiatiques, la Patéamine A, extraite d'une éponge marine, et l'Hippuristanol, extrait d'un corail de l'océan Pacifique (Figure II.4).

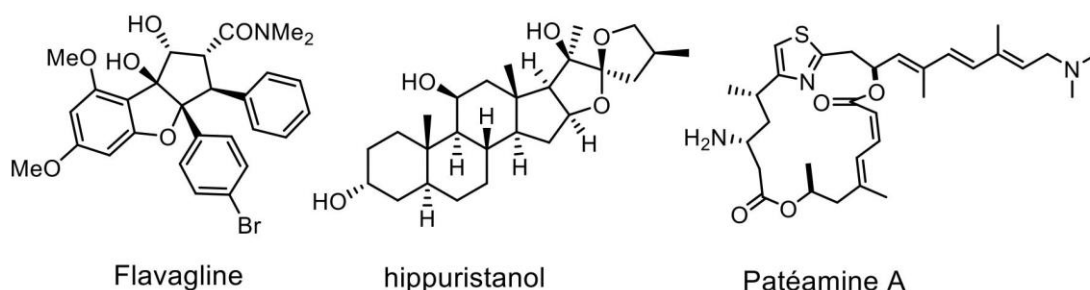


Figure II.4: Exemples d'inhibiteurs d'eIF4A.

Les dérivés du 2-iminoimidazole sont connus pour leurs activités antiprolifératives par mécanismes inconnus ou en inhibant la synthèse protéique, comme avec la Girolline⁵³ (Figure II.5).

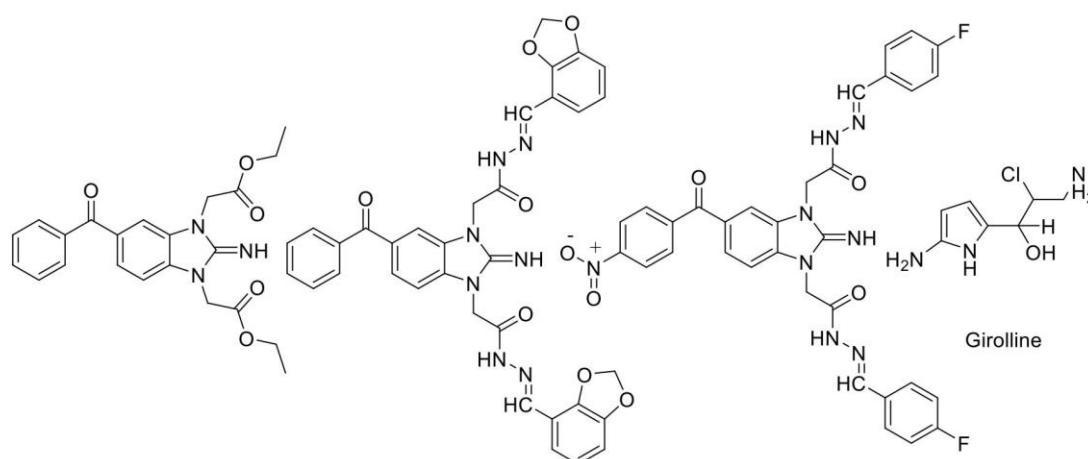


Figure II.5: Exemple d'iminoimidazoles cytotoxiques.

Les 3 premiers ont des composés de synthèse qui agissent par un mécanisme inconnu.^{53a} Le dernier, la girolline, est un produit naturel qui inhibe la synthèse protéique.^{53b}

Dans notre quête pour identifier les inhibiteurs de la traduction eucaryote (eIF4F), nous avons effectué un criblage virtuel et nous avons identifié l'imino-benzimidazole 1 (ChemBridge 5657657) comme inhibiteur putatif de eIF4F. Malheureusement, lorsque nous avons examiné la possibilité d'inhiber eIF4F en utilisant une construction de rapporteur bicistronique de luciférase, nous n'avons trouvé aucune activité significative. Cependant nous avons découvert par hasard un nouvel agent cytotoxique. Même si ce composé n'a pas inhibé la traduction, nous avons exploré les exigences structurales de son cytotoxicité en raison de son originalité structurale.

II.1.1. Synthèse des iminobenzimidazoles

Notre stratégie de synthèse des iminobenzimidazoles est illustrée dans le schéma suivant (Schéma II.1). L'époxyde (**3**) réagit avec l'aminobenzimidazole (**2**) pour donner le produit (**4**) avec 63% de rendement. Ce dernier a été alkylé avec différents halogénures pour obtenir les produits (**9**) avec des rendements compris entre 36 et 88%. Une condensation entre (**4**) et (**5**) a permis d'obtenir le produit (**6**) avec 55% de rendement. Le produit (**4**) a été acylé par (**7**) pour former l'adduit (**8**) avec un rendement de 39% (Schéma II.1).

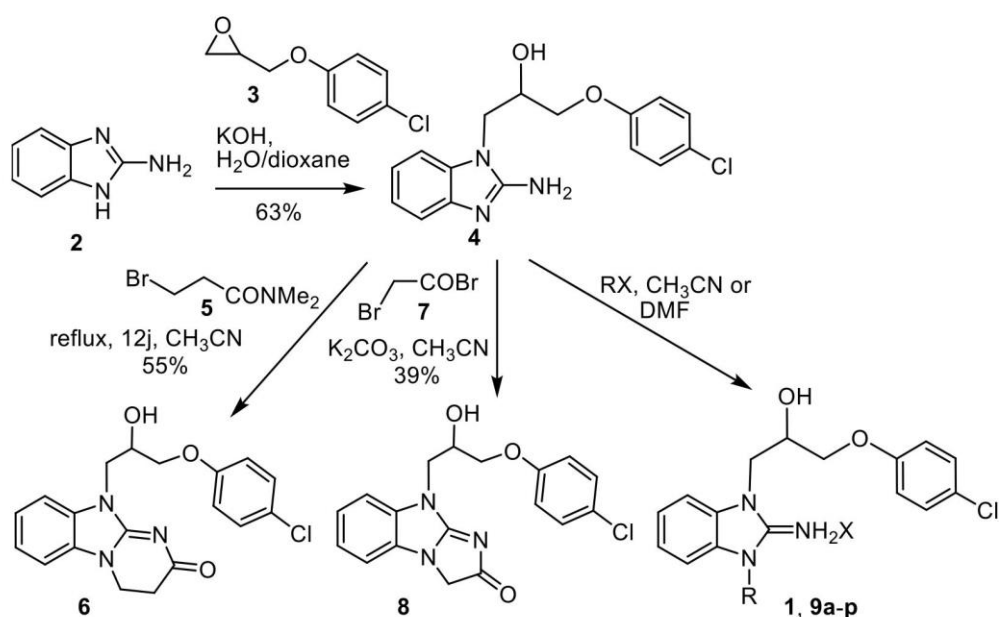


Schéma II.1: Synthèse des analogues (**6**), (**8**) et (**9a-p**).

L'aza-isostère (**14**) a été préparé en 4 étapes à partir de la 2-chloro-3-nitropyridine (**10**). La substitution du chlore par de la méthylamine, suivie d'une réduction du groupe nitro et de la fermeture du cycle avec du bromure de cyanogène a donné l'aza-benzimidazole (**13**) qui a été alkylé par l'époxyde (**3**) pour donner le produit désiré (**14**) (Schéma II.2).

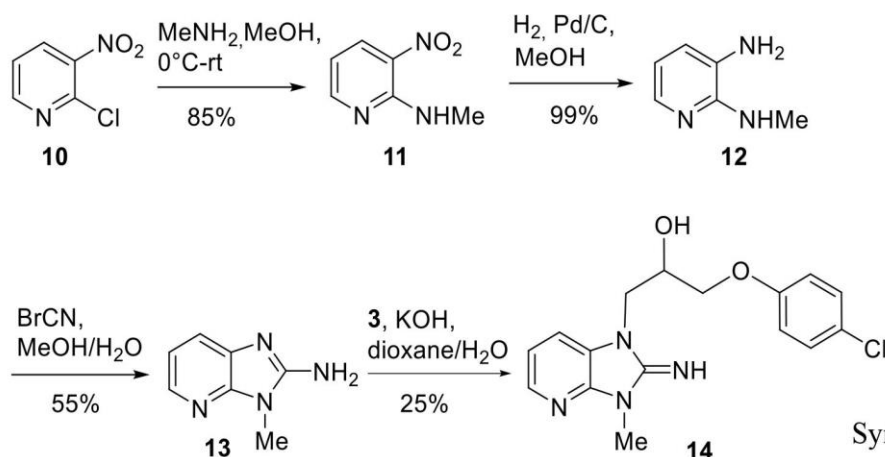


Schéma II.2:

l'aza-isostère (14).

Synthèse de

II.1.2. Etude pharmacologique des iminobenzimidazoles préparés

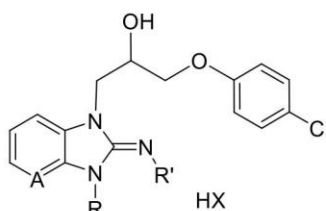


Tableau II.1 : Cytotoxicité à 10⁻⁵ et 10⁻⁶M dans les cellules KB après 72h de traitement.

Produit	R	R'	A	HX	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M
1	Me	H	CH	-	0±17	0±2
4	H	H	CH	HCl	0±9	0±3
6			CH	-	0±3	0±2
8			CH	-	0±6	0±7
9a		H	CH	HCl	0±12	0±15
9b		H	CH	HCl	0±2	0±9
9c		H	CH	-	1±11	0±13
14	Me	H	N	-	0±7	0±4
9d		H	CH	HBr	88±5	0±17
9e		H	CH	HBr	96±2	8±8
9f		H	CH	HBr	98±1	57±5


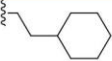
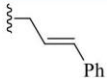
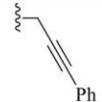
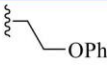
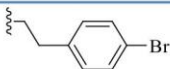
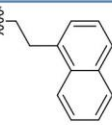
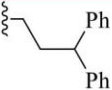
De façon surprenante, ni le composé (1) ni son analogue (4) n'étaient cytotoxiques pour les cellules KB à 10 uM (Tableau II.1). L'inclusion de la fonction

Chapitre II : Synthèse des iminobenzimidazoles et dérivés de la Fluorizoline à visée anticancéreuse

amidine dans un cycle supplémentaire (**6, 8**) ou l'introduction de fonctions polaires (**9a-c**) n'a pas favorisé la cytotoxicité. L'introduction d'un azote dans le fragment benzimidazole (**14**) était également inefficace, mais le remplacement du méthyle par un allyle (**9d**) ou le benzyle (**9e**) a rendu ces composés extrêmement cytotoxiques. De manière intéressante, l'augmentation de la taille du groupement espaceur entre l'imino-benzimidazolium et le phényle de une à trois méthylènes (**9f**) a augmenté la cytotoxicité.

Avec l'identification des composés cytotoxiques, nous avons poursuivi notre étude en déterminant l'IC₅₀ des composés nouvellement synthétisés dans 3 lignées de cellules cancéreuses humaines (Tableau II.2). Le remplacement du phényle par un cyclohexyle (**9g**), l'introduction d'insaturations ou d'un éther dans le groupement espaceur (**9h-j**) et l'addition d'un brome (**9k**) ou de cycles aromatiques supplémentaires (**9l-m**) n'ont pas significativement modifié la cytotoxicité, qui était très similaire dans les 3 lignées cellulaires examinées. Ces résultats suggèrent que ces composés se lient probablement avec une affinité comparable pour leur cible.

Tableau II.2: Cytotoxicité dans les cellules cancéreuses humaines KB, HL60 et HCT116 (IC₅₀).

produit	R	HX	KB	HL60	HCT116
9f		HBr	2/1.2	1.1/1.0	1.5/1.5
9g		HBr	1.3/1.5	1.25/1.25	1.3/2
9h		HBr	2/1.2	1.25/1.25	2/2
9i		HBr	1.75/0.8	1.75/1.5	1.3/2
9j		HBr	1/0.8	1.75/1.5	1.5/1
9k		HBr	1.25/0.8	2/2	0.7/1.25
9l		HBr	1.25/0.8	1.75/1.75	1.2/0.8
9m		HBr	1.5/0.8	1.75/1.75	0.8/0.8

II.2. La fluorizoline

II.2.1. Découverte et synthèse.

La fluorizoline est un nouvel agent anticancéreux qui cible les PHBs.^{54,55} L'étape clé de synthèse de la fluorizoline et de ses analogues repose sur la trifluorination des thiazoles par du select fluor, développée pour la première fois par Lavilla et ses collègues⁵⁶ (Schéma II.3).

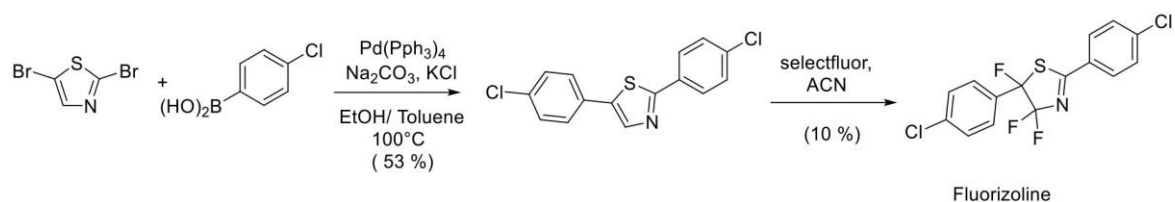


Schéma II.3: Synthèse de la fluorizoline.⁵⁶

II.2.2. Relation structure activité.

Les requis structuraux de ce composé pour son activité cytotoxique demeurent peu décrits. Parmi les sept trifluorothiazolines examinées, cinq présentent une cytotoxicité similaire avec de EC50 de l'ordre du micromolaire et deux composés substitués par des méthyles en ortho ou en para étaient inactifs⁵⁶ (Schéma II.4).

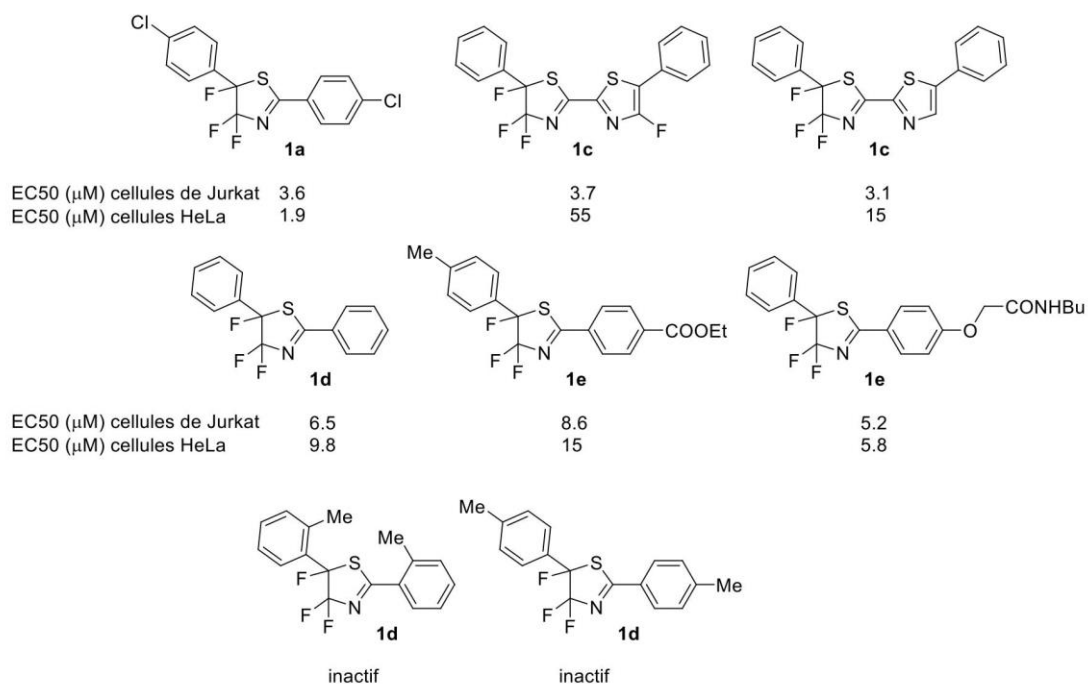


Schéma II.4: Cytotoxicité des trifluorothiazolines sur des cellules de Jurkat ou HeLa après un traitement de 24h.⁵⁶

II.2.3. Propriété pharmacologique.

En collaboration avec les biologistes au sein de l'université de Barcelone, les équipes de chimie organique des Pr. Fernando Albericio et Rodolfo Lavilla ont décrit en 2014 une série de trifluorothiazolines diarylées dont ils ont pu observer la cytotoxicité p53-dépendante sur plusieurs lignées cancéreuses, le plus cytotoxique de ces composés est la fluorizoline.⁵⁷ Par chromatographie d'affinité, ils ont démontré que ces composés se lient aux PHBs. Dans la continuité de ces travaux, toujours à l'Université de Barcelone, l'équipe des Pr. Daniel Iglesias-Serret et Joan Gil a mis en évidence la résistance aux effets cytotoxiques de la fluorizoline dans le cas d'une déplétion partielle en PHBs. Ils ont ainsi démontré que les PHBs sont impliquées dans le mécanisme d'action cytotoxique de la fluorizoline.⁵⁴

L'équipe de Pr. Rajalingam a mis en évidence dans cette étude la surexpression de la PHB1 dans les cancers du poumon non à petites cellules (NSCLCs), elle a corrélé ce phénomène à un pronostic défavorable.⁵⁸ Cette équipe a démontré que la fluorizoline inhibe l'activation de C-RAF induite par l'EGF, mais à la différence des fluorizolines sans affecter la localisation de C-RAF dans la membrane plasmique⁵⁸ (Figure II.6).

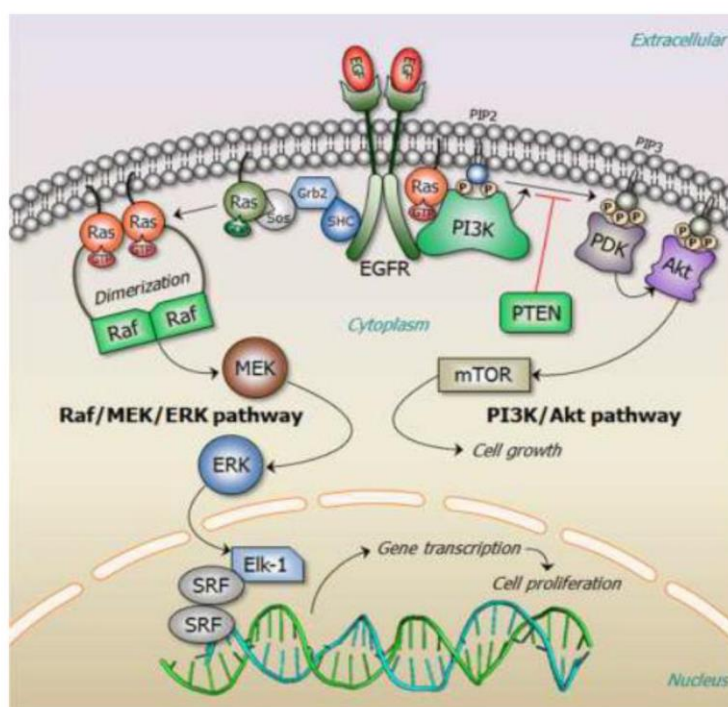


Figure II.6 : L'activation du récepteur à l'EGF induit une cascade d'événements conduisant à un échange du GDP lié à RAS par du GTP et à une activation des voies RAF/MEK/ERK et PI3K/Akt/ mTOR.⁵⁴

II.2.4. Synthèse de la fluorizoline

La synthèse de la fluorizoline et de ses analogues commence par les thiazoles correspondants. Les thiazoles (**2**) sont préparés avec des rendements compris entre 35 et 58% par la méthode de Hantzsch:⁵⁹ condensation de thioamides avec du chloroacétaldéhyde (Schéma II.5).

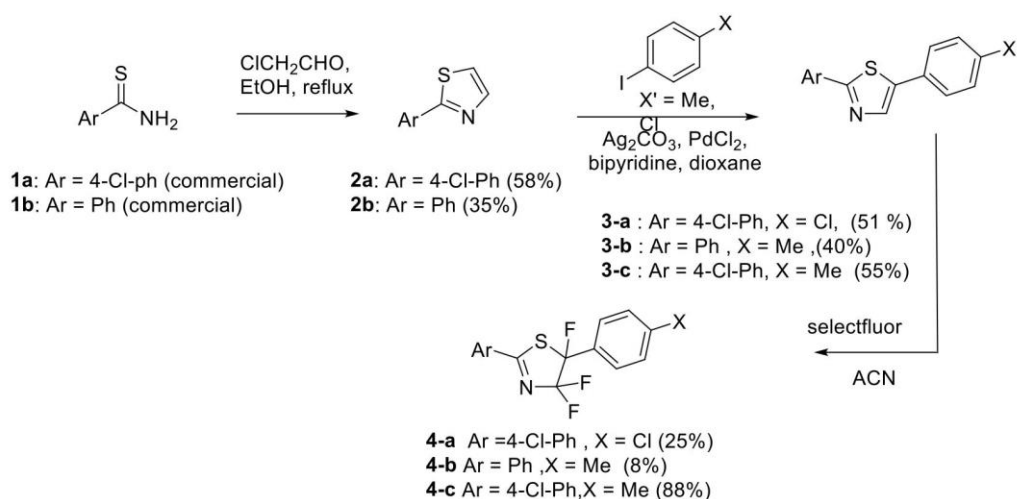


Schéma II.5: Synthèse de la fluorizoline (**4a**) et de ses des dérivés (**4b**) et (**4c**).

Plusieurs méthodes de synthèses de diarylthiazoles ont été décrites. La première méthode de synthèse de diarylthiazole (**3a**) fait appel à une catalyse au palladium selon le protocole décrit par Tani et *al.*⁶⁰ Avec cette méthode nous avons réussi à obtenir les composés désirés (**3a-c**) avec des rendements compris entre 40 et 55%.

La synthèse de la fluorizoline a été décrite dans la littérature⁵⁶ et fait appel à une fluoruration de la diphenyle thiazole par le selectfluor avec l'acétonitrile anhydre à reflux. La fluoruration des composés (**3a-c**) a permis d'obtenir les fluorizolines (**4a-c**) avec des rendements compris entre 8- 88% (Schéma II.5).

Le laboratoire d'innovation thérapeutique de l'université de Strasbourg a signé un contrat de confidentialité avec celui du Pr. Rajalingam qui ne nous permet pas de révéler actuellement les structures des analogues de la fluorizoline les plus actifs.

Nous avons aussi cherché à remplacer un des fluors de la fluorizoline par un méthyle. Ce type de composé n'a jamais été décrit. La synthèse de ce composé commence par la préparation de l'acide (**3d**) selon le protocole de Li et coll.⁶¹ qui s'effectue par une condensation entre un chlorothioamide et le 2-chloroacetate d'éthyle pour former l'intermédiaire (**2d**) avec un excellent rendement (95%). Ce dernier a été hydrolysé par LiOH

Chapitre II : Synthèse des iminobenzimidazoles et dérivés de la Fluorizoline à visée anticancéreuse

dans un mélange de solvant (H₂O /EtOH/ MeOH : 1/ 1/ 1) pour donner le produit (**3d**) avec un rendement de 83% (Schéma II.6).

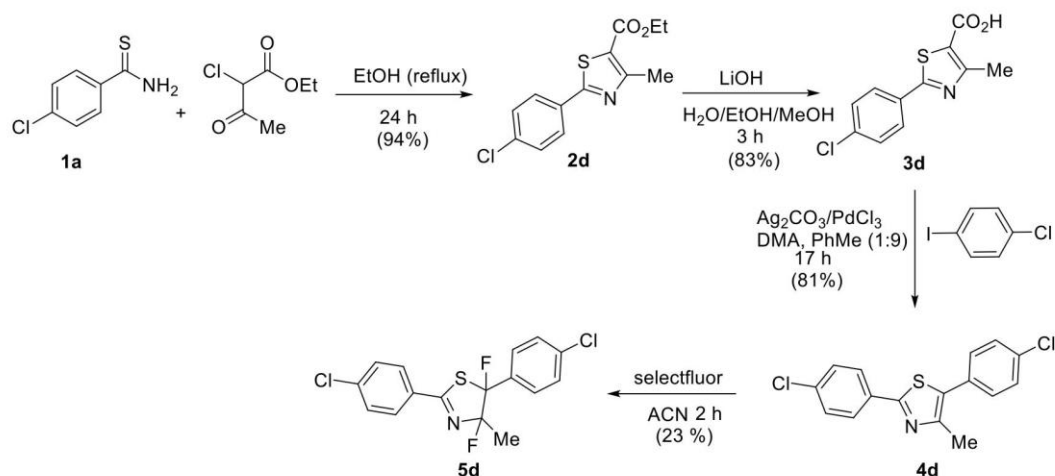


Schéma II.6: Synthèse de la fluorizoline (**5d**).

La formation du diarylthiazole (**4d**) s'effectue par une arylation décarboxylative utilisant un système bimétallique de palladium catalytique et d'un carbonate d'argent stœchiométrique.⁶² Cette méthode a permis d'obtenir l'adduit (**4d**) avec un rendement de 81%. La fluoration de ce dernier a permis l'obtention de la fluorizoline (**5d**) avec un rendement de 23% (Schéma II.6).

Le diarylthiazole (**3e**) est synthétisé par une condensation entre le thioamide **1a** et la 2,4-dichloroacétophenone⁶³ avec un rendement de 86%. Ce dernier est traité par le selectfluor pour donner le produit (**4e**). A notre connaissance c'est la première fois que cette réaction est effectuée sur des thiazoles arylés en position 2 et 5 (Schéma II.7).

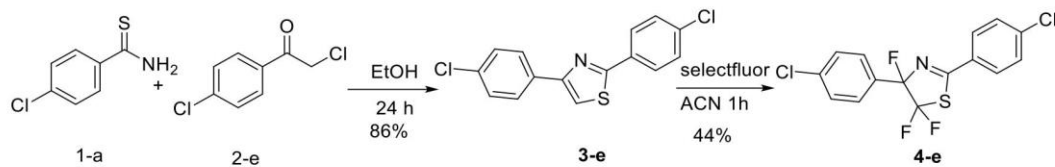


Schéma II.7: Synthèse de la fluorizoline (**4e**).

Nous avons ensuite cherché à remplacer un des fluors par un chlore (Schéma II.8). Pour cela, nous avons traité le thiazole (**5a**) par du NCS pour obtenir le produit désiré avec un rendement de 27%.⁶⁴ La fluoration de ce dernier a donné un mélange inséparable de plusieurs composés fluorés. Grâce à RMN du fluor et la spectrométrie de masse nous avons pu caractériser deux produits: le produit désiré (**2f**) et le (**3f**).

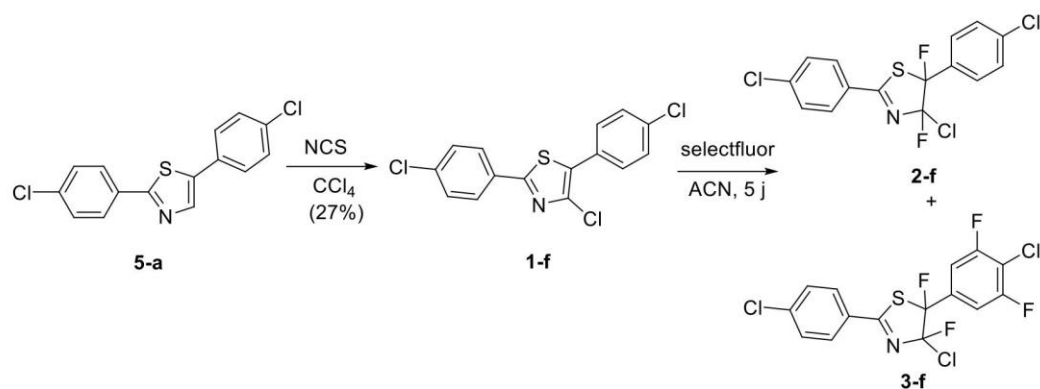


Schéma II.8: Essai de synthèse du 4-chloro-2,5-bis (4-chlorophényl)-4,5-difluoro-4,5-dihydrothiazole

Nous avons ensuite essayé de synthétiser l'isostère azoté (**1j**) de la fluorizoline. La synthèse de diarylimidazole est effectuée par une réaction monotope catalysée par de l'acétate de palladium selon un protocole décrit par Abdelilah Takfaoui et *coll.*⁶⁵ Nous avons réussi à obtenir le produit désiré (**5j**), mais avec un rendement qui ne dépasse pas 13%, et la fluoruration de ce dernier a abouti à un mélange de produits qui ne contient pas le produit attendu (Schéma II.9).

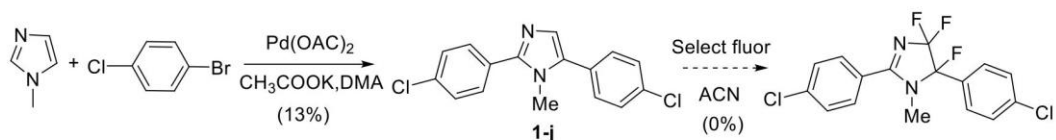


Schéma II.9: Essai de synthèse du 2,5-bis (4-chlorophényl)-4, 4,5-trifluoro-1-méthyl-4,5-dihydro-1*H*-imidazole.

II.2.5. Mécanisme réactionnel de la fluoruration de diarylthiazole

Le mécanisme proposé par Lavilla et ses collègues pour la réaction de fluoruration impliquant la fluoruration électrophile initiale de la position thiazole non substituée suivie d'un second processus électrophile, produisant ainsi un ion carbénium fluoré, qui est ensuite piégé par l'anion BF_4^- et conduit aux trifluorothiazolines finales⁵⁷ (Schéma II.10).

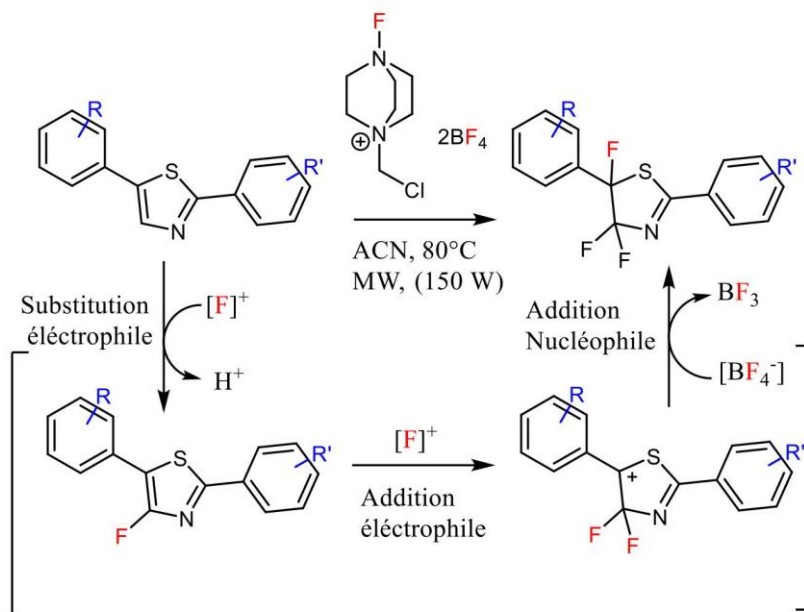


Schéma II.10: Mécanisme réactionnel de la fluoruration de diarylthiazole

II.2.6. Etude pharmacologique de la fluorizoline

Au cours de cette thèse, une librairie de fluorizoline a été préparée et examinée par les Drs. Paggetti et Moussay à l'Institut Luxembourgeois de la Santé, Luxembourg.

La fluorizoline a démontré une induction élevée de l'apoptose dans différentes cellules cancéreuses *in vitro* en se liant à la prohibitine (PHB) 1 et 2.^{54,56,66} Très récemment, la fluorizoline a été rapportée pour induire efficacement l'apoptose dans les cellules CLL provenant de patients, montrant des effets synergiques avec d'autres médicaments utilisés dans le traitement de la LLC comme l'Ibrutinib (Figure II.7), un inhibiteur de la tyrosine kinase de Bruton (BTK) et utilisé comme médicament par voie orale, dans certaines leucémies.⁶⁷ Cependant, aucune évaluation de l'efficacité de la fluorizoline *in vivo* n'a été rapportée. Les Drs. Paggetti et Moussay⁶⁸ avaient précédemment montré que la fluorizoline induit fortement l'apoptose dans les cellules CLL primaires par l'induction de NOXA (Figure II.8).

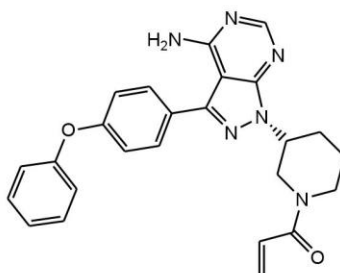


Figure II.7: Ibrutinib

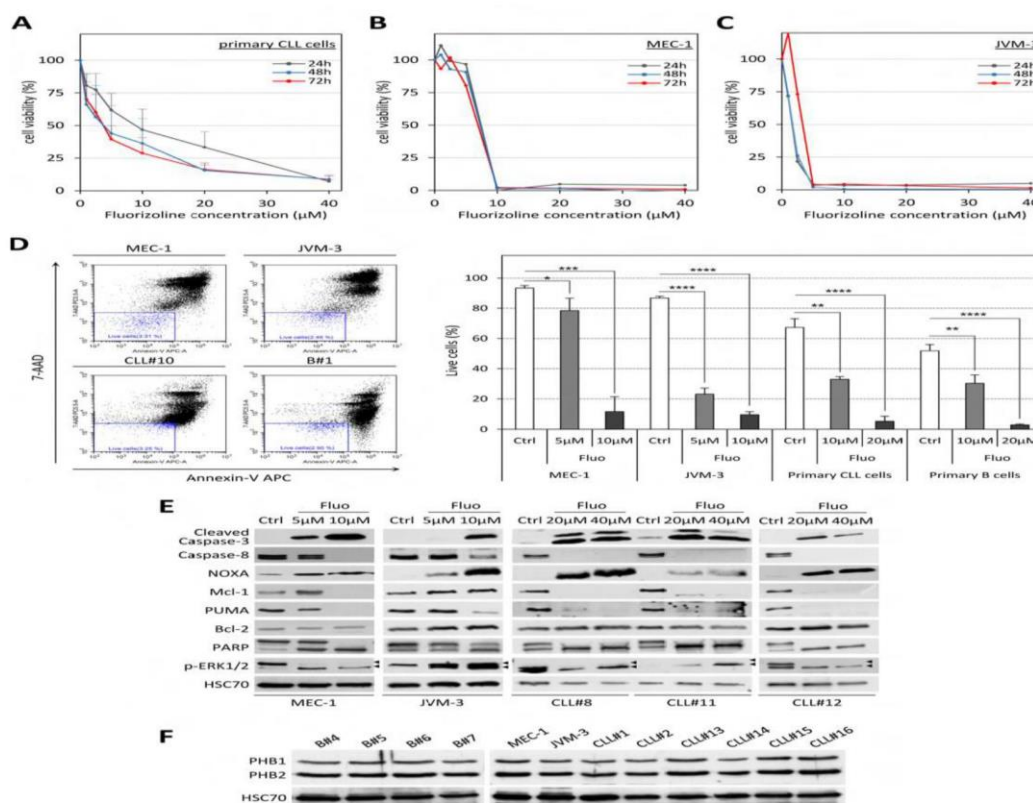


Figure II.8: La fluorizoline induit efficacement l'apoptose dans les cellules CLL *in vitro*.

Cependant, ils avaient aussi démontré que la fluorizoline, combinée à l'Ibrutinib, ne parvient pas à contrôler le développement de la LLC dans un modèle murin (Figure II.9).

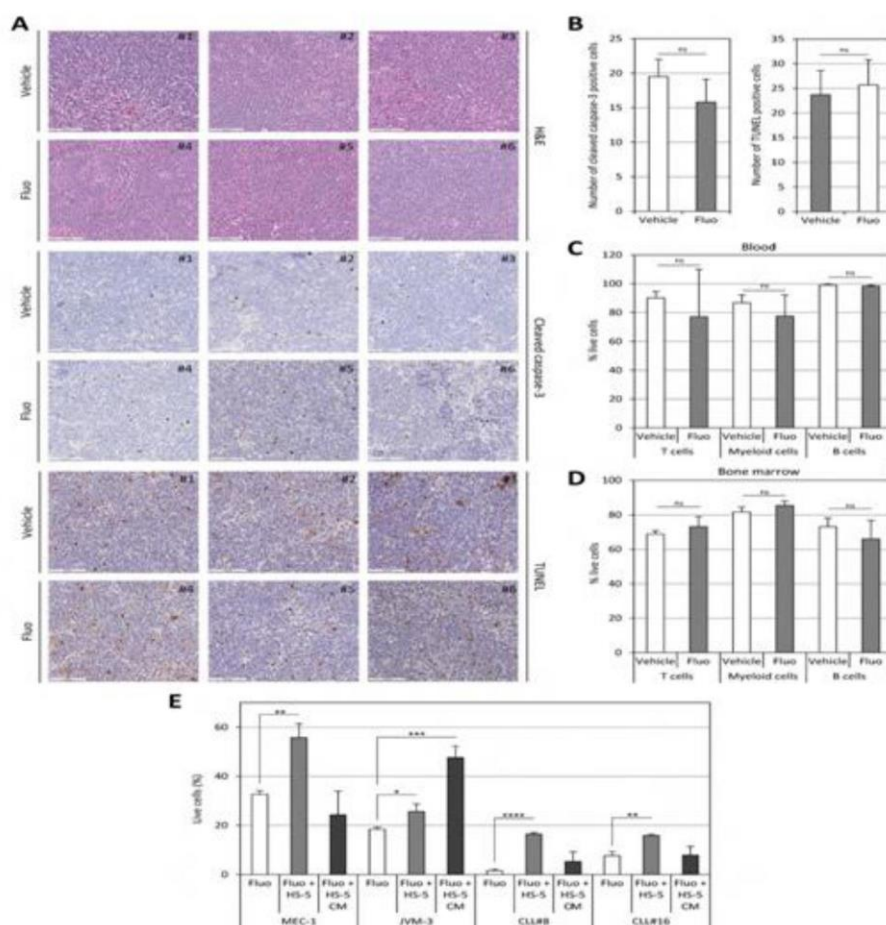


Figure II.9 : La fluorizoline n'induit pas l'apoptose *in vivo*. (A-D).

Les souris AT-TCL1 ont été traitées avec 15 mg/kg de fluorizoline (fluo) ou un volume équivalent de DMSO comme véhicule, trois fois par semaine pendant deux semaines (5 souris par groupe). (A-B) Coloration immunohistochimique effectuée sur les coupes de rate indiquées en utilisant respectivement l'hématoxyline-éosine (H & E), l'anticorps anti-clivage caspase-3 et le test TUNEL (barres d'échelle, 100 μ m). Les panneaux montrent une image représentative pour chaque animal (A) et les quantifications respectives (10 champs par souris chez 3 souris par groupe) (B). (C-D) La viabilité cellulaire a été évaluée par coloration à l'annexine-V / 7-AAD dans les cellules T.

II.2.7. Inhibition de l'activation de C-RAF par les dérivés de la fluorizoline.

Notre collaborateur, le professeur Rajalingam à l'Université Médicale de Mayence, avait montré en 2017 que la fluorizoline inhibait l'activation de C-RAF induite par l'EGF. Ce laboratoire a examiné les effets des analogues que nous avons synthétisés (Figure II.10). De manière intéressante le remplacement d'un des trois fluors par un méthyle abolit l'activité anti-C-RAF (composé **5d**). Le remplacement du chlore de l'aryle en position 4 par un méthyle a aussi un effet délétère, mais moins prononcé (**4b** et **4c**). L'inversion des positions du soufre et de

Chapitre II : Synthèse des iminobenzimidazoles et dérivés de la Fluorizoline à visée anticancéreuse

l'azote abolit l'activité, en revanche parmi les autres analogues, nous avons découvert un, le composé IM5, qui inhibe plus C-RAF que la fluorizoline tout en étant moins toxique (Figure II.10).

La structure de ce composé sera dévoilée dans un brevet avant d'être publiée.

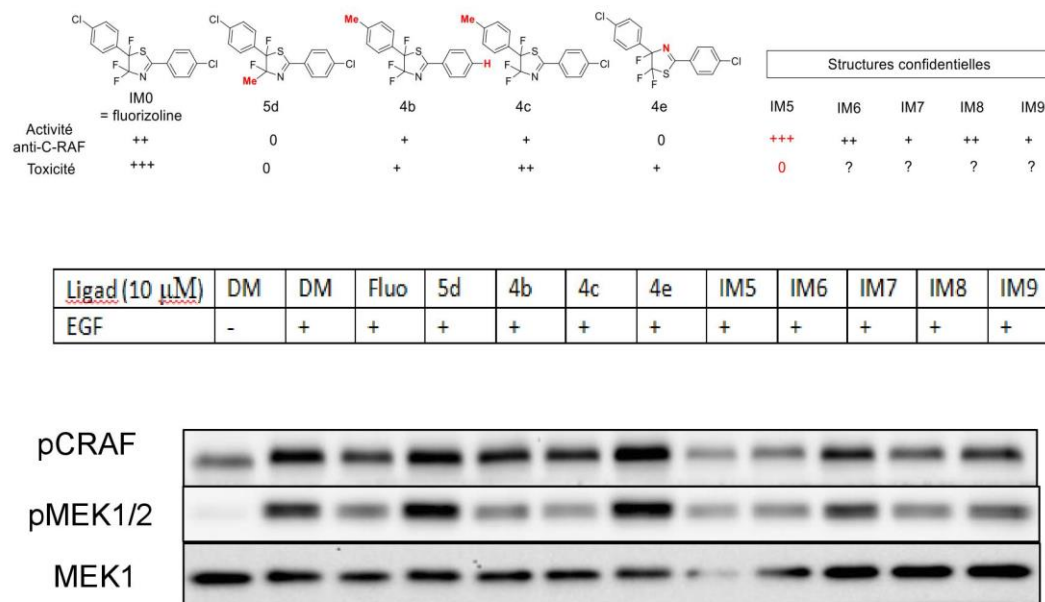


Figure II.10: Activité anti-CRAF des analogues de la fluorizoline.

Des cellules HeLa ont été traitées par les composés à tester à la dose de 10 μ M durant 4 h puis par de l'EGF (100 ng/ml) avant d'être lysées et analysées par Western blot avec des anticorps ciblant la forme phosphorylée de C-RAF, la forme phosphorylée de MEK1 et MEK2, ainsi que MEK1.

II.3. Conclusion:

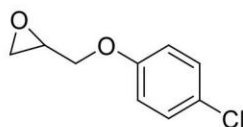
Nous avons mis en évidence les propriétés cytotoxiques d'un iminobenzimidazole sur des lignées cancéreuses. D'autres analogues de ce composé ont été synthétisés pour déterminer les requis structuraux pour cette cytotoxicité. Un article décrivant ces travaux a été publié dans «*The Open Medicinal Chemistry Journal*». Un autre agent cytotoxique, la fluorizoline et des analogues de celle-ci ont également été préparés. Deux premiers articles démontrant l'inhibition de l'oncogène KRAS par la fluorizoline et son activité dans des modèles de leucémie lymphocytaire chronique ont également été publiés.

Partie Expérimentale II

II.4. Partie Expérimentale II

II.4.1. Synthèse des iminobenzimidazoles.

2-((4-Chlorophénoxy)méthyl)oxirane (**3**).

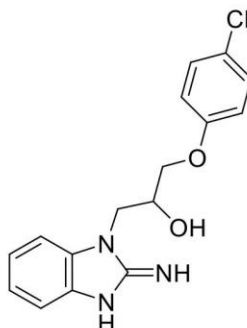


A une solution de 4-chlorophénol, (57.58 g, 622.4 mmol, 1 eq) dans 200 ml d'acétone, sont ajoutés successivement du K_2CO_3 (32 g, 233.4 mmol, 3 eq) et de l'épichlorohydrine (10 g, 77.8 mmol, 8 eq). La solution est ensuite agitée 24 h à reflux. Après retour à température ambiante, le solide est filtré et le filtrat concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est dilué avec de l'eau distillée et la phase aqueuse est extraite trois fois à l'éther. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice (Pentane/ Et_2O : 80/20) pour donner 13.79 g (97 %) de produit désiré (**3**).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J = 8.8$, 2H), 4.13 (dd, $J = 11.2, 2.4$ Hz, 1H), 3.92-3.96 (m, 1H), 3.37-3.38 (m, 1H), 2.92 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H), 2.77-2.79 (m, 1H) ppm.

^{13}C NMR (400, MHz, $CDCl_3$) δ 157.1, 129.4, 126.2, 115.9, 69.1, 50.1, 44.6 ppm.

1-(4-Chlorophénoxy)-3-(2-imino-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)propan-2-ol (**4**).



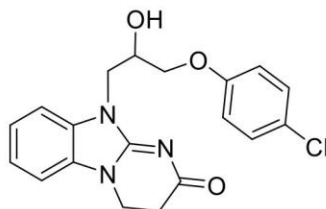
A une solution de 2-((4-chlorophénoxy)méthyl)oxirane (**3**) (2.07 g, 11.26 mmol, 1 eq), dans (H_2O :dioxane / 1:1), sont ajoutés successivement du KOH (0.63 g, 11.26 mmol, 1eq), et 2-aminobenzimidazole (1.5 g, 11.26 mmol, 1eq). La solution est ensuite agitée 2 h à reflux. Après retour à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le

solide obtenu est dilué avec de l'eau distillée et la phase aqueuse est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et évaporée sous pression réduite. Le solide formé est lavé par le dichlorométhane pour donner 1.87 g (54%) de composé attendu **(4)** sous forme d'un solide blanc.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 7.32 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.14 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.91 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.83 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 5.51 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.11-4.12 (m, 1H), 4.03-4.07 (m, 1H), 3.92-3.97 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 157.8, 155.8, 143.2, 135.3, 129.7, 124.9, 120.7, 118.5, 116.8, 115.2, 108.3, 70.5, 68.3, 45.4 ppm.

10-[3-(4-Chlorophénoxy)-2-hydroxypropyl]-3,4-dihydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidin-2(10H)-one (6).



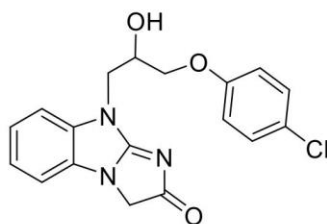
A une solution de **(4)** (0.1 g, 0.31 mmol, 1 eq) dans l'acétonitrile (4 ml) est ajoutée la 3-bromo-N, N-diméthylpropanamide **(5)** (0.08 g, 0.43 mmol, 1.4 eq). La solution est ensuite agitée, et après 15 h, K_2CO_3 (0.63 mmol) est ajouté et le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 2 jours. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite. Le solide formé est dilué avec de l'eau distillée et la phase aqueuse est extraite 3 fois par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par colonne (MeOH/DCM: 5/95) pour donner 0.063 g (0.17 mmol, 55%) du produit désiré **(6)**.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 7.48 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.15-7.23 (m, 2H), 6.95 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 5.56 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 4.25-4.31 (m, 1H), 4.12-4.21 (m, 4H), 3.93-4.03 (m, 2H), 2.57-2.61 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 175.3, 157.7, 155.4, 131.5, 130.0, 129.6, 124.8, 122.7, 122.5, 116.7, 110.7, 109.2, 70.8, 67.2, 45.3, 38.7, 29.8 ppm.

LCMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé : 372.10, trouvé : 372.02.

9-[3-(4-Chlorophénoxy)-2-hydroxypropyl]-3H-benzo[d]imidazo[1,2-a]imidazol-2(9H)-one (8).



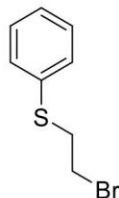
A une solution de **(2)** (0.1g, 0.31 mmol, 1 eq) dans 4 ml d'acétonitrile sont ajoutés successivement du bromure de bromoacétyle **(7)** (0.02 ml, 0.31 mmol, 1.eq) et du K_2CO_3 (0.08 g, 0.62 mmol, 2eq). Le mélange réactionnel est agité pendant 24 h à reflux. Après retour à température ambiante, le solide est filtré, lavé par l'acétonitrile pour donner 0.04g (0.11 mmol, 39 %) de produit désiré **(8)**.

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.56 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.17-7.35 (m, 5H), 6.955-6.980 (m, 2H), 5.55 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.43 (s, 2H), 4.17-4.31 (m, 3H), 4.00-4.05 (m, 2H) ppm.

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ 186.1, 168.5, 157.7, 133.7, 129.7, 129.2, 124.9, 123.4, 122.1, 116.7, 111.7, 109.7, 70.6, 67.1, 51.4, 46.9 ppm.

LCMS-ESI (m/z) $[M+H]^+$ calculé: 358.09, trouvé: 358.08.

2-Bromoéthyl phényl sulfide

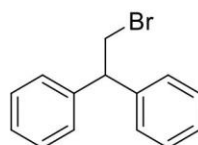


A une solution de thiophenol (1 g, 9.076 mmol, 1 eq), et de K_2CO_3 (1.88 g, 13.62 mmol, 1.5 eq), dans 40 ml d'acétone, sont ajoutés successivement 1,3-dibromoéthane (3.41 g, 18.15 mmol, 2 eq), et KI (0.015g, 0.09 mmol, 0.01eq). La solution est ensuite agitée 24 h à température ambiante, le solide formé est filtré, le filtrat est concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (pentane) pour donner 1.117 g (4.8 mmol, 57%) de produit désiré.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.11-7.3 (m, 5H), 3.32-3.63 (m, 2H), 3.15-3.19 (m, 2H) ppm.

^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 134.1, 130.6, 129.2, 127.2, 36.2, 29.8 ppm.

1-Bromo-2, 2-diphényléthane



A une solution de 2,2-diphényléthanol (1.0 g, 5.0 mmol, 1eq) dans 20 ml de dichlorométhane sont ajoutés successivement de la Ph_3P (1.5 g, 6.1 mmol, 1.22 eq) et du CBr_4 (2.5 g, 7.56 mmol, 1.5 eq). La solution est ensuite agitée 4h à température ambiante. La solution ensuite lavée par une solution saturée de NaHCO_3 et NaCl . La phase organique est séchée sur MgSO_4 et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice (pentane) pour donner 0.89 g (3.4 mmol, 68%) de produit désiré.

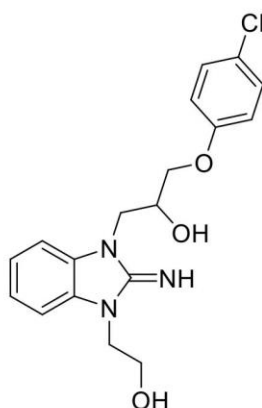
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 7.39 (d, $J=7.6$ Hz, 4H), 7.3 (t, $J=7.6$ Hz, 4H), 7.21 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.4 (t, $J=8$ Hz, 1H), 4.18 (d, $J=8$ Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 142.8, 128.9, 128.2, 127.2, 53.6, 36.8 ppm.

Procédure générale pour la l'alkylation des N-alkyliminobenzimidazoles

A une solution de 1-allyl-aminobenzimidazole (1eq) dans l'acétonitrile est ajouté le dérivé halogéné (1.1 eq). Le milieu est agité pendant 24 h à reflux. Après retour à température ambiante, le solide est filtré, lavé par l'acétonitrile pour donner l'imino-benzimidazole désiré.

1-(4-Chlorophénoxy)-3-(3-(2-hydroxyéthyl)-2-imino-2,3-dihydro-1H benzo[d]imidazol-1-yl)propan-2-ol (9a).



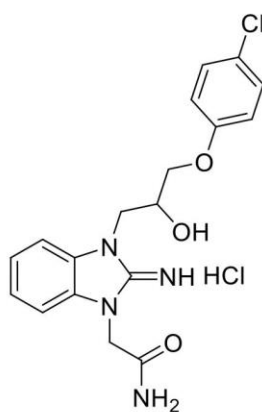
Le composé (**9a**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de (**4**) (0.1 g, 0.31 mmol, 1 eq) et 2-chloroéthanol (0.04 ml, 0.62 mmol, 2 eq), dans 4 ml d'acétonitrile anhydre pour donner 0.04g (0.11 mmol, 32 %) d'imino-benzimidazole désiré.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 8.84 (bs, 1H), 7.59 (d, $J= 9.2$ Hz, 2H), 7.29-7.36 (m, 4H), 7.02 (d, $J= 9.2$ Hz, 2H), 5.65 (bs, 1H), 5.09 (bs, 1H), 4.24-4.34 (m, 5H), 4.06-4.09 (m, 2H), 3.74 (t, $J= 4.8$ Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO, 100MHz) δ 173.0, 157.7, 150.9, 130.8, 130.7, 129.7, 124.9, 123.6, 123.5, 116.8, 111.1, 70.3, 67.2, 58.9, 46.3, 45.8 ppm.

LCMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé: 362.12, trouvé : 362.05.

2-[3-[3-(4-Chlorophénoxy)-2-hydroxypropyl]-2-imino-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl]acétamide (9b).



Le composé (**9b**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de (**4**) (0.08 g, 0.25 mmol) et de chloroacétamide (0.02 g, 0.25 mmol), dans 4 ml d'acétonitrile anhydre pour fournir 0.03 g (0.07 mmol, 31 %) d'iminoenzimidazole (**9b**).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 8.96 (bs, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.40-7.53 (m, 2H), 7.29-7.35 (m, 5H), 7.02 (d, $J= 7.2$ Hz, 2H), 4.90 (s, 2H), 4.29-4.36 (m, 3H), 4.07-4.09 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 167.1, 157.7, 151.3, 130.7, 130.5, 129.7, 124.9, 123.9, 123.8, 116.8, 111.3, 110.4, 70.3, 67.2, 46.4, 45.5 ppm.

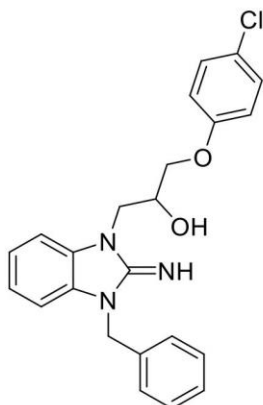
LCMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé: 375.10, trouvé: 375.04.

1-(3-(2-(1,3-Dioxolan-2-yl)Ethyl)-2-imino-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-3-(4-chlorophénoxy) propan-2-ol (9c)

Hz, 1H), 5.24 (d, $J= 7.6$ Hz, 1H), 4.82 (d, $J= 3.2$ Hz, 2H), 4.32-4.39 (m, 2H), 3.92-4.19 (m, 3H) ppm.

LCMS-ESI (m/z) $[M+H]^+$ calculé: 357.12, trouvé: 357.13.

1-(3-Benzyl-2-imino-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-3-(4-chlorophénoxy)propan-2-ol (9e).



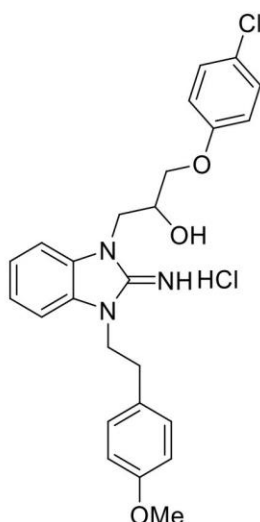
Le composé (**9e**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de (**4**) (0.09 g, 0.3 mmol) et bromométhyl benzène (0.05 g, 0.3 mmol), dans 4 ml de l'acétonitrile anhydre pour donner 0.06 g (0.15 mmol, 61%) d'iminoenzimidazole (**9e**).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 7.53 (d, $J= 7.6$ Hz, 1H), 7.18-7.37 (m, 10H), 7.01 (d, $J= 7.6$ Hz, 2H), 5.42 (s, 2H), 4.24-4.28 (m, 3H), 4.01-4.09 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO: 100MHz) δ 157.7, 150.8, 135.1, 130.8, 129.9, 129.7, 129.3, 128.4, 127.5, 124.9, 124.1, 124.0, 116.8, 111.6, 111.0, 70.4, 67.0, 46.6, 46.0 ppm.

LCMS-ESI (m/z) $[M+H]^+$ calculé: 407.14, trouvé : 407.11.

1-(4-Chlorophénoxy)-3-(2-imino-3-(4-méthoxyphénéthyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl) propan-2-ol (9f)



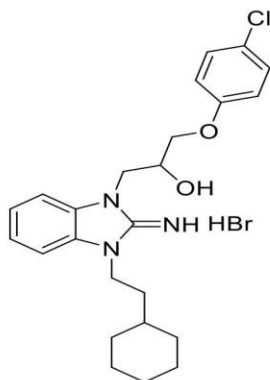
Le composé (**9f**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de (**4**) (0.2 g, 0.63 mmol) et de la 4-(2-chloroéthyl)anisole (0.12 g, 0.69 mmol), dans 4 ml d'acétonitrile anhydre pour donner 0.109 g (0.22 mmol, 36%) d'iminoenzimidazole (**9f**).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 7.52-7.53 (m, 1H), 7.44 (m, 1H), 7.13 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.21-7.23 (m, 4H), 7.00 (d, $J=8$ Hz, 2H), 6.81 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 4.36-4.34 (m, 4H), 4.22 (m, 1H), 4.05-4.06 (m, 2H), 2.91 (t, $J=6.2$ Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 158.6, 157.7, 150.5, 130.7, 130.6, 129.9, 129.7, 129.5, 124.9, 123.6, 123.5, 116.8, 114.2, 111.0, 110.5, 70.3, 67.3, 55.5, 46.2, 44.3, 32.7 ppm.

LCMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé: 452.1, trouvé 452.1.

1-(4-Chlorophénoxy)-3-(3-(2-cyclohexyléthyl)-2-imino-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)propan-2-ol (9g).



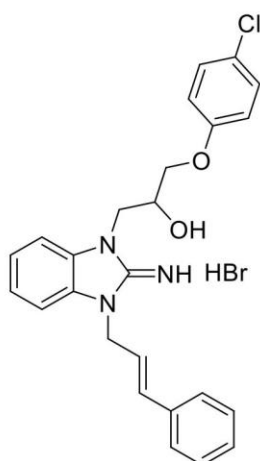
Le composé (**9g**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de **4** (0.2 g, 0.63 mmol) et du (2-bromoéthyl) cyclohexane (0.132g, 0.69 mmol), dans 4 ml de l'acétonitrile anhydre pour donner 0.126 g (0.24 mmol, 39%) d'iminoenzimidazole (**9g**).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 8.71 (sb, 1H), 7.6 (d, $J=8$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.3-7.36 (m, 4H), 6.99 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 4.08-4.34 (m, 2H), 4.23-4.27 (m, 1H), 4.17 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 4.02-4.11 (m, 2H), 1.77 (d, $J=12.4$ Hz, 2H), 1.63-1.69 (m, 3H), 1.52-1.57 (q, $J=7.3$ Hz, 2H), 1.34-1.38 (m, 1H), 1.13-1.25 (m, 3H), 0.93-1.02 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 156.6, 148.1, 128.6, 127.6, 122.9, 121.8, 121.7, 114.7, 109.4, 108.5, 68.3, 64.9, 44.3, 39.2, 33.0, 32.9, 30.9, 24.3, 24.0 ppm.

LCMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé: 428.1 trouvé : 428.1.

(E)-1-(4-Chlorophénoxy)-3-(2-imino-3-(3-phénylallyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)propan-2-ol (9h)



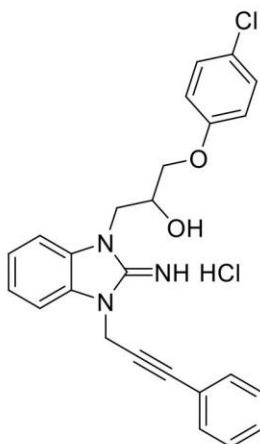
Le composé (**9h**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de (**4**) (0.2 g, 0.63 mmol) et du 3-bromo-1-phényl-1-propène (0.137g, 0.69 mmol), dans 4 ml d'acétonitrile anhydre pour donner 0.186 g (0.36 mmol, 58%) d'iminoenzimidazole (**9h**).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 7.51 (t, $J = 3.2$, Hz, 2H), 7.42 (d, 7.2 Hz, 2H), 7.25-7.35 (m, 7H), 7.0 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.7 (d, $J = 16$ Hz, 1H), 6.39 (dt, $J = 15.6, 5.7$ Hz, 1H), 5.0 (d, $J = 5.2$, 2H), 4.27-4.33 (m, 3H), 4.04-4.12 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 157.8, 150.7, 136.2, 136.1, 133.1, 131.7, 130.9, 130.1, 129.8, 129.2, 128.6, 126.9, 124.9, 123.8, 122.6, 116.8, 111.2, 110.7, 70.5, 67.1, 46.4, 44.6ppm.

LCMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé : 434.1, trouvé : 434.1.

1-(4-Chlorophénoxy)-3-(2-imino-3-(3-phénylprop-2-yn-1-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)propan-2-ol (9i)



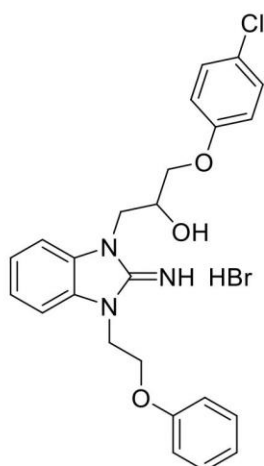
Le composé (**9i**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de (**4**) (0.15g, 0.47mmol) et du 3-chloro-1-phényl-1-propyne (0.077 g, 0.51 mmol), dans 4 ml d'acétonitrile anhydre pour fournir 0.143 g (0.3 mmol, 66%) d'iminoenzimidazole (**9i**).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 7.7 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 8$, 1H), 7.31-7.44 (m, 9H), 7.0 (d, $J = 9.6$, 2H), 5.5 (s, 2H), 4.33-4.42 (m, 2H), 4.23-4.27 (m, 1H), 4.06-4.1 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 157.7, 150.3, 132.1, 130.9, 129.8, 129.7, 129.5, 129.3, 124.9, 124.2, 124.1, 121.6, 116.9, 116.8, 111.6, 110.9, 85.3, 82.6, 70.4, 67.1, 46.6, 33.9 ppm.

LCMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé : 432.1, trouvé : 432.1.

1-(4-Chlorophénoxy)-3-(2-imino-3-(2-phénoxyéthyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl) propan-2-ol (9j)



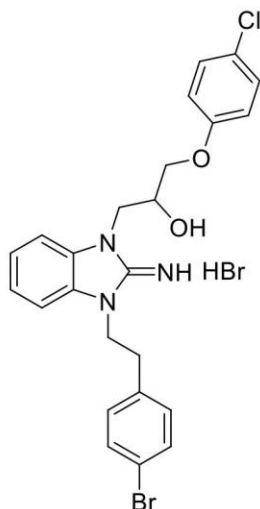
Le composé (**9j**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de (**4**) (0.2 g, 0.63 mmol) et du bromure de 2-phénoxyéthyle (0.138 g, 0.69 mmol), dans 4 ml d'acétonitrile anhydre pour donner 0.27 g (0.52 mmol, 85%) d'iminoenzimidazole (**9j**).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 7.63 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.23-7.33 (m, 6H), 6.99 (d, $J = 8.8$, 2H), 6.92 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 4.6 (m, 2H), 4.23-4.32 (m, 5H), 4.02-4.1 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 158.3, 157.7, 151.1, 130.8, 130.6, 130.2, 130, 129.7, 124.9, 123.6, 121.5, 116.8, 114.8, 111.2, 111.1, 111, 70.4, 67.1, 65.6, 46.4, 42.9 ppm.

LCMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé: 438.1, trouvé:438.1.

1-(3-(4-Bromophényl)-2-imino-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-3-(4-chlorophénoxy) propan-2-ol (9k)



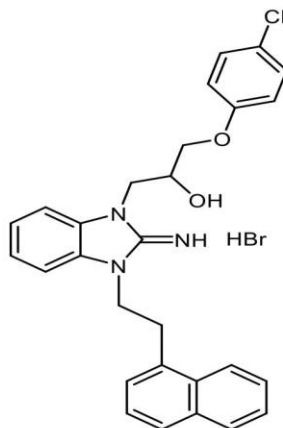
Le composé (**9k**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de (**4**) (0.2 g, 0.63 mmol) et du 1-bromoéthyl 4-(2-bromoéthylbenzène) (0.18 g, 0.69 mmol), dans 4 ml d'acétonitrile anhydre pour donner 0.144 g (0.25 mmol, 46%) d'imino benzimidazole (**9k**).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 7.53-7.55 (m, 1H), 7.47 (d, $J=7.6$ Hz, 3H), 7.35 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J=7.6$ Hz, 4H), 7.0 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 4.38 (t, $J=7.4$, 2H), 4.21-4.29 (m, 3H), 4.02-4.08 (m, 2H), 4.97 (t, $J=7.4$ Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO) 157.7, 152.6, 150.6, 137.2, 131.9, 131.6, 130.7, 129.9, 129.8, 124.9, 123.6, 120.4, 116.8, 111.0, 110.5, 70.4, 67.2, 46.2, 43.7, 31.9 ppm.

LCMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé: 499.1 trouvé: 498.9.

1-(4-Chlorophénoxy)-3-(2-imino-3-(2-(naphthalèn-1-yl)éthyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)propan-2-ol (9l)



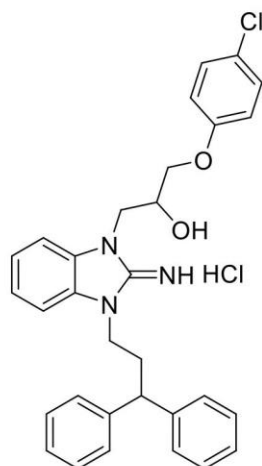
Le composé (**9l**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de (**4**) (0.2 g, 0.63 mmol) et du 1-(2-bromoéthyl) naphthalène (0.16 g, 0.69mmol), dans 4 ml d'acétonitrile anhydre pour donner 0.281 g (0.51 mmol, 88%) d'iminoenzimidazole (**9l**).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ 8.08 (s, 2H) ,8.06 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.9 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.77-7.79 (m, 1H) , 7.5-7.58 (m, 3H), 7.35-7.38 (m, 4H), 7.21(t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.08-7.132 (m, 2H), 7.00-7.06 (m, 2H), 5.63 (s, 1H), 4.59 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 4.23-4.31 (m, 3H), 4.00-4.09 (m, 2H), 3.5 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 157.7, 150.3, 133.9, 133.8, 131.9, 130.4, 129.9, 129.8, 129.1, 127.8, 127.5, 126.7, 126.2, 125.9, 125.0, 123.7, 116.8, 111.3, 110.4, 70.4, 67.1, 46.3, 43.7, 30.2ppm.

LCMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé :471.2 trouvé : 471.1.

1-(4-Chlorophénoxy)-3-(3-(3,3-diphénylpropyl)-2-imino-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)propan-2-olhydrochloride (9m**)**



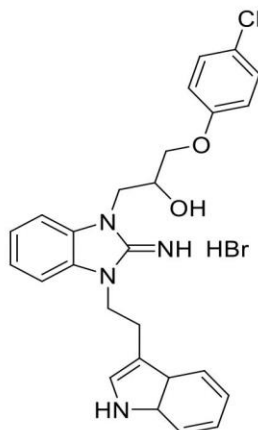
Le composé (**9m**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de (**4**) (0.2 g, 0.63 mmol) et du (3-bromopropane-1,1-diyl) dibenzene (0.18 g, 0.69 mmol), dans 4 ml d'acétonitrile anhydre pour donner 0.373 g (0.68 mmol, 86%); d'iminoenzimidazole (**9m**).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 8.74 (s, 2H), 7.52-7.55 (m, 1H), 7.26-7.35 (m, 12H), 7.18 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 7.10-7.16 (m, 1H), 7.01 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 5.59 (s, 1H), 4.21 (s, 3H), 4.02-4.14 (m, 5H), 5.53-5.55 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ 157.7, 150.1, 144.4, 144.3, 130.6, 129.7, 129.0, 128.0, 127.8, 126.8, 124.9, 123.8, 116.8, 111.4, 110.2, 70.4, 67.0, 48.4, 46.3, 42.1, 32.7 ppm.

LCMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé : 512.2, trouvé : 512.11.

1-(3-(2-(1H-Indol-3-yl)éthyl)-2-imino-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-3-(4-chlorophénoxy) propan-2-ol (9n)



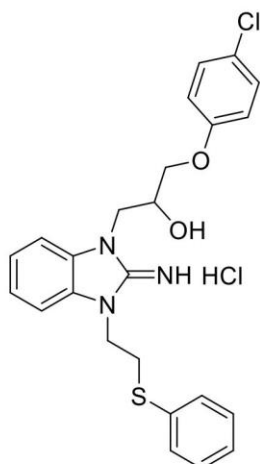
Le composé (**9n**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de (**4**) (0.2 g, 0.63 mmol, 1 eq) et du 3-(2-(bromoéthyl)-1-indole) (0.15g, 0.69 mmol, 1.1 eq), dans 4 ml d'acétonitrile anhydre pour donner 0.289 g (0.53 mmol, 85%) d'imino-benzimidazole (**9n**).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.89 (s, 1H), 8.73 (bs, 2H), 7.57 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.32-7.37 (m, 4H), 7.21-7.28 (m, 3H), 7.08 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 6.95-7.01 (m, 3H), 5.61 (bs, 1H), 4.46 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.22-4.29 (m, 3H), 3.99-4.08 (m, 2H), 3.13 (t, $J=7$ Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (400 MHz, DMSO) δ 157.7, 150.3, 136.5, 130.6, 130.0, 129.8, 127.5, 125.0, 124.1, 123.8, 123.7, 121.5, 118.9, 118.4, 116.8, 111.9, 111.2, 110.6, 110.0, 70.4, 67.1, 46.3, 43.9, 23.5 ppm.

LCMS-ESI (m/z) $[M+H]^+$ calculé : 461.2, trouvé : 461.1

1-(4-Chlorophénoxy)-3-(2-imino-3-(2-(phénylthio)éthyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)propan-2-ol (9o)



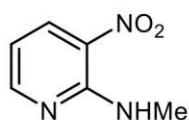
Le composé (**9o**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de (**4**) (0.2 g, 0.63 mmol) et du 2-bromoethyl phényle sulfide (0.15 g, 0.69 mmol), dans 4 ml d'acétonitrile anhydre pour donner 0.265 g (0.54 mmol, 86%) d'iminoenzimidazole (**9o**).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.47-7.49 (m, 1H), 7.42 (d, $J = 9.2$ Hz, 3H), 7.15-7.28 (m, 7H), 7.0 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.45 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 4.19 (s, 3H), 4.01-4.07 (m, 2H), 3.43 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (400 MHz, DMSO) δ 157.7, 150.5, 135.0, 130.5, 130.0, 129.7, 129.4, 129.0, 126.7, 124.9, 123.8, 123.7, 116.8, 111.2, 110.7, 70.3, 67.1, 46.3, 42.9, 31.1 ppm.

LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calculé : 454.1, trouvé : 454.1

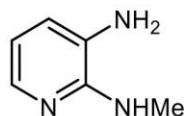
N-méthyl-3-nitropyridin-2-amine (11)



A une solution de diméthylamine (10 ml, 80.7 mmol) à 0°C est ajouté le 2-chloro-3-nitropyridine (**10**) (1.6 g, 10.0 mmol). Le mélange réactionnel est ensuite agité 1h à 0°C et 2h à température ambiante puis concentré sous pression réduite. Le résidu est lavé par H₂O, et la phase aqueuse est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est finalement séchée sur MgSO₄ et évaporée sous pression réduite, pour donner 1.3 g (8.5 mmol, 85%) de produit désiré.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.40-8.45 (m, 2H), 8.24 (bs, 1H), 6.62-6.65 (m, 1H), 3.16 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H) ppm.

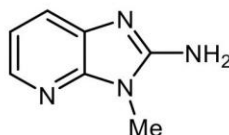
¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 155.7, 153.2, 135.2, 128.3, 111.5, 28.1 ppm.

N-méthylpyridine-2, 3-diamine (12).

A une solution de (**11**) (1.1 g, 7.18 mmol) dans le MeOH anhydre (25 ml), est ajouté 10% pd/c (0.07 g, 0.71 mmol). Le mélange réactionnel est ensuite agité 24 h à température ambiante sous hydrogène. La solution est filtrée sur la celite puis concentrée sous vide pour donner 0.88 g (7.1 mmol, 99%) de produit désiré.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.78 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 6.51 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H). 4.20 (bs, 1H), 3.18 (bs, 2H), 3.00 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 151.1, 139.2, 128.5, 121.7, 113.2, 28.7 ppm.

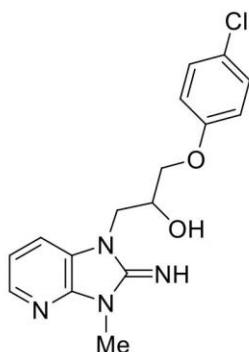
3-Méthyl-3H-imidazo [4,5-b] pyridin-2-amine (13)

A une solution de (**12**) (0.6 g, 4.87 mmol) dans un mélange MeOH/ H_2O 12/12 ml, est ajouté le bromure de cyanogène (1.5 g, 14.63 mmol). Le mélange réactionnel est ensuite agité 4 h à 60°C. Après évaporation du méthanol, une solution de NaOH (1M) jusqu'à pH = 8. La phase organique est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle, séchée sur MgSO_4 et évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par colonne (MeOH/DCM: 1/9) pour donner 0.37 g (2.5 mmol, 55%) de produit désiré.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 7.84 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J = 7.2$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.92-6.96 (m, 1H), 6.78 (s, 2H). 3.51 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 156.5, 148.5, 137.8, 136.3, 120.5, 117.1, 27.3 ppm.

1-(4-Chlorophénoxy)-3-(2-imino-3-méthyl-2,3-dihydro-1H-imidazo[4,5b] pyridin-1-yl) propan-2-ol (14)



A une solution de 3-méthyl-3*H*-imidazo [4,5-*b*] pyridin-2-amine (0.1 g, 0.67 mmol) dans H₂O/dioxane 3/3 ml sont ajoutés successivement du KOH (0.04 g, 0.67 mmol), et le composé (**13**) (0.13 g, 0.74 mmol). La solution est ensuite agitée 2 h à 110 °C. Après retour à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le solide est dilué avec de l'eau distillée et la phase aqueuse est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est finalement séchée sur MgSO₄ et évaporée sous pression réduite. Le résidu est recristallisé dans un mélange H₂O/EtOH: 3/7 pour donner 0.05 g (0.15 mmol, 25%) de produit désiré.

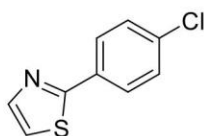
¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 8.11 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.08 (bs, 1H), 4.31-4.42 (m, 1H), 3.94-4.09 (m, 3H), 3.76-3.80 (m, 1H), 3.64 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 157.1, 155.4, 147.9, 139.7, 134.2, 129.4, 126.1, 122.4, 117.7, 115.7, 70.1, 69.4, 46.5, 26.8 ppm.

LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calculé: 333.10, trouvé : 333.04.

II.4.2. La fluorizoline.

4-Chlorophényl-thiazole (2a)

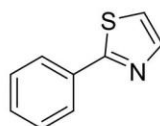


A une solution de de 4-chlorothiobenzamide (5 g, 29 mmol, 1 eq), dans 25 ml d'éthanol est ajouté le chloroacétaldéhyde (2.75 g, 35 mmol, 1.2 eq). La solution est ensuite agitée 24 h à reflux. Après retour à température ambiante, la solution est évaporée sous pression réduite. Le solide est dilué avec de l'eau distillée et la phase aqueuse est extraite trois fois par de dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur gel de silice [pentane : CH_2Cl_2 (9:1)] pour donner 3.297 g (16.8 mmol, 55 %) d'une huile jaune.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.83 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400, MHz, CDCl_3) δ 167.1, 143.9, 135.9, 132.1, 129.2, 127.8, 119.1 ppm.

2-Phénylthiazole (2b)

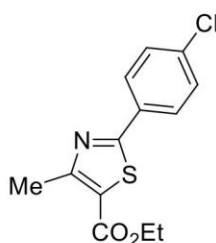


A une solution de thiobenzamide (5 g, 36.5 mmol, 1 eq) dans 25 ml d'éthanol est ajouté chloroacétaldéhyde (11.4 g, 145.5 mmol, 4 eq). La solution est ensuite agitée 10 h à reflux. Après retour à température ambiante, la solution est évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est dilué avec de l'eau distillée et la phase aqueuse est extraite trois fois par de dichlorométhane. La phase organique est finalement séchée sur MgSO_4 et évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur gel de silice [pentane : CH_2Cl_2 (9:1)] pour donner 2.015 g (12.5 mmol, 35 %) d'une huile jaune.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.82 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.24-7.29 (m, 3H), 7.12-7.13 (m, 1H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400, MHz, CDCl_3) δ 168.3, 143.6, 133.6, 130.1, 129.0, 126.6, 118.9 ppm.

2-(4-Chlorophényl)-4-méthyl-thiazole-5-carboxylic acidéthyl ester (2d)

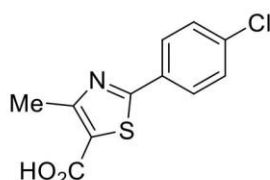


A une solution de de 4-chlorothiobenzamide (3.43 g, 20 mmol, 1 eq) dans 25 ml d'éthanol est ajouté le 2-chloroacétate d'éthyle (3.29 g, 20 mmol, 1eq). La solution est ensuite agitée 24 h à reflux. Après retour à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut obtenu est purifié sur gel de silice (pentane/AcOEt : 95/5) pour donner 5.25 g (24 mmol, 94 %) d'un solide blanc.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.49 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 4.40 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.92 (s, 3H), 1.41 (t, $J = 7$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400, MHz, CDCl_3) δ 169.4, 160.9, 158.4, 139.0, 129.8, 128.9, 128.6, 122.6, 62.1, 16.4, 14.3 ppm.

2-(4-Chlorophényl)-4méthyl-thiazole-5-carboxylicacid (3d)

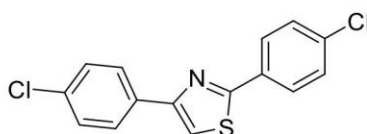


A une solution d'éthylester d'acide 2-(4-chlorophényl)-4-méthyl-thiazole-5-carboxylique (2.5 g, 8.9 mmol, 1 eq) dans 45 ml (H_2O : EtOH: MeOH/ 1 : 1 : 1), est ajouté LiOH (1.27 g, 53.4 mmol, 6 eq). La solution est ensuite agitée 3 h à reflux. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée et le filtrat est évaporé sous pression réduite. 50 ml d'eau sont ajoutés et ensuite le pH est ajusté à 3-4 par HCl. Le solide est filtrée, lavé à l'eau pour donner 1.87 g (7.4 mmol, 83%) d'un solide blanc.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 7.98 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 2.67 (s, 3H) ppm

$^{13}\text{C NMR}$ (400, MHz, DMSO) δ 167.5, 163.3, 160.1, 136.3, 131.6, 129.9, 128.6, 123.8, 17.5 ppm.

2,4-Bis (4-chlorophényl) thiazole (3e)



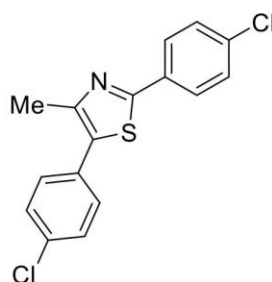
A une solution de 4-chlorothiobenzamide (1.71 g, 10 mmol, 1 eq) dans 15 ml d'éthanol est ajoutée de la 2,4-dichloroacétophénone (1.89 g, 10 mmol, 1 eq). La solution est ensuite agitée 24 h à reflux. Après retour à température ambiante, la solution est évaporée sous

pression réduite. Le brut obtenu est purifié sur gel de silice (pentane/AcOEt : 95/5) pour donner 2.62 g (8.5 mmol, 86 %) d'un solide jaune.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.24-7.30 (m, 5H) ppm

$^{13}\text{C NMR}$ (400, MHz, CDCl_3) δ 166.8, 155.3, 136.2, 134.1, 132.8, 132.1 129.2, 129.0, 127.8, 127.7, 113.1 ppm.

2, 5-Bis (4-chloro-phényl)-4-méthylthiazole (4d)



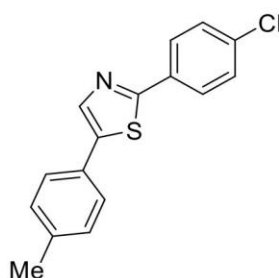
A une solution de l'acide 2-(4-chlorophényl)-4-méthyl-thiazole-5-carboxylique (1.012g, 4 mmol, 1 eq) dans DMA /toluène (1: 10) sont ajoutés successivement du chlorure de palladium (5 mol%), PPh_3 (10 mol%), carbonate d'argent (1.1 g, 4 mmol, 1eq) et du 1-chloro-4-iodobenzène (1.907 g, 8 mmol, 2 eq). La solution est ensuite agitée 17 h à reflux. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur celite et lavée par l'acétate d'éthyle. La solution est diluée avec de l'eau distillée et la phase aqueuse est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est finalement séchée sur MgSO_4 et évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur gel de silice [pentane : diéthyl éther (9:1)] pour donner 1.034 g (3.2 mmol, 81 %) de produit désiré.

pf: 160°C ;

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.84 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.38-7.39 (m, 6H), 2.51 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400, MHz, CDCl_3) δ 163.9, 149.4, 135.9, 134.0, 132.1, 131.3, 130.5, 130.4, 129.2, 129.0, 127.5, 16.3 ppm.

2-(4-Chlorophényl)-5-(*p*-tolyl) thiazole (4b)



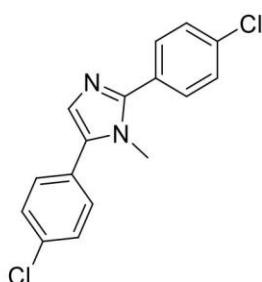
A une solution de 4-chlorophényl-thiazole (1 g, 5.12 mmol, 1.5 eq), dans 20 ml de dioxane, sont ajoutés successivement d'iodotoluène (0.74 g, 3.4 mmol, 1 eq), carbonate d'argent (1.41 g, 5.12 mmol, 1 eq), chlorure de palladium (5 mol%), et de la bipyridine (5 mol%). La solution est ensuite agitée 48 h à reflux. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur celite et lavée par de l'acétate d'éthyle. La solution est diluée avec de l'eau distillée et la phase aqueuse est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est finalement séchée sur $MgSO_4$ et évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur gel de silice [pentane:diéthyl éther (9:1)] pour donner 0.809 g (2.8 mmol, 55%) d'un solide jaune.

Pf: 153°C

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.29 (s, 1H), 7.97 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 7.58-7.60 (m, 4H), 7.28-7.29 (m, 2H), 2.35 (s, 3H) ppm .

^{13}C NMR (400, MHz, DMSO) δ 140.1, 138.8, 135.2, 132.4, 130.4, 129.8, 128.2, 128.2, 128.1, 126.8, 21.3 ppm.

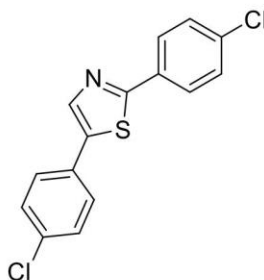
2, 5-Bis (4-chlorophényl)-1-méthyl-1H-imidazole (1j)



A une solution de 4-chlorophényl-thiazole (1 g, 5.12 mmol, 1.5 eq), dans 18 ml de DMA, sont ajoutés successivement le 1-bromo-4-chlorobenzène (4.2 g, 22 mmol, 3 eq), l'acétate de palladium (2 mol%) et de l'acétate de potassium (2.87 g, 29 mmol, 4 eq). La solution est ensuite agitée 48 h à reflux. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur celite et lavée à l'acétate d'éthyle, évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur gel de silice [pentane: acétate d'éthyle (9:1)] pour donner 0.233 g (0.8 mmol, 10%) d'un solide blanc.

Pf: 155°C

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.82 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.06 (s, 1H), 3.81 (s, 3H) ppm.

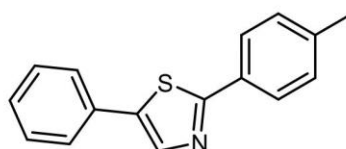
2, 5-bis(4-Chlorophényl)thiazole (3a)

A une solution de 4-chlorophényl-thiazole, (1.94 g, 10 mmol, 1.5 eq), dans 40 ml de dioxane sont ajoutés successivement 1-chloro-4-iodobenzène, (1.6 g, 6.7 mmol, 1 eq), carbonate d'argent (1.85 g, 6.7 mmol, 1 eq), chlorure de palladium (5 mol%), et de la bipyridine (5 mol%). La solution est ensuite agitée 48 h à reflux. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur célite et lavée avec l'acétate d'éthyle. La solution est diluée avec de l'eau distillée et la phase aqueuse est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est finalement séchée sur MgSO_4 et évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur gel de silice [pentane:diéthyl éther (9:1)] pour donner 1.57 g (5.1 mmol, 51%) de produit désiré.

Pf: 135 °C

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.99 (s, 1H), 7.91 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.52 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H) ppm.

^{13}C NMR (400, MHz, CDCl_3) δ 166.2, 138.9, 138.5, 136.5, 134.6, 131.5, 129.5, 129.4, 127.9, 127.7 ppm.

2-Phényl-5-(p-tolyl) thiazole (4b)

A une solution de phényle-thiazole (1 g, 6.2 mmol, 1.5 eq), dans 20 ml de dioxane, sont ajoutés successivement l'iodotoluène (0.9 g, 4.1 mmol, 1 eq), carbonate d'argent (1.7 g, 6.2 mmol, 1.5 eq), chlorure de palladium (5 mol%), et la bipyridine (5 mol%). La solution est ensuite agitée 48 h à reflux. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur célite et lavée avec l'acétate d'éthyle. La solution est diluée avec de l'eau distillée et la phase aqueuse est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est finalement séchée sur MgSO_4 et évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur gel de silice [pentane:diéthyl éther (9:1)] pour donner 0.66 g (2.6 mmol, 40%) de produit désiré.

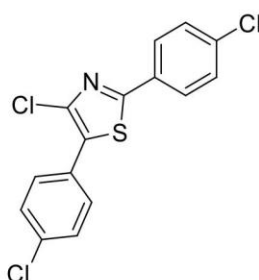
Aspect: solide jaune

Pf: 114°C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.78-7.81 (m, 4H), 7.26-7.33 (m, 4H), 7.04-7.07 (m, 2H), 2.21 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (400, MHz, CDCl₃) δ 166.9, 139.5, 138.8, 138.4, 133.8, 129.9, 129.8, 128.9, 128.6, 126.6, 126.3, 21.3 ppm.

4-Chloro-2, 5-bis(4-chlorophényl)thiazole (3e)



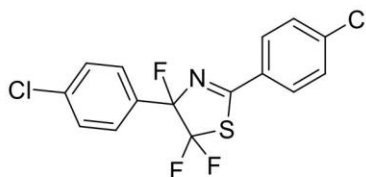
A une solution de 2,5-bis (4-chlorophényl) thiazole (1 g, 3.3 mmol, 1 eq), dans 12 ml de CCl₄, sont ajoutés successivement le N-chlorosuccinimide (0.57 g, 4.3 mmol, 1.3 eq) et du peroxyde du benzoyle (0.08 g, 0.3 mmol, 0.1 eq). La solution est ensuite agitée 72 h à reflux. Après retour à température ambiante, la solution est évaporée sous pression réduite. Le solide est dilué avec de l'eau distillée et la phase aqueuse est extraite trois fois par de Et₂O et lavée avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique est finalement séchée sur MgSO₄ et évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur gel de silice [pentane : CH₂Cl₂ (2:8)] pour donner 0.13 g (0.38 mmol, 10%) du produit désiré.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 7.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 8 Hz, 4H) ppm.

¹³C NMR (400, MHz, CDCl₃) δ 163.8, 136.9, 135.7, 134.9, 131.0, 130.0, 129.4, 129.1, 128.1, 127.3 ppm.

Procédure générale pour la synthèse de la fluorizoline

A une solution de bi-phényle thiazole (1eq) dans l'acétonitrile est ajouté le selectfluor (2.5eq). Le mélange est agité pendant 1-6 h à reflux. Après retour à température ambiante, la solution est diluée avec diéthyléther et la phase organique est lavée 3fois par 50 ml d'eau puis avec 50 ml d'une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié sur gel de silice [pentane : DCM (9:1)] pour donner la fluorizoline désirée.

4, 4, 5-Trifluoro-2, 4-bis (4-chlorophényl) thiazole (4e)

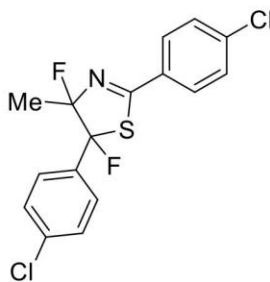
Le composé (**4e**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de la 2,4-bis(4-chlorophényl)thiazole (0.152 g, 0.5 mmol, 1 eq), et du select fluor (0.44 g, 1.24 mmol, 2.5 eq), dans 10 ml de l'acétonitrile anhydre (0.079 g, 0.22 mmol) pour donner la fluorizoline (**4e**) (44% de rendement) sous forme d'une huile jaune.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.70 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7.25 (d, *J* = 8 Hz, 2H) ppm.

¹⁹F NMR (400 MHz, CDCl₃) δ -72.55 (dd, *J*¹ = 4.8, *J*²=223.6 Hz, 1F), -98.08 (dd, *J*¹ = 4.4, *J*² =223.7 Hz, 1F), -123.10 (t, *J* = 4.6 Hz, 1F) ppm.

¹³C NMR (400, MHz, CDCl₃) δ 173.4 ,140.6, 136.8, 130.9, 130.6, 130.3, 130.1, 129.5, 128.8, 128.1, 128.1 ppm.

LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calculé : 360.9 trouvé : 360.9

4, 5-Difluoro-2, 5-bis (4-chlorophényl)-4-méthylthiazole (5d)

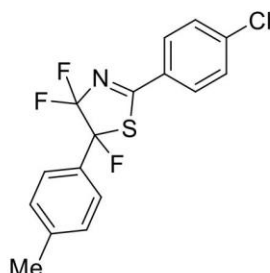
Le composé (**5d**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de la 2,5-bis (4-chlorophényl)-4-méthylthiazole (0.159 g, 0.5 mmol, 1 eq) et du select fluor (0.44 g, 1.24 mmol, 2.5 eq), dans 10 ml de l'acétonitrile anhydre pour donner 0.041 g (0.11 mmol, 23%) de la fluorizoline (**5d**) sous forme d'une huile jaune.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.89 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H) ,7.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H) ,7.41 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 1.56 (s, 3H) ppm.

¹⁹F NMR(400 MHz, CDCl₃) δ -113.36 (d, *J*=18.4 Hz, 1F), -126.33 (d, *J* = 17.6 Hz, 1F) ppm.

¹³C NMR (400, MHz, CDCl₃) δ 129.3, 128.3, 128.2, 127.6, 127.4, 127.3, 28.7 ppm.

LCMS-ESI(m/z) [M+H]⁺ calculé: 357.0, trouvé : 356.9.

2-(4-Chlorophényl)-4,4,5-trifluoro-5-(p-tolyl)-4,5-dihydrothiazole (4c)

Le composé (**4c**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de la 2-(4-chlorophényl)-5-(p-tolyl)-thiazole (0.142 g, 0.5 mmol, 1 eq), et du select fluor (0.44 g, 1.24 mmol, 2.5 eq), dans 10 ml de l'acétonitrile anhydre pour donner 0.151 g (0.44 mmol, 88%) de la fluorizoline (**4c**) sous forme d'un solide blanc.

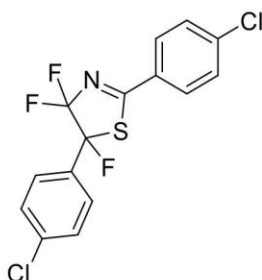
Pf : 60 °C ;

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H) ppm.

¹⁹F NMR (400 MHz, CDCl₃) δ -79.5 (dd, *J* = 10.2, 231.8 Hz, 1F), -103.9 (dd, *J*¹ = 9, *J*² = 231.8 Hz, 1F), -129.76 (t, *J* = 9.6 Hz, 1F) ppm.

¹³C NMR (400, MHz, CDCl₃) δ 140.9, 140.8, 130.2, 129.6, 129.4, 129.3, 127.2, 127.0, 126.9, 21.31 ppm.

LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calculé:341.0, trouvé: 340.9.

2, 5-Bis (4-chlorophényl)-4,4,5-trifluoro-4,5-dihydrothiazole (4e)

Le composé (**4e**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de la of 2,5-bis (4-chlorophényl) thiazole (1.55 g, 5 mmol, 1 eq), et du select fluor 4.5 g, 12.75 mmol, 2.5 eq), dans 100 ml de l'acétonitrile anhydre pour donner 0.45 g (1.2 mmol, 25%) de la fluorizoline (**4e**) sous forme d'un solide blanc.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.91 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H) ppm.

$^{19}\text{F NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ -79.30 (dd, $J^1 = 10.8, J^2 = 232$ Hz, 1F), -103.40 (dd, $J^1 = 8.4, J^2 = 231.6$ Hz, 1F), -130.99 (t, $J = 9.8$ Hz, 1F) ppm.

4, 4, 5-Trifluoro-2-phényl-5-(p-tolyl)-4, 5-dihydrothiazole (4b)



Le composé (**4b**) est synthétisé selon la procédure générale décrite précédemment à partir de la 2-phényl-5-(p-tolyl) thiazole (0.125 g, 0.5 mmol, 1 eq), et du selectfluor (0.44 g, 1.24 mmol, 2.5 eq), dans 10 ml de l'acétonitrile anhydre pour donner (0.012 g, 0.04 mmol) 8%) de la fluorizoline (**4b**) sous forme d'un solide blanc.

Pf: 92°C.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.01 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.66 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.53 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 2.41 (s, 3H) ppm.

$^{19}\text{F NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ -79.4 (dd, $J^1 = 11.2, J^2 = 231.6$ Hz, 1F), -103.6 (dd, $J^1 = 9.4, J^2 = 231.4$ Hz, 1F), -129.88 à -129.83 (m, 1 F) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400, MHz, CDCl_3) δ 140.8, 134.3, 131.1, 129.3, 129.0, 127.0, 126.9, 21.3 ppm.

LCMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé: 307.1 trouvé: 307.0.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Des efforts considérables ont été consacrés et se consacrent au développement de nouvelles méthodes de synthèse efficaces et économiques en atome, en étapes et en énergie pour permettre l'obtention et l'utilisation des composés hétérocycliques bioactifs.

Dans ce contexte, dans un premier chapitre, réalisé au sein du laboratoire SYMBIO, nous avons mis au point de nouvelles conditions pour préparer des bibliothèques de triphénylimidazoles et des spirooxindoles par des réactions à composants multiples en présence d'acide citrique et de trifluorure de bore comme nouveaux catalyseurs respectivement.⁶⁹

Les études menées à Strasbourg ont permis de caractériser les requis structuraux d'une série d'iminobenzimidazoles pour leur cytotoxicité sur des cellules cancéreuses.⁷⁰ Ces études ont démontré la nécessité d'un substituant hydrophobe.

De plus, la fluorizoline a été préparée en quantité suffisante pour des études *in vivo*. Nos collaborateurs Luxembourgeois, les Drs Paggetti et Moussay, ont montré que la fluorizoline induit l'apoptose dans des cellules de leucémie lymphocytaire chronique *in vitro*, mais est inactive dans un modèle murin de leucémie.⁶⁸ Par ailleurs, le professeur Rajalingam à l'Université médicale de Mayence a montré pour la première fois que la liaison de la fluorizoline aux prohibitines inhibe l'activation de C-RAF sans affecter KRAS, ce qui la distingue des flavaglines qui, elles, peuvent inhiber l'activation de ces deux oncogènes.

Nous avons également synthétisé de nouveaux dérivés de la fluorizoline, qui sont actuellement en train d'être évalués dans le laboratoire du Pr. Rajalingam pour leurs effets sur l'activation de C-RAF.

Références

1. Surveillance, E.; Program, E. R., SEER* Stat Database: Incidence-SEER 9 Regs Public-Use, Nov 2004Sub (1973–2003). National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch: 2003.
2. Uçucu, Ü.; Karaburun, N. G.; Işikdağ, İ., Synthesis and analgesic activity of some 1-benzyl-2-substituted-4, 5-diphenyl-1H-imidazole derivatives. *Il Farmaco* **2001**,*56* (4), 285-290.
3. (a) Atwell, G. J.; Fan, J.-Y.; Tan, K.; Denny, W. A., DNA-directed alkylating agents. 7. Synthesis, DNA interaction, and antitumor activity of bis (hydroxymethyl)-and bis (carbamate)-substituted pyrrolizines and imidazoles. *Journal of medicinal chemistry* **1998**,*41* (24), 4744-4754;(b) Wang, L.; Woods, K. W.; Li, Q.; Barr, K. J.; McCroskey, R. W.; Hannick, S. M.; Gherke, L.; Credo, R. B.; Hui, Y.-H.; Marsh, K., Potent, orally active heterocycle-based combretastatin A-4 analogues: synthesis, structure–activity relationship, pharmacokinetics, and in vivo antitumor activity evaluation. *Journal of medicinal chemistry* **2002**,*45* (8), 1697-1711.
4. Laping, N.; Grygielko, E.; Mathur, A.; Butter, S.; Bomberger, J.; Tweed, C.; Martin, W.; Fornwald, J.; Lehr, R.; Harling, J., Inhibition of transforming growth factor (TGF)- β 1–induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF- β type I receptor kinase activity: SB-431542. *Molecular pharmacology* **2002**,*62* (1), 58-64.
5. Wang, Z.; Canagarajah, B. J.; Boehm, J. C.; Kassisà, S.; Cobb, M. H.; Young, P. R.; Abdel-Meguid, S.; Adams, J. L.; Goldsmith, E. J., Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinases. *Structure* **1998**,*6* (9), 1117-1128.
6. Newman, M. J.; Rodarte, J. C.; Benbatoul, K. D.; Romano, S. J.; Zhang, C.; Krane, S.; Moran, E. J.; Uyeda, R. T.; Dixon, R.; Guns, E. S., Discovery and characterization of OC144-093, a novel inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer research* **2000**,*60* (11), 2964-2972.
7. Heidorn, S. J.; Milagre, C.; Whittaker, S.; Nourry, A.; Niculescu-Duvas, I.; Dhomen, N.; Hussain, J.; Reis-Filho, J. S.; Springer, C. J.; Pritchard, C., Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* **2010**,*140* (2), 209-221.
8. Debus, H., Ueber die einwirkung des ammoniaks auf glyoxal. *European Journal of Organic Chemistry* **1858**,*107* (2), 199-208.
9. Japp, F. R.; Robinson, H., Constitution des Lophins und des Amarins. *European Journal of Inorganic Chemistry* **1882**,*15* (1), 1268-1270.
10. Radziszewski, B., Ueber die Constitution des Lophins und verwandter Verbindungen. *European Journal of Inorganic Chemistry* **1882**,*15* (2), 1493-1496.
11. (a) Weidenhagen, R.; Herrmann, R., Eine neue Synthese von Imidazol-Derivaten. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1935**,*68* (10), 1953-1961;(b) Weidenhagen, R.; Hermann, R., 4-Hydroxymethylimidazole. *Ber. Dtsch. Chem. Ges* **1937**,*70*, 570-583.
12. (a) Breslin, H. J.; Miskowski, T. A.; Rafferty, B. M.; Coutinho, S. V.; Palmer, J. M.; Wallace, N. H.; Schneider, C. R.; Kimball, E. S.; Zhang, S.-P.; Li, J., Rationale, design, and synthesis of novel phenyl imidazoles as opioid receptor agonists for gastrointestinal disorders. *Journal of medicinal chemistry* **2004**,*47* (21), 5009-5020;(b) Baldwin, J.; Engelhardt, E.; Hirschmann, R.; Lundell, G.; Ponticello, G.; Ludden, C.; Sweet, C.; Scriabine, A.; Share, N.; Hall, R., . beta.-Adrenergic blocking agents with acute antihypertensive activity. *Journal of medicinal chemistry* **1979**,*22* (6), 687-694;(c) James, D. S.; Fanta, P. E., 4, 5-Diphenyl-3-nitrofurfurylideneaniline from the Reaction of Sodium 2-Nitro-3-oxosuccinaldehyde with Aniline Hydrochloride and Benzaldehyde. *The Journal of Organic Chemistry* **1963**,*28* (2), 390-393.

Références

13. Marques, M. V.; Ruthner, M. M.; Fontoura, L. A.; Russowsky, D., Metal chloride hydrates as Lewis acid catalysts in multicomponent synthesis of 2, 4, 5-triarylimidazoles or 2, 4, 5-triaryloxazoles. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2012**,*23* (1), 171-179.
14. Wolkenberg, S. E.; Wisnoski, D. D.; Leister, W. H.; Wang, Y.; Zhao, Z.; Lindsley, C. W., Efficient synthesis of imidazoles from aldehydes and 1, 2-diketones using microwave irradiation. *Organic letters* **2004**,*6* (9), 1453-1456.
15. Elumalai, S.; Somasundaran, D.; Guhanathan, S., Green Synthesis of Glycine Catalyzed Triaryl Imidazoles Under Solvent Free Conditions.
16. Zheng, H.; Shi, Q. Y.; Du, K.; Mei, Y. J.; Zhang, P. F., One-pot synthesis of 2, 4, 5-trisubstituted imidazoles catalyzed by lipase. *Catalysis letters* **2013**,*143* (1), 118-121.
17. Maleki, B.; Sedigh Ashrafi, S., N-Bromosuccinimide catalyzed three component one-pot efficient synthesis of 2, 4, 5-triaryl-1H-imidazoles from aldehyde, ammonium acetate, and 1, 2-diketone or α -hydroxyketone. *Journal of the Mexican Chemical Society* **2014**,*58* (1), 76-81.
18. Marzouk, A. A.; Abbasov, V. M.; Talybov, A. H.; Mohamed, S. K., Synthesis of 2, 4, 5-triphenyl imidazole derivatives using diethyl ammonium hydrogen phosphate as green, fast and reusable catalyst. *World Journal of Organic Chemistry* **2013**,*1* (1), 6-10.
19. Yu, C.; Lei, M.; Su, W.; Xie, Y., Europium Triflate-Catalyzed One-Pot Synthesis of 2, 4, 5-Trisubstituted-1 H-imidazoles via a Three-component Condensation. *Synthetic Communications* **2007**,*37* (19), 3301-3309.
20. Safari, J.; Khalili, S. D.; Banitaba, S. H., A novel and an efficient catalyst for one-pot synthesis of 2, 4, 5-trisubstituted imidazoles by using microwave irradiation under solvent-free conditions. *Journal of chemical sciences* **2010**,*122* (3), 437-441.
21. Siddiqui, S. A.; Narkhede, U. C.; Palimkar, S. S.; Daniel, T.; Lahoti, R. J.; Srinivasan, K. V., Room temperature ionic liquid promoted improved and rapid synthesis of 2, 4, 5-triaryl imidazoles from aryl aldehydes and 1, 2-diketones or α -hydroxyketone. *Tetrahedron* **2005**,*61* (14), 3539-3546.
22. Safari, J.; Khalili, S. D.; Rezaei, M.; Banitaba, S. H.; Meshkani, F., Nanocrystalline magnesium oxide: a novel and efficient catalyst for facile synthesis of 2, 4, 5-trisubstituted imidazole derivatives. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly* **2010**,*141* (12), 1339-1345.
23. Carreira, E. M.; Fessard, T. C., Four-membered ring-containing spirocycles: synthetic strategies and opportunities. *Chemical reviews* **2014**,*114* (16), 8257-8322.
24. Lovering, F., Escape from flatland 2: complexity and promiscuity. *MedChemComm* **2013**,*4* (3), 515-519.
25. Peterson, L. F.; Lo, M.-C.; Liu, Y.; Giannola, D.; Mitrikeska, E.; Donato, N. J.; Johnson, C. N.; Wang, S.; Mercer, J.; Talpaz, M., Induction of p53 suppresses chronic myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma* **2017**,*58* (9), 2165-2175.
26. Hati, S.; Tripathy, S.; Dutta, P. K.; Agarwal, R.; Srinivasan, R.; Singh, A.; Singh, S.; Sen, S., Spiro [pyrrolidine-3, 3'-oxindole] as potent anti-breast cancer compounds: Their design, synthesis, biological evaluation and cellular target identification. *Scientific reports* **2016**,*6*, 32213.

Références

27. Tian, Y.; Nam, S.; Liu, L.; Yakushijin, F.; Yakushijin, K.; Buettner, R.; Liang, W.; Yang, F.; Ma, Y.; Horne, D., Spirooxindole derivative SOID-8 induces apoptosis associated with inhibition of JAK2/STAT3 signaling in melanoma cells. *PLoS one* **2012**, *7* (11), e49306.
28. Tian, Y.; Nam, S.; Liu, L.; Yakushijin, F.; Buettner, R.; Liang, W.; Yang, F.; Horne, D.; Jove, R., Spirooxindole derivative (SOID-8) inhibits proliferation and induces apoptosis by blocking JAK2/STAT3 signaling in melanoma cells. AACR: 2011.
29. Stucchi, M.; Lesma, G.; Meneghetti, F.; Rainoldi, G.; Sacchetti, A.; Silvani, A., Organocatalytic asymmetric Biginelli-like reaction involving isatin. *The Journal of organic chemistry* **2016**, *81* (5), 1877-1884.
30. Moghaddam, M. M.; Bazgir, A.; Akhondi, M. M.; Zarnani, A. H.; Ghahremanzadeh, R., Simple and efficient route to synthesis of functionalized spiro-[chromeno [2, 3-d] pyrimidine-3', 5-indoline]-tetraones by K-10 as a reusable catalyst. *Org. Chem. J* **2010**, *2*, 54-59.
31. Liang, B.; Kalidindi, S.; Porco Jr, J. A.; Stephenson, C. R., Multicomponent reaction discovery: three-component synthesis of spirooxindoles. *Organic letters* **2010**, *12* (3), 572-575.
32. Elinson, M. N.; Ilovaisky, A. I.; Dorofeev, A. S.; Merkulova, V. M.; Stepanov, N. O.; Miloserdov, F. M.; Ogibin, Y. N.; Nikishin, G. I., Electrocatalytic multicomponent transformation of cyclic 1, 3-diketones, isatins, and malononitrile: facile and convenient way to functionalized spirocyclic (5, 6, 7, 8-tetrahydro-4H-chromene)-4, 3'-oxindole system. *Tetrahedron* **2007**, *63* (42), 10543-10548.
33. Wu, C.; Shen, R.; Chen, J.; Hu, C., An efficient method for multicomponent synthesis of spiro [4H-pyran-oxindole] derivatives catalyzed by magnesium perchlorate. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2013**, *34* (8), 2431-2435.
34. Elwarrakya, L. M.; Abdel-Fattaha, M.; Garyb, B. D.; Piazzab, G. A.; Abadia, A. H., An efficient and green one-pot synthesis of novel spirooxindole derivatives with potential anti-tumor activity in an aqueous solvent. *Chem Rapid Commun* **2014**, *2* (2), 33-40.
35. Sadeghi, B.; Lasemi, Z.; Azimi, R., One-pot three-component synthesis of spirooxindoles catalyzed by nano Ag/kaolin. *Oriental Journal of Chemistry* **2015**, *31* (2), 1175-1179.
36. Spriggs, K. A.; Stoneley, M.; Bushell, M.; Willis, A. E., Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biology of the Cell* **2008**, *100* (1), 27-38.
37. Pelletier, J.; Graff, J.; Ruggero, D.; Sonenberg, N., Targeting the eIF4F translation initiation complex: a critical nexus for cancer development. *Cancer research* **2015**, *75* (2), 250-263.
38. Bhat, M.; Robichaud, N.; Hulea, L.; Sonenberg, N.; Pelletier, J.; Topisirovic, I., Targeting the translation machinery in cancer. *Nature reviews Drug discovery* **2015**, *14* (4), 261.
39. Goodfellow, I. G.; Roberts, L. O., Eukaryotic initiation factor 4E. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2008**, *40* (12), 2675-2680.
40. Culjkovic, B.; Topisirovic, I.; Borden, K. L., Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell cycle* **2007**, *6* (1), 65-69.
41. Hickey, E. D.; Weber, L. A.; Baglioni, C.; Kim, C. H.; Sarma, R. H., A relation between inhibition of protein synthesis and conformation of 5'-phosphorylated 7-methylguanosine derivatives. *Journal of molecular biology* **1977**, *109* (2), 173-183.

Références

42. (a) Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J., Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides. *Medicinal research reviews* **2000**,*20* (6), 417-451;(b) Jemielity, J.; Kowalska, J.; Rydzik, A. M.; Darzynkiewicz, E., Synthetic mRNA cap analogs with a modified triphosphate bridge—synthesis, applications and prospects. *New Journal of Chemistry* **2010**,*34* (5), 829-844.
43. Kentsis, A.; Topisirovic, I.; Culjkovic, B.; Shao, L.; Borden, K. L., Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**,*101* (52), 18105-18110.
44. Assouline, S.; Culjkovic, B.; Cocolakis, E.; Rousseau, C.; Beslu, N.; Amri, A.; Caplan, S.; Leber, B.; Roy, D.-C.; Miller, W. H., Molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): a proof-of-principle clinical trial with ribavirin. *Blood* **2009**,*114* (2), 257-260.
45. Moerke, N. J.; Aktas, H.; Chen, H.; Cantel, S.; Reibarkh, M. Y.; Fahmy, A.; Gross, J. D.; Degtarev, A.; Yuan, J.; Chorev, M., Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. *Cell* **2007**,*128* (2), 257-267.
46. Fan, S.; Li, Y.; Yue, P.; Khuri, F. R.; Sun, S.-Y., The eIF4E/eIF4G interaction inhibitor 4EGI-1 augments TRAIL-mediated apoptosis through c-FLIP Down-regulation and DR5 induction independent of inhibition of cap-dependent protein translation. *Neoplasia* **2010**,*12* (4), 346-356.
47. Cencic, R.; Hall, D. R.; Robert, F.; Du, Y.; Min, J.; Li, L.; Qui, M.; Lewis, I.; Kurtkaya, S.; Dingleline, R., Reversing chemoresistance by small molecule inhibition of the translation initiation complex eIF4F. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**.
48. Graff, J. R.; Konicek, B. W.; Vincent, T. M.; Lynch, R. L.; Monteith, D.; Weir, S. N.; Schwier, P.; Capen, A.; Goode, R. L.; Dowless, M. S., Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity. *The Journal of clinical investigation* **2007**,*117* (9), 2638-2648.
49. Hong, D. S.; Kurzrock, R.; Oh, Y.; Wheler, J. J.; Naing, A.; Brail, L.; Callies, S.; Andre, V. A.; Kadam, S. K.; Nasir, A., A phase 1 dose-escalation, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation of eif-4e antisense oligonucleotide ly2275796 in patients with advanced cancer. *Clinical Cancer Research* **2011**, clincanres. 0430.2011.
50. Duffy, A.; Makarova-Rusher, O.; Ulahannan, S.; Rahma, O.; Fioravanti, S.; Walker, M.; Abdullah, S.; Raffeld, M.; Anderson, V.; Abi-Jaoudeh, N., Modulation of tumor eIF4E by antisense inhibition: A phase I/II translational clinical trial of ISIS 183750—an antisense oligonucleotide against eIF4E—in combination with irinotecan in solid tumors and irinotecan-refractory colorectal cancer. *International journal of cancer* **2016**,*139* (7), 1648-1657.
51. Osborne, M. J.; Borden, K. L., The eukaryotic translation initiation factor eIF 4E in the nucleus: taking the road less traveled. *Immunological reviews* **2015**,*263* (1), 210-223.
52. Rogers, G. W.; Richter, N. J.; Lima, W. F.; Merrick, W. C., Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *Journal of Biological Chemistry* **2001**,*276* (33), 30914-30922.
53. (a) Mavrova, A. T.; Wesselinova, D.; Vassilev, N.; Tsenov, J. A., Design, synthesis and antiproliferative properties of some new 5-substituted-2-iminobenzimidazole derivatives. *European journal of medicinal chemistry* **2013**,*63*, 696-701;(b) Diop, D.; Chauvin, C.; Salhi, S.; Poupat, C.; Ahond, A.; Jean-Jean, O., Girolline interferes with cell-cycle progression, but not with translation. *Comptes rendus biologies* **2007**,*330* (12), 855-860.

Références

54. Moncunill-Massaguer, C.; Saura-Esteller, J.; Pérez-Perarnau, A.; Palmeri, C. M.; Núñez-Vázquez, S.; Cosialls, A. M.; González-Gironès, D. M.; Pomares, H.; Korwitz, A.; Preciado, S., A novel prohibitin-binding compound induces the mitochondrial apoptotic pathway through NOXA and BIM upregulation. *Oncotarget* **2015**,*6* (39), 41750.
55. H, P.; CM, P.; D, I.-S.; C, M.-M.; J, S.-E.; S, N.-V.; E, G.; M, A.; S, P.; F, A.; R, L.; G, P.; EM, G.-B.; AM, C.; J, G., - Targeting prohibitins induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget* **2016**,*7* (40), 64987-65000.
56. Pérez-Perarnau, A.; Preciado, S.; Palmeri, C. M.; Moncunill-Massaguer, C.; Iglesias-Serret, D.; González-Gironès, D. M.; Miguel, M.; Karasawa, S.; Sakamoto, S.; Cosialls, A. M., A Trifluorinated Thiazoline Scaffold Leading to Pro-apoptotic Agents Targeting Prohibitins. *Angewandte Chemie* **2014**,*126* (38), 10314-10318.
57. Pérez-Perarnau, A.; Preciado, S.; Palmeri, C. M.; Moncunill-Massaguer, C.; Iglesias-Serret, D.; González-Gironès, D. M.; Miguel, M.; Karasawa, S.; Sakamoto, S.; Cosialls, A. M.; Rubio-Patiño, C.; Saura-Esteller, J.; Ramón, R.; Caja, L.; Fabregat, I.; Pons, G.; Handa, H.; Albericio, F.; Gil, J.; Lavilla, R., A Trifluorinated Thiazoline Scaffold Leading to Pro-apoptotic Agents Targeting Prohibitins. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**,*53* (38), 10150-10154.
58. Yurugi, H.; Marini, F.; Weber, C.; David, K.; Zhao, Q.; Binder, H.; Désaubry, L.; Rajalingam, K., Targeting prohibitins with chemical ligands inhibits KRAS-mediated lung tumours. *Oncogene* **2017**,*36* (33), 4778.
59. Turner, G. L.; Morris, J. A.; Greaney, M. F., Direct arylation of thiazoles on water. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**,*46* (42), 7996-8000.
60. Tani, S.; Uehara, T. N.; Yamaguchi, J.; Itami, K., Programmed synthesis of arylthiazoles through sequential C–H couplings. *Chemical Science* **2014**,*5* (1), 123-135.
61. Li, Z.; Khaliq, M.; Zhou, Z.; Post, C. B.; Kuhn, R. J.; Cushman, M., Design, synthesis, and biological evaluation of antiviral agents targeting flavivirus envelope proteins. *Journal of medicinal chemistry* **2008**,*51* (15), 4660-4671.
62. Zhang, F.; Greaney, M. F., Decarboxylative cross-coupling of azoyl carboxylic acids with aryl halides. *Organic letters* **2010**,*12* (21), 4745-4747.
63. Turner, G. L.; Morris, J. A.; Greaney, M. F., Direct arylation of thiazoles on water. *Angewandte Chemie* **2007**,*119* (42), 8142-8146.
64. Yamanaka, H.; Ohba, S.; Sakamoto, T., On the Reactivity of Halo-1, 3-azoles and Related Compounds Toward Aromatic SN2 Substitution. *ChemInform* **1990**,*21* (50).
65. Takfaoui, A.; Zhao, L.; Touzani, R.; Soulé, J.-F.; Dixneuf, P. H.; Doucet, H., One pot Pd (OAc) 2-catalysed 2, 5-diarylation of imidazoles derivatives. *Tetrahedron* **2014**,*70* (44), 8316-8323.
66. Pomares, H.; Palmeri, C. M.; Iglesias-Serret, D.; Moncunill-Massaguer, C.; Saura-Esteller, J.; Núñez-Vázquez, S.; Gamundi, E.; Arnan, M.; Preciado, S.; Albericio, F., Targeting prohibitins induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget* **2016**,*7* (40), 64987.
67. Cosialls, A. M.; Pomares, H.; Iglesias-Serret, D.; Saura-Esteller, J.; Núñez-Vázquez, S.; González-Gironès, D. M.; de la Banda, E.; Preciado, S.; Albericio, F.; Lavilla, R., The prohibitin-binding compound fluorizoline induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through the upregulation of NOXA

Références

and synergizes with ibrutinib, 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside or venetoclax. *Haematologica* **2017**,102 (9), 1587-1593.

68. Wierz, M.; Pierson, S.; Chouha, N.; Desaubry, L.; Francois, J. H.; Berchem, G.; Paggetti, J.; Moussay, E., The prohibitin-binding compound fluorizoline induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells ex vivo but fails to prevent leukemia development in a murine model. *Haematologica* **2018**.

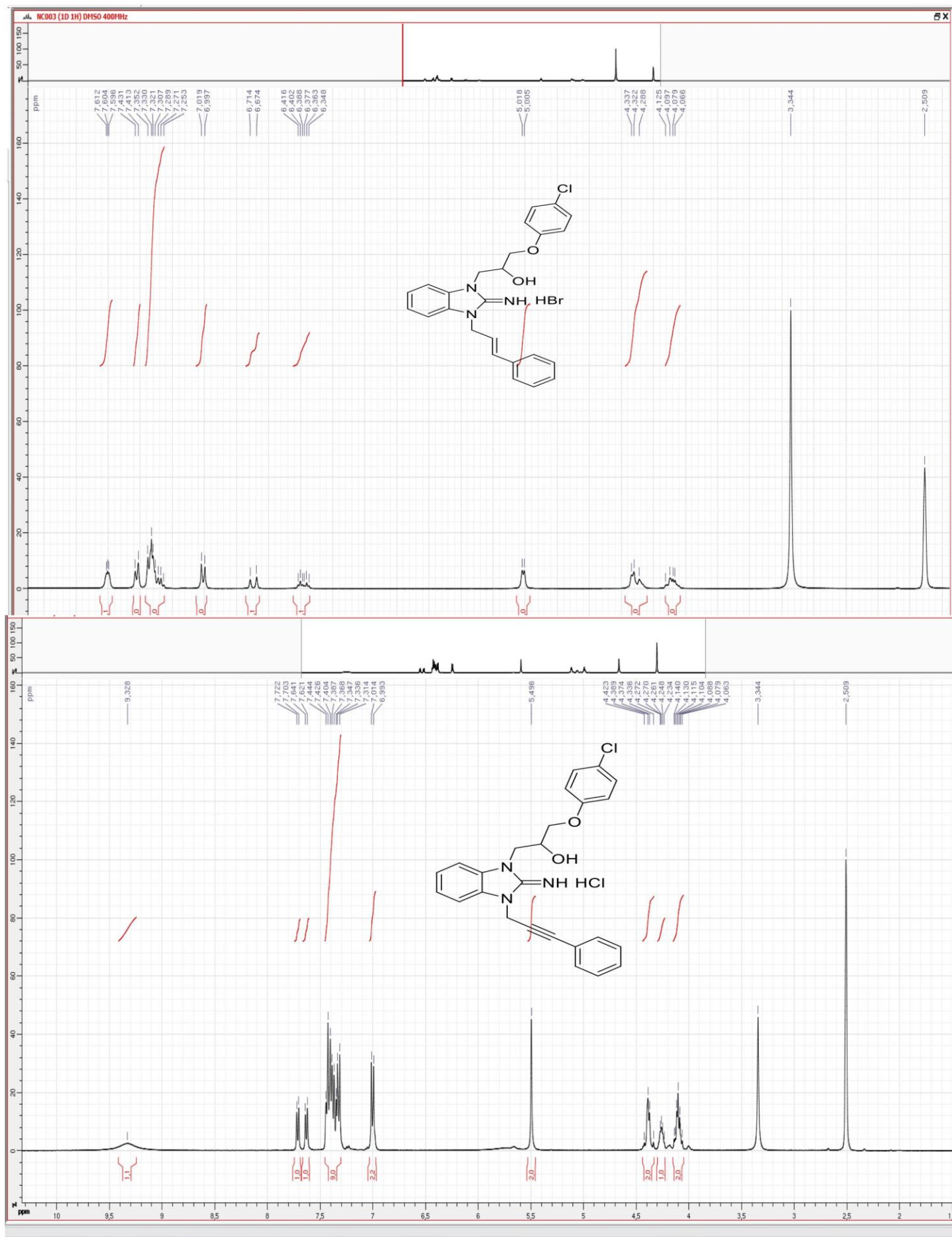
69. Chouha, N.; Boumoud, T.; Boumoud, B.; Debache, A., Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2018, 10 (3): 113-117. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **2018**,10 (3), 113-117.

70. Chouha, N.; Hammoud, H.; Brogi, S.; Campiani, G.; Welsch, C.; Robert, C.; Vagner, S.; Cresteil, T.; Bentouhami, E.; Désaubry, L., Discovery of Iminobenzimidazole Derivatives as Novel Cytotoxic Agents. *The Open Medicinal Chemistry Journal* **2018**,12 (1).

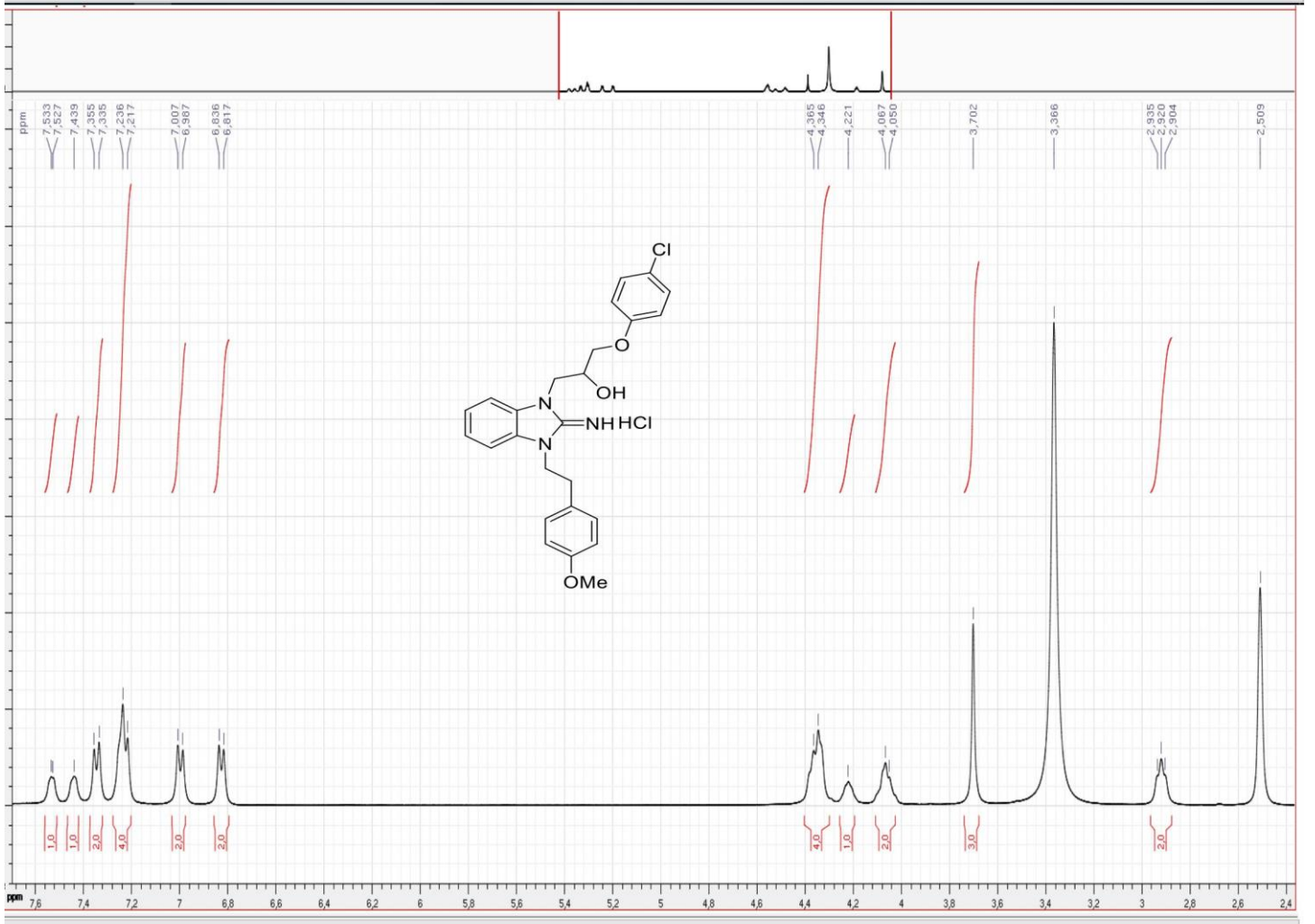
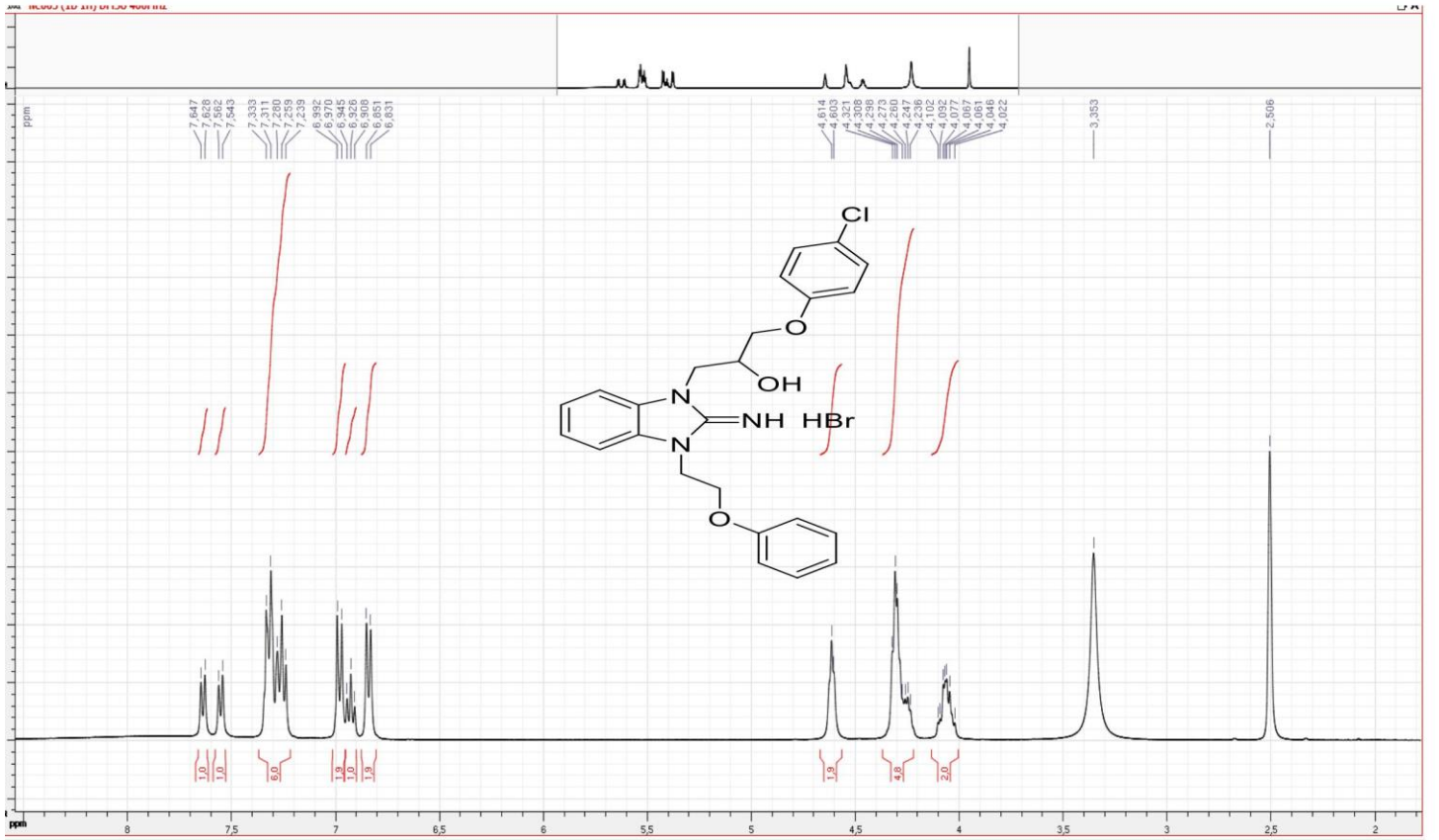
71. Chouha, N.; Boumoud T.;Tebabel, I.; Boumoud, B.; Debache, A., An efficient one-pot synthesis of 2,4,5-trisubstitued imidazole catalyzed by citric acid , *Der Pharma Chem*, **2016**,8(4) .

**Annexe 1 : Enregistrements
spectroscopiques**

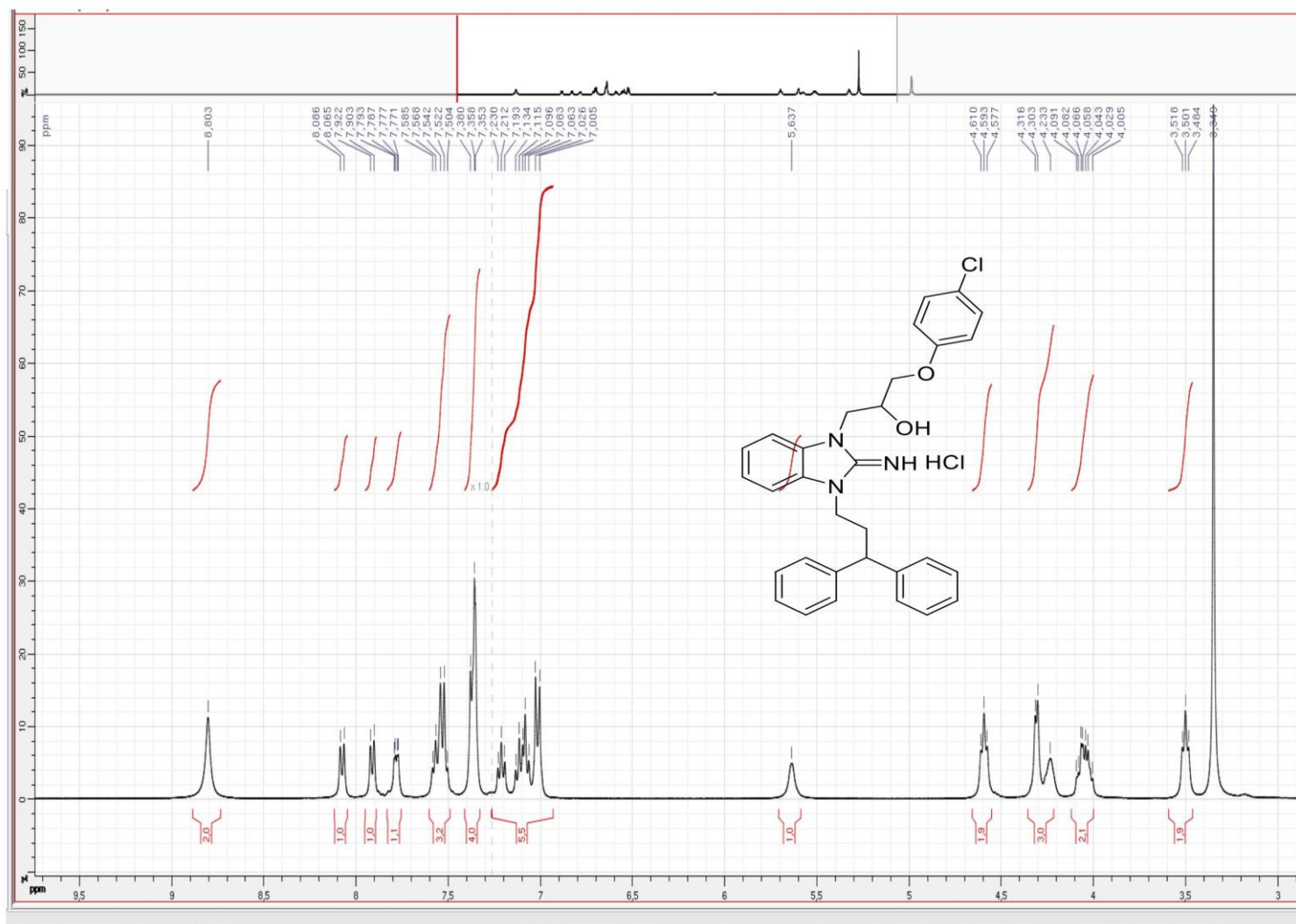
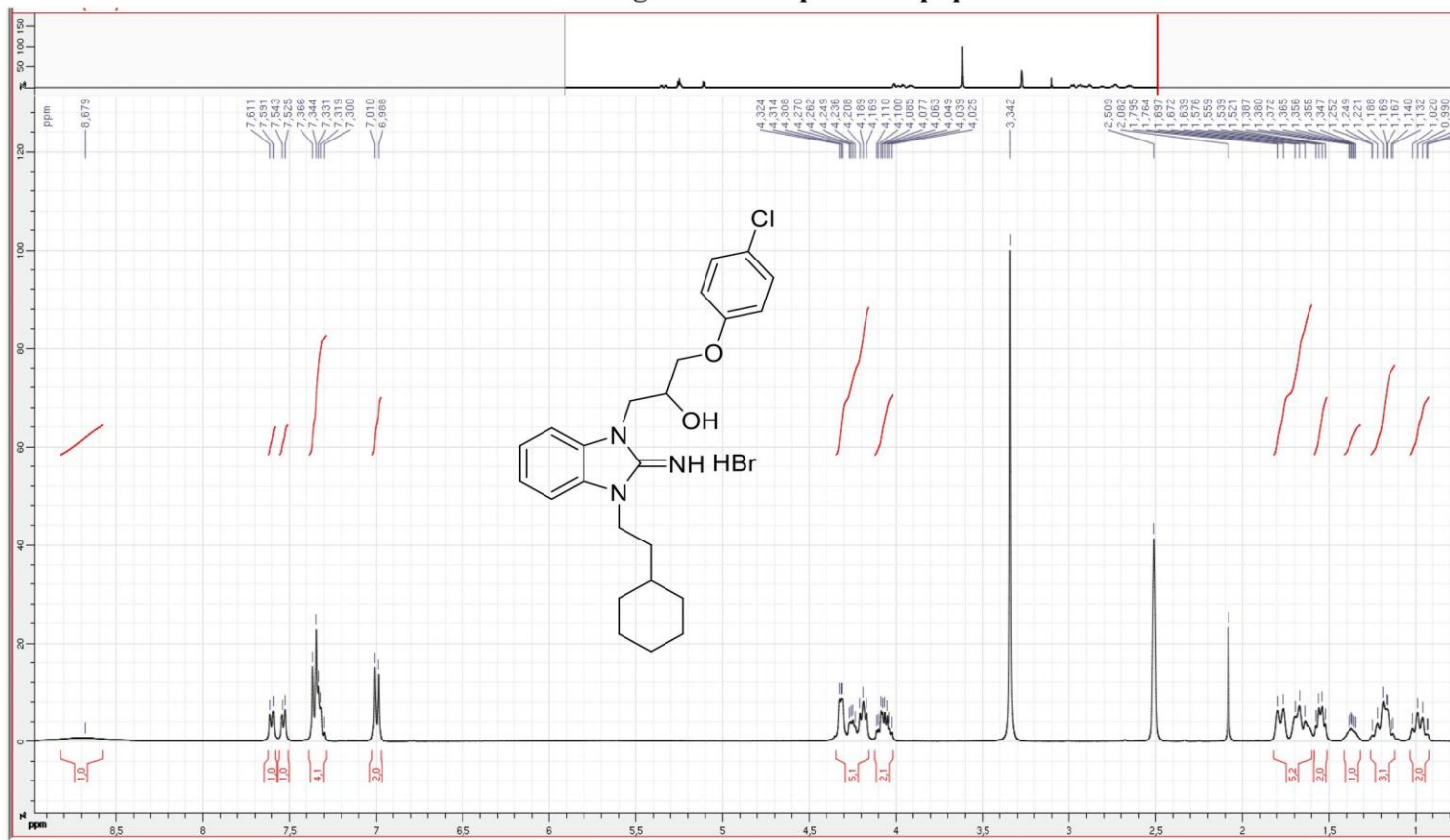
Enregistrements spectroscopiques



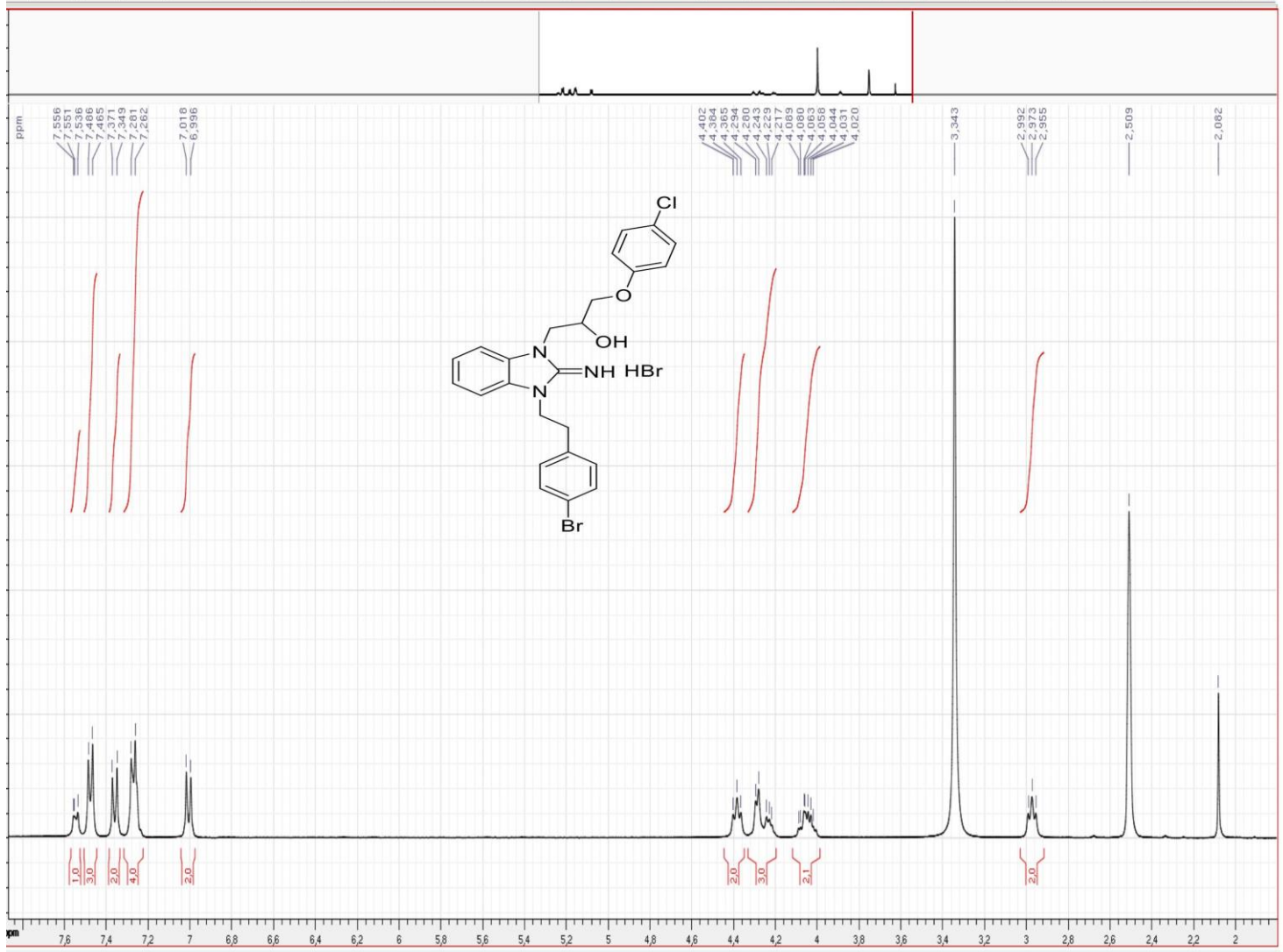
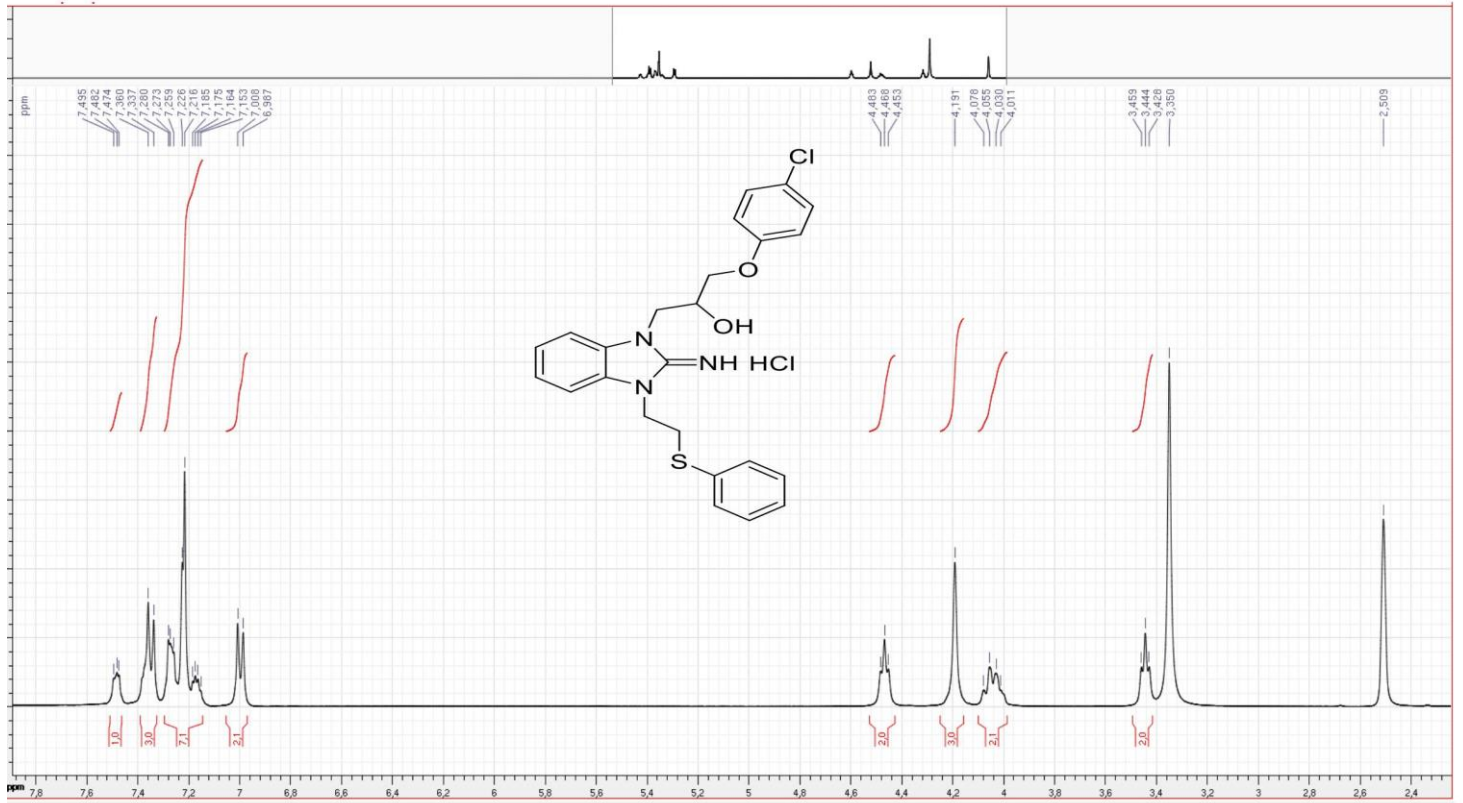
Enregistrements spectroscopiques



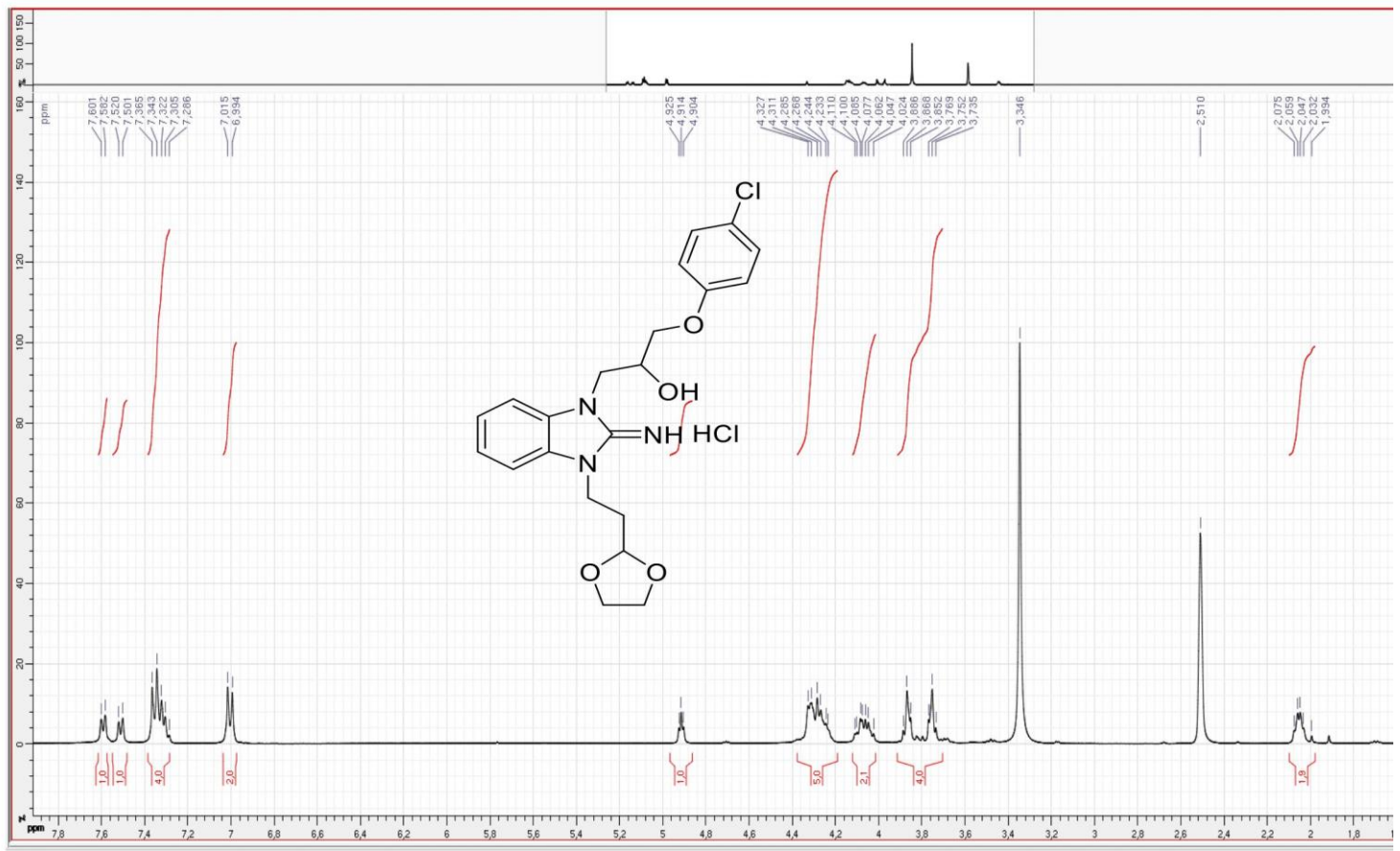
Enregistrements spectroscopiques



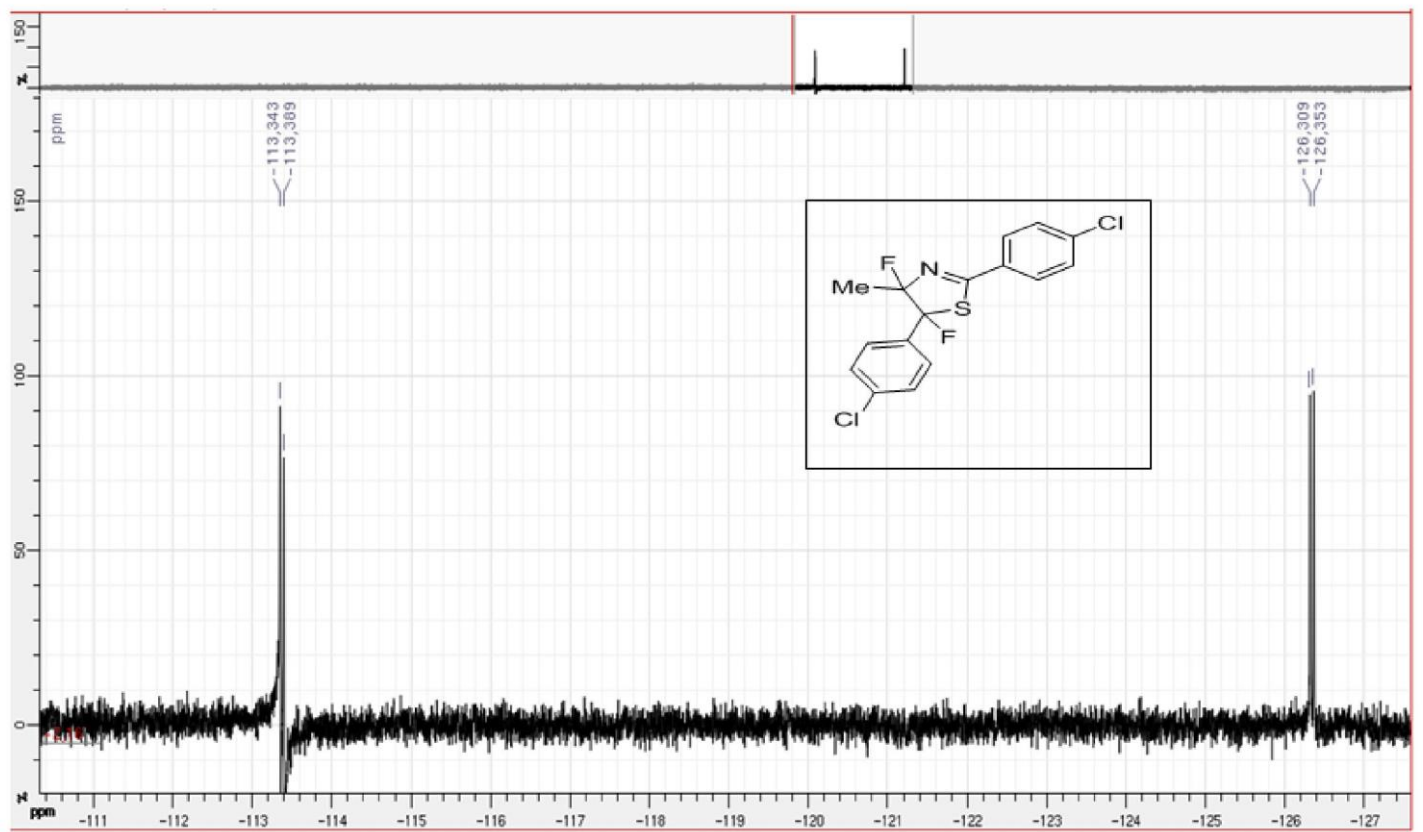
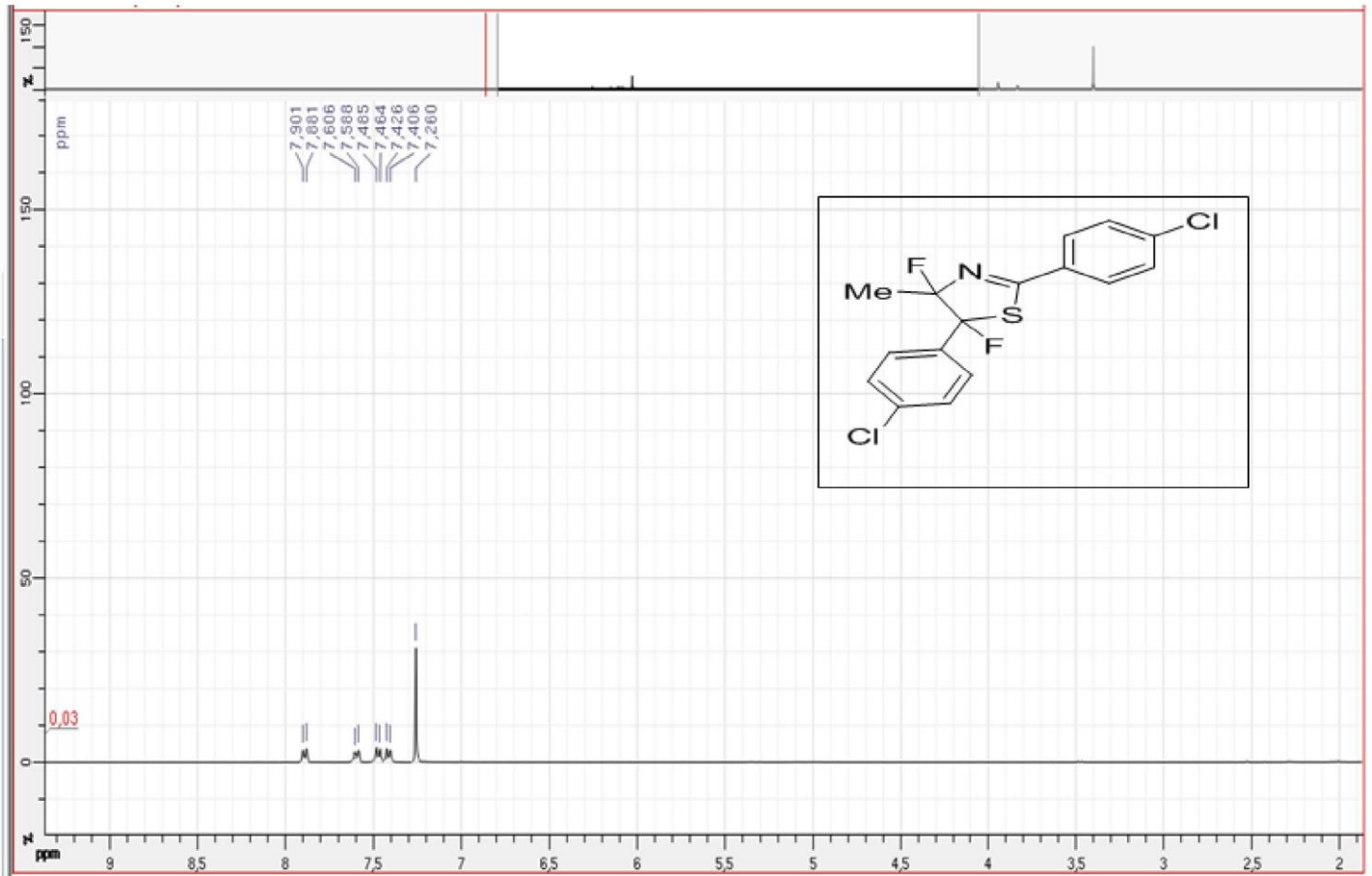
Enregistrements spectroscopiques



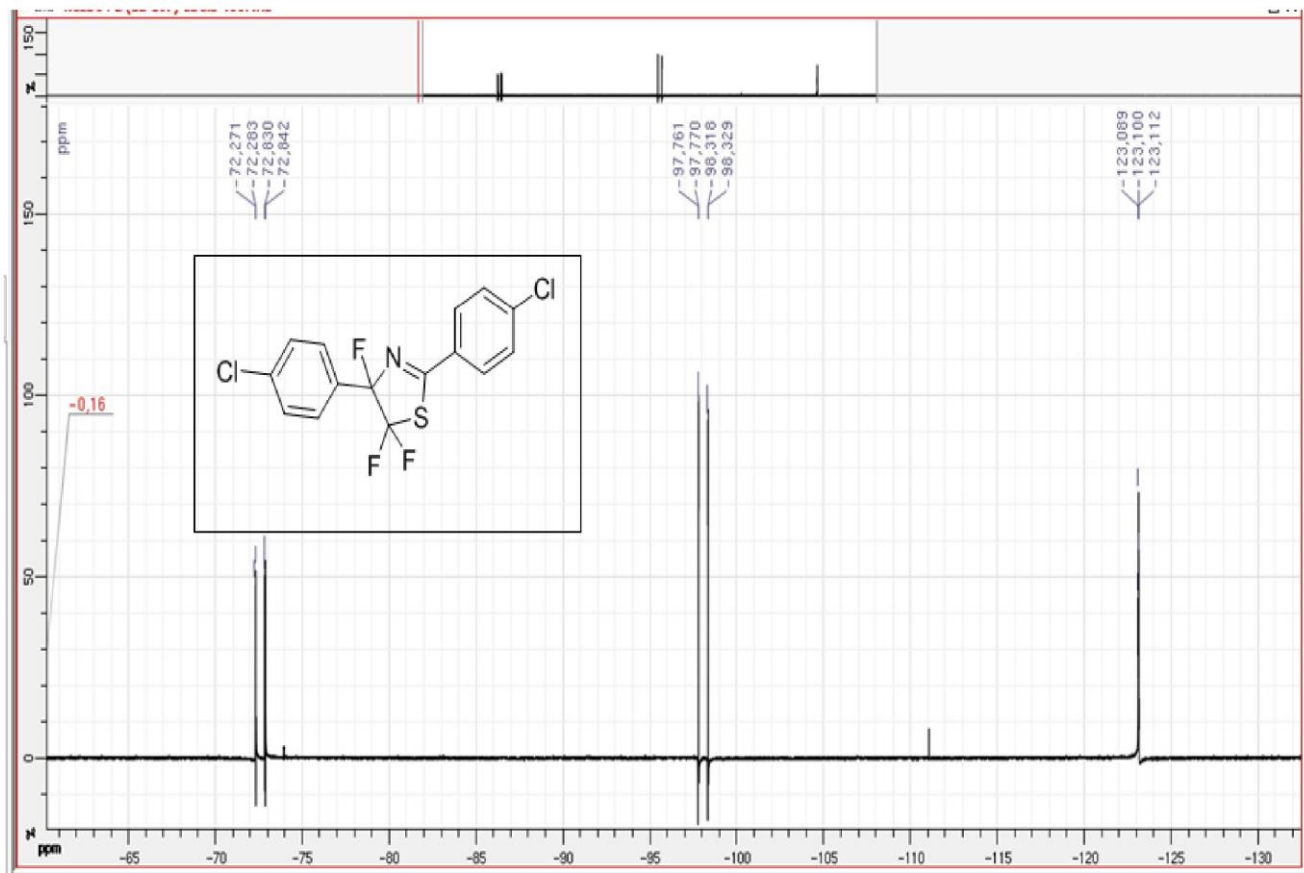
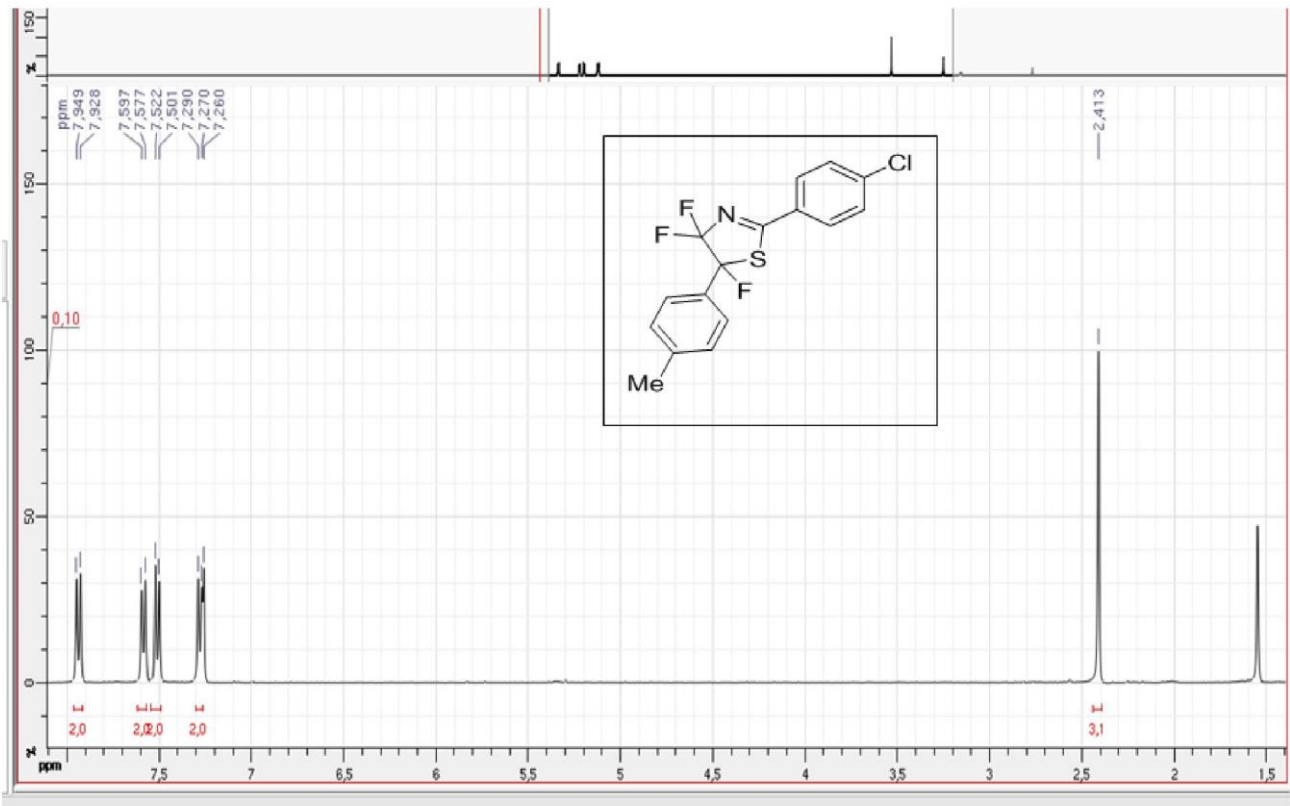
Enregistrements spectroscopiques



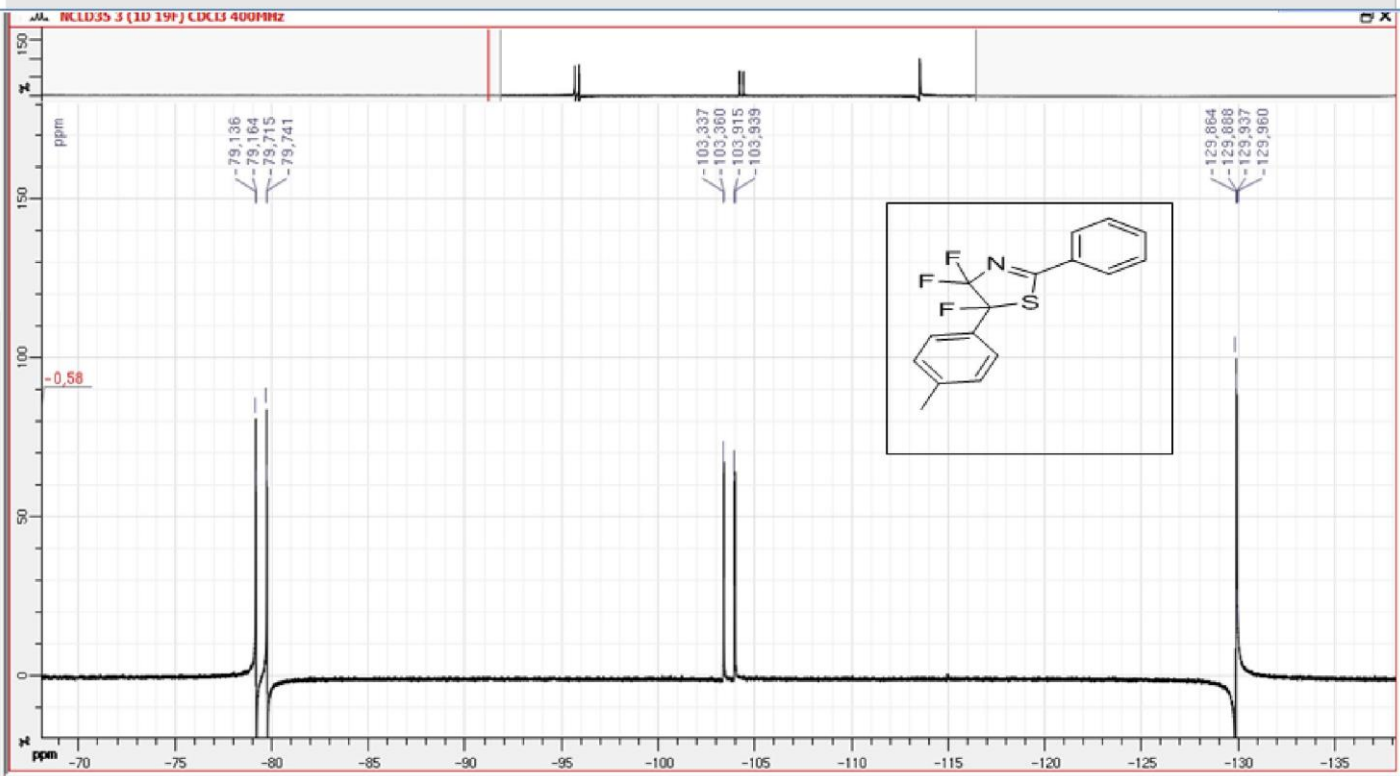
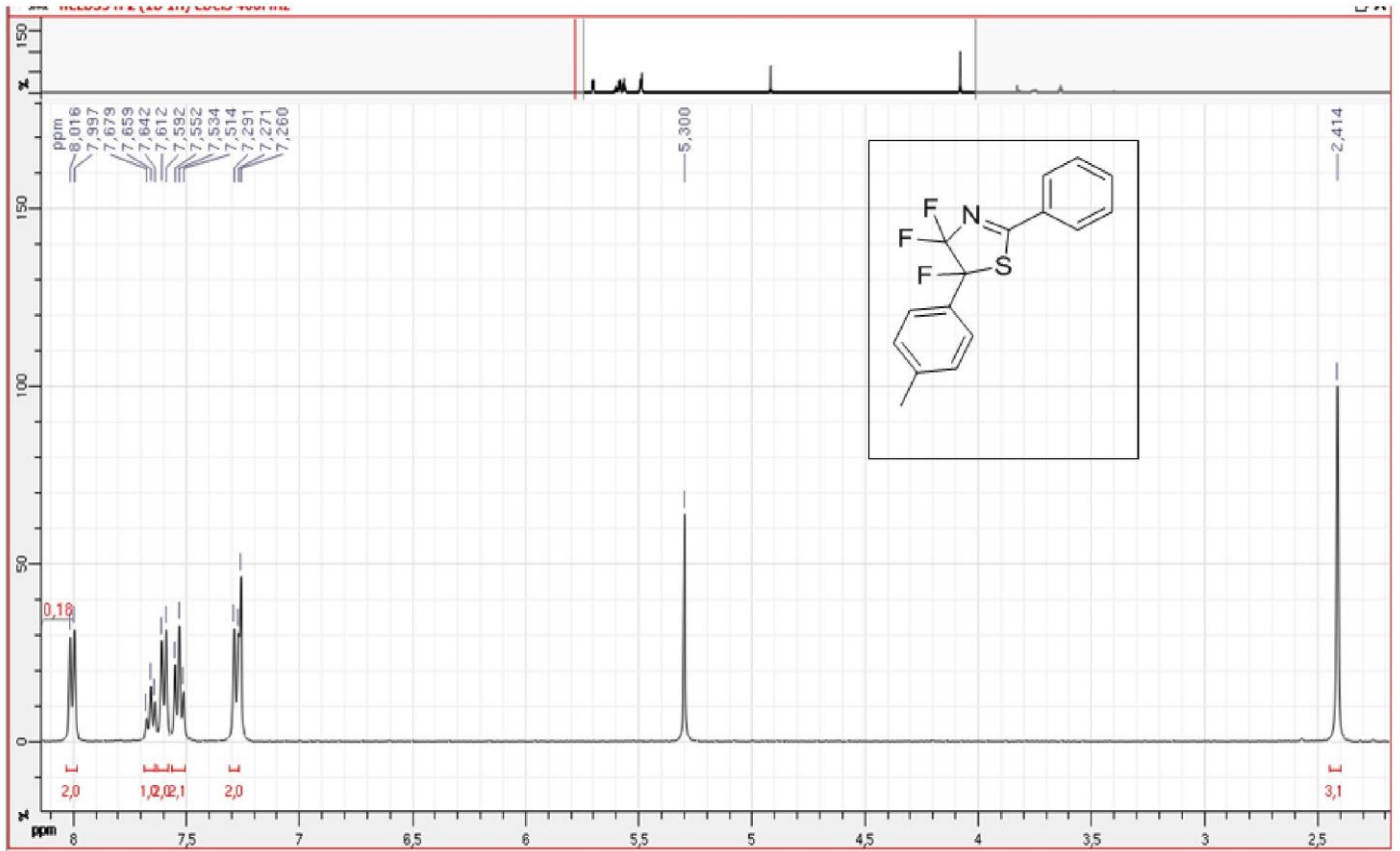
Enregistrements spectroscopiques



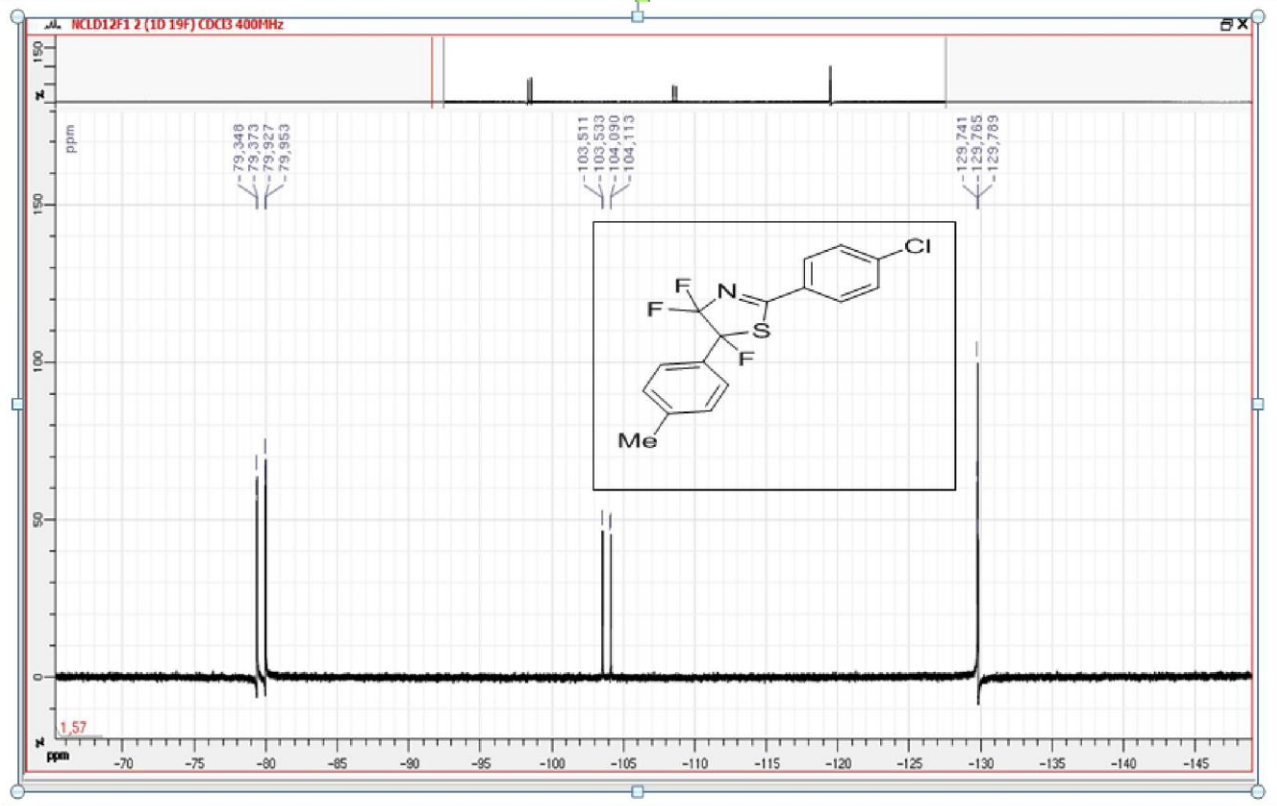
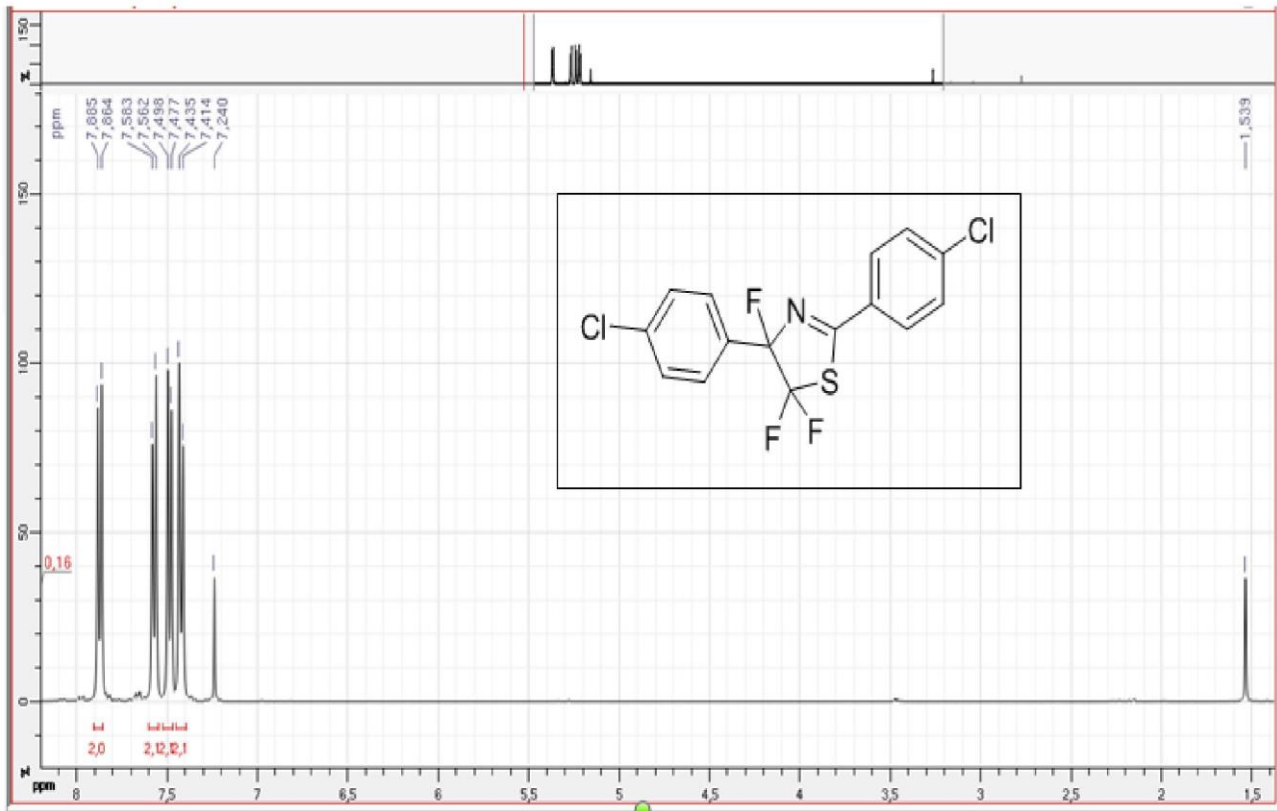
Enregistrements spectroscopiques



Enregistrements spectroscopiques



Enregistrements spectroscopiques



Annexe 2 : Publications

Publication N° 01

**An efficient one-pot synthesis of 2,4,5-trisubstituted imidazole
catalysed by citric acid**

**Nora CHOUHA, Taoues BOUMOUD,* Imane TEBABEL, Boudjemaa BOUMOUD
and Abdelmadjid DEBACHE**



ISSN 0975-413X
CODEN (USA): PCHHAX

Der Pharma Chemica, 2016, 8(4):202-206
(<http://derpharmachemica.com/archive.html>)

An efficient one-pot synthesis of 2,4,5-trisubstituted imidazole catalysed by citric acid

Nora CHOUHA, Taoues BOUMOU, * Imane TEBABEL, Boudjemaa BOUMOU and Abdelmadjid DEBACHE

Laboratoire de Synthèse de Molécules d'Intérêts Biologiques, Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes, Université des Frères Mentouri Constantine, 25000 Constantine, Algérie

ABSTRACT

From synthesis view-point, multicomponent reactions catalysed by metal-free catalysts have proven themselves better alternatives because of better economical, ecological and toxicological profiles. In this context, herein, we report a facile and efficient synthesis of 2,4,5-triarylsubstituted imidazole derivatives via three-component condensation reaction in the presence of a catalytic amount of citric acid.

Keywords: one-pot, 2,4,5-triarylimidazoles, metal-free catalysts, three-component, citric acid, Debus-Radziszewski condensation, MCRs.

INTRODUCTION

The use of multicomponent reactions (MCRs), to generate interesting and novel drug-like scaffolds, becomes one challenging goal for organic chemists since they offer significant advantages over conventional linear stepwise syntheses [1]. Indeed, MCRs have been used extensively to form heterocyclic and complex structures, not easily accessible via classical synthetic reactions.

On the other hand, imidazole ring containing heterocycles have been of great interest for organic chemists due to their useful biological and pharmacological aspects [2]. For example, it is reported that many of substituted imidazoles can act as fungicides, herbicides, plant growth regulators [3], antibacterial [4], antitumor [5] and glucagon receptors [6]. In addition, they can be used in ionic liquids [7-10] that have been given a new approach to "Green Chemistry". Subsequently, a variety of methods have been used to prepare these heterocyclic compounds involving several Brønsted and Lewis acids in liquid or solid-phase conditions [11]. In spite of being effective, some of the reported methods have certain limitations such as complex work-up and purification, significant amounts of waste materials, strongly acidic conditions, low yields and the use of expensive reagents and toxic catalysts. Hence, it is important to continue to search for simpler, effective, cleaner, economical and environmentally safer protocols. In this context, the use of catalysts containing transition metals is less appropriate, due not only to their hazardous properties but also because, in many cases, these catalysts are moisture sensitive, very toxic, difficult to handle, act contrary to the principles of green chemistry to some extent, when used in large amounts, and give metal contaminated products which are usually difficult to purify. Thus, metal-free catalysts start to be more and more important in this century for the construction of new and useful molecules due to their remarkable eco-compatibility as they do not contain metals.

All these facts have strengthened ourselves to find newer eco-friendly method and prompted us to employ citric acid (Figure 1) as a metal-free catalyst for efficient and high-yielding synthesis of 2,4,5-triarylimidazole derivatives via Debus-Radziszewski one-pot three-component condensation of benzil, ammonium acetate and aromatic aldehydes as shown in Scheme 1.

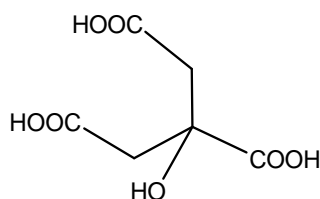


Figure 1: 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid (citric acid)

MATERIALS AND METHODS

Chemistry

All products are known and were characterized by comparison of their physical and spectroscopic data with those of authentic samples. Melting points were measured using a fine control Electro thermal capillary apparatus and are uncorrected. IR spectra were obtained as KBr pellets with a Shimadzu FT IR-8201 PC spectrometer. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded in DMSO- d_6 and/or CDCl_3 on a Bruker Avance DPX spectrometer. Chemical shifts (δ) are reported in ppm and J values in hertz (Hz).

General procedure for the preparation of 2,4,5-triarylimidazoles (4a-m):

A mixture of benzil **1** (10 mmol), ammonium acetate **2** (30 mmol), aromatic aldehyde **3** (10 mmol) and citric acid (15 mol%) was stirred in refluxed ethanol (5 ml) for the appropriate time as mentioned in Table 1. After completion of reaction, as monitored by TLC, the reaction mixture was cooled to room temperature and diluted with excess of cold water. The solid product that separated out, was filtered, washed with excess of water and further recrystallized from acetone/water (9/1) to result the corresponding 2,4,5-triarylimidazole **4** in a pure state (Scheme 1).

The structures of all the prepared products were unambiguously established on the basis of their spectral analysis (IR, ^1H & ^{13}C NMR) and melting points.

2,4,5-Triphenyl-1H-imidazole (4a): Yield: 92%; mp 273-275°C; IR cm^{-1} : 3429.2 (N-H), 3043.5 (CH aromatic), 1600 (C=C), 1492.8 (C=N); ^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.22 - 7.60 (m, 13H, CH aromatic), 8.10 (d, 2H, CH aromatic, $J = 7.7$ Hz), 12.70 (s, 1H, N-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 125.33, 126.69, 127.23, 127.94, 128.36, 128.58, 128.85, 130.43, 131.17, 135.25, 137.23, 145.67.

2-(4-Methylphenyl)-4,5-diphenyl-1H-imidazole (4b): Yield: 82%; mp 229-232°C; IR cm^{-1} : 3417.6 (N-H), 3039.6 (CH aromatic), 1604.7 (C=C), 1490.8 (C=N); ^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$) δ : 2.30 (s, 3H, CH_3), 7.49 - 7.93 (d, 2H, CH aromatic, $J = 6.9, 7.9$ Hz), 7.18 - 7.30 (m, 12H, CH aromatic), 12.40 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 20.89, 125.08, 127.06, 127.56, 127.80, 128.19, 128.87, 137.39, 145.74.

2-(3-Methoxyphenyl)-4,5-diphenyl-1H-imidazole (4c): Yield: 80%; mp 258°C; IR cm^{-1} : 3290.3 (NH), 2966.3 (CH aromatic), 1631.7 (C=N), 1542.1 (C=C), 1028 (C-O); ^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.80 (s, 3H, O- CH_3), 6.85 (dd, 1H, CH aromatic, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.7$ Hz), 6.29 - 7.72 (m, 13H, CH aromatic), 12.50 (s, 1H, N-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 54.89, 110.06, 113.88, 117.53, 119.68, 127.95, 129.22, 131.47, 145.49, 159.34.

2-(2-Nitrophenyl)-4,5-diphenyl-1H-imidazole (4d): Yield: 65%; mp 227-229°C; IR cm^{-1} : 3421 (NH), 2928 (CH aromatic), 1596 (C=N), 1515 (NO_2), 1345 (NO_2); ^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.25 - 8.01 (m, 14H, CH aromatic), 12.98 (s, 1H, N-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 123.9, 124.5, 127.20, 127.51, 128.52, 128.70, 129.10, 129.21, 130.01, 130.32, 131.02, 132.61, 135.21, 138.00, 141.41, 148.80.

2-(2-Methylphenyl)-4,5-diphenyl-1H-imidazole (4f): Yield: 75%; mp 208-210°C; IR cm^{-1} : 3433.1 (NH), 3028.0 (CH aromatic), 1596.9 (C=N); ^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$) δ : 2.70 (s, 3H, CH_3), 7.15 - 7.71 (m, 14H, CH aromatic), 12.35 (s, 1H, NH).

2-(2-Methoxyphenyl)-4,5-diphenyl-1H-imidazole (4g): Yield: 81%; mp 211-213°C; IR cm^{-1} : 3433.1 (N-H), 3070.5 (CH aromatic), 2356.9, 1598.1 (C=C), 1463.6 (C=N), 1030 (C-O); ^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.90 (s, 3H, O- CH_3), 7.05 - 8.09 (m, 14H, CH aromatic), 11.90 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 55.31, 111.09, 118.22, 120.43, 126.79, 127.67, 128.03, 128.57, 129.53, 132.78, 155.77.

2-(2,4-Dichlorophenyl)-4,5-diphenyl-1H-imidazole (4h): Yield: 70%; mp 174-175°C; IR cm^{-1} : 3433.1 (N-H), 3062.7 (CH aromatic), 1679 (C=C), 1598.9 (C=N); ^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.21 - 7.56 (m, 12H, CH

aromatic) 7.82 (dd, 1H, CH aromatic, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz), 12.60 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 119.25, 126.37, 127.00, 127.14, 127.48, 127.89, 128.10, 128.32, 128.69, 129.49, 132.23, 132.37, 133.87, 137.10, 142.32

2-(4-Chlorophenyl)-4,5-diphenyl-1H-imidazole (4i): Yield: 78%; mp 263-264°C; IR cm^{-1} : 3294.2 (N-H), 2846.7 (CH aromatic), 1635.5 (C=C), 1368.4 (C=N); ^1H NMR (CDCl₃/ DMSO- d_6) δ : 7.20 - 7.55 (m, 12H, CH aromatic), 8.10 (d, 2H, CH aromatic, $J = 8.3$ Hz), 12.80 (s, 1H, N-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 125.41, 126.95, 127.18, 127.98, 128.31, 128.51, 128.79, 128.89, 128.99, 129.25, 130.95, 132.87, 137.38, 144.54.

2-(4-Ethylphenyl)-4,5-diphenyl-1H-imidazole (4j): Yield: 86%; mp 242-244°C; IR cm^{-1} : 3500 (N-H), 2966.3 (CH aromatic), 2356.9, 1635.5 (C=C), 1468.2 (C=N); ^1H NMR (CDCl₃/ DMSO- d_6) δ : 1.20 (t, 3H, CH₃, $J = 7.6$ Hz) 2.65 (q, 2H, CH₂, $J = 7.5$ Hz) 7.20-7.60 (m, 12H, CH aromatic), 8.02 (d, 2H, CH aromatic, $J = 7.5$ Hz), 12.60 (s, 1H, N-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 15.53, 28.09, 119.73, 125.37, 126.60, 127.19, 127.81, 128.0, 128.06, 128.18, 128.29, 128.50, 128.76, 131.22, 135.31, 137.05, 144.10, 145.83.

2-(3-Chlorophenyl)-4,5-diphenyl-1H-imidazole (4k): Yield: 75%; mp 280°C; IR cm^{-1} : 3440.8 (N-H), 3062.7 (CH aromatic), 1589.2 (C=C); ^1H NMR (CDCl₃/ DMSO- d_6) δ : 7.32 - 7.55 (m, 12H, CH aromatic), 8.07 (d, 1H, CH aromatic, $J = 6.9$ Hz), 8.18 (s, 1H, CH aromatic), 12.85 (s, 1H, N-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 144.43, 137.30, 135.01, 132.75, 130.93, 129.20, 128.77, 128.67, 128.56, 128.43, 128.20, 127.86, 127.07, 126.84, 126.59.

2-(4-Methoxyphenyl)-4,5-diphenyl-1H-imidazole (4l): Yield: 90%; mp 238-240°C; IR cm^{-1} : 3421.5 (N-H), 3024.2 (CH aromatic), 2299.0, 1608.9 (C=C), 1149.8 (C-O); ^1H NMR (CDCl₃/ DMSO- d_6) δ : 3.90 (s, 3H, O-CH₃), 7.00 - 8.05 (m, 14H, CH aromatic), 12.50 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 56.11, 114.31, 123.10, 126.32, 126.60, 128.01, 128.31, 134.20, 146.00, 158.90.

2-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-4,5-diphenyl-1H-imidazole (4m): Yield: 64%; mp 192-194°C; IR cm^{-1} : 3417.6 (N-H), 3062.7 (CH aromatic), 1604.7 (C=C), 1257.5 (C-O); ^1H NMR (CDCl₃/ DMSO- d_6) δ : 3.80 (s, 3H, O-CH₃) 7.02 (d, 1H, CH aromatic, $J = 8.1$ Hz), 7.19 - 7.58 (m, 12H, CH aromatic), 9.20 (s, 1H, O-H), 12.45 (s, 1H, N-H).

RESULTS AND DISCUSSION

In continuation of our on-going research for the development of simple and efficient methods for the synthesis of various heterocyclic compounds [12], herein we wish to report a simple, economic and efficient one-pot method for the synthesis of 2,4,5-triaryl-1H-imidazole derivatives from 1,2-dicarbonyl compound, ammonium acetate and aromatic aldehydes in the presence of citric acid as catalyst.

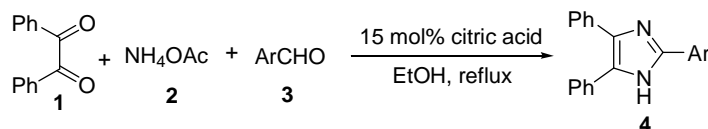
Initially, we investigated the ability of this catalyst for examining the reaction of benzil, ammonium acetate and benzaldehyde. After initial screening of amounts for citric acid, solvents and reaction temperature, we obtained that the use of 15 mol% citric acid in ethanol under reflux conditions produced 2,4,5-triphenyl-1H-imidazole after 50 minutes, in 92% yield (Table 1, entry 14). Notably, the desired product could not be obtained under similar reaction conditions, even after long time in the absence of the catalyst (Table 1, entry 3).

Table 1. Optimizing the reaction conditions^a

Entry	Catalyst loading (mol%)	Solvent	Temperature (°C)	Time (min)	Yield ^b (%)
1	----	-----	r t	240	N.R ^c
2	----	-----	80	240	N.R ^c
3	----	EtOH	reflux	120	N.R ^c
4	10	----	r t	180	traces
5	10	----	80	50	80
6	10	EtOH	r t	300	16
7	10	EtOH	50	180	35
8	10	EtOH	reflux	50	85
9	10	CH ₃ CN	reflux	50	56
10	10	CH ₂ Cl ₂	reflux	50	N.R ^c
11	10	CHCl ₃	reflux	50	NR ^c
12	10	H ₂ O	reflux	50	N.R ^c
13	5	EtOH	reflux	50	39
14	15	EtOH	reflux	50	92
15	20	EtOH	reflux	50	80

^aBenzil:benzaldehyde:NH₄OAc (1 mmol:1 mmol:3 mmol); ^bIsolated yield; ^cNo reaction.

Subsequently, to examine the efficiency and applicability of this protocol, the reaction was extended to other substituted aromatic aldehydes. The results are incorporated in Table 2. The reactions proceeded efficiently to furnish the corresponding imidazole derivatives (**4a-m**) in fair to good yields (Table 2).



Scheme 1: Synthesis of 2,4,5-triarylimidazoles

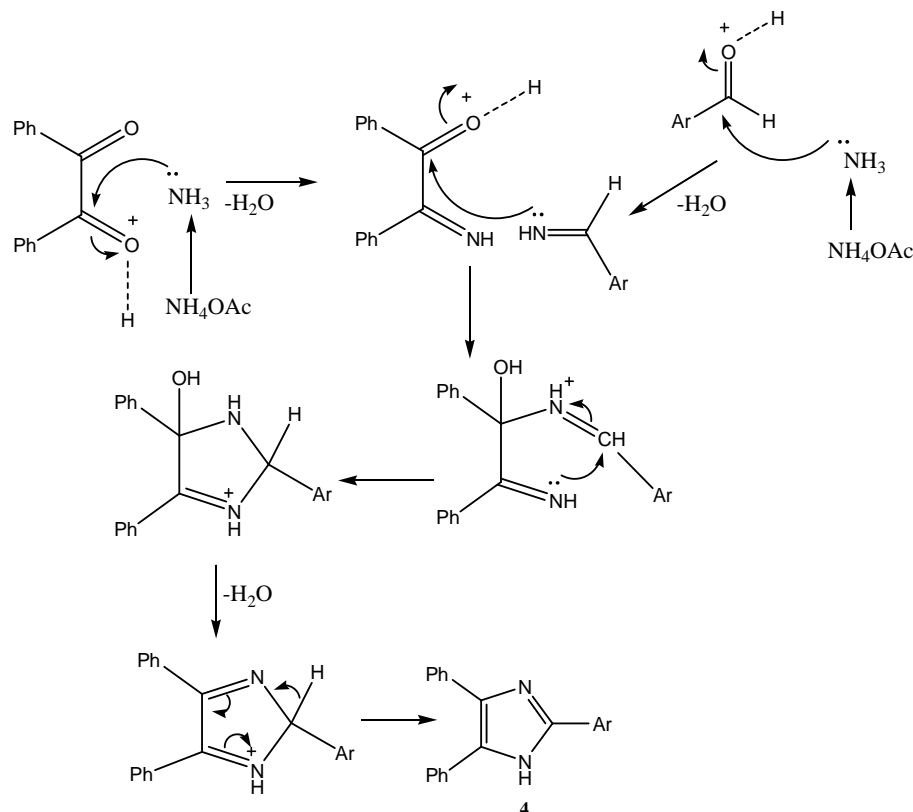
Table 2: Physical data of the prepared 2,4,5-triarylimidazole compounds (**4a-m**)

Entry	Ar	Time (min)	Compound ^a	Yield ^b (%)	Melting point	
					Found	Reported[ref]
1	C ₆ H ₅	50	4a	92	273-275	274-275[13]
2	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	75	4b	82	229-232	230-232[13]
3	3-CH ₃ O-C ₆ H ₄	70	4c	80	258	266-268[14]
4	2-NO ₂ -C ₆ H ₄	100	4d	65	227-229	230-231[14]
5	2-HO-C ₆ H ₄	90	4e	80	199-201	198-201[15]
6	2-CH ₃ -C ₆ H ₄	80	4f	75	208-210	205-207[16]
7	2-CH ₃ O-C ₆ H ₄	70	4g	81	211-213	212-214[13]
8	2,4-Cl ₂ -C ₆ H ₃	115	4h	70	174-175	170-172[15]
9	4-Cl-C ₆ H ₄	120	4i	78	263-264	264-266[13]
10	4-Et-C ₆ H ₄	360	4j	86	242-244	223-224[17]
11	3-Cl-C ₆ H ₄	210	4k	75	280	285-287[17]
12	4-MeO-C ₆ H ₄	180	4l	90	238-240	230-233[13]
13	3-OH-4-MeO-C ₆ H ₃	300	4m	64	192-194	214-216[18]

^aAll the isolated products were characterized on the basis of their physical properties and IR, ¹H- and ¹³C-NMR spectral analysis and by direct comparison with authentic materials.

^bIsolated yields

A plausible mechanism for citric acid mediated Radziszewski synthesis of 2,4,5-triarylimidazole derivatives is depicted in Scheme 2:



Scheme 2: A plausible mechanism for the formation of 2,4,5-triarylimidazole derivatives

CONCLUSION

In conclusion, a one-pot, multicomponent methodology has been developed for the synthesis of 2,4,5-triarylimidazole derivatives catalysed by 15 mol% of citric acid in fair to high yields. Compared to previously reported methods, most of which required metal containing catalysts, this protocol proceeded smoothly in the presence of citric acid, an eco-friendly organocatalyst. Moreover, the mild reaction conditions, easy work-up, clean reaction profiles, low catalyst loading and cost efficiency render this approach as an interesting alternative to the existing methods.

Further studies on the application of this catalyst for the synthesis of highly functionalized biologically active heterocyclic compounds are underway.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the MESRES (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique) for Financial support.

REFERENCES

- [1] (a) A. Domling, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **1998**, 1, 1-22; (b) I. Ugi, A. Domling, B. Gruber, M. Almstetter, *Croatica Chem. Acta.* **1997**, 70, 631-647; (c) R. Armstrong, A. Combs, P. Tem-pest, D. Brown, T. Keating, *Acct. Chem. Res.* **1996**, 29, 123-131.
- [2] J. G. Lambardino, E. H. Wiseman, *J. Med. Chem.* **1974**, 17, 1182-1188.
- [3] J. C. Lee, J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Keys, S. W. L. Vatter, J. E. Strickler, M. M. McLaughlin, I. R. Siemens, S. M. Fisher, G. P. Livi, J. R. White, J. L. Adams, P. R. Young, *Nature*, **1994**, 372, 739-346.
- [4] M. Antolini, A. Bozzoli, C. Ghiron, G. Kennedy, T. Rossi, A. Ursini, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 1023-1028.
- [5] L. Wang, K. W. Woods, Q. Li, K. J. Barr, R. W. Mc Croskey, S. M. Hannick, L. Gherke, R. B. Credo, Y-H.Hui, K. Marsh, R. Warner, J. Y. Lee, N. Zielinsky-Mozng, D. Frost, S. H. Rosenberg, H. L. Sham, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1697-1711.
- [6] S. E. De Laszlo, C. Hacker, B. Li, D. Kim, M. Mac Coss, N. Mantl, J. V. Pivnichny, L. Colwell, G. E. Koch, M. A. Cascieri, W. K. Hagmann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 641-646.
- [7] A. R. Hajipour, F. Rafiee, *J. Iran. Chem. Soc.* **2009**, 6, 647-678.
- [8] A. Zare, A. Hasaninejad, A. Khalafi-Nezhad, A. R. Moosavi-Zare, M. H. Beyzavi, F. Khedri, F. Asadi, N. Hayati, A. Asifi, *J. Iran. Chem. Soc.* **2010**, 7, 461-469.
- [9] D. V. Seo, Y. D. Lim, S. H. Lee, S. C. Ur, V. G. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, 32, 2633-2636.
- [10] Li, H.; Liu, J.; Zhu, J. Wang, H. *J. Korean Chem. Soc.* **2011**, 55, 685-690.
- [11] M. R. Mohammad Shafiee, Marzieh Cheraghipoor and M. Ghashang, *International Conference on Nanotechnology and Biosensors IPCBEE*, **2011**, 25.
- [12] (a) A. Debache, B. Boumoud, M. Amimour, A. Belfaitah, S. Rhouati, B. Carboni, *Tetrahedron letters* **2006**, 47 (32), 5697-5699; (b) B. Boumoud, A. Debbache, T. Boumoud, R. Boulcina, A. Debache, *LOC*, **2014**, 11, 475-479; (c) B. Boumoud, I. Mennana, T. Boumoud, A. Debache, *LOC*, **2013**, 10, 8-11.
- [13] Behrooz Maleki and Samaneh Sedigh Ashrafiehrooz Maleki, Samaneh Sedigh Ashrafi, *J. Mex. Chem. Soc.* **2014**, 58, 76-81.
- [14] A. Adel Marzouk, M. Vagif Abbasov, H. Avtandil Talybov, K. Mohamed Shaaban, *World Journal of Organic Chemistry*, **2013**, 1, 6-10.
- [15] J. Safari, S. D. Khalili, S. H. Banitaba, *Chem. Sci.*, **2010**, 122, 437-441.
- [16] C. Yu, M. Lei, W. Su, Y. Xie, *Synth. Commun.*, **2007**, 37, 3301-3309.
- [17] (a) K. V. Srinivasan, *Tetrahedron* **2005**, 61, 3539; (b) L. M. Wang, Y. H. Wang, H. Tian, Y. F. Yao, J. H. Shao, B. Liu, *J. Fluor. Chem.* **2006**, 127, 1570-1573.
- [18] J. Safari, S. D. Khalili, M. Rezaei, S. H. Banitab, F. Meshkani, *Monatsh Chem.*, **2010**, 141, 1339-1345.

Publication N° 02

The prohibitin-binding compound fluorizoline induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells ex vivo but fails to prevent leukemia development in a murine model

Marina Wierz, Sandrine Pierson, Nora Chouha, Laurent Désaubry, Jean-Hugues François, Guy Berchem, Jerome Paggetti, and Etienne Moussay



The prohibitin-binding compound fluorizoline induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells ex vivo but fails to prevent leukemia development in a murine model

by Marina Wierz, Sandrine Pierson, Nora Chouha, Laurent Désaubry, Jean-Hugues François, Guy Berchem, Jerome Paggetti, and Etienne Moussay

Haematologica 2018 [Epub ahead of print]

*Citation: Marina Wierz, Sandrine Pierson, Nora Chouha, Laurent Désaubry, Jean-Hugues François, Guy Berchem, Jerome Paggetti, and Etienne Moussay. The prohibitin-binding compound fluorizoline induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells ex vivo but fails to prevent leukemia development in a murine model. Haematologica. 2018; 103:xxx
doi:10.3324/haematol.2017.175349*

Publisher's Disclaimer.

E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. After having E-published Ahead of Print, manuscripts will then undergo technical and English editing, typesetting, proof correction and be presented for the authors' final approval; the final version of the manuscript will then appear in print on a regular issue of the journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.

The prohibitin-binding compound fluorizoline induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells *ex vivo* but fails to prevent leukemia development in a murine model

Running title: Fluorizoline fails to prevent CLL progression

Marina Wierz,¹ Sandrine Pierson,¹ Nora Chouha,² Laurent Désaubry,² Jean-Hugues François,³ Guy Berchem,^{1,3} Jerome Paggetti,^{1,*} and Etienne Moussay^{1,*}

¹Laboratory of Experimental Cancer Research, Department of Oncology, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg

²Laboratory of Therapeutic Innovation (UMR 7200) CNRS/Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch

³Centre Hospitalier de Luxembourg, Luxembourg

*JP and EM contributed equally to this work.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, fluorizoline, prohibitin-binding compound, apoptosis

Correspondence:

Jerome Paggetti / Etienne Moussay

Laboratory of Experimental Cancer Research, Department of Oncology, Luxembourg Institute of Health, 84 Val Fleuri, L-1526, Luxembourg, Luxembourg

E-mail: jerome.paggetti@lih.lu / etienne.moussay@lih.lu

To the editor:

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most frequent leukemia in adults, is characterized by an accumulation of monoclonal B cells with a mature phenotype in the blood and lymphoid organs. Despite considerable advances in the treatment of patients, CLL remains an incurable disorder^{1, 2} and therefore, novel therapies are needed. New compounds harboring a trifluorinated thiazoline scaffold have been recently described for their pro-apoptotic properties.³ Indeed, a diaryl trifluorothiazoline, named fluorizoline, demonstrated a high apoptosis induction in different cancer cells *in vitro* by binding to prohibitin (PHB) 1 and 2.³⁻⁵ Very recently, fluorizoline was reported to efficiently induce apoptosis in CLL cells derived from patients, showing synergistic effects with other drugs used in CLL treatment such as the Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor ibrutinib.⁶ However, no assessment of fluorizoline efficacy *in vivo* was reported by all these studies. Here, we confirmed that fluorizoline strongly induces apoptosis in primary CLL cells through the induction of NOXA. However, we also demonstrated that fluorizoline, contrary to ibrutinib, fails to control CLL development in a relevant mouse model of aggressive disease.

First, we isolated PBMC from CLL patients (>95% CD5+CD19+ cell purity) and tested the cytotoxicity of fluorizoline *ex vivo* (see methods in Online Supplementary data). We observed that CLL cells were sensitive to treatment as mirrored by the low inhibitory concentrations (IC₅₀) after 24h, 48h, and 72h of culture (9μM, 4μM, and 4μM IC₅₀, respectively) (Figure 1A). Both the MEC-1 and JVM-3 CLL cell lines were sensitive to the drug as well (7.5μM and 1.5μM IC₅₀, respectively) (Figure 1B and C). The strong decrease in cell viability was confirmed for MEC-1 and JVM-3 cell lines, and primary CLL cells by the quantification of annexin V/7-AAD-positive cells (Figure 1D). Fluorizoline also induced apoptosis in healthy B cells. To understand the mechanisms leading to apoptosis induction, we examined the expression and cleavage of proteins playing major roles in the cell death cascade. Similarly in cell lines and patients' cells, both caspase-3 and -8 were cleaved after fluorizoline treatment (24h) along with PARP cleavage in a dose-dependent manner (Figure 1E). We also

observed an increased expression of the pro-apoptotic Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only protein NOXA and depletion of the anti-apoptotic molecules Mcl-1 and PUMA. However, fluorizoline-induced cell death appeared to be Bcl-2-independent as its level remained unchanged upon treatment. Finally, we observed a dose-dependent decrease in Phospho-ERK1 and an increase in ERK2 phosphorylation. The binding of fluorizoline to prohibitins is required to induce apoptosis.⁴ Therefore we examined the expression of PHB1 and PHB2 in purified normal B and CLL cells. Indeed, both prohibitins are expressed in high levels in both populations with no detectable difference between them (Figure 1F and Online Supplementary Figure S1).

Next, we sought to confirm the therapeutic benefit of fluorizoline in the E μ -TCL1 mouse model of CLL. For this purpose, we first prepared splenocytes from diseased E μ -TCL1 mice and observed a similar toxicity of the compound towards murine CLL cells *in vitro*. Indeed, a concentration of 10 μ M killed 80-90% of cells depending on the incubation period (Figure 2A). Then, we performed adoptive transfer (AT) of splenocytes from diseased E μ -TCL1 to C57BL/6 recipients (see Supplemental data). After five days, animals were randomized to treatment with either fluorizoline, ibrutinib, or control vehicles. Fluorizoline was administered by intraperitoneal injections three times a week at 15mg/kg, a dose ten times higher than the dose of another PHB-binding compound successfully used for the treatment of murine CLL.⁷ The animals were treated for five weeks and monitored weekly for both the blood cell count and the percentage of leukemic CD5+CD19+ cells. Interestingly, while the animals receiving ibrutinib remained with an almost undetectable tumor load in the circulation, the animals treated with vehicle or fluorizoline became leukemic very rapidly (3 weeks) as reflected by the strong increase in the percentage and the number of CD5+CD19+ CLL cells in the blood (Figure 2B and C). We also quantified by flow cytometry the proportion of immune cells in the blood of mice treated with fluorizoline or vehicle. After five weeks of treatment, no significant difference in B and T cell number was observed (Online Supplementary Figure S2). While monocytes increased and granulocytes decreased in a manner concomitant with the development of CLL cells, no difference was measured in presence of fluorizoline (Online Supplementary Figure S2). Moreover, fluorizoline

did not control disease development in the spleen as indicated by enlarged spleens, which were even larger than in vehicle-treated animals (**Figure 2D**), as well as a high proportion of CLL cell infiltration (> 96%). In addition, a survival analysis based on the Kaplan Meier estimate did not indicate any statistical difference between the groups treated with vehicle or fluorizoline ($p=0.273$), whereas all animals treated with ibrutinib survived until the end of the experiment ($p=0.0004$) (**Figure 2E**).

Furthermore, we investigated the induction of cell death in several organs after *in vivo* treatment. The absence of apoptosis was shown *in situ* by immunohistochemistry staining against cleaved caspase-3 and TUNEL assay in spleen sections (**Figure 3A-B**). Similarly, no difference in the percentage of live cells was observed for B cells, T cells, and myeloid cells in the blood and the bone marrow (**Figure 3C-D**). We also analyzed if the microenvironment could have any protective capabilities by co-culturing CLL cells with stromal cells. Indeed, we observed a significant protection from cell death by co-culturing CLL cells with HS-5 cells. The fact that conditioned medium had a protective effect only for JVM-3 cells, but not for CLL cells, suggests that direct cell contact is required for protection of human primary CLL cells (**Figure 3E**).

Moreover, fluorizoline is likely poorly bioavailable. Indeed, its structure suggests a lipophilic character with, as a main consequence, a rapid transfer from the blood to the fatty compartment and therefore a decreased bioavailability. Adsorption of fluorizoline to lipids and proteins *in vivo* could also decrease the free bioavailable fraction. In addition, the metabolization of fluorizoline (e.g. hydrolysis, oxidation and/or conjugation) into non-active by-products, could also explain the difference observed between cell cultures and animal experiments.

In conclusion, despite promising apoptosis-inducing effects *in vitro*, fluorizoline was unsuccessful in inducing apoptosis and limiting CLL progression *in vivo*. The absence of toxicity towards CLL cells as well as normal cells present in the peripheral circulation strongly points toward the low bioavailability of the drug or its rapid systemic clearance *in vivo*. Efforts should be made to modify the compound to improve its overall efficacy.

Acknowledgments

We thank Pr. Carlo Croce and Pr. John Byrd (OSU, OH) for the kind gift of E μ -TCL1 mouse and Dr. Martina Seiffert (DKFZ Heidelberg, Germany) for providing the animals. We also thank Dr Brice Appenzeller (LIH, Human Biomonitoring Research Unit) for helpful discussions. This project was supported by Télévie (7.4563.15, 7.4508.16, and 7.4502.17) and the Luxembourg Institute of Health (HEMATEXO project). Finally we thank Dr. Joshua Brown-Clay (LIH, LECR-Cytoskeleton and Cancer Progression) for editing the manuscript.

Authorship Contributions

J.P. and E.M. designed the study. M.W. and S.P. performed all experiments. M.W., J.P., and E.M. analyzed data, prepared the figures, and wrote the paper. N.C. and L.D. synthesized fluorizoline. G.B. and J.H.F provided patient samples. All authors revised the manuscript.

Disclosure of Conflicts of Interest

The authors disclose no conflict of interest.

References

1. Ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(3):401-413.
2. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:16096.
3. Perez-Perarnau A, Preciado S, Palmeri CM, et al. A trifluorinated thiazoline scaffold leading to pro-apoptotic agents targeting prohibitins. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2014;53(38):10150-10154.
4. Moncunill-Massaguer C, Saura-Esteller J, Perez-Perarnau A, et al. A novel prohibitin-binding compound induces the mitochondrial apoptotic pathway through NOXA and BIM upregulation. *Oncotarget*. 2015;6(39):41750-41765.
5. Pomares H, Palmeri CM, Iglesias-Serret D, et al. Targeting prohibitins induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*. 2016;7(40):64987-65000.
6. Cosialls AM, Pomares H, Iglesias-Serret D, et al. The prohibitin-binding compound fluorizoline induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through the upregulation of NOXA and synergizes with ibrutinib, AICAR or venetoclax. *Haematologica*. 2017;102(9):1587-1593.
7. Lucas DM, Edwards RB, Lozanski G, et al. The novel plant-derived agent silvestrol has B-cell selective activity in chronic lymphocytic leukemia and acute lymphoblastic leukemia in vitro and in vivo. *Blood*. 2009;113(19):4656-4666.

Figure legends

Figure 1.

Fluorizoline efficiently induces apoptosis in CLL cells *in vitro*.

(A-C) Cytotoxic dose response of fluorizoline on primary human CLL cells **(A)**, CLL cell lines MEC-1 **(B)** and JVM-3 **(C)** was analyzed by CCK8 assay. PBMC from 7 CLL patients as well as the CLL cell lines MEC-1 and JVM-3 were treated with increasing doses of fluorizoline ranging from 1 μ M to 40 μ M for 24h (grey line), 48 h (blue line) or 72h (red line). **(D)** Representative scatter plots illustrating annexin-V/7-AAD staining of cells after 24h of treatment (left panel). MEC-1 (upper left plot), JVM-3 (upper right plot), primary CLL cells (lower left plot, patients CLL#8 to CLL#10), and normal B cells (lower right plot, donors B#1 to B#3) cells were treated with 5 to 20 μ M fluorizoline or with equivalent volume of the vehicle DMSO for 24h and stained with annexin V-APC and 7-AAD prior to analysis by flow cytometry. Viable cells (annexin V-APC negative/7-AAD negative, blue gate) were determined and are expressed as percentage of total cell population. Data represent average percentage of live cells (right panel) from independent experiments (N=3). **(E)** MEC-1, JVM-3 and primary CLL cells (patients CLL#8, CLL#11 and CLL#12) were treated with 5 μ M to 40 μ M fluorizoline or with equivalent volume of the vehicle DMSO (Ctrl) for 24 h, lysed and proteins were analyzed by western blot with the indicated antibodies. HSC70 protein served as a loading control. **(F)** The expression of PHB1 and PHB2 was analyzed by western blot in total cell lysates from normal B cells (donors B#4 to B#7), MEC-1 and JVM-3 cells, and primary CLL B cells (patients CLL#1, CLL#2 and CLL#13 to CLL#16). HSC70 protein served as a loading control.

Figure 2.

Fluorizoline fails to control CLL development *in vivo*.

(A) Cytotoxic dose response of fluorizoline on primary murine CLL cells (E μ -TCL1 splenocytes). Splenocytes from a diseased E μ -TCL1 mouse were treated with increasing doses of fluorizoline

ranging from 1 μ M to 40 μ M for 24 h (grey line), 48 h (blue line) or 72 h (red line). **(B-C)** Tumor load in the peripheral blood (PB) of individual mice. CLL development of AT-TCL1 mice treated either with 15mg/kg i.p. fluorizoline (Fluorizoline) (n=8) or ibrutinib (Ibrutinib) (n=8) or equivalent doses of vehicles (vehicle) (n=10) was monitored weekly and is depicted by both the percentage **(B)** and the number **(C)** of CD5+ CD19+ CLL cells. **(D)** Spleen weight (g) of mice treated either with 15mg/kg i.p. fluorizoline (Fluorizoline) (n=8) or ibrutinib (Ibrutinib) (n=8) or equivalent doses of vehicles (vehicle) (n=10). **(E)** Survival analysis of mice upon fluorizoline and ibrutinib treatment. AT-TCL1 mice were treated either with 15mg/kg i.p. fluorizoline (red line) or ibrutinib (blue line) or equivalent doses of vehicles (black line). Overall survival was analyzed using the Kaplan-Meier method and is displayed as the percentage of viable mice in the observed period of time. For panels B-D, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ns not significant.

Figure 3.

Fluorizoline does not induce apoptosis *in vivo*.

(A-D) AT-TCL1 mice were treated with either 15mg/kg fluorizoline (fluo) or equivalent volume of DMSO as vehicle, three times a week for two weeks (5 mice per group). **(A-B)** Immunohistochemical staining performed on indicated spleen sections using hematoxylin-eosin (H&E), anti-cleaved caspase-3 antibody, and TUNEL assay, respectively (Scale bars, 100 μ m). The panels show a representative picture for each animal **(A)** and the respective quantifications (10 fields per mouse in 3 mice per group) **(B)**. **(C-D)** Cell viability was assessed by annexin-V/7-AAD staining in T cells, myeloid cells and B cells from blood **(C)** and bone marrow **(D)** of treated AT-TCL1 mice. **(E)** Cell viability was assessed *in vitro* in CLL cells co-cultured on HS-5 stromal cells or with HS-5 conditioned medium only in presence of 5 μ M (for cell lines) or 20 μ M (for patients' cells) fluorizoline or equivalent volume of DMSO as vehicle.

Figure 2

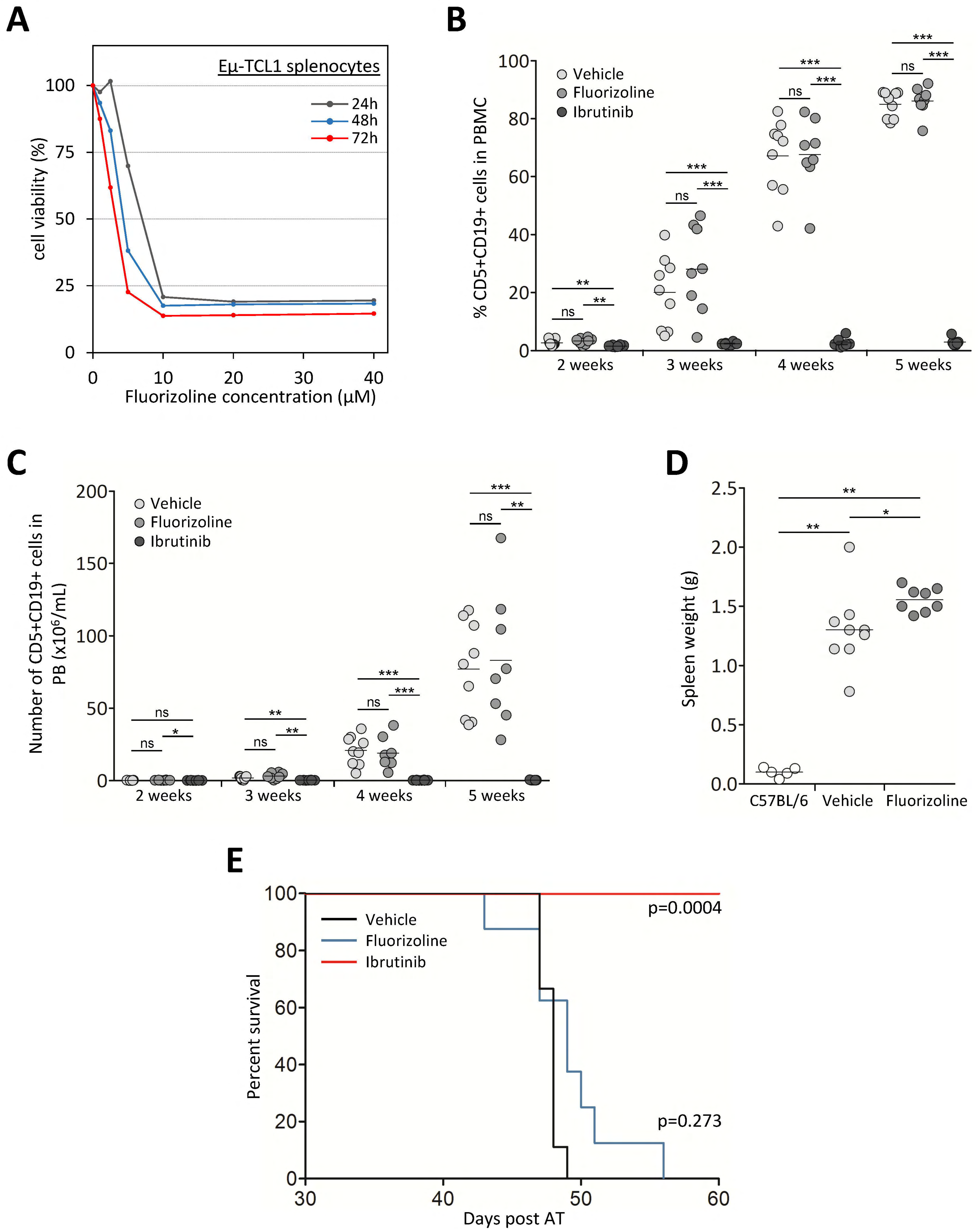
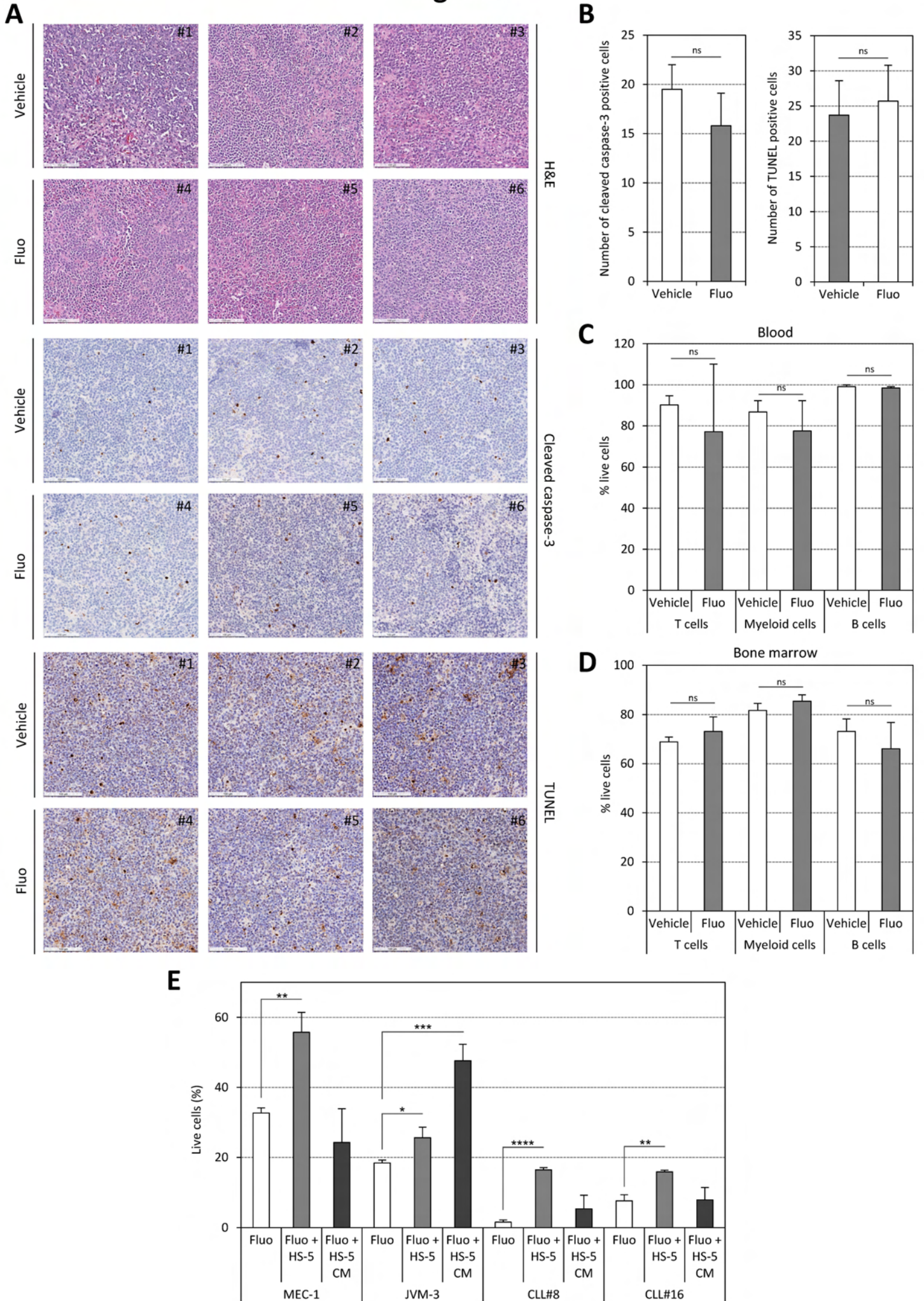


Figure 3



Supplementary data

The prohibitin-binding compound fluorizoline induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells *ex vivo* but fails to prevent leukemia development in a murine model

Marina Wierz,¹ Sandrine Pierson,¹ Nora Chouha,² Laurent Désaubry,² Jean-Hugues François,³ Guy Berchem,^{1,3}

Jerome Paggetti,^{1,*} and Etienne Moussay^{1,*}

Materials and Methods

Primary CLL cells and healthy B cells

Peripheral blood (PB) samples from 16 patients with CLL were obtained from the Centre Hospitalier de Luxembourg (CHL) after obtaining written informed consent according to the Declaration of Helsinki. PB mononuclear cells (PBMC) were isolated from whole blood by density gradient centrifugation using the LeucoSep™ Separation Medium (Greiner Bio-One) according to the manufacturer's protocol. PBMC were then incubated with 3ml 1X ACK lysing buffer (Lonza) for 3 minutes at room temperature (RT) to lyse remaining red blood cells (RBC), washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and counted. PBMC were cultured immediately after isolation at a concentration of 4×10^6 cells/mL in RPMI 1640 culture medium with Ultraglutamine (Lonza) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (P/S, Lonza) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide.

Buffy coats were obtained from seven healthy donors (Croix-Rouge Luxembourg). B cells were isolated by positive selection with Dynabeads® CD19 pan B (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. After release of CD19+ B cells from beads with the DETACHaBEAD® CD19 (Life Technologies), the cells were stained with a Fluorescein isothiocyanate (FITC)- or Alexa Fluor 700-conjugated anti-human CD20 (both from BioLegend, clone 2H7) and analyzed on a CytoFlex cytometer (Beckman-Coulter) to control purity.

Cell lines

The human CLL cell lines MEC-1 (ACC-497, DMSZ) and JVM-3 (ACC-18, DMSZ) were maintained in RPMI1640 culture medium with Ultraglutamine (Lonza) supplemented with 10% FBS and 1% P/S at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide. The human stromal cell line HS-5 was maintained in DMEM culture medium (Lonza) supplemented with 10% FBS and 1% P/S at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide. Conditioned medium was harvested from sub-confluent HS-5 cells. Medium was centrifuged twice at 400 x g for 10 min and stored at -80°C until use.

Reagents and antibodies

Fluorizoline was synthesized as previously described.¹ For *in vitro* experiments, fluorizoline was dissolved in DMSO at 40mM. For *in vivo* experiments, fluorizoline was dissolved in DMSO at 27.5mg/ml. Ibrutinib (Imbruvica, Janssen) was dissolved in DMSO at 48mg/ml. Kolliphor®EL and (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (β -HC) were from Sigma-Aldrich. Cell Counting Kit-8 (CCK8) was purchased from Dojindo Molecular Technologies.

Allophycocyanin (APC)-conjugated annexin V was purchased from ImmunoTools. 7-amino-actinomycin D (7-AAD) Viability Staining Solution was purchased from BioLegend. APC-conjugated anti-mouse CD19, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse CD5, FITC-conjugated anti-mouse CD11b, FITC-conjugated anti-mouse CD4, and FITC-conjugated anti-mouse CD8 were from BioLegend.

Specific Antibody against Bcl-2 was purchased from Santa Cruz Biotechnology, anti-NOXA was from Calbiochem®, anti-prohibitin (PHB-1) and anti-BAP-37 (PHB-2) were from BioLegend, and anti-Mcl-1, -PUMA, -PARP, -cleaved caspase 3, -caspase 8, -phospho-ERK1/2 and -HSC70 were from Cell Signaling Technology.

Mice

Female C57BL/6 mice were purchased from Janvier labs (France). E μ -TCL1 mice (on C57BL/6 background) were a kind gift from Pr. Carlo Croce and Pr. John Byrd (OSU, OH) and provided by Dr. Martina Seiffert (DKFZ Heidelberg, Germany). Both strains were maintained under specific pathogen-free conditions in an animal facility with the approval of the Luxembourg Ministry for Agriculture. Mice were treated in accordance with the European Union guidelines.

Adoptive transfer (AT) and treatments

For adoptive transfer (AT), 6-week-old recipient C57BL/6 mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 15 x 10⁶ splenocytes pooled from several leukemic E μ -TCL1 donor mice in 100 μ l DMEM. Treatments started five days after AT. For fluorizoline treatment, fluorizoline was freshly prepared immediately before injection and diluted in 5% Kolliphor®EL/PBS as vehicle. Mice (n=8) were injected i.p. with 15mg/kg fluorizoline three times

per week. For ibrutinib treatment, ibrutinib was administered in 10% β -HC/H₂O as vehicle (n=8) *via* drinking water at 0.16mg/ml as previously described.² Control mice (n=10) were injected i.p. with 5% Kolliphor®EL/PBS vehicle solely and were provided with 10% β -HC/H₂O as drinking water. CLL development was monitored weekly. The blood cell count was analyzed by the MS4e Vet hematology analyzer (Melet Schloesing, France). Healthy C57BL/6 mice (n=5) were used as controls.

To analyze *in vivo* cell viability, AT was performed as described above. Four weeks after AT, when CLL cells were detectable in peripheral blood (PB), mice (n=5) were injected i.p. with 15mg/kg fluorizoline three times per week for two weeks.

Sample preparation

Peripheral blood was drawn via retro-orbital puncture with EDTA as anticoagulant and processed for flow cytometry and blood cell count. The animals were sacrificed by cervical dislocation and femurs were dissected. Bone marrow cells were isolated by flushing the femurs with cold PBS (without Ca²⁺/Mg²⁺) followed by cell resuspension and filtration (100 μ m CellTrics®, Sysmex). PB cells and bone marrow cells were recovered by centrifugation (400 x g, 4°C, 10 minutes) before resuspension in ACK lysing solution (Lonza) to remove erythrocytes. Finally, cells were washed in MACS buffer (Miltenyi Biotec), counted and processed for flow cytometry.

Measure of leukemic load by flow cytometry

PB cells were directly stained with anti-CD5 and anti-CD19 for 30 minutes on ice in the dark, then red blood cells were lysed using RBC Lysis/Fixation Solution (BioLegend), according to the manufacturer's instructions. After washing twice, samples were acquired on a CytoFLEX analyzer (Beckman Coulter) and the percentage of CD5+CD19+ CLL cells was determined.

Survival analysis

Mice were monitored daily and were euthanized according to the animal welfare scoring system validated by the Luxembourg Ministry of Agriculture. The animals were sacrificed by cervical dislocation and the spleens were dissected and weighed. Overall survival (OS) was defined as the time from adoptive transfer (AT) until death and was analyzed using the Kaplan-Meier method (Graph Pad Prism 7).

Analysis of cytotoxicity by the CCK8 assay

Cell lines (5×10^4 cells/well) and human PBMC (2×10^5 cells/well) were plated in a 96-well plate in triplicate and incubated in the absence (CTRL) or in the presence of $1\mu\text{M}$, $2.5\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$ and $40\mu\text{M}$ fluorizoline in a final volume of $100\mu\text{l}$. After 24, 48 or 72 hours, $10\mu\text{l}$ CCK8 was added to each well for 3 hours. The absorbance values were measured at 450nm on a multi-well plate reader. The inhibitory concentration (IC_{50}) was defined as the concentration of fluorizoline required to reduce the CCK8 metabolization ability by 50%.

Analysis of cell viability by flow cytometry

Cell viability was assessed by the detection of annexin V binding to surface-exposed phosphatidylserine and of 7-AAD binding to DNA. Cell lines (5×10^6 cells/ 25cm^2 flask) or primary cells (20×10^6 cells/ 25cm^2 flask) were incubated with DMSO (Ctrl) or with fluorizoline in a final volume of 10ml RPMI medium for 24 hours. Cells were then washed once in PBS and once in annexin V binding buffer (ABB). Cultured cells were resuspended in $100\mu\text{l}$ ABB and incubated with $5\mu\text{l}$ annexin V-APC for 15 minutes at RT in the dark. After annexin V staining, cells were washed once in ABB, resuspended in $100\mu\text{l}$ ABB, and additionally incubated with $5\mu\text{l}$ 7-AAD for 15 minutes at RT in the dark. Cells were resuspended in $400\mu\text{l}$ ABB immediately before acquisition on a CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter). Data were analyzed using the CytExpert software (Beckman Coulter). After CLL cells were co-cultured with HS-5 cells, CLL cells were stained with a FITC-conjugated anti-human CD20 antibody (BioLegend) to gate on leukemic cells for the quantification of apoptosis.

For the analysis of cell viability after *in vivo* treatment, single cell suspensions prepared from blood and bone marrow were incubated with FITC-conjugated anti-mouse CD4, CD8, CD19, or CD11b and with Annexin V-APC/7-AAD, washed in ABB and analyzed on a CytoFLEX Flow Cytometer.

Western Blot

Freshly isolated cells as well as cultured cells treated with fluorizoline or left untreated (as described for Analysis of cell viability by flow cytometry) were used for western blotting. Cells were harvested, washed twice with PBS and whole cell protein extracts were prepared by lysing cells with RIPA buffer (Millipore) supplemented with a complete protease inhibitor cocktail (Roche) and Phosphatase Inhibitor Cocktails 2 and 3 (Sigma-Aldrich) for 30 minutes on ice before centrifugation at 12.000g for 15 minutes at 4°C. Protein concentration of the cell lysates was measured using the colorimetric protein assay (Bio-Rad). Protein lysates (15µg) were subjected to reducing conditions before electrophoresis on a polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and electrophoretic transfer to 0.2µm PVDF membranes (Whatman). After 1 hour of blocking with 5% (w/v) non-fat milk in Tris-buffered saline with 0.1% Tween[®]-20 (TBS-T), the membranes were probed with specific primary antibodies against NOXA, MCL-1, PUMA, BCL-2, PARP, cleaved caspase 3, caspase 8, p-ERK1/2 and HSC70. Primary antibody binding was detected using a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase and the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Perkin-Elmer).

Immunohistochemistry

Mice were euthanized by cervical dislocation and dissected to collect spleens. A portion was cut out, fixed in 10% neutral buffered formalin (HistoTainer™ prefilled specimen containers, Simport) and directly shipped to HistoWiz Inc. (histowiz.com). Samples were processed, embedded in paraffin, sectioned at 4µm, and stained with an anti-mouse cleaved-caspase 3 or with TUNEL assay to detect apoptotic cells. Sections were then counterstained with hematoxylin, dehydrated and film coverslipped using a TissueTek-Prisma and Coverslipper (Sakura). Whole slide scanning (40x) was performed on an Aperio AT2 (Leica Biosystems).

Positive cells were counted in ten fields per sample in three animals. A representative picture is presented for each animal.

Statistical analysis

Statistical significance was determined using the two-sided unpaired t test for *in vitro* analysis or the two-sided Mann Whitney U test for *in vivo* analysis. *p*-values lower than 0.05 were considered statistically significant. Analyses were performed with GraphPad Prism 7. Significance displayed in each figure is explained in figure legends.

References

1. Perez-Perarnau A, Preciado S, Palmeri CM, et al. A trifluorinated thiazoline scaffold leading to pro-apoptotic agents targeting prohibitins. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014;53(38):10150-10154.
2. Woyach JA, Bojnik E, Ruppert AS, et al. Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood.* 2014;123(8):1207-1213.

Supplementary Figure legends

Supplementary Figure S1.

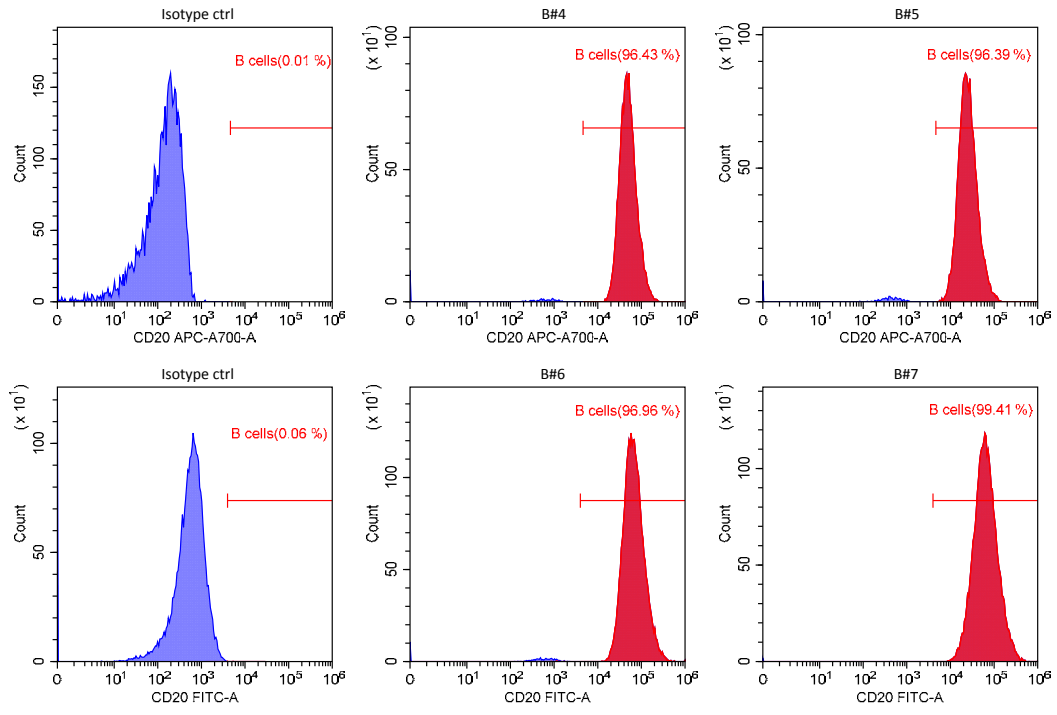
Purification of human B cells.

B cells were isolated by positive selection from buffy coats obtained from healthy donors. After release of CD19+ B cells from beads, the cells were stained with a FITC- or AF700-conjugated anti-human CD20 antibody and analyzed on a CytoFlex cytometer (Beckman-Coulter) to control purity.

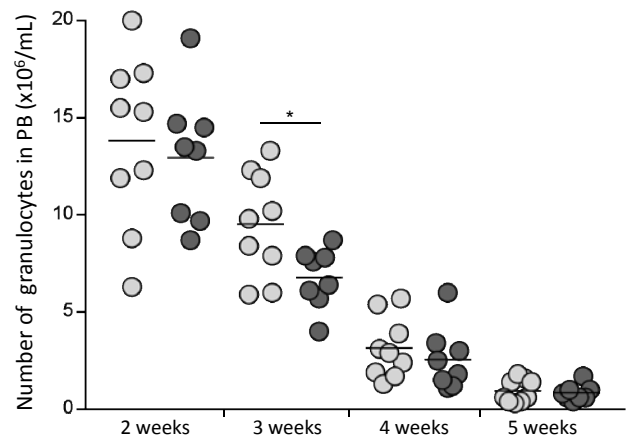
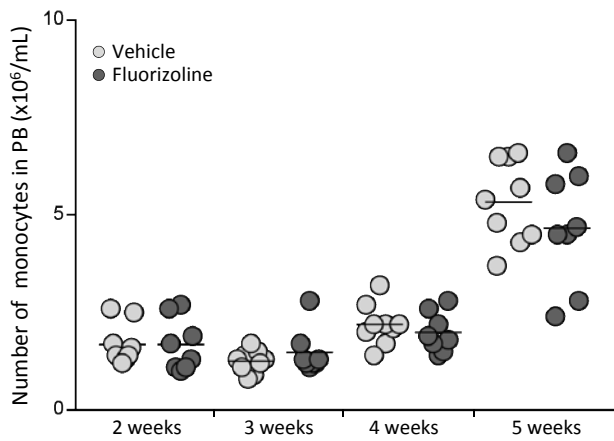
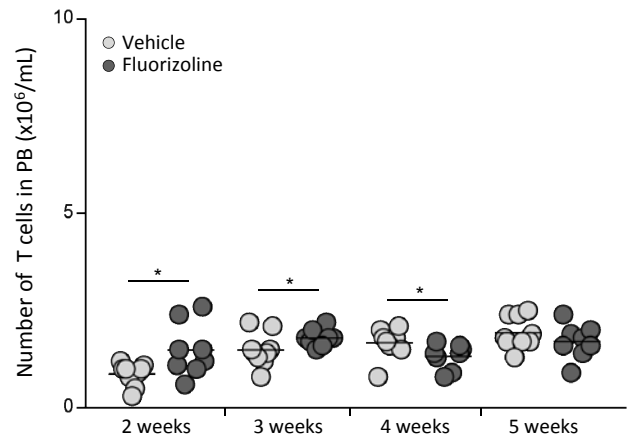
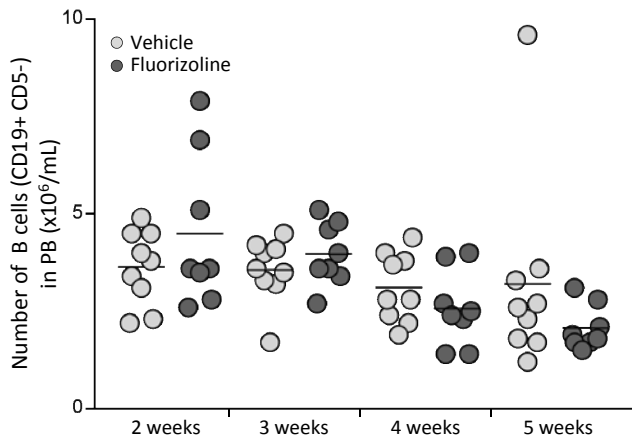
Supplementary Figure S2.

Number of normal B cells, T cells, monocytes, and granulocytes in the blood of mice treated with fluorizoline. Following adoptive transfer of E μ -TCL1 splenocytes, mice were treated for five weeks with 15mg/kg fluorizoline or with vehicle (DMSO). Blood was analyzed weekly for cell count with a MS4e Vet hematology analyzer and the percentage of each cell subset was determined by flow cytometry.

Supplementary Figure S1



Supplementary Figure S2



Publication N° 03

An Efficient One-Pot Multicomponent Synthesis of Spirooxindole Derivatives

Nora Chouha, Taoues Boumoud* , Boudjema Boumoud and Abdelmadjid Debache



An Efficient One-Pot Multicomponent Synthesis of Spirooxindole Derivatives

Nora Chouha, Taoues Boumoud*, Boudjemaa Boumoud and Abdelmadjid Debache

Laboratory of Synthesis of Molecules of Biological Interests, Department of Chemistry, University of the Brothers Mentouri Constantine, Algeria

ABSTRACT

The development of efficient and versatile catalytic system for one-pot multicomponent reaction is one of the active ongoing research areas for further improvement towards milder reaction conditions. In this context, we report here in Boron trifluoride diethyl ether ($\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$) as a convenient and readily available catalyst for the synthesis of spirooxindole derivatives in satisfactory yields. This new protocol has the advantages of environmental friendliness, higher yields, shorter reaction times, low cost, and convenient operation.

Keywords: Multicomponent reactions; Multi-step synthesis; Spirooxindoles; $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$; Isatin

INTRODUCTION

Multicomponent reactions (MCRs) allow the formation of several bonds in one-step and easy operation to offer rapid access to drug-like molecules with greater efficiency, lower costs and atom economy [1] that are among the major challenges in organic synthesis in recent years. Consequently, synthetic strategies consisting MCRs, in which three or more reagents are brought together in a one-pot version, have emerged as a uniquely powerful tool in accessing novel and structurally complex products from easily available and simple starting materials. Taking into account the high reactivity [2] and easy its availability, isatin and its derivatives have been used as key building blocks in many different and elegant MCRs for the synthesis of various heterocyclic and spiro-heterocyclic products [3] among which we can find spirooxindole derivatives which possess variety of biological activities such as antibacterial and antifungal activities [4]. Furthermore, the spirooxindole structure is an important pharmacophore in medicinal chemistry [5], hence, there has been significant interest in developing new methods for the construction of spirooxindoles from researchers working in both synthetic and medicinal chemistry [6-9].

In continuation of our investigation and development towards MCRs for the preparation of heterocyclic compounds [10,11], and considering the interesting biological properties and complex architecture of spirocyclic oxindoles, we wish to report, herein, the synthesis of series of spirooxindole derivatives, via the three-component reaction of isatin, malononitrile or cyanoacetic esters, and 1,3-dicarbonyl compounds in the presence of $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ as a novel and efficient catalyst.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials and Reagents

All products are known compounds and were characterized by comparison of their physical and spectroscopic data with those of authentic samples. Melting points were measured using a fine control Electro thermal capillary apparatus and are uncorrected. IR spectra were obtained as KBr pellets with a Shimadzu FT IR-8201 PC spectrometer. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded in DMSO-d_6 and/or CDCl_3 on a Bruker Avance DPX spectrometer. Chemical shifts (δ) are reported in ppm and J values in hertz (Hz).

General Procedure for the Synthesis of Spirooxindol Derivatives (4a-i)

A mixture of isatin derivative (1.0 mmol), malononitrile or ethyl cyanoacetate (2a-b) (1.0 mmol), 1,3 diketone (3a-b) (1.0 mmol) and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (10 mol%) in $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (10 ml, 1/1) was stirred at 80°C for an appropriate time. Upon completion of the reaction as indicated by TLC (3:2; EtOAc: pet. ether), the reaction mixture was allowed to cool to room temperature, poured upon ice cold water and stirred for 10 minutes. The solid formed was filtered off and washed with water and cold ethanol to afford the desired products (4), which were purified by recrystallization from ethanol. The structures of all the prepared products were unambiguously established on the basis of their spectral analysis (IR, ^1H & ^{13}C NMR) and melting points (Figure 1).

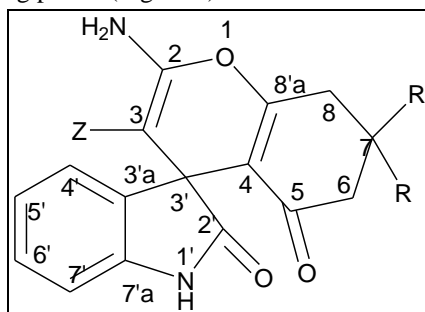


Figure 1: Spirooxindol derivative

2-amino-7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile (4a):

White solid; yield: 95%; mp: $> 300^\circ\text{C}$ (lit. $307\text{-}308^\circ\text{C}$); IR cm^{-1} : 3359 (NH), 3155 (NH_2), 2256 (CN), 1733 (CO); ^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6 and CDCl_3): δ 1.00 (s, 3H, CH_3), 1.02 (s, 3H, CH_3), 2.05 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, CH_AH_B), 2.17 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H, CH_AH_B), 2.50 (s, 2H, CH_2), 6.79 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, CH aromatic), 6.85 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, CH aromatic), 6.93 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, CH aromatic), 7.11 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, CH aromatic), 7.00 (s, 2H, NH_2), 10.35 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (62.9 MHz, $\text{DMSO-d}_6\text{-CDCl}_3$): δ 25.7 (CH_3), 26.5 (CH_3), 30.4 (C-7), 48.7 (C-8, C-3'), 56.2 (C-3), 107.8 (C-4), 118.40 (CN), 120.00, 121.4, 126.54, 132.80, 140.53 (C-7'a), 157.30 (C-8a), 162.36 (C-2), 176.70 (C=O, amide), 193.10 (C=O).

2-amino-7-chloro-7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile (4b):

White solid, yield: 82% ; mp: $296\text{-}298^\circ\text{C}$ (lit. $291\text{-}293^\circ\text{C}$); IR cm^{-1} : 3309 (NH), 3139 (NH_2), 2252 (CN), 1720 (CO); ^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6 and CDCl_3): δ 1.00 (s, 3H, CH_3), 1.09 (s, 3H, CH_3), 2.05 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, CH_ACH_B), 2.18 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, CH_ACH_B), 2.40-2.52 (m, 2H, CH_2), 6.66 (s, 2H, NH_2), 6.81-7.12 (m, 3H, CH aromatic), 10.60 (s, 1H, NH).

2-amino-5-chloro-7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile (4c):

White solid; yield: 64%; mp: $290\text{-}292^\circ\text{C}$ (lit. $293\text{-}295^\circ\text{C}$); IR cm^{-1} : 3371 (NH), 3155.3 (NH_2), 2191 (CN), 1724 (CO); ^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6 and CDCl_3): δ 1.00 (s, 3H, CH_3), 1.01 (s, 3H, CH_3), 2.10 (s, 2H, CH_2), 2.40-2.6.0 (m, 2H, CH_2), 6.78 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, CH aromatic), 6.92 (s, 1H, CH aromatic), 7.00 (s, 2H, NH_2), 7.10 (dd, $J = 1.3, 8.0$ Hz), 10.50 (s, 1H, NH).

2-amino-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile (4d):

White solid; yield: 67%; mp: $> 300^\circ\text{C}$ (lit. $312\text{-}313^\circ\text{C}$); IR cm^{-1} : 3382 (NH), 33217 (NH_2), 1724 (CO); ^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6 and CDCl_3): δ 1.90 (m, 2H, CH_2), 2.22 (m, 2H, CH_2), 2.65 (m, 2H, CH_2), 6.80 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, CH aromatic), 6.89 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, CH aromatic), 7.02 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH aromatic), 7.15 (td, $J = 1.3, 7.5$ Hz, 1H, CH aromatic), 7.23 (s, 2H, NH_2), 10.40 (s, 1H, CH aromatic); ^{13}C NMR (62.9 MHz, $\text{DMSO-d}_6\text{-CDCl}_3$): δ 19.92, 26.86, 36.5, 47.01, 57.62, 109.3, 111.97, 117.5 (CN), 121.82, 123.33, 128.29, 134.66, 142.08, 158.77, 166.23 (C=O, ester), 178.30 (C=O amide), 195.20 (C=O).

Ethyl-2-amino-7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carboxylate (4e):

White solid; yield: 72%; mp: $284\text{-}286^\circ\text{C}$ (lit. $279\text{-}281^\circ\text{C}$), IR cm^{-1} : 3367 (NH), 3178 (NH_2), 1681(CO); ^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6 and CDCl_3): δ 0.81 (t, 3H, CH_3), 0.95 (s, 3H, CH_3), 1.10 (s, 3H, CH_3), 2.10 (d, $J = 15.3$, 1H, CH_ACH_B), 2.17 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CH_ACH_B), 2.52 (m, 2H, CH_2), 3.7 (m, 2H, CH_2), 6.68 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH aromatic), 6.70-6.89 (m, 2H, CH aromatic), 7.05 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, CH aromatic), 7.88 (s, 2H, NH_2), 10.25 (s, H, NH); ^{13}C NMR (62.9 MHz, $\text{DMSO-d}_6\text{-CDCl}_3$): δ 13.20 (CH_3), 26.81 (CH_3), 27.9. (CH_3), 31.71 (C-7), 46.72 (C-3'),

50.80 (C-6), 59.01 (CH₂), 76.41 (C-3), 108.30 (C-4), 113.18, 120.73, 122.38, 127.34, 144.10 (C-7'a), 159.20 (C-8a), 162.61 (C-2), 167.8. (C=O, ester), 180.00 (C=O, amide), 194.90 (C=O).

Ethyl-2-amino-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carboxylate (4f):

Brown solid; yield: 62%; mp: 268-270°C (lit. 262-264°C); IR cm⁻¹: 3359 (NH), 3155 (NH₂), 1720 (CO); ¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆ and CDCl₃): δ 0.9 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 1.90 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, CH₂), 2.20 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 2.52 (m, 2H, CH₂), 3.70 (m, 2H, CH₂), 6.67 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH aromatic), 6.75 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, CH aromatic), 6.81 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, CH aromatic), 7.00 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH aromatic), 7.65 (s, 2H, NH₂), 10.05 (s, 1H, NH).

Ethyl-2-amino-5'-chloro-7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8 tetrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carboxylate (4g):

White solid; yield: 72%; mp: 295-29°C (lit. 292-293°C); IR cm⁻¹: 3359 (NH), 3182 (NH₂), 1701 (CO); ¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆ and CDCl₃): δ 0.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.00 (s, 3H, CH₃), 1.01 (s, 3H, CH₃), 2.10 (m, 2H, CH₂), 2.50 (m, 2H, CH₂), 3.80 (m, 2H, CH₂), 6.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH aromatic), 6.78 (s, 1H, CH aromatic), 7.00 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, CH aromatic), 7.66 (s, 2H, NH₂), 10.20 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (62.9 MHz, DMSO-d₆-CDCl₃): δ 14.0 (CH₃), 27.9 (CH₃), 28.3 (CH₃), 32.4 (CH₂), 40.3, 51.4 (CH₂), 59.8 (CH₂), 110.2, 113.3, 123.2, 125.2, 127.8, 139.0, 144.0, 160.0, 163.7, 168.3 (C=O, ester), 180.4 (C=O, amide), 195.7 (C=O).

Ethyl-2-amino-5-chloro-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carboxylate (4h):

White solid; yield: 70%; mp: 280-282°C (lit. 271-273°C); ¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆ and CDCl₃): δ 0.80 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.90 (m, 2H, CH₂), 2.20 (m, 2H, CH₂), 2.60 (m, 2H, CH₂), 3.70 (m, 2H, CH₂), 6.67 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H, CH aromatic), 6.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, CH aromatic), 6.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH aromatic), 7.70 (s, 2H, NH₂), 10.20 (s, 1H, NH).

2-amino-5-chloro-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile (4i):

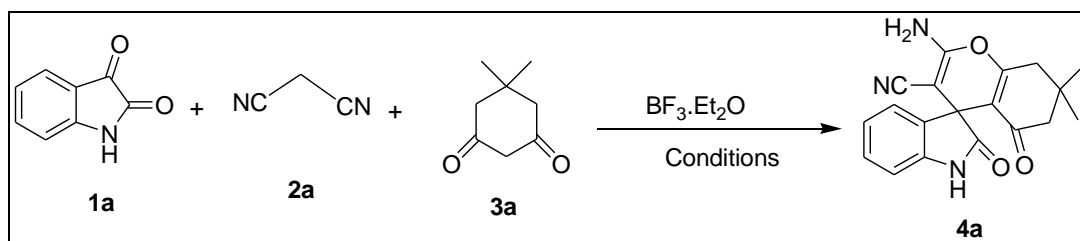
White solid; yield: 89%; mp: >300°C (lit. 293-294°C); ¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆ and CDCl₃): δ 1.95 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂), 2.25 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂), 2.70 (m, 2H, CH₂), 6.82 (dd, *J* = 2.4, 8.2 Hz, 1H, CH aromatic), 7.02 (m, 1H, CH aromatic), 7.12 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH aromatic), 7.16 (s, 2H, NH₂), 10.55 (s, 1H, NH).

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and Characterization

The catalytic behaviour of BF₃.Et₂O was studied for the synthesis of 3-spirochromene-2-oxindole (4a). Thus, the model reaction of isatin (1a), malononitrile (2a) and 5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione (3a) was carried out in the presence of different amounts of BF₃.Et₂O under different conditions. The screening of the various optimized parameters for the model reaction (Table 1), showed that water/EtOH (10 ml, 1/1) was a solvent of choice and 10 mol% of the catalyst was sufficient to afford the desired product in excellent yield (Table 1, entry 6). Notably, the desired product could not be obtained under similar reaction conditions, even after longer time (4hours) in the absence of the catalyst (Table 1, entry 7).

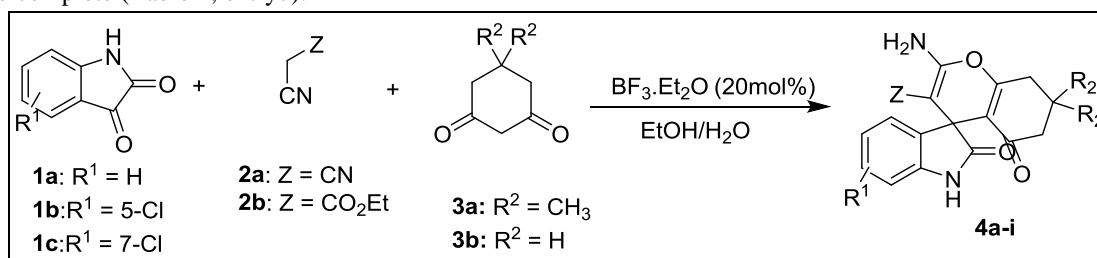
Table 1: Optimisation of the reaction conditions



Entry	Solvent	Catalyst (mol%)	Temperature (°C)	Time (h)	Yield (%) ^a
1	CH ₃ CN	10	Reflux	24	/
2	THF	10	Reflux	24	/
3	EtOH	10	Reflux	12	32
4	H ₂ O	10	Reflux	4	81
5	H ₂ O/EtOH	10	r. t	24	50
6	EtOH/H ₂ O	10	80	2	95
7	EtOH/H ₂ O	none	80	4	traces
8	EtOH/H ₂ O	5	80	2.5	85
9	EtOH/H ₂ O	15	80	3	87
10	EtOH/H ₂ O	20	80	2	93
11	EtOH/H ₂ O	30	80	2	89

^aIsolated yields

Encouraged by this preliminary result and to examine the efficiency and applicability of the present protocol, the reaction was extended to other substituted isatin (1a-c), cyanoacetic acid derivatives (2a-b) and 1,3-dicarbonyl compounds (3a-b) (Scheme 1). All the reaction proceeded well to afford respective 3-spirochromene-2-oxindoles in good yields (Table 2, 4a-i), but better ones are obtained when using both of diethyl malonate and dimedone as starting materials. The results, summarized in Table 2, are significant in terms of yields and product purity in all cases when BF₃.Et₂O was used as catalyst, whereas without BF₃.Et₂O, the reactions may need very long period of time to complete (Table 1, entry7).



Scheme 1: Synthesis of spirooxindole derivatives

Table 2: Physical data of the prepared spirooxindole derivatives * (4a-i)

Entry	R ¹	Z	ketone	Product ^a	Time (h)	Yield ^b (%)	Mp (°C)	
							found	reported[ref]
1	H	CN	3a	4a	2	95	> 300	305-307 [12]
2	7-Cl	CN	3a	4b	0.5	82	296-298	291-293 [13]
3	5-Cl	CN	3a	4c	1	64	290-292	293-295 [13]
4	H	CN	3b	4d	15	67	> 300	312-313 [12]
5	H	CO ₂ Et	3a	4e	3	72	284-286	279-281 [13]
6	H	CO ₂ Et	3b	4f	6	62	268-270	262-264 [14]
7	5-Cl	CO ₂ Et	3a	4g	2	72	295-298	292-293 [13]
8	5-Cl	CO ₂ Et	3b	4h	12	70	280-282	271-273 [14]
9	5-Cl	CN	3b	4i	1	89	>300	293-294 [15]

*Reaction conditions: isatin (1.0 mmol), cyanoacetic acid derivatives (1.0 mmol), 1,3-dicarbonyl compounds (1.0 mmol), catalyst (10 mol% with respect to isatin), refluxing water/ethanol (10 ml, 1/1); ^aAll compounds are well characterized by spectroscopic analyses ; ^bIsolated yields

CONCLUSION

In conclusion, we have described a highly efficient procedure for the preparation of spirooxindoles using an inexpensive and readily available BF₃.Et₂O as catalyst. Moreover, the procedure offers several advantages including good yields, operational simplicity, cleaner reaction and low cost, which make it a useful and attractive process for the synthesis of such compounds with the minimum use and generation of hazardous substances which complies with the green chemistry philosophy. Development of other uses of BF₃.Et₂O as catalyst in MCRS is ongoing in our laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the MESRES (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique) for financial support.

REFERENCES

- [1] J Zhu, H Bienayme. *Multicomponent Reactions*. Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2005**.
- [2] Y Liu; W Hang; J Wan. *Asian J Org Chem*. **2013**, 2, 374-386.
- [3] N Isambert; R Lavilla. *Chem Eur J*. **2008**, 14, 8444-8454.
- [4] RJ Sundberg. *The Chemistry of Indoles*. Academic Press: New York, **1996**.
- [5] A Fensome; WR Adams; AL Adams; TJ Berrodin; J Coen; C Huselton; A Illenberger; JC Kern; VA Hudak; MA Marella; EG Melenski; CC McComas; CA Mugford; OD Slayden; M Yudt; Z Zhang; P Zhang; Y Zhu; RC Winneker; JE Wrobel. *J Med Chem*. **2008**, 51(6), 1861-1873.
- [6] A Mobinikhaledi; N Foroughifar; MAB Fard. *Synth Commun*. **2011**, 41, 441-450.
- [7] SL Zhu; SJ Zhang; Y Ji. *Tetrahedron*. **2007**, 63, 9365-9372.
- [8] L Shemchuk; V Chernykh; R Red'kin. *Russ J Org Chem*. **2008**, 44, 1789-1794.
- [9] GS Hari; YR Lee. *Synthesis*. **2010**, 453-464.
- [10] B Boumoud; AA Yahiaoui; T Boumoud; A Debache. *J Chem Pharm Res*. **2012**, 4(1), 795-799.
- [11] T Boumoud; B Boumoud; P Mosset; A Debache. *E J Chem*. **2011**, 8, 312-318.
- [12] MN Elinson; AI Ilovaisky; AS Dorofeev; VM Merkulova; NO Stepanov; FM Miloserdov; YN Ogibin; GI Nikishin. *Tetrahedron*. **2007**, 63, 10543-10548.
- [13] W Chunlei; Sh Runpu; Ch Jianhui; Hu Chunqi. *Bull Korean Chem Soc*. **2013**, 34, 2431-2435.
- [14] ML Elwarraky; AF Mohamed; AO Bernard; D Gary; A Gary Piazza; AH Abadi. *Chem Rapid Commun*. **2014**, 2, 33-40.
- [15] S Bahareh; Z Zahr; A Raziéh. *Oriental J Chem*. **2015**, 31, 1175-1179.

Publication N° 04

Discovery of Iminobenzimidazole Derivatives as Novel Cytotoxic Agents

Nora Chouha^{1,3}, Hassan Hammoud¹, Simone Brogi⁴, Giuseppe Campiani⁴, Caroline Welsch^{5,6}, Caroline Robert^{5,7}, Stéphan Vagner⁸, Thierry Cresteil⁹, Embarek Bentouhami^{1,10} and Laurent Désaubry^{1,2,*}

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/327351069>

Discovery of Iminobenzimidazole Derivatives as Novel Cytotoxic Agents

Article in *The Open Medicinal Chemistry Journal* · August 2018

DOI: 10.2174/1874104501812010074

CITATIONS

0

READS

53

10 authors, including:



Hassan Hammoud
University of Strasbourg

11 PUBLICATIONS 51 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Simone Brogi
Università degli Studi di Siena

81 PUBLICATIONS 658 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Giuseppe Campiani
Università degli Studi di Siena

236 PUBLICATIONS 4,532 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Flavaglines [View project](#)



Medicinal chemistry of prohibitin ligands and anticancer agents [View project](#)



LETTER

Discovery of Iminobenzimidazole Derivatives as Novel Cytotoxic Agents

Nora Chouha^{1,3}, Hassan Hammoud¹, Simone Brogi⁴, Giuseppe Campiani⁴, Caroline Welsch^{5,6}, Caroline Robert^{5,7}, Stéphan Vagner⁸, Thierry Cresteil⁹, Embarek Bentouhami^{1,10} and Laurent Désaubry^{1,2,*}

¹Laboratory of Therapeutic Innovation (UMR 7200), Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg–CNRS, 67401, Illkirch, France

²Laboratory of Biomolecules (UMR7203), CNRS-Sorbonne University, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

³Laboratory of Synthesis of Molecules of Biological Interest, Université des Frères Mentouri Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria

⁴European Research Centre for Drug Discovery (Nat SynDrugs), Department of Biotechnology, Chemistry and Pharmacy (DBCF), University of Siena, Siena, Italy

⁵INSERM U981, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

⁶Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Kremlin-Bicêtre, France

⁷Department of Oncology, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

⁸Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR3348, 91405, Orsay, France

⁹IPSIT, Faculty of Pharmacy, Université Paris-Sud, 92290 Chatenay-Malabry, France

¹⁰Laboratory of Chemistry, Molecular Engineering and Nanostructures (LCIMN), University Ferhat Abbas- Sétif 1, Sétif, Algeria

Received: May 20, 2018

Revised: August 8, 2018

Accepted: August 12, 2018

Abstract: In our quest to identify inhibitors of the eukaryotic translation initiation factor 4F (eIF4F), we serendipitously discovered a novel cytotoxic agent. Even though this compound did not inhibit translation, we explored the structural requirements for its cytotoxicity due to its structural originality. A series of 1,3-disubstituted iminobenzimidazoles was synthesized and evaluated for their *in vitro* cytotoxicity. The structure-activity relationship studies demonstrate that hydrophobic substituent is essential for activity. The most active compounds displayed a cytotoxicity in KB, HL60 and HCT116 human cancer cells with an IC₅₀ of about 1 μM. These first-in-class series of low molecular weight synthetic molecules may provide the basis for the development of new anticancer drugs.

Keywords: Iminobenzimidazoles, Cytotoxicity, Structure-activity relationship, Cancer, Apoptosis, Eukaryotic translation initiation factor 4F.

1. INTRODUCTION

Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4F (eIF4F) holds promise as novel anticancer drugs that can overcome intra-tumor heterogeneity [1]. Indeed, the eIF4F complex, which regulates the cap-dependent protein synthesis is dysregulated in many types of cancers, leading to the overexpression of proteins that promote tumor growth, metastasis and resistance to cancer treatments. More important, several natural products that inhibit eIF4F, principally flavaglines, but also hippuristanol and pateamine, have demonstrated promising activities in several mouse

* Address correspondence to this authors at the Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg–CNRS, 67401, Illkirch, France; Tel: (+33) 368 854 141; E-mails: desaubry@unistra.fr; labo.strasbg@yahoo.fr

models of cancers. In our quest to identify novel eIF4F inhibitors [2 - 6], we performed a virtual screening and we identified the iminobenzimidazole **1** (ChemBridge 5657657, Scheme 1). as a putative eIF4F inhibitor. Unfortunately, when we examine whether it inhibits eIF4F by using a bicistronic luciferase reporter construct [3], we didn't find any significant activity. However, we found that it is cytotoxic in A375 melanoma cells. Considering that **1** had been described in a small number of patents and articles, none of them were related to cancer [7 - 10], and since the anticancer potential of iminobenzimidazoles has been scarcely investigated [11], we explored the requirement of **1** for its cytotoxicity to determine whether it could provide the basis for the development of new anticancer agents.

2. MATERIALS & METHODS

2.1. Chemical Syntheses

2.1.1. 2-[(4-Chlorophenoxy) Methyl] Oxirane (**3**)

4-Chlorophenol (12.0 g, 93.3 mmol, 1 equiv) was taken up into acetone (250 mL), then K_2CO_3 (38.7 g, 280.0 mmol, 3 equiv) and epichlorohydrin (21.6 mL, 280.0 mmol, 3 equiv) were added consecutively. The reaction mixture was set to stir at reflux for 24 h. At this time, an additional 3 equiv of epichlorohydrin was added and the solution was allowed to stir at reflux for an additional 24 h. The mixture was cooled down to room temperature, and the solids were filtered off. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was taken up in diethyl ether (150 mL). The organic layer was washed with H_2O (1 x 150 mL), 1M aqueous NaOH solution (1 x 150 mL), and brine (1 x 150 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting yellow oil was purified *via* column SiO_2 chromatography (10% EtOAc/hexanes) to yield the desired epoxide as a yellow oil (15.2 g, 88%); 1H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) δ 7.29-7.25 (m, 2H), 6.90-6.86 (m, 2H), 4.24 (dd, $J = 2.8, 10.8$ Hz, 1H), 3.94 (dd, $J = 2.8, 10.8$ Hz, 1H), 3.39-3.35 (m, 1H), 2.94 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H), 2.78 (dd, $J = 2.8, 4.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100MHz) δ 157.1, 129.4, 126.1, 115.9, 69.1, 50.0, 44.6.

2.1.2. 1-(4-Chlorophenoxy)-3-(2-Imino-2,3-Dihydro-1H-Benzo[d]imidazol-1-yl)Propan-2-ol (**4**)

(4-Chlorophenoxy)-3-(2-imino-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)propan-2-ol (**4**). To a solution of 2-aminobenzimidazole **2** (4.0 g, 30.04 mmol) in H_2O /Dioxane 35/35 mL, KOH (1.6 g, 30.04 mmol) and oxirane **3** (5.5 g, 30.04 mmol) were added. The mixture was stirred at 110 °C for 2 hours, then cooled to room temperature. Dioxane was removed under reduced pressure and the resulting solution was extracted 3 times with 50 mL of AcOEt. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting solid was recrystallized with EtOH/ H_2O 3/7 to give the desired product as a white solid (6.0 g, 18.7 mmol, 63%). 1H NMR (DMSO, 400MHz) δ 7.34 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.14 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.90-6.94 (m, 3H), 6.84 ((t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 6.26 (s, 2H), 5.59 (s, 1H), 3.93-4.15 (m, 5H). ^{13}C NMR (DMSO, 100MHz) δ 157.8, 155.8, 143.1, 135.3, 129.7, 124.8, 120.7, 118.5, 116.7, 115.2, 108.3, 70.4, 68.3, 45.4.

2.1.3. 10-[3-(4-Chlorophenoxy)-2-Hydroxypropyl]-3,4-Dihydrobenzo [4,5] Imidazo [1,2-a] Pyrimidin-2(10H)-one (**6**)

To a solution of **4** (0.1 g, 0.31 mmol) in acetonitrile (4 mL), 3-bromo-N,N-dimethylpropanamide **5** (0.08 g, 0.43 mmol) was added and the mixture was stirred at reflux for 15 hours. K_2CO_3 (0.63 mmol) was added and the mixture was stirred at reflux for 2 days. Water (10 mL) and AcOEt (10mL) were added and the organic layer was extracted, dried over $MgSO_4$ and concentrated. The residue was purified on flash chromatographic using (MeOH/DCM 5/95) to give the desired product as a white solid (0.7 mg, 55%). 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.48 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.32 (d $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.15-7.23 (m, 2H), 6.95 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 5.56 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 4.25-4.31 (m, 1H), 4.12-4.21 (m, 4H), 3.93-4.03 (m, 2H), 2.57-2.61 (m, 2H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ 175.3, 157.7, 155.4, 131.5, 130.0, 129.6, 124.8, 122.7, 122.5, 116.7, 110.7, 109.2, 70.8, 67.2, 45.3, 38.7, 29.8. LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ + calcd: 372.10, found 372.02.

2.1.4. 9-[3-(4-Chlorophenoxy)-2-Hydroxypropyl]-3H-Benzo[d] Imidazo [1,2-a] Imidazol-2(9H)-One (**8**).

A mixture of **2** (0.1g, 0.31 mmol, 1 equiv) was taken up into 4 ml of acetonitrile, then bromoacetyl bromide **7** (0.02 mL, 0.31 mmol, 1equiv) and K_2CO_3 (0.08 g, 0.62 mmol, 2 equiv). The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h, the mixture was cooled down to room temperature, and the solid was filtered, to yield the desired product as a white solid (0.126 g, 39%); 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.56 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.17-7.35 (m, 5H), 6.955-6.980 (m, 2H),

5.55 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.43 (s, 2H), 4.17-4.31 (m, 3H), 4.00-4.05 (m, 2H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ 186.1, 168.5, 157.7, 133.7, 129.7, 129.2, 124.9, 123.4, 122.1, 116.7, 111.7, 109.7, 70.6, 67.1, 51.4, 46.9. LCMS-ESI (m/z) [M + H]⁺ calcd: 358.09, found 358.08.

2.1.5. 1-(4-Chlorophenoxy)-3-(3-(2-Hydroxyethyl)-2-Imino-2,3-Dihydro-1H-Benzo[d] Imidazol-1-yl) Propan-2-ol (9b)

A mixture of **4** (0.1 g, 0.31 mmol, 1 equiv) was taken up into 4 ml of acetonitrile then 2-chloroethanol was added (0.04 mL, 0.62 mmol, 2.0 equiv). The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h, the mixture was cooled down to room temperature. The solid was filtered, to yield the desired product as a white solid (0.04 g, 32%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.84 (bs, 1H), 7.59 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.29-7.36 (m, 4H), 7.02 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 5.65 (bs, 1H), 5.09 (bs, 1H), 4.24-4.34 (m, 5H), 4.06-4.09 (m, 2H), 3.74 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (DMSO, 100MHz) δ 173.0, 157.7, 150.9, 130.8, 130.7, 129.7, 124.9, 123.6, 123.5, 116.8, 111.1, 70.3, 67.2, 58.9, 46.3, 45.8. LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd: 362.12, found 362.05.

2.1.6. 2-[3-[3-(4-Chlorophenoxy)-2-Hydroxypropyl]-2-Imino-2,3-Dihydro-1H-Benzo[d] Imidazol-1-yl] Acetamide (9b)

A mixture of **4** (0.08 g, 0.25 mmol, 1 equiv) was taken up into 4 ml of acetonitrile, then chloroacetamide (0.02 mL, 0.25 mmol, 1.0 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h, the mixture was cooled down to room temperature. The solid was filtered, to yield the desired product as a white solid (0.03 g, 31%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.96 (bs, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.40-7.53 (m, 2H), 7.29-7.35 (m, 5H), 7.02 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.90 (s, 2H), 4.29-4.36 (m, 3H), 4.07-4.09 (m, 2H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ 167.1, 157.7, 151.3, 130.7, 130.5, 129.7, 124.9, 123.9, 123.8, 116.8, 111.3, 110.4, 70.3, 67.2, 46.4, 45.5. LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd: 375.10, found 375.04.

2.1.7. [3-[2-[1, 3-Dioxolan-2-yl) Ethyl]-2-Imino-2, 3-Dihydro-1H-Benzo[d] Imidazol-1-yl]-3-(4-Chlorophenoxy) Propan-2-ol (9c)

A mixture of **4** (0.2 g, 0.63 mmol, 1 equiv) was taken up into 4 ml of acetonitrile, then 2-(2-bromoethyl-1,3 dioxane) (0.12 g, 0.69 mmol, 1.1 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h, the mixture was cooled down to room temperature, and the solid was filtered and purified by column chromatography (AcOEt:MeOH / 9: 1), to yield the desired product as a brown solid (0.1 g, 38%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.59 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.28-7.36 (m, 4H), 7.01 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.91 (t, $J = 4.2$ Hz, 1H), 4.23-4.32 (m, 5H), 4.04-4.1 (m, 2H), 3.73, 3.88 (m, 4H), 2.05 (q, $J = 5.7$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ 157.7, 150.4, 130.8, 129.9, 129.7, 125.0, 123.9, 123.8, LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd: 418.12, found 418.14.

2.1.8. 1-(3-Allyl-2-Imino-2,3-Dihydro-1H-Benzo[d] Imidazol-1-yl)-3-(4-Chlorophenoxy)propan-2-ol (9d)

A mixture of **4** (0.12 g, 0.40 mmol, 1 equiv) was taken up into 4 ml of acetonitrile, then allylbromide (0.03 mL, 0.3 mmol, 1.0 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h, the mixture was cooled down to room temperature, and the solid was filtered to yield the desired product as a white solid (0.05 g, 48%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.61 (dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.31-7.37 (m, 4H), 7.01 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 5.83-5.91 (m, 1H), 5.38 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.24 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.82 (d, $J = 3.2$ Hz, 2H), 4.32-4.39 (m, 2H), 3.92-4.19 (m, 3H). LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd: 357.12, found 357.13.

2.1.9. 1-(3-Benzyl-2-imino-2,3-Dihydro-1H-Benzo[d] Imidazol-1-yl)-3-(4-Chlorophenoxy)propan-2-ol (9e)

A mixture of **4** (0.09 g, 0.30 mmol, 1 equiv) was taken up into 4 ml of acetonitrile, then benzylbromide (0.05 g, 0.3 mmol, 1.0 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h, the mixture was cooled down to room temperature, and the solid was filtered to yield the desired product as a white solid (0.06 g, 61%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.53 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.18-7.37 (m, 10H), 7.01 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 5.42 (s, 2H), 4.24-4.28 (m, 3H), 4.01-4.09 (m, 2H). ^{13}C NMR (DMSO, 100MHz) δ 157.7, 150.8, 135.1, 130.8, 129.9, 129.7, 129.3, 128.4, 127.5, 124.9, 124.1, 124.0, 116.8, 111.6, 111.0, 70.4, 67.0, 46.6, 46.0. LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd: 407.14, found 407.11.

2.1.10. 1-(4-Chlorophenoxy)-3-(2-Imino-3-(3-Phenylpropyl)-2,3-Dihydro-1H-Benzo [d] Imidazol-1-yl) Propan-2-ol (9f)

A mixture of **4** (0.09 g, 0.30 mmol, 1 equiv) was taken up into 4 ml of acetonitrile, then (3-bromopropyl)benzene

(0.06 g, 0.3 mmol, 1.0 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h, the mixture was cooled down to room temperature, and the solid was filtered to yield the desired product as a white solid (0.08 g, 65%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.15-7.28 (m, 10H), 7.02 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.35-4.71 (m, 5H), 4.04-4.14 (m, 2H), 2.89 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.24 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H). ¹³C NMR (DMSO, 100MHz) δ 157.7, 150.3, 141.3, 130.7, 130.0, 129.7, 128.8, 128.5, 126.4, 124.9, 123.8, 123.8, 116.8, 111.4, 110.6, 70.4, 67.0, 46.4, 42.9, 32.3, 29.7. LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd: 435.17, found 435.02.

2.1.11. 1-(4-Chlorophenoxy)-3-(3-(2-Cyclohexylethyl)-2-Imino-2,3-Dihydro-1H-Benzo[d] Imidazol-1-yl) Propan-2-ol (9g)

A mixture of **4** (0.2g, 0.63 mmol, 1 equiv) was taken up into 4 ml of acetonitrile, then 1-bromo-2-cyclohexyl ethane (0.132g, 0.69 mmol, 1.1 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h, the mixture was cooled down to room temperature, and the solid was filtered, to yield the desired product as a white solid (0.126 g, 39%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.71 (sb, 1H), 7.6 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.3-7.36 (m, 4H), 6.99 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.08-4.34 (m, 2H), 4.23-4.27 (m, 1H), 4.17 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.02-4.11 (m, 2H), 1.77 (d, *J* = 12.4 Hz, 2H), 1.63-1.69 (m, 3H), 1.52-1.57 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.34-1.38 (m, 1H), 1.13-1.25 (m, 3H), 0.93-1.02 (m, 2H); ¹³C NMR (400 MHz, DMSO) δ 156.6, 148.1, 128.6, 127.6, 122.9, 121.8, 121.7, 114.7, 109.4, 108.5, 68.3, 64.9, 44.3, 39.2, 33.0, 32.9, 30.9, 24.3, 24.0. LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd: 428.12, found 428.18.

2.1.12. (E)-1-(4-Chlorophenoxy)-3-(2-Imino-3-(3-Phenylallyl)-2,3-Dihydro-1H-Benzo[d] Imidazol-1-yl)-Propan-2-ol (9h)

A mixture of **4** (0.2 g, 0.63 mmol, 1 equiv) was taken up into 4 ml of acetonitrile, then 3-bromo-1-phenyl-1-propene (0.137g, 0.69 mmol, 1.1 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h, the mixture was cooled down to room temperature, and the solid was filtered, to yield the desired product as a white solid (0.186 g, 58%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.51 (t, *J* = 3.2, Hz, 2H), 7.42 (d, 7.2 Hz, 2H), 7.25-7.35 (m, 7H), 7.0 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.7 (d, *J* = 16Hz, 1H), 6.39 (dt, *J* = 15.6, 5.7 Hz, 1H), 5.0 (d, *J* = 5.2, 2H), 4.27-4.33 (m, 3H), 4.04-4.12 (m, 2H), ¹³C NMR (400 MHz, DMSO) δ 157.8, 150.7, 136.2, 136.1, 133.1, 131.7, 130.9, 130.1, 129.8, 129.2, 128.6, 126.9, 124.9, 123.8, 122.6, 116.8, 111.2, 110.7, 70.5, 67.1, 46.4, 44.6. LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd: 434.1, found 434.1.

2.1.13. 1-(4-Chlorophenoxy)-3-(2-Imino-3-(3-Phenylprop-2-yn-1-yl)-2,3-Dihydro-1H-Benzo [d] Imidazol-1-yl) Propan-2-ol (9i)

A mixture of **4** (0.15 g, 0.47mmol, 1 equiv) was taken up into 4 ml of acetonitrile, then 3-chloro-1-phenyl-1-propyne (0.077 g, 0.51 mmol, 1.1 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h and cooled down to room temperature. The solid was filtered to yield the desired product as a white solid (0.143 g, 66%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.7 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 8, 1H), 7.31-7.44 (m, 9H), 7.0 (d, *J* = 9.6, 2H), 5.5 (s, 2H), 4.33-4.42 (m, 2H), 4.23-4.27 (m, 1H), 4.06-4.1 (m, 2H), ¹³C NMR (400 MHz, DMSO) δ 157.7, 150.3, 132.1, 130.9, 129.8, 129.7, 129.5, 129.3, 124.9, 124.2, 124.1, 121.6, 116.9, 116.8, 111.6, 110.9, 85.3, 82.6, 70.4, 67.1, 46.6, 33.9. LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd: 432.1, found 432.1.

2.1.14. 1-(4-Chlorophenoxy)-3-(2-Imino-3-(2-Phenoxyethyl)-2,3-Dihydro-1H-Benzo[d] Imidazol-1-yl) Propan-2-ol (9j)

A mixture of **4** (0.2 g, 0.63 mmol, 1 equiv) was taken up into 4 ml of acetonitrile, then 2-phenoxyethyl bromide (0.138 g, 0.69 mmol, 1.1 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h and cooled down to room temperature. The solid was filtered to yield the desired product as a white solid (0.27 g, 85%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.63 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.23-7.33 (m, 6H), 6.99 (d, *J* = 8.8, 2H), 6.92 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 4.6 (m, 2H), 4.23-4.32 (m, 5H), 4.02-4.1 (m, 2H), ¹³C NMR (400 MHz, DMSO) δ 158.3, 157.7, 151.1, 130.8, 130.6, 130.2, 130, 129.7, 124.9, 123.6, 121.5, 116.8, 114.8, 111.2, 111.1, 111, 70.4, 67.1, 65.6, 46.4, 42.9. LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd: 438.11, found 438.21.

2.1.15. 1-(3-(4-Bromophenethyl)-2-Imino-2,3-Dihydro-1H-Benzo[d] Imidazol-1-yl)-3-(4-Chlorophenoxy) Propan-2-ol (9k)

A mixture of **4** (0.2 g, 0.63 mmol, 1 equiv) was taken up into 4 ml of acetonitrile, then 1-bromoethyl – 4-(2-bromoethylbenzene) (0.18 g, 0.69 mmol, 1.1 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h and

cooled down to room temperature. The solid was filtered to yield the desired product as a white solid (0.144 g, 46%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.53-7.55 (m, 1H), 7.47 (d, $J=7.6$ Hz, 3H), 7.35 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J=7.6$ Hz, 4H), 7.0 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 4.38 (t, $J=7.4$, 2H), 4.21-4.29 (m, 3H), 4.02-4.08 (m, 2H), 4.97 (t, $J=7.4$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) 157.7, 152.6, 150.6, 137.2, 131.9, 131.6, 130.7, 129.9, 129.8, 124.9, 123.6, 120.4, 116.8, 111.0, 110.5, 70.4, 67.2, 46.2, 43.7, 31.9. LCMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd: 499.1, found 499.9.

2.1.16. 1-(4-Chlorophenoxy)-3-[2-Imino-3-[2-(Naphthalen-1-yl) Ethyl]-2, 3-Dihydro-1H-Benzo[d] Imidazol-1-yl] Propan-2-ol (9l)

A mixture of **4** (0.2g, 0.63 mmol, 1 equiv) was taken up into 4 ml of acetonitrile, then 1-(2-bromoethyl) naphthalene (0.16 g, 0.69 mmol, 1.1 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h and cooled down to room temperature. The solid was filtered to yield the desired product as a white solid (0.281 g, 88%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.08 (s, 2H), 8.06 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.9 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.77-7.79 (m, 1H), 7.5-7.58 (m, 3H), 7.35-7.38 (m, 4H), 7.21 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.08-7.132 (m, 2H), 7.00-7.06 (m, 2H), 5.63 (s, 1H), 4.59 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 4.23-4.31 (m, 3H), 4.00-4.09 (m, 2H), 3.5 (t, $J=6.8$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ 157.7, 150.3, 133.9, 133.8, 131.9, 130.4, 129.9, 129.8, 129.1, 127.8, 127.5, 126.7, 126.2, 125.9, 125.0, 123.7, 116.8, 111.3, 110.4, 70.4, 67.1, 46.3, 43.7, 30.2. LCMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd: 472.2, found 472.1.

2.1.17. 1-(4-Chlorophenoxy)-3-(3-(3,3-Diphenylpropyl)-2-Imino-2,3-Dihydro-1H-Benzo [d] Imidazol-1-yl) Propan-2-ol (9m)

A mixture of **4** (0.2g, 0.63 mmol, 1 equiv) was taken up into 4 ml of acetonitrile, then 3,3-diphenyl-1-bromopropane (0.18 g, 0.69 mmol, 1.1 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h and cooled down to room temperature. The solid was filtered to yield the desired product as a white solid (0.37 g, 86%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.74 (s, 2H), 7.52-7.55 (m, 1H), 7.26-7.35 (m, 12H), 7.18 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 7.10-7.16 (m, 1H), 7.01 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 5.59 (s, 1H), 4.21 (s, 3H), 4.02-4.14 (m, 5H), 5.53-5.55 (m, 2H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ 157.7, 150.1, 144.4, 144.3, 130.6, 129.7, 129.0, 128.0, 127.8, 126.8, 124.9, 123.8, 116.8, 111.4, 110.2, 70.4, 67.0, 48.4, 46.3, 42.1, 32.7. LCMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd: 512.2, found 512.11.

2.1.18. N-Methyl-3-Nitropyridin-2-Amine (11)

To a solution of methylamine (10 mL, 80.7 mmol) at 0°C , 2-chloro-3-nitropyridine **10** (1.6 g, 10.0 mmol) was added in several portions. The solution was stirred 1 hour at 0°C then 2 hours at room temperature before concentration in vacuum. The residue was washed with water (20 mL) and then extracted 3 times in AcOEt (20 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 then concentrated to give the desired product as a yellow oil (1.3 g, 85%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.40-8.45 (m, 2H), 8.24 (bs, 1H), 6.62-6.65 (m, 1H), 3.16 (d, $J=2.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 155.7, 153.2, 135.2, 128.3, 111.5, 28.1.

2.1.19. N-Methylpyridine-2,3-Diamine (12)

To a solution of **11** (1.1 g, 7.18 mmol) in dry MeOH (25 mL), palladium 10% carbon (0.07 g, 0.71 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature and under hydrogen (atmospheric pressure) overnight. The solution was filtered over celite then concentrated to give the desired product as a yellow oil (0.88 g, 99%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.78 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 6.51 (t, $J=5.4$ Hz, 1H), 4.20 (bs, 1H), 3.18 (bs, 2H), 3.00 (d, $J=2.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 151.1, 139.2, 128.5, 121.7, 113.2, 28.7.

2.1.20. 3-Methyl-3H-Imidazo[4,5-b] Pyridin-2-Amine (13)

To solution of **12** (0.6 g, 4.87 mmol) in MeOH/ H_2O 12/12 mL, cyanogen bromide (1.5 g, 14.63 mmol) was added. The mixture was stirred at 60°C for 4 hours. After cooling to room temperature, MeOH was evaporated and the solution was basified to pH 8 using a solution of NaOH 1N. The organic layer was extracted 3 times with AcOEt (20 mL), dried over MgSO_4 and concentrated in vacuum. The residue was purified by flash chromatographic (MeOH/DCM 1/9) to give the desired product as a brown solid (0.37 g, 55%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.84 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J=7.2$ Hz, $J=1.8$ Hz, 1H), 6.92-6.96 (m, 1H), 6.78 (s, 2H), 3.51 (s, 3H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ 156.5, 148.5, 137.8, 136.3, 120.5, 117.1, 27.3.

2.1.21. 2.1.21 1-(4-Chlorophenoxy)-3-(2-Imino-3-Methyl-2,3-Dihydro-1H-Imidazo[4,5-b] Pyridin-1-yl) Propan-2-ol (14)

To a solution of 3-methyl-3H-imidazo [4,5-b]pyridin-2-amine (0.1 g, 0.67 mmol) in H₂O/dioxane 3/3 mL, KOH (0.04 g, 0.67 mmol) and epoxide **3** (0.13 g, 0.74 mmol) were added. The mixture was stirred at 110 °C for 2 hours, then cooled down to room temperature. Dioxane was removed under reduced pressure and the resulting solution was extracted 3 times with 50 mL of AcOEt. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting solid was recrystallized with EtOH/H₂O 3/7 to give the desired product as a white solid (0.05 g, 0.16 mmol, 25%). ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 8.11 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.08 (bs, 1H), 4.31-4.42 (m, 1H), 3.94-4.09 (m, 3H), 3.76-3.80 (m, 1H), 3.64 (s, 3H). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 157.1, 155.4, 147.9, 139.7, 134.2, 129.4, 126.1, 122.4, 117.7, 115.7, 70.1, 69.4, 46.5, 26.8. LCMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd: 333.10, found 333.04.

2.2. Biological Assays

2.2.1. Cell Culture

The human cell lines KB (nasopharyngeal epidermis carcinoma) and HCT116 (colon adenocarcinoma) were purchased from ECACC (Salisbury, UK) and HL60 (promyeocytic leukaemia) cells from ATCC. KB cells were grown in D-MEM medium supplemented with 10% fetal calf serum, in the presence of penicillin, streptomycin and fungizone in a 75 cm² flask under 5% CO₂, whereas the two other cell lines were grown in complete RPMI medium.

2.2.2. Cell Cytotoxicity Assay

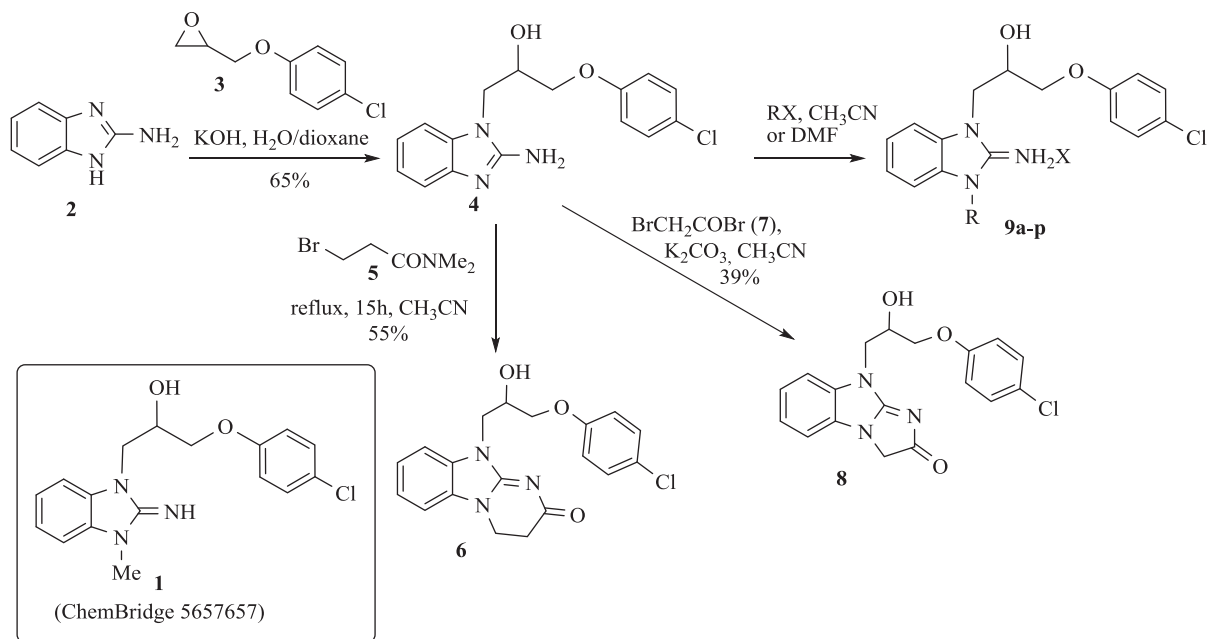
Cells were plated in 96-well tissue culture plates in 200 μl medium and treated 24 h later with complexes dissolved in DMSO at concentrations ranged 0.5 nM to 10 μM and were prepared by using a Biomek 3000 (Beckman-Coulter). Control cells received the same volume of DMSO (1% final volume). After 72 h exposure to the drug, Cell Titer 96[®] AQueous one reagent (Promega) was added and incubated for 3h at 37 °C: the absorbance was monitored at 490 nm and results are expressed as the inhibition of cell proliferation and cell viability calculated as the ratio [(1-(OD490 treated/OD490 control)) × 100]. For IC₅₀ determinations (50% inhibition of cell viability), experiments were performed in duplicate.

3. RESULTS AND DISCUSSION

We started our Structure-Activity Relationships (SAR) investigation by replacing the *N*-methyl of **1** by various substituents. The synthesis of these derivatives began with the alkylation of aminobenzimidazole **2** with an epoxide **3** to afford adduct **4** Scheme (1). Condensation of **4** with acyl halides **5** and **7** delivered the cyclized adducts **6** and **8**. Reaction with alkyl halides afforded adducts **9a-p** (Scheme 1).

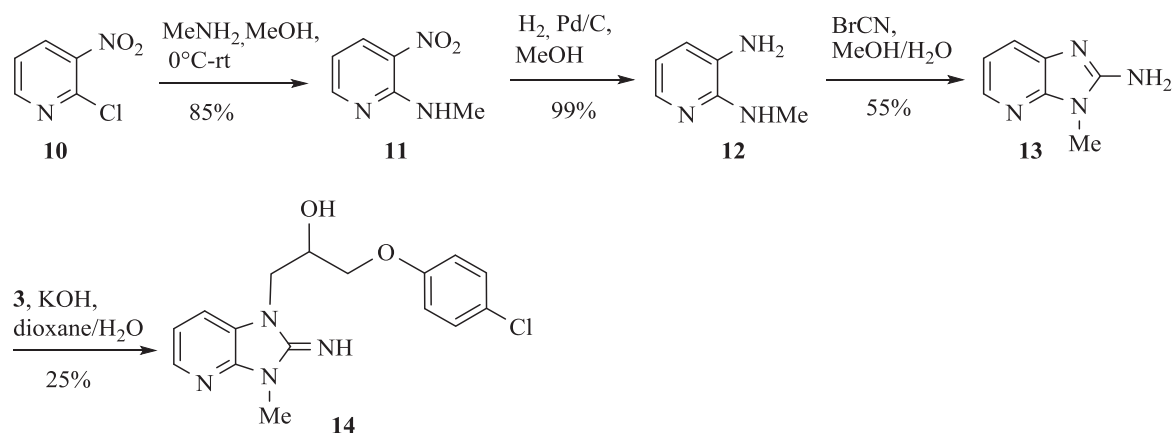
Aza-isostere **14** was prepared in 4 steps starting from 2-chloro-3-nitropyridine **10** (Scheme 2). Condensation with methylamine, followed by a reduction of the nitro group and ring closure with cyanogen bromide afforded the aza-benzimidazole **13** that was alkylated by epoxide **3** to yield **14**.

Surprisingly, neither **1** nor its desmethyl analogue **4** was cytotoxic to KB cells at 10 μM (Table 1). The inclusion of the amidine moiety in an extra cycle (**6**, **8**) or introduction of polar functions (**9a-c**) did not promote cytotoxicity. Introduction of a nitrogen in the benzimidazole moiety (**14**) was also ineffective, but the replacement of the methyl by an allyl (**9d**) or benzyl (**9e**) made these compounds extremely cytotoxic. Gratefully, increasing the size of the linker between iminobenzimidazolium and phenyl from one to three methylenes (**9f**) enhanced cytotoxicity.



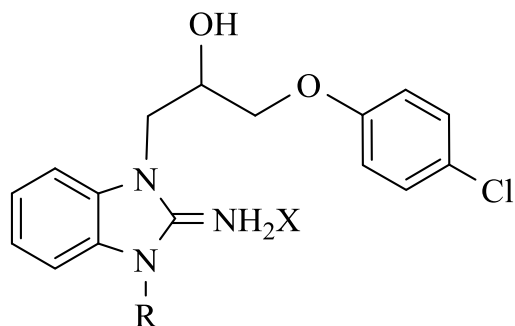
Scheme (1). Structure of hit **1** and synthesis of its analogues **6**, **8** and **9a-p**.

Aza-isostere **14** was prepared in 4 steps starting from 2-chloro-3-nitropyridine **10** Scheme. (2). Condensation with methylamine, followed by a reduction of the nitro group and ring closure with cyanogen bromide afforded the aza-benzimidazole **13** that was alkylated by epoxide **3** to yield **14**. Synthesis of aza-isostere **14**.



Scheme (2). Synthesis of aza-isostere **14**.

With the identification of potent cytotoxic compounds, we pursued our investigation by determining the IC_{50} of newly synthesized compounds in 3 human cancer cell lines (Table 2), (Fig. 1). These three human cancer cell lines are respectively derived from patients with cervical carcinoma, acute promyelocytic leukemia and colorectal carcinoma. As such, they represent a variety of different cancers. Replacement of the phenyl by a cyclohexyl (**9g**), introduction of unsaturations or an ether in the linker (**9h-j**), and the addition of a bromine (**9k**) or extra aromatic cycles (**9l,m**) did not significantly modified cytotoxicity, which was very similar in the 3 examined cell lines. These results suggest that these compounds probably bind with a comparable affinity for their target and indicate the requirement for a hydrophobic moiety connected to the benzimidazole ring by a linker with 2 or 3 carbons (Fig. 2).

Table 1. Cytotoxicity in KB, HL60 and HCT116 human cancer cells (IC_{50} , μM).^[a]

Cpd.	R	R'	A	HX	$10^{-5}M$	$10^{-6}M$
1	Me	H	CH	-	0 ± 17	0 ± 2
4	H	H	CH	-	0 ± 9	0 ± 3
6			CH	-	0 ± 3	0 ± 2
8			CH	-	0 ± 6	0 ± 7
9a		H	CH	HCl	0 ± 12	0 ± 15
9b		H	CH	HCl	0 ± 2	0 ± 9
9c		H	CH	-	1 ± 11	0 ± 13
14	Me	H	N	-	0 ± 7	0 ± 4
9d		H	CH	HBr	88 ± 5	0 ± 17
9e		H	CH	HBr	96 ± 2	8 ± 8
9f		H	CH	HBr	98 ± 1	57 ± 5

[a] Experiments were performed in triplicate.

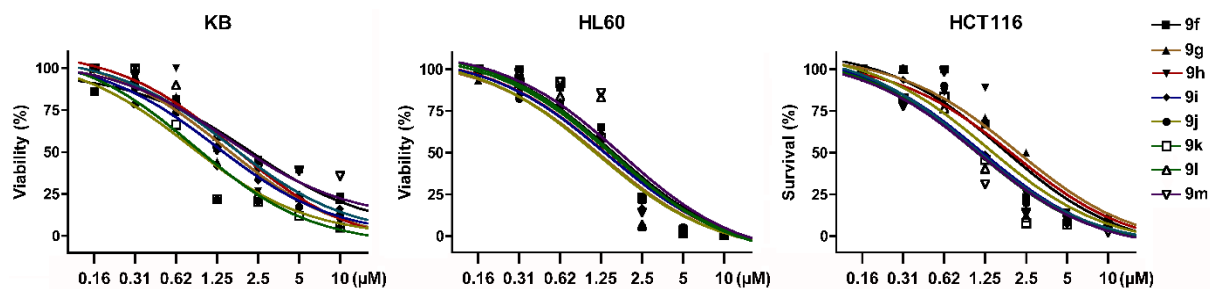
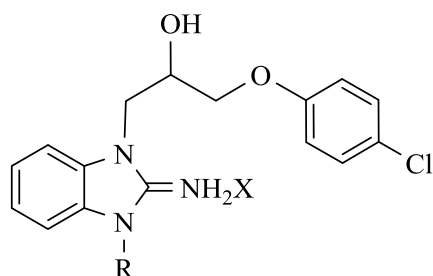


Fig. (1). Effects of iminobenzimidazoles 9f-m on the viability of KB, HL60 and HCT116 human cancer cells (average of two independent experiments).

Table 2. Cytotoxicity in KB, HL60 and HCT116 human cancer cells (IC_{50} , μM).^[a]

PD	R	HX	KB	HL60	HCT116
9f		HBr	2/1.2	1.1/1.0	1.5/1.5
9g		HBr	1.3/1.5	1.25/1.25	1.3/2
9h		HBr	2/1.2	1.25/1.25	2/2
9i		HBr	1.75/0.8	1.75/1.5	1.3/2

[a] Experiments were performed in duplicate.

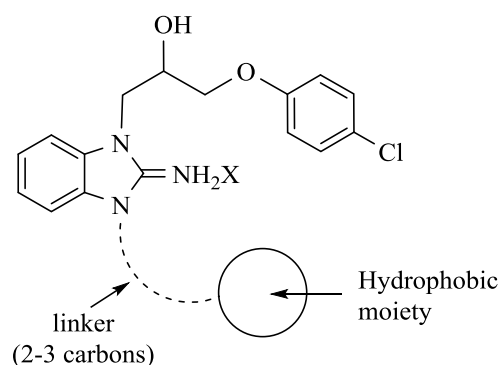


Fig. (2). Summary of the structural requirement of iminobenzimidazoles for their cytotoxicity.

CONCLUSION

The research and development of a novel type of drugs are of great importance to improve the treatment of cancers. In this context, we describe herein the discovery and optimization of the first-in-class series of cytotoxic agents. The SAR studies demonstrated the requirement for a hydrophobic moiety. These results are highly encouraging, and SAR studies to examine structural variations of the iminobenzimidazole and 3-(4-chlorophenoxy)-2-hydroxypropyl moieties are underway.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is published within the LABEX ANR-10-LABX-0034_Medalis and received financial support from the French government managed by ANR under “Programme d’investissement d’avenir”. NC received a fellowship from Frères Mentouri University-Constantine 1.

REFERENCES

- [1] Malka-Mahieu, H.; Newman, M.; Désaubry, L.; Robert, C.; Vagner, S. The eIF4F translation initiation complex- New opportunities for cancer treatment. *Clin. Cancer Res.*, **2017**, 23(1), 21-25. [<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2362>] [PMID: 27789529]
- [2] Basmadjian, C.; Thuaud, F.; Ribeiro, N.; Désaubry, L. Flavaglines: Potent anticancer drugs that target prohibitins and the helicase eIF4A. *Future Med. Chem.*, **2013**, 5(18), 2185-2197. [<http://dx.doi.org/10.4155/fmc.13.177>] [PMID: 24261894]
- [3] Boussemart, L.; Malka-Mahieu, H.; Girault, I.; Allard, D.; Hemmingsson, O.; Tomasic, G.; Thomas, M.; Basmadjian, C.; Ribeiro, N.; Thuaud, F.; Mateus, C.; Routier, E.; Kamsu-Kom, N.; Agoussi, S.; Eggermont, A.M.; Désaubry, L.; Robert, C.; Vagner, S. eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature*, **2014**, 513(7516), 105-109. [<http://dx.doi.org/10.1038/nature13572>] [PMID: 25079330]
- [4] Tabet, R.; Schaeffer, L.; Freyermuth, F.; Jambou, M.; Workman, M.; Lee, C-Z.; Lin, C-C.; Jiang, J.; Jansen-West, K.; Abou-Hamdan, H.; Désaubry, L.; Gendron, T.; Petrucelli, L.; Martin, F.; Lagier-Tourenne, C. CUG initiation and frameshifting enable production of dipeptide repeat proteins from ALS/FTD C9ORF72 transcripts. *Nat. Commun.*, **2018**, 9(1), 152. [<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02643-5>] [PMID: 29323119]
- [5] Malka-Mahieu, H.; Girault, I.; Rubington, M.; Leriche, M.; Welsch, C.; Kamsu-Kom, N.; Zhao, Q.; Désaubry, L.; Vagner, S.; Robert, C. Synergistic effects of eIF4A and MEK inhibitors on proliferation of NRAS-mutant melanoma cell lines. *Cell Cycle*, **2016**, 15(18), 2405-2409. [<http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2016.1208862>] [PMID: 27533468]
- [6] Wang, S.; Darini, C.; Désaubry, L.; Koromilas, A.E. Susceptibility to pharmacological inhibition of translation initiation factor eIF4A. *Mol. Cancer Ther.*, **2016**, 15(12), 3055-3063. [<http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0416>] [PMID: 27913706]
- [7] Drasner, K.; Weber, K.T.U.S. *U.S. Guanidine compounds as anesthetics and for treatment of nervous system disorders*. Patent 7868028 B2, 2011.
- [8] Yanagisawa, M. *Preparation of iminobenzimidazole derivatives for use as type-2 orexin receptor agonists*. U.S. Patent 20100150840 A1, 2010.
- [9] Raphemot, R.; Rouhier, M.F.; Hopkins, C.R.; Gogliotti, R.D.; Lovell, K.M.; Hine, R.M.; Ghosalkar, D.; Longo, A.; Beyenbach, K.W.; Denton, J.S.; Piermarini, P.M. Eliciting renal failure in mosquitoes with a small-molecule inhibitor of inward-rectifying potassium channels. *PLoS One*, **2013**, 8(5), e64905. [<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064905>] [PMID: 23734226]
- [10] Rubin, H.; Reitz, A.; Selwood, T.; Yano, T.; Wrobel, J.; Loughran, H.M.; Weaver, D.; Costanzo, M.J. *Preparation of substituted benzimidazoles as anti-infective compounds and methods using same.*, U.S. Patent 201462078726, **2014**.
- [11] Wolpaw, A.J.; Shimada, K.; Skouta, R.; Welsch, M.E.; Akavia, U.D.; Pe'er, D.; Shaik, F.; Bulinski, J.C.; Stockwell, B.R. Modulatory profiling identifies mechanisms of small molecule-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, 108(39), E771-E780. [<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1106149108>] [PMID: 21896738]

© 2018 Chouha et al.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International Public License (CC-BY 4.0), a copy of which is available at: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>. This license permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Résumé

Nos travaux portent sur le développement de nouvelles approches synthétiques de composés à visée anticancéreuse. Ces travaux ont été effectués à l'Université de Constantine et de Strasbourg, sous la supervision de la Pr. Taoues Boumoud et du Dr. Laurent Désaubry.

Les triarylimidazoles et les spirooxindoles sont des hétérocycles que l'on retrouve parmi plusieurs agents anticancéreux importants. Afin de faciliter l'exploration pharmacochimique, enrichir d'avantage la bibliothèque de ces composés et améliorer leur synthèse, nous avons reportés de nouvelles voies catalytiques de synthèse des triarylimidazoles et des spiro[chromène-oxindoles] avec des bons rendements *via* des réactions multicomposants en utilisant deux nouveaux catalyseurs : l'acide citrique et le $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ respectivement. Deux articles démontrant l'effet catalytiques de ces deux catalyseurs dans la synthèse des spirooxindoles et triarylimidazoles ont été publiés.^{69, 71}

Des travaux originaux menés à Strasbourg ont mis en évidence les propriétés cytotoxiques d'un iminobenzimidazole sur des lignées cancéreuses. D'autres analogues ce composé ont été synthétisés pour déterminer les requis structuraux pour cette cytotoxicité. Un article décrivant ces travaux a été publié dans *The Open Medicinal Chemistry Journal*.⁷⁰ Un autre agent cytotoxique, la fluorizoline et des analogues de celle-ci ont également été préparés. Deux premiers articles démontrant l'inhibition de l'oncogène KRAS par la fluorizoline et son activité dans des modèles de leucémie lymphocytaire chronique ont également été publiés.⁶⁸

Mots clés : Triarylimidazoles, spirooxindoles, acide citrique, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, iminobenzimidazole, fluorizoline, oncogène KRAS, cytotoxicité, leucémie

Abstract:

Our work focuses on the development of new synthetic approaches to anticancer compounds. This work was carried out at the University of Constantine and Strasbourg, under Prof. Taoues Boumoud and Dr. Laurent Désaubry's supervision.

Triarylimidazoles and spirooxindoles are heterocycles found among several important anti-cancer agents. In order to facilitate the pharmacochemical exploration of these compounds, improving their synthesis was aimed. Novel catalytic ways were developed for the synthesis of triarylimidazoles and spiro[chroméne-oxindoles] with good yields *via* multicomponent reactions in the presence of citric acid and $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ as catalysts respectively. Two articles demonstrating the catalytic effects of the former catalysts in the synthesis of benzimidazoles and spirooxindole derivatives were published.

Original work carried out in Strasbourg has demonstrated the cytotoxic properties of an iminobenzimidazole on cancerous lines. Analogues of this compound, were prepared, to determine the structural requirements for this cytotoxicity. An article describing these works was published in *The Open Medicinal Chemistry Journal*. Another cytotoxic agent "fluorizoline" and analogues thereof were also prepared. Two first articles demonstrating the inhibition of KRAS oncogene by this compound and its activity in models of chronic lymphocytic leukemia were also published.

Keywords: Triarylimidazoles, spirooxindoles, citric acid, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, iminobenzimidazole, fluorizoline, KRAS oncogene, cytotoxicity, leukemia

الملخص:

ارتكز عملنا على تطوير طرق تركيبية جديدة للمركبات المضادة للسرطان. وقد تم هذا العمل بالتعاون بين جامعة قسنطينة-الجزائر- و جامعة ستراسبورغ-فرنسا- تحت إشراف كل من البروفسور الطاوس بومود والدكتور لوران ديزبري.

الترياريل اميدازول و السبيرو اكسندول هي مركبات معروفة بمفعولها الهام المضاد للسرطان. و بغية تسهيل الاستكشاف الكيميائي لهذه المركبات ، سعينا إلى تحسين طرق تركيبها. و قد تبين لنا أن حمض الليمون يحفز تصنيعالترياريل اميدازولمع مردودعال.وأظهرت التجارب أن $BF_3 \cdot OEt_2$ بإمكانها أن تحفز تركيبالسبيرو اكسندول انطلاقا منالازاتين.

التجارب المجرات في جامعة ستراسبورغعلى مشتقات جديدة التصنيع للامينوبنزمدازول بينت انها تمتلك خصائصسامة على خلايا سرطانية.

و من جهة اخرى قمنا بتصنيع الفلورزولين ونظائرها. النتائج المحصل عليها تبين قدرة الفلورزولين على

تنشيط الجين الورمي KRAS على نماذج من سرطان الدم الليمفاوي المزمن