



Université  
de Toulouse



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT EN CO-TUTELLE

Délivré par l'Université Paul Sabatier - Toulouse III et l'Université Mohammed V-Faculté des sciences  
Rabat / Maroc

Spécialité : Chimie-Biologie-Santé

---

Présentée et soutenue par Mme ASMAE ZANZOUL

Le 19 juin 2014

**Titre :** *synthèse de ligands hétérocycliques polyaromatiques dérivés de quinoxaline pour le ciblage de l'ADN G-quadruplex*

---

### JURY

Pr BENCHIDMI Mohammed, Professeur de l'Université Mohammed V-Agdal, Examineur  
Dr BOMBARD Sophie, Chargé de recherche CNRS, l'Université Paris Descartes, Rapporteur  
Pr ESSASSI El Mokhtar, Professeur de l'Université Mohammed V-Agdal, co-Directeur de thèse  
Pr KANDRI RODI Youssef, Professeur de l'Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès, Rapporteur  
Pr MALFANT Isabelle, Professeur de l'Université Paul Sabatier, Examineur  
Dr PRATVIEL Geneviève, Directeur de recherche CNRS, Toulouse, co-Directeur de thèse

---

**Ecole doctorale :** *Sciences de la matière*

**Unité de recherche :** *Laboratoire de Chimie de Coordination-CNRS, Toulouse et le  
Laboratoire de Chimie Organique Hétérocyclique-Faculté des sciences, Rabat*

**Directeur(s) de Thèse :** *Pr ESSASSI El Mokhtar, Dr PRATVIEL Geneviève*

**Rapporteurs :** *Dr BOMBARD Sophie, Pr KANDRI RODI Youssef*



*À mon cher papa*

*En reconnaissance des sacrifices qu'il a toujours consentis pour moi, de son encouragement, son soutien, et de son aide morale et matérielle permanente. Que ce modeste travail soit pour lui un témoignage de mon infini respect et mon profond amour.*

*À ma famille, mon mari et mes amis*

*Aucune dédicace ne saurait vous exprimer mon grand attachement, vous trouverez ici la reconnaissance pour tous les services que vous avez pu me rendre.*

*À tous ceux qui me sont chers.*



## Remerciement

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé en co-tutelle entre le Laboratoire de Chimie Organique Hétérocyclique de la faculté des sciences, Université M<sup>ed</sup> V à Rabat et le Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS de Toulouse.

Je remercie vivement Mr Jean-Jacques BONNET, Professeur émérite de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, responsable du Laboratoire International Associé (Laboratoire en Chimie Moléculaire Maroco-Français) de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mr Youssef KANDRI RODI et Mme Sophie BOMBARD, pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Leur présence à ce jury est un honneur et je leur en suis très reconnaissante.

Mr Mohammed BENCHIDMI et Mme Isabelle MALFANT, m'ont également fait l'honneur de participer à ce jury de thèse. Je tiens à leurs adresser mes remerciements pour leur implication dans l'évaluation de ce travail.

Ces travaux ont été effectués au sein de l'équipe de Mme Geneviève PRATVIEL, Directeur de Recherche au CNRS, qui a assuré la co-direction de cette thèse. Je la remercie de m'avoir accueillie au sein de son équipe et en me proposant un sujet à l'interface de la chimie et de la biologie, je la remercie aussi de m'avoir fait partager ses larges connaissances scientifiques lors de nos discussions. Sa détermination et sa rigueur scientifique ont été indispensables au bon déroulement de mes recherches. Enfin, je la remercie chaleureusement pour ses encouragements et surtout sa disponibilité, ayant toujours pris le temps de répondre à mes questions.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mr El Mokhtar ESSASSI, Professeur à la faculté des sciences à Rabat, qui m'a accordé l'occasion de faire une thèse en co-tutelle et qui a assuré aussi sa co-direction. Je le remercie de m'avoir fait partager ses compétences et ses conseils ont été précieux tout au long de ces trois années de travail.

J'adresse aussi mes remerciements aux différents services du LCC grâce auxquels ce travail a pu être réalisé dans de très bonnes conditions : le service RMN et en particulier Mr Yannick COPPEL, le service de spectrométrie de masse, Mme Laure VENDIER pour les structures aux rayons X et le service de documentation.

Je souhaite également adresser de chaleureux remerciements aux membres de l'équipe K : Jean, Anne, Marguerite, Vania, Jean-Luc, Céline, Michel, Aurélien. Je remercie aussi Mr Christophe DROUER mon parrain de thèse, Mr ZARZOUF professeur à l'ENS de Rabat et Mr RAMLI. Merci à vous pour vos conseils, vos aides morale et matérielles et pour votre gentillesse.

Pour terminer, mes remerciements les plus forts reviennent à mon papa qui m'a encouragée et soutenue pendant toutes ces années d'études et sans qui je n'aurais pu aller au bout de mes projets.

## Liste des abréviations

A	Adénine	HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
ALT	Alternative Lengthening of Telomeres	IR	InfraRouge
ARN	Acide RiboNucléique	J	constante de couplage
22AG4	22-mer, 5'-d[A(G <sub>3</sub> TTA) <sub>3</sub> G <sub>3</sub> ]-3'	m	Multiplet
C	Cytosine	MS	Mass Spectroscopy
COSY	COrrrelation Spectroscopy	NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
CCM	Chromatographie sur Couche Mince	NOE	Nuclear Overhauser Effect
Cl <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice permettant de diminuer de 50 % le phénomène étudié	ppm	Partie Par Million
d	Doublet	q	Quadruplet
dd	Doublet Dédoublé	Rdt	Rendement
DMF	N,N-DiMéthylFormamide	Rf	Rapport Frontal
DMSO	DiMéthylSulfOxyde	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
DMS	DiMéthyle Sulfate	ROSY	Rotating frame Overhauser effect Spectroscopy
DC50	Concentration nécessaire pour déplacer 50% d'une sonde fluorescente d'un ADN	RX	Rayons X
DOWEX	Résines échangeuses d'ions	s	Singulet
ESI	ElectroSpray Ionisation	T	Thymine
FAM	6-carboxyfluorescein	t	Triplet
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer	TAMRA	6-carboxy-tetramethylrhodamin
F21T	5'-FAM-d[G <sub>3</sub> (TTAGGG) <sub>3</sub> ]-TAMRA	T <sub>1/2</sub>	Température de demi-dénaturation
FID	Fluorescent Intercalator Displacement	TEA	Triéthylamine
FAB	Fast Atomic Bombardment	δ	Déplacement chimique
G	Guanine	λ	Lambda
G4	G-quadruplex		
GEQ	1-(fluorenyl)-4-(indolylcarbonyl)piperazine		





# Table des matières

## Liste des abréviations

<b>Introduction générale</b> .....	1
------------------------------------	---

## Chapitre I : Introduction bibliographique

I. Les dérivés de la quinoxaline en biologie .....	3
1. Activité antimicrobienne.....	3
2. Activité anti-inflammatoire .....	4
3. Activité antivirale .....	5
4. Activité anti tumorale.....	6
II. Ciblage des G-quadruplex de l'ADN.....	8
1. Télomères et G-quadruplexes télomériques ; structures et rôles biologiques.....	8
2. Télomérase.....	11
III. Ligands de G-quadruplex.....	12
1. Principaux ligands d'ADN quadruplex.....	12
2. Les méthodes biophysiques pour évaluer l'affinité d'un ligand pour l'ADN quadruplex	17
2.1 La mesure de dénaturation thermique par FRET .....	17
2.2 La méthode G4-FID (G-quadruplex Fluorescent Intercalator Displacement assay)....	19
2.3 Autres méthodes pour mesurer l'affinité et la sélectivité des ligands.....	21
IV. Objectifs : Synthèse et caractérisation des nouveaux ligands d'ADN quadruplex à base de quinoxaline .....	21
V. References bibliographiques.....	22

## Chapitre II : Synthèse et caractérisation d'une molécule de la famille benzimidazopyridoquinoxaline

I. Introduction .....	27
II. Synthèse du noyau pentacyclique dérivé du benzimidazole .....	30
III. Quaternarisation.....	32
IV. Conclusion .....	34
V. Références bibliographiques .....	34

## **Chapitre III : Synthèse et caractérisation de molécules de la famille indoloquinoxaline**

I. Introduction .....	35
II. Synthèse des noyaux tetracyclique dérivés du 6 <i>H</i> -indolo[2,3- <i>b</i> ]quinoxaline .....	36
1. Alkylation d'indole-2,3-dione (isatine).....	37
2. Condensation d'isatine N-substituée avec l'o-phénylènediamine non substituée.....	39
III. Quaternarisation .....	41
IV. Conclusion .....	44
V. Références bibliographiques.....	44

## **Chapitre IV : Synthèse et caractérisation de molécules de la famille triazoloquinoxaline**

I. Introduction .....	46
II. Synthèse du noyau polycyclique dérivé du triazoloquinoxaline .....	47
III. Conclusion.....	52
IV. Références bibliographiques : .....	52

## **Chapitre V : Tests biologiques**

I. Etude de l'interaction des ligands avec les G-quadruplex de l'ADN télomérique par la méthode de FRET .....	53
II. tests sur l'enzyme InhA de Mycobacterium tuberculosis.....	55
III. Conclusions et perspectives .....	56

<b>Conclusion générale</b> .....	57
----------------------------------	----

<b>Partie expérimentale</b> .....	58
-----------------------------------	----

<b>Annexes "A"</b> .....	75
--------------------------	----

<b>Annexes "B"</b> .....	80
--------------------------	----

<b>Annexes "C"</b> .....	95
--------------------------	----

**Publication**

**Résumé**

**Produits AZ**

# *INTRODUCTION GENERALE*



Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS de Toulouse sous la direction du docteur PRATVIEL Geneviève et au Laboratoire de Chimie Organique Hétérocyclique du département de chimie de la Faculté des Sciences de l'Université Mohammed V-Rabat Agdal sous la direction du professeur ESSASSI El Mokhtar, concerne la synthèse de dérivés de quinoxaline susceptibles de présenter des propriétés pharmacologiques potentielles.

Ce mémoire est composé de cinq chapitres:

Le premier chapitre présente un rappel bibliographique sur les différentes activités pharmacologiques des dérivés de la quinoxaline. L'objectif principal de la thèse étant la synthèse de nouveaux ligands d'ADN quadruplex à base de quinoxaline, une présentation de l'ADN G-quadruplex, des ligands existant suit.

Le chapitre deux, intitulé « Synthèse et caractérisation d'une molécule de la famille benzimidazopyridoquinoxaline », explore la synthèse et la caractérisation d'un produit pentacyclique de structure plane qui présente une fluorescence très importante, ainsi que sa quaternarisation dans le but d'augmenter l'hydrophilie de ce composé et l'affinité pour l'ADN quadruplex.

Le chapitre trois est relatif à la synthèse et la caractérisation des molécules de la famille indoloquinoxaline en deux étapes : une alkylation de l'isatine suivie d'une condensation avec l'*o*-phénylènediamine non substituée, ainsi que la quaternarisation de ces molécules pour améliorer la solubilité dans l'eau et l'affinité pour l'ADN quadruplex.

Le quatrième chapitre concerne la synthèse et la caractérisation de molécules de la famille triazoloquinoxaline.

Le chapitre cinq est intitulé : « tests biologiques ». Il comprend d'une part une étude sur l'interaction des produits synthétisés avec les G-quadruplex de l'ADN télomérique par la méthode de FRET et d'autre part des tests sur l'enzyme InhA de *Mycobacterium tuberculosis*.

Enfin, nous terminerons par une conclusion générale.

## *Chapitre I*

# *INTRODUCTION bibliographique*





## I. Les dérivés de la quinoxaline en biologie

La quinoxaline, également appelée un benzopyrazine en chimie organique, est un composé hétérocyclique contenant un complexe d'anneau composé d'un anneau de benzène et d'un anneau de pyrazine (Figure 1).

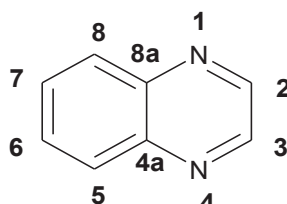


Figure 1 : structure de la quinoxaline (benzopyrazine)

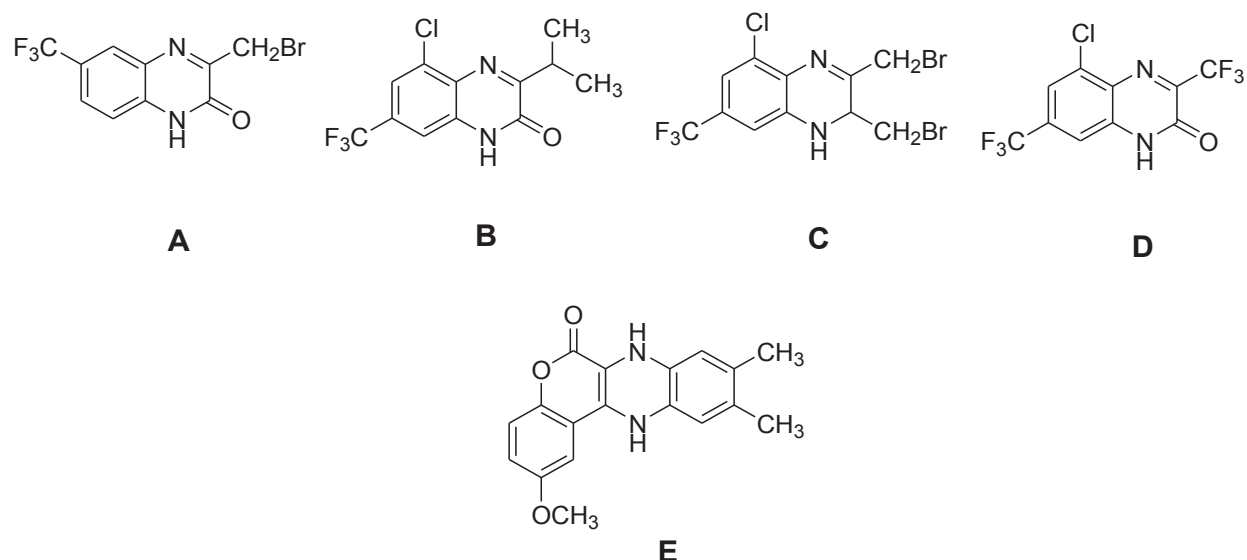
Les dérivés de quinoxaline constituent une classe de composés hétérocycliques présentant diverses applications dans divers domaines. Ils ont été étudiés de manière intensive pour la synthèse de composés biologiquement actifs allant d'herbicides et de fongicides à des médicaments utilisables en thérapeutique. Ces études ont conduit à la découverte d'une grande variété de composés qui sont d'un grand intérêt du point de vue antimicrobien, antifongique, antiviral, anti-inflammatoire et des effets anti-tumoraux, entre autres.

### 1. Activité antimicrobienne

Les agents antimicrobiens sont essentiels pour le traitement d'un certain nombre de maladies d'origine bactérienne ou fongique. Récemment, cependant, les bactéries ont acquis une résistance aux médicaments et ainsi le développement de nouveaux agents antimicrobiens est nécessaire[1].

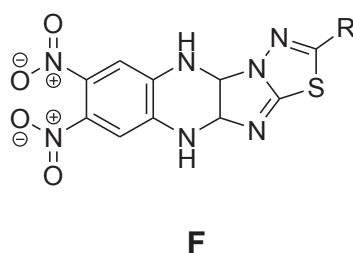
Citons à titre d'exemple :

Les composés **A**, **B**, **C** et **D** (Figure 2) possèdent une activité antimicrobienne [2] et la 9,10-diméthyl-2-méthoxy-6-oxo-7,12-dihydro-chromo-[3,4-b]quinoxaline, composé **E** (Figure 2), possède deux activités, antibactériens et antifongiques[3].



**Figure 2** : structure chimique des composés **A**, **B**, **C**, **D** et **E**

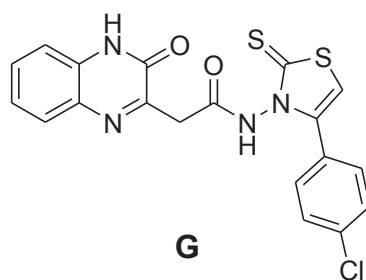
Il existe aussi les dérivés de thiadiazolo[2,3]imidazo[4,5 b]quinoxaline, composé **F** (Figure 3), qui ont montré aussi une bonne activité antibactérienne et antifongique[4].



**Figure 3** : structure chimique du composé **F**

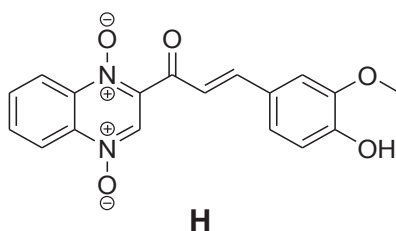
## 2. Activité anti-inflammatoire

Dans la recherche de nouveaux agents anti-inflammatoires, 2 (1H)-quinoxalinones et leurs dérivés hexahydro ont été préparés[5]. Le 2 (1H)-quinoxalin 4-chloro-phényl-2 ,3-dihydro thiazole, composé **G** (Figure 4), présentait la plus forte activité anti-inflammatoire sans provoquer d'effets secondaires de l'ulcère comme la COX-2 sélectifs inhibiteur célécoxib.



**Figure 4 :** structure chimique du composé **G**

Burguete *et al.*[6] ont étudié l'activité anti-inflammatoire et antioxydante de plusieurs quinoxalines pour trouver que le composé **H** (Figure 5) présentait l'activité la plus intéressante.



**Figure 5 :** structure chimique du composé **H**

### 3. Activité antivirale

Depuis 2005, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que dans le monde entier plus de 40 millions de personnes ont été infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). En particulier l'Amérique du Sud est confrontée à un nombre croissant d'infections par le VIH qui ont besoin d'un traitement antiviral efficace, sélectif, disponible et avec une production à grande échelle et à faible coût pour les rendre accessibles aux patients des pays en développement.

Plusieurs dérivés de quinoxaline présentent une activité contre le VIH plus intéressante que les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (RT)[7, 8]. Certains de ces dérivés synthétisés par Gris *et al.*[9] présentent une bonne activité inhibitrice contre des cellules tumorales humaines et le lymphome lié au VIH-1.

De grands efforts ont été consacrés à la conception de composés qui agissent comme inhibiteurs sélectifs du VIH-1, dans le cas présent une série de nouveaux dérivés de *N*4-(hétéro) arylsulfonylquinoxalinone, (Figure 6I), ont été préparés par Xu *et al.*[10].

Parmi tous les composés synthétisés, cinq composés présentaient des activités anti-réplication de VIH-1 puissantes avec une valeur de  $CI_{50}$ , au niveau de  $10^{-7}$  mol / L.

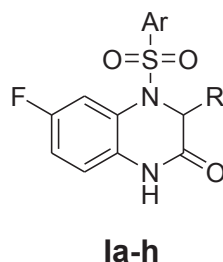


Figure 6 : structure chimique du composé **la-h**

Compound	R	ArSO <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (μM)
<b>la</b>	H	Quinoline-8-sulfonyl	0.98
<b>lb</b>	H	3-Cyanobenzene-1-sulfonyl	>100
<b>lc</b>	H	2-Methyloxycarbonylthiophene-3-sulfonyl	2.02
<b>ld</b>	CH <sub>3</sub>	Quinoline-8-sulfonyl	7.0
<b>le</b>	CH <sub>3</sub>	4-Nitrobenzene-1-sulfonyl	>100
<b>lf</b>	CH <sub>3</sub>	3-Cyanobenzene-1-sulfonyl	55
<b>lg</b>	CH <sub>3</sub>	2-Methyloxycarbonylthiophene-3-sulfonyl	0.2
<b>lh</b>	CH <sub>3</sub>	2,5-Dichlorothiophene-3-sulfonyl	>100

Tableau 1: Activité antivirale des composés **la-h**[10].

De même, d'autres dérivés de quinoxalinone ont des propriétés antivirales[11, 12]. De nombreuses études ont montré l'activité de quelques composés de quinoxaline pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1), y compris le 6,7- diméthyl-2-(pent-4-ényloxy)quinoxaline, composé **J** (Figure 7)[13] et le composé **K** (Figure 7), qui inhibent le VIH-1 RT[14].

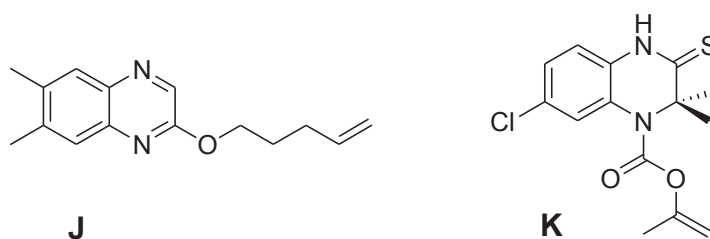


Figure 7 : structure chimique des composés **J** et **K**

#### 4. Activité anti tumorale

La multirésistance (MDR) est un problème critique dans le traitement chimiothérapeutique du cancer. La glycoprotéine transmembranaire (P-gp) est la raison la plus fréquente de cette résistance. La P-gp est un transporteur ATP dépendant qui

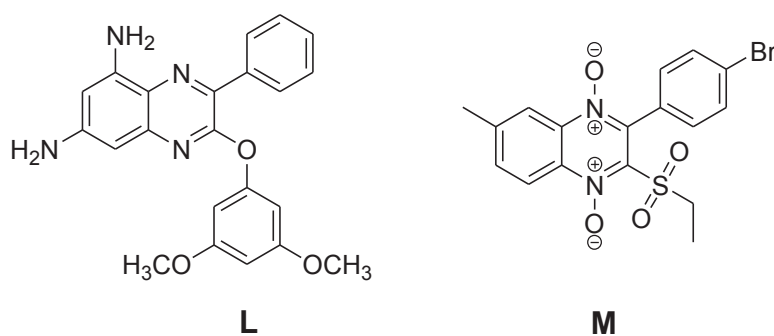
effectue un transport unilatéral des médicaments de l'intérieur vers l'extérieur des cellules, ce qui rend les cellules cancéreuses résistantes au traitement médicamenteux.

Une gamme d'agents qui peuvent inverser le phénotype MDR et restaurer la sensibilité aux médicaments pour les cellules cancéreuses ont été développés[15, 16]. Cependant, la plupart de ces agents se sont révélés être toxique ou présentent des effets indésirables.

Sun *et al.*[17] ont conçu et synthétisé une série de dérivés de 1,3-diméthyl-1H-quinoxaline-2-ones. Ils ont constaté que certains des composés ont un effet potentiel d'inhibition sur le phénotype MDR du cancer.

Piras *et al.*[18] ont pris en compte en tant que modèles d'antifoliques soit le classique méthotrexate (améthoptérine) ou le non-classique trimetrexate (dérivé de [quinazoline](#)) ainsi que les dérivés dideazafoliques correspondants. Dans ce contexte ils ont montré que le remplacement bioisostérique de cycle ptéridine avec 6(7)trifluorométhylquinoxaline offre un bon substrat pour l'activité biologique dans la série des analogues d'antifoliques classiques.

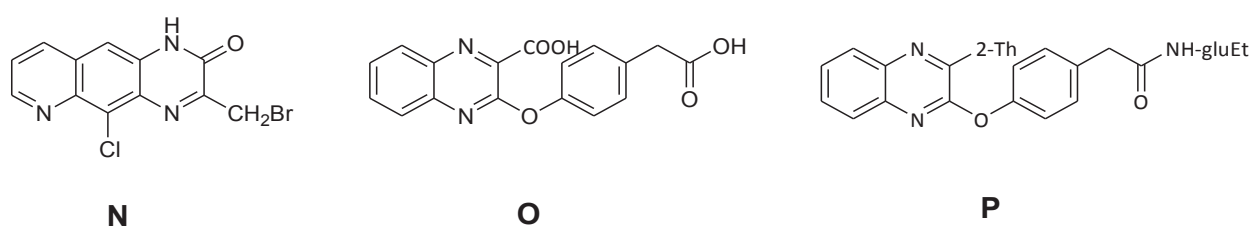
Il existe de nombreux dérivés de quinoxaline qui ont montré une activité antitumorale[19] ont montré que la 5,7-diamino-3-phényl-2-[(3,5-diméthoxy) phénoxy] quinoxaline, composé **L** (Figure 8), a une activité antitumorale in vitro. De plus, le 3-(4-bromo-phényl)-2-(éthylsulfonyl)-6 méthylquinoxalin-1,4-dioxyde, composé **M** (Figure 8), présente une activité contre la tumeur dans l'étape de l'hypoxie, qui est une phase où la tumeur présente une résistance au cours de la chimiothérapie et la radiothérapie[20].



**Figure 8** : structure chimique des composés **L** et **M**

D'autres composés, dérivés de quinoxalinone, ont été soumis à un dépistage primaire d'activité anticancéreuse dans le programme de dépistage anti-tumorale in vitro, contre un groupe de 60 lignées cellulaires tumorales humaines[21]. L'activité de chaque composé testé a été déduite par une courbe dose-réponse en fonction des données fournies par l'Institut National du Cancer (NCI). Le composé **N** (Figure 9) a été trouvé comme ayant une activité anticancéreuse in vitro encourageante à une concentration de  $10^{-4}$  M.

Des sélectivités intéressantes ont également été enregistrées entre  $10^{-8}$  et  $10^{-6}$  M pour les composés **O** et **P** (Figure 9).



**Figure 9** : structure chimique des composés **N**, **O** et **P**

Au cours des dernières années, les dérivés de la quinoxaline ont un énorme succès dans les domaines biologiques et pharmacologiques.

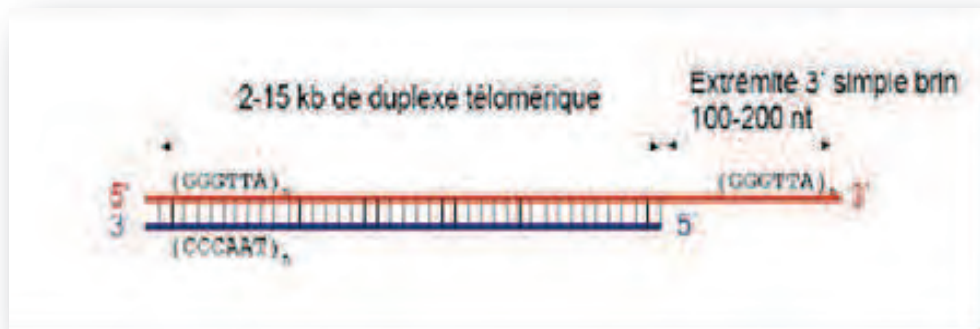
En conclusion, l'étude de ces dérivés a montré que la modification structurale peut améliorer son profil pharmacologique conférant un potentiel antibactérien, anticancéreux, anti-VIH, et anti-inflammatoire.

## II. Ciblage des G-quadruplex de l'ADN

### 1. Télomères et G-quadruplexes télomériques ; structures et rôles biologiques

Les télomères, complexes nucléoprotéiques constituent les extrémités des chromosomes, ils existent chez toutes les espèces eucaryotes et ont un rôle de protection contre les événements provoquant une instabilité génétique, entraînant des dégradations, des recombinaisons, ou encore des fusions inter-chromosomiques. L'extrémité 3' des télomères est simple brin sur quelques centaines de bases (la longueur varie selon les organismes et les types de cellules),

sur cette extrémité on retrouve des copies répétées de séquences de type TTGGGG (retrouvées chez un protozoaire cilié : *Tetrahymena*) ou TTAGGG (retrouvées chez l'Homme) (Figure 10).



**Figure 10** : ADN télomérique humain.

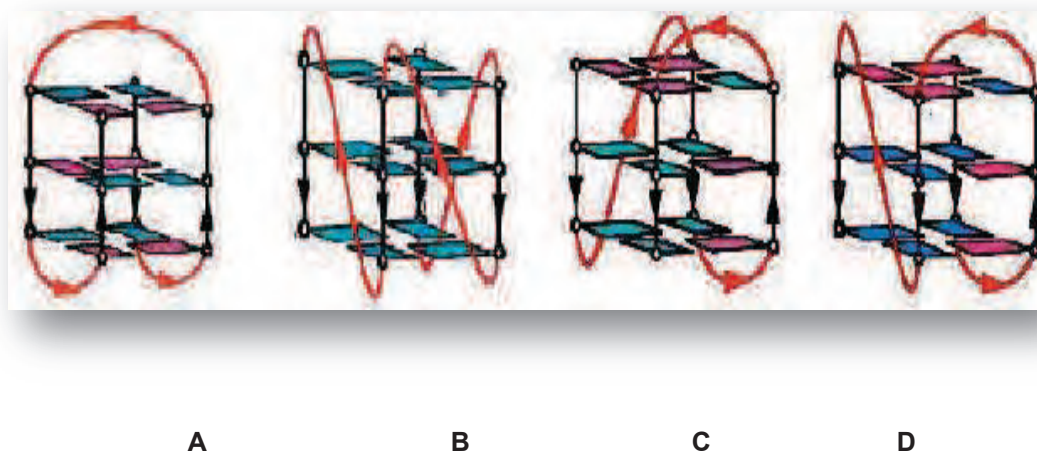
Dans une cellule normale, à chaque réplication cellulaire, les télomères sont raccourcis, du fait de l'incapacité de l'ADN polymérase à les répliquer complètement. Quand l'extrémité télomérique a atteint une certaine taille, la cellule arrête de se diviser puis meurt. Par contre dans les cellules cancéreuses il a été constaté que les télomères ne raccourcissent pas et la cellule devient immortelle.

Les mécanismes de maintenance de la longueur des télomères sont de deux sortes. Dans 85% des cellules cancéreuses le maintien des télomères est assuré par une enzyme spécifique : la télomérase. Dans les 15% restants la longueur des télomères est maintenue, en absence de télomérase, par un mécanisme appelé alternative lengthening of telomeres (ALT)[22].

Nous nous intéresserons ici aux structures G-quadruplex intramoléculaires formées par l'ADN télomérique humain. Une structure d'ADN quadruplex a été caractérisée *in vitro* par cristallographie, diffraction des rayons X par Parkinson *et al.*[23]. Elle présente une structure dite « parallèle » où tous les brins sont parallèles (Figure 11B). Les conditions de cristallisation pourraient influencer la formation d'un tel repliement. Enfin deux autres structures formées par la séquence télomérique modifiée à ses

extrémités ont été déterminées par spectroscopie RMN par Wang et Patel[24]. C'est une structure « antiparallèle » avec deux brins orientés dans un sens et les deux autres en sens inverse (Figure 11A). Une structure dite « hybride » pour laquelle trois brins sont parallèles et le quatrième inversé ont été décrites par Luu *et al.*[25] (Figure 11C), Phan *et al.*[26] (Figure 11D).

La structure d'ADN quadruplex a également été mise en évidence *in vivo* au niveau des télomères du cilié *stylonychia lemnae* à l'aide d'anticorps par Schaffitzel *et al.*[27].

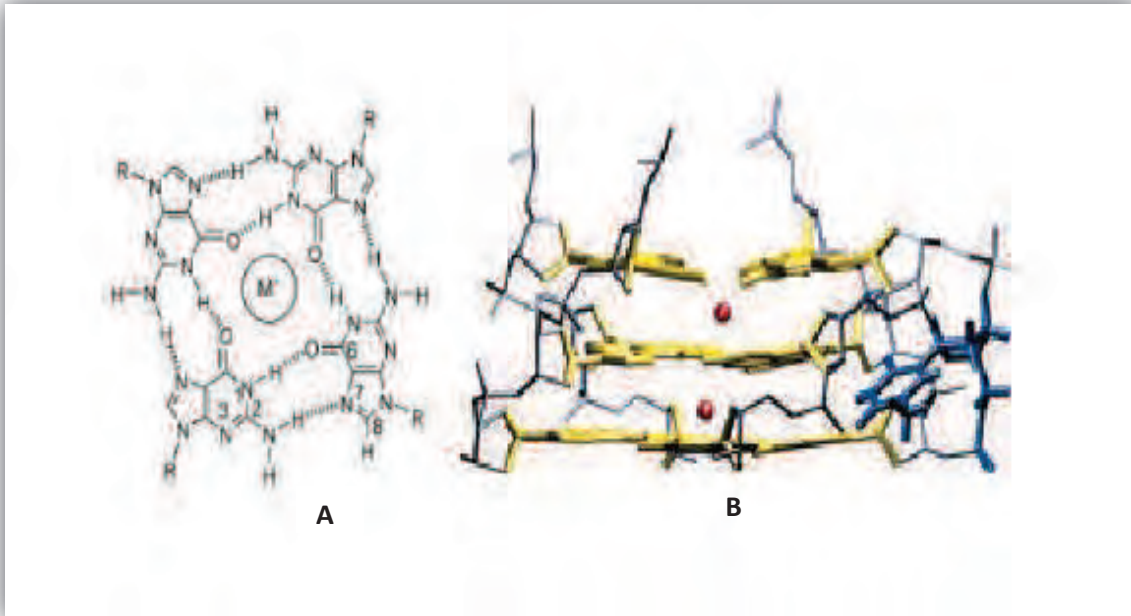


**Figure 11** : structure des quadruplexes intramoléculaires pour la séquence télomérique humaine : **A.** forme antiparallèle (RMN / Na<sup>+</sup>)[23]. **B.** forme parallèle (RX / K<sup>+</sup>)[22]. **C.** forme hybride (RMN / K<sup>+</sup>)[24]. **D.** forme hybride (RMN / K<sup>+</sup>)[25].

Les brins d'ADN riches en G peuvent ainsi former des structures à 4 brins appelées quadruplexes de guanine ou G-quadruplexes, résultant de l'empilement de plusieurs G- quartets. Ces G-quartets résultent de l'association de quatre guanines coplanaires par des liaisons hydrogène de type Hoogsteen (Figure 12A).

L'empilement de ces quadruplexes de guanine est stabilisé par interaction de  $\pi$ -stacking (Figure 12B) et les G-quadruplexes ne peuvent se former qu'en présence de cations qui sont piégés entre deux tétrades de guanine par coordination avec huit atomes d'oxygène des groupements carbonyles des guanines à condition que leur rayon ionique corresponde bien à la taille de la cavité entre les deux tétrades de guanine[28, 29]. Ainsi, les ions de potassium K<sup>+</sup>, présents en milieu biologique, induisent la plus grande stabilité des quadruplexes de guanine. Les ions Na<sup>+</sup>, eux aussi présents en milieu biologique, stabilisent cette structure mais dans une moindre mesure, alors que la présence d'ion Li<sup>+</sup> n'induit pas de stabilisation[29].





**Figure 12** : **A.** Tétrade de guanines.  $M^+$  est un cation, métallique ou non. **B.** G-quadruplexe : les guanines constituant les tétrades sont représentées en jaune, les acides nucléiques constituant les boucles en bleu et le cation en rouge[30].

La structuration des acides nucléiques riches en guanines sous forme de quadruplex a été mise en évidence dans les cellules initialement au niveau des télomères[27]. Cependant, il a pu être montré par la suite que ces structurations particulières peuvent également se rencontrer dans des zones d'ADN non télomérique[31] ainsi qu'au niveau des ARNs[32]. La connaissance précise des structures et du rôle biologique de ces acides nucléiques G-quadruplex *in vivo* constitue une aire de recherche très active à l'heure actuelle[33, 34].

## 2. Télomérase

La réplication de l'ADN à l'extrémité des chromosomes eucaryotes fait donc intervenir une enzyme particulière appelée télomérase qui permet de maintenir la longueur des télomères, en luttant contre leur érosion naturelle.

La télomérase est une reverse transcriptase, mise en évidence en 1985 dans le microorganisme cilié *Tetrahymena* par Greider *et al.*[35]. Elle est constituée d'une sous unité catalytique hTERT et d'une séquence d'ARN hTR servant de matrice pour l'addition de nucléotides à l'extrémité simple brin du télomère[36]. Il a été montré que

l'inhibition de la télomérase entraîne un arrêt de croissance des cellules tumorales par raccourcissement des télomères[37]. De façon intéressante, l'activité télomérase est très significative dans la majorité des cellules cancéreuses et faible voire inexistante dans la plupart des cellules somatiques normales. De plus, les télomères de la plupart des cellules cancéreuses sont plus courts que ceux des cellules germinales. Cette enzyme constitue donc un marqueur du cancer chez l'homme et c'est une cible intéressante en stratégie anticancéreuse.

Les structures en G-quadruplex apparaissent très particulières et totalement différentes des cibles pharmacologiques habituelles comme l'ADN ou les protéines. Elles offrent la possibilité de concevoir des petites molécules capables de les reconnaître et les stabiliser spécifiquement *in vivo*. Elles constituent des cibles pharmacologiques nouvelles. Donc la stabilisation de ces structures au niveau des télomères par des ligands synthétiques spécifiques, va entraîner la perturbation de la fixation de plusieurs protéines télomériques et aussi la modification de la conformation du substrat de l'enzyme télomérase. Cette stabilisation a démontré une capacité à inhiber la télomérase *in vitro*[38-41].

Les G-quadruplexes sont donc susceptibles de jouer un rôle dans plusieurs processus biologique. Cette activité biologique a conduit à la recherche des ligands reconnaissant ces structures et au développement de techniques qui permettant l'évaluation d'affinité et la sélectivité d'un ligand potentiel pour l'ADN quadruplex.

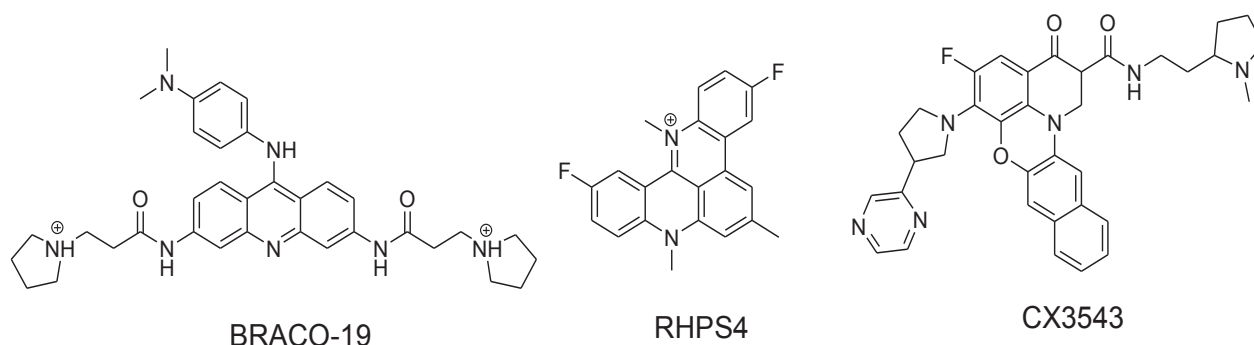
### **III. Ligands de G-quadruplex**

Dans ce paragraphe, nous présenterons d'abord les ligands d'ADN G-quadruplex les plus efficaces connus à ce jour puis les différentes techniques utilisées pour l'étude de leur interaction avec l'ADN quadruplex.

#### **1. Principaux ligands d'ADN quadruplex**

Les molécules capables de reconnaître les structures G-quadruplex d'acides nucléiques appelées « ligands de G4 » sont actuellement considérées comme de potentiels composés anticancéreux[42-46]. Le ciblage de l'ADN télomérique par des ligands de G-quadruplex interfère avec le bon fonctionnement des télomères[47-49] et le ciblage des séquences capables de se structurer en G-quadruplex dans les promoteurs de gènes ou dans les régions 5'-UTR des ARN messagers inhibe la biosynthèse des protéines correspondantes[50-55]. Il est frappant de trouver des

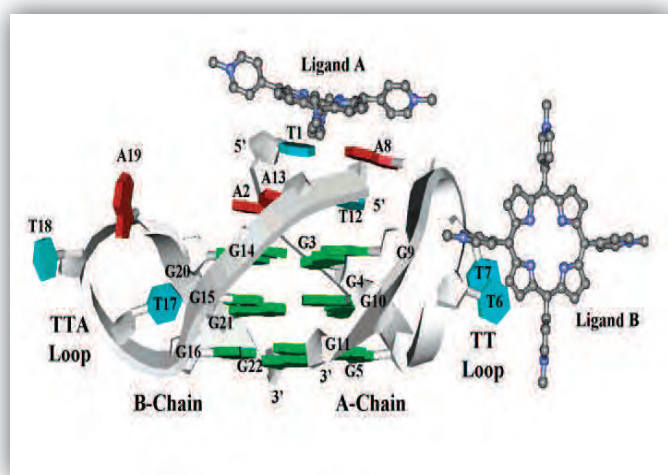
structures quadruplex dans les promoteurs de certains gènes responsables du cancer comme *c-kit*, *c-myc* et *bcl-2*[53-55]. Une activité antitumorale *in vivo* a été reportée pour deux composés, le BRACO-19[47] et le RHPS4[48-57] et une molécule ligand de G-quadruplex, la quarfloxin CX-3543, est le seul composé entré récemment en phase clinique (Figure 13)[58].



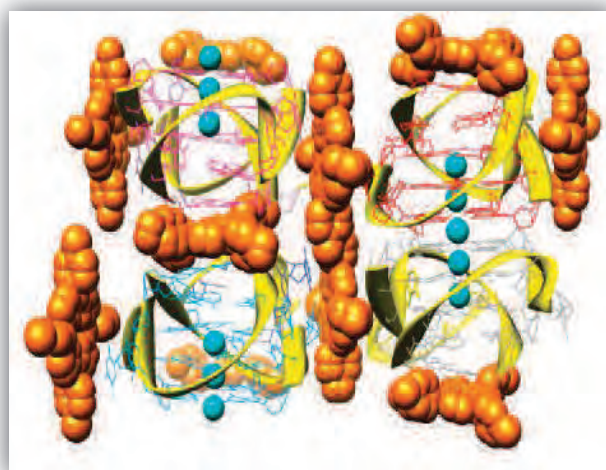
**Figure 13** : structures des composés ligands de G-quadruplex possédant une activité antitumorale.

On peut citer aussi des macrocycles tel que la télomestatine[41, 47, 54, 59-62], un produit naturel isolé chez *Streptomyces anulatus*, caractérisé en 2001 par Kazuo Shin-Ya *et al.*[60]. La porphyrine tétra-cationique TMPyP4, malgré sa faible sélectivité[63] est utilisée régulièrement comme ligand de G-quadruplex en raison de sa disponibilité commerciale. La récente structure cristalline de cette molécule avec un G-quadruplex formé par la séquence télomérique humaine[64] montre qu'il n'y a pas de contact direct de ligand avec les G-tétrades (pas d'intercalation de TMPyP4 entre les G-tétrades adjacentes). Dans ce complexe G-quadruplex-TMPyP4, deux modes de liaison assez différents sont observés avec deux molécules de TMPyP4 liées en contact seules avec les bases TTA au niveau des boucles.

Une molécule TMPyP4 est empilée sur une paire de bases AT qui est formée à partir de la thymine de l'extrémité 5' et l'autre molécule est empilée à l'extérieur sur les bases thymine au niveau des boucles TTA (Figure 14).



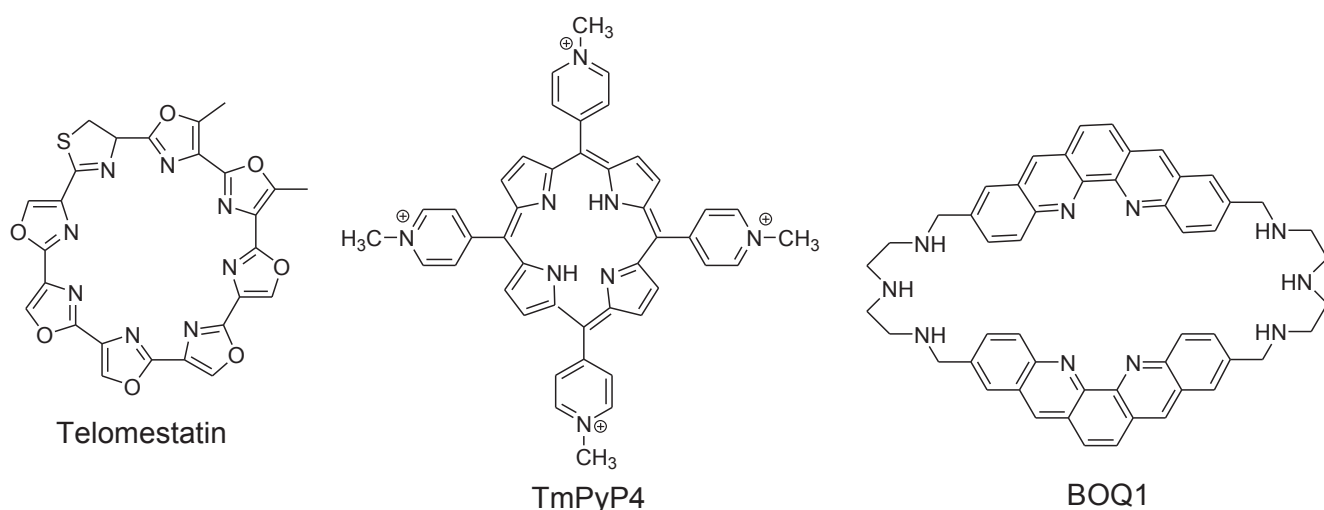
A



B

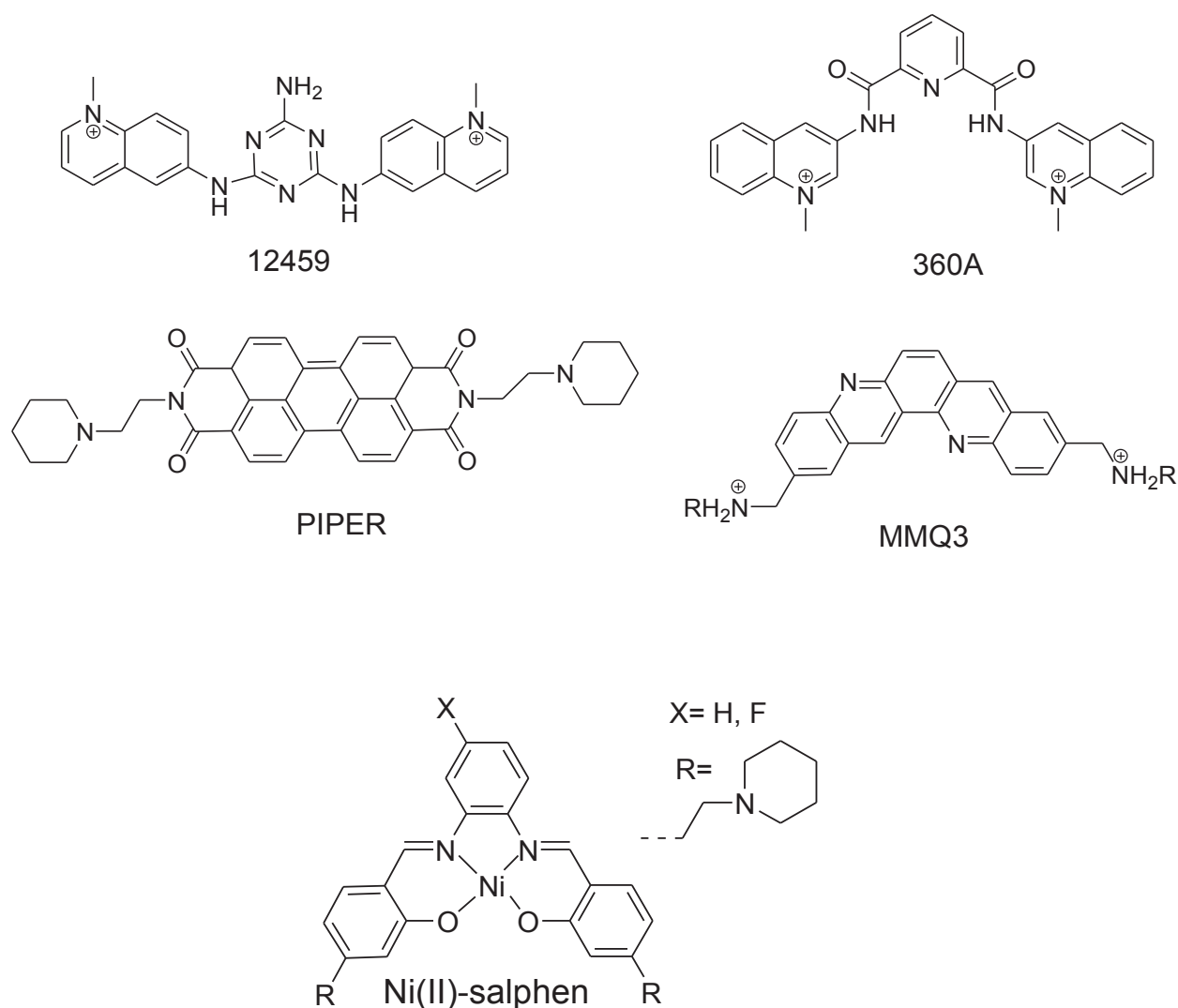
**Figure 14 :** A. schéma de la structure d'un complexe quadruplex-TMPyP4, montrant la topologie de repliement, la numérotation des nucléotides, la géométrie de la boucle TTA étendu, et deux molécules TMPyP4 liés par unité asymétrique. Bases de guanine sont de couleur verte, adénines rouge et thymines bleu. B. structure cristalline le long des colonnes du complexe quadruplex-TMPyP4, montrant les molécules de porphyrine en mode de remplissage d'espace (de couleur orange), le squelette désoxyribose-phosphate de quadruplex (de couleur jaune), et les ions de potassium (couleur bleu)[64]

Le macrocycle BOQ1[65] est utilisé aussi comme ligand de G-quadruplex (Figure 15).



**Figure 15 :** Exemples de ligands macrocycliques de G-quadruplexes.

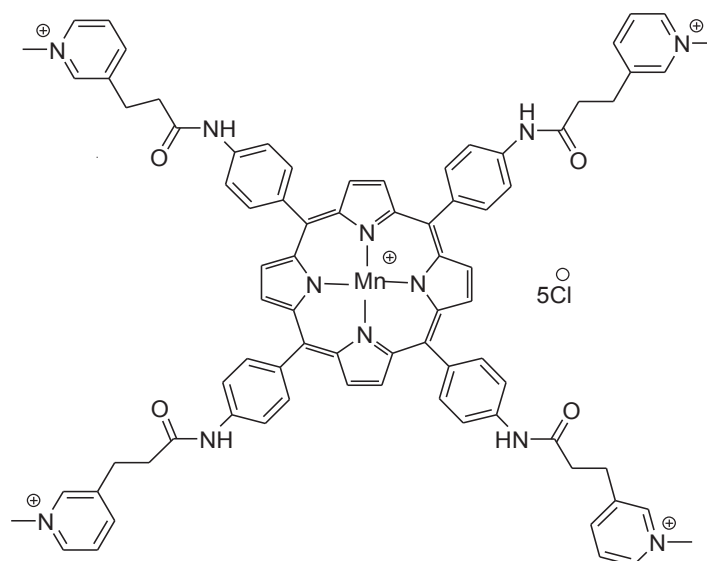
Il existe d'autre part plusieurs ligands possédant une large surface aromatique plane (Figure 16), tels que le pérylène diimide ou PIPER, molécule très aromatique condensée, un ligand inhibiteur de la télomérase[66], les dibenzophénanthrolines ou quinacridines par exemple le MMQ3, mono-méta-quinacridine[38, 67]. Les triazines telles que la 12459, bisquinolinium triazine[68] et les pyridodicarboxamide 360A[67] **sont** deux molécules qui stabilisent le G-quadruplex intramoléculaire formé par la séquence télomérique humaine en test de dénaturation thermique suivie par FRET. Récemment, Neidle *et al.* ont montré que le complexe de nickel Ni(II)-salphen stabilisait fortement la structure quadruplexe[69].



**Figure 16** : Exemples de ligands d'ADN G-quadruplex.

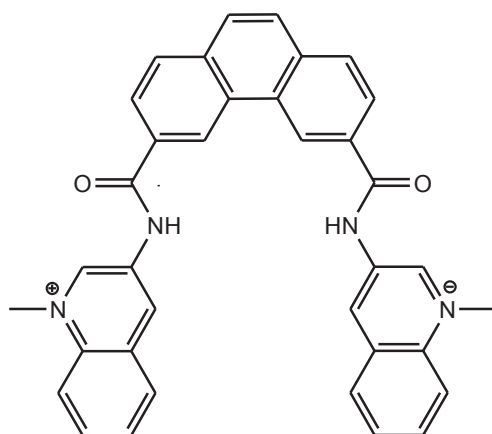
La métalloporphyrine de manganèse(III), synthétisée au laboratoire[70], est un composé combinant un cœur aromatique et quatre bras cationiques flexibles qui s'est avéré capable de discriminer par un facteur de  $10^4$  entre l'ADN quadruplex et

l'ADN duplex (Figure 17).



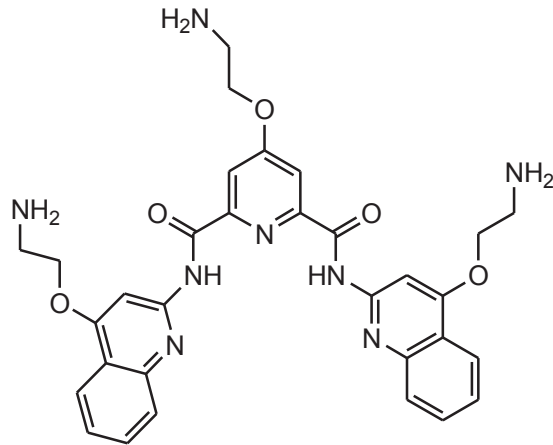
**Figure 17** : Métalloporphyrine de manganèse (III)

Le dérivé phénanthroline bisquinolinium, Phen-DC3, est un composé qui cible spécifiquement l'ADN G-quadruplex et qui montre des effets biologiques *in vivo*. L'analyse RMN de la structure d'un complexe de ce composé avec l'ADN quadruplex dérivé de la séquence c-myc a révélé que Phen-DC3 interagit par un large  $\pi$ -stacking avec la G-tétrade extérieure du quadruplex[71] (Figure 18).



**Figure 18** : structure de la molécule Phen-DC3

La pyridostatin (PDS) (Figure 19) est un autre ligand spécifique de quadruplex récent. Ce composé a permis de mettre en évidence les structures d'ADN quadruplex intracellulaires[72, 73].



**Figure 19** : structure de la molécule PDS

Les molécules ligands de G-quadruplex doivent posséder une forte constante d'affinité pour l'ADN quadruplex mais ne doivent pas interagir avec l'ADN double brin constituant les chromosomes.

Ces molécules doivent donc être planes, étendues, aromatiques pour interagir par  $\pi$ - $\pi$  stacking avec les tétrades de guanines, chargées positivement pour avoir une bonne affinité avec les charges négatives de l'ADN et enfin être incapables de s'intercaler entre les plateaux de bases de l'ADN double brin.

Cependant, très peu de molécules décrites s'avèrent sélectives des structures quadruplex d'ADN par rapport à l'ADN double-brin[67, 70, 74, 75] ce qui explique peut-être le nombre restreint de composés actuellement en clinique.

## **2. Les méthodes biophysiques pour évaluer l'affinité d'un ligand pour l'ADN quadruplex**

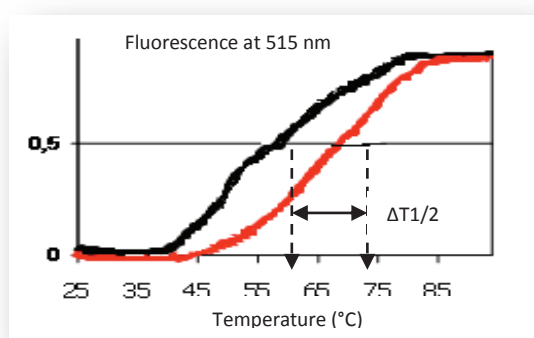
L'objectif de ce paragraphe est d'exposer les méthodes biophysiques les plus communément utilisées jusqu'à présent pour l'étude des ligands d'ADN quadruplex.

### **2.1 La mesure de dénaturation thermique par FRET**

C'est une méthode décrite par Mergny *et al.*[76] à moyen haut débit pour identifier rapidement de nouvelles molécules ligands des ADNs G-quadruplex et tester leur sélectivité vis-à-vis d'autres structures d'ADN.

Cette technique se base sur la dénaturation thermique d'un oligonucléotide structuré en quadruplex d'une séquence télomérique humaine liée de façon covalente à des fluorophores.

Le chauffage de cette séquence télomérique entraîne la perte de sa structure secondaire par rupture des liaisons hydrogènes. La température de fusion  $T_{1/2}$  est définie comme la température de demi-dissociation de l'ADN. L'ajout à la solution d'ADN étudiée d'un composé se fixant préférentiellement sur sa structure entraîne le retard de la fusion de l'ADN structuré. Donc plus l'affinité du composé est importante, plus l'effet stabilisant ( $\Delta T_{1/2}$ , différence entre les températures de fusion de l'ADN en présence du composé et de l'ADN seul), est grand. On peut donc évaluer par cette méthode des affinités relatives de composés pour une structure d'ADN donnée (Figure 20).



**Figure 20** : dénaturation thermique de l'ADN quadruplexe seul (courbe rouge) et en présence d'un composé (courbe bleue)

La méthode de dénaturation thermique suivie par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer ou Transfert d'énergie de fluorescence par résonance), développée par Mergny et al, utilise l'oligonucléotide F21T. C'est un 21-mer contenant 3 répétitions de la séquence télomérique humaine  $(GGGTTA)_3GGG$ , susceptible de se structurer en G-quadruplexe et portant deux fluorophores : la fluorescéine (donneur,  $\lambda_{abs}$  490 nm,  $\lambda_{ems}$  520 nm) en 5' et la tétraméthylrhodamine (accepteur,  $\lambda_{abs}$  515 nm,  $\lambda_{ems}$  588 nm) en 3' (Figure 21(A et B)). Cette dénaturation s'effectue en présence de cation lithium qui stabilisent peu l'ADN quadruplexe, de façon à obtenir une température de fusion accessible (dans un tampon cacodylate lithium 10 mM, 10 mM KCl et LiCl 90 mM, la température de fusion  $T_{1/2}$  de l'oligonucléotide F21T est de 43,2°C)[76].

Lorsque l'oligonucléotide est sous forme simple brin, les deux fluorophores sont trop éloignés l'un de l'autre pour que le FRET ait lieu. Lorsque l'oligonucléotide est structuré en G-quadruplexe, la distance entre les deux fluorophores est suffisamment



faible et l'excitation de la fluorescéine entraîne la fluorescence de la tétraméthylrhodamine. La mesure est effectuée en excitant le système à 470 nm et en suivant la restauration de la fluorescence de la fluorescéine (515 nm) avec l'augmentation de la température. La température de fusion ( $T_{1/2}$ ) est définie comme la température où l'intensité relative de fluorescence est de 0,5.

Pour pouvoir étudier l'affinité d'un ligand pour l'ADN quadruplex par la méthode de FRET, un ligand potentiel ne doit pas fluorescer dans la même zone que la fluorescéine. La plupart des ligands de quadruplex connus à ce jour ne posent pas ce problème.

La dénaturation thermique par FRET peut être réalisée aussi en présence d'un duplex compétiteur non marqué. Si le ligand est peu sélectif de l'ADN quadruplex, il va se répartir entre les deux espèces, donc stabilise moins le quadruplex et le  $\Delta T_{1/2}$  va diminuer.

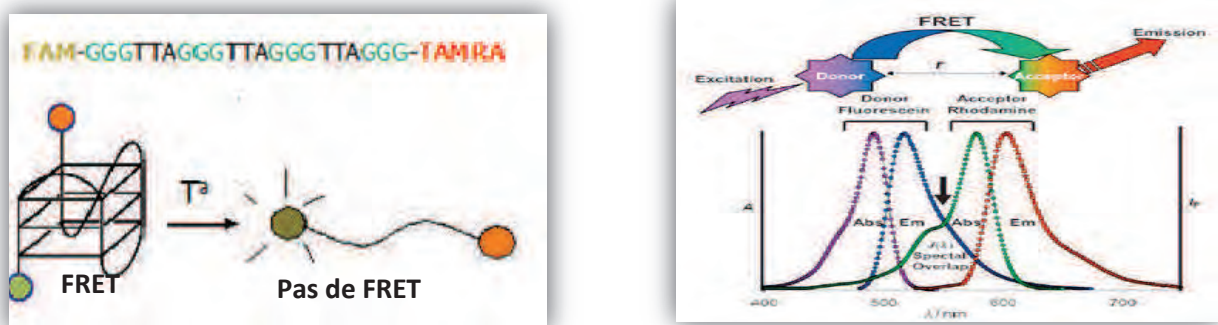
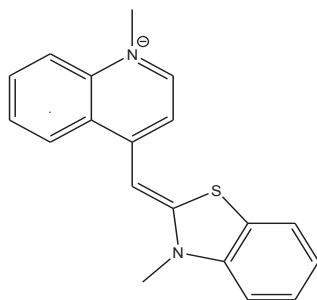


Figure 21: A. principe de la mesure de  $\Delta T_{1/2}$  par FRET, B. phénomène de FRET

## 2.2 La méthode G4-FID (G-quadruplex Fluorescent Intercalator Displacement assay)

C'est une méthode simple et rapide qui permet d'évaluer l'affinité d'un composé pour l'ADN G-quadruplex et sa sélectivité vis-à-vis de l'ADN double brin. C'est un dosage basé sur la perte de fluorescence de thiazole orange (TO) (Figure 22) lors de son déplacement compétitif par un ligand.



**Figure 22:** Structure de thiazole orange (contre-ion :  $p\text{-CH}_3(\text{C}_6\text{H}_4)\text{SO}_3^-$ ).

Le TO est très fluorescent lorsqu'il se trouve en interaction avec l'ADN G-quadruplex et non fluorescent quand il est libre en solution. Des études préliminaires ont démontré que le TO se lie à l'oligonucléotide 22AG-quadruplex (22-mer, 5'-A(G<sub>3</sub>TTA)<sub>3</sub>G<sub>3</sub>-3') de manière à site unique avec une forte affinité ( $K_a = 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ )[77]. La capacité de déplacement du TO d'un ligand donné peut être aisément suivie par la diminution de la fluorescence de TO ( $\lambda_{\text{max}} = 539 \text{ nm}$  lors de l'excitation sélective à 501 nm).

Le test est réalisé avec un mélange de 22AG-quadruplex pré-structuré (0,25  $\mu\text{M}$ ) et TO (0,50  $\mu\text{M}$ ), dans un tampon cacodylate de sodium 10 mM, pH 7,3, 100 mM K<sup>+</sup>. L'addition d'une quantité croissante de ligand (de 0,5 à 10 équiv.) est suivie par une période d'équilibrage de 3 min avant la mesure du spectre de fluorescence[77].

Les résultats du test sont présentés sous forme d'une courbe qui présente le pourcentage de TO déplacé en fonction de la concentration de ligand ajouté qui permet de quantifier précisément le déplacement TO induite par le ligand. Une valeur de  $G^4\text{DC}_{50}$  a été définie comme la concentration nécessaire de ligand 22AG pour déplacer 50% de TO. De même que pour le test de FRET melting, il est possible de mesurer avec le test G4-FID, l'influence de l'ajout d'un excès d'ADN double-brin sur la capacité de déplacement du TO par un ligand et d'évaluer ainsi la sélectivité du ligand testé pour l'ADN G-quadruplex.

De manière remarquable, dans la plupart des cas, les résultats de G4-FID sont en bon accord avec les données de FRET. A titre d'exemple, la TMPyP4, ligand d'ADN G-quadruplex connu pour interagir par  $\pi$ -stacking avec les tétrade extérieures de

guanines, présente une haute capacité pour le déplacement du TO,  $^{G4}DC_{50} = 0,106 \mu M$ [77].

En conclusion, ce test «facile à utiliser» offre comme le test de FRET melting, la possibilité de tester un grand nombre de ligand potentiels sur tout G-quadruplex d'intérêt biologique. Il représente donc un outil intéressant.

### **2.3 Autres méthodes pour mesurer l'affinité et la sélectivité des ligands**

Il existe d'autres méthodes communément utilisées pour évaluer l'affinité et la sélectivité quadruplex/duplex d'un ligand potentiel. Parmi ces méthodes on peut citer, la résonance plasmonique de surface (SPR), la spectrométrie de masse à ionisation par electrospray (ESI-MS), la dialyse à l'équilibre et les titrations en spectroscopie de fluorescence et d'absorbance. Ces techniques permettent en théorie d'accéder aux nombre de sites de fixation des molécules et à leurs valeurs de constantes d'affinité mais elles possèdent en même temps des inconvénients majeurs :

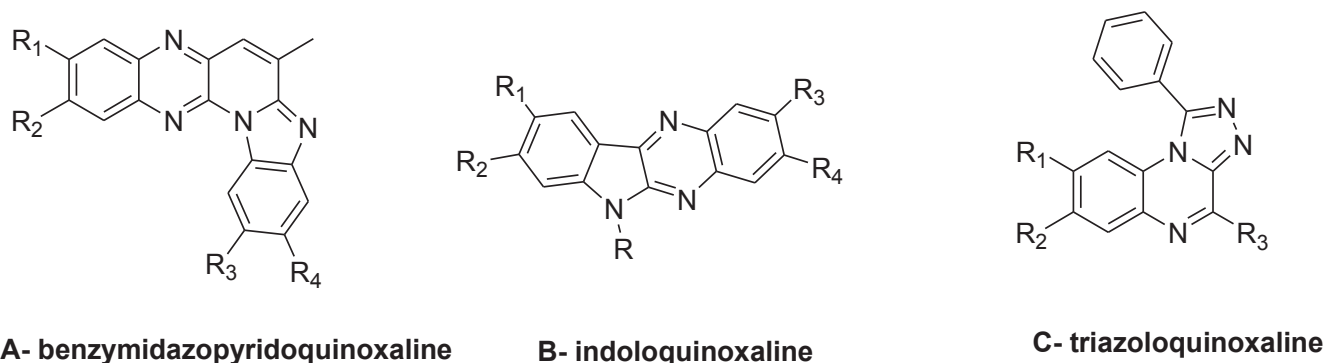
- Un débit limité
- Des contraintes de tampon pour l'ESI-MS ( $NH_4^+$ )
- Des interactions des molécules avec la surface de la puce en SPR et les difficultés rencontrées avec cette technique lorsque les molécules sont solubilisées dans des solvants organiques tels que le DMSO
- La nécessité de propriétés spectrales exploitables des molécules.

Toutes ces méthodes peuvent être utilisées non seulement pour estimer une sélectivité quadruplex/duplex mais aussi pour comparer l'affinité d'un composé pour plusieurs formes quadruplexes. Or la méthode de FRET reste la méthode à moyen-haut débit nécessaire pour identifier rapidement de nouvelles molécules liant les G-quadruplex et tester leur sélectivité vis-à-vis d'autres structures d'ADN.

## **IV. Objectifs : Synthèse et caractérisation des nouveaux ligands d'ADN quadruplex à base de quinoxaline**

Comme nous l'avons présenté plus haut, les structures en G-quadruplex constituent une cible biologique extrêmement étudiée pour laquelle de nombreux ligands ont été développés dans le but de les stabiliser. Ce contexte nous a conduit à nous

intéresser à la synthèse de nouveaux ligands de l'ADN quadruplex à base de quinoxaline qui comportent 4 à 5 cycles aromatiques contigus constituant une forte base d'interaction par  $\pi$ - $\pi$  stacking avec les tétrades de guanines (Figure 23). Ces composés quinoxaliniques sont susceptibles de présenter des propriétés pharmacologiques potentielles[78-80], des propriétés anti-inflammatoires[6, 81], anti-bactériennes[2, 3], antivirales[7, 8, 12] et aussi anticancéreuses[18].



**Figure 23:** structure des ligands de G-quadruplex préparés et testés sur le F21T par la méthode de FRET

Ces macrocycles seront ensuite quaternarisés pour améliorer la solubilité dans l'eau et l'affinité vers l'ADN quadruplex. Quelques exemples d'aromatiques azotés quaternisés ligands G-quadruplex peuvent être trouvés dans la littérature tels que la bis-quinoléine dérivé 360A[67], des dérivés de bromure d'éthidium[82], des dérivés d'acridine pentacycliques comme le RHPS4[83, 84] et le dérivé berbérine[85-87].

## V. References bibliographiques

1. Fridkin, S.K., Hageman, J. C., Morrison, M., Sanza, L. T., Como-Sabetti, K., Jernigan, J. A., Harriman, K., Harrison, L. H., Lynfield, R., Farley, M. M., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus disease in three communities*. N Engl J Med, 2005. **352**(14): p. 1436-1444.
2. Carta, A., Loriga, M., Zanetti, S., Sechi, L. A., *Quinoxalin-2-ones. Part 5. Synthesis and antimicrobial evaluation of 3-alkyl-, 3-halomethyl- and 3-carboxyethylquinoxaline-2-ones variously substituted on the benzo-moiety*. Farmaco, 2003. **58**(12): p. 1251-1255.
3. Kotharkar, S.A. and D.B. Shinde, *Synthesis of antimicrobial 2,9,10-trisubstituted-6-oxo-7,12-dihydro-chromeno[3,4-b]quinoxalines*. Bioorg Med Chem Lett, 2006. **16**(24): p. 6181-6184.
4. Estevez, Y., Quiliano, M., Burguete, A., Cabanillas, B., Zimic, M., Malaga, E., Verastegui, M., Perez-Silanes, S., Aldana, I., Monge, A., Castillo, D., Deharo, E., *Trypanocidal properties, structure-activity relationship and computational studies of quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives*. Exp Parasitol, 2011. **127**(4): p. 745-751.
5. El-Sabbagh, O.I., El-Sadek, M. E., Lashine, S. M., Yassin, S. H., El-Nabtity, S. M., *Med Chim Res*, 2009. **18**(9): p. 782-797.

6. Burguete, A., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Villar, R., Vicente, E., Solano, B., Ancizu, S., Perez-Silanes, S., Aldana, I., Monge, A., *Synthesis and anti-inflammatory/antioxidant activities of some new ring substituted 3-phenyl-1-(1,4-di-N-oxide quinoxalin-2-yl)-2-propen-1-one derivatives and of their 4,5-dihydro-(1H)-pyrazole analogues*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007. **17**(23): p. 6439-6443.
7. Kleim, J.P., Bender, R., Kirsch, R., Meichsner, C., Paessens, A., Rosner, M., Rubsamen-Waigmann, H., Kaiser, R., Wichers, M., Schneeweis, K. E., *Preclinical evaluation of HBY 097, a new nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 replication*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995. **39**(10): p. 2253-2257.
8. Balzarini, J., Karlsson, A., Meichsner, C., Paessens, A., Riess, G., De Clercq, E., Kleim, J. P., *Resistance pattern of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase to quinoxaline S-2720*. *J Virol*, 1994. **68**(12): p. 7986-7992.
9. Gris, J., Glisoni, R., Fabian, L., Fernáandez, B., Moglioni, A. G., *Tetrahedron Lett*, 2008. **49**: p. 1053-1056.
10. Xu, B., Sun, Y., Guo, Y., Cao, Y., Yu, T., *Synthesis and biological evaluation of N4-(hetero)arylsulfonylquinoxalinones as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors*. *Bioorg Med Chem*, 2009. **17**(7): p. 2767-2774.
11. Rubsamen-Waigmann, H., Hugueneel, E., Shah, A., Paessens, A., Ruoff, H. J., von Briesen, H., Immelmann, A., Dietrich, U., Wainberg, M. A., *Resistance mutations selected in vivo under therapy with anti-HIV drug HBY 097 differ from resistance pattern selected in vitro*. *Antiviral Res*, 1999. **42**(1): p. 15-24.
12. Patel, M., McHugh, R. J., Jr., Cordova, B. C., Klabe, R. M., Erickson-Viitanen, S., Trainor, G. L., Rodgers, J. D., *Synthesis and evaluation of quinoxalinones as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000. **10**(15): p. 1729-1731.
13. Ali, I.A.I., Al-Masoudi, I. A., Hassan, H. Gh., Al-Masoudi, N. A., *Chem. Heterocycl. Comp.*, 2007. **43**: p. 1052.
14. Kleim, J.P., Bender, R., Billhardt, U. M., Meichsner, C., Riess, G., Rosner, M., Winkler, I., Paessens, A., *Activity of a novel quinoxaline derivative against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and viral replication*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993. **37**(8): p. 1659-1664.
15. Avendano, C. and J.C. Menendez, *Inhibitors of multidrug resistance to antitumor agents (MDR)*. *Curr Med Chem*, 2002. **9**(2): p. 159-193.
16. Robert, J., *Approaches to multidrug resistance reversal*. *Expert Opin Investig Drugs*, 1998. **7**(6): p. 929-239.
17. Li-rui Sun , X.L., Yan-na Cheng, Hong-yu Yuan, Ming-hui Chen,Wei Tang, Stephen Geoffrey Ward, Xian-jun Qu,, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2009. **63**: p. 202-208.
18. Piras, S., M. Loriga, and G. Paglietti, *Quinoxaline chemistry. Part XVII. Methyl [4-(substituted 2-quinoxalinyloxy) phenyl] acetates and ethyl N-([4-(substituted 2-quinoxalinyloxy) phenyl] acetyl) glutamates analogs of methotrexate: synthesis and evaluation of in vitro anticancer activity*. *Farmaco*, 2004. **59**(3): p. 185-194.
19. Corona, P., Carta, A., Loriga, M., Vitale, G., Paglietti, G., *Synthesis and in vitro antitumor activity of new quinoxaline derivatives*. *Eur J Med Chem*, 2009. **44**(4): p. 1579-1591.
20. Weng, Q., Wang, D., Guo, P., Fang, L., Hu, Y., He, Q., Yang, B., *Q39, a novel synthetic Quinoxaline 1,4-Di-N-oxide compound with anti-cancer activity in hypoxia*. *Eur J Pharmacol*, 2008. **581**(3): p. 262-269.
21. Carta, A., Sanna, P., Gherardini, L., Usai, D., Zanetti, S., *Novel functionalized pyrido[2,3-g]quinoxalinones as antibacterial, antifungal and anticancer agents*. *Farmaco*, 2001. **56**(12): p. 933-938.
22. Cesare, A.J., Reddel, R. R., *Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications*. *Nat Rev Genet* , 2010. **11**: p. 319-330.
23. Parkinson, G.N., M.P. Lee, and S. Neidle, *Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA*. *Nature*, 2002. **417**(6891): p. 876-880.

24. Wang, Y. and D.J. Patel, *Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex*. Structure, 1993. **1**(4): p. 263-882.
25. Luu, K.N., Phan, A. T., Kuryavyi, V., Lacroix, L., Patel, D. J., *Structure of the human telomere in K<sup>+</sup> solution: an intramolecular (3 + 1) G-quadruplex scaffold*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(30): p. 9963-9970.
26. Phan, A.T., Luu, K. N. and Patel, D. J., *Different loop arrangements of intramolecular human telomeric (3+1) G-quadruplexes in K<sup>+</sup> solution*. Nucl Acids Res, 2006. **34**: p. 5715-5719.
27. Schaffitzel, C., Berger, I., Postberg, J., Hanes, J., Lipps, H. J., Pluckthun, A., *In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with Stylonychia lemnae macronuclei*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8572-8577.
28. Davis, J.T., *G-quartets 40 years later: from 5'-GMP to molecular biology and supramolecular chemistry*. Angew Chem Int Ed, 2004. **43**(6): p. 668-698.
29. Simonsson, T., *G-quadruplex DNA structures--variations on a theme*. Biol Chem, 2001. **382**(4): p. 621-628.
30. Hazel, P., Huppert, J., Balasubramanian, S., Neidle, S., *Loop-length-dependent folding of G-quadruplexes*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(50): p. 16405-16415.
31. Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J., Balasubramanian, S *Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells*. Nat Chem, 2013. **5**: p. 182-186.
32. Biffi, G., Di Antonio, M., Tannahill, D., Balasubramanian, S., *Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells*. Nat Chem, 2014. **6**: p. 75-80.
33. Maizels, N., Gray, L. T., *The G4 genome*. PLoS genetics, 2013. **9**, e1003468.
34. Murat, P., Balasubramanian, S., *Existence and consequences of G-quadruplex structures in DNA*. Current Opinion in Genetics & Development, 2014. **25**: p. 22-29.
35. Greider, C.W. and E.H. Blackburn, *Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts*. Cell, 1985. **43**(2 Pt 1): p. 405-413.
36. Smogorzewska, A. and T. de Lange, *Regulation of telomerase by telomeric proteins*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 177-208.
37. Neidle, S. and G. Parkinson, *Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(5): p. 383-393.
38. Mergny, J.L., Lacroix, L., Teulade-Fichou, M. P., Hounsou, C., Guittat, L., Hoarau, M., Arimondo, P. B., Vigneron, J. P., Lehn, J. M., Riou, J. F., Garestier, T., Helene, C., *Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3062-3067.
39. Pennarun, G., et al., *Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands*. Oncogene, 2005. **24**(18): p. 2917-2928.
40. Moore, M.J., et al., *Trisubstituted acridines as G-quadruplex telomere targeting agents. Effects of extensions of the 3,6- and 9-side chains on quadruplex binding, telomerase activity, and cell proliferation*. J Med Chem, 2006. **49**(2): p. 582-599.
41. Kim, M.Y., et al., *Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(10): p. 2098-2099.
42. Balasubramanian, S. and S. Neidle, *G-quadruplex nucleic acids as therapeutic targets*. Curr Opin Chem Biol, 2009. **13**(3): p. 345-353.
43. De Cian, A., et al., *Targeting telomeres and telomerase*. Biochimie, 2008. **90**(1): p. 131-155.
44. Ou, T.M., et al., *G-quadruplexes: targets in anticancer drug design*. ChemMedChem, 2008. **3**(5): p. 690-713.
45. Monchaud, D. and M.P. Teulade-Fichou, *A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands*. Org Biomol Chem, 2008. **6**(4): p. 627-636.
46. Collie, G.W., Parkinson, G. N., *The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines*. Chem Soc Rev, 2011. **40**: p. 5867-5892.

47. Burger, A.M., et al., *The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function.* *Cancer Res*, 2005. **65**(4): p. 1489-1496.
48. Phatak, P., et al., *Telomere uncapping by the G-quadruplex ligand RHPS4 inhibits clonogenic tumour cell growth in vitro and in vivo consistent with a cancer stem cell targeting mechanism.* *Br J Cancer*, 2007. **96**(8): p. 1223-1233.
49. Rizzo, A., et al., *Stabilization of quadruplex DNA perturbs telomere replication leading to the activation of an ATR-dependent ATM signaling pathway.* *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(16): p. 5353-5364.
50. Beaudoin, J.D. and J.P. Perreault, *5'-UTR G-quadruplex structures acting as translational repressors.* *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(20): p. 7022-7036.
51. Gomez, D., et al., *A G-quadruplex structure within the 5'-UTR of TRF2 mRNA represses translation in human cells.* *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(20): p. 7187-7198.
52. Qin, Y. and L.H. Hurley, *Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions.* *Biochimie*, 2008. **90**(8): p. 1149-1171.
53. Bejugam, M., et al., *Trisubstituted isoalloxazines as a new class of G-quadruplex binding ligands: small molecule regulation of c-kit oncogene expression.* *J Am Chem Soc*, 2007. **129**(43): p. 12926-12927.
54. Cogoi, S. and L.E. Xodo, *G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription.* *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(9): p. 2536-2549.
55. Siddiqui-Jain, A., et al., *Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(18): p. 11593-11598.
56. Gomez, D., et al., *Telomestatin-induced telomere uncapping is modulated by POT1 through G-overhang extension in HT1080 human tumor cells.* *J Biol Chem*, 2006. **281**(50): p. 38721-38729.
57. Salvati, E., et al., *Telomere damage induced by the G-quadruplex ligand RHPS4 has an antitumor effect.* *J Clin Invest*, 2007. **117**(11): p. 3236-3247.
58. Drygin, D., et al., *Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis.* *Cancer Res*, 2009. **69**(19): p. 7653-7661.
59. Fernando, H., et al., *A conserved quadruplex motif located in a transcription activation site of the human c-kit oncogene.* *Biochemistry*, 2006. **45**(25): p. 7854-7860.
60. Shin-ya, K., et al., *Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from Streptomyces anulatus.* *J Am Chem Soc*, 2001. **123**(6): p. 1262-1263.
61. Lyoung, S., et al., *G-quartets direct assembly of HIV-1 nucleocapsid protein along single-stranded DNA.* *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(19): p. 5754-5763.
62. De Armond, R., et al., *Evidence for the presence of a guanine quadruplex forming region within a polypurine tract of the hypoxia inducible factor 1alpha promoter.* *Biochemistry*, 2005. **44**(49): p. 16341-16350.
63. Ren, J. and J.B. Chaires, *Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands.* *Biochemistry*, 1999. **38**(49): p. 16067-16075.
64. Parkinson, G.N., R. Ghosh, and S. Neidle, *Structural basis for binding of porphyrin to human telomeres.* *Biochemistry*, 2007. **46**(9): p. 2390-2397.
65. Teulade-Fichou, M.P., et al., *Selective recognition of G-quadruplex telomeric DNA by a bis(quinacridine) macrocycle.* *J Am Chem Soc*, 2003. **125**(16): p. 4732-4740.
66. Fedoroff, O.Y., et al., *NMR-Based model of a telomerase-inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA.* *Biochemistry*, 1998. **37**(36): p. 12367-12374.
67. Pennarun, G., Granotier, C., Gauthier, L. R., Gomez, D., Hoffschir, F., Mandine, E., Riou, J. F., Mergny, J. L., Mailliet, P., Boussin, F. D., *Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands.* *Oncogene*, 2005. **24**(18): p. 2917-2928.

68. Guittat, L., et al., *Targeting human telomerase for cancer therapeutics*. Cytotechnology, 2004. **45**(1-2): p. 75-90.
69. Reed, J.E., et al., *Stabilization of G-quadruplex DNA and inhibition of telomerase activity by square-planar nickel(II) complexes*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(18): p. 5992-5993.
70. Dixon, I.M., et al., *A G-quadruplex ligand with 10000-fold selectivity over duplex DNA*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(6): p. 1502-1503.
71. Chung, W.J., Heddi, B., Hamon, F., Teulade-Fichou, M. P., and Phan, A. T., *Solution structure of a G-quadruplex bound to the bisquinolinium compound Phen-DC(3)*. Angew Chem Int Ed 2014. **53**: p. 999-1002.
72. Müller, S., Kumari, S., Rodriguez, R., Balasubramanian, S., , *Small-molecule-mediated G-quadruplex isolation from human cells*. Nat Chem, 2010. **12** p. 1095–1098.
73. Rodriguez, R., Miller, K. M., Forment, J. V., Bradshaw, C. R., Nikan, M., Britton, S., Oelschlaegel, T., Xhemalce, B., Balasubramanian, S., Jackson, S. P., *Small-molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes*. Nat Chem Biol, 2012. **8**: p. 301-310.
74. De Cian, A., et al., *Highly efficient G-quadruplex recognition by bisquinolinium compounds*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(7): p. 1856-1857.
75. Shirude, P.S., et al., *Macrocyclic and helical oligoamides as a new class of G-quadruplex ligands*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(39): p. 11890-11891.
76. Mergny, J.L. and J.C. Maurizot, *Fluorescence resonance energy transfer as a probe for G-quartet formation by a telomeric repeat*. ChemBiochem, 2001. **2**(2): p. 124-132.
77. Monchaud, D., Allain, Cl., Teulade-Fichou, M. P., *Development of a fluorescent intercalator displacement assay (G4-FID) for establishing quadruplex-DNA affinity and selectivity of putative ligands*. Bioorg Med Chem Lett, 2006. **16**: p. 4842–4845.
78. Kinashi, H., et al., *Frequent loss and restoration of antibiotic production by Streptomyces lasaliensis*. J Antibiot (Tokyo), 1988. **41**(5): p. 624-637.
79. Sarges, R., et al., *4-Amino[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalines. A novel class of potent adenosine receptor antagonists and potential rapid-onset antidepressants*. J Med Chem, 1990. **33**(8): p. 2240-2254.
80. Loscher, W., et al., *A new pyrrolyl-quinoxalinedione series of non-NMDA glutamate receptor antagonists: pharmacological characterization and comparison with NBQX and valproate in the kindling model of epilepsy*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(1): p. 250-262.
81. Li, J.J., et al., *Synthesis and structure-activity relationship of 2-amino-3-heteroaryl-quinoxalines as non-peptide, small-molecule antagonists for interleukin-8 receptor*. Bioorg Med Chem, 2003. **11**(17): p. 3777-3790.
82. Koepfel, F., et al., *Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(5): p. 1087-1096.
83. Gavathiotis, E., et al., *Drug recognition and stabilisation of the parallel-stranded DNA quadruplex d(TTAGGGT)<sub>4</sub> containing the human telomeric repeat*. J Mol Biol, 2003. **334**(1): p. 25-36.
84. Gowan, S.M., et al., *Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes*. Mol Pharmacol, 2001. **60**(5): p. 981-988.
85. Bessi, I., et al., *Spectroscopic, molecular modeling, and NMR-spectroscopic investigation of the binding mode of the natural alkaloids berberine and sanguinarine to human telomeric G-quadruplex DNA*. ACS Chem Biol, 2012. **7**(6): p. 1109-1119.
86. Bazzicalupi, C., et al., *The crystal structure of human telomeric DNA complexed with berberine: an interesting case of stacked ligand to G-tetrad ratio higher than 1:1*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(1): p. 632-638.
87. Ma, Y., et al., *Quinolono-benzo-[5, 6]-dihydroisoquinolium compounds derived from berberine: a new class of highly selective ligands for G-quadruplex DNA in c-myc oncogene*. Eur J Med Chem, 2011. **46**(5): p. 1906-1913.



## *Chapitre II*

*Synthèse et caractérisation d'une  
molécule de la famille  
benzimidazopyridoquinoline*



## I. Introduction

Une seule méthode a été décrite, à notre connaissance, pour la synthèse de ce produit. Elle a été décrite par Zniber *et al.*[1]. Il s'agit d'une condensation de la sérine **1** avec l'*o*-phénylènediamine **2** en milieu HCl (5,5 N) à reflux pendant trois jours (Schéma 1).

Cette réaction conduit à deux types de produits :

- ✓ Un système bicyclique de type 3-méthyl-quinoxaline **3**
- ✓ une structure pentacyclique dérivée du benzimidazole **4**

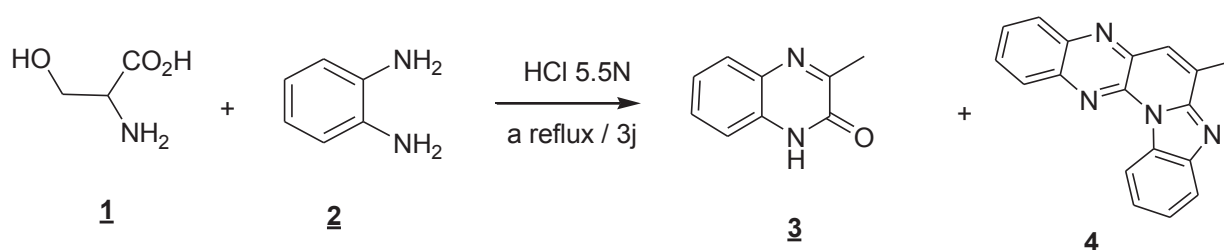


Schéma 1 : synthèse du produit **4** dérivé du benzimidazole

L'obtention du produit **3** peut s'expliquer selon le schéma réactionnel suivant (Schéma 2) :

La sérine subit, en milieu acide, une déshydratation, conduisant ainsi, à la 2-méthylidène glycine qui peut exister sous la forme tautomère de structure acide 2-imino propionique. Ce dernier, en milieu acide et sous l'action du groupe amino de l'*o*-phénylènediamine, donne un intermédiaire qui subit une cyclisation intramoléculaire suivie de la perte d'une molécule d'eau et d'ammoniac pour conduire à la 3-méthyl-quinoxalin-2-one **3**

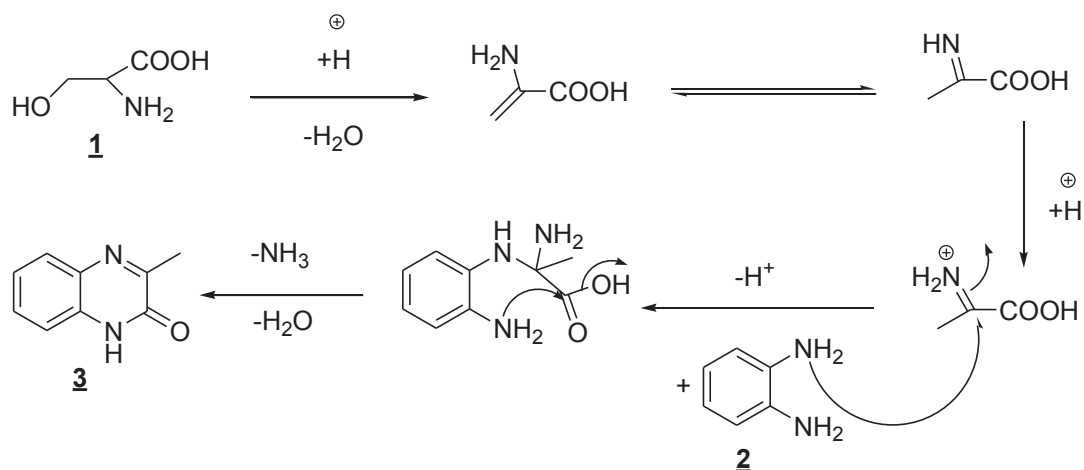
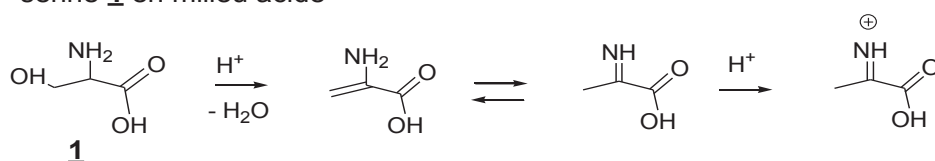


Schéma 2 : mécanisme réactionnel pour obtenir le produit 3

La formation du composé pentacyclique 4, peut être expliquée selon le mécanisme suivant :

En milieu acide les 2 formes tautomères précédemment obtenues, après déshydratation de la sérine, réagissent entre elles. La 2-méthylidène glycine intervient comme une énamine mettant en jeu le caractère nucléophile du carbone du groupe méthylidène, pour attaquer le carbone du groupe iminium issu de la protonation du groupe imino de l'acide 2-imino-propionique. L'intermédiaire, ainsi formé, perd une molécule d'ammoniac pour donner 1' (Schéma 3) :

sérine 1 en milieu acide



dimère de sérine 1'

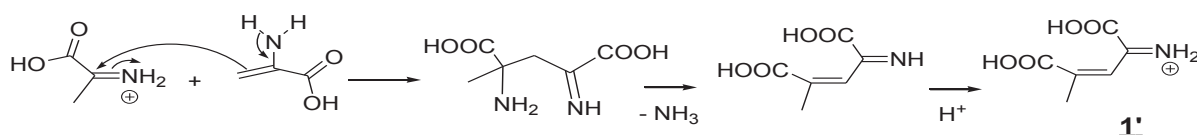
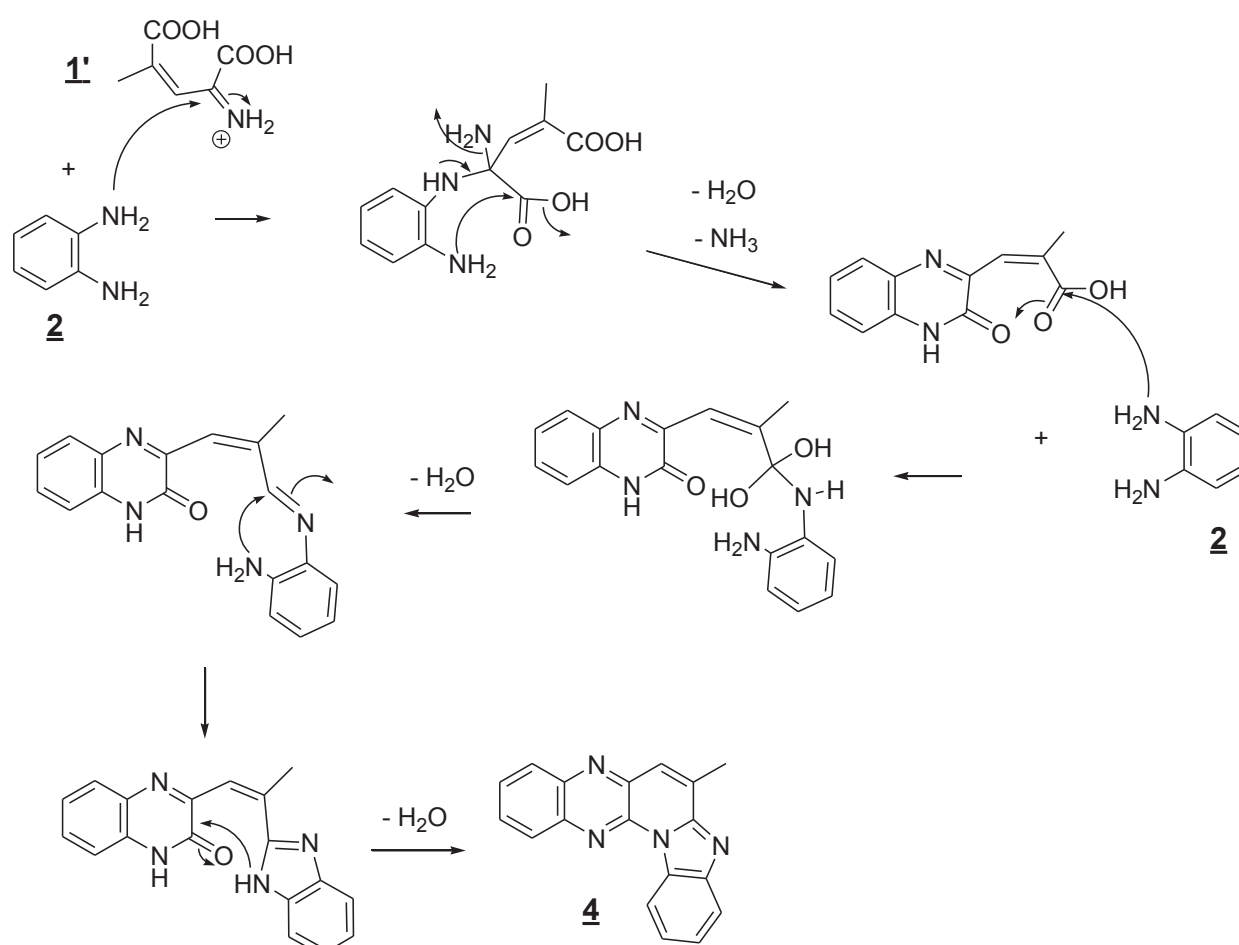


Schéma 3 : mécanisme réactionnel pour obtenir le produit 1'

Le groupe amino de l'*o*-phénylènediamine réagit sur la carbone iminium de **1'** pour conduire à un intermédiaire qui subit une cyclisation intramoléculaire, induisant la formation de la quinoxalinone, suivie de la perte d'une molécule d'ammoniac. Le composé obtenu réagit avec l'*o*-phénylènediamine, en engageant le groupe carboxyle afin de former le noyau benzimidazole. L'intermédiaire formé, subit une cyclisation intramoléculaire mettant en jeu le groupe NH du benzimidazole et le carbonyle de la fonction lactame de la quinoxaline, pour conduire finalement au composé pentacyclique **4** (Schéma 4).



**Schéma 4** : mécanisme réactionnel pour obtenir le produit **4**

Dans ce travail, a été reproduite la synthèse décrite par Zniber *et al.*[1]. pour obtenir le produit pentacyclique **4** à partir de l'*o*-phénylènediamine non substituée (Schéma

4). Ensuite la quaternarisation de ce produit a été réalisée pour rendre la molécule finale chargée positivement dans le but d'augmenter sa solubilité dans l'eau.

## II. Synthèse du noyau pentacyclique dérivé du benzimidazole

Cette réaction de condensation était auparavant réalisée avec 1 équivalent de sérine **1** et 1 équivalent d'*o*-phénylènediamine **2** dans HCl 5,5 N à reflux pendant 3 jours ; cependant, dans ces conditions expérimentales, seul le produit **3** est obtenu.

L'augmentation du nombre d'équivalents de la sérine **1** (3,5 et 10 équivalents) nous a permis d'obtenir le produit pentacyclique **4** comme un produit minoritaire de cette réaction avec un rendement de 4% [2].

Pour augmenter ce rendement, nous avons essayé de changer l'ordre de l'ajout des deux réactifs ; premièrement nous avons laissé la sérine **1** incuber dans l'acide chlorhydrique à reflux pendant 2h pour former le composé **1'** (voir Schéma 3), ensuite nous avons ajouté progressivement le deuxième réactif l'*o*-phénylènediamine et laissé l'ensemble à reflux 3 jours pour obtenir à la fin le même rendement.

Nous avons alors tenté de former ce dimère autrement par une réaction de condensation entre la sérine **1** et l'acide pyruvique **5** dans un milieu acide (HCl 5,5 N) à reflux pendant 24h (Schéma 5), la réaction a été contrôlée par CCM sur silice sous UV et aussi par révélation à la ninhydrine après neutralisation du milieu réactionnel avec Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Les plaques de CCM ne mettent pas en évidence de nouveaux produits.

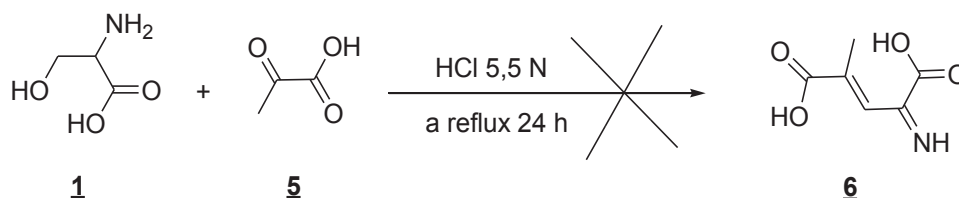
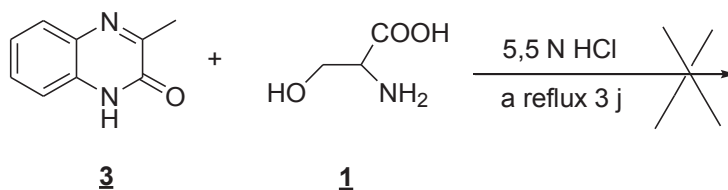


Schéma 5

Nous nous sommes tournés vers d'autres conditions pour augmenter le rendement du produit **4** qui nous intéresse en faisant réagir le quinoxalin-2-one produit 3 majoritaire de la réaction dans le même solvant HCl 5,5 N à reflux avec 1, 4 et 10

équivalents de la sérine **1** (Schéma 6). Au bout de 3 jours il ne s'est produit aucune réaction.

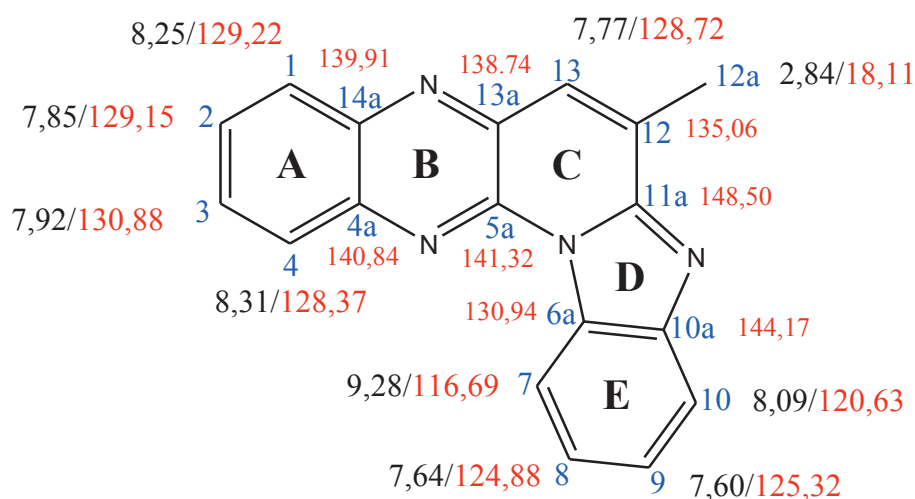


**Schéma 6**

Nous avons ensuite changé le solvant en réalisant la réaction dans un mélange constituée de 50% de DMF et 50% soit d'HCl dans du 2-propanol 5 à 6 N, soit d'HCl dans l'acide acétique, ou soit d'HCl dans le dioxane et de 10 équivalents de sérine **1** à 90°C pendant 3 jours. Le changement de solvant n'a pas permis non plus d'améliorer la réaction. Il est à noter que les produits de départ sont partiellement soluble dans ces conditions expérimentales.

Un dernier essai a consisté à utiliser la méthode de micro-onde à 170°C et 170W avec 3,5 équivalents de sérine **1** dans HCl 5,5 N pendant 4h. Cette méthode ne permet pas d'augmenter le rendement du produit pentacyclique **4** mais par contre permet de diminuer le temps de la réaction de 3 jours à 4h. Cette méthode semble prometteuse. Un seul essai ayant été réalisé, une étude plus approfondie devrait être entreprise pour confirmer ce résultat.

L'analyse du spectre de RMN du produit **4** montre la présence de deux familles **A** (**H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub>**) et **E** (**H<sub>7</sub>-H<sub>10</sub>**) des protons aromatiques (Figure 1) et deux signaux sous forme d'un singulet, l'un relatif au proton **H<sub>13</sub>** et l'autre qui intègre pour trois protons du groupement **CH<sub>3</sub>** en position 12a (Annexe A, spectre 1). Le spectre de masse haute résolution permet de confirmer la structure de la molécule, il donne un *m/z* pour C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub> ([M + H]<sup>+</sup>) = 285.1138. Ce composé possède deux maxima d'absorption UV-visible à 255 et 401 nm dans le méthanol (Annexe A, spectre 2), ainsi qu'un maximum d'émission à 490 nm (excitation à 390 nm dans le méthanol) (Annexe A, spectre 3).

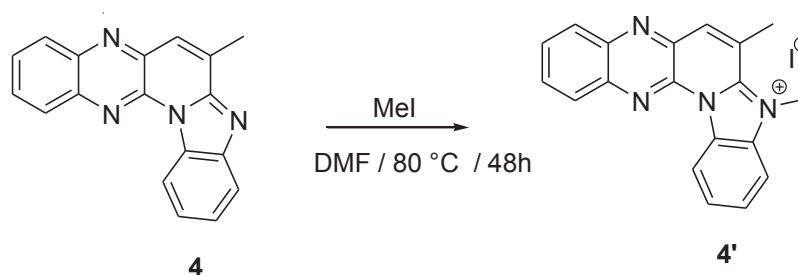


**Figure 1** : caractérisation du produit **4** par RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC, HMQC, Cosy

### III. Quaternarisation

Le produit pentacyclique **4** que nous avons synthétisé est une molécule plane, aromatique et qui présente une fluorescence très importante. Nous avons introduit une charge positive directement sur le noyau aromatique par quaternarisation d'un atome d'azote cyclique afin d'améliorer la solubilité dans l'eau et l'affinité pour l'ADN quadruplex.

Pour quaternariser le produit **4** nous avons utilisé l'iodure de méthyle pour obtenir le produit **4'** avec un contre ion iodure et un rendement de 56% (schéma 7)[2].

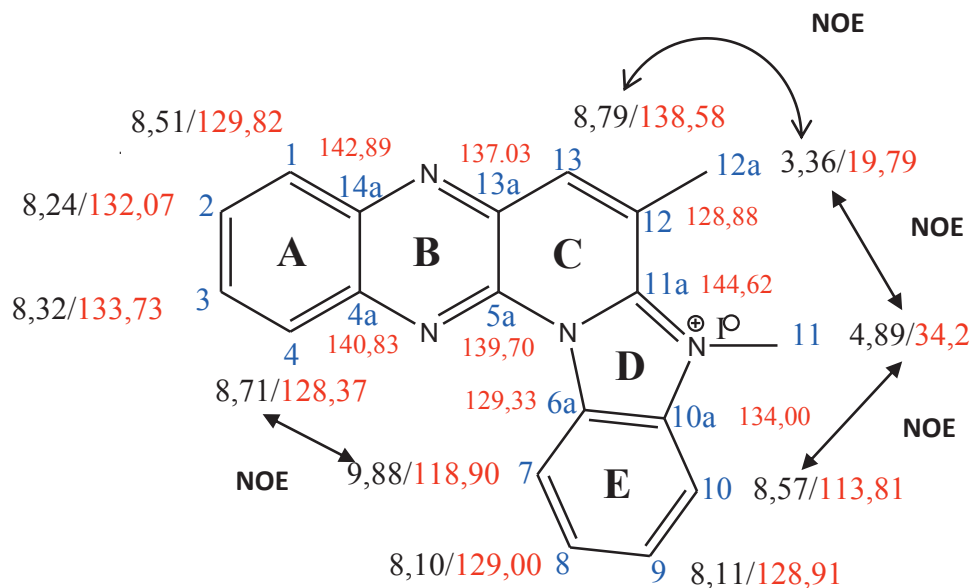


**Schéma 7**: quaternarisation du produit **4** avec Mel

L'analyse du spectre de RMN  $^1\text{H}$  du produit **4'** (Annexe A, spectre 4) montre la présence d'un troisième signal sous forme d'un singulet qui intègre pour trois protons du groupement  $\text{CH}_3$  de la quaternarisation et un changement de déplacement chimique très remarquable du proton  $\text{H}_{13}$  ainsi que des autres protons de la molécule.

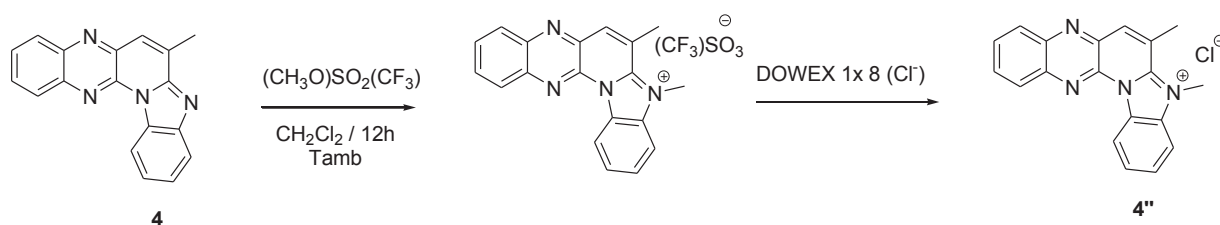


La position de la méthylation de ce produit a été déterminée par une analyse RMN 2D ainsi que par étude des NOESY 2D intramoléculaires (Figure 2).



**Figure 2** : caractérisation du produit **4'** par RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC, HMQC, Cosy et Noesy 2D

Le produit **4'** de cette réaction de quaternarisation est un produit soluble seulement dans le DMSO. Nous n'avons pas réussi à échanger le contre ion iodure pour obtenir un produit soluble dans l'eau. Nous nous sommes tournés donc vers un autre agent de méthylation pour apporter d'autres propriétés de solubilité, il s'agit du triflate de méthyle pour obtenir le produit avec un contre ion triflate soluble dans le méthanol (Schéma 8). Le changement du contre ion par un ion chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) sur une résine DOWEX 1x8( $\text{Cl}^-$ ) nous a permis d'obtenir un produit **4''** sous forme d'une poudre verte avec un rendement de 86% et totalement soluble dans l'eau[2].



**Schéma 8**: quaternarisation du produit **4** avec  $(\text{CH}_3\text{O})\text{SO}_2(\text{CF}_3)$

Le produit **4''** a été identifié par une analyse RMN  $^1\text{H}$  (Annexe A, spectre 5) et une analyse en spectrométrie de masse haute résolution qui a donné un  $m/z$  pour

$C_{19}H_{15}N_4$  ([M+]) = 299.1289. L'absence du contre ion triflate a été vérifiée par ionisation electrospray négatif (-ESI).

Ce composé possède deux maxima d'absorption UV-visible à 256 et 397 nm dans l'eau (Annexe A, spectre 6).

#### IV. Conclusion

La réaction de condensation de 3,5 équivalents de sérine avec 1 équivalent d'o-phénylëndiamine dans un milieu acide (HCl 5,5 N) à reflux pendant 3 jours reste pour l'instant la plus efficace. Elle permet d'obtenir le produit pentacyclique **4** avec un rendement de 4%. Par contre l'utilisation de la méthode de micro-onde semble apporter un plus en terme de temps de réaction.

La réaction de quaternarisation du produit **4** avec le triflate de méthyle permet l'échange du contre ion pour obtenir un produit **4'** soluble dans l'eau avec un contre ion chlorure.

#### V. Références bibliographiques

1. Zniber, R., El Hajji, A. J., Achour, R., Cherkaoui, M. Z. et Harrata, A. , *Synthese et caracterisation de nouveaux composes benzimidazoliques et quinoxaliniques a proprietes pharmacologiques potentielles*. J Soc Chim de Tunisie 2000. **IV**: p. 783-787.
2. Zanzoul, A., Ramli, Y., Essassi, M. & Pratviel, G., *A benzimidazopyridoquinoxaline as promising scaffold for G-quadruplex DNA targeting*. Med Chem Res, 2014. **23**: p.4042-4049.

## *Chapitre III*

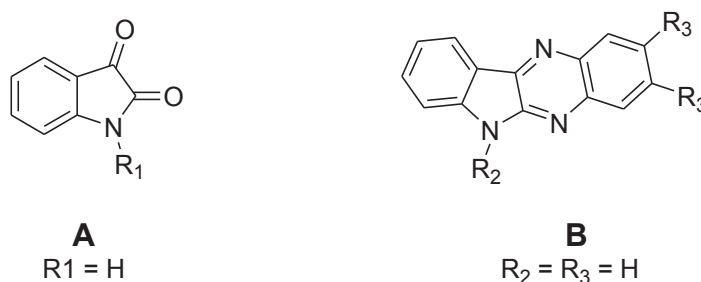
# *Synthèse et caractérisation des molécules de la famille indoloquinoléine*



## I. Introduction

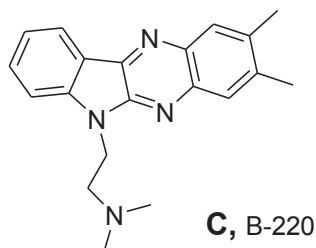
Les indole-2,3-diones, composé A (Figure 1), représentent une grande famille de composés hétérocycliques qui ont été largement étudiées pour le développement de molécules importantes sur le plan pharmaceutique. Les isatines *N*-substitués[1], en particulier présentent un large éventail d'activités biologiques telles que antifongique[2], antivirale[3], anti-VIH[4], et anticancéreuse[5].

Plusieurs dérivés tetracycliques du système 6*H*-indolo[2,3-*b*]quinoxaline (Figure 1B), sont synthétisé par condensation d'isatine (indole-2,3-diones) (Figure 1A) et d'*o*-phénylènediamine.



**Figure 1:** structure chimique des composés A et B

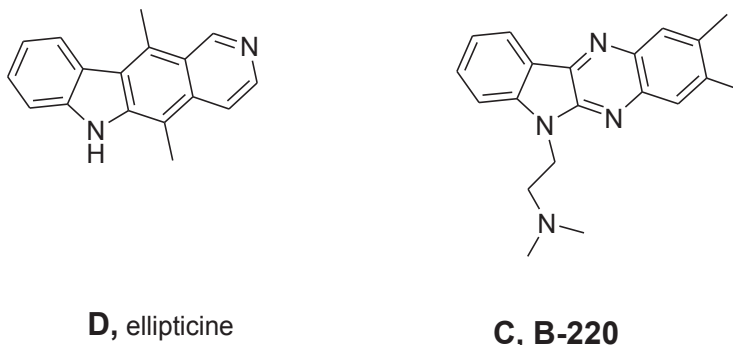
Certain de ces dérivés avec des chaînes latérales en position 6, tel que le 2,3-diméthyl-6-(2-diméthylaminoéthyl)-6*H*-indolo[2,3-*b*]quinoxaline, appelé aussi B-220, composé C (Figure 2), présentent une activité antivirale puissante[6, 7], contre, par exemple le virus de l'herpès simplex de type 1 HSV-1, le cytomégalovirus CMV et le virus varicelle-zona VZV.



**Figure 2:** structure chimique du composé C

L'Ellipticine (Figure 3D) et plusieurs de ces dérivés ont été rapportés comme possédant une activité antinéoplasique potentielle[8-10]. Une comparaison entre D et C a montré que ces deux composés se lient à l'ADN ou des polynucléotides synthétiques par intercalation, mais à la différence de l'ellipticine (composé D), le

composé C présentait une spécificité de liaison significative pour les séquences alternées A-T[11].



**D**, ellipticine

**C**, B-220

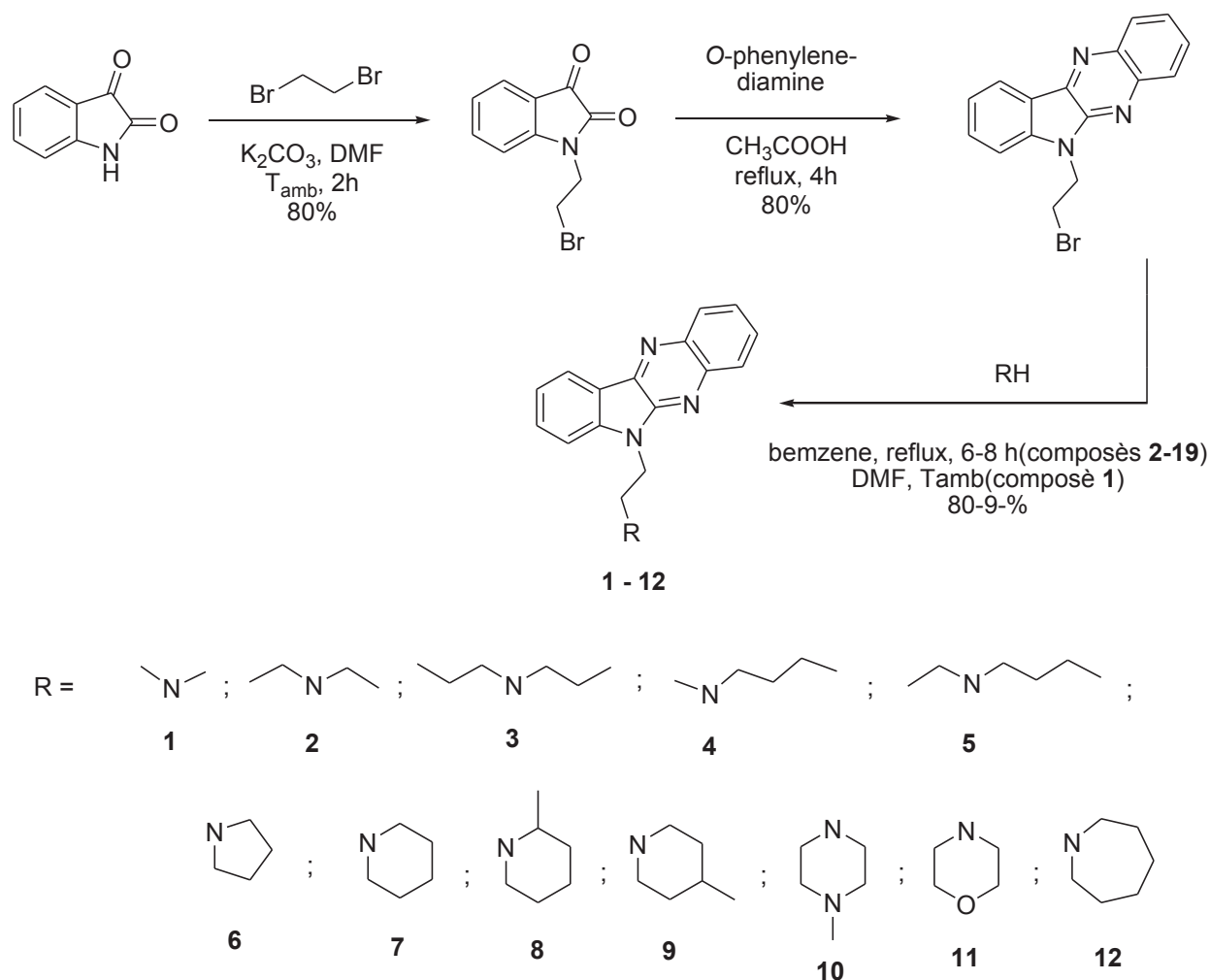
**Figure 3:** structure chimique des composés **D** et **C**

Dans cette partie du travail, nous allons synthétiser quatre dérivés tetracyclique du système *6H*-indolo[2,3-*b*]quinoxaline par alkylation d'isatines non substituées avec différents agents d'alkylation, ensuite la condensation de ces isatines *N*-substituées avec l'*o*-phénylènediamine.

La quaternarisation de ces produits a été réalisée pour rendre les molécules finales chargées positivement dans le but d'augmenter la solubilité dans l'eau.

## II. Synthèse des noyaux tetracyclique dérivés du *6H*-indolo[2,3-*b*]quinoxaline

Une synthèse a été auparavant réalisée en trois étapes à partir de deux intermédiaires ; le 1-(2-bromoéthyl)-indole-2,3-dione et le 6-(2-bromoéthyl)indoloquinoxaline pour obtenir des dérivés tetracyclique du *6H*-indolo[2,3-*b*]quinoxaline[12]. (Schéma 1).

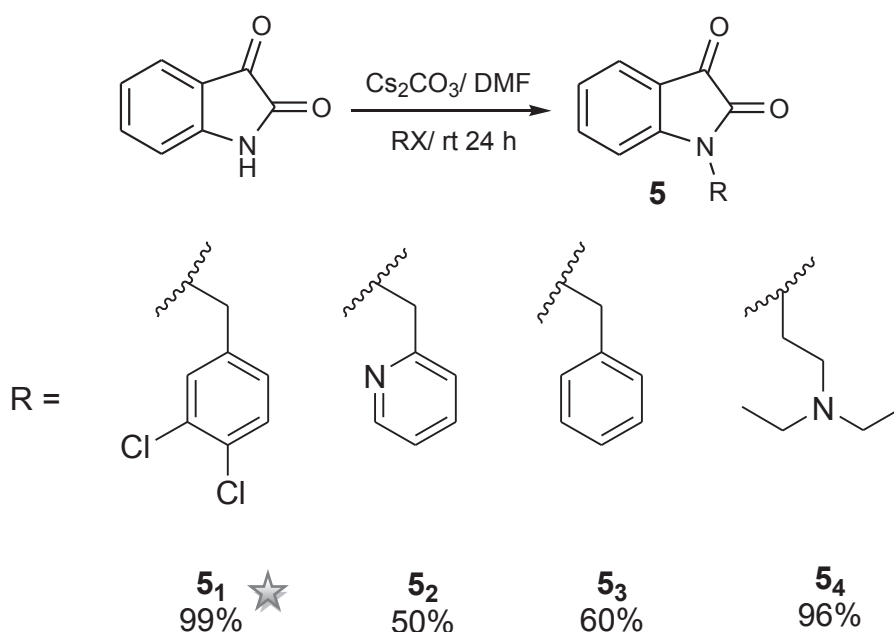


**Schéma 1:** synthèse des aminoéthyl-indoloquinoxalines (1-12)[12].

Notre stratégie pour obtenir des molécules de la famille indoloquinoxaline a consisté en deux étapes ; une alkylation d'isatine ensuite une condensation avec l'*o*-phénylènediamine non substituée.

### 1. Alkylation d'indole-2,3-dione (isatine)

Nous avons synthétisé des isatines *N*-substituées par alkylation d'indole-2,3-dione avec différents agent alkylation, le chlorure de 3,4-dichlorobenzyle, le chlorhydrate de 2-chlorométhylpyridine, le 2-chlorométhylbenzène et le 2-chloro-*N,N*-chlorhydrate diéthyléthylamine, dans DMF à température ambiante pendant 24 h et en présence de carbonate de césium pour obtenir le composé **5** différemment substitué (Schéma 2)[13].



**Schéma 2:** synthèse du produit **5**, ★ rendement de forme protonée voir ci-dessous

Les quatre composés **5<sub>1</sub>**, **5<sub>2</sub>**, **5<sub>3</sub>** et **5<sub>4</sub>** ont été caractérisés par leur spectre RMN de proton et un spectre IR (Annexe B, spectre 1, 2, 3 et 4) ainsi que par spectrométrie de masse.

La molécule **5<sub>1</sub>** a été obtenue sous forme neutre ou sous forme de chlorhydrate en fonction du mode opératoire :

A la fin de la réaction le DMF est évaporé. Si le produit est repris dans du dichloromethane et laissé précipiter à température ambiante pendant une nuit on obtient un produit sous forme de chlorhydrate qui se caractérise par un triplet à 9,11 ppm qui intègre pour un proton dû à la protonation de l'atome d'azote (Annexe B, spectre 5).

Par contre si après évaporation du DMF on purifie par colonne de silice on obtient la forme non protonée dont la RMN est présentée en annexe (Annexe B, spectre 6).

L'analyse du spectre de masse a haute résolution nous a permis de confirmer la structure de la forme neutre, le massif isotopique montre les deux  $m/z$  caractéristiques à 306,0102 et 308,0077 (Annexe B, spectre 7)



## 2. Condensation d'isatine N-substituée avec l'o-phénylènediamine non substituée

La condensation du produit **5** avec l'o-phénylènediamine non substituée dans l'acide acétique à reflux pendant 2-5 h nous a permis d'obtenir le produit **6** avec un rendement de 60-80% (Schéma 3)[13].

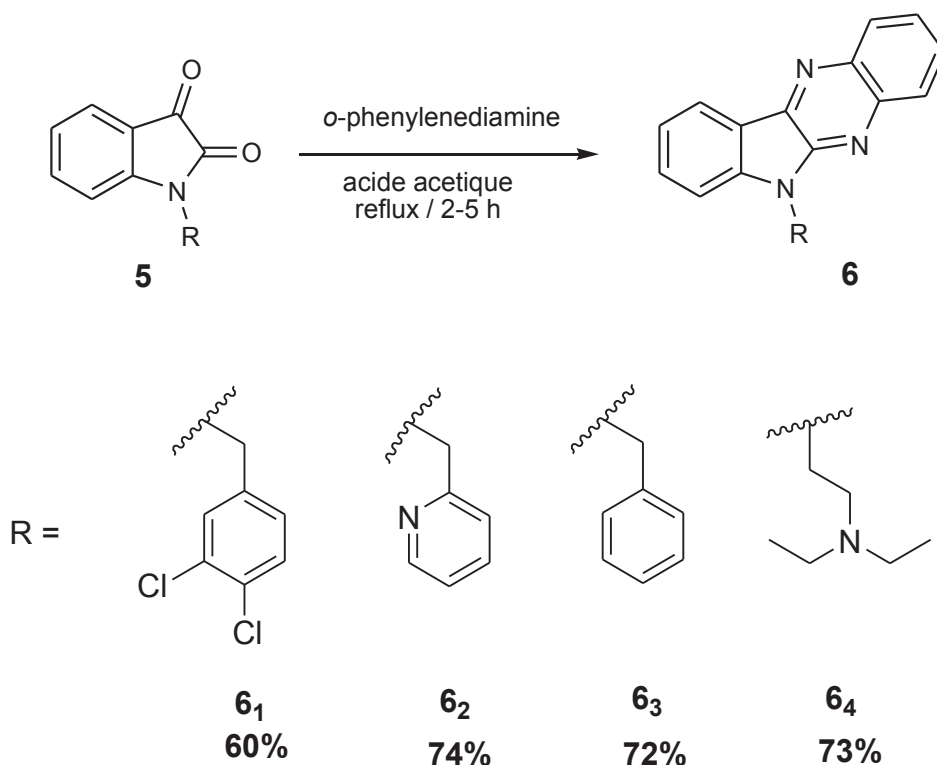


Schéma 3: synthèse du produit **6**

Le composé **5** réagit avec les groupes  $\text{NH}_2$  d'o-phénylènediamine en engageant les deux groupes carboxyle afin de former le noyau quinoxaline pour conduire finalement au composé tetracyclique **6** (Schéma 4).

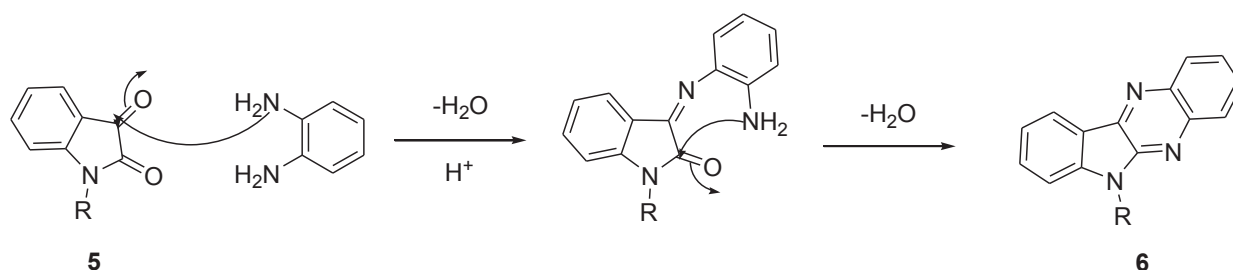


Schéma 4 : mécanisme réactionnel pour obtenir le produit **6**

L'analyse du spectre de RMN des produits **6<sub>1</sub>**, **6<sub>2</sub>**, **6<sub>3</sub>** et **6<sub>4</sub>** montre la présence de deux familles **A** (**H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub>**) et **D** (**H<sub>7</sub>-H<sub>10</sub>**) de protons aromatiques (Figure 4). Pour les composés **6<sub>1</sub>**, **6<sub>2</sub>** et **6<sub>3</sub>** leurs spectres RMN présentent un signal sous forme d'un singulet qui intègre pour deux protons du groupement **CH<sub>2</sub>** en position 13 (Figure 4).

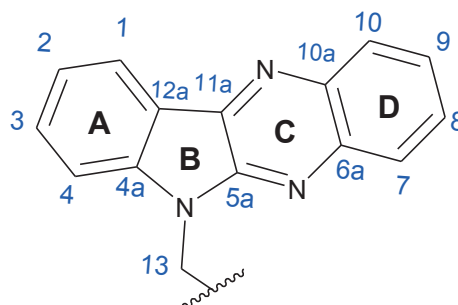


Figure 4: composés **6**

L'analyse du spectre RMN des produits **6<sub>1</sub>**, **6<sub>2</sub>** et **6<sub>3</sub>** montre aussi la présence d'une troisième famille des protons aromatiques ; la famille **E** (**H<sub>15</sub>, H<sub>18</sub> et H<sub>19</sub>**) du produit **6<sub>1</sub>** avec trois protons aromatiques (Annexe B, spectre 8), la famille **E'** (**H<sub>15</sub>-H<sub>18</sub>**) du produit **6<sub>2</sub>** avec quatre protons aromatique (Annexe B, spectre 9) et la famille **E''** (**H<sub>15</sub>-H<sub>19</sub>**) du produit **6<sub>3</sub>** avec cinq protons aromatiques (Annexe B, spectre 10) (Figure 5).

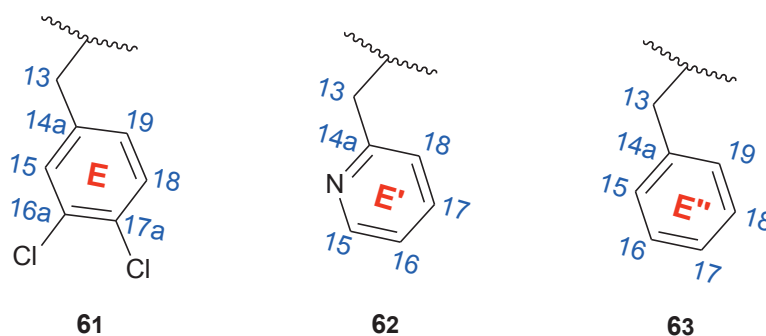


Figure 5: composés **6<sub>1</sub>**, **6<sub>2</sub>** et **6<sub>3</sub>**

Le produit **6<sub>4</sub>** a été identifié aussi par une analyse RMN (Annexe B, spectre 11), il montre la présence de deux signaux sous forme d'un triplet l'un est relatif aux protons en position 13 à 4,60 ppm et l'autre aux protons en position 14 à 2,98 ppm et qui intègrent pour deux protons, un signal sous forme d'un quadruplet relatif aux protons en position 15 à 2,69 ppm qui intègre pour quatre proton et un signal sous

forme d'un triplet relatif aux protons en position 16 à 1,05 ppm et qui intègre pour six protons (Figure 6).

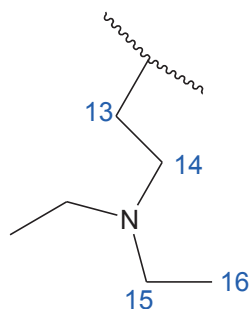


Figure 6: composés 6<sub>4</sub>

L'analyse du spectre de masse des quatre molécules permet de confirmer la structure, (Tableau 1). Les composés possèdent deux maxima d'absorption UV-visible autour de 270 et 352 nm dans le méthanol.

composé	SM(DCI/NH <sub>4</sub> ), <i>m/z</i> : [M+H] <sup>+</sup>
<u>6<sub>1</sub></u>	378,0 et 380,0
<u>6<sub>2</sub></u>	311,1
<u>6<sub>3</sub></u>	310,0
<u>6<sub>4</sub></u>	319,1

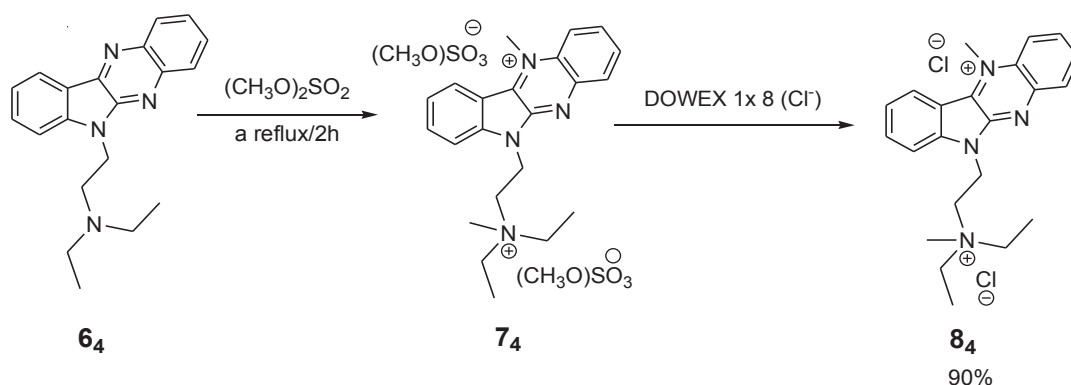
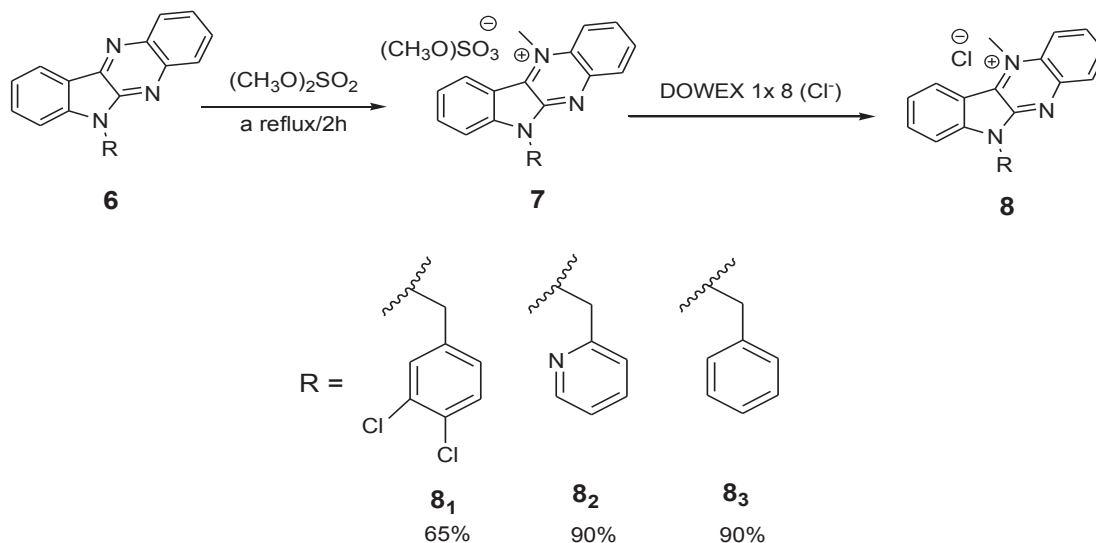
Tableau 1: analyse du spectre de masse des composés 6<sub>1</sub>, 6<sub>2</sub>, 6<sub>3</sub> et 6<sub>4</sub>

### III. Quaternarisation

Nous avons introduit une charge positive directement sur le noyau aromatique du produit tetracyclique 6 par quaternarisation d'un atome d'azote cyclique afin d'améliorer la solubilité dans l'eau et l'affinité pour l'ADN quadruplex.

Pour quaternariser le produit 6 nous avons utilisé le sulfate de diméthyle anhydre DMS pour obtenir le produit 7 avec un contre ion sulfate de méthyle (CH<sub>3</sub>O)SO<sub>3</sub><sup>-</sup> soluble dans l'eau (7<sub>2</sub> et 7<sub>4</sub>) et dans le méthanol (7<sub>1</sub> et 7<sub>3</sub>). Le changement du contre ion par un ion chlorure (Cl<sup>-</sup>) sur une résine DOWEX 1x8(Cl<sup>-</sup>) nous a permis d'obtenir

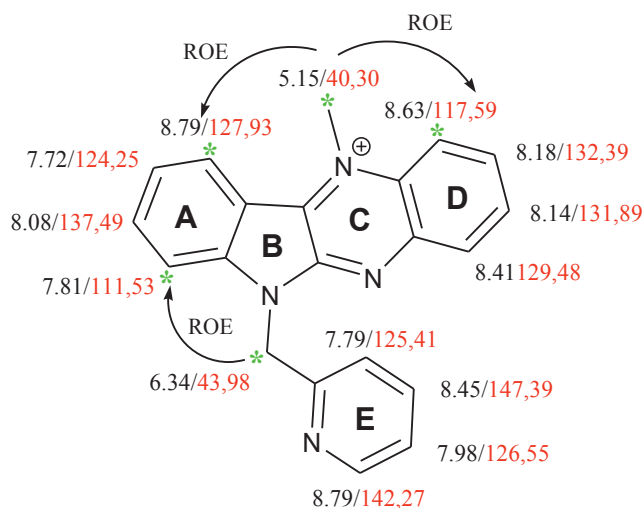
un produit pâteux **8** de couleur rouge-orange totalement soluble dans l'eau avec un contre ion chlorure et un rendement de 65-90% (schéma 5)[13, 14].



**Schémata 5** : quaternarisation du produit **6** avec  $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$

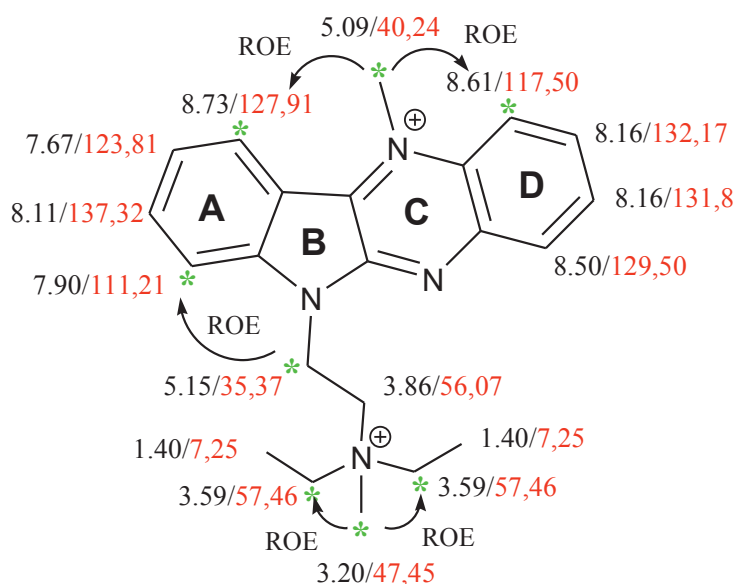
L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit **8** montre la présence d'un nouveau signal sous forme d'un singulet qui intègre pour trois protons du groupement **CH<sub>3</sub>** de la quaternarisation et un changement de déplacement chimique au niveau des protons aromatiques pour les molécules **8<sub>1</sub>**, **8<sub>2</sub>** et **8<sub>3</sub>** (Annexe B, spectre 12, 13 et 14).

La position de la méthylation de ces trois produits a été déterminée par une analyse RMN 2D ainsi que par étude des NOESY 2D intramoléculaires du produit **8<sub>2</sub>** (Figure 7).



**Figure 7** : caractérisation du produit **8<sub>2</sub>** par RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC, HMQC, Cosy et Noesy 2D 500 MHz dans  $\text{D}_2\text{O}$

Le spectre RMN du produit **8<sub>4</sub>** (Annexe B, spectre 15), montre la présence de deux signaux sous forme d'un singulet à 5,09 et 3,20 ppm et qui intègrent chacun pour trois protons du groupement  $\text{CH}_3$  de la quaternarisation. Un changement de déplacement chimique au niveau des protons aromatiques du noyau tetracyclique est également observé par rapport au produit non quaternarisé **6<sub>4</sub>** . Les deux positions de méthylation ont été déterminée aussi par une analyse RMN 2D et par étude des NOESY 2D intramoléculaires(Figure 8).



**Figure 8** : caractérisation du produit **8<sub>4</sub>** par RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC, HMQC, Cosy et Noesy 2D 500 MHz dans  $\text{D}_2\text{O}$

L'analyse du spectre de masse permet de confirmer les structures du produit **8**. Ce composé possède deux maxima d'absorption UV-visible dans le méthanol (Tableau 2).

Composé	UV-visible	
	$\lambda_{\min}$ (nm)	$\lambda_{\max}$ (nm)
<b>8<sub>1</sub></b>	275	394
<b>8<sub>2</sub></b>	267	351
<b>8<sub>3</sub></b>	276	394
<b>8<sub>4</sub></b>	274	394

**Tableau 2** : analyse du spectre UV-visible des composés **8<sub>1</sub>**, **8<sub>2</sub>**, **8<sub>3</sub>** et **8<sub>4</sub>**

#### IV. Conclusion

La synthèse des dérivés de 6*H*-indolo[2,3-*b*]quinoxaline en deux étapes, alkylation des isatines puis condensation avec l'*o*-phénylènediamine non substituée, nous a permis d'obtenir le produit tetracyclique **6** avec un rendement de 60-80%.

La réaction de quaternarisation du produit **6** avec le sulfate de diméthyle permet l'échange du contre ion pour obtenir un produit **8** soluble dans l'eau avec un contre ion chlorure et un rendement de 65-90%.

#### V. Références bibliographiques

- Mesropyan, E.G., Ambartsumyan, G. B., Avetisyan, A. A., Sarkisyan, M. G., Amasapyan, G. S., *Synthesis of Isatin and 5-Bromoisatin Derivatives*. Russ J Org Chem, 2001. **37**: p. 1476-1477.
- Ravichandran, V., Mohan, S., Suresh Kumar, K., *Synthesis and antimicrobial activity of Mannich bases of isatin and its derivatives with 2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenylacetic acid*. Arkivoc, 2007. **(xiv)**: p. 51-57.
- Nalan Terzioğlu, N.K., Aysel Gürsoy, Christophe Pannecouque, Pieter Leysen, Jan Paeshuysse, Johan Neyts, and Erik De Clercq, *Synthesis and primary antiviral activity evaluation of 3-hydrazone-5-nitro-2-indolinone derivatives*. Arkivoc, 2006. **(i)**: p. 109-118.
- Surendra N. Pandeyaa, D.S., Gopal Nath, Erik De Clercq, *Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of norfloxacin mannich bases*. Eur J Med Chem, 2000. **35**(2): p. 249-255.
- Lidia Matesic, J.M.L., John B. Bremner, Stephen G. Pyne, Danielle Skropeta, Marie Ransonb and Kara L. Vine, *N-phenethyl and N-naphthylmethyl isatins and analogues as in vitro cytotoxic agents*. Bioorg Med Chem, 2008. **16**(6): p. 3118-3124.
- Harmenberg, J., Wahren, B., Bergman, J., Akerfeldt, S. and Lundblad, L., *Antiherpesvirus activity and mechanism of action of indolo-(2,3-*b*)quinoxaline and analogs*. Antimicrob Agents Chemother, 1988. **32**(11): p. 1720-1724.

7. Harmenberg, J., et al., *The mechanism of action of the anti-herpes virus compound 2,3-dimethyl-6(2-dimethylaminoethyl)-6H-indolo-(2,3-b)quinoxaline*. *Antiviral Res*, 1991. **15**(3): p. 193-204.
8. Acton, E.M., Narayanan, V. L., Risbood, P. A., Shoemaker, R. H., Vistica, D. T. and Boyd, M. R., *Anticancer specificity of some ellipticinium salts against human brain tumors in vitro*. *J Med Chem*, 1994. **37**(14): p. 2185-2189.
9. Auclair, C., Pierre, A., Voisin, E., Pepin, O., Cros, S., Colas, C., Saucier, J. M., Verschuere, B., Gros, P. and Paoletti, C., *Physicochemical and pharmacological properties of the antitumor ellipticine derivative 2-(diethylamino-2-ethyl)9-hydroxy ellipticinium-chloride, HCl*. *Cancer Res*, 1987. **47**(23): p. 6254-6261.
10. Juret, P., Girard, A., LE Talaer, J. Y., Abbatucci, J. S., Dat-Xuong, N., LE Pecq, J. B., Paoletti, C., *Preliminary Trial of 9-Hydroxy-2-Methyl Ellipticinium (NSC264-137) in Advanced Human Cancers*. *Eur J Cancer* 1978. **14**: p. 205-206.
11. Zegar, I., Graslund, A., Bergman, J., Eriksson, M. and Norden, B., *Interaction of ellipticine and an indolo[2,3b]-quinoxaline derivative with DNA and synthetic polynucleotides*. *Chem Biol Interact*, 1989. **72**(3): p. 277-293.
12. Shibinskaya, M.O., Lyakhov, S. A., Mazepa, A. V., Andronati, S. A., Turov, A. V., Zholobak, N. M. and Spivak, N. Y., *Synthesis, cytotoxicity, antiviral activity and interferon inducing ability of 6-(2-aminoethyl)-6H-indolo[2,3-b]quinoxalines*. *Eur J Med Chem*, 2010. **45**(3): p. 1237-1243.
13. Zanzoul, A., Chollet, A., Stigliani, J. L., Bernardes-Génisson, V., Essassi, E. M., Pratviel, G., *6-(Diethylaminoethyl)indoloquinoxaline as inhibitor of InhA enzyme of Mycobacterium tuberculosis*. soumis, 2014.
14. Zanzoul, A., Ramli, Y., Essassi, M. & Pratviel, G., *A benzimidazopyridoquinoxaline as promising scaffold for G-quadruplex DNA targeting*. *Med Chem Res*, 2014. **23**: p.4042-4049.





*Chapitre IV*  
*Synthèse et caractérisation des*  
*molécules de la famille*  
*triazoloquinoxaline*



## I. Introduction

Une méthode a été décrite pour la synthèse d'un composé polycyclique de la famille triazoloquinoxaline par Mustaphi *et al.*[1]. Il s'agit d'une condensation de la quinoxalin-2,3-dithione **1** avec le benzoylhydrazide **2** dans le DMF à reflux pendant 24h. Cette réaction conduit à la formation de trois produits (Schéma 1).

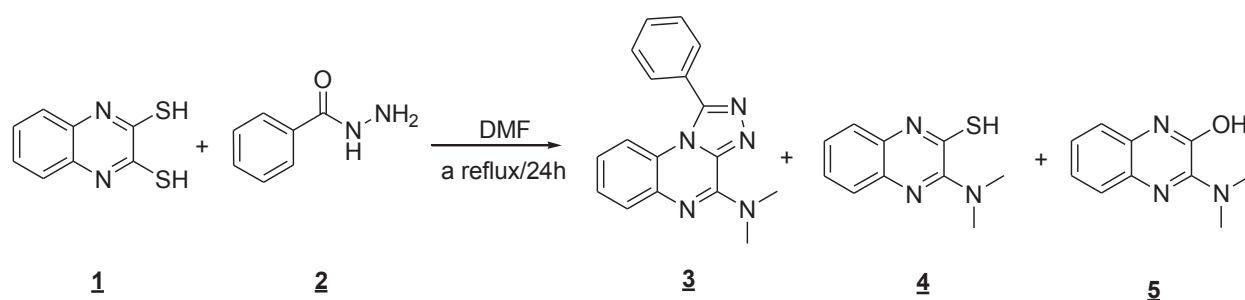
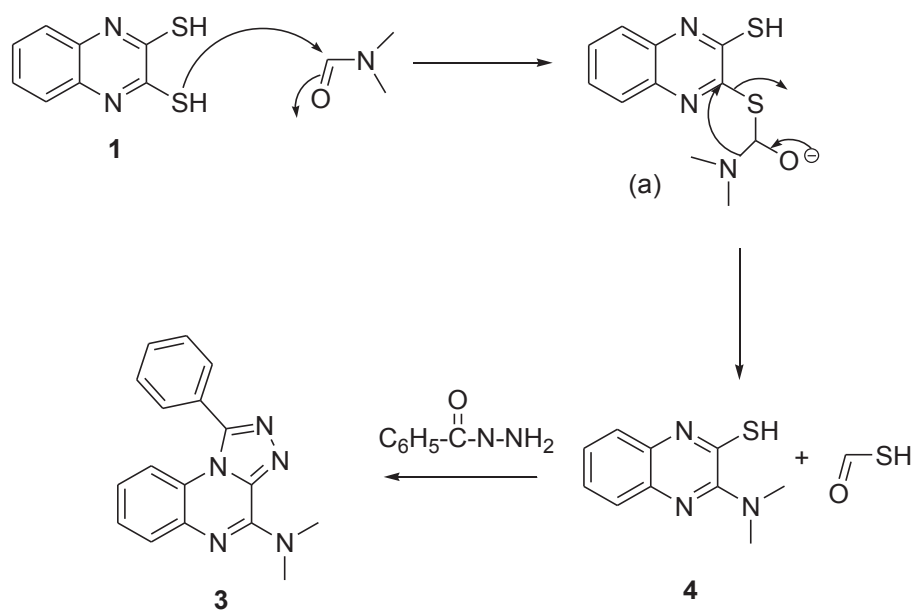


Schéma 1 : synthèse du produit **3** dérivé du triazoloquinoxalin[1].

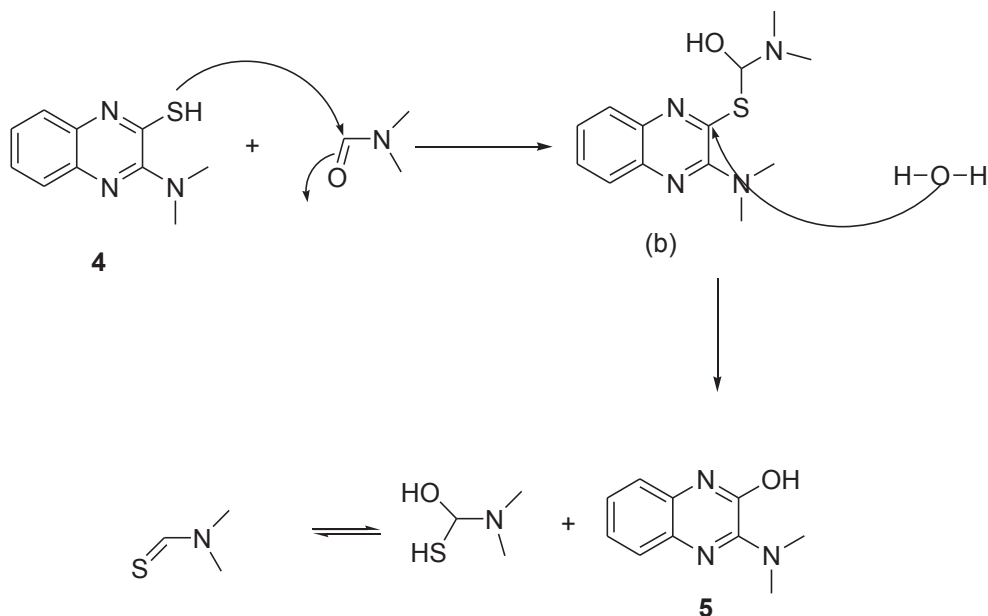
La formation des composés **3**, **4** et **5** peut être expliquée selon les mécanismes suivants :

Le groupe mercapto de la quinoxalin-2,3-dithione **1** attaque le carbonyle du DMF pour conduire à un intermédiaire (a) qui subit un réarrangement, induisant la formation du composé **4**. Ce dernier subit l'attaque du benzoylhydrazide pour donner le composé **3** (Schéma 2).



**Schéma 2** : mécanisme réactionnel pour obtenir le produit **3**

Le composé **5** pourrait provenir de l'hydrolyse de l'iminothioether (b) obtenu par action du DMF sur le composé **4** (Schéma 3).

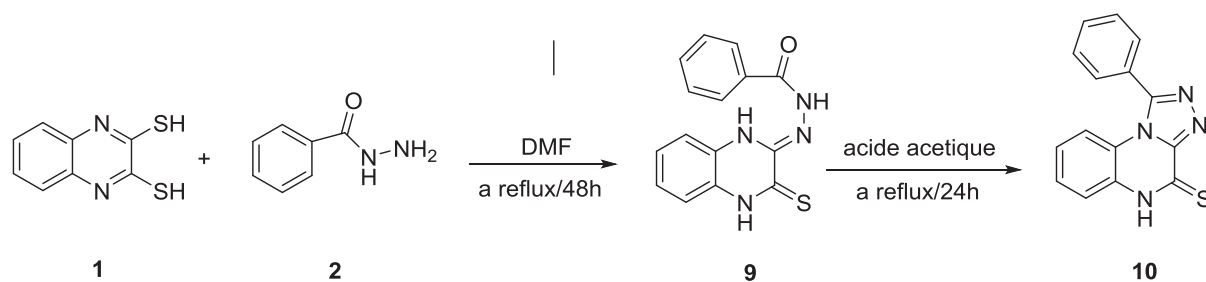


**Schéma 3** : mécanisme réactionnel pour obtenir le produit **5**

Dans ce travail, a été reproduite la synthèse décrite par Mustaphi *et al.* pour obtenir le produit polycyclique **3** à partir de la quinoxalin-2,3-dithione (Schéma 3).

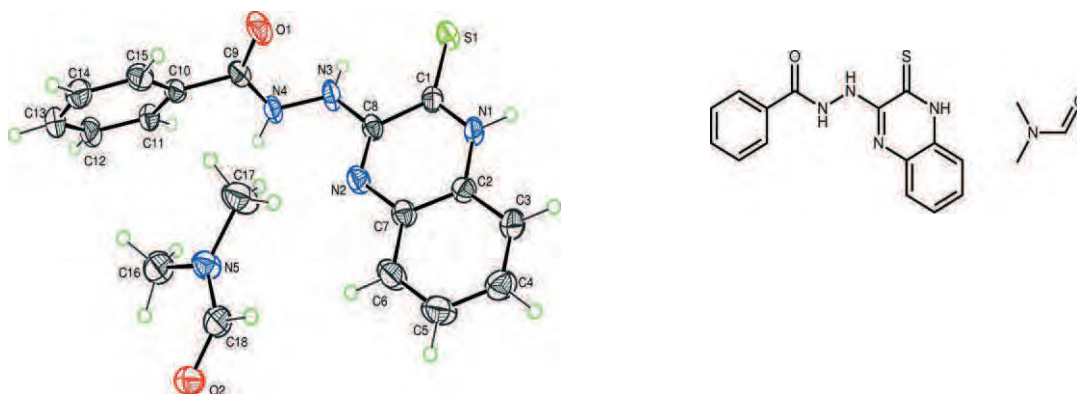
## II. Synthèse du noyau polycyclique dérivé du triazoloquinoxaline

Cette réaction de condensation était auparavant réalisée avec 1 équivalent de quinoxalin-2,3-dithione **1** et 2 équivalent de benzoylhydrazide **2** dans du DMF à reflux pendant 24h ; cependant, dans ces conditions expérimentales, nous avons obtenu un produit non cyclisé **9** sous forme de cristaux avec un rendement de 46% que nous avons cyclisé dans l'acide acétique à reflux pendant 24h pour obtenir un produit **10** avec un rendement de 98% proche du produit **3** mais sans groupement diméthylamine (Schéma 4)[2].



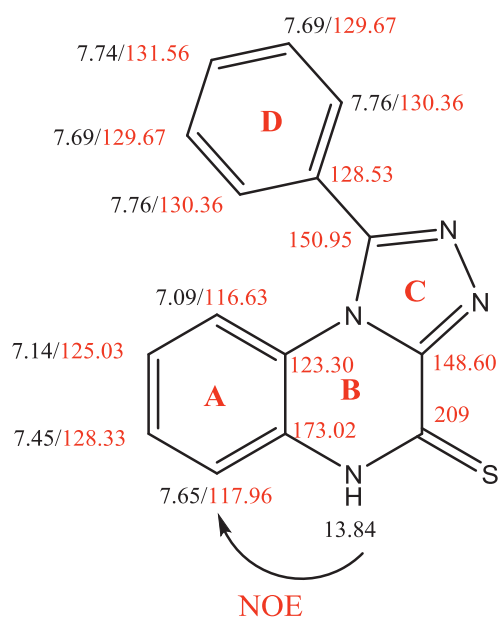
**Schéma 4** : synthèse du produit **10** dérivé du triazoloquinoxaline[2].

La structure du produit **9** a été identifiée sur la base des données spectrales RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (Annexe C. spectre 1 et 2). Une analyse cristallographique par diffraction aux rayons X a permis de confirmer la structure de ce composé (Figure 1).



**Figure 1** : caractérisation du produit **9** par diffraction aux rayons X[2].

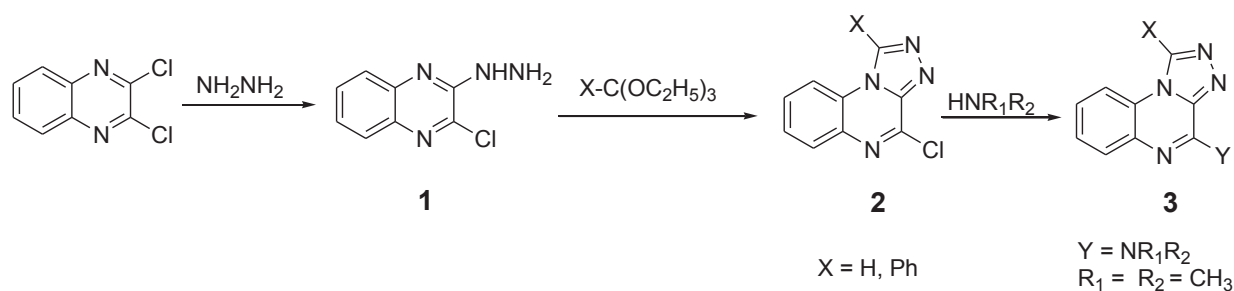
L'analyse du spectre de RMN  $^1\text{H}$  du produit **10** montre la présence de deux familles, **A** avec quatre protons aromatiques et **D** avec cinq protons aromatiques (Figure 2) et un signal sous forme d'un singulet qui intègre pour un proton du groupement **NH** (Annexe C, spectre 3). Le spectre de masse donne un  $m/z = 279$  (100%)[ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ .



**Figure 2:** caractérisation du produit **10** par RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC, HMQC, Cosy et NOE 2D.

Nous avons porté à ébullition le produit **10** dans du DMF pendant 24 h pour obtenir le produit **3** avec un rendement de 10-20%.

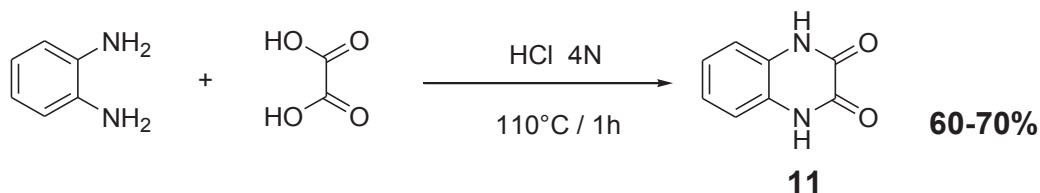
Pour reproduire la synthèse du produit polycyclique **3** décrite par Mustaphi *et al.* et augmenter son rendement Nous nous sommes tournés vers une autre voie de synthèse qui a été décrite par Reinhard *et al.*[3] à partir du 2,3-dichloroquinoxaline (Schéma 5).



**Schéma 5 :** synthèse du produit **3**[3].

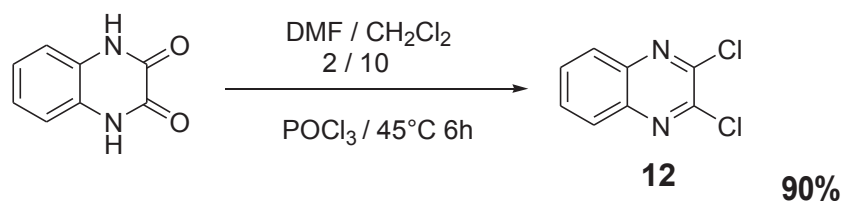
Nous avons reproduit la synthèse du produit **3** en cinq étapes :

La première étape consiste au synthèse de la quinoxalin-2,3-dione **11** à partir d'une condensation de l'*o*-phénylènediamine avec l'acide oxalique dans HCl 4N (Schéma 6).



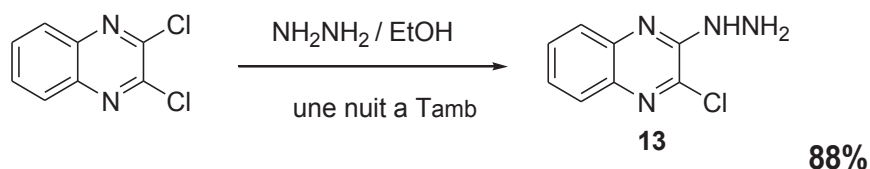
**Schéma 6:** synthèse du produit **11**

La deuxième étape c'est la synthèse du produit **12** le 2,3-dichloroquinoxaline par chloration du produit **11** (Schéma 7).



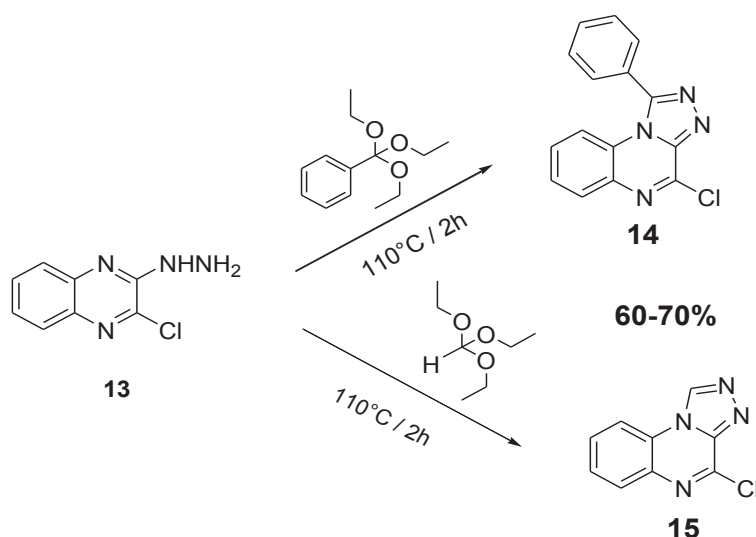
**Schéma 7:** synthèse du produit **12**

La réaction entre le produit **12** et l'hydrazine dans l'éthanol nous a permis d'obtenir dans la troisième étape le 3-hydrazinoquinoxaline, produit **13** (Schema 8).



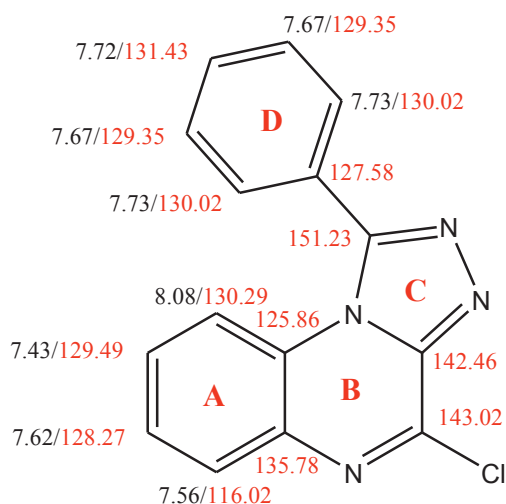
**Schéma 8:** synthèse du produit **13**

La quatrième étape c'est une condensation du produit **13** avec la triéthyl orthobenzoate pour obtenir le 4-phényl[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxaline, produit **14** ou avec la triéthyl orthoformate pour obtenir le 4-Chloro[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxaline, produit **15** (Schéma 9



**Schéma 9:** synthèse du produit **14** et **15**

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit **14** (Annexe C, spectre 4) montre la présence de deux familles, **A** avec quatre protons aromatiques et **D** avec cinq protons aromatiques (Figure 3). Le spectre de masse donne un  $m/z = 281,05$  (100%)[ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ .

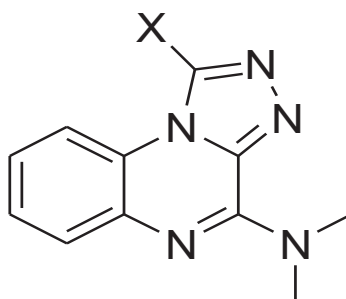


**Figure 3:** caractérisation du produit **14** par RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC, HMQC, Cosy et NOE 2D.

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit **15** (Annexe C, spectre 5) montre la présence d'une seule famille **A** des protons aromatiques et un signal sous forme d'un singulet à 10,22 ppm et qui intègre pour un proton. Le spectre de masse donne un  $m/z = 204,9$  (100%)[ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ .



La dernière étape qui consiste à faire réagir le produit **14** (ou **15**) avec le diméthylamine dans DMF pour obtenir le produit **3** (Figure 4) synthétisé par Mustaphi *et al.*[1] et Reinhard *et al.*[3], nous n'avons pas pu la réaliser faute de temps.



X = H, Ph

Figure 4: Structure du produit **3**

### III. Conclusion

La voie de synthèse décrite par Reinhard *et al.*[3] reste pour l'instant la plus reproductible pour synthétiser des dérivés de triazoloquinoxaline à partir du 2,3-dichloroquinoxaline.

La quaternarisation de cette famille des produits n'a pas été réalisée faute de temps.

### IV. Références bibliographiques :

1. Mustaphie, N.E.H., Ferfra, S., Essassi, E. M., Garrigues, B., Pierrot, M. , *condensation de la quinoxaline-2,3-dithione avec le benzoylhydrazide dans le DMF*. Phosphorus, Sulfur, and Silicon, 2004. **179**: p. 2265-2271.
2. Zanzoul, A., Essassi, E. M., Pratiel, G., Saadi, M., El Ammari, L., *N'-(3-Sulfanyl-idene-3,4-dihydro-quinoxalin-2-yl)benzohydrazide di-methyl-formamide monosolvate*. Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online, 2013. **69**(Pt 8): p. o1268.
3. Reinhard, S., Howard, H. R., Browne, R. G., Lebel, L. A., Seymour, P. A., Kenneth Koe, B., *4-Amino[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalines. A Novel Class of Potent Adenosine Receptor Antagonists and Potential Rapid-Onset Antidepressants*. J Med Chem, 1990. **33**: p. 2240-2254.



*Chapitre V*  
*Tests biologiques*



Dans cette partie, l'étude de l'interaction des ligands à base de quinoxaline que nous avons synthétisés avec les structures G-quadruplex de l'ADN télomérique par la méthode de FRET, ainsi des tests d'inhibition de l'enzyme InhA de *Mycobacterium tuberculosis* ont été menés.

## I. Etude de l'interaction des ligands avec les G-quadruplex de l'ADN télomérique par la méthode de FRET

Les résultats des expériences de FRET effectuées pour évaluer la capacité de liaison à l'ADN G-quadruplex des composés synthétisés sont rapportés dans l'article 1: "A benzimidazopyridoquinoxaline as promising scaffold for G-quadruplex DNA targeting". (2014)

### Résumé:

Comme détaillé dans le chapitre I, le test de FRET permet d'évaluer la capacité de stabilisation d'un ADN G-quadruplex d'un ligand donné et la sélectivité de ce ligand pour l'ADN G-quadruplex par rapport à un ADN compétiteur de type ADN double-brin ou autre. Ce test permet notamment d'établir un classement des ligands en fonction de leurs affinités et sélectivités relatives pour l'ADN G-quadruplex.

La porphyrine Ni-TMPyP4 a été incluse dans les essais comme ligand G-quadruplex standard. Ni-TMPyP4 (1  $\mu\text{M}$ ) stabilise l'ADN G-quadruplex F21T (0,2  $\mu\text{M}$ ) avec un  $\Delta T_{1/2}$  de 20 °C. Cette molécule a la même capacité de stabilisation que la molécule TMPyP4, un ligand G-quadruplex commun, dont la constante d'affinité pour l'ADN G-quadruplex télomérique est connue  $K_a = 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Le composé (2)/(4'') montre un  $\Delta T_{1/2}$  de 3,6 ; 9,3 et 13,5 °C aux concentrations respectives de 1, 5 et 10  $\mu\text{M}$  (Article 1, Fig. 1). Dans le présent travail, le rapport ligand/ADN F21T était de 5, 25, et 50 mol. equiv. Ces résultats ont montré que le composé (2)/(4'') peut être considéré comme un ligand modeste de l'ADN G-quadruplex par rapport aux porphyrines cationiques telles que TMPyP4 et Ni-TMPyP4. Le composé (2)/(4'') a également été comparé avec un agent intercalant de l'ADN, un dérivé d'ellipticine, l'acétate de 9-hydroxy-N-méthyllellipticine (9-OH-NMe-E), et avec deux autres produits cationiques aromatiques dérivés d'indoloquinoxaline (3)/(6<sub>4</sub>) et (4)/(8<sub>4</sub>) (Article 1, schéma 2). Le dérivé 9-OH-NMe-E est un médicament anti-tumoral. Jusqu'à présent, sa capacité de

liaison de l'ADN G-quadruplex n'avait pas été testée. Le composé (3)/(6<sub>4</sub>) a également été décrit dans la bibliographie comme possédant une activité antitumorale. La capacité de stabilisation de l'ADN G-quadruplex de la 9-OH-NMe-E s'avère similaire à celle du produit pentacyclique quaternarisé (2)/(4'').

Il est intéressant de noter que le composé (2)/(4'') s'est montré capable de se lier spécifiquement sur l'ADN G-quadruplex en présence d'un excès de compétiteur d'ADN double-brin ds26 (les concentrations de 2 et 10 μM de compétiteur correspondent respectivement à 10 et 50 mol. equiv) (Article 1, Fig. 2). A l'opposé, la 9-OH-NMe-E n'a pas conservé la capacité de stabilisation des G-quadruplexes lorsque la concentration du double brin d'ADN compétiteur a été augmentée (Article 1, Fig. 2).

Les composés (3)/(6<sub>4</sub>) et (4)/(8<sub>4</sub>) ont été les moins efficaces en tant que ligands d'ADN G-quadruplex. Le composé (3)/(6<sub>4</sub>) s'est avéré totalement incapable de stabiliser le F21T G-quadruplex tandis que le composé 4 a montré une faible  $\Delta T_{1/2}$  de 2, 3 et 5 °C aux concentrations respectives de 1, 5, et 10 μM. On peut remarquer ici que l'introduction de deux charges positives sur la molécule (3)/(6<sub>4</sub>) a amélioré l'affinité du composé pour l'ADN G-quadruplex. Toutefois, ces charges positives ne sont probablement pas bien situées pour une optimisation significative de l'interaction ionique avec l'ADN. L'emplacement des charges positives par rapport au noyau aromatique a déjà été démontré dans la bibliographie comme étant d'une grande importance pour le réglage de l'interaction avec l'ADN G-quadruplex dans d'autres séries de ligands G-quadruplex.

### **Conclusion:**

Le composé pentacyclique cationique (2)/(4''), en forme de croissant, dérivé de benzimidazopyridoquinoxaline, se lie à l'ADN G-quadruplex avec une affinité modeste, mais ne se lie pas à l'ADN double brin. Les propriétés de liaison de ce composé à l'égard de l'ADN de G-quadruplex sont meilleures que celles présentées par d'autres molécules aromatiques cationiques telles que les dérivés de l'ellipticine ou d'indoloquinoxaline. En conséquence, il est considéré comme une piste prometteuse pour l'optimisation de propriétés de reconnaissance sélective de l'ADN de G-quadruplex.

# A benzimidazopyridoquinoxaline as promising scaffold for G-quadruplex DNA targeting

Asmae Zanzoul · Youssef Ramli · El Mokhtar Essassi · Geneviève Pratiel

Received: 5 December 2013 / Accepted: 27 February 2014 / Published online: 13 March 2014  
© Springer Science+Business Media New York 2014

**Abstract** In the search for new molecular scaffolds for G-quadruplex DNA targeting, we prepared a pentacyclic, crescent-shaped, benzimidazopyridoquinoxaline derivative, which proved to bind to G-quadruplex DNA with a modest affinity but did not bind to double-stranded DNA. The binding properties of this compound toward G-quadruplex DNA were better than those exhibited by other aromatic molecules such as ellipticine or indoloquinoxaline derivatives. Consequently, it is considered as a promising lead for optimization of selective G-quadruplex DNA recognition properties.

**Keywords** Heterocyclic G4-ligand · FRET-melting · Quinoxaline · Anticancer

## Introduction

Guanine-rich DNA sequences are able to fold into four-stranded structures composed of stacked arrays of guanine quartets. Each guanine quartet consists of a square planar arrangement of four guanine bases connected by Hoogsteen-type hydrogen bonds (Collie and Parkinson 2011). These alternative higher-order DNA structures play a role in fundamental processes of life and were in particular shown to be connected with cancer. Indeed, DNA sequences able to adopt G-quadruplex structures are formed in the single-stranded overhang region of telomeres. They are also present in a number of oncogene promoters (c-myc, c-kit, bcl2, k-ras, VEGF...) (Qin and Hurley 2008; Balasubramanian *et al.*, 2011). Thus, small molecules that behave as G-quadruplex ligands (Monchard and Teulade-Fichou 2008; Ou *et al.*, 2008; Balasubramanian and Neidle 2009; Granzhan *et al.*, 2010; Monchard *et al.*, 2010; Georgiades *et al.*, 2010; Haider *et al.*, 2011; Xu 2011) and interfere with their biological function are considered as potential new antitumoral drugs (Neidle 2010; Miller and Rodriguez 2011). Some of them actually exhibited antitumoral activity (Burger *et al.*, 2005; Tauchi *et al.*, 2006; Grand *et al.*, 2002; Leonetti *et al.*, 2008). Up to now, only one so-called G-quadruplex ligand is under clinic (Drygin *et al.*, 2009). G-quadruplex ligands may also be useful as G-quadruplex luminescent probe molecules (Largy *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2013).

Most of the ligands for G-quadruplex DNA contain a planar aromatic scaffold that undergoes  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction with an external guanine quartet of quadruplex DNA. In the present paper, we investigated a new crescent shape aromatic scaffold for G-quadruplex DNA binding. Furthermore, we introduced a positive charge directly on the aromatic core by quaternarization of a cyclic nitrogen

---

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00044-014-0985-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

---

A. Zanzoul · G. Pratiel (✉)  
Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS, UPR 8241, 205  
route de Narbonne, BP 44099, 31077 Toulouse Cedex 4, France  
e-mail: genevieve.pratiel@lcc-toulouse.fr

A. Zanzoul · G. Pratiel  
Université de Toulouse, UPS, INPT, LCC, 31077 Toulouse,  
France

A. Zanzoul · Y. Ramli · E. M. Essassi  
Laboratoire de Chimie Organique Hétérocyclique, pôle de  
compétences pharmacochimie, Faculté des Sciences, Université  
Mohammed V-Agdal, Avenue Ibn Battouta, BP 1014, Rabat,  
Morocco

atom to improve water solubility and DNA affinity. Few examples of such aromatic nitrogen quaternarized G-quadruplex ligands can be found in the literature, bis-quinoline derivative 360A (Pennarum *et al.*, 2005), ethidium bromide derivatives (Koepfel *et al.*, 2001), pentacyclic acridine derivatives such as RHPS4 (Gavathiotis *et al.*, 2003; Gowan *et al.*, 2001), berberin derivatives (Bessi *et al.*, 2012; Bazzicalupi *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2011).

The cationic benzimidazopyridoquinoxaline compound prepared in the present work showed moderate affinity for G-quadruplex DNA but high selectivity with respect to double-stranded DNA. Consequently, it can be considered as a promising scaffold for G-quadruplex DNA targeting.

## Experimental section

The following compounds were commercially available, *o*-phenylenediamine, serine, methyl trifluoromethanesulfonate, dimethyl sulfate, DOWEX 1 × 8 chloride form resin (Sigma-Aldrich), sodium carbonate anhydrous (Acros), and oligonucleotides (Eurogentec). The anticancer drug, 9-hydroxy-*N*-methyllellipticine acetate was a gift of Sanofi, France. Silica gel refers to Fluka 60 silica (ref. 60741), and alumina refers to Merck aluminum oxide 90 active neutral alumina (ref. 101077). TLC analysis was performed with Merck 60 F254 silica or 150 F254 aluminum oxide neutral pre-coated aluminum plates. NMR spectra were recorded on Bruker Avance-400 and/or Avance-500 spectrometers with the residual solvent peak as internal calibration. Mass spectra (electrospray) were recorded on a Perkin–Elmer SCIEX API 365 or an Applied Biosystems QTRAP. UV–visible spectra were recorded with a Hewlett Packard 8452A spectrophotometer and fluorescence spectra with a Safas FLX-Xenius fluorimeter.

**Synthesis of 1** A mixture of *o*-phenylenediamine (3.0 g, 0.027 mol) and serine (10.2 g, 0.097 mol) was kept under reflux in 40 mL of hydrochloric acid (5.5 N) for 3 days. After neutralization with saturated sodium carbonate solution, the precipitate was filtered, dried under reduced pressure, and chromatographed on a column of neutral alumina with 100 % dichloromethane as eluent. The first eluted fraction was evaporated under reduced pressure, and the product was precipitated from dichloromethane/hexane 1:10. Yield: yellow cotton-like powder 4 % (150 mg).  $R_f = 0.76$  (aluminum oxide neutral plate, 100 % dichloromethane).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 9.28 (d, 1H,  $J = 8$  Hz, H7), 8.31 (d, 1H,  $J = 8$  Hz, H4), 8.25 (d, 1H,  $J = 8$  Hz, H1), 8.09 (d, 1H,  $J = 8$  Hz, H10), 7.92 (t, 1H,  $J = 8$  Hz, H3), 7.85 (t, 1H,  $J = 8$  Hz, H2), 7.77 (s, 1H, H13), 7.64 (t, 1H,  $J = 8$  Hz, H8), 7.60 (t, 1H,  $J = 8$  Hz, H9), 2.84 (s, 3H, H12).  $^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,

$\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 148.50 (C11a), 144.17 (C10a), 141.32 (C5a), 140.84 (C4a), 139.91 (C14a), 138.74 (C13a), 135.06 (C12), 130.94 (C6a), 130.88 (C3), 129.22 (C1), 129.15 (C2), 128.72 (C13), 128.35 (C4), 125.32 (C9), 124.88 (C8), 120.63 (C10), 116.69 (C7), 18.11 (C12a). HRMS (+ESI) for  $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4$  ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ) calcd: 285.1140, found: 285.1138. UV/vis ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )  $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) 255 ( $25 \pm 1 \times 10^3$ ), 401 ( $12.3 \pm 1 \times 10^3$ ). Fluorescence ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )  $\lambda_{\text{ex}} = 390$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 490$  nm.

**Synthesis of 2'** Methyl trifluoromethanesulfonate (25  $\mu\text{L}$ , 0.211 mmol) was added to a solution of **1** (40 mg, 0.141 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) preably cooled to  $-78$  °C. The solution was then warmed to room temperature and stirred for 12 h. After solvent evaporation under reduced pressure, the dry residue was washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) affording product **2'**. Yield: red powder 60 % (38 mg).  $R_f = 0.5$  (silica plate,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{KNO}_3$  sat 8:1:1). MS (+ESI) 299.1 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ).

Product **2'** (38 mg) was dissolved in 10 mL of methanol and deposited on a 10 g column of chloride-loaded DOWEX 1 × 8–200 (ion exchange resin). The solution of green product was collected and evaporated to dryness. Product **2** was dissolved in 5 mL of methanol and precipitated with diethyl ether (50 mL). After centrifugation, the pellet was dried under vacuum. The absence of  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$  counter ion was checked by mass analysis (negative ESI). Yield: green powder 86 % (24.5 mg).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 9.82–9.80 (m, 1H, H7), 8.57–8.55 (m, 2H, H13, H4), 8.43 (d, 1H,  $J = 8$  Hz, H1), 8.27–8.30 (m, 1H, H10), 8.20 (t, 1H,  $J = 8$  Hz, H3), 8.13 (t, 1H,  $J = 8$  Hz, H2), 8.04–8.02 (m, 2H, H8, H9), 4.68 (s, 3H, N– $\text{CH}_3$ ), 3.21 (s, 3H, C– $\text{CH}_3$ ). HRMS (+ESI) for  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_4$  ( $[\text{M}^+]$ ) calcd: 299.1297, found: 299.1289. UV/vis ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon$   $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) 256 ( $29 \pm 1 \times 10^3$ ), 397 ( $20 \pm 1 \times 10^3$ ).

**Synthesis of 2''** Quaternarization of **1** was also possible using MeI to afford **2''**. MeI (3 mL, 0.021 mol) was added to a solution of **1** (40 mg, 0.141 mmol) in dimethylformamide (10 mL). The reaction was maintained at 80 °C for 2 days and led to pentacyclic compound with iodide counter ion. The volume of solvent was reduced to 1 mL under reduced pressure, and acetone was added (100 mL). The product precipitated overnight at 4 °C. It was filtered, washed with acetone (3 × 10 mL), and dried under vacuum. Yield: red powder 56 % (34 mg).  $R_f = 0.5$  (silica plate,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{KNO}_3$  sat 8:1:1).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMF}-d_7$ )  $\delta$  (ppm) 9.88 (m, 1H, H7), 8.79 (s, 1H, H13), 8.71 (d, 1H,  $J = 8$  Hz, H4), 8.57 (m, 1H, H10), 8.51 (d, 1H,  $J = 8$  Hz, H1), 8.32 (t, 1H,  $J = 8$  Hz, H3), 8.24 (t, 1H,  $J = 8$  Hz, H2), 8.12–8.09 (m, 2H, H8, H9), 4.89 (s, 3H, N– $\text{CH}_3$ ), 3.36 (s, 3H, C– $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{DMF}-d_7$ )  $\delta$  (ppm) 144.62 (C11a), 142.89 (C14a), 140.83 (C4a),



139.70 (C5a), 138.58 (C13), 137.03 (C13a), 134.00 (C10a), 133.73 (C3), 132.07 (C2), 129.82 (C1), 129.00 (C8), 128.91 (C9), 128.88 (C12), 128.37 (C4), 128.33 (C6a), 118.90 (C7), 113.81 (C10), 34.2 (C11), 19.79 (C12a).

**Synthesis of 4** Diethyl-(2-indolo[2,3-b]quinoxalin-6-yl-ethyl)-amine (**3**) (100 mg, 0.31 mmol) was added to 2 mL of anhydrous dimethyl sulfate, and the mixture was refluxed for 2 h. After cooling, the reaction medium was diluted with diethyl ether (50 mL). The precipitate was filtered off, washed with diethyl ether, and dried. The product was dissolved in distilled water (10 mL) and washed with chloroform (50 mL). The aqueous phase was reduced to 2 mL under reduced pressure before counter ion exchange performed on a chloride-loaded Dowex 1 × 8–200 ion exchange resin column (10 g). The resulting aqueous solution was lyophilized. Yield: red powder 90 % (118 mg). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm) 8.73 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 8.61–8.59 (m, 1H), 8.50–8.48 (m, 1H), 8.17–8.14 (m, 2H), 8.13–8.09 (m, 1H), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 7.67 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz), 5.15 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 5.09 (s, 3H), 3.86 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 3.59 (q, 4H, *J* = 7.2 Hz), 3.20 (s, 3H), 1.40 (t, 6H, *J* = 7.2 Hz). <sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm) 146.8, 146.5, 140.9, 137.3, 132.1, 131.8, 131.7, 129.5, 128.8, 127.9, 123.8, 117.5, 112.7, 111.2, 57.4 (2C), 56.0, 47.4, 40.2, 35.3, 7.2 (2C). *R*<sub>f</sub> = 0.6 (silica plate, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/KNO<sub>3</sub>sat 8:1:1). MS (+ESI) 174.1 ([M/2]<sup>2+</sup>). UV/vis (CH<sub>3</sub>OH) λ<sub>max</sub> nm (ε M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) 274 (31 ± 1 10<sup>3</sup>), 394 (23 ± 1 10<sup>3</sup>). Fluorescence (CH<sub>3</sub>OH) λ<sub>ex</sub> = 375 nm, λ<sub>em</sub> = 465 nm.

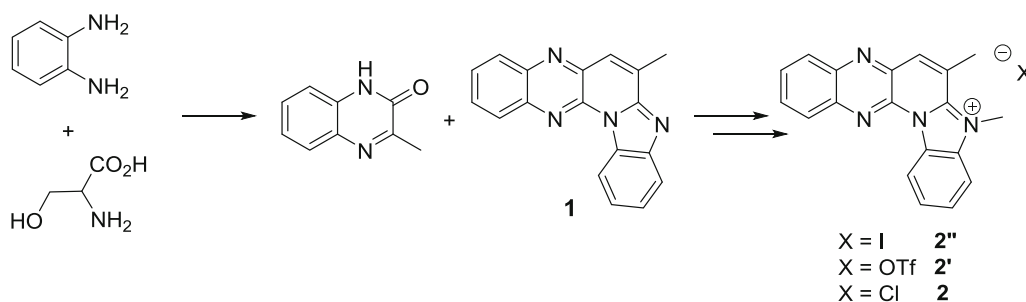
**FRET melting assay** The compounds were prepared as 0.2 mM stock solutions in MeOH (**3**, **4**) or H<sub>2</sub>O (Ni-TMPyP, 9-OH-NMe-E, **2**). Further dilutions were performed with H<sub>2</sub>O. Fluorescence melting curves were determined (ABIP 7000 realtime PCR machine) with F21T oligonucleotide (5'-FAM-G<sub>3</sub>(TTAGGG)<sub>3</sub>-TAMRA-3') (0.2 μM) (where FAM is the donor fluorophore 6-carboxyfluorescein, and TAMRA is the acceptor 6-carboxytetramethylrhodamine) in 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2, 10 mM KCl, and 90 mM LiCl. The melting of the G-quadruplex was monitored by measuring the fluorescence of FAM (520 nm) in 25 μL reaction samples.

After a first equilibration step at 23 °C during 8 min, a stepwise increase of 1 °C every minute for 71 cycles to reach 95 °C was performed, and measurements were made after each cycle. Thermal denaturation of F21T was performed in the presence of various concentrations of drug (1, 5, and 10 μM) as well as in the presence of drug (5 or 10 μM) and DNA competitors to test the binding selectivity of the drug to the quadruplex structure: double-stranded DNA (26-mer oligonucleotide ds26: 5'-CAA TCG GAT CGA ATT CGA TCC GAT TG-3'). Competitor DNA concentration was 0, 2, and 10 μM. Emission of FAM was normalized, and T<sub>1/2</sub> was defined as the temperature for which the normalized emission is 0.5. T<sub>1/2</sub> and δT<sub>1/2</sub> are the mean of at least 3 values.

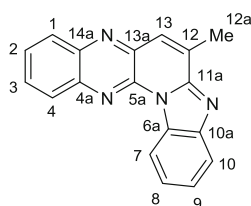
## Results and discussion

Pentacyclic compound benzimidazopyridoquinoxaline **1** was a minor product of the reaction between *o*-phenylene diamine and serine carried out in aqueous acid, under reflux for 3 days (Scheme 1) (Zniber *et al.*, 2000). Compound **1** exhibited a particularly bright green fluorescence due to light emission between 450 and 600 nm with a maximum at λ<sub>maxem</sub> = 490 nm upon excitation at 390 nm, which was the λ<sub>maxex</sub> (excitation and emission fluorescence spectra were recorded in methanol).

Compound **1** was characterized by mass analysis and 2D NMR experiments. Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR characterization was achieved through the analysis of coupling patterns and 2D NMR (<sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HMBC, <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H ROESY) experiments. Table 1 shows the NMR data of **1**. From COSY experiment, two series of proton signals belonging to the two different aromatic cycles could be identified. One series included the <sup>1</sup>H-NMR resonances at 8.31, 8.25, 7.92, and 7.85 that were attributed to H4, H1, H3, and H2, respectively. The other series included NMR resonances at 9.28, 8.09, 7.64, and 7.60 that were attributed to H7, H10, H8, and H9, respectively. Discrimination between the two sets of

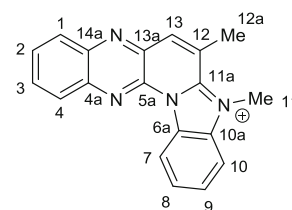


**Scheme 1** Synthesis of cationic benzimidazopyridoquinoxaline. I, OTf, and Cl refer to iodide, triflate, and chloride counterion, respectively

**Table 1**  $^1\text{H}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR data of **1** in  $\text{CDCl}_3$ 

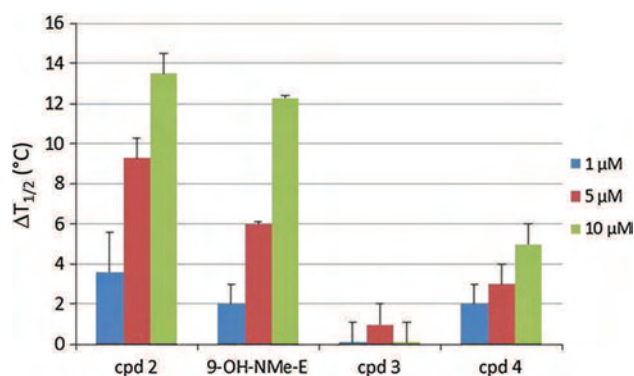
Position	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicity, $^3J_{\text{H,H}}$ (Hz)	HMBC $^3J_{\text{C,H}}$	ROESY
1	129.22	8.25	d, 8	H1/C3 H1/C4a	
2	129.15	7.85	t, 8	H2/C4 H2/C14a	
3	130.88	7.92	t, 8	H3/C1 H3/C4a	
4	128.35	8.31	d, 8	H4/C14a H4/C2	
4a	140.84				
5a	141.32				
6a	130.94				
7	116.69	9.28	d, 8	H7/C9 H7/C10a	
8	124.88	7.64	t, 8	H8/C10 H8/C6a	
9	125.32	7.60	t, 8	H9/C7 H9/C10a	
10	120.63	8.09	d, 8	H10/C8 H10/C6a	
10a	144.17				
11a	148.50				
12	135.06				
12a	18.11	2.84		H(Me12a)/ C13 H(Me12a)/ C11a H(Me12a)/ C12 ( $^2J_{\text{CH}}$ ) H(Me12a)/ C13a ( $^4J_{\text{CH}}$ )	H(Me12a)/ H13
13	128.72	7.77		H13/C11a H13/C5a	H13/ H(Me12a)
13a	138.74				
14a	139.91				

signals was not directly possible from NMR data of compound **1** but proved to be possible after methylation. Thus, attribution of NMR signals of **1** was deduced from the attributions of **2** (see below).

**Table 2**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR data of **2** (**2''** with iodide counter ion) in  $\text{DMF-}d_7$ 

Position	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicity $^3J_{\text{H,H}}$ (Hz)	HMBC $^3$ $J_{\text{C,H}}$	ROESY
1	129.82	8.51	d, 8	H1/C3 H1/C4a	
2	132.07	8.24	t, 8	H2/C4 H2/C14a	
3	133.73	8.32	t, 8	H3/C1 H3/C4a	
4	128.37	8.71	d, 8	H4/C2 H4/C14a	H4/H7
4a	140.83				
5a	139.70				
6a	128.33				
7	118.90	9.88	m	H7/C9 H7/C10a	H7/H4
8	129.00	8.10	m	H8/C10	
9	128.91	8.11	m	H9/C7	
10	113.81	8.57	m	H10/C8 H10/C6a	H10/ H(Me11)
10a	134.00				
11a	144.62				
12	128.88				
13	138.58	8.79	s	H13/C5a H13/C11a H13/C12a	H13/H12
13a	137.03				H13/ H(Me12a)
14a	142.89				
12a	19.79	3.36	s	H12/C12 ( $^2J_{\text{CH}}$ ) H12/C13 H12/C11a	H12 /H13 H12/ H(Me11)
11	34.2	4.89	s	H(Me11)/ C10a H(Me11)/ C11a	H(Me11)/ H(Me12a) H(Me11)/ H10

Quaternarization of **1** was carried out in the presence of MeI (150 mol. equiv. in dimethylformamide) and/or methyl trifluoromethanesulfonate (2 mol. equiv. in dichloromethane). Methyl trifluoromethanesulfonate was more efficient.



**Fig. 1** FRET melting results for **2**, **3**, **4**, and 9-OH-NMe-E. Stabilization of F21T (0.2 μM) was measured at 1 (blue), 5 (red), and 10 μM (green) concentrations in 10 mM lithium cacodylate buffer (pH 7.2) with 10 mM KCl and 90 mM LiCl (Color figure online)

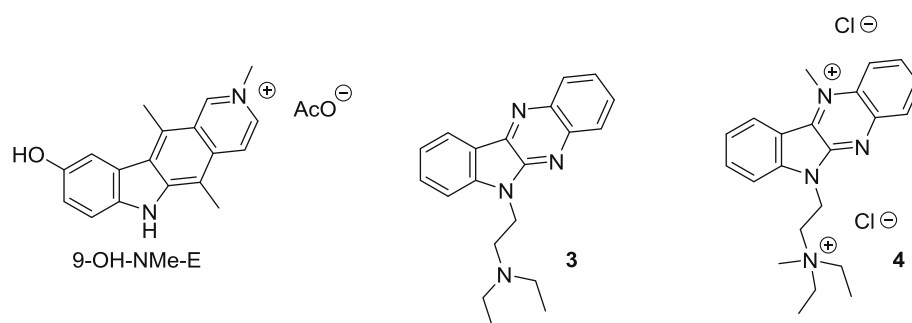
Quaternarized product was characterized by mass and 2D NMR spectrometry. The assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra was based on the analysis of coupling patterns and 2D NMR ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY) experiments on **2'** (Table 2). As in the case of **1**, two families of proton signals could be attributed to H1–H4 and H7–H10. As in the case of **1**, H13 was the only aromatic proton appearing as a singlet. The HMBC spectrum showed long-range  $^3J$  coupling between H-atom of methyl on nitrogen at position 11 ( $\delta = 4.89$  ppm) and C10a ( $\delta = 134.0$  ppm) on the one hand and between H-atom of methyl on nitrogen at position 11 and C11a ( $\delta = 144.62$  ppm) on the other hand. Significant structural information on *N*-methylated compound was gained from 2D ROESY spectrum, which showed a correlation between the two methyl groups, methyl at N11 and methyl at C12a (NMR resonances at  $\delta = 4.89$  and 3.36 ppm). This unambiguously located the position of quaternarization at N11. If methylation had occurred at N13, such a through-space correlation would not have been possible. Furthermore, a ROESY correlation was observed between the *N*-methyl group ( $\delta = 4.89$  ppm) and H10 ( $\delta = 8.57$  ppm) and between the aromatic protons H4 ( $\delta = 8.71$  ppm) and H7 ( $\delta = 9.88$  ppm). This allowed us to identify the resonance signals of protons H7–H10 and especially that of H7, which

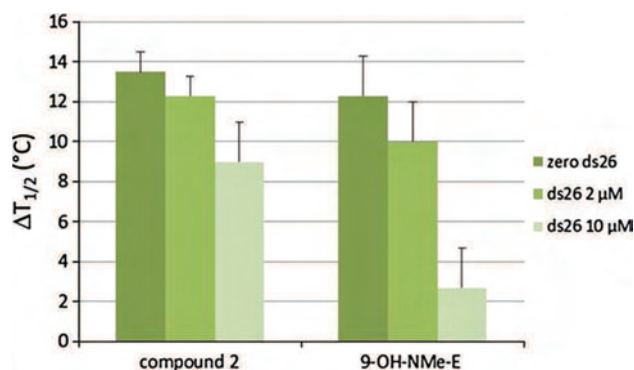
appeared as the most deshielded one. Consequently, the signal corresponding to the aromatic proton observed at significantly lower field was attributed to H7 in the NMR spectrum of **1** as well and thus elucidated attribution. Additionally, 2D ROESY spectrum of **2** showed a correlation between H13 ( $\delta = 8.79$  ppm) and H12 protons ( $\delta = 3.36$  ppm) as was observed for **1** (Table 1).

In view of biological tests, the quaternarized compound was associated to a chloride counter ion (**2**) by incubation of **2'** with a chloride-loaded ion exchange resin. Compound **2** was soluble in water.

Many methods have been designed for the evaluation of the affinity and selectivity of G-quadruplex ligands (Murat *et al.*, 2011; Jaumot and Gargallo 2012). Among them the FRET melting assay developed by Mergny (Mergny and Maurizot 2001; De Cian *et al.*, 2007) is rapid and easy to set-up. It was used in numerous reports for the evaluation of the binding properties of G4-ligands (Monchaud *et al.*, 2008). Thus, it is particularly convenient for comparison purpose. This assay is based on the measurement of the stabilization induced by a ligand to a fluorescently labeled quadruplex-forming oligonucleotide (F21T, 5'-FAM-G<sub>3</sub>(TTAG<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-TAMRA-3'). The denaturation of the G-quadruplex structure upon heating causes the fluorescence emission of FAM. DNA melting is characterized by a half-melting temperature ( $T_{1/2}$ ) at which half of the fluorescence emission is measured. The stabilization effect of a bound G4-ligand induces an increase in the melting temperature of F21T ( $\Delta T_{1/2}$ ). The concentration of F21T G-quadruplex DNA is kept constant (0.2 μM), and the concentration of G4-ligand may vary. Increasing concentration of G4-ligand in the medium induces an increase of  $\Delta T_{1/2}$ . High  $\Delta T_{1/2}$  at low ligand concentration is the typical signature for a strong ligand. When a competitor DNA is added, the G4-ligand may bind to the competitor DNA. The resulting decrease in  $\Delta T_{1/2}$  indicates the displacement of the G4-ligand from F21T to the competitor DNA. In the case of a selective G4-ligand, the  $\Delta T_{1/2}$  is not affected by the presence of any competitor DNA. The competition assay is performed at given G4-ligand, and F21T concentrations and measurements are carried out at increasing

**Scheme 2** Structure of 9-OH-NMe-E and compounds **3** and **4**





**Fig. 2** FRET melting competition results for **2** (10  $\mu$ M) and 9-OH-NMe-E (10  $\mu$ M) carried out with F21T (0.2  $\mu$ M) without (*dark green bars*) or with increasing concentrations (2 and 10  $\mu$ M, i.e., 10 and 50 mol equiv.) of competitor double-stranded DNA (ds26) in 10 mM lithium cacodylate buffer (pH 7.2) with 10 mM KCl, 90 mM LiCl (Color figure online)

concentrations of competitor. Therefore, this assay allows the evaluation of the stabilization capacity of a ligand toward G-quadruplex DNA denaturation and the evaluation of the selectivity of a G4-ligand for G-quadruplex DNA versus a competitor DNA. The assay does not permit the measurement of binding constants ( $K_a$ ). However, it constitutes a good first approximation of relative affinity of ligands for G-quadruplex DNA.

Ni-TMPyP4 porphyrin was included in the tests as a standard G-quadruplex ligand (Romera *et al.*, 2011). It stabilized G-quadruplex F21T DNA (0.2  $\mu$ M) with a  $\Delta T_{1/2}$  of 20 °C at 1  $\mu$ M concentration (not shown). Ni-TMPyP4 has the same stabilization capacity as TMPyP4, a common G-quadruplex ligand (Wheelhouse *et al.*, 1998) with a binding constant  $K_a = 10^6 \text{ M}^{-1}$  (Dixon *et al.*, 2005). Compound **2** exhibited  $\Delta T_{1/2}$  of 3.6, 9.3, and 13.5 °C at 1, 5, and 10  $\mu$ M concentrations, respectively (Fig. 1). The ratio ligand/F21T DNA employed in the present work was 5, 25, and 50 mol. equiv. of ligand. This data showed that **2** could be considered as a modest G-quadruplex DNA ligand when compared to cationic porphyrins such as TMPyP4 and Ni-TMPyP4. Compound **2** was also compared with a DNA intercalating agent in the ellipticine series, 9-hydroxy-*N*-methyllellipticine acetate (9OH-NMe-E) (Khon *et al.*, 1975; Le Pecq *et al.*, 1974; Jain *et al.*, 1979), and with two other cationic aromatic indoloquinoline derivatives **3** and **4** (Scheme 2). The 9-OH-NMe-E derivative is an antitumoral drug, celiptium<sup>®</sup> (Paoletti *et al.*, 1980). Up to now, its G-quadruplex binding capacity has not been assayed. Compound **3** was reported to have some antitumoral activity (Gudkov 2008). The structure of **3** is reminiscent of some G-quadruplex ligands reported in the literature such as indoloquinoline derivative (Ou *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2011). It was prepared as described by Shibinskaya *et al.* (2010) with some modifications. It was

methylated to afford compound **4** in view of better solubility in water and better G-quadruplex affinity due to the increase in the number of positive charges. As shown in Fig. 1, the affinity of 9-OH-NMe-E and **2** for G-quadruplex DNA were similar. Ellipticine derivative exhibited  $\Delta T_{1/2}$  of 2, 6, and 12.3 °C at 1, 5, and 10  $\mu$ M concentrations, respectively. Therefore, as compound **2**, 9-OH-NMe-E, proved to be a modest G-quadruplex binder. However, the binding properties of **2** and 9-OH-NMe-E toward double-stranded DNA differed. G-quadruplex versus duplex DNA affinity was assessed by FRET-based competition assay. Compound **2** appeared to be G-quadruplex specific as evidenced by stable  $\Delta T_{1/2}$  of F21T/2 complex even in the presence of excess ds26 double-stranded DNA competitor (2 and 10  $\mu$ M concentrations of competitor correspond to 10 and 50 mol. equiv., respectively) (Fig. 2). On the opposite, 9-OH-NMe-E, known to intercalate between the base pairs of DNA, did not retain G-quadruplex stabilization capacity when the concentration of double-stranded DNA competitor increased (Fig. 2).

Compounds **3** and **4** were less efficient G-quadruplex DNA binders than **2**. Compound **3** proved to be totally unable to stabilize F21T G-quadruplex while **4** showed very low  $\Delta T_{1/2}$  of 2, 3, and 5 °C at 1, 5, and 10  $\mu$ M concentrations, respectively. The introduction of two constitutive positive charges on the molecule improved the binding capacity of the compound toward G-quadruplex DNA. However, these positive charges were probably not located properly for a significant optimization of ionic interaction with DNA. The location of the positive charges with respect to the aromatic core was previously shown to be of great importance for tuning G-quadruplex affinity in other series of G-quadruplex ligands (Moore *et al.*, 2006; Housou *et al.*, 2007).

## Conclusion

Pentacyclic aromatic and cationic compound **2** appeared as a modest G-quadruplex DNA ligand but was shown not to bind to double-stranded DNA in competition experiments. Thus, **1** or **2** can be considered as suitable scaffolds for further modification in order to improve their solubility and binding constant toward G-quadruplex DNA or RNA. Indeed, other rigid aromatic platforms showed similar moderate binding affinities for G-quadruplex DNA before chemical decoration with suitable cationic side chains converted them to strong and selective G-quadruplex ligands (Mergny *et al.*, 2001; Koeppl *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2006; Housou *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2009). The crescent-shaped pentacyclic compound (**2**) appears more promising than “linear” tetracyclic aromatic scaffolds, such as those of ellipticine (9-OH-NMeE) or indoloquinoline derivatives (**3**, **4**).

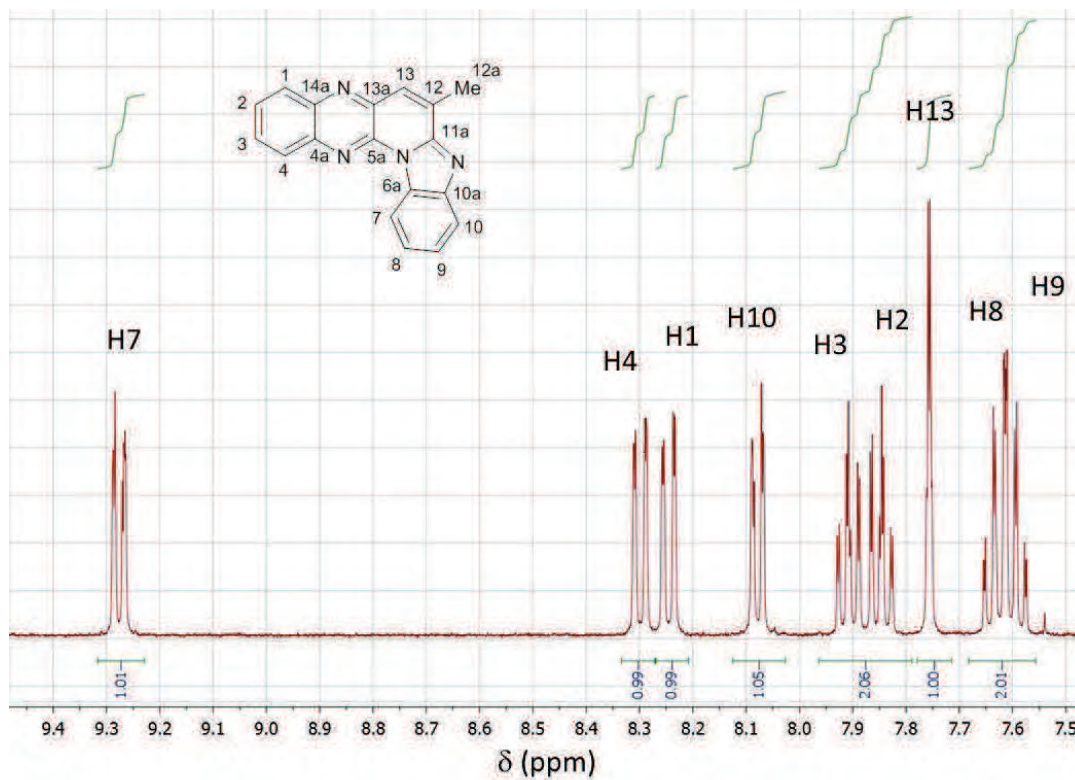
**Acknowledgments** This work was partly supported by the International Associated Moroccan-French Laboratory on Molecular Chemistry (LIA, LCMMF). Thomas Marie is acknowledged for technical assistance.

## References

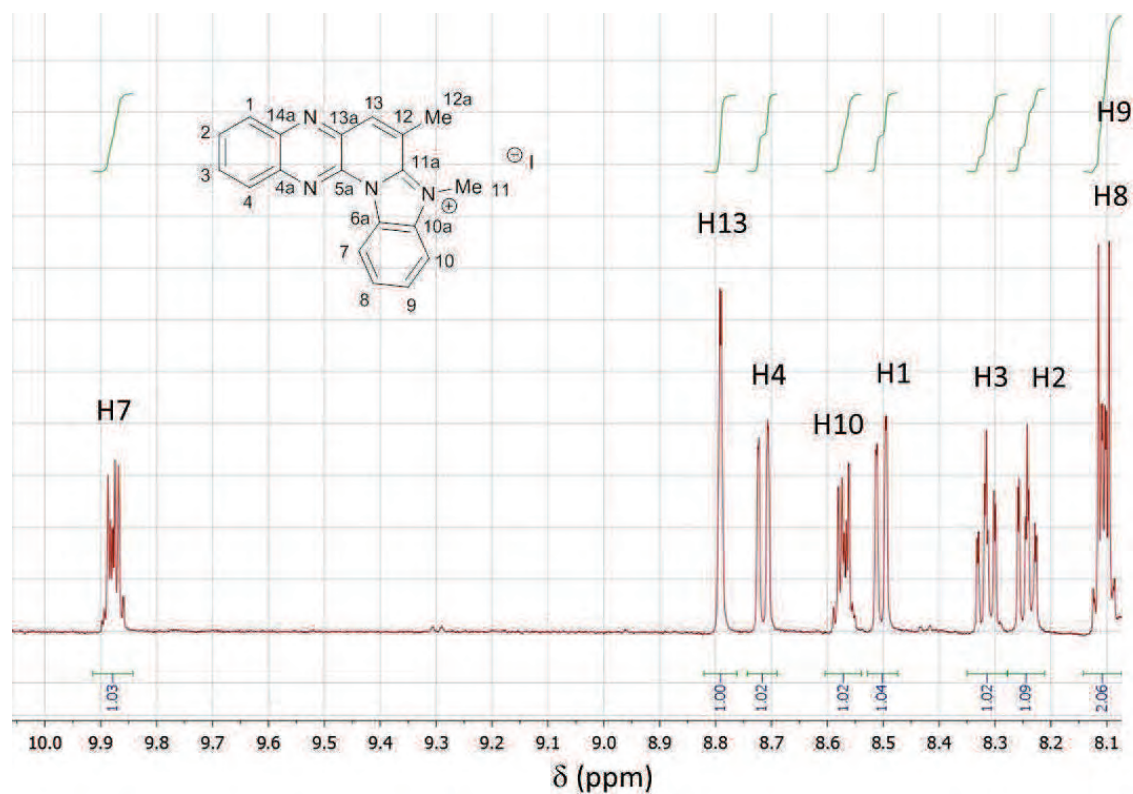
- Balasubramanian S, Neidle S (2009) G-quadruplex nucleic acids as therapeutic targets. *Curr Opin Chem Biol* 13:345–353
- Balasubramanian S, Hurley LH, Neidle S (2011) Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? *Nat Rev Drug Discov* 10:261–275
- Bazzicalupi C, Ferraroni M, Bilia AR, Scheggi F, Gratteri P (2013) The crystal structure of human telomeric DNA complexed with berberine: an interesting case of stacked ligand to G-tetrad ratio higher than 1:1. *Nucleic Acids Res* 41:632–638
- Bessi I, Bazzicalupi C, Richter C, Jonker HR, Saxena K, Sissi C, Chioccioli M, Bianco S, Bilia AR, Schwalbe H, Gratteri P (2012) Spectroscopic, molecular modeling, and NMR-spectroscopic investigation of the binding mode of the natural alkaloids berberine and sanguinarine to human telomeric G-quadruplex DNA. *ACS Chem Biol* 7:1109–1119
- Burger AM, Dai F, Schultes CM, Reszka AP, Moore MJ, Double JA, Neidle S (2005) The G-quadruplex-interactive molecule BRAC-O-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function. *Cancer Res* 65:1489–1496
- Collie GW, Parkinson GN (2011) The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines. *Chem Soc Rev* 40:5867–5892
- Dai J, Carver M, Hurley LH, Yang D (2011) Solution structure of a 2:1 quindoline-c-MYC G-quadruplex: insights into G-quadruplex-interactive small molecule drug design. *J Am Chem Soc* 133:17673–17680
- De Cian A, Guittat L, Kaiser M, Sacca B, Amrane S, Bourdoncle A, Alberti P, Teulade-Fichou MP, Lacroix L, Mergny JL (2007) Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands. *Methods* 42:183–195
- Dixon IM, Lopez F, Esteve JP, Tejera AM, Blasco MA, Pratiel G, Meunier B (2005) Porphyrin derivatives for telomere binding and telomerase inhibition. *ChemBioChem* 6:123–132
- Drygin D, Siddiqui-Jain A, O'Brien S, Schwaebe M, Lin A, Bliesath J, Ho CB, Proffitt C, Trent K, Whitten JP, Lim JK, Von Hoff D, Anderes K, Rice WG (2009) Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Res* 69:7653–7661
- Gavathiotis E, Heald RA, Stevens MF, Searle MS (2003) Drug recognition and stabilisation of the parallel-stranded DNA quadruplex d(TTAGGGT)<sub>4</sub> containing the human telomeric repeat. *J Mol Biol* 334:25–36
- Georgiades SN, Abd Karim NH, Suntharalingam K, Vilar R (2010) Interaction of metal complexes with G-quadruplex DNA. *Angew Chem Int Ed* 49:4020–4034
- Gowan SM, Heald R, Stevens MF, Kelland LR (2001) Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes. *Mol Pharmacol* 60:981–988
- Grand CL, Han H, Munoz RM, Weitman S, Von Hoff DD, Hurley LH, Bearss DJ (2002) The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo. *Mol Cancer Ther* 1:565–573
- Granzhan A, Monchaud D, Saettel N, Guedin A, Mergny JL, Teulade-Fichou MP (2010) “One ring to bind them all”-part II: identification of promising G-quadruplex ligands by screening of cyclophane-type macrocycles. *J Nucleic Acids*. doi:10.4061/2010/460561
- Gudkov A (2008). Aminoacridines and other heterocyclic compounds for NF- $\kappa$ B inhibition and modulation of cell growth or apoptosis. In *PCT Int Appl. WO 2008090417*
- Haider SM, Neidle S, Parkinson GN (2011) A structural analysis of G-quadruplex/ligand interactions. *Biochimie* 93:1239–1251
- Hounsou C, Guittat L, Monchaud D, Jourdan M, Saettel N, Mergny JL, Teulade-Fichou MP (2007) G-quadruplex recognition by quinacridines: a SAR, NMR, and biological study. *ChemMedChem* 2:655–666
- Jain SC, Bhandary KK, Sobell HM (1979) Visualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution. VI. Structure of two drug-dinucleoside monophosphate crystalline complexes, ellipticine-5-iodocytidylyl (3'-5') guanosine and 3,5,6,8-tetramethyl-N-methyl phenanthrolium-5-iodocytidylyl (3'-5') guanosine. *J Mol Biol* 135:813–840
- Jaumot J, Gargallo R (2012) Experimental methods for studying the interactions between G-quadruplex structures and ligands. *Curr Pharm Des* 18:1900–1916
- Koepfel F, Riou JF, Laoui A, Mailliet P, Arimondo PB, Labit D, Petitgenet O, Helene C, Mergny JL (2001) Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes. *Nucleic Acids Res* 29:1087–1096
- Kohn KW, Waring MJ, Glaubiger D, Friedman CA (1975) Intercalative binding of ellipticine to DNA. *Cancer Res* 35:71–76
- Largy E, Granzhan A, Hamon F, Verga D, Teulade-Fichou MP (2013) Visualizing the quadruplex: from fluorescent ligands to light-up probes. *Top Curr Chem* 330:111–177
- Le Pecq JB, Nguyen Dat X, Gosse C, Paoletti C (1974) A new antitumoral agent: 9-hydroxyellipticine. Possibility of a rational design of anticancerous drugs in the series of DNA intercalating drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:5078–5082
- Leonetti C, Scarsella M, Riggio G, Rizzo A, Salvati E, D'Incalci M, Staszewsky L, Frapolli R, Stevens MF, Stoppacciaro A, Mottolese M, Antoniani B, Gilson E, Zupi G, Biroccio A (2008) G-quadruplex ligand RHPS4 potentiates the antitumor activity of camptothecins in preclinical models of solid tumors. *Clin Cancer Res* 14:7284–7291
- Ma Y, Ou TM, Tan JH, Hou JQ, Huang SL, Gu LQ, Huang ZS (2009) Synthesis and evaluation of 9-O-substituted berberine derivatives containing aza-aromatic terminal group as highly selective telomeric G-quadruplex stabilizing ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 3414–3417
- Ma Y, Ou TM, Tan JH, Hou JQ, Huang SL, Gu LQ, Huang ZS (2011) Quinolono-benzo-[5,6]-dihydroisoquinolium compounds derived from berberine: a new class of highly selective ligands for G-quadruplex DNA in c-myc oncogene. *Eur J Med Chem* 46:1906–1913
- Ma DL, He HZ, Leung KH, Zhong HJ, Chan DS, Leung CH (2013) Label-free luminescent oligonucleotide-based probes. *Chem Soc Rev* 42:3427–3440
- Mergny JL, Maurizot JC (2001) Fluorescence resonance energy transfer as a probe for G-quartet formation by a telomeric repeat. *ChemBiochem* 2:124–132
- Mergny JL, Lacroix L, Teulade-Fichou MP, Hounsou C, Guittat L, Hoarau M, Arimondo PB, Vigneron JP, Lehn JM, Riou JF, Garestier T, Hélène C (2001) Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3062–3067
- Miller KM, Rodriguez R (2011) G-quadruplexes: selective DNA targeting for cancer therapeutics? *Expert Rev Clin Pharmacol* 4:139–142
- Monchaud D, Teulade-Fichou MP (2008) A Hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands. *Org Biomol Chem* 6:627–636

- Monchaud D, Allain C, Bertrand H, Smargiasso N, Rosu F, Gabelica V, De Cian A, Mergny JL, Teulade-Fichou MP (2008) Ligands playing musical chairs with G-quadruplex DNA: a rapid and simple displacement assay for identifying selective G-quadruplex binders. *Biochimie* 90:1207–1223
- Monchaud D, Granzhan A, Saettel N, Guedin A, Mergny JL, Teulade-Fichou MP (2010) “One ring to bind them all”-part I: the efficiency of the macrocyclic scaffold for G-quadruplex DNA recognition. *J Nucleic Acids*. doi:10.4061/2010/525862
- Moore MJ, Schultes CM, Cuesta J, Cuenca F, Gunaratnam M, Tanious FA, Wilson WD, Neidle S (2006) Trisubstituted acridines as G-quadruplex telomere targeting agents. Effects of extensions of the 3,6- and 9-side chains on quadruplex binding, telomerase activity, and cell proliferation. *J Med Chem* 49:582–599
- Murat P, Singh Y, Defrancq E (2011) Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions. *Chem Soc Rev* 40:5293–5307
- Neidle S (2010) Human telomeric G-quadruplex: the current status of telomeric G-quadruplexes as therapeutic targets in human cancer. *FEBS J* 277:1118–1125
- Ou TM, Lu YJ, Zhang C, Huang ZS, Wang XD, Tan JH, Chen Y, Ma DL, Wong KY, Tang JC, Chan AS, Gu LQ (2007) Stabilization of G-quadruplex DNA and down-regulation of oncogene c-myc by quindoline derivatives. *J Med Chem* 50:1465–1474
- Ou TM, Lu YJ, Tan JH, Huang ZS, Wong KY, Gu LQ (2008) G-quadruplexes: targets in anticancer drug design. *ChemMedChem* 3:690–713
- Paoletti C, Le Pecq JB, Dat-Xuong N, Juret P, Garnier H, Amiel JL, Rouesse J (1980) Antitumor activity, pharmacology, and toxicity of ellipticines, ellipticinium, and 9-hydroxy derivatives: preliminary clinical trials of 2-methyl-9-hydroxy ellipticinium (NSC 264-137). *Recent Results Cancer Res* 74:107–123
- Pennarun G, Granotier C, Gauthier LR, Gomez D, Hoffschir F, Mandine E, Riou JF, Mergny JL, Mailliet P, Boussin FD (2005) Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands. *Oncogene* 24:2917–2928
- Qin Y, Hurley LH (2008) Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions. *Biochimie* 90:1149–1171
- Romera C, Bombarde O, Bonnet R, Gomez D, Dumy P, Calsou P, Gwan JF, Lin JH, Defrancq E, Pratiel G (2011) Improvement of porphyrins for G-quadruplex DNA targeting. *Biochimie* 93:1310–1317
- Shibinskaya MO, Lyakhov SA, Mazepa AV, Andronati SA, Turov AV, Zholobak NM, Spivak NY (2010) Synthesis, cytotoxicity, antiviral activity and interferon inducing ability of 6-(2-aminoethyl)-6H-indolo[2,3-b]quinoxalines. *Eur J Med Chem* 45:1237–1243
- Tauchi T, Shin-ya K, Sashida G, Sumi M, Okabe S, Ohyashiki JH, Ohyashiki K (2006) Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: in vitro and in vivo studies in acute leukemia. *Oncogene* 25:5719–5725
- Wheelhouse RT, Sun D, Han H, Xiaoguang Han F, Hurley LH (1998) Cationic porphyrins as telomerase inhibitors: the interaction of tetra-(N-methyl-4-pyridyl)porphine with quadruplex DNA. *J Am Chem Soc* 120:3261–3262
- Xu Y (2011) Chemistry in human telomere biology: structure, function and targeting of telomere DNA/RNA. *Chem Soc Rev* 40:2719–2740
- Zniber R, El Hajji AJ, Achour R, Cherkaoui MZ, Harrata A (2000) Synthèse et caractérisation de nouveaux composés benzimidazoliques et quinoxaliniques à propriétés pharmacologiques potentielles. *J Soc Chim Tunisie IV*:783–787

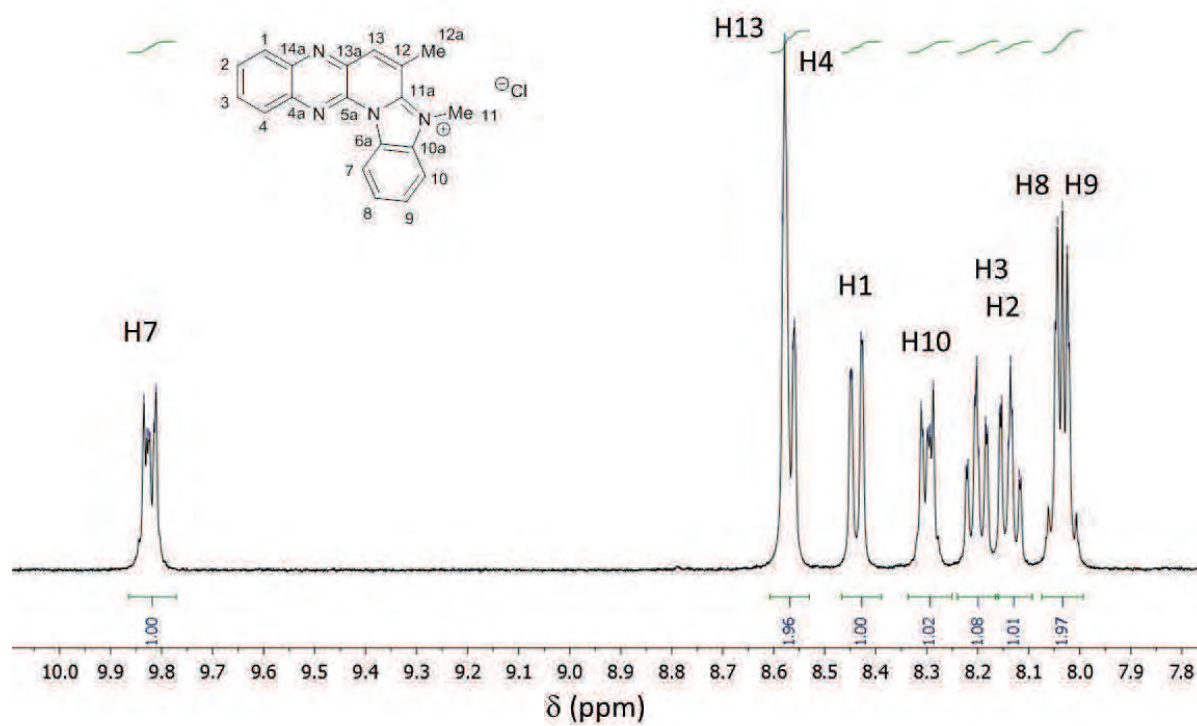
## Supporting Information



**Fig. S1** Aromatic region of the  $^1\text{H}$  NMR spectrum (400 MHz) of product **1** in  $\text{CDCl}_3$ .

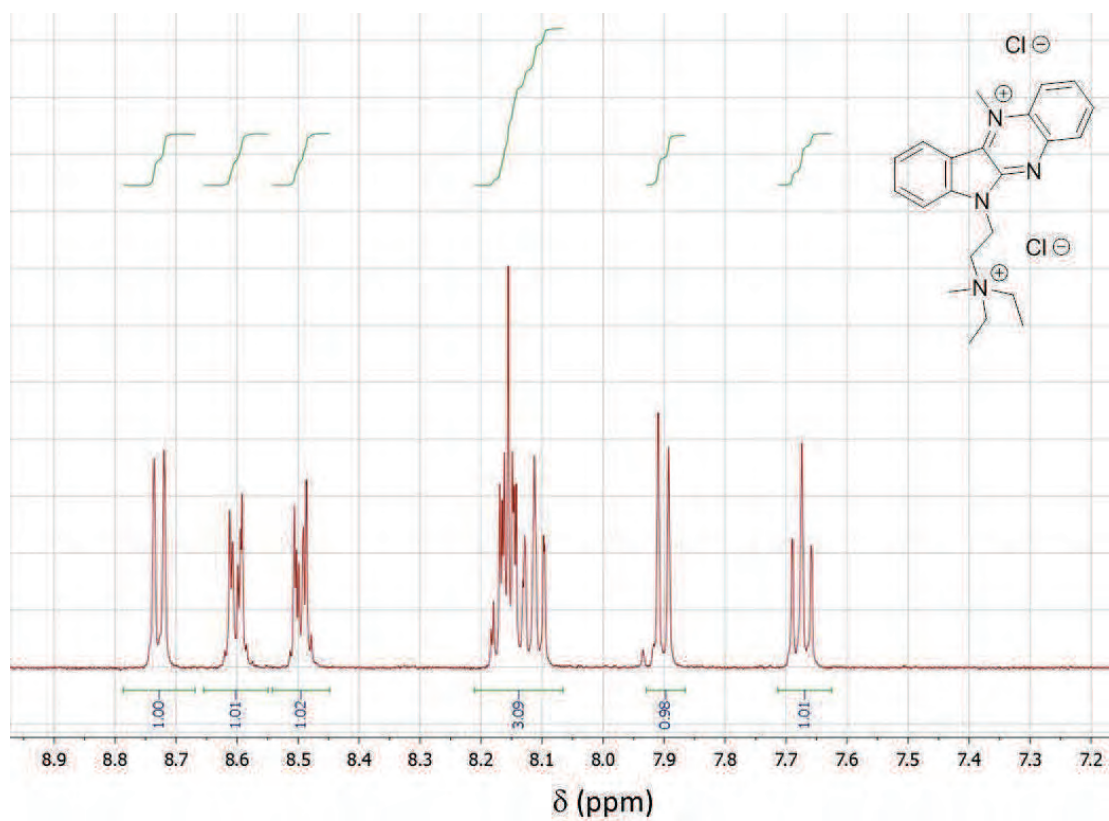


**Fig. S2** Aromatic region of the <sup>1</sup>H NMR spectrum (500 MHz) of product **2''** in DMF-d<sub>7</sub>.

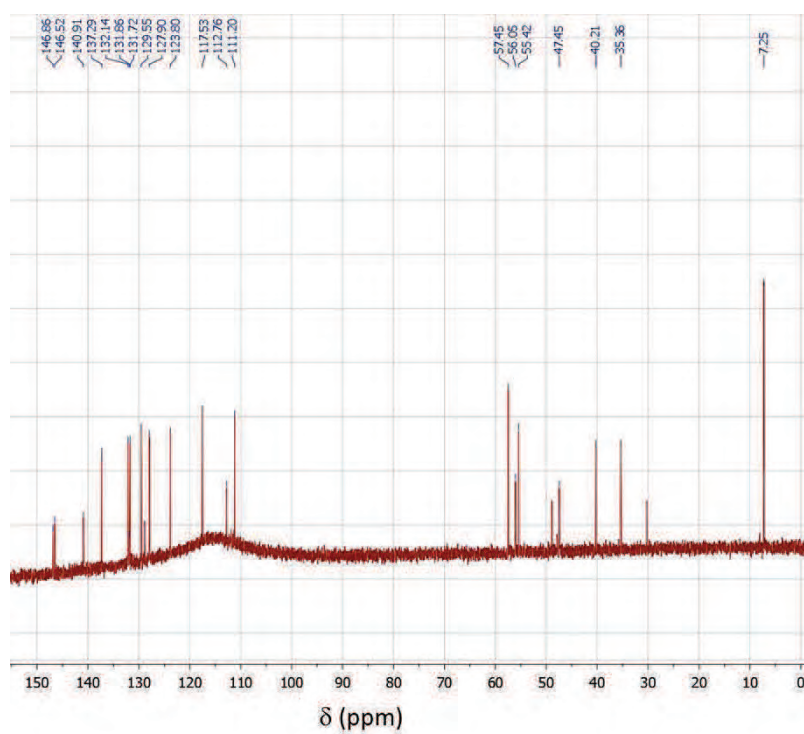


**Fig. S3** Aromatic region of the <sup>1</sup>H NMR spectrum (400 MHz) of product **2** in CD<sub>3</sub>OD.

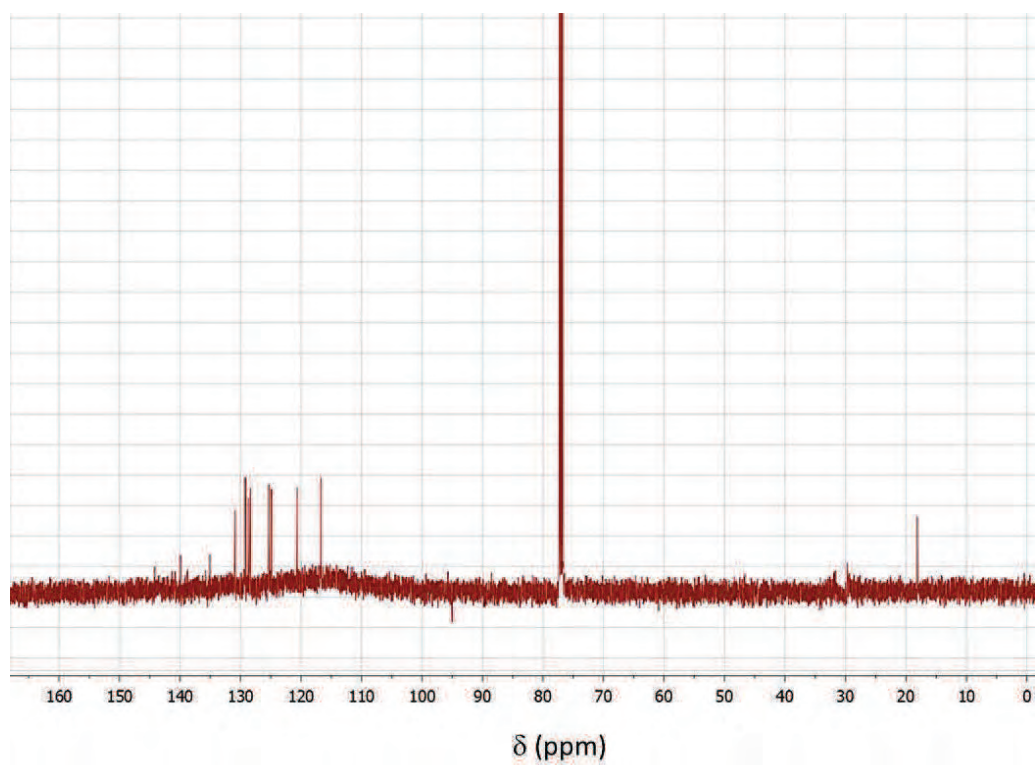




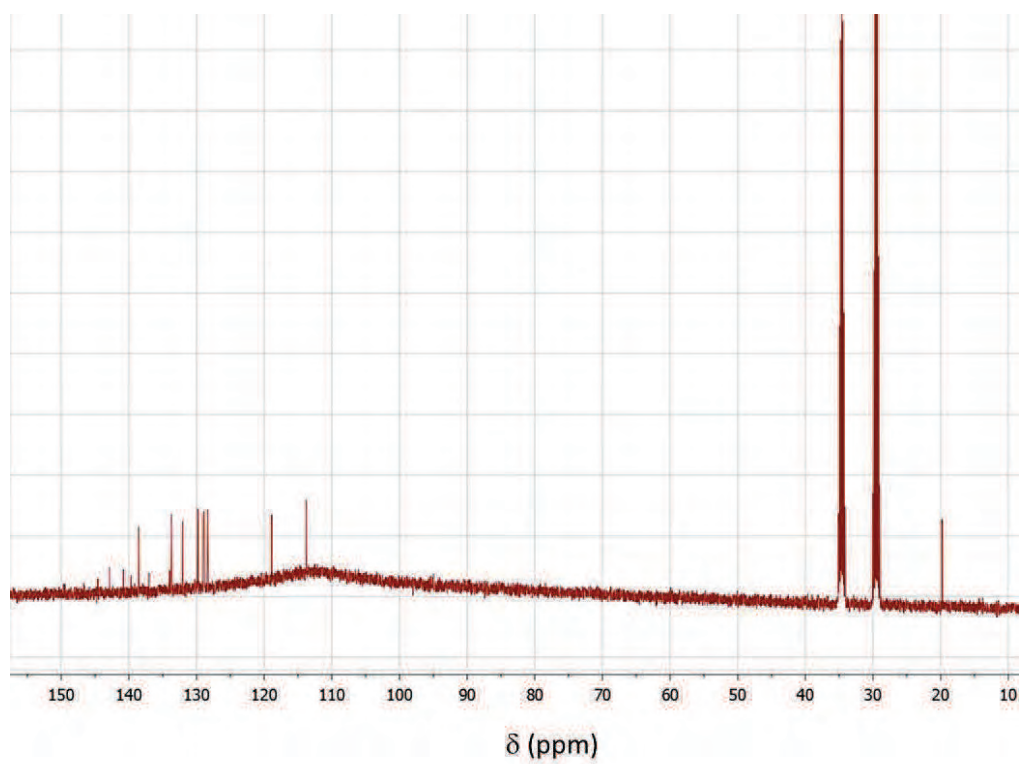
**Fig. S4** Aromatic region of the  $^1\text{H}$  NMR spectrum (500 MHz) of product **4** in  $\text{D}_2\text{O}$ .



**Fig. S5.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (127.5 MHz) of product **4** in  $\text{D}_2\text{O}$



**Fig. S6.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (127.5 MHz) of product **1** in  $\text{CDCl}_3$ .



**Fig. S7.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (127.5 MHz) of product **2''** in  $\text{DMF-}d_7$ .

## II. Tests sur l'enzyme InhA de *Mycobacterium tuberculosis*

Dans l'article 2 nous rapportons les conditions de préparation des solutions mères, la production et la purification de l'enzyme InhA ainsi que les tests d'inhibition de l'enzyme InhA en prenant comme standard la molécule de triclosan, inhibiteur connu de l'enzyme.

Article 2: "6-(Diethylaminoethyl)indoloquinoline as inhibitor of InhA enzyme of *Mycobacterium tuberculosis*". (2014)

### Résumé:

Deux séries de composés hétérocycliques dérivés de l'isatine ont été synthétisées. Dans la première série, l'isatine a été *N*-substitué par des groupements aromatiques/aliphatiques (**1a-c**)/(5<sub>4</sub>-5<sub>3</sub>-5<sub>2</sub>). Dans la deuxième série, les composés (**1a-c**)/(5<sub>4</sub>-5<sub>3</sub>-5<sub>2</sub>) ont été condensés avec l'*o*-phénylène-diamine pour donner des dérivés d'indoloquinoline (**2a-c**)/(6<sub>4</sub>-6<sub>3</sub>-6<sub>2</sub>). Les composés ont été testés comme inhibiteurs de l'enzyme InhA de *M. tuberculosis*. Le composé 6-(diéthylaminoéthyl)indoloquinoline (**2a**)/(6<sub>4</sub>) a inhibé 38% de l'activité de InhA à 50 μM. Cette activité constitue un point de départ encourageant. Les modes d'interaction possibles de **2a-c**/6<sub>4</sub>-6<sub>3</sub>-6<sub>2</sub> avec InhA ont été explorés par docking moléculaire.



## 6-(Diethylaminoethyl)indoloquinoline as inhibitor of InhA enzyme of *Mycobacterium tuberculosis*

Asmae Zanzoul<sup>a,b,c</sup>, Aurélien Chollet<sup>a,b</sup>, Jean-Luc Stigliani<sup>a,b</sup>, Vania Bernardes-Génisson<sup>a,b</sup>, El Mokhtar Essassi<sup>c</sup>, Geneviève Pratviel<sup>a,b</sup>

a) Laboratoire de Chimie de Coordination CNRS, UPR 8241, 205 route de Narbonne, BP 44099, 31077 Toulouse cedex 4, France

b) Université de Toulouse, UPS, INPT, LCC, 31077 Toulouse, France

c) Laboratoire de Chimie Organique Hétérocyclique, pôle de compétences pharmacochimie, Université Mohammed V-Agdal, Faculté des sciences, avenue Ibn Battouta, BP 1014, Rabat, Morocco

### Abstract

Two series of heterocyclic compounds derived from isatin have been synthesized. In the first series, isatin was *N*-substituted with aromatic/aliphatic moieties (**1a-c**). In the second series, compounds **1a-c** were condensed with *o*-phenylenediamine to afford indoloquinoline derivatives (**2a-c**). The compounds were tested as inhibitors of InhA enzyme of *M. tuberculosis*. Compound 6-(diethylaminoethyl)indoloquinoline (**2a**) inhibited 38% of InhA activity at 50  $\mu$ M. The possible modes of interaction of **2a-c** with InhA were explored by molecular docking.

**Keywords:** Heterocyclic compounds, enzymatic inhibition, modeling

### Introduction

*Mycobacterium tuberculosis*, the etiologic agent of tuberculosis, exhibits a particular lipid cell wall, which is rich in mycolic acids. These mycolic acids that are specific and essential components of the mycobacterial envelope are produced by type II fatty acid elongation system (FAS-II). Among the enzymes belonging to this biosynthesis pathway the enzyme enoyl-ACP reductase, referred to as InhA, has been identified as the pharmacological target of isoniazid (Bernardes *et al.*, 2013), which is since 1952 one of the major drugs for the treatment of tuberculosis. InhA catalyzes the reduction of a *trans* double bond of an enoyl-acyl group on a fatty acid precursor, which is covalently attached to an acyl carrier protein (ACP). InhA reaction is NADH (reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide cofactor) dependent.

A renewed interest in tuberculosis research emerged due to alarming number of new cases associated to increased resistance of the pathogen toward existing drugs (Davies 2003). Since InhA enzyme is crucial for *Mycobacterium tuberculosis* and is considered as a validated target for drugs against tuberculosis, we focused our attention toward InhA inhibitors. Several crystal structures of InhA (or FabI *i.e.* the InhA homologue protein in *E. coli*) in absence or in complex with inhibitors can be found in the literature (Dessen *et al.* 1995; Rozwarski *et al.*, 1998; Rozwarski *et al.*, 1999; Kuo *et al.*, 2003; He *et al.*, 2006). The substrate binding pocket is hydrophobic in nature while the presence of bound NADH cofactor affords polar groups. Hydrophobic moiety of inhibitors interact in the lipophilic substrate binding cavity (Tonge *et al.*, 2007). In addition, most inhibitors also interact via the formation of hydrogen bonds with the ribose and/or phosphate of nicotinamide cofactor and with the hydroxyl group of the catalytic tyrosine Y158 (Kuo *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2002; Stigliani *et al.*, 2012). Based on some structural analogy with published inhibitors (Kuo *et al.*, 2003; Mehboob *et al.*, 2012) we report the synthesis of a series of isatin and indoloquinoline derivatives and their evaluation as InhA inhibitors *in vitro*. One of them proved to be active and thus may be considered as a lead. Based on molecular docking studies we may propose some modifications to optimize this compound toward better interaction with InhA enzyme.

### Experimental Section

The following compounds were commercially available, *o*-phenylenediamine, 1*H*-indole-2,3-dione, benzylchloride, 3,4-dichlorobenzyl chloride, 2-(chloromethyl)pyridine hydrochloride, 2-chloro-*N,N*-diethylethylamine hydrochloride, cesium carbonate, NADH (Aldrich). Silica gel refers to Fluka 60 silica (ref. 60741). TLC analysis was performed with Merck 60 F254 silica pre-coated aluminium plates. NMR spectra were recorded on Bruker Avance-400, Avance-500 spectrometers with the residual solvent peak as internal calibration. The mass-spectra (DCI/NH<sub>3</sub>) were recorded using Thermofisher DSQ II mass spectrometer. UV-visible spectra were recorded with a Hewlett Packard 8452A spectrophotometer.

**Synthesis of 1a.** Cesium carbonate (4.4 g, 0.0136 mol) was added to a stirred solution of 1*H*-indole-2,3-dione (1.0 g, 0.0068 mol) in 20 mL of DMF. Then 2-chloro-*N,N*-diethylethylamine hydrochloride (1.75 g, 0.0102 mol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 24 h. The inorganic precipitate was filtered and washed with DMF (5 mL). The filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was poured into 100 mL of diethyl ether with stirring, filtered and dried under reduced pressure. Yield: 96% (1.6 g). MS (DCI/NH<sub>3</sub>):  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> = 247.0 (100%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) : 7.62-7.57 (m, 2H), 7.11 (t, 1H, *J* = 8 Hz), 6.96 (d, 1H, *J* = 8Hz), 3.82 (t, 2H, *J* = 8 Hz),

2.72 (t, 2H,  $J = 8$  Hz), 2.58 (q, 4H,  $J = 8$  Hz), 1.01 (t, 6H,  $J = 8$  Hz). IR  $\nu = 1736, 1606$   $\text{cm}^{-1}$ .  $R_f = 0.16$  (hexane:ethyl acetate, 5:5, TEA 1%).

**Synthesis of 1b.** Cesium carbonate (6.0 g, 0.018 mol) was added to a stirred solution of 1*H*-indole-2,3-dione (1.0 g, 0.0068 mol) in 20 mL DMF. Then 2-chloromethylbenzene (1.17 g, 0.0102 mol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 24 h. The inorganic precipitate was filtered and washed with DMF (5 mL). The filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by precipitation in dichloromethane:heptane, 1:10. Yield: 60% (0.95 g); MS (DCI/NH<sub>3</sub>):  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> = 238.0 (100%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) : 7.61 (d, 1H,  $J = 8$  Hz), 7.48 (t,  $J = 8$  Hz), 7.37-7.29 (m, 5H), 7.10 (t,  $J = 8$  Hz), 6.77 (d, 1H,  $J = 8$  Hz), 4.93 (s, 2H). IR  $\nu = 1728, 1608$   $\text{cm}^{-1}$ .  $R_f = 0.77$  (hexane:ethyl acetate, 6:4).

**Synthesis of 1c.** Cesium carbonate (4.67 g, 0.0136 mol) was added to a stirred solution of 1*H*-indole-2,3-dione (1.0 g, 0.0068 mol) in 20 mL DMF, then 2-(chloromethyl)pyridine hydrochloride (1.77 g, 0.0102 mol) was added. The mixture was mixed at room temperature for 24 h. The inorganic precipitate was filtered and washed with DMF (5 mL). The filtrate was reduced to 1 mL DMF under reduced pressure and then poured into 100 mL of diethyl ether with stirring. The precipitated product was filtered. Yield: 50% (0.83 g); MS (DCI/NH<sub>3</sub>)  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> = 239.0 (100%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.57 (d, 1H,  $J = 8$  Hz), 7.69 (t, 1H,  $J = 8$  Hz), 7.62 (d, 1H,  $J = 8$  Hz), 7.52 (t, 1H,  $J = 8$  Hz), 7.35 (d, 1H,  $J = 8$  Hz), 7.25 (t, 1H,  $J = 8$  Hz), 7.11 (t, 1H,  $J = 8$  Hz), 6.99 (d, 1H,  $J = 8$  Hz), 5.07 (s, 2H). IR  $\nu = 1723, 1599, 1592$   $\text{cm}^{-1}$ .  $R_f = 0.24$  (hexane:ethyl acetate, 6:4).

**Synthesis of 2a.** A mixture of **1a** (1.38 g, 0.0056 mol), *o*-phenylenediamine (0.73 g, 0.0095 mol) and acetic acid (15 mL) was boiled under reflux for 5h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The product was purified by flash middle pressure chromatography (SiO<sub>2</sub>, 40 g, hexane:ethyl acetate, 90:10 to 20:80). Yield : 73% (1,3 g); MS (DCI/NH<sub>3</sub>)  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> = 319.1 (100%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.50 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 8.32 (dd, 1H,  $J = 8.3$  Hz,  $J = 1.2$  Hz), 8.16 (dd, 1H,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 1.2$  Hz), 7.77 (ddd, 1H,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 8.3$  Hz,  $J = 1.2$  Hz), 7.72-7.68 (m, 2H), 7.54 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.39 (dd; 1H,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 7.6$  Hz), 4.60 (t, 2H,  $J = 7.3$  Hz), 2.97 (t, 2H,  $J = 7.3$  Hz), 2.68 (q, 4H,  $J = 7.1$  Hz), 1.04 (t, 6H,  $J = 7.1$  Hz). <sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 145.68, 144.59, 140.67, 140.10, 139.31, 130.90, 129.31, 128.64, 127.90, 125.90, 122.74, 120.78, 119.54, 109.57, 50.65, 47.59 (2C), 40.16, 12.04 (2C). UV-visible in MeOH,  $\lambda$ , nm ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>); 269 ( $52 \pm 2 \cdot 10^3$ ), 353 ( $18 \pm 1 \cdot 10^3$ ).  $R_f = 0,26$  (hexane:ethyl acetate, 6:4, TEA 1%).

**Synthesis of 2b.** A mixture of **1b** (0.46 g, 0.00194 mol), *o*-phenylenediamine (0.21 g, 0.00194 mol) and acetic acid (15 mL) was boiled under reflux for 5h. The reaction was evaporated under reduced pressure. The product was purified by precipitation in dichloromethane:heptane, 1:10. Yield : 72% (0.422 g); MS (DCI/NH<sub>3</sub>) *m/z* [M+H]<sup>+</sup> = 310.0 (100%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8.52 (dd, 1H, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.2 Hz), 8.36 (dd, 1H, *J* = 8.3 Hz, *J* = 1.2 Hz), 8.18 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.2 Hz), 7.79 (ddd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 8.3 Hz, *J* = 1.2 Hz), 7.73 (ddd, 1H, *J* = 8.3 Hz, *J* = 8.3 Hz, *J* = 1.2 Hz), 7.64 (ddd, 1H, *J* = 8.2 Hz, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.2 Hz), 7.42-7.26 (m, 7H), 5,73 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 145.85, 144.31, 140.69, 140.08, 139.58, 136.53, 131.01, 129.38, 128.82 (3C), 127.92, 127.68, 127.23 (2C), 126,13, 122.73, 121.18, 119.72, 110.16, 45.03. UV-visible, MeOH, λ, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), 271 (34 ± 1 10<sup>3</sup>), 352 (13.2 ± 0.4 10<sup>3</sup>). R<sub>f</sub> = 0.72 (hexane:ethyl acetate, 6:4).

**Synthesis of 2c.** A mixture of **1c** (0.25 g, 0.0011 mol), *o*-phenylenediamine (0.18 g, 0.00165 mol) and acetic acid (15 mL) was boiled under reflux for 2 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The product was purified by flash middle pressure chromatography (SiO<sub>2</sub>, 40 g, hexane/ethyl acetate 90:10 to 80:20). Yield: 74% ( 0.251 g); MS (DCI/NH<sub>3</sub>) *m/z* [M+H]<sup>+</sup> = 311.1 (100%), <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8.63 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz), 8.50 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 8.35 (dd, 1H, *J* = 8.3 Hz, *J* = 1.2 Hz ), 8.16 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.2 Hz), 7.78 (ddd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 8.3 Hz, *J* = 1.2 Hz), 7.72 (ddd, 1H, *J* = 8.3 Hz, *J* = 8.3 Hz, *J* = 1.2 Hz), 7.63 (ddd, 1H, *J* = 8.2 Hz, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.2 Hz), 7.54 (ddd, 1H, *J* = 7.9 Hz, *J* = 7.0 Hz, *J* = 1.2 Hz), 7.46 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.40 (dd, 1H, *J* = 8.0 Hz, *J* = 7.7 Hz ), 7.19 (dd, 1H, *J* = 7.0 Hz, *J* = 5.0 Hz), 7.10 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 5,86 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 156.52, 149.53, 145.69, 144.32, 140.65, 140.14, 139.64, 137.01, 131.10, 129.45, 128.86, 127.88, 126.22, 122.67, 122.66, 121.47, 121.34, 119.71, 110.37, 47.06. UV-visible in MeOH, λ, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) 270 (40.4 ± 0.5 10<sup>3</sup>), 352 (15.2 ± 0.3 10<sup>3</sup>). R<sub>f</sub> 0.53 (hexane:ethyl acetate, 6:4).

#### *Inhibition of InhA enzyme*

The production and purification of InhA were performed as described (Menendez et al., 2011). Stock solutions of all compounds were prepared in DMSO such that the final concentration of this co-solvent was constant at 5% v/v in a final volume 1 mL for all kinetic reactions. Kinetic assays using trans-2-dodecenoyl-Coenzyme A (DD-CoA) and wild-type InhA were performed as described (Menendez et al., 2011). Reactions were initiated by addition of InhA (100 nM final) to solutions containing DD-CoA (50 μM final), inhibitor (50 μM final), and NADH (250 μM final) in 30 mM PIPES, 150 mM NaCl, pH 6.8, buffer. Control reactions were carried out with the same conditions as described above but without inhibitor, and with triclosan as positive control. The inhibitory activity of each derivative was expressed as the percentage inhibition of InhA activity (initial velocity of the



reaction) with respect to the control reaction without inhibitor. All activity assays were performed in triplicate.

### *Molecular modeling studies*

The ensemble docking procedure described in Stigliani *et al.*, 2012 was used: with this method it is possible to take into account the ligand-induced receptor deformations, by docking a unique compound against multiple rigid receptor conformations. The crystallographic structures of InhA in complex with inhibitors were taken from the Brookhaven Protein Data Bank. We used the related PDB entry codes: 1P44 (Kuo *et al.* 2003), 1P45 (Kuo *et al.*, 2003) and 2H7M (He *et al.*, 2006). The ligands and water molecules were extracted from the PDB files. The MolProbity software (Chen *et al.*, 2010) was used to assign the position of hydrogen atoms and the protonation state of histidines. The NADH cofactor was kept into the InhA structures. The docking calculations were performed with the docking program Autodock Vina v1.1.2 (Trott and Olson 2010). The Autodock graphical interface AutoDockTools (Morris *et al.*, 2009) was used to keep polar hydrogens and add partial charges to the proteins using the Kollman United charges. The search space was included in a box of 24x24x24 Å, centred on the binding site of the ligands and nicotinamide cofactor. Rotation of the side chains of the six residues, M103, F149, Y158, M161, M199 and L218 that surround the catalytic cavity, was possible during the docking. Flexible torsions of side chains and of ligands were assigned with Autotors, an auxiliary module of AutoDockTools. For each calculation, fifteen poses ranked according to the scoring-function of Autodock Vina were obtained. The docking procedure was followed by a post-docking optimization with the PM6-DH2 method (Rezac *et al.*, 2009; Korth *et al.*, 2010) implemented into the MOPAC2012 quantum mechanical package (Stewart 2012; Maia *et al.*, 2012). For that purpose, the docking poses were merged into the cavities of the corresponding InhA and the complexes were submitted to a minimization stage in which the ligand, a set of 12 residues delimiting the binding pocket and the totality of hydrogen atoms were fully energy-minimized. The remaining residues were kept frozen. The localized molecular orbital method (keyword MOZYME) which was developed to enable calculation on large systems such as enzymes (Stewart 1996) was applied. The effects of the solvation interface were simulated with the continuum model COSMO (Klamt and Schuurmann 1996) with a dielectric constant set to 78.4. The interaction energies ( $E_{opt}$ ) were calculated with the equation:  $\Delta E = \Delta_f H$  (ligand-receptor complex) -  $\Delta_f H$  (ligand alone) -  $\Delta_f H$  (receptor alone). For a same compound, the analysis of the docking poses obtained with the three InhA structures was facilitated by a cluster analysis of the RMSD values computed between all the docking poses with the Accelrys DS Visualizer v3.5. software (from Accelrys, San Diego, USA). The structures shown in the graphic illustrations refer to the poses that are found into the most prominent clusters and generally correspond to the first Vina-ranked solutions.

## Results and discussion

### Chemistry

Synthesis of *N*-substituted isatin derivatives (**1a-c**) and indoloquinoline derivatives (**2a-c**) is outlined in Scheme 1. Alkylation of isatin with 2-chloro-*N,N*-diethylethylamine hydrochloride (**a**), 2-chloromethylbenzene (**b**), and 2-(chloromethyl)pyridine hydrochloride (**c**) in DMF at room temperature, afforded derivatives **1a-c** in good yields (50-96%). Further condensation of **1a-c** with *o*-phenylenediamine in boiling acetic acid led to compounds **2a-c**. In the case of **2b** the product was obtained through dichloromethane/hexane precipitation while **2a** and **2c** were purified by silica gel chromatography. In all cases the yield reached c.a. 75%. Synthesis of compounds **2a** (Shibinskaya *et al.*, 2010), **1b**, and **2b** (Paul and Basu 2011; Jain *et al.*, 2012) were previously reported by other routes.

### Biology

The compounds were evaluated *in vitro* for the inhibition of InhA enzyme from *M. tuberculosis* by a commonly used method (Menendez *et al.*, 2011-5524). Compounds were tested at 50  $\mu$ M concentration. Triclosan (Scheme 2), which was previously reported to inhibit InhA ( $IC_{50}$  = 1.1  $\mu$ M) (Freundlich *et al.*, 2009) was included in the measurements as a standard. At the concentration of 50  $\mu$ M triclosan inhibited 98% of InhA activity. Intermediates **1a-c** were tested because of structural analogy with some previously reported benzylbenzimidazole inhibitors of FabI enzyme (Mehboob *et al.*, 2012). However, none of them inhibited InhA enzyme under the used experimental conditions. In the indoloquinoline series, compounds **2b** and **2c** were also totally unable to inhibit the enzyme (0% inhibition) while with **2a** the percentage of inhibition of InhA reached  $38 \pm 6\%$ . The inhibition of InhA by **2a**, although modest compared to triclosan, can be considered as significant. The total inactivity of **2b** and **2c** was puzzling considering their structural analogy not only with **2a** but also with other InhA inhibitors such as GEQ and Genz 8575 (Scheme 2) (Kuo *et al.*, 2003). The  $IC_{50}$  value of GEQ toward InhA inhibition is 0.16  $\mu$ M and Genz 8575 showed 91% of InhA inhibition when tested at a concentration of 40  $\mu$ M in similar test (Kuo *et al.*, 2003).

To better understand the lack of inhibition observed for **2b** and **2c** and to propose some reasonable starting points for structure-based drug design to afford effective InhA inhibitors from **2a** we performed some molecular modeling studies.

## Molecular modeling studies

Modeling of the interaction of **2a-c** with InhA enzyme active site was performed according to a previously reported cross-docking methodology (Stigliani *et al.*, 2012). The binding poses were compared to that of GEQ within InhA/GEQ crystal (Kuo *et al.*, 2003) (1P44). The aromatic fluorene moiety of GEQ lies in the hydrophobic pocket of the enzyme active site and the carbonyl oxygen undergoes two hydrogen bonds with the hydroxyl group of tyrosine Y158 on the one hand, and the 2-hydroxyl group of cofactor's ribose on the other hand (Fig. 1). The calculated interaction energy was  $E_{\text{opt}} = -61 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . In the case of indoloquinoline derivatives **2a** (Fig. 1A), **2b** (Fig. 1B), and **2c** (Fig. 1C) the best ranking poses, found in 1P44 and 1P45 structures by Vina, positioned the ligand in a similar orientation with respect to GEQ. The polycyclic aromatic framework of the molecules lied in the lipophilic region of the enzyme active site. The  $E_{\text{opt}}$  energies calculated for **2a**, **2b**, and **2c** were -19.1, -1.4, -9.2  $\text{kcal.mol}^{-1}$ , respectively. They were much higher than that calculated for GEQ due to the absence of hydrogen bonds connecting the small molecule inhibitor with the protein or the bound cofactor (Fig. 1). However, in accordance with inhibition activity, the interaction energy calculated for **2a** was the lowest  $E_{\text{opt}} = -19.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . In the case of 2H7M, the first Vina poses exhibited various orientations that did not fit with GEQ (the most relevant conformation corresponded to the 7<sup>th</sup> pose). This result was easily explained by the inspection of the catalytic cavity of 2H7M which showed that some bulky amino acid residues (*i.e.* L218 and M199) hindered the expected orientation.

Furthermore, in the case of **2a** modeling, it was possible to find other suitable poses where the protonated molecule (aliphatic tertiary amine group) could undergo ionic interaction with the negatively charged phosphate group of cofactor (Fig. 2A). The aliphatic tertiary nitrogen of **2a** may be protonated at physiological pH, usual pKa value of aliphatic tertiary amines is about 9-10. Due to the short distance between this protonated nitrogen site and the aromatic core of the molecule, the indoloquinoline aromatic moiety located below that of GEQ fluorene as shown in the superimposition in Fig. 2B. In this novel interaction the aromatic moiety does not position deeply in the hydrophobic pocket of the enzyme. Interestingly, the corresponding calculated interaction energy,  $E_{\text{opt}} = -14 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , was of the same order as that found in the docking pose of **2a** where the neutral molecule was located deeper in the hydrophobic cavity of the enzyme ( $-19.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) (Fig. 1A). Thus, two different modes of interactions might be compatible with the observed inhibition effect of **2a**. Alternatively, it may be proposed that the ionic interaction found with the protonated form of **2a** may be the key interaction since it is only possible in the case of **2a**, which is also the only active compound in the series.

## Conclusion

Two series of heterocyclic compounds have been synthesized. The isatin intermediates (**1a-c**) were condensed with *o*-phenylenediamine to afford indoloquinoxaline derivatives (**2a-c**). The compounds were evaluated as inhibitors of InhA enzyme of *M. tuberculosis*. The compound 6-(diethylaminoethyl)indoloquinoxaline (**2a**) inhibited InhA. It may be considered as a potential lead for the design of new drugs against tuberculosis.

From docking studies the four-ring aromatic moiety of **2a-c** seems appropriate in size and shape for binding in the lipophilic pocket as the fluorene moiety of GEQ. In a separate docking pose, compound **2a** was also found to undergo a unique ionic interaction between the protonated alkyl tertiary amine and the phosphate group of cofactor. Therefore, it clearly appears that the distance between the aromatic moiety and the hydrogen bonding donor group of **2a** must be increased in order to get a single molecule compatible with both types of interactions within the protein active site. On the other hand, the introduction of hydrogen bond donating group on the isolated benzyl or pyridyl moiety of **2b** and **2c**, respectively, may also be suggested in analogy with the role of the carbonyl group of GEQ in the binding of this inhibitor in InhA enzyme.

## Acknowledgements

This work was partly supported by the International Associated Moroccan-French Laboratory on Molecular Chemistry (LIA, LCMMF). Dr. Christian Lherbet is acknowledged for fruitful discussions and Marie-Emilie Morantin for technical assistance.

## References

- Bernardes-Genisson, V., Deraeve, C., Chollet, A., Bernadou, J. & Pratviel, G. (2013). Isoniazid: an update on the multiple mechanisms for a singular action. *Curr. Med. Chem.* **20**, 4370-4385.
- Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12-21.
- Davies, P. D. (2003). The world-wide increase in tuberculosis: how demographic changes, HIV infection and increasing numbers in poverty are increasing tuberculosis. *Ann. Med.* **35**, 235-243.
- Dessen, A., Quemard, A., Blanchard, J. S., Jacobs, W. R., Jr. & Sacchettini, J. C. (1995). Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **267**, 1638-1641.

- Freundlich, J. S., Wang, F., Vilcheze, C., Gulten, G., Langley, R., Schiehser, G. A., Jacobus, D. P., Jacobs, W. R., Jr. & Sacchettini, J. C. (2009). Triclosan derivatives: towards potent inhibitors of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *ChemMedChem* **4**, 241-248.
- He, X., Alian, A., Stroud, R. & Ortiz de Montellano, P. R. (2006). Pyrrolidine carboxamides as a novel class of inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* **49**, 6308-6323.
- Jain, R., Sharma, K. & Kumar, D. (2012). A greener, facile and scalable synthesis of indole derivatives in water: reaction of indole-2,3-diones with 1n<sup>2</sup>-difunctionalized benzene. *Tetrahedron Lett.* **53**, 6236-6240.
- Klamt, A. & Schuurmann, G. (1993). Cosmo - a New Approach to Dielectric Screening in Solvents with Explicit Expressions for the Screening Energy and Its Gradient. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 799-805.
- Korth, M., Pitonak, M., Rezac, J. & Hobza, P. (2010). A Transferable H-Bonding Correction for Semiempirical Quantum-Chemical Methods. *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 344-352.
- Kuo, M. R., Morbidoni, H. R., Alland, D., Sneddon, S. F., Gourlie, B. B., Staveski, M. M., Leonard, M., Gregory, J. S., Janjigian, A. D., Yee, C., Musser, J. M., Kreiswirth, B., Iwamoto, H., Perozzo, R., Jacobs, W. R., Jr., Sacchettini, J. C. & Fidock, D. A. (2003). Targeting tuberculosis and malaria through inhibition of enoyl reductase: compound activity and structural data. *J. Biol. Chem.* **278**, 20851-20859.
- Maia, J. D. C., Carvalho, G. A. U., Manguiera, C. P., Santana, S. R., Cabral, L. A. F. & Rocha, G. B. (2012). GPU Linear Algebra Libraries and GPGPU Programming for Accelerating MOPAC Semiempirical Quantum Chemistry Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3072-3081.
- Mehboob, S., Hevener, K. E., Truong, K., Boci, T., Santarsiero, B. D. & Johnson, M. E. (2012). Structural and enzymatic analyses reveal the binding mode of a novel series of Francisella tularensis enoyl reductase (FabI) inhibitors. *J. Med. Chem.* **55**, 5933-5941.
- Menendez, C., Gau, S., Lherbet, C., Rodriguez, F., Inard, C., Pasca, M. R. & Baltas, M. (2011). Synthesis and biological activities of triazole derivatives as inhibitors of InhA and antituberculosis agents. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 5524-5531.
- Miller, W. H., Seefeld, M. A., Newlander, K. A., Uzinskas, I. N., Burgess, W. J., Heerding, D. A., Yuan, C. C., Head, M. S., Payne, D. J., Rittenhouse, S. F., Moore, T. D., Pearson, S. C., Berry, V., DeWolf, W. E., Jr., Keller, P. M., Polizzi, B. J., Qiu, X., Janson, C. A. & Huffman, W. F. (2002). Discovery of aminopyridine-based inhibitors of bacterial enoyl-ACP reductase (FabI). *J. Med. Chem.* **45**, 3246-3256.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785-2791.
- Paul, S. & Basu, B. (2011). Synthesis of libraries of quinoxalines through eco-friendly tandem oxidation-condensation or condensation reactions. *Tetrahedron Lett.* **52**, 6597-6602.
- Rezac, J., Fanfrlik, J., Salahub, D. & Hobza, P. (2009). Semiempirical Quantum Chemical PM6 Method Augmented by Dispersion and H-Bonding Correction Terms Reliably Describes Various Types of Noncovalent Complexes. *J. Chem. Theory Comput.* **5**, 1749-1760.
- Rozwarski, D. A., Grant, G. A., Barton, D. H., Jacobs, W. R., Jr. & Sacchettini, J. C. (1998). Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **279**, 98-102.
- Rozwarski, D. A., Vilcheze, C., Sugantino, M., Bittman, R. & Sacchettini, J. C. (1999). Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD<sup>+</sup> and a C16 fatty acyl substrate. *J. Biol. Chem.* **274**, 15582-15589.
- Shibinskaya, M. O., Lyakhov, S. A., Mazepa, A. V., Andronati, S. A., Turov, A. V., Zholobak, N. M. & Spivak, N. Y. (2010). Synthesis, cytotoxicity, antiviral activity and interferon inducing ability of 6-(2-aminoethyl)-6H-indolo[2,3-b]quinoxalines. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 1237-1243.
- Stewart, J. J. P. (1996). Application of localized molecular orbitals to the solution of semiempirical self-consistent field equations. *Int. J. Quantum Chem.* **58**, 133-146.

- Stewart, J. J. P. (2012). In *MOPAC2012, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Version 13.240L* <http://OpenMOPAC.net>
- Stigliani, J. L., Bernardes-Genisson, V., Bernadou, J. & Pratviel, G. (2012). Cross-docking study on InhA inhibitors: a combination of Autodock Vina and PM6-DH2 simulations to retrieve bio-active conformations. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 6341-6349.
- Tonge, P. J., Kisker, C. & Slayden, R. A. (2007). Development of modern InhA inhibitors to combat drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Top. Med. Chem.* **7**, 489-98.
- Trott, O. & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455-461.

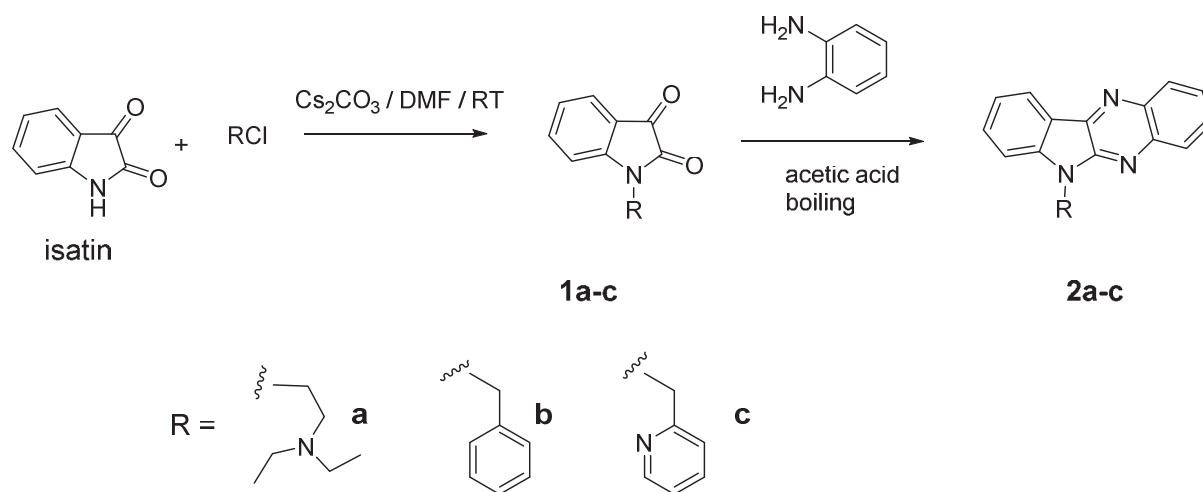
## Figure Captions

**Scheme 1** Structure of synthesized isatin (**1**) and indoloquinoline derivatives (**2**).

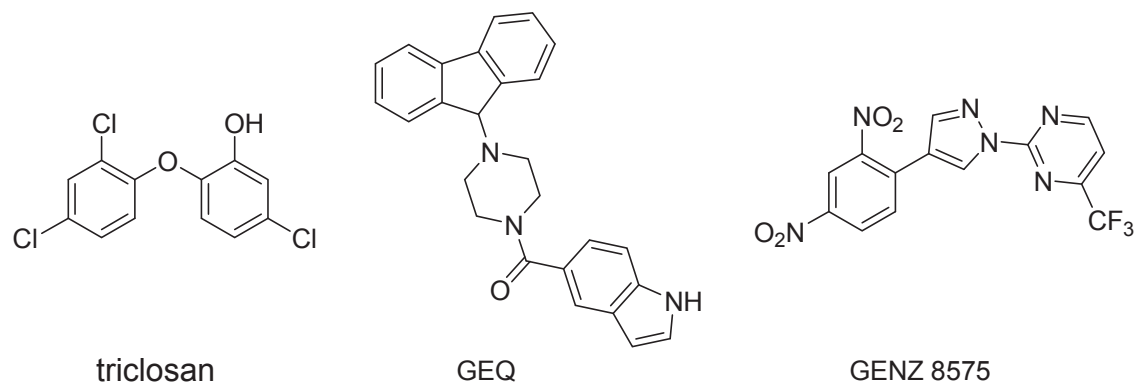
**Scheme 2** Structure of known InhA inhibitors (triclosan, GEQ and GENZ 8575).

**Fig. 1** Docking of indoloquinolines in InhA enzyme. Structure of the reference InhA/GEQ complex (1P44) (top) (Kuo et al., 2003); best Vina poses for compound **2a** (A), **2b** (B), and **2c** (C) in 1P44, 1P45, and 1P44 structures, respectively; superimposition of the best pose of Vina for **2a** (gray) and GEQ (green) in 1P44 protein structure (D); **2b** (gray) and GEQ (green) in 1P45 protein structure (E) and **2c** (gray) and GEQ (green) in 1P45 protein structure (F). Calculated interaction energies are indicated.

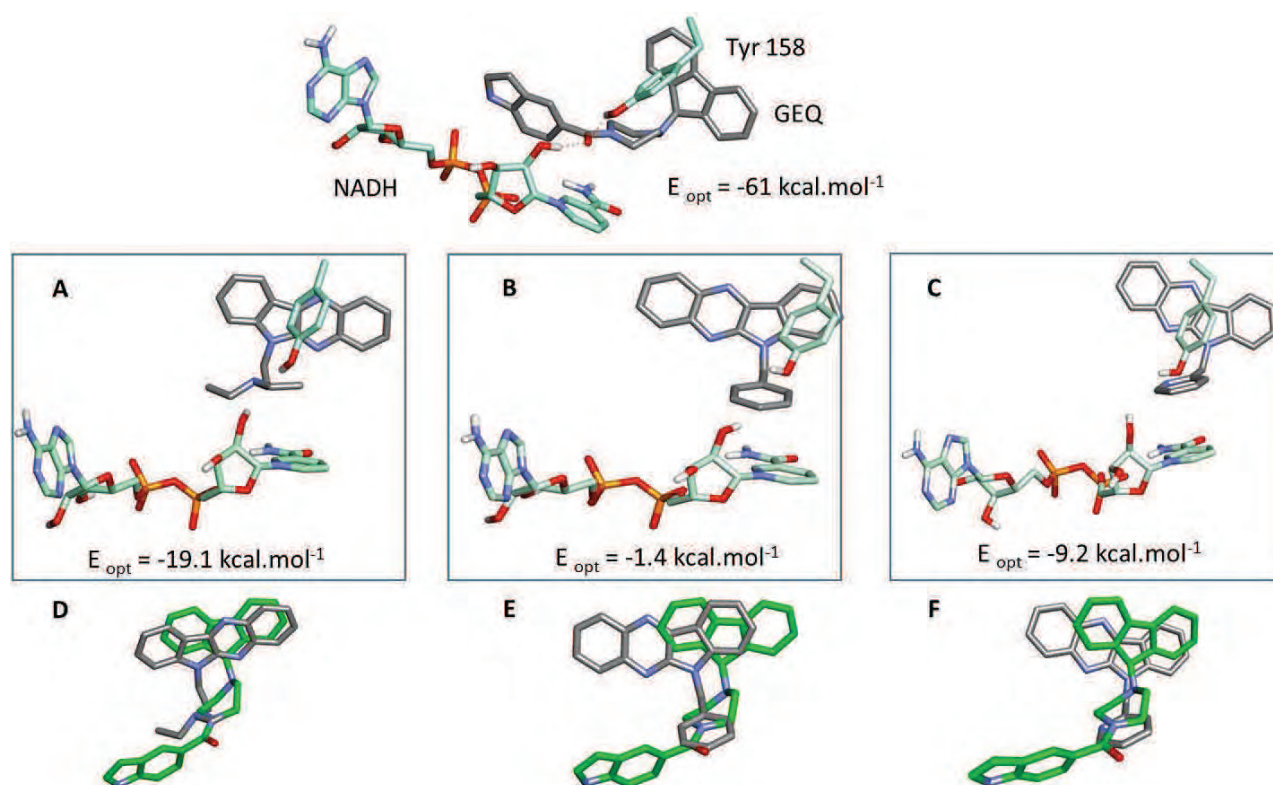
**Fig. 2** Docking studies with protonated **2a**. Best poses in 2H7M structure of InhA (A) and superimposition with GEQ docked in the same protein structure (B).



**Scheme 1** Structure of synthesized isatin (**1**) and indoloquinoline derivatives (**2**).

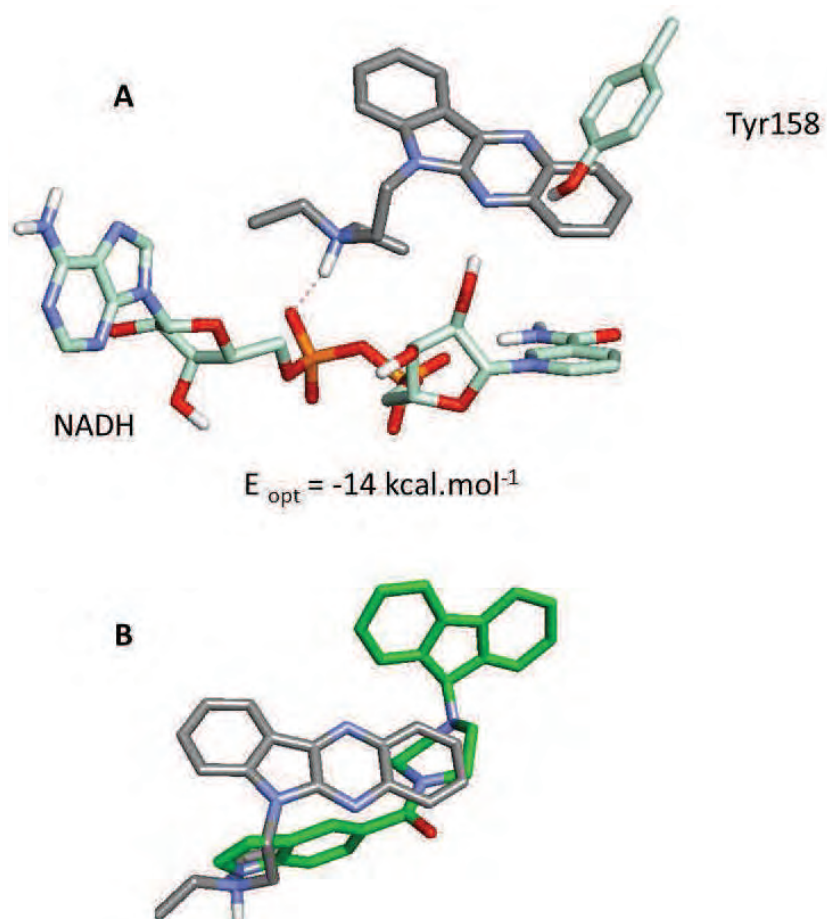


**Scheme 2** Structure of known InhA inhibitors (triclosan, GEQ and GENZ 8575).



**Fig. 1** Docking of indoloquinoxalines in InhA enzyme. Structure of the reference InhA/GEQ complex (1P44) (top) (Kuo et al., 2003); best Vina poses for compound **2a** (A), **2b** (B), and **2c** (C) in 1P44, 1P45, and 1P44 structures, respectively; superimposition of the best pose of Vina for **2a** (gray) and GEQ (green) in 1P44 protein structure (D); **2b** (gray) and GEQ (green) in 1P45 protein structure (E) and **2c** (gray) and GEQ (green) in 1P45 protein structure (F). Calculated interaction energies are indicated.





**Fig. 2** Docking studies with protonated **2a**. Best poses in 2H7M structure of InhA (A) and superimposition with GEQ docked in the same protein structure (B).



### III. Conclusions et perspectives

Nous avons donc montré que le composé aromatique et cationique **(2)/(4'')** de la série benzimidazopyridoquinoxaline est apparu comme un ligand de l'ADN G-quadruplex modeste mais non sélectif pour l'ADN double brin dans des expériences de compétition. En plus la forme croissant de ce produit pentacyclique apparaissent plus prometteuses que les composés aromatiques tetracycliques « linéaire » tels que l'ellipticine (9-OH-NMeE) ou les dérivés d'indoloquinoxaline **(3, 4)/(6<sub>4</sub>, 8<sub>4</sub>)**.

Les dérivés indoloquinoxaline **(2a-c)/(6<sub>4</sub>-6<sub>3</sub>-6<sub>2</sub>)** que nous avons synthétisés ont été évalués comme inhibiteurs de l'enzyme de InhA *M. tuberculosis*. Le composé 6(diéthylaminoéthyl)indoloquinoxaline **(2a)/(6<sub>4</sub>)** a inhibé InhA. Il peut être considéré comme une molécule « lead » pour la conception de nouveaux médicaments contre la tuberculose.

Les études de docking ont montré que les quatre anneaux aromatiques de **2a-c/6<sub>4</sub>-6<sub>3</sub>-6<sub>2</sub>** semblent appropriés en taille et en forme pour un localisation dans la poche lipophile comme le groupement de fluorène GEQ et que le composé **2a/6<sub>4</sub>** peut également établir une interaction ionique unique entre l'alkyl amine tertiaire protonée et le groupe phosphate de cofacteur.



## *Conclusión general*



Notre travail avait pour objectif la synthèse et la caractérisation des nouveaux ligands d'ADN quadruplex à base de quinoxaline.

Nous avons choisi de synthétiser dans la première partie de ce travail de thèse un produit pentacyclique dérivé de benzimidazopyridoquinoxaline à partir de la sérine et de l'*o*-phénylènediamine. Ce produit possède une forme en croissant et porte une charge positive. Les tests de FRET ont montré que ce produit a des meilleures propriétés de liaison à l'égard de l'ADN-quadruplex que celles présentées par l'ellipticine ou les dérivés d'indoloquinoxaline. Ce squelette peut donc être considéré comme une base prometteuse en vue d'une optimisation vers des ligands spécifiques d'ADN G-quadruplex.

Des pistes d'optimisation en vue d'une meilleure reconnaissance de l'ADN G-quadruplex pourraient consister à l'addition de bras substituants cationiques sur le squelette déjà quaternarisé (**4''**) ou neutre (**4**) de manière à obtenir des zones d'interactions supplémentaires avec les boucles ou les sillons des ADNs G-quadruplex.

Nous nous sommes ensuite tournés, dans la deuxième partie de ce travail, vers la synthèse d'autres composés de la série indoloquinoxaline à partir des isatines substituées et d'*o*-phénylènediamine. Ces composés tetracycliques ont été testés comme inhibiteurs de l'enzyme InhA de *Mycobacterium tuberculosis*.

Le composé 6(diéthylaminoéthyl)indoloquinoxaline (**6<sub>4</sub>**) a montré une inhibition de 38% de l'activité de InhA à 50  $\mu$ M. Cette activité constitue un point de départ encourageant. La modélisation de l'interaction de ce composé dans le site actif de l'enzyme montre deux formes d'interactions possibles : (i) une interaction de la partie aromatique du composé dans la poche hydrophobe de l'enzyme et (ii) une interaction ionique entre l'alkyl amine tertiaire protonée et le groupe phosphate du cofacteur NADH. On voit bien que pour cette molécule **6<sub>4</sub>** le bras aliphatique de jonction entre la partie aromatique et l'amine tertiaire terminale est trop court pour que les deux interactions révélées par la modélisation moléculaire puissent avoir lieu en même temps. En conséquence, il semble intéressant d'envisager la synthèse d'un dérivé indoloquinoxaline à chaîne plus longue pour tenter d'associer deux modes de liaison à l'enzyme InhA sur la même molécule et obtenir ainsi un inhibiteur puissant de l'enzyme.





## *Partie expérimentale*

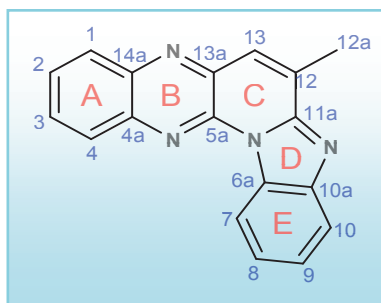


Les réactifs et solvants utilisés proviennent de fournisseurs standards en produits chimiques et ont été utilisés sans purification ultérieure. Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur plaque de silice MERCK 60 F254 ou sur plaque d'aluminium 150 F254 oxyde d'aluminium neutres.

Les spectres RMN ont été enregistrés sur des appareils Bruker 400 et/ou 500. Les spectres de masse ont été réalisés au service d'analyse de l'Institut de Chimie de Toulouse (ICT-FR2599)

Les spectres UV-visible ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Hewlett Packard 8452 A et les spectres de fluorescence sur un fluorimètre Safas FLX-Xenius.

#### Produit 4 :



Un mélange d'*o*-phénylènediamine (3,0 g, 0,027 mol) et de sérine (10,2 g, 0,097 mol) est maintenu à reflux dans 40 mL d'acide chlorhydrique (5,5 N) durant 3 jours.

Après neutralisation du milieu réactionnel avec une solution saturée de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , le précipité est filtré et séché sous pression réduite. Le brut réactionnel est alors purifié par chromatographie sur une colonne d'alumine neutre éluée avec 100% de dichlorométhane. Le solvant des fractions contenant le produit est évaporé sous pression réduite pour donner, après précipitation du produit dans un mélange dichlorométhane/hexane, 01/10 et séchage sous vide, 4 sous la forme d'un produit cotonné jaune (150 mg, rendement = 4%).  $R_f = 0,76$  (plaque d'alumine neutre, 100% dichlorométhane).

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ , ppm :** 9,28 (d, 1H,  $J = 8$  Hz, H7), 8,31 (d, 1H,  $J = 8$  Hz, H4), 8,25 (d, 1H,  $J = 8$  Hz, H1), 8,09 (d, 1H,  $J = 8$  Hz, H10), 7,92 (t, 1H,  $J = 8$  Hz, H3), 7,85 (t, 1H,  $J = 8$  Hz, H2), 7,77 (s, 1H, H13), 7,64 (t, 1H,  $J = 8$  Hz, H8), 7,60 (t, 1H,  $J = 8$  Hz, H9), 2,84 (s, 3H, H12).

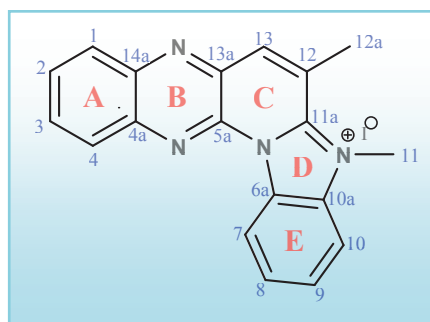
**RMN  $^{13}\text{C}$  (125,7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$ , ppm : 148,50 (C11a), 144,17 (C10a), 141,32 (C5a), 140,84 (C4a), 139,91 (C14a), 138,74 (C13a), 135,06 (C12), 130,94 (C6a), 130,88 (C3), 129,22 (C1), 129,15 (C2), 128,72 (C13), 128,35 (C4), 125,32 (C9), 124,88 (C8), 120,63 (C10), 116,69 (C7), 18,11 (C12a).

**HRSM (+ESI)**  $m/z$  : pour  $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  calculé: 285,1140, observé: 285,1138.

**UV/vis** [ $\text{CH}_3\text{OH}$ ] :  $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) = 255 ( $25 \pm 1 \times 10^3$ ), 401 ( $12,3 \pm 1 \times 10^3$ ).

**Fluorescence** [ $\text{CH}_3\text{OH}$ ]  $\lambda_{\text{ex}}$  = 390 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 490 nm.

**Produit 4' avec in contre ion iodure :**



A une solution de 4 (40 mg, 0,141 mmol) dans du diméthylformamide (10 mL), on ajoute du iodure de méthyle (3 mL, 0,021 mol). La réaction est maintenue à 80 °C pendant 2 jours. On réduit le volume de solvant à 1 mL sous pression réduite et on ajoute de l'acétone (100 mL).

Le précipité qui se forme après une nuit à 4 °C est filtré, lavé avec de l'acétone (3x10 mL) et séché sous vide pour obtenir le produit 4' avec un contre ion iodure sous la forme d'une poudre rouge (34 mg, rendement = 56%).  $R_f$  = 0,5 (plaque de silice,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{KNO}_3\text{sat}$ , 8/1/1).

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMF-}d_7$ )**  $\delta$ , ppm : 9,88 (m, 1H, H7), 8,79 (s, 1H, H13), 8,71 (d, 1H,  $J$  = 8 Hz, H4), 8,57 (m, 1H, H10), 8,51 (d, 1H,  $J$  = 8 Hz, H1), 8,32 (t, 1H,  $J$  = 8 Hz, H3), 8,24 (t, 1H,  $J$  = 8 Hz, H2), 8,12-8,09 (m, 2H, H8, H9), 4,89 (s, 3H, N- $\text{CH}_3$ ), 3,36 (s, 3H, C- $\text{CH}_3$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (125,7 MHz,  $\text{DMF-}d_7$ )**  $\delta$ , ppm : 144,62 (C11a), 142,89 (C14a), 140,83 (C4a), 139,70 (C5a), 138,58 (C13), 137,03 (C13a), 134,00 (C10a), 133,73 (C3), 132,07 (C2), 129,82 (C1), 129,00 (C8), 128,91 (C9), 128,88 (C12), 128,37 (C4), 128,33 (C6a), 118,90 (C7), 113,81 (C10), 34,2 (C11), 19,79 (C12a).

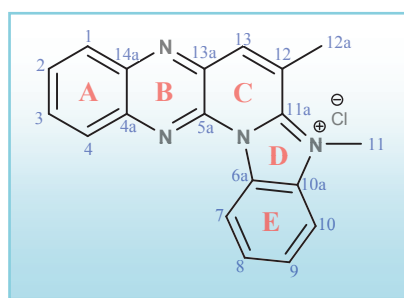
### Produit 4'' avec un contre ion triflate de méthyle :

A une solution de 4 (40 mg, 0,141 mmol) dans du dichlorométhane (5 mL) refroidie à  $-78^{\circ}\text{C}$ , on a ajouté du trifluorométhanesulfonate de méthyle (25  $\mu\text{L}$ , 0,211 mmol). La solution a été ensuite réchauffée à température ambiante et agitée pendant 12 heures. Après concentration sous vide, le résidu a été lavé avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) pour donner un solide sous forme d'une poudre marron (4'' avec un contre ion triflate de méthyle) (38 mg, rendement = 60%).

Rf = 0,5 (plaque de silice,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{KNO}_3\text{sat}$ , 8/1/1).

**SM (+ ESI)  $m/z$  :** 299,1 (100%)  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

### Produit 4'' avec un contre ion chlorure :



Le produit 4'' avec un contre ion triflate de méthyle (38 mg) a été dissous dans 10 mL de méthanol et déposé sur une colonne de 10 g chargée de chlorure DOWEX 1x8-200 (résine échangeuse d'ions), préparée avec du HCl 1 M puis équilibrée avec de l'eau jusqu'à neutralité (pH 6-7). Le produit vert qui sort de la colonne a été recueilli et évaporé à sec.

Le produit a été dissout dans 5 mL de méthanol et précipité avec de l'éther diéthylique (50 mL). Après centrifugation, le culot a été séché sous vide pour obtenir une poudre verte (4'' avec un contre ion chlorure) (24,5 mg, rendement = 86%).

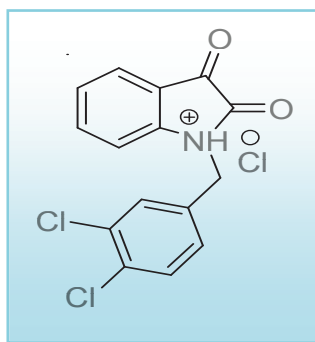
L'absence de contre ion  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$  a été vérifiée par analyse de masse (ESI négatif).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ , ppm :** 9,82-9,80 (m, 1H, H7), 8,57-8,55 (m, 2H, H13, H4), 8,43 (d, 1H,  $J = 8$  Hz, H1), 8,27-8,30 (m, 1H, H10), 8,20 (t, 1H,  $J = 8$  Hz, H3), 8,13 (t, 1H,  $J = 8$  Hz, H2), 8,04-8,02 (m, 2H, H8, H9), 4,68 (s, 3H, N- $\text{CH}_3$ ), 3,21 (s, 3H, C- $\text{CH}_3$ ).

**HRSM (+ESI)  $m/z$  :** pour  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_4$   $[\text{M}^+]$  calculé: 299,1297, observé: 299,1289.

**UV/vis  $[\text{H}_2\text{O}]$  :**  $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) = 256 ( $29 \pm 1 \times 10^3$ ), 397 ( $20 \pm 1 \times 10^3$ ).

**Produit 5<sub>1</sub> : forme chlorhydrate :**



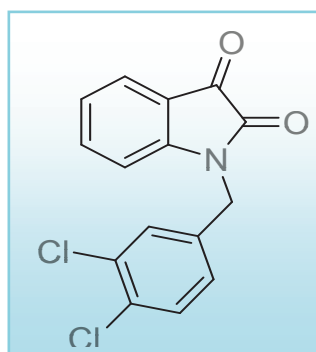
Du carbonate de césium (1,3 g, 0,0039 mole) a été ajouté à une solution agitée de 1H-indole-2,3-dione (0,2 g, 0,00136 mole) dans 15 mL de DMF. Puis le chlorure de 3,4-dichlorobenzoyle a été ajouté (0,266 g, 1,36 mole). Le mélange a été laissé à température ambiante sous agitation pendant 24 h.

Le précipité minéral est filtré et lavé avec 5 mL de DMF. Le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été repris dans 200 mL de dichlorométhane et précipité à température ambiante pendant une nuit pour obtenir 5<sub>1</sub> sous la forme d'un produit cotonné jaune (0,462 g, rendement = 99%).  $R_f = 0,28$  (plaque de silice, MeOH, 100%).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ , ppm :** 9,11 (t, 1H,  $J = 8$  Hz), 7,73 (d, 1H,  $J = 8$  Hz), 7,51 (s, 1H), 7,48 (d, 2H,  $J = 8$  Hz), 7,35-7,29 (m, 2H), 6,67-6,63 (m, 2H), 4,54 (d, 2H,  $J = 8$  Hz).

**SM (DCI/NH<sub>3</sub>)  $m/z$  :** 322,9 (100%)  $[M+NH_4]^+$  et 324,9 (65%)

**Produit 5<sub>1</sub> : forme non protoné :**



Du carbonate de césium (1,3 g, 0,0039 mole) a été ajouté à une solution agitée de 1H-indole-2,3-dione (0,2 g, 0,00136 mole) dans 15 mL de DMF. Puis le chlorure de

3,4-dichlorobenzoyl a été ajouté (0,266 g, 1,36 mole). Le mélange a été laissé à température ambiante pendant 24 h sous agitation.

Le précipité minéral est filtré et lavé avec 5 mL de DMF. Le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur une colonne de silice éluée avec hexane/acétate d'éthyle de 90/10 à 70/30. Le solvant des fractions contenant le produit est évaporé sous pression réduite pour donner **5<sub>1</sub>** sous la forme d'un produit cotonné jaune.  $R_f = 0,28$  (plaque de silice, MeOH, 100%).

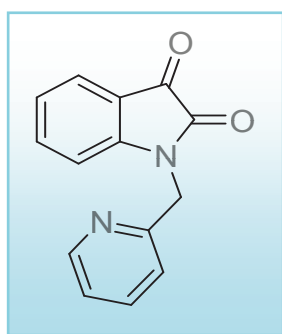
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$ , ppm: 7,74 (dd, 1H,  $J = 8$  Hz,  $J = 1,5$  Hz), 7,51 (d, 1H,  $J = 2$  Hz), 7,48 (d, 1H,  $J = 8$  Hz), 7,35-7,28 (m, 2H), 6,68-6,62 (m, 2H), 4,54 (s, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (100.6 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$ , ppm: 199,11, 172,73, 151,34, 140,29, 135,08, 134,65, 132,10, 130,29, 128,57, 126,45, 114,79, 113,89, 111,53, 44,64.

**HRSM (DCI/CH<sub>4</sub>)**  $m/z$  : pour C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé: 306,0089, observé: 306,0102 (100%) et pour C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 308,0077 (70%).

**IR**  $\nu = 3286, 1621, 1608, 1582, 1518$  cm<sup>-1</sup>.

**Produit **5<sub>2</sub>** :**



Du carbonate de césium (4,67 g, 0,0136 mol) a été ajouté à une solution agitée de 1H-indole-2,3-dione (1 g, 0,0068 mole) dans 20 mL de DMF, puis du chlorhydrate de 2-chlorométhylpyridine (1,77 g, 0,0102 mol) a été ajouté. Le mélange a été laissé sous agitation à température ambiante pendant 24 h.

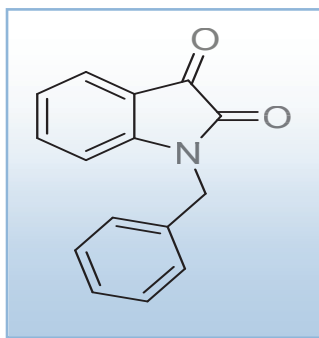
Le précipité minéral est filtré et lavé avec 5 mL de DMF. Le filtrat a été évaporé jusqu'à 1 mL de DMF sous pression réduite; le milieu réactionnel est versé dans 100 mL d'éther sous agitation, le précipité a été filtré sous fritte de verre P4 pour obtenir **5<sub>2</sub>** sous forme d'un produit cotonné jaune (0,83 g, rendement = 50%).  $R_f = 0,24$  (plaque de silice, hexane/acétate d'éthyle, 6/4).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ, ppm : 8,57 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 7,69 (t, 1H, *J* = 8 Hz), 7,62 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 7,52 (t, 1H, *J* = 8 Hz), 7,35 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 7,25 (t, 1H, *J* = 8 Hz), 7,11 (t, 1H; *J* = 8 Hz), 6,98 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 5,06 (s, 2H).

**SM (DCI/NH<sub>3</sub>)** *m/z* : 339,0 (100%) [M+H]<sup>+</sup>.

**IR** *v* = 1723, 1599, 1592 cm<sup>-1</sup>.

**Produit 5<sub>3</sub>** :



Du carbonate de césium (6 g, 0,018 mole) a été ajouté à une solution agitée de 1H-indole-2,3-dione (1 g, 0,0068 mole) dans 20 mL de DMF, puis le 2-chlorométhylbenzène (1,17 g, 0,0102 mol) a été ajouté. le mélange a été agité à température ambiante pendant 24 h.

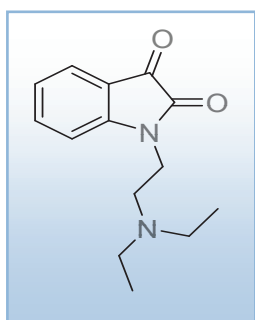
Le précipité minéral est filtré et lavé avec 5 mL de DMF. Le filtrat a été évaporé sous pression réduite; le résidu a été purifié par précipitation dans un mélange dichlorométhane/heptane, 1/10 pour obtenir un produit sous forme cotonné rouge-orange (0,95 g, rendement = 60%). *R<sub>f</sub>* = 0,77 (plaque de silice, hexane/acétate d'éthyle, 6/4).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ, ppm : 7,61 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 7,48 (t, *J* = 8 Hz), 7,37-7,29 (m, 5H), 7,10 (t, *J* = 8 Hz), 6,77 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 4,93 (s, 2H).

**SM (DCI/NH<sub>3</sub>)** *m/z* : 238,0 (100%) [M+H]<sup>+</sup>.

**IR** *v* = 1728, 1608 cm<sup>-1</sup>.

**Produit 5<sub>4</sub>** :





Du carbonate de césium (4,4 g, 0,0136 mole) a été ajouté à une solution agitée de 1H-indole-2,3-dione (1 g, 0,0068 mole) dans 20 mL de DMF, puis du 2-chloro-*N,N*-diéthylethylamine chlorhydrate (1,75 g, 0,0102 mol) a été ajouté. Le mélange a été agité à température ambiante pendant 24 h.

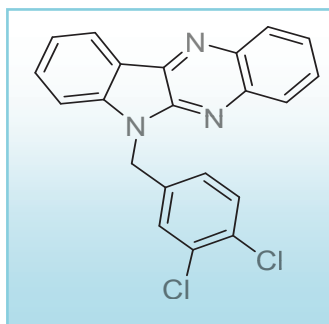
Le précipité minéral est filtré et lavé avec 5 mL de DMF. Le filtrat a été évaporé sous pression réduite; le résidu a été versé dans 100 mL d'éther sous agitation et on filtre pour obtenir un produit orange sous forme cotonné (1,6 g, rendement = 96%).  $R_f = 0,16$  (plaque de silice, hexane/acétate d'éthyle, 5/5, TEA 1%).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$ , ppm : 7,62-7,57 (m, 2H), 7,11 (t, 1H,  $J = 8$  Hz), 6,96 (d, 1H,  $J = 8$  Hz), 3,82 (t, 2H,  $J = 8$  Hz), 2,72 (t, 2H,  $J = 8$  Hz), 2,58 (q, 4H,  $J = 8$  Hz), 1,01 (t, 6H,  $J = 8$  Hz).

**SM ( $\text{DCI}/\text{NH}_3$ )**  $m/z$  : 247,0 (100%)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**IR**  $\nu = 1736, 1606 \text{ cm}^{-1}$ .

**Produit 6<sub>1</sub> :**



Un mélange de 5<sub>1</sub> (0,115 g, 0,000337 mol), d'*o*-phénylènediamine (0,072 mg, 0,000674 mol) et d'acide acétique (10 mL) est porté à ébullition sous reflux pendant 3 h.

Le mélange réactionnel a été évaporé sous pression réduite. Le produit a été purifié par flash-chromatographie à moyenne pression sur une colonne de silice de 20 g éluée avec un mélange hexane/acétate d'éthyle de 90/10 à 70/30. Le solvant des fractions contenant le produit est évaporé sous pression réduite pour donner 6<sub>1</sub> sous la forme d'un produit cotonné jaune (0,076 g, rendement = 60%).  $R_f = 0,72$  (plaque de silice, hexane/acétate d'éthyle, 7/3, 1% TEA).

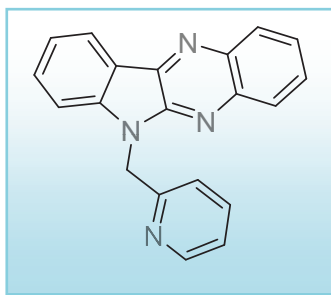
**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ, ppm : 8,53 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz), 8,37 (dd, 1H, *J* = 8,3 Hz, *J* = 1,2 Hz), 8,17 (dd, 1H, *J* = 8,4 Hz, *J* = 1,2 Hz), 7,81 (ddd, 1H, *J* = 8,3 Hz, *J* = 8,3 Hz, *J* = 1,2 Hz), 7,74 (ddd, 1H, *J* = 8,4 Hz, *J* = 8,3 Hz, *J* = 1,2 Hz), 7,67 (ddd, 1H, *J* = 8,2 Hz, *J* = 8,0 Hz, *J* = 1,2 Hz), 7,47 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz), 7,43 (ddd, 1H, *J* = 8,0 Hz, *J* = 7,6 Hz, *J* = 1,2 Hz), 7,38 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz), 7,34 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz), 7,17 (dd, 1H, *J* = 8,3 Hz, *J* = 2,0 Hz), 5,68 (s, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C (125,7 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ, ppm : 145,63, 143,87, 140,56, 139,93, 139,68, 136,85, 133,06, 131,92, 131,19, 130,86, 129,40, 129,20, 129,06, 127,86, 126,57, 126,43, 122,98, 121,56, 119,82, 109,80, 44,04.

**SM (DCI/NH<sub>3</sub>)** *m/z* : 378,0 (100%) [M+H]<sup>+</sup> et 380,0 (66%).

**UV/vis** [CH<sub>3</sub>OH] : λ<sub>max</sub>, nm = 271, 352.

**Produit 6<sub>2</sub> :**



Un mélange de 5<sub>2</sub> (0,25 g, 0,0011 mol), d'*o*-phénylènediamine (0,18 g, 0,00165 mol) et d'acide acétique (15 mL) est porté à ébullition sous reflux pendant 2 h.

Le mélange réactionnel a été évaporé sous pression réduite. Le produit a été purifié par flash-chromatographie à moyenne pression sur une colonne de silice de 40 g éluée avec un mélange hexane/acétate d'éthyle, de 90/10 à 80/20. Le solvant des fractions contenant le produit est évaporé sous pression réduite pour donner 6<sub>2</sub> sous la forme d'un produit cotonné orangre (0,251 g, rendement = 74%). *R<sub>f</sub>* = 0,53 (plaque de silice, hexane/acétate d'éthyle, 6/4).

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ, ppm : 8,63 (d, 1H, *J* = 5,0 Hz), 8,50 (d, 1H, *J* = 7,7 Hz), 8,35 (dd, 1H, *J* = 8,3 Hz, *J* = 1,2 Hz), 8,16 (dd, 1H, *J* = 8,4 Hz, *J* = 1,2 Hz), 7,78 (ddd, 1H, *J* = 8,4 Hz, *J* = 8,3 Hz, *J* = 1,2 Hz), 7,72 (ddd, 1H, *J* = 8,3 Hz, *J* = 8,3 Hz, *J*

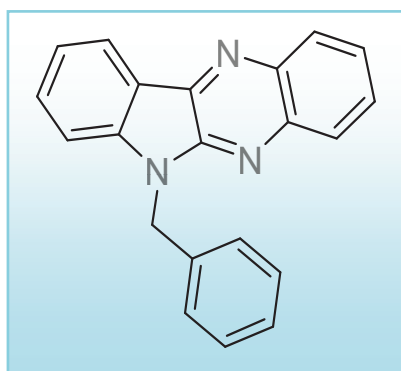
= 1,2 Hz), 7,63 (ddd, 1H,  $J = 8,2$  Hz,  $J = 8,0$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 7,54 (ddd, 1H,  $J = 7,9$  Hz,  $J = 7,0$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 7,46 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz), 7,40 (dd, 1H,  $J = 8,0$  Hz,  $J = 7,7$  Hz), 7,19 (dd, 1H,  $J = 7,0$  Hz,  $J = 5,0$  Hz), 7,10 (d, 1H,  $J = 7,9$  Hz), 5,86 (s, 2H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (125,7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ , ppm :** 156,52, 149,53, 145,69, 144,32, 140,65, 140,14, 139,64, 137,01, 131,10, 129,45, 128,86, 127,88, 126,22, 122,67, 122,66, 121,47, 121,34, 119,71, 110,37, 47,06.

**SM ( $\text{DCI}/\text{NH}_3$ )  $m/z$  :** 311,1 (100%)  $[\text{M}+\text{H}]^+$

**UV/vis [ $\text{CH}_3\text{OH}$ ] :**  $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) = 270 ( $40,4 \pm 0,5 \cdot 10^3$ ), 352 ( $15,2 \pm 0,3 \cdot 10^3$ ).

**Produit 6<sub>3</sub>:**



Un mélange de 5<sub>3</sub> (0,46 g, 0,00194 mol), d'*o*-phénylènediamine (0,21 g, 0,00194 mol) et d'acide acétique (15 mL) est porté à ébullition sous reflux pendant 5 h.

Le mélange réactionnel a été évaporé sous pression réduite. Le produit a été purifié par précipitation dans un mélange dichlorométhane/heptane, 1/10 pour obtenir 6<sub>3</sub> sous forme d'un produit cotonné rouge-orange (0,422 g, rendement = 72%).  $R_f = 0,72$  (plaque de silice, hexane/acétate d'éthyle, 6/4).

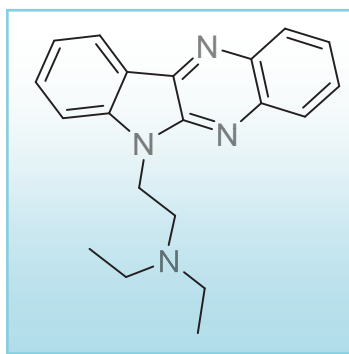
**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ , ppm :** 8,52 (dd, 1H,  $J = 7,4$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 8,36 (dd, 1H,  $J = 8,3$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 8,18 (dd, 1H,  $J = 8,4$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 7,79 (ddd, 1H,  $J = 8,4$  Hz,  $J = 8,3$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 7,73 (ddd, 1H,  $J = 8,3$  Hz,  $J = 8,3$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 7,64 (ddd, 1H,  $J = 8,2$  Hz,  $J = 7,4$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 7,42-7,26 (m, 7H), 5,73 (s, 2H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (125,7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$ , ppm : 145,85, 144,31, 140,69, 140,08, 139,58, 136,53, 131,01, 129,38, 128,82 (3C), 127,92, 127,68, 127,23 (2C), 126,13, 122,73, 121,18, 119,72, 110,16, 45,03.

**SM ( $\text{DCI}/\text{NH}_3$ )**  $m/z$  : 310,0 (100%)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**UV/vis** [ $\text{CH}_3\text{OH}$ ] :  $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) = 271 ( $34 \pm 1 \cdot 10^3$ ), 352 ( $13,2 \pm 0,4 \cdot 10^3$ ).

**Produit 6<sub>4</sub>** :



Un mélange de 5<sub>4</sub> (1,38 g, 0,0056 mol), d'*o*-phénylènediamine (0,73 g, 0,0095 mol) et d'acide acétique (15 mL) est porté à ébullition sous reflux pendant 5 h.

Le mélange réactionnel a été évaporé sous pression réduite. Le produit a été purifié par flash-chromatographie à moyenne pression sur une colonne de silice de 40 g éluée avec un mélange hexane/acétate d'éthyle, de 90/10 à 20/80. Le solvant des fractions contenant le produit est évaporé sous pression réduite pour donner 6<sub>4</sub> sous la forme d'un produit cotonné jaune (1,3 g, rendement = 73%).  $R_f = 0,26$  (plaque de silice, hexane/acétate d'éthyle, 6/4, 1% TEA).

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$ , ppm : 8,50 (d, 1H,  $J = 7,6$  Hz), 8,32 (dd, 1H,  $J = 8,3$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 8,16 (dd, 1H,  $J = 8,4$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 7,77 (ddd, 1H,  $J = 8,4$  Hz,  $J = 8,3$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 7,72-7,68 (m, 2H), 7,54 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz), 7,39 (dd; 1H,  $J = 8$  Hz,  $J = 7,6$  Hz), 4,60 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz), 2,98 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz), 2,69 (q, 4H,  $J = 7,1$  Hz), 1,05 (t, 6H,  $J = 7,1$  Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (125,7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$ , ppm : 145,68, 144,59, 140,67, 140,10, 139,31, 130,90, 129,31, 128,64, 127,90, 125,90, 122,74, 120,78, 119,54, 109,57, 50,65, 47,59 (2C), 40,16, 12,04 (2C).

**SM (DCI/NH<sub>3</sub>)** *m/z* : 319,1 (100%) [M+H]<sup>+</sup>.

**UV/vis** [CH<sub>3</sub>OH] : λ<sub>max</sub>, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) = 269 (52 ± 2 10<sup>3</sup>), 353 (18 ± 1 10<sup>3</sup>).

**Produit 8 :**

Un mélange de carbonate de potassium anhydre (4 g) et de DMS (10 mL) a été agité à température ambiante pendant 10 min.

Du DMS (2 mL) filtré sur une fritte de verre (P4) a été ajouté au produit **6** [**6<sub>1</sub>**, **6<sub>2</sub>** (40 mg) et **6<sub>3</sub>**, **6<sub>4</sub>** (100 mg)]. Le mélange a été agité pendant 2 heures à 110 ° C.

La réaction est contrôlée par chromatographie sur couche mince de silice avec un mélange d'acétonitrile/H<sub>2</sub>O/KNO<sub>3</sub>sat, 8/1/1.

Après refroidissement, le milieu réactionnel est versé dans 50 mL d'éther diéthylique sous agitation, le produit précipité a été filtré sur verre fritté P4 est récupéré dans 10 mL d'eau distillée et lavé avec 50 mL de chloroforme.

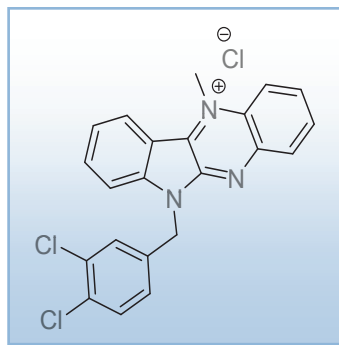
La phase aqueuse a été réduite à 2 mL sous pression réduite pour les produit **7<sub>2</sub>** et **7<sub>4</sub>** avant l'échange de l'ion complémentaire. Dans le cas de **7<sub>1</sub>** et **7<sub>3</sub>** la phase aqueuse est évaporée à sec et les deux produits sont dissous dans du méthanol (2 mL).

L'échange du contre-ion a été réalisée sur une colonne de 1x8-200 Dowex résine échangeuse d'ions (10 g) préalablement lavé avec HCl 1 N et de l'eau jusqu'à pH neutre.

Dans le cas des composés solubles dans l'eau l'échange d'ions a été effectuée par le chargement d'une solution aqueuse du composé. Dans le cas de composés solubles dans le méthanol la colonne a été équilibrée avec du méthanol avant le chargement du composé.

Après l'échange de contre-ion, les solutions d'eau et de méthanol éluées de la colonne de résine ont été lyophilisées pour obtenir le produit **8** (**8<sub>1</sub>**, **8<sub>2</sub>**, **8<sub>3</sub>** et **8<sub>4</sub>**).

**Produit 8<sub>1</sub> :**



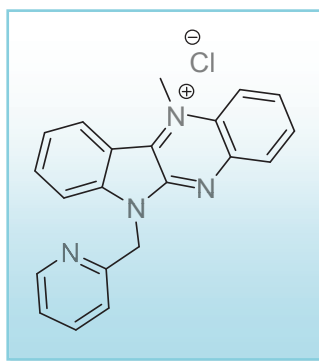
Produit rouge sous forme cotonné, 73 mg, rendement = 65%.  $R_f = 0,6$  (plaque de silice, acetonitrile/H<sub>2</sub>O/KNO<sub>3sat</sub>, 8/1/1).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O)**  $\delta$ , ppm : 8,89 (d, 1H,  $J = 8$  Hz), 8,81 (m, AMXX'), 8,58 (m, AMXX'), 8,26-8,20 (m, 2H), 8,11 (t, 1H,  $J = 8$  Hz), 7,93 (d, 1H,  $J = 8$  Hz), 7,72 (t, 1H,  $J = 8$  Hz), 7,65 (s, 1H), 7,50 (d, 1H,  $J = 8$  Hz), 7,38 (d, 1H,  $J = 8$  Hz), 5,99 (s, 2H), 5,21 (s, 3H).

**SM (ESI positif)**  $m/z$  : 392,07 (100%) [M+H]<sup>+</sup> et 394,06 (66%).

**UV/vis** [CH<sub>3</sub>OH] :  $\lambda_{max}$ , nm ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) = 275 (30  $\pm$  1 10<sup>3</sup>), 394 (22  $\pm$  1 10<sup>3</sup>).

**Produit 8<sub>2</sub> :**



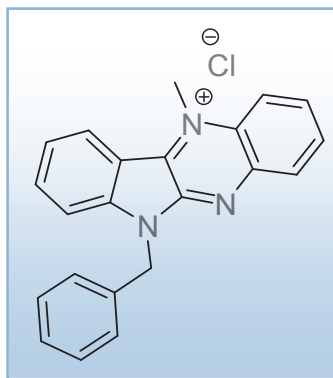
Produit cotonné orange, 100 mg, rendement = 90%.  $R_f = 0,5$  (plaque de silice, acetonitrile/H<sub>2</sub>O/KNO<sub>3sat</sub>, 8/1/1)

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O)**  $\delta$ , ppm : 8,79 (m, 2H), 8,63 (dd, 1H,  $J = 8,7$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 8,45 (ddd, 1H,  $J = 8,4$  Hz,  $J = 8,0$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 8,41 (dd, 1H,  $J = 8,3$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 8,18 (ddd, 1H,  $J = 8,7$  Hz,  $J = 8,0$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 8,14 (ddd, 1H,  $J = 8,3$  Hz,  $J = 8,0$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 8,08 (ddd, 1H,  $J = 8,4$  Hz,  $J = 8,0$  Hz,  $J = 1,2$  Hz), 7,98 (dd, 1H,  $J = 8,0$  Hz,  $J = 5,0$  Hz), 7,81 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz), 7,79 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz), 7,72 (dd, 1H,  $J = 8,0$  Hz,  $J = 7,8$  Hz), 6,34 (s, 2H), 5,15 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (125,7 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ , ppm: 150,0, 147,4, 146,9, 142,3, 141,0, 137,5, 132,4, 132,1, 131,9, 129,5, 129,4, 129,1, 127,9, 126,5, 124,2, 117,6, 113,1, 111,5, 42,9, 40,3.

**SM (ESI positif):**  $m/z$  : 325,1 (100%)  $[M+H]^+$ .

**Produit 8<sub>3</sub> :**



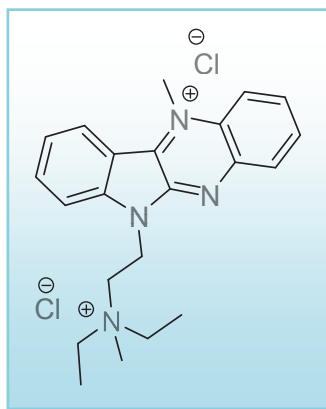
Produit cotonné orange, 123 mg, rendement = 90%.  $R_f$  = 0,8 (plaque de silice, acetonitrile/ $H_2O$ / $KNO_3$ , 8/1/1).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O)**  $\delta$ , ppm: 8,62 (d, 1H,  $J$  = 8 Hz), 8,52 (d, 1H,  $J$  = 8 Hz), 8,37 (d, 1H,  $J$  = 8 Hz), 8,10-8,03 (m, 2H), 7,92 (t, 1H,  $J$  = 8 Hz), 7,73(d, 1H,  $J$  = 8 Hz), 7,54 (t, 1H,  $J$  = 8Hz), 7,32-7,23 (m, 5H), 5,82 (s, 2H), 5,01 (s, 3H).

**SM (ESI positif) :**  $m/z$ : 324,1 (100%)  $[M+H]^+$ .

**UV/vis** [ $CH_3OH$ ] :  $\lambda_{max}$ , nm ( $\epsilon$ ,  $M^{-1} cm^{-1}$ ) = 276 ( $30 \pm 1 10^3$ ), 394 ( $23 \pm 1 10^3$ ).

**Produit 8<sub>4</sub> :**



Produit cotonné rouge-orange, 118 mg, rendement = 90%.  $R_f$  = 0,6 (plaque de silice, acetonitrile/ $H_2O$ / $KNO_{3sat}$ , 8/1/1)

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ, ppm: 8,73 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz), 8,61-8,59 (m, 1H, AMXX'), 8,50-8,48 (m, 1H, AMXX'), 8,17-8,14 (m, 2H), 8,13-8,09 (m, 1H), 7,90 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz), 7,67 (t, 1H, *J* = 8,5 Hz), 5,15 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz), 5,09 (s, 3H), 3,86 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz), 3,59 (q, 4H, *J* = 7,2 Hz), 3,20 (s, 3H), 1,40 (t, 6H, *J* = 7,2 Hz).

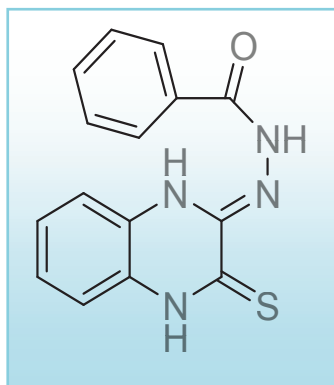
**RMN <sup>13</sup>C (125,7 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ (ppm): 146,8, 146,5, 140,9, 137,3, 132,1, 131,8, 131,7, 129,5, 128,8, 127,9, 123,8, 117,5, 112,7, 111,2, 57,4 (2C), 56,0, 47,4, 40,2, 35,3, 7,2 (2C).

**SM (ESI positif)** : *m/z*: 174,1 [M/2]<sup>2+</sup>.

**UV/vis** [CH<sub>3</sub>OH] : λ<sub>max</sub>, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) = 274 (31 ± 1 10<sup>3</sup>), 394 (23 ± 1 10<sup>3</sup>).

**Fluorescence** [CH<sub>3</sub>OH] λ<sub>ex</sub> = 375 nm, λ<sub>em</sub> = 465 nm.

**Produit 9 :**



Un mélange de quinoxalin-2,3-dithione (1 g, 5,15 10<sup>-3</sup> mole), benzhydrazide (1,4 g, 0,01 mol) et de DMF (40 mL) est porté à ébullition à reflux pendant 48 h. Le volume de DMF a été réduit sous pression réduite (2 mL) et le résidu a été repris dans 100 mL d'éther diéthylique. Un produit huileux précipité rapidement après l'addition de l'éther diéthylique. Après centrifugation, la phase d'éther diéthylique a été récupéré et le précipité (produit huileux) a été lavé avec de l'éther diéthylique (2 x 3 mL). Le produit cristallise dans la phase d'éther diéthylique pendant une nuit à température ambiante. Les cristaux ont été collectés, lavés avec de l'éther diéthylique (5 mL) et séchés sous vide. (0,7 g, rendement = 46%).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO)** δ, ppm: 10,74 (s, 1H), 9,19 (s, 1H), 7,97 (d, 2H), 7,61 (t, 1H), 7,56-7,51 (m, 3H), 7,48 (m, 1H), 7,33 (m, 2H).

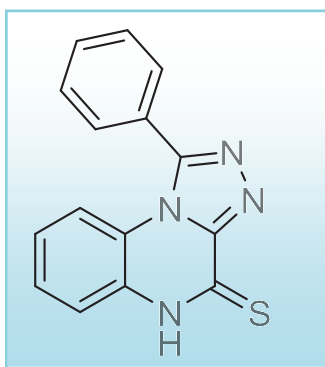


**RMN  $^{13}\text{C}$  (125,7 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm):** 167,5, 165,8, 162,7, 152,1, 135,7, 133,1, 132,2, 128,9 (2C), 128,0 (2C), 126,5, 126,1, 125,9, 116,2.

**SM (FAB positif) :**  $m/z$ : 297  $[\text{M}+\text{H}]^+$

**RX** La molécule cristallise avec une molécule de DMF. (Voir Zanzoul *et.al.* Acta Crystallogr. E69, o1268 (2013) et Chapitre IV)

**Produit 10 :**



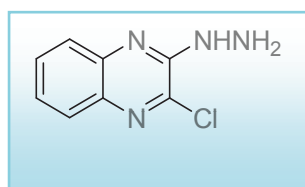
Le produit 9 (100 mg, mole) est porté à ébullition sous reflux pendant 24 h dans 4 mL d'acide acétique. Après évaporation à sec de l'acide le produit est séché sous vide pour obtenir le composé 10 sous forme cotonnée de couleur jaune. (58 mg, rendement = 98%).  $R_f$  = 0,64 (plaque de silice, acétate d'éthyle, 100%).

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO } d_6$ )  $\delta$ , ppm:** 13,84 (s, 1H), 7,76-7,64 (m, 6H), 7,45 (t, 1H), 7,16-7,09 (m, 2H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (125,7 MHz,  $\text{DMSO } d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 209,00, 173,02, 150,95, 148,60, 131,56, 130,36 (2C), 129,67 (2C), 128,53, 128,33, 125,03, 123,30, 117,96, 116,63.

**SM (FAB positif) :**  $m/z$ : 279 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**Produit 13 :**

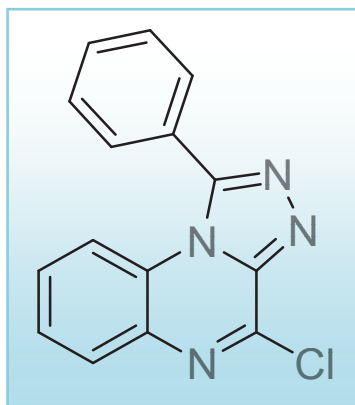


A une solution de 2,3-dichloroquinoxaline 12 (0,2 g, 1 mmol) dans de l'EtOH (5 ml), on ajoute l'hydrate d'hydrazine (100  $\mu\text{L}$ , 2 mmol). Le mélange a été agité une nuit à 25 ° C. Le précipité obtenu est filtré et lavé avec de l'EtOH et séché à sous vide pour obtenir le 3-hydrazinoquinoxaline produit 13. (0,175 g, rendement = 88%).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ, ppm: 7,86 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,77 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,64 (t, 1H, J = 8 Hz), 7,47 (t, 1H, J = 8 Hz), 6,83 (s, 1H), 4,19 (s, 2H).

**SM (DCI/NH<sub>3</sub>)** : *m/z*: 195 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**Produit 14** :



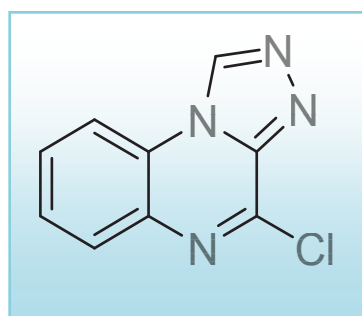
Un mélange de produit **13** (0,173 g, 0,89 mmol) et de triéthylamine orthobenzoate (3 mL) a été agité à 100 ° C pendant 2 h. Le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante et le précipité qui se forme est filtré, lavé avec du cyclohexane et séché sous vide pour donner le produit **14** sous forme cotonnée de couleur blanche. (0,167 g, rendement = 67%).

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ, ppm: 8,08 (d, 1H, J = 10 Hz), 7,74-7,70 (m, 3H), 7,68-7,60 (m, 3H), 7,56 (d, 1H, J = 10 Hz), 7,43 (t, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (125,7 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 151,23, 143,02, 142,46, 135,78, 131,43, 130,29, 130,02 (2C), 129,49, 129,35 (2C), 128,27, 127,58, 125,86, 116,02.

**SM (DCI/NH<sub>3</sub>)** *m/z* : 204,9 (100%) [M+H]<sup>+</sup>.

**Produit 15** :



Un mélange de produit **13**, le 3-hydrazinoquinixaline, (50 mg, 0,00025 mmol) et de triéthyl orthoformate (2 mL) a été agité à 100 °C pendant 2 h. le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante et le précipité qui se forme est filtré, lavés avec du cyclohexane et séché sous vide pour donner le produit **15** sous forme cotonnée de couleur blanche. (34 mg, rendement = 65%).

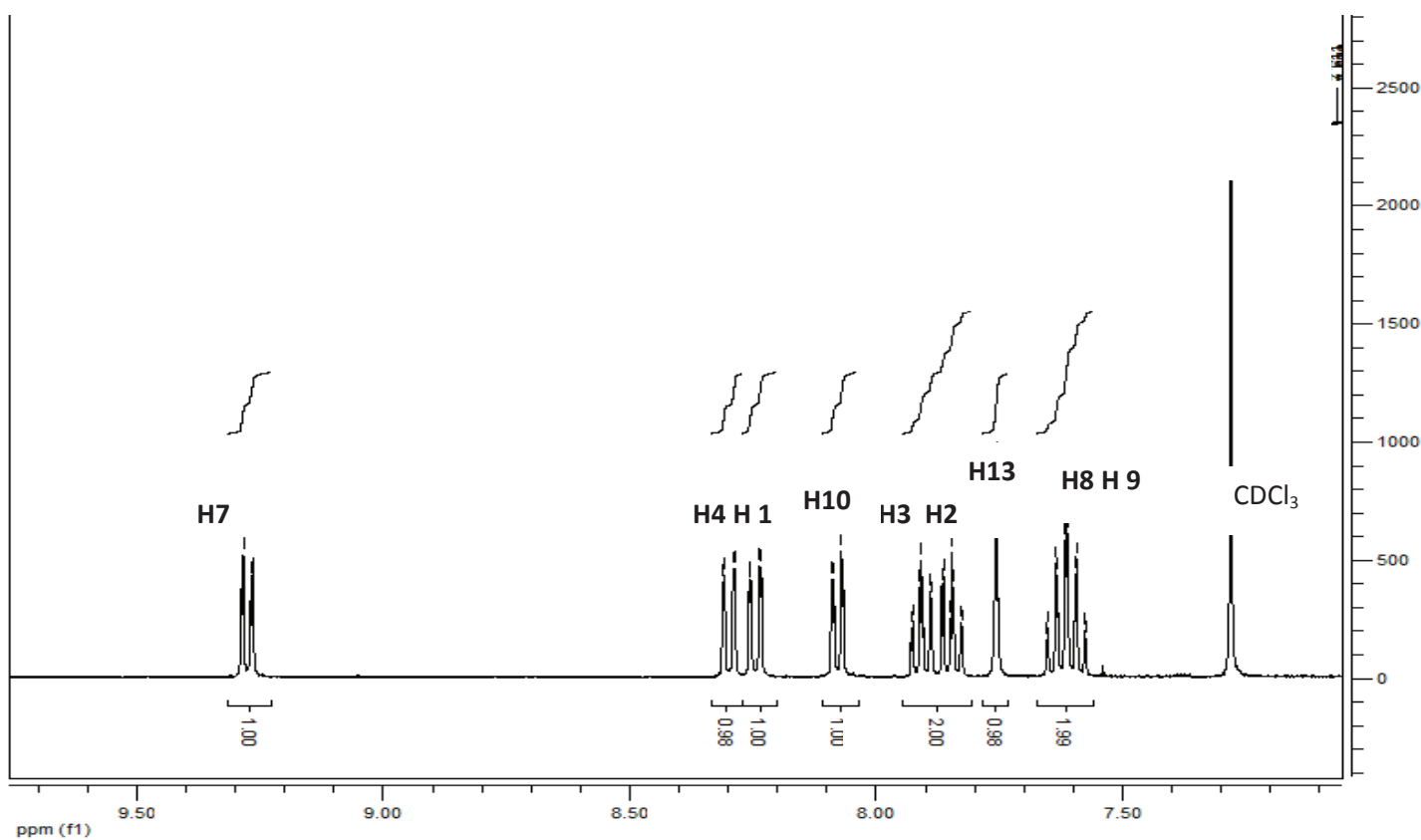
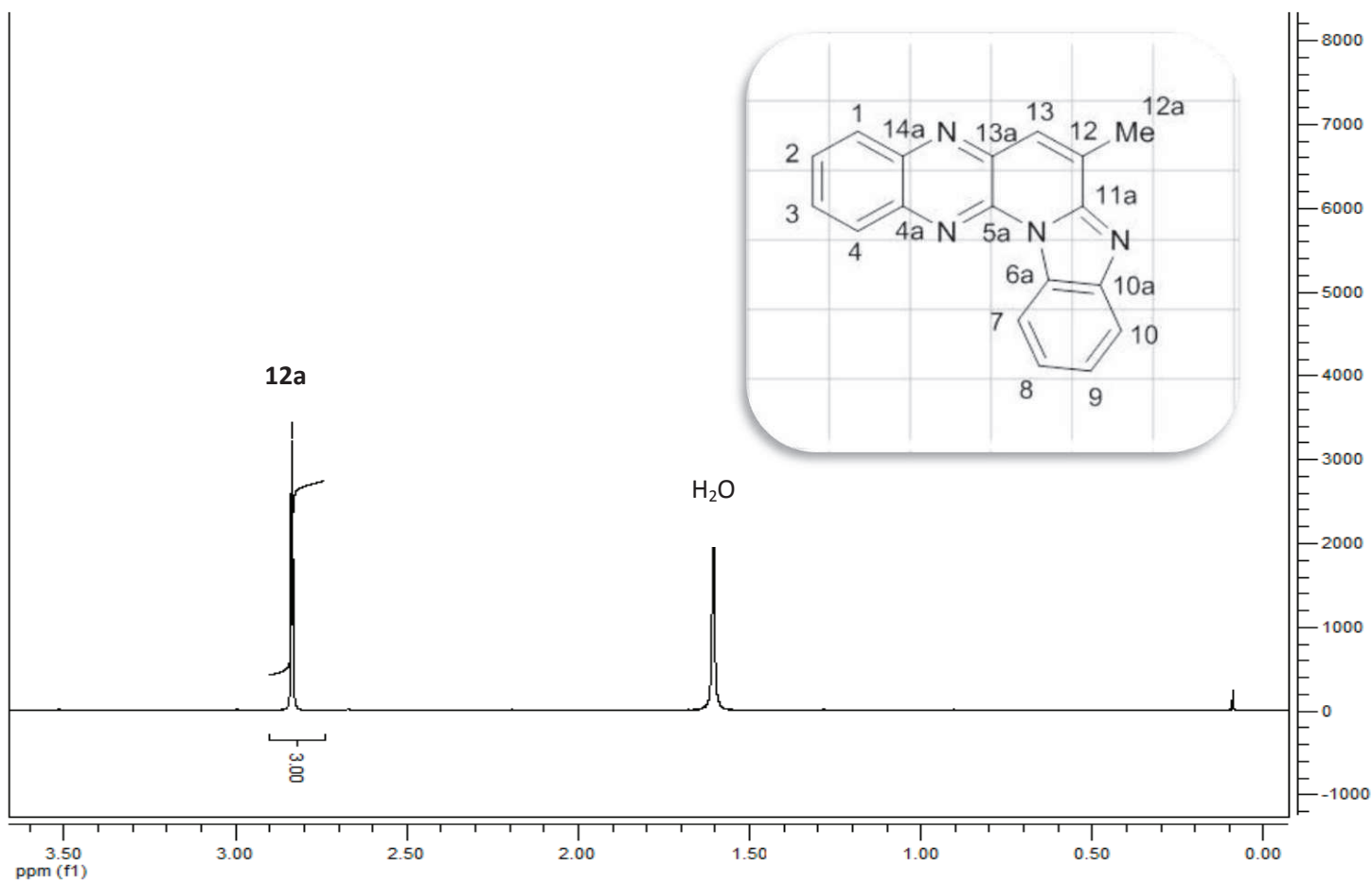
**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO *d*<sub>6</sub>)** δ, ppm: 10,22 (s, 1H), 8.43 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 8,03 (d, 1H, *J* = 8 Hz ), 7,84 (t, 1H, *J* = 8 Hz ), 7,72 (t, 1H, *J* = 8 Hz ).

**SM (ESI positif) :** *m/z* = 281,05 (100%)[M + H]<sup>+</sup>.

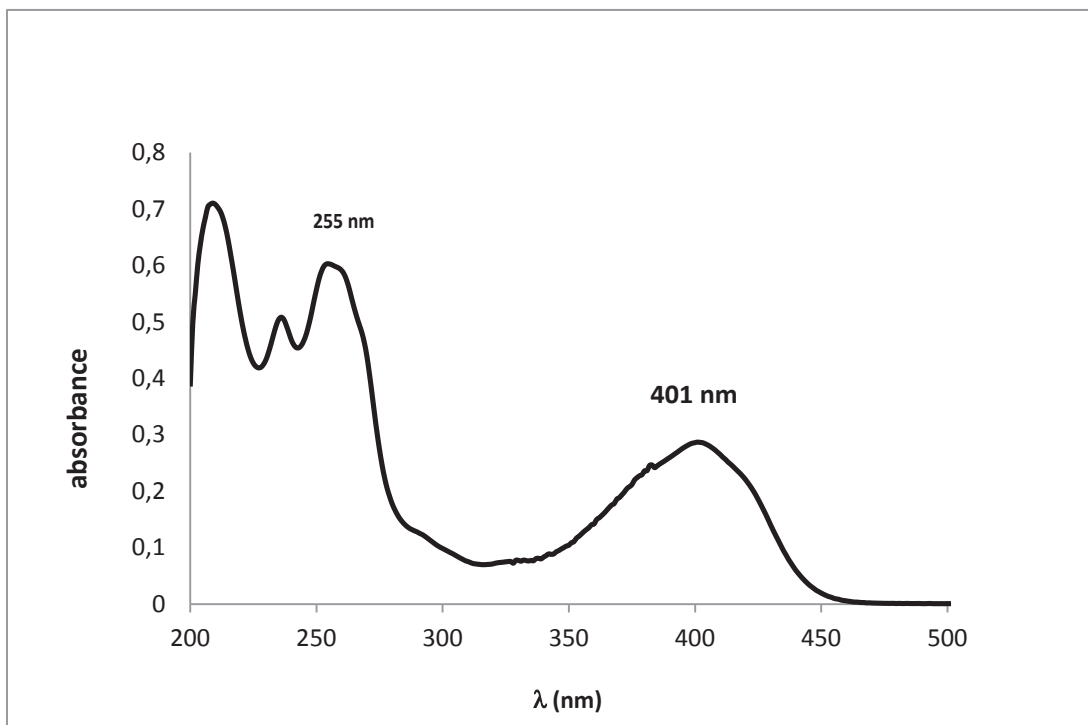


# *ANNEXES "A"*

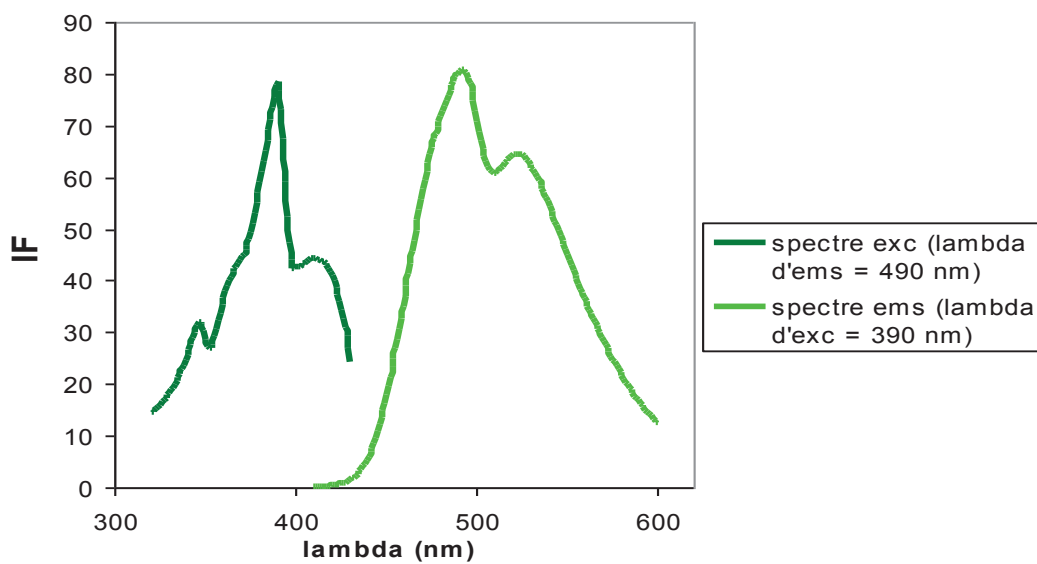




Spectre 1: spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) du produit **4** dans CDCl<sub>3</sub>

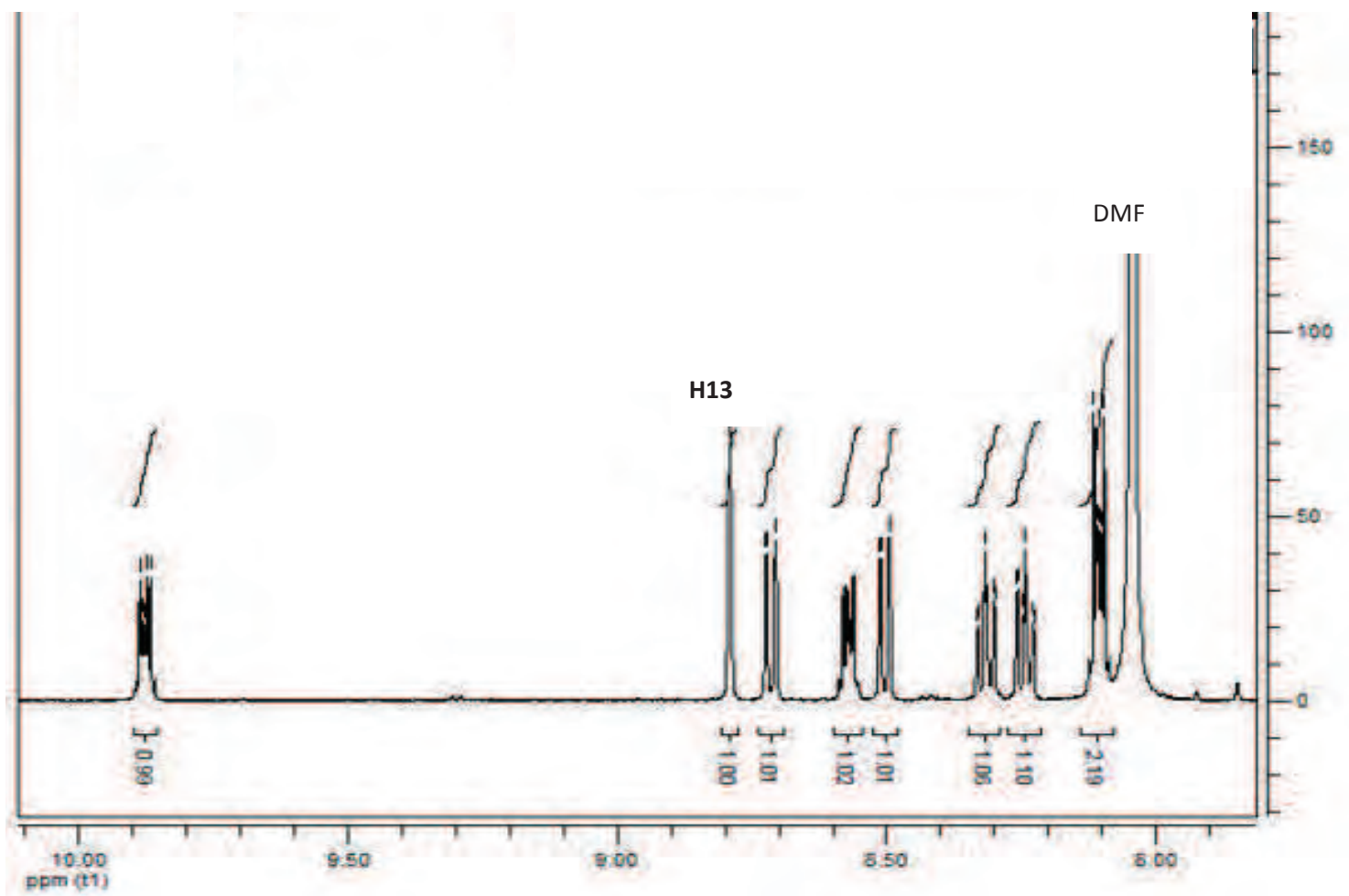
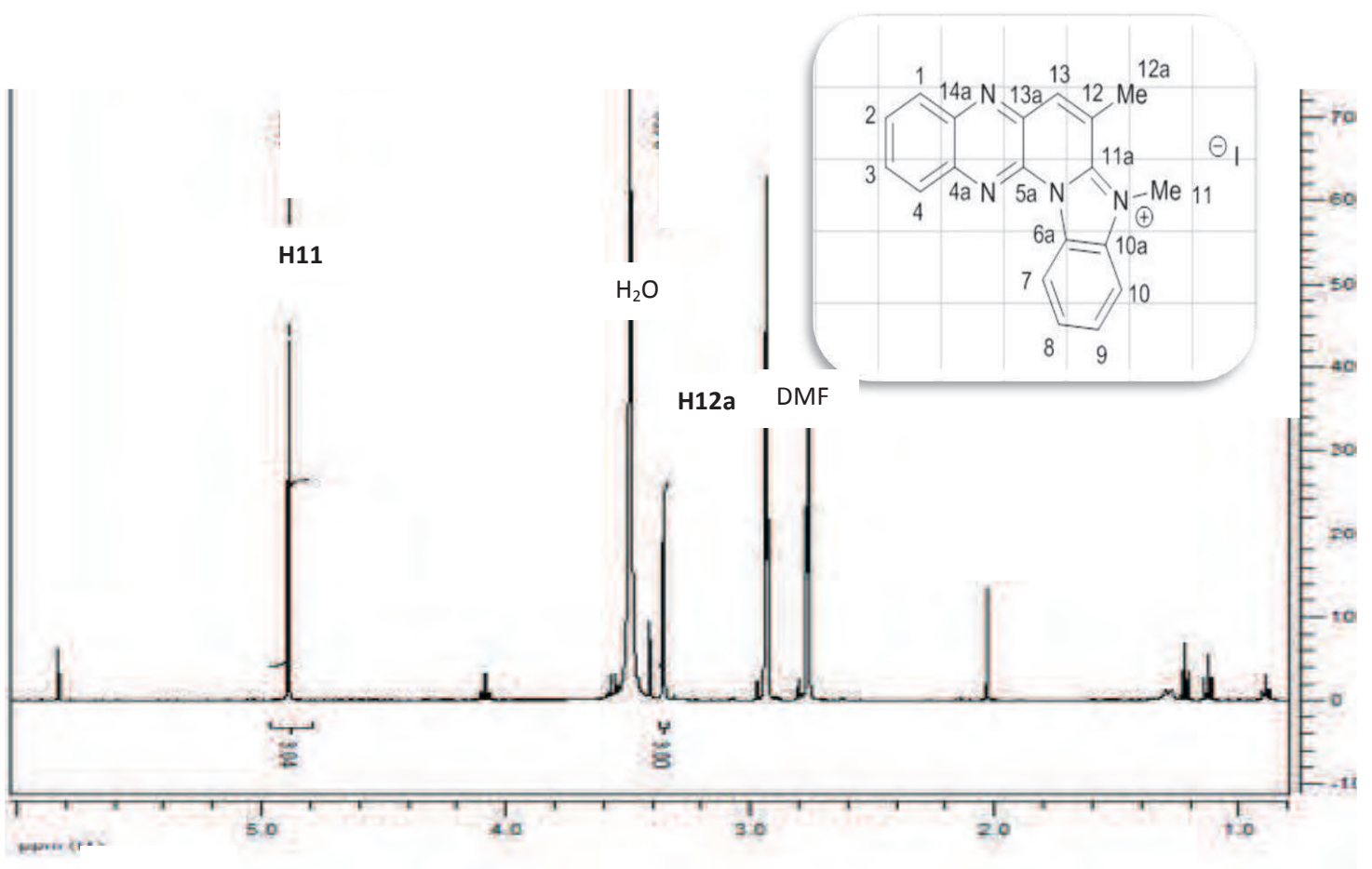


**Spectre 2:** spectre UV-visible du produit 4 dans le méthanol à 3,14 μM

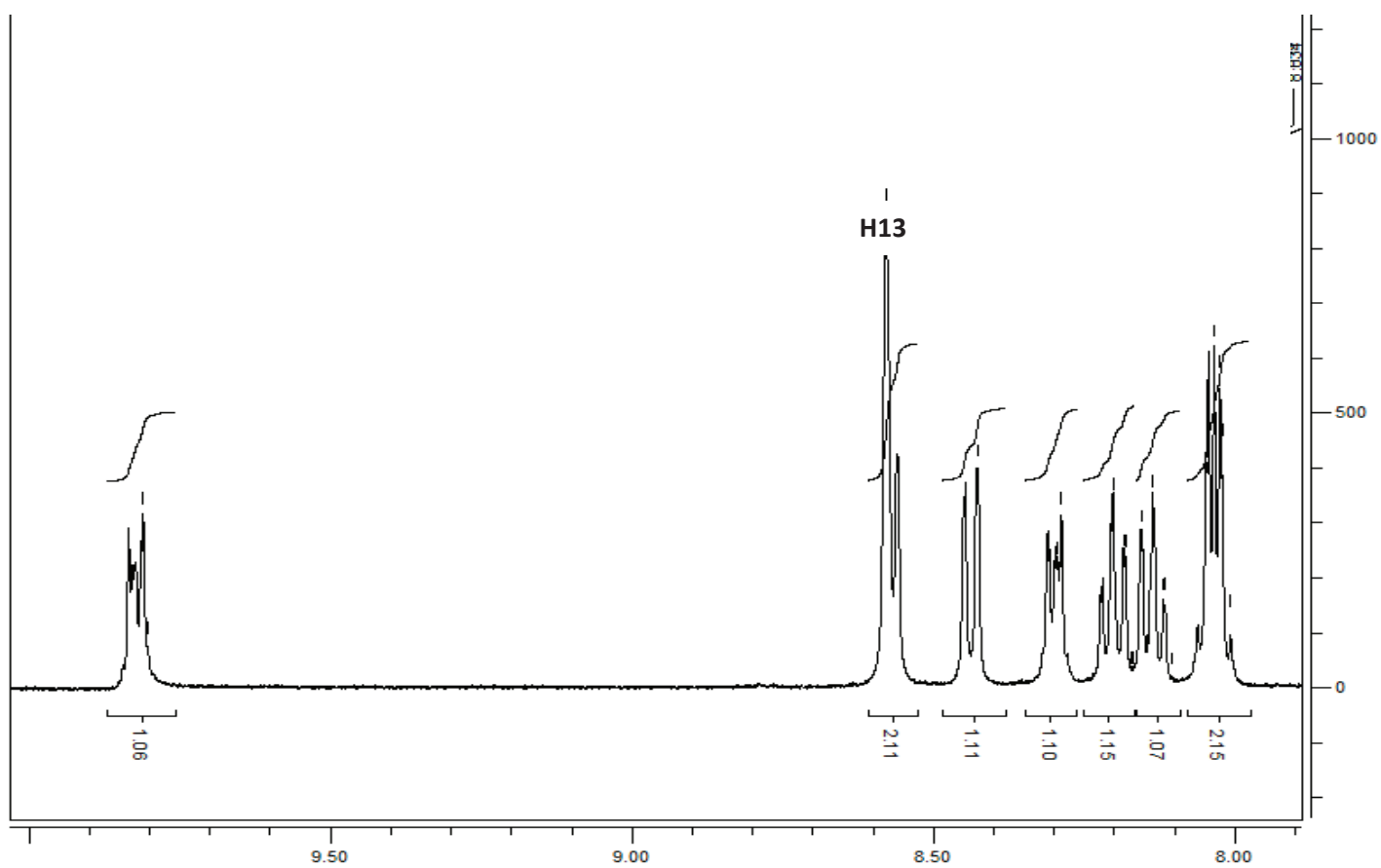
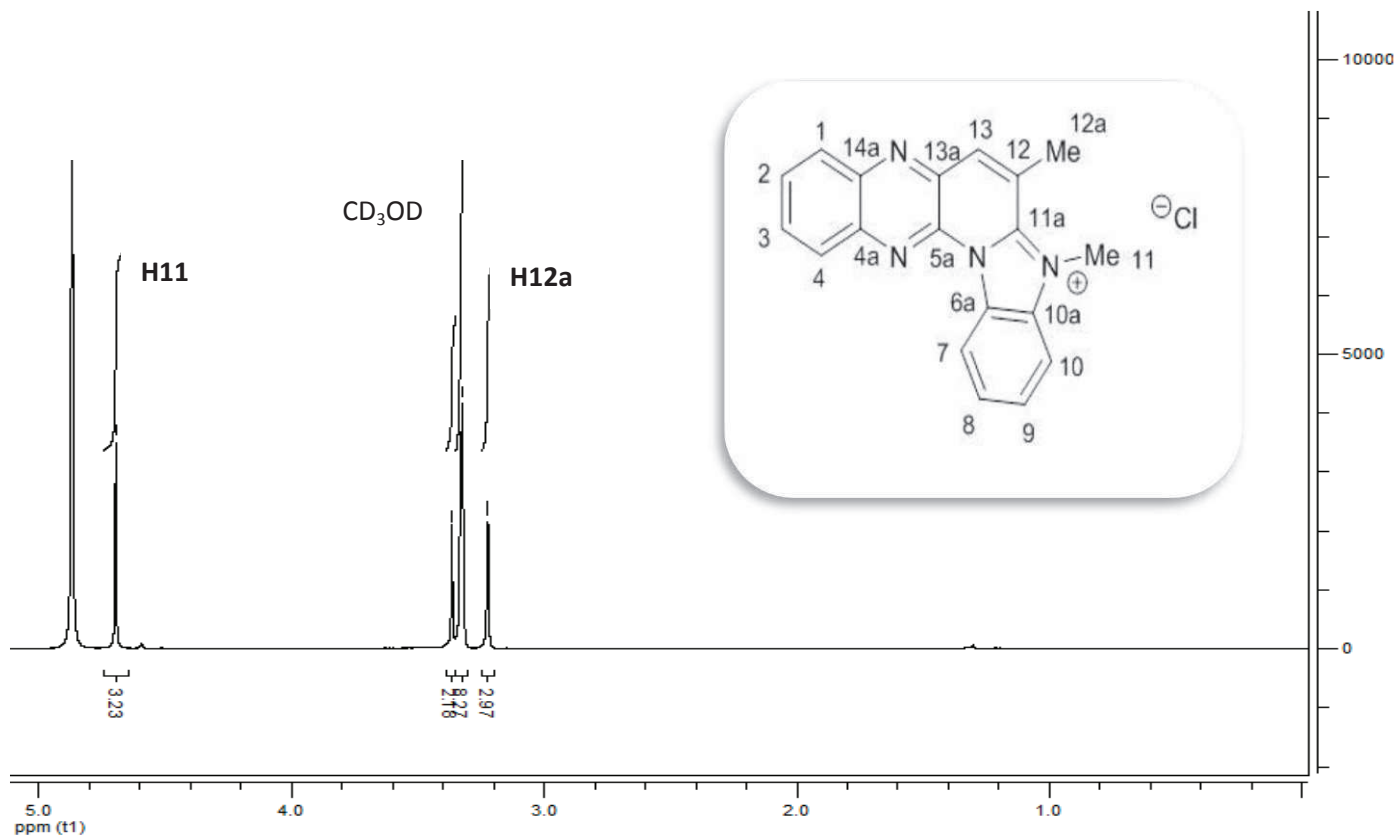


**Spectre 3:** spectre d'excitation et d'émission du produit 4 dans le méthanol à 7,6 μM

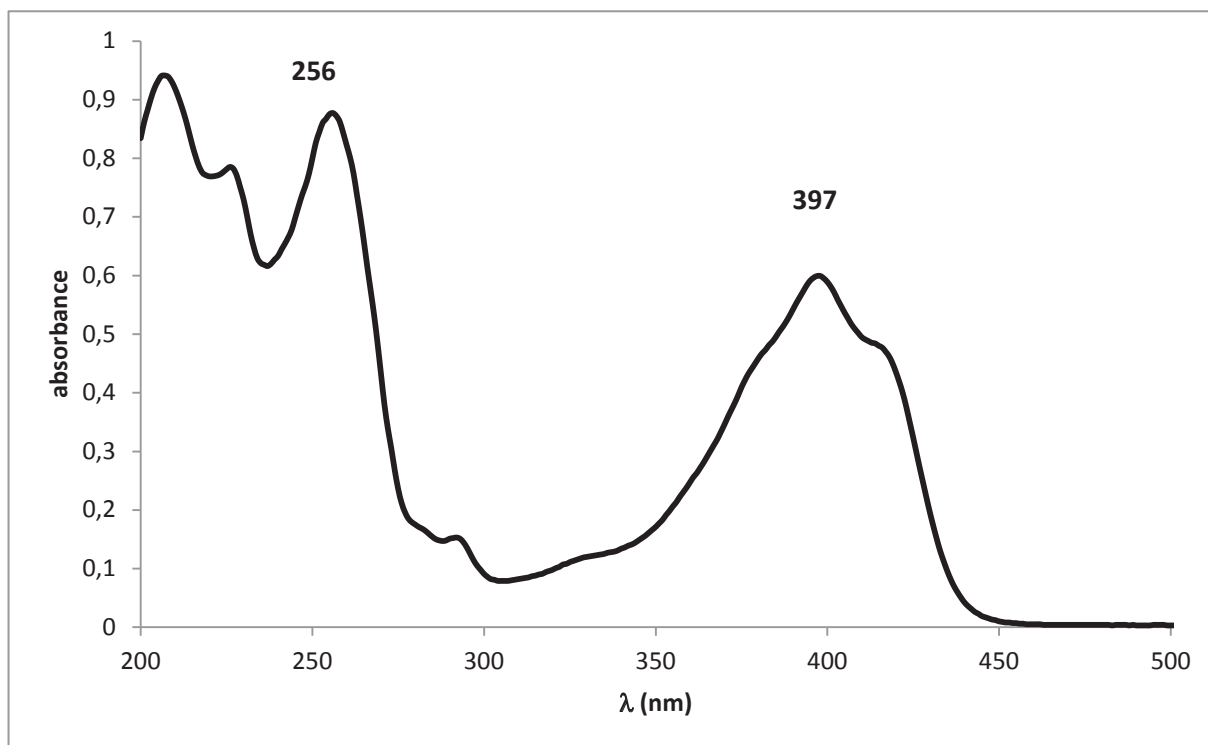




**Spectre 4:** spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) du produit **4'** dans DMF d<sub>7</sub>



Spectre 5: spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) pour du produit **4''** dans CD<sub>3</sub>OD

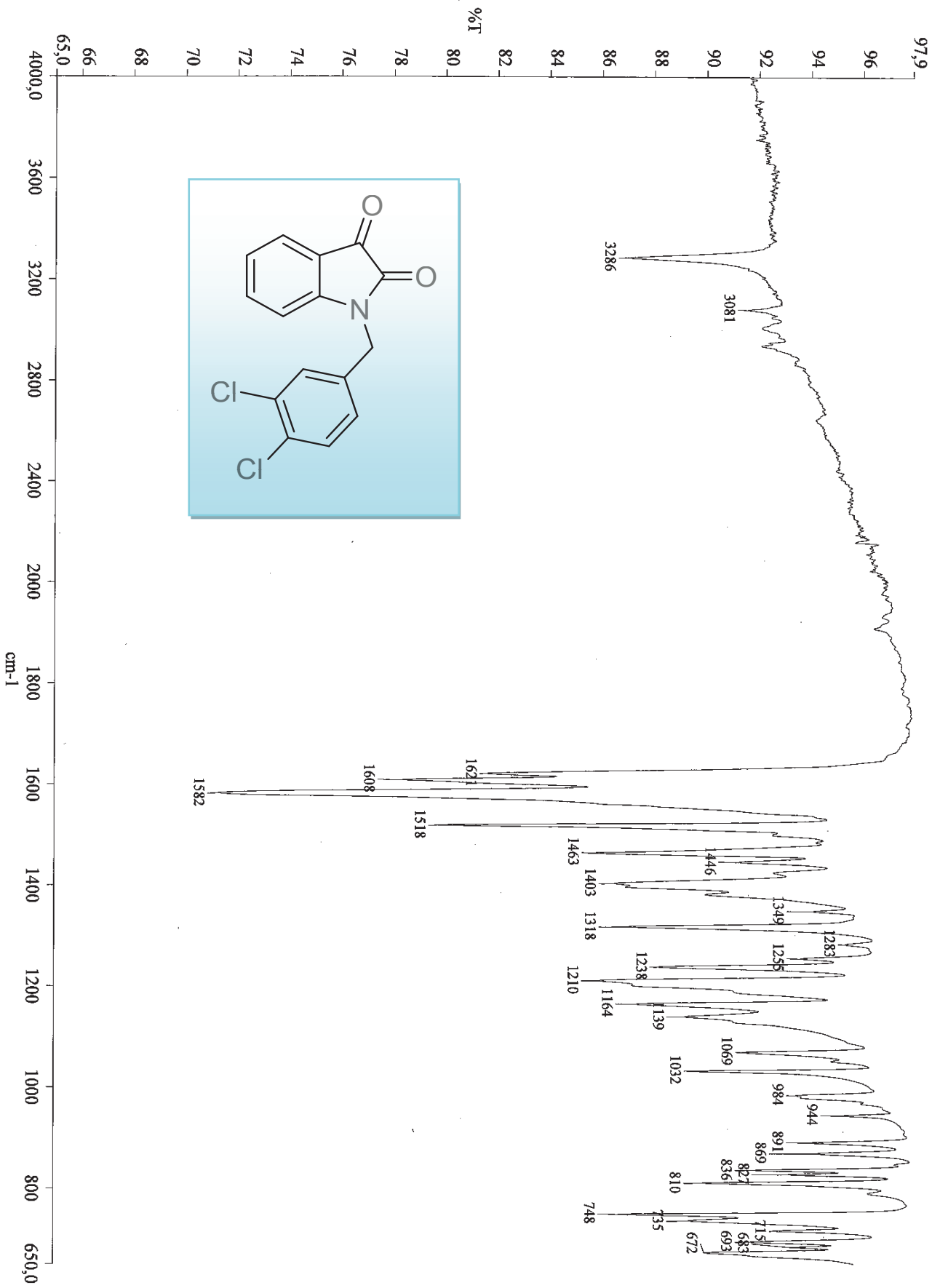


**Spectre 6:** spectre UV-visible du produit 4'' dans l'eau à 30,2 μM

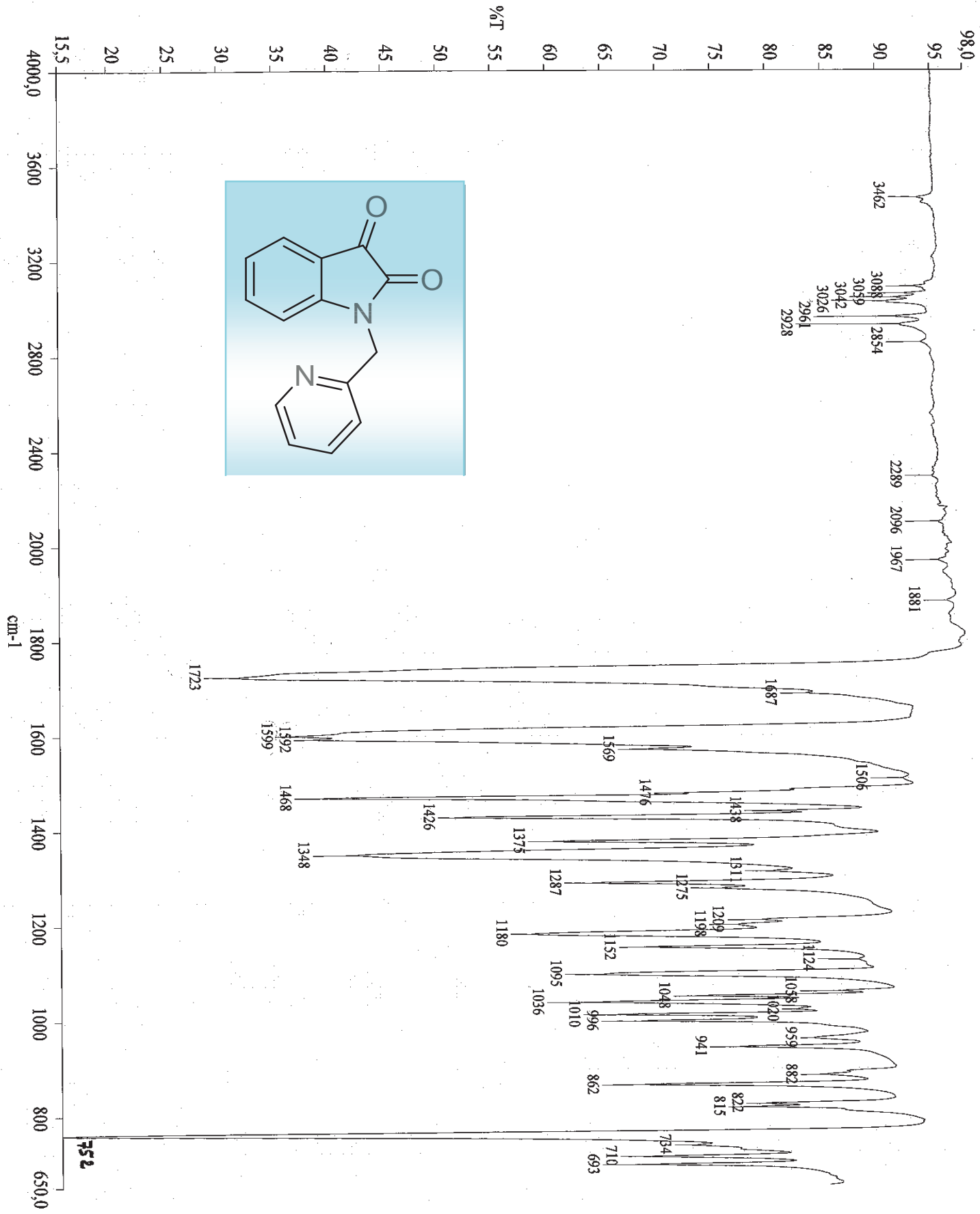


# *ANNEXE "B"*



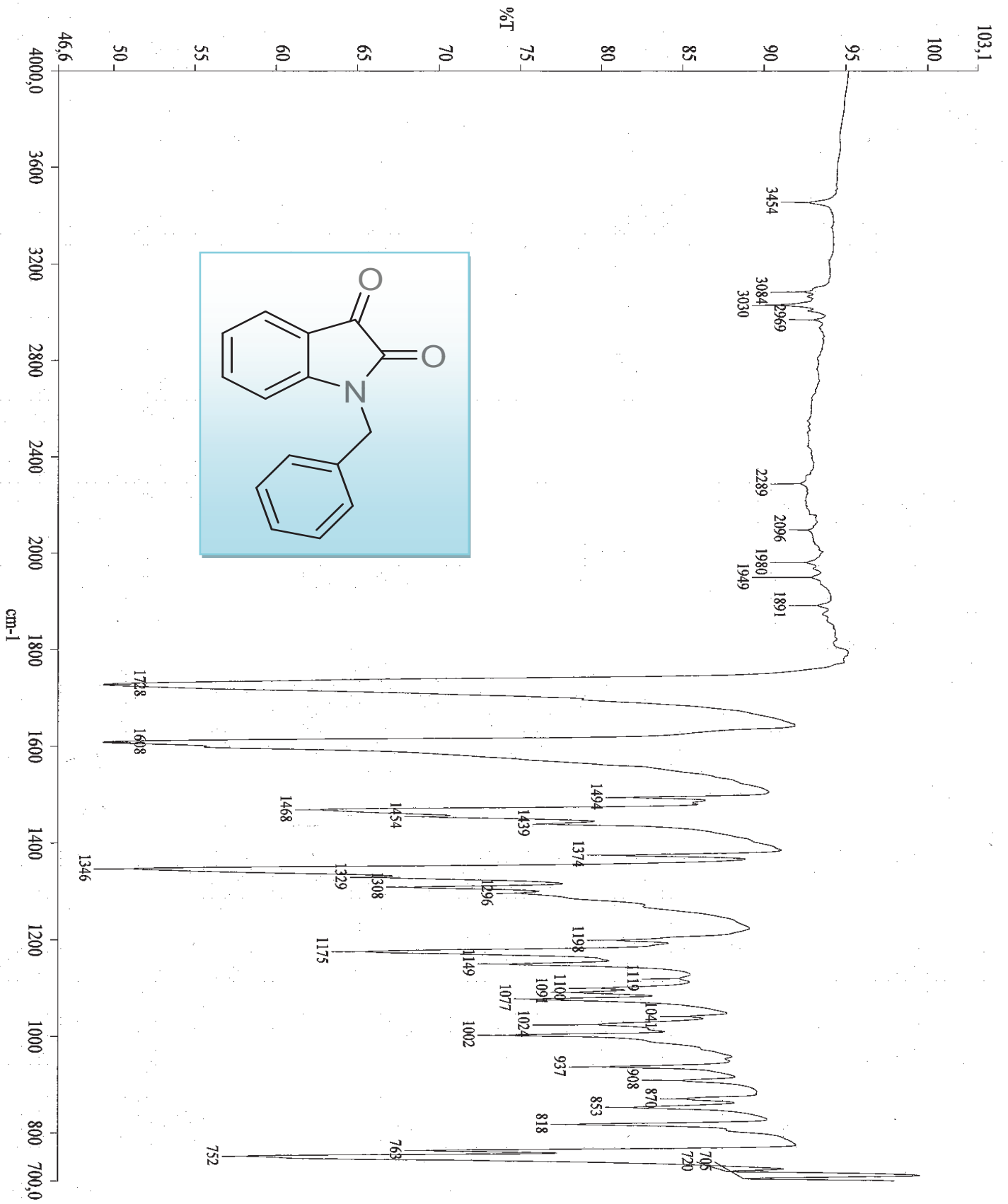


**Spectre 1:** spectre IR du produit **5<sub>1</sub>** forme non protoné

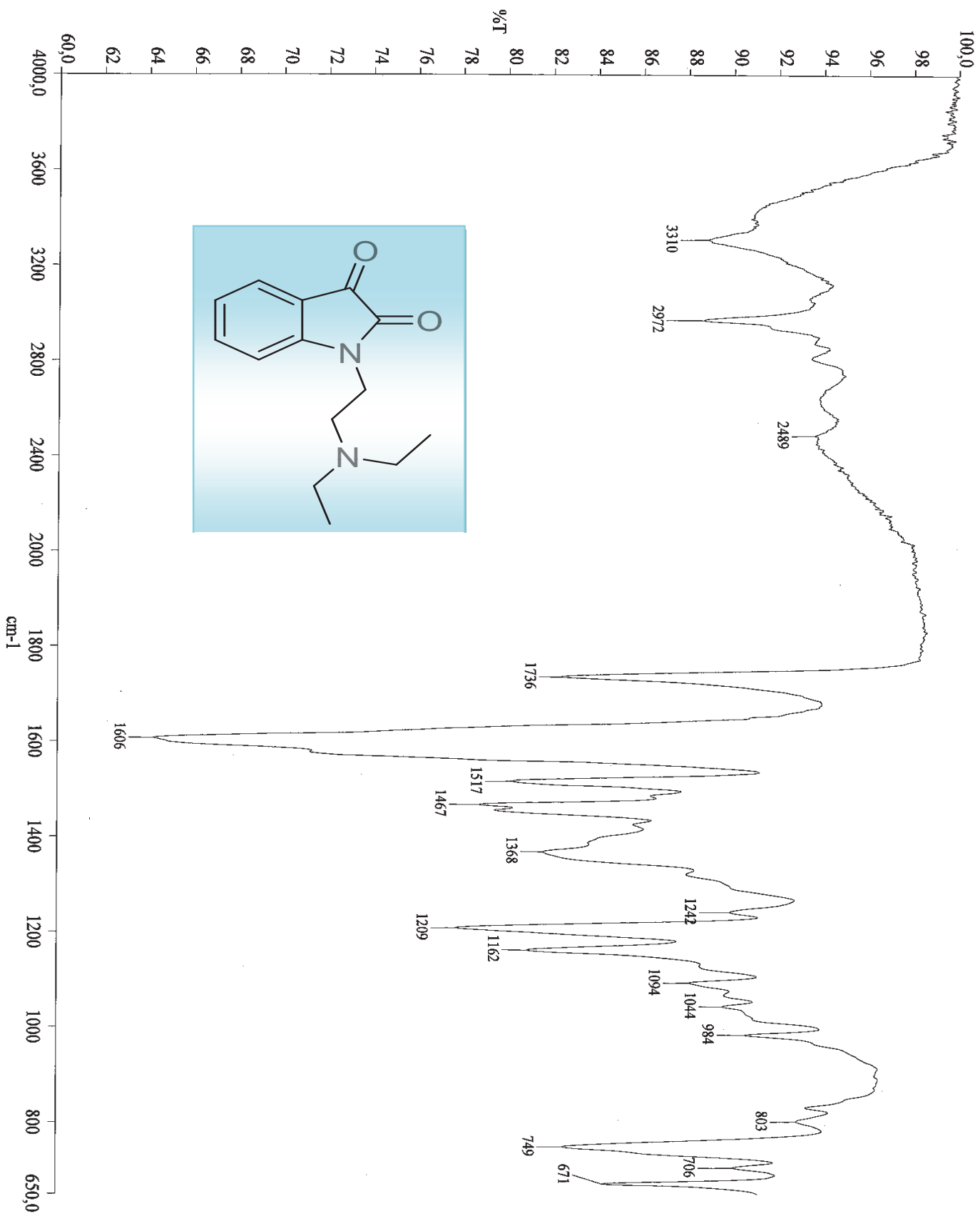


Spectre 2: spectre IR du produit 5<sub>2</sub>

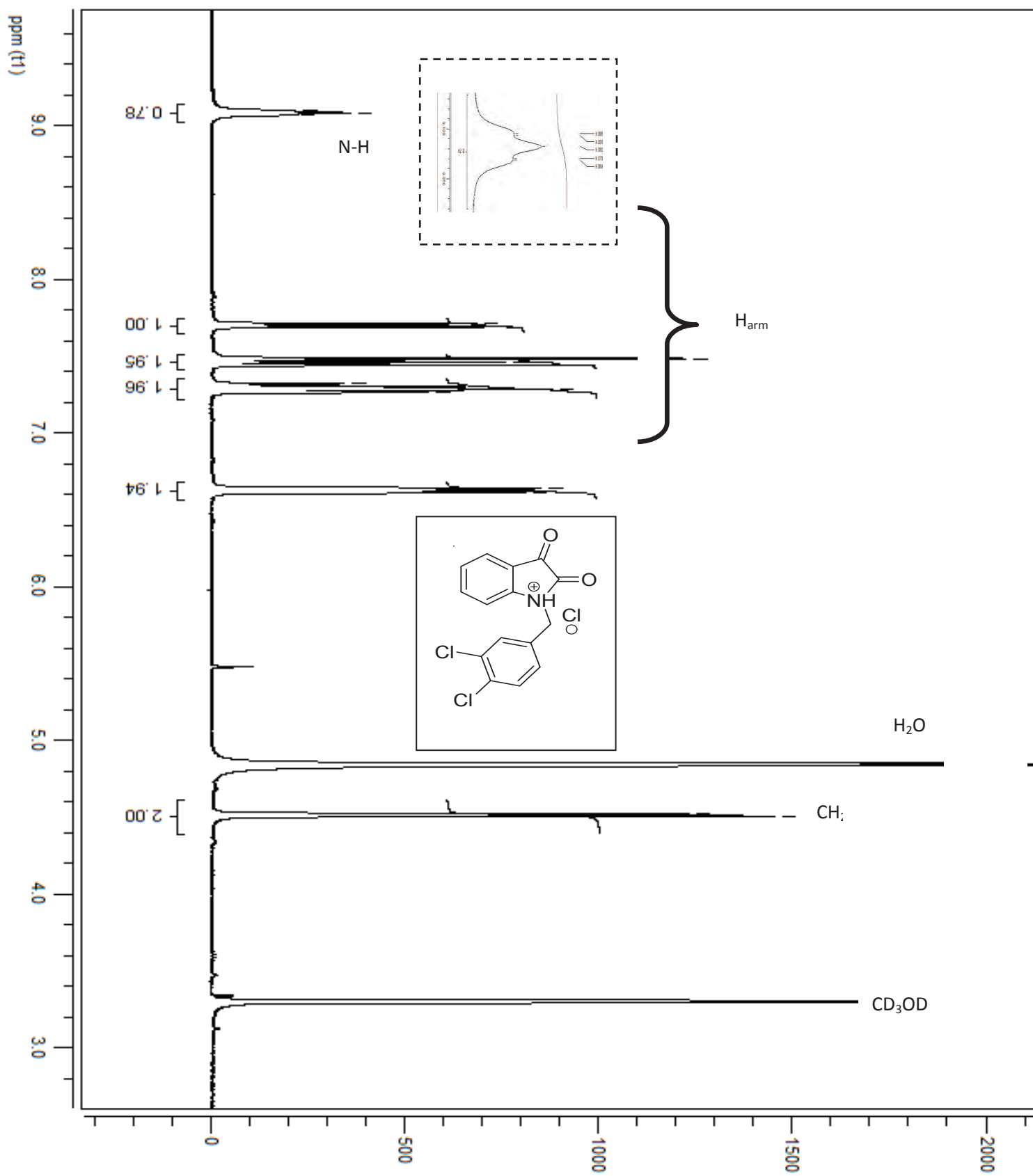




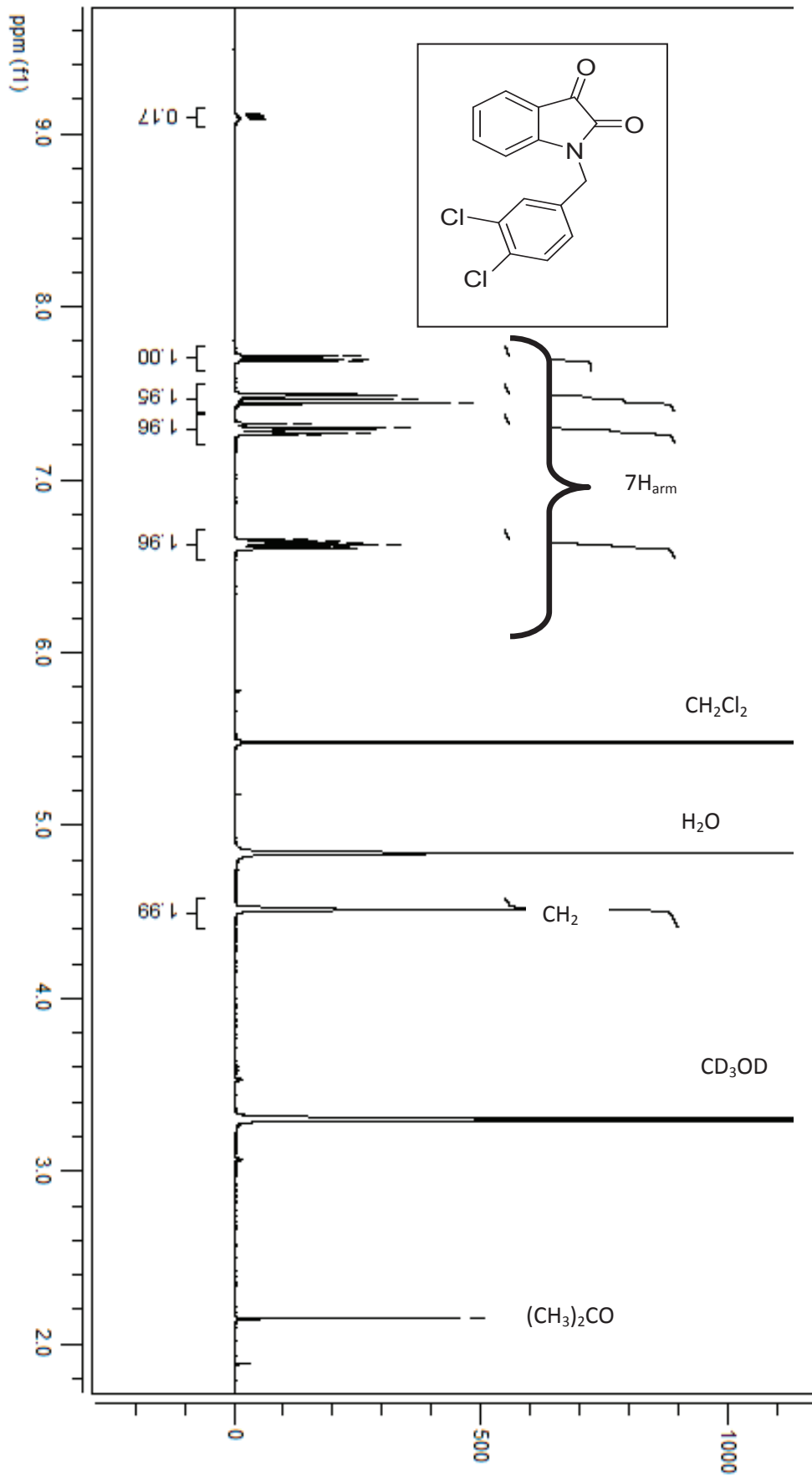
Spectre 3: spectre IR du produit 5<sub>3</sub>



Spectre 4: spectre IR du produit 54



Spectre 5: spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) du produit **5<sub>1</sub>** forme chlorhydrate dans  $\text{CD}_3\text{OD}$



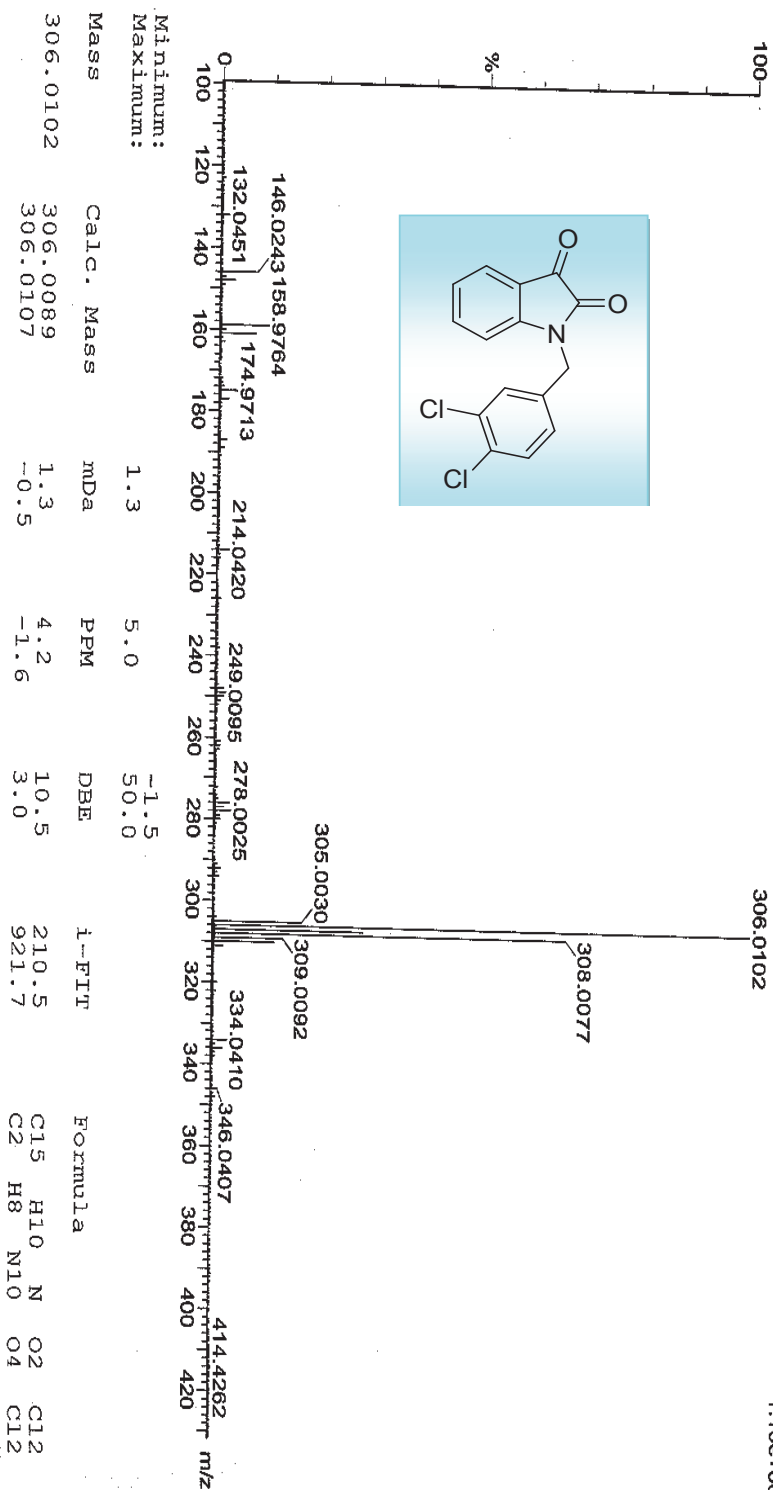
**Spectre 6:** spectre RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) du produit  $\underline{5}_1$  forme non protoné dans CD<sub>3</sub>OD

é dans CD<sub>3</sub>OD

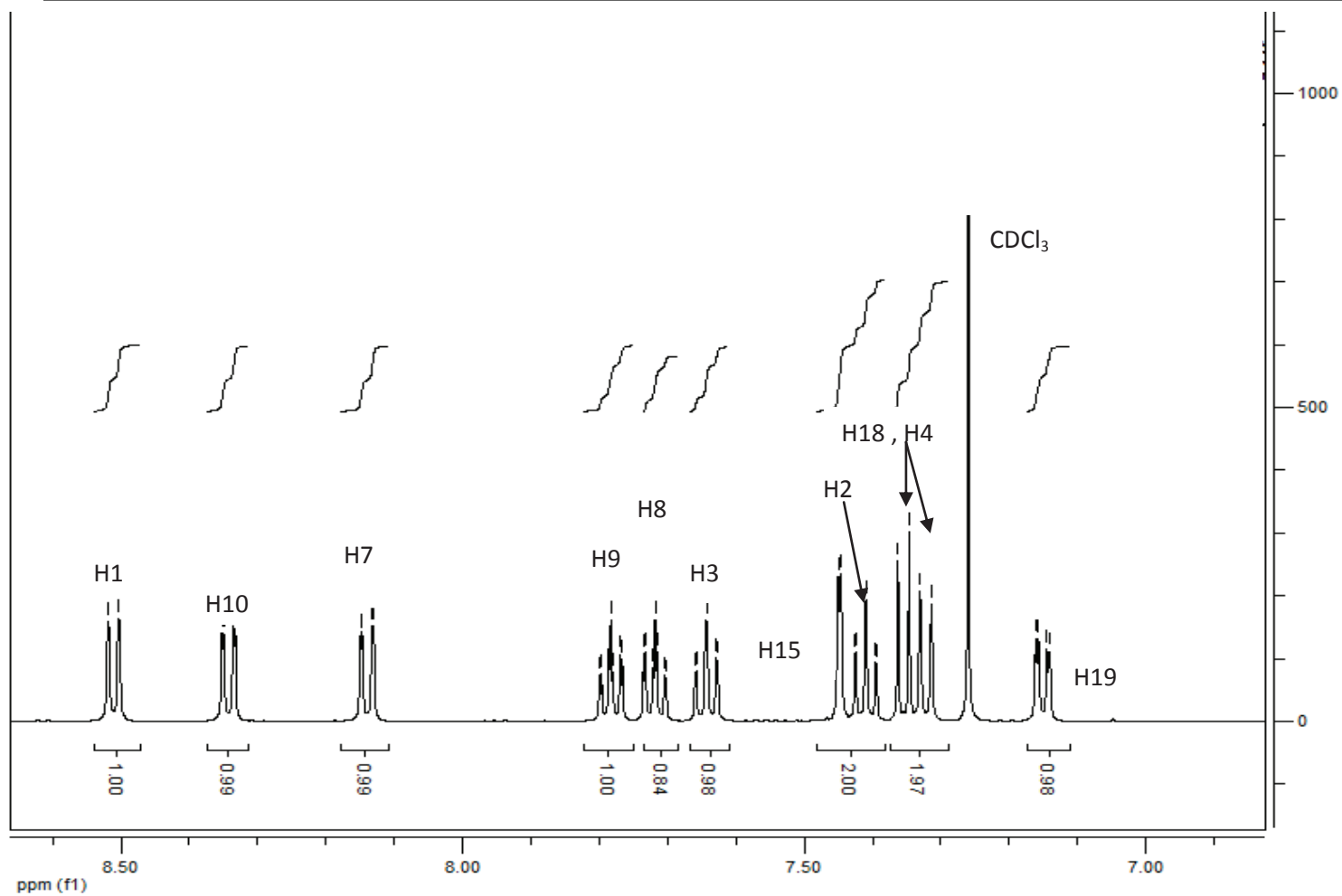
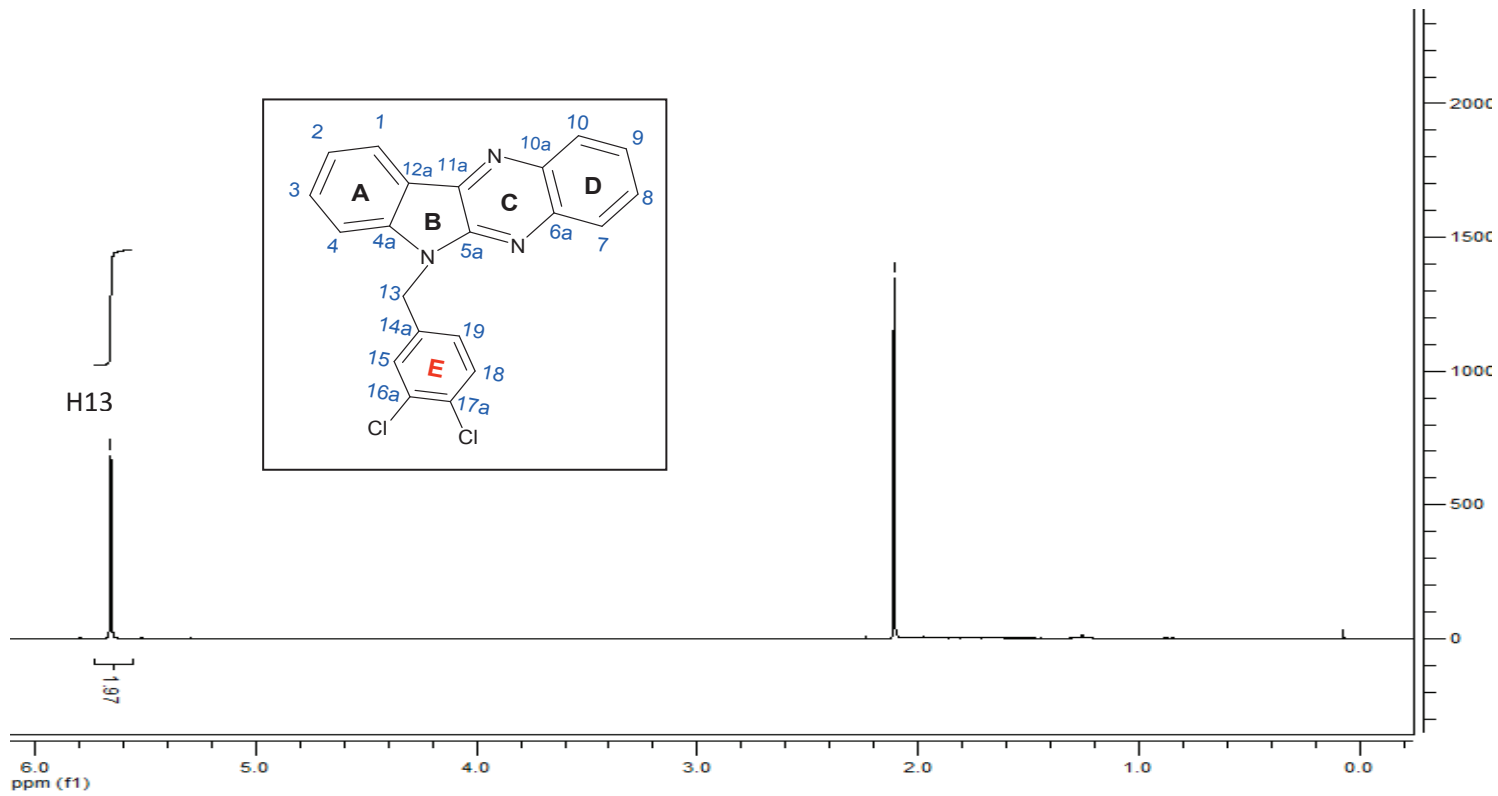
C: 0-100 H: 0-100 N: 0-10 O: 0-10  
DCI-CH4  
20140113-AZ10 13 (0.417) Cm (13:14-5:6x5.000)

CI: 2-2  
GCT Premier CAB109

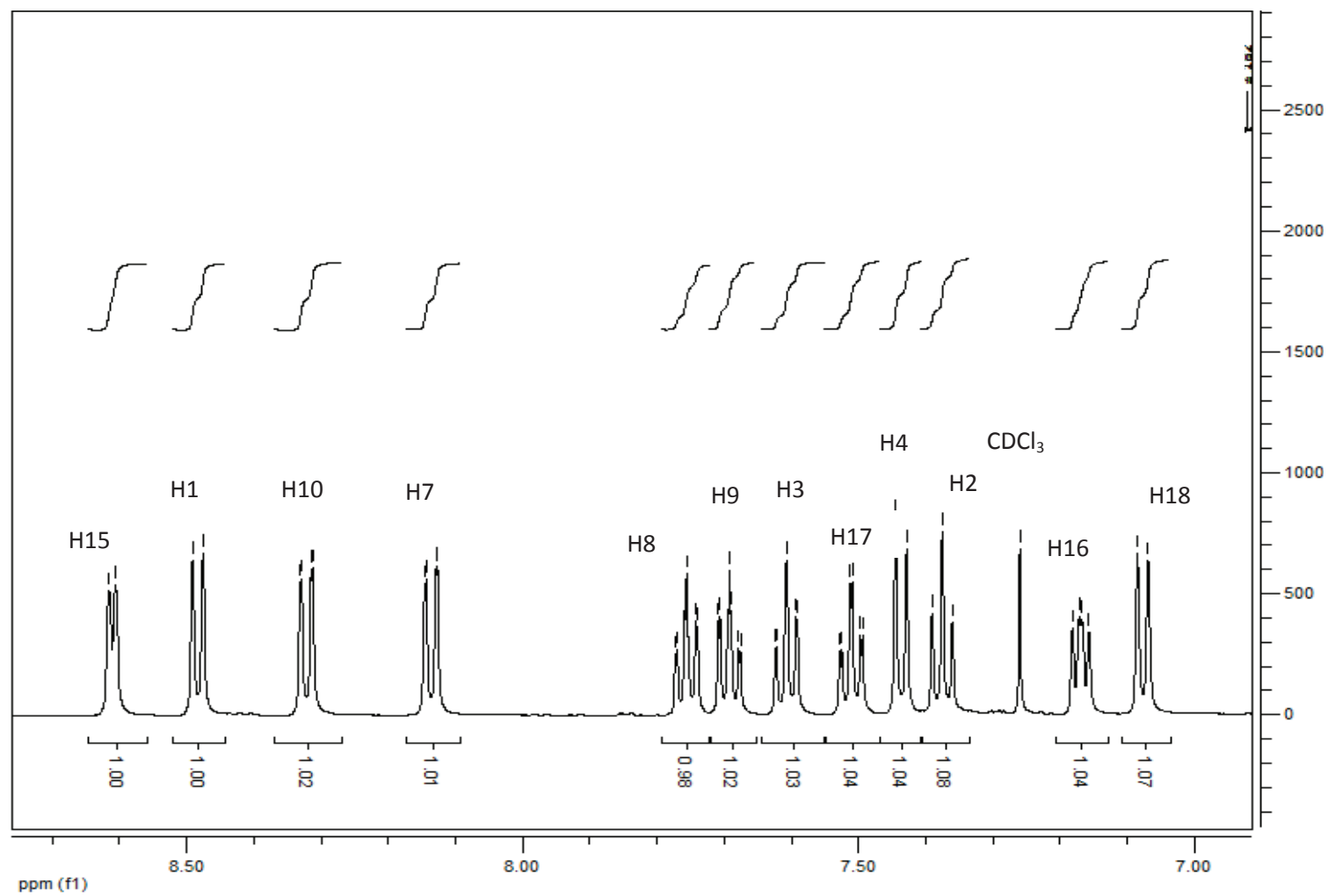
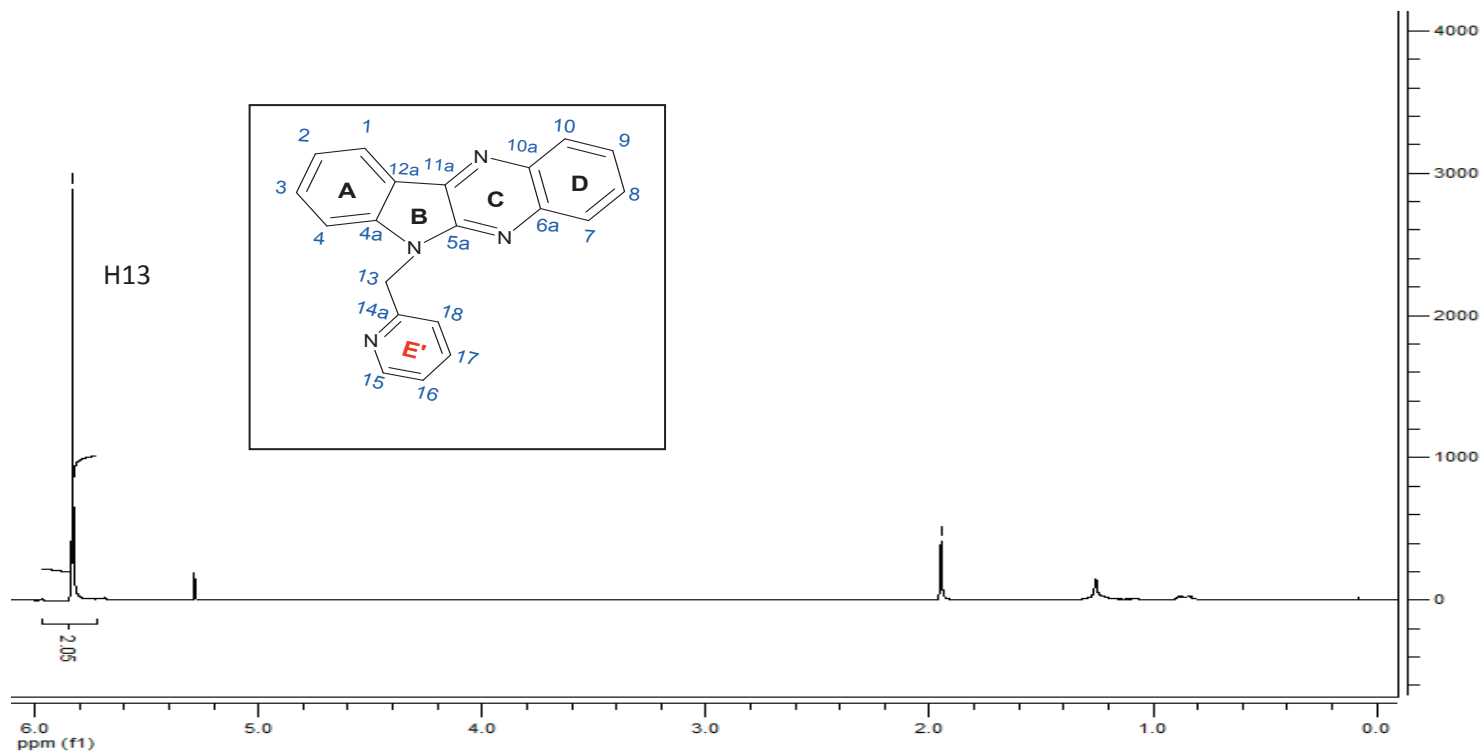
13-Jan-2014 14:50:54  
TOF MS CI+  
1.10e+004



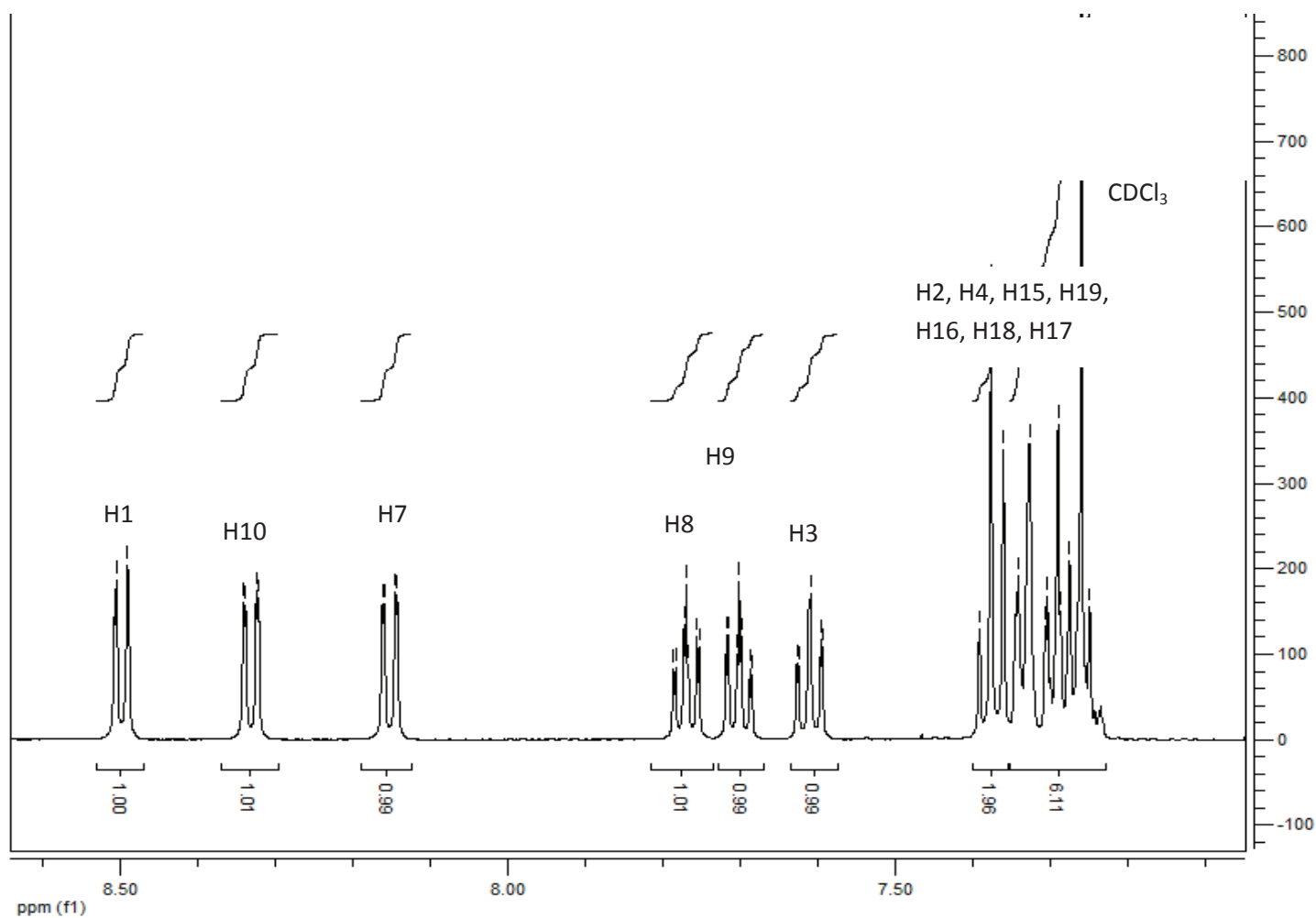
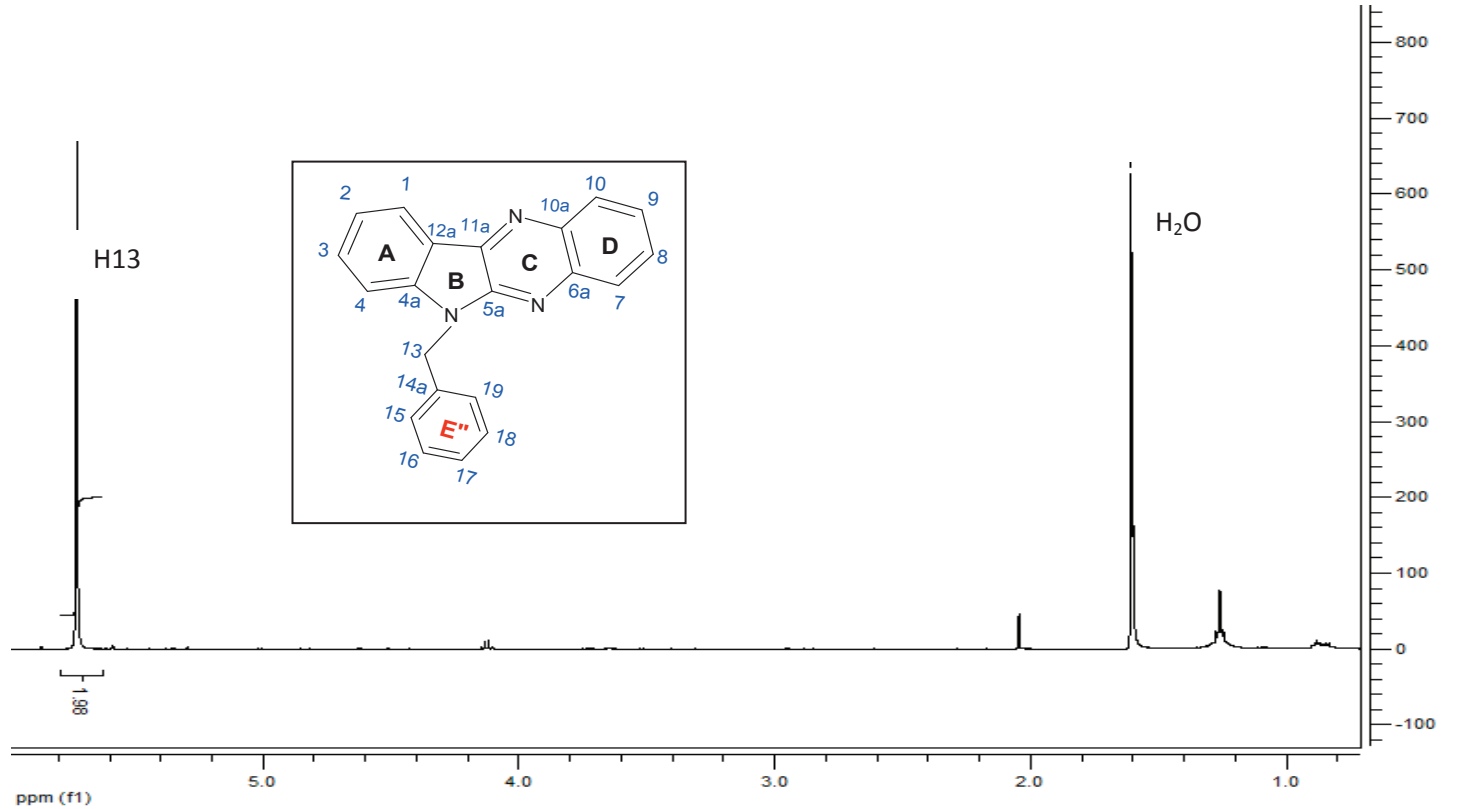
Spectre 7 : spectre de masse haute résolution du produit 5<sub>1</sub> forme non protoné



**Spectre 8** : spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) du produit **6<sub>1</sub>** dans CDCl<sub>3</sub>

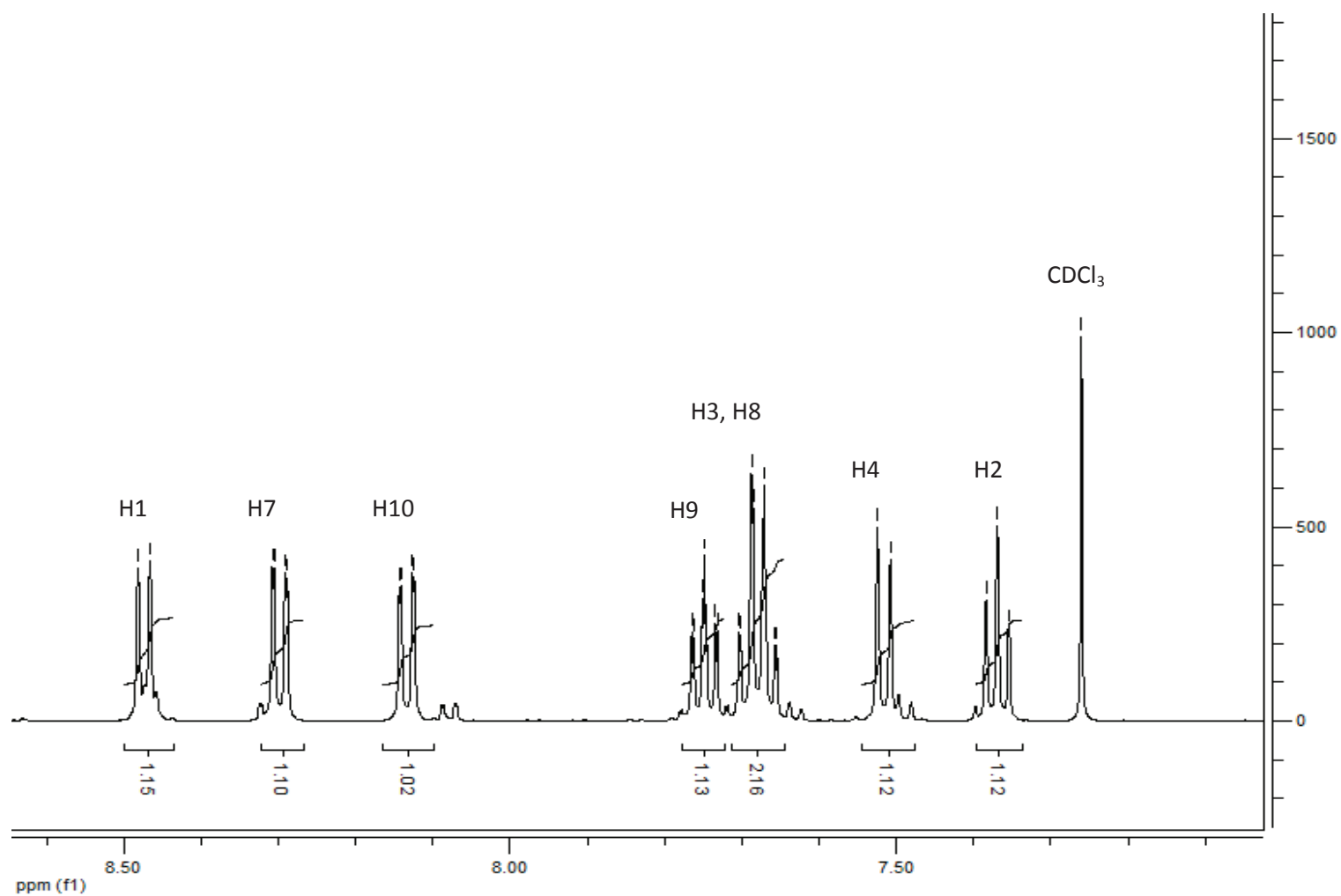
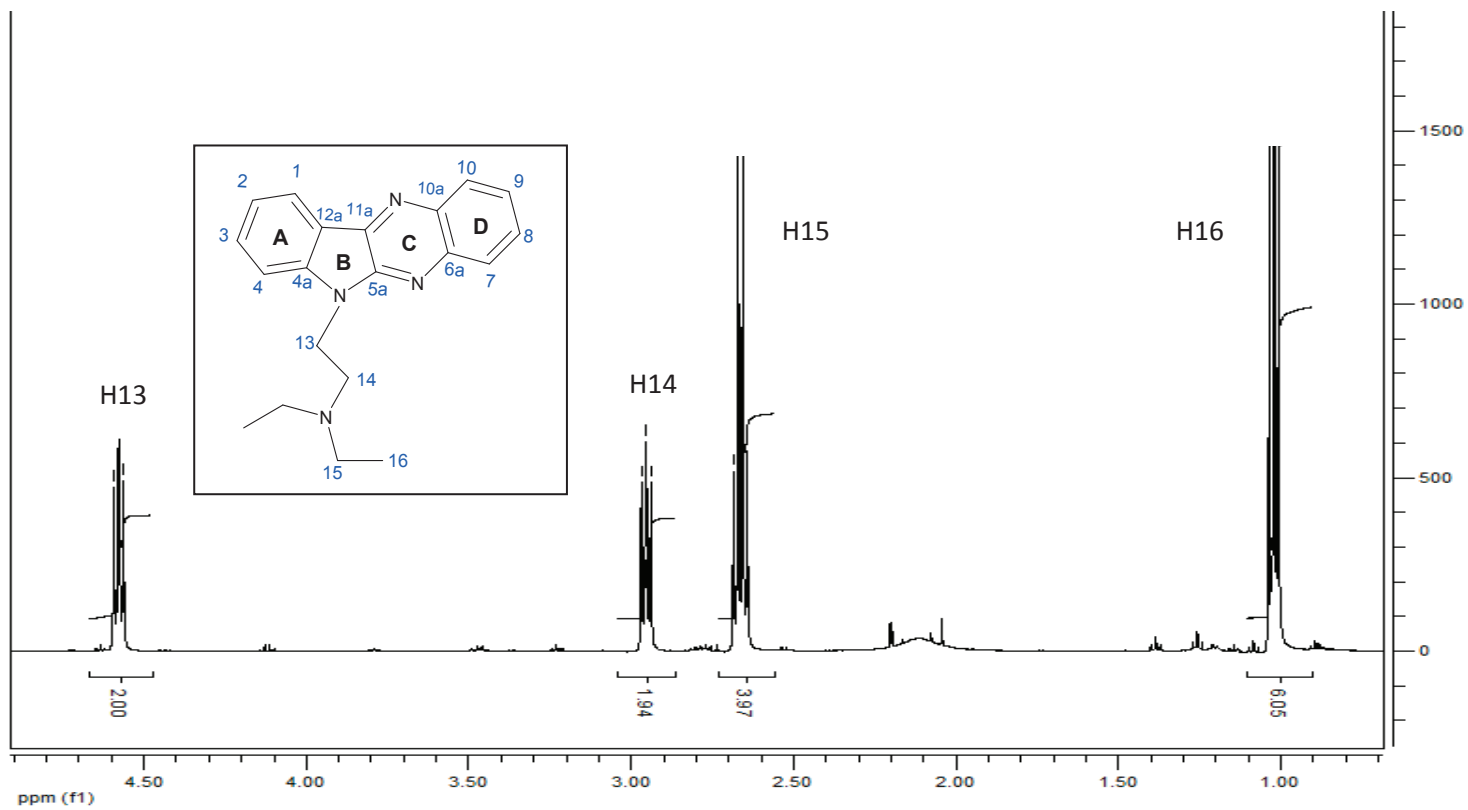


Spectre 9 : spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) du produit **6<sub>2</sub>** dans CDCl<sub>3</sub>

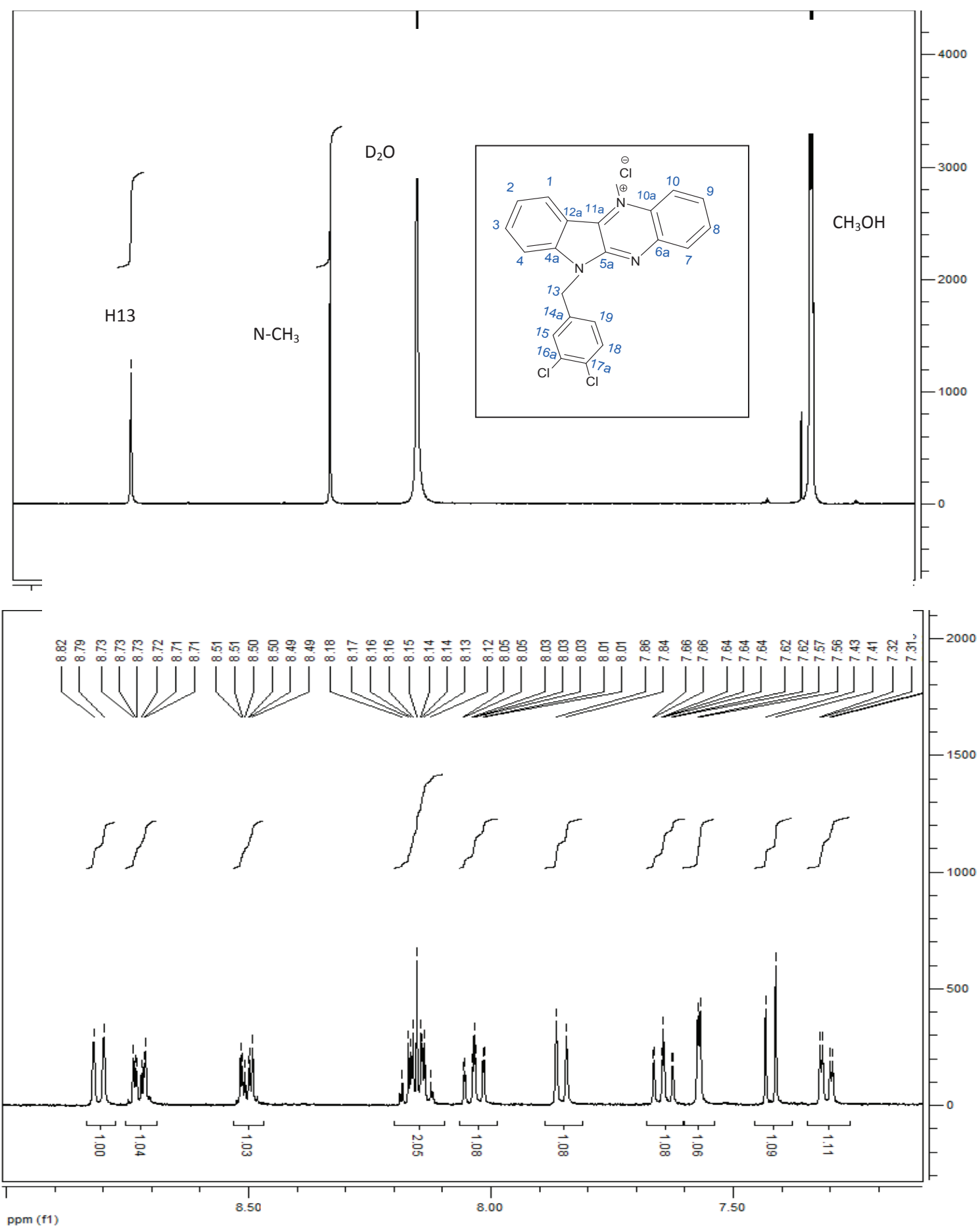


**Spectre 10:** spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) du produit **6<sub>3</sub>** dans CDCl<sub>3</sub>

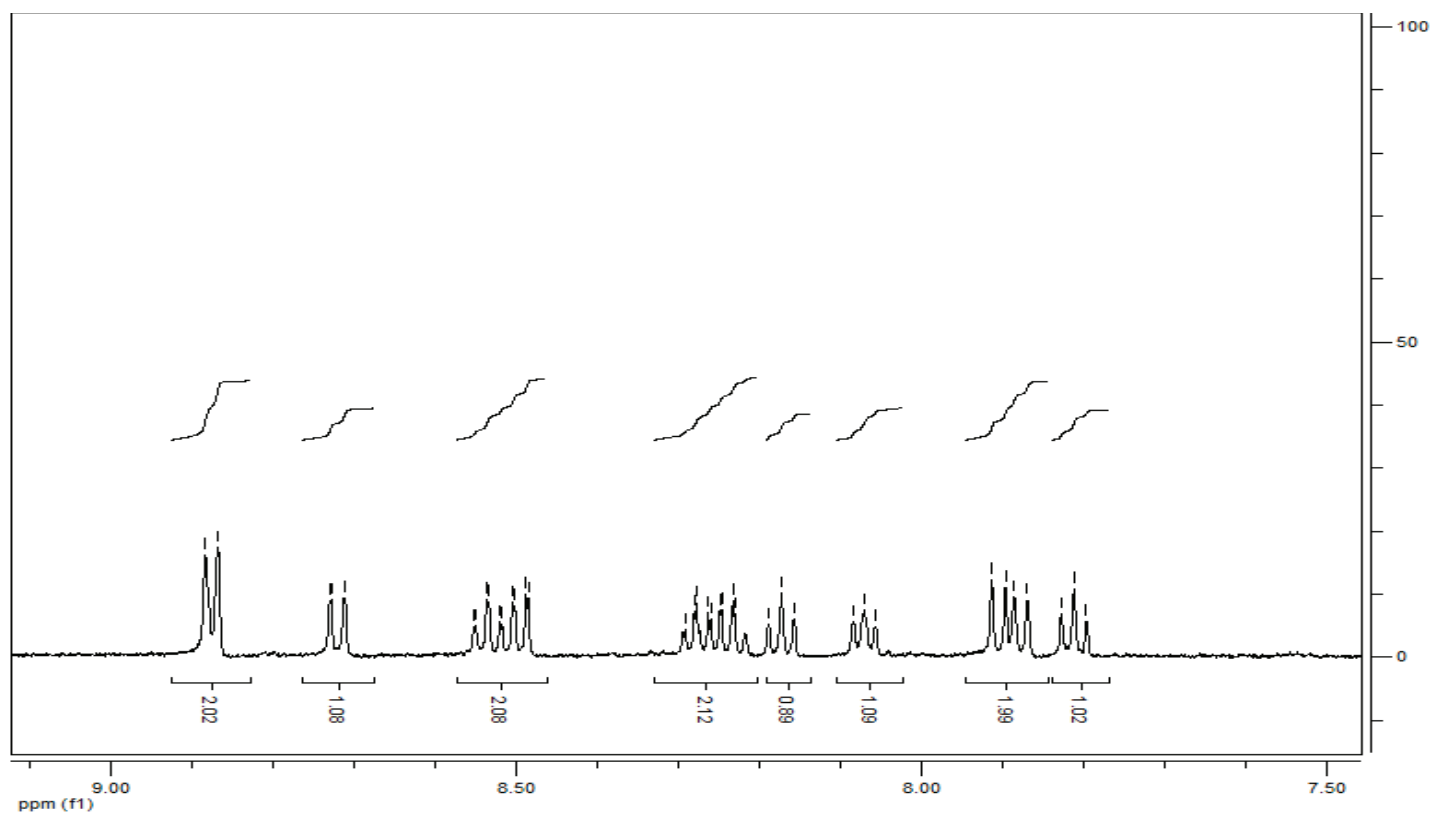
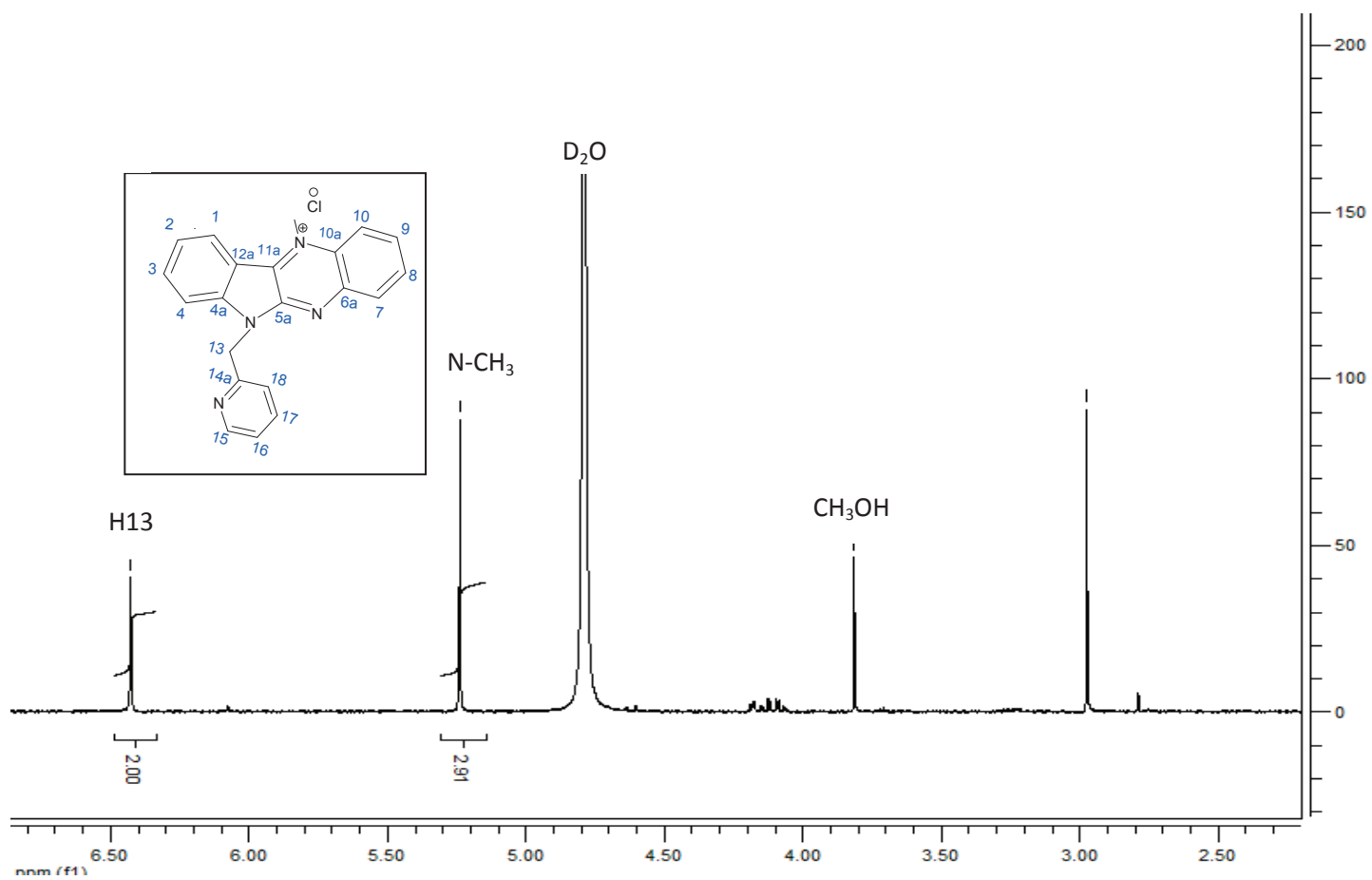




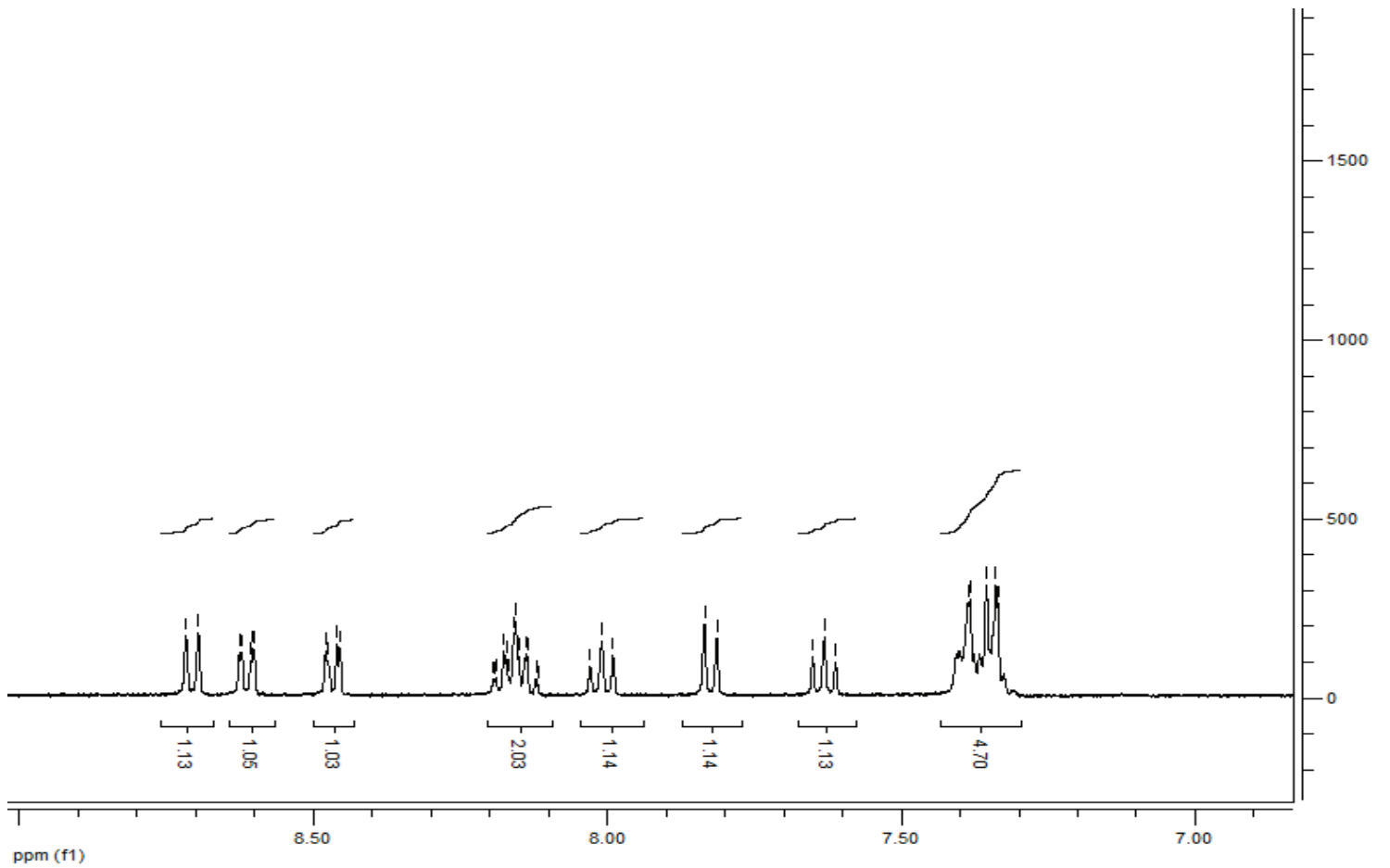
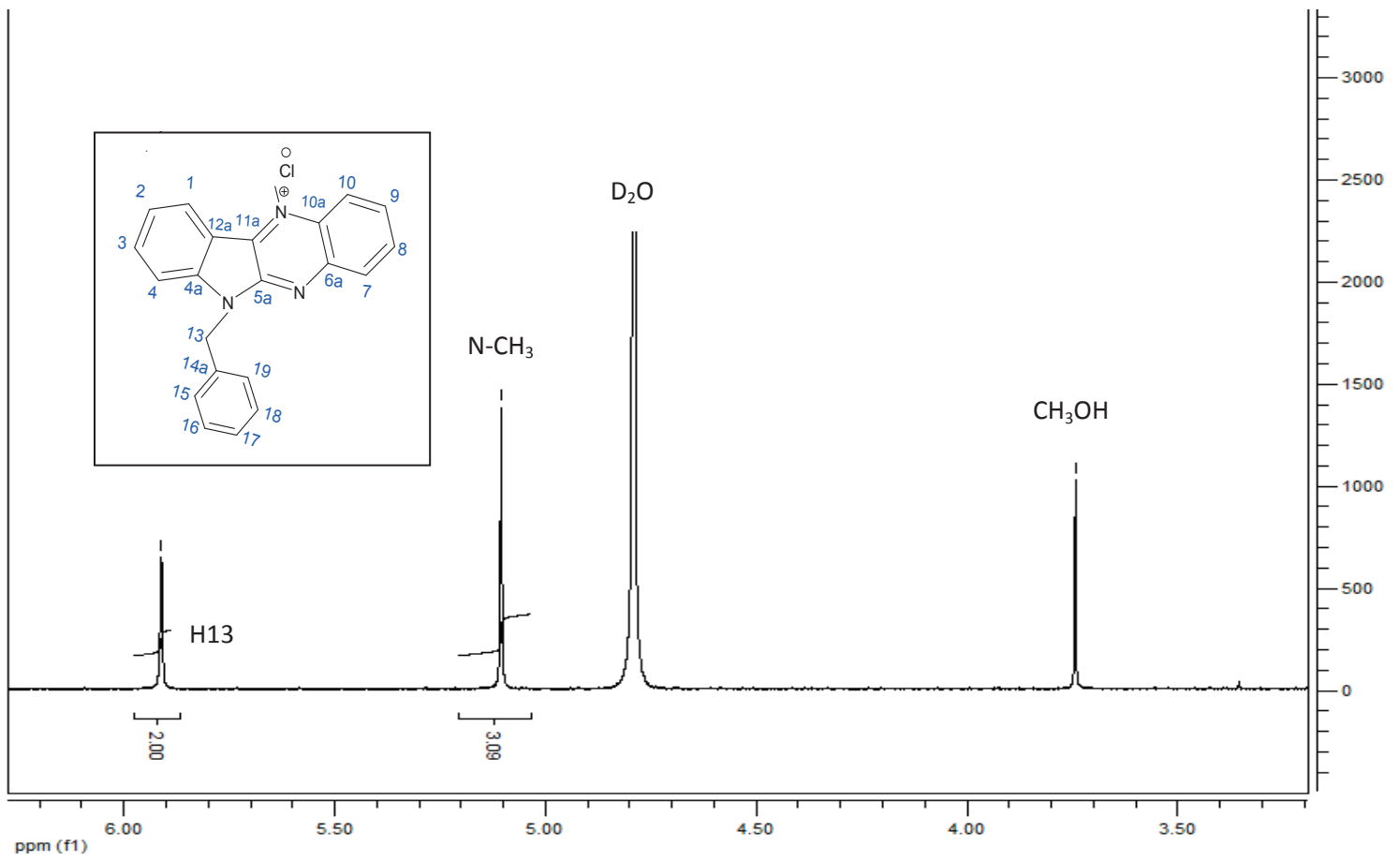
**Spectre 11** : spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) du produit **6<sub>a</sub>** dans CDCl<sub>3</sub>



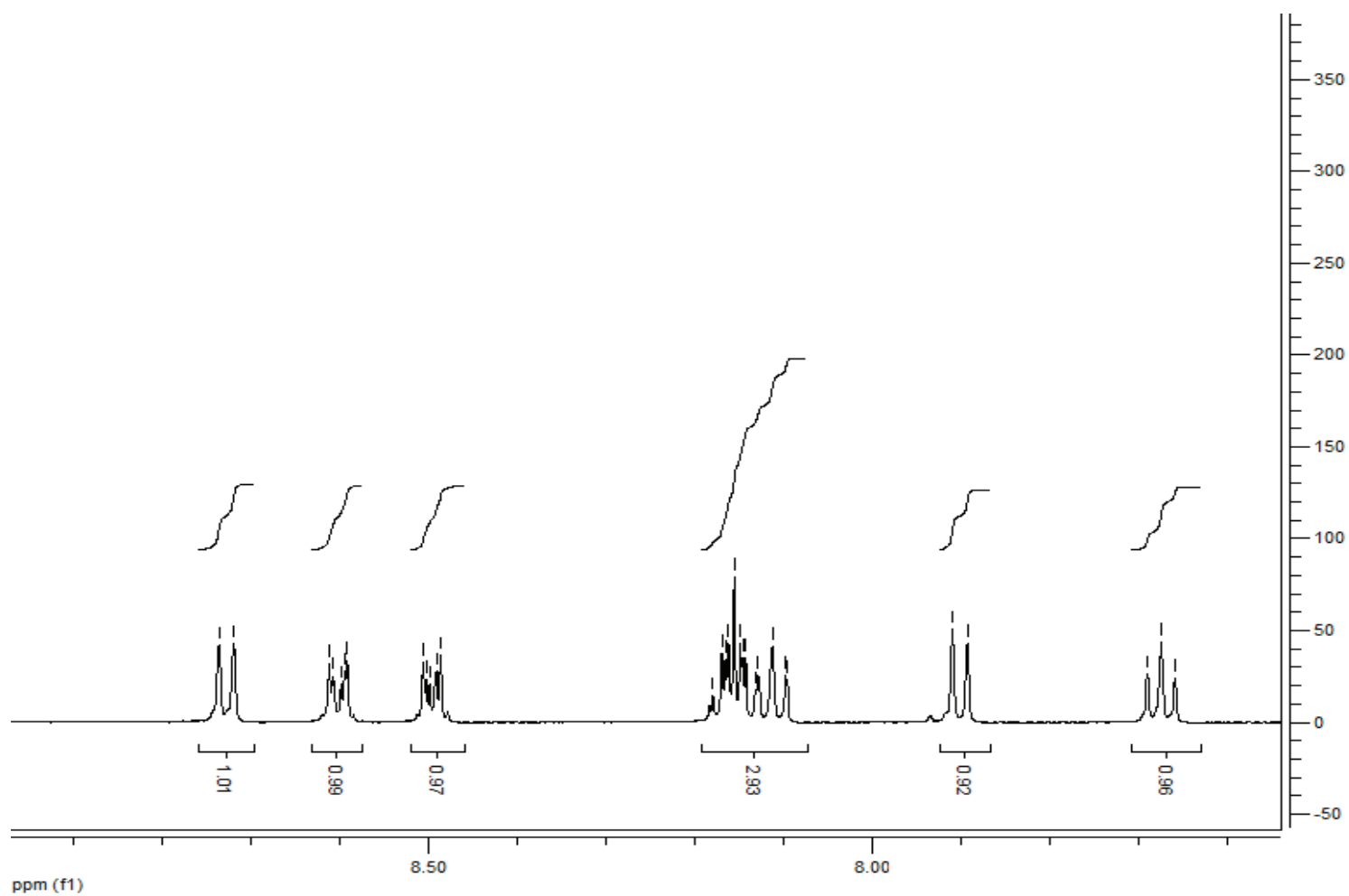
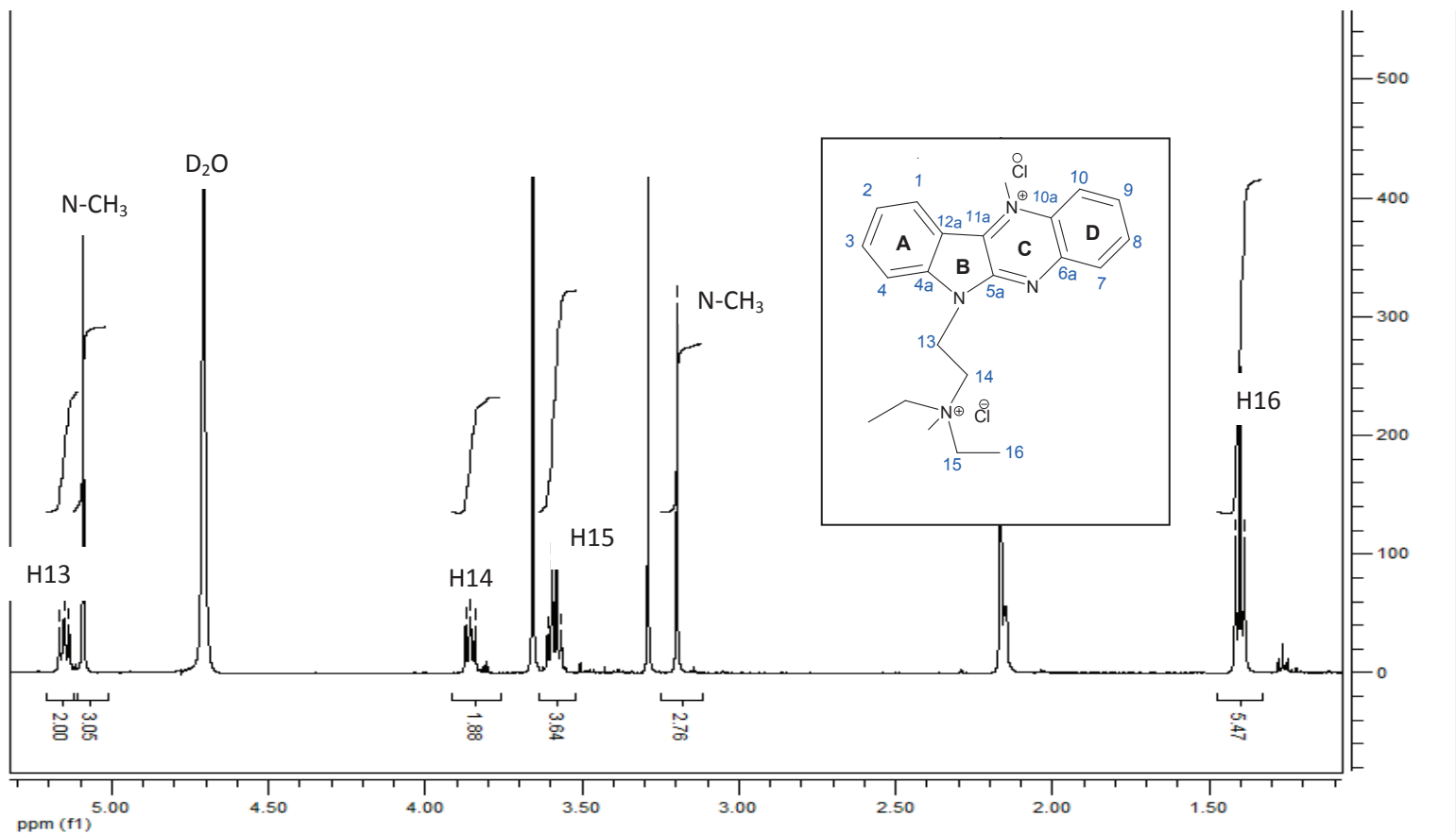
Spectre 12 : spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) du produit **8<sub>1</sub>** dans  $\text{D}_2\text{O}$



Spectre 13 : spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) du produit **8<sub>2</sub>** dans D<sub>2</sub>O



**Spectre 14** : spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) du produit **8<sub>3</sub>** dans D<sub>2</sub>O



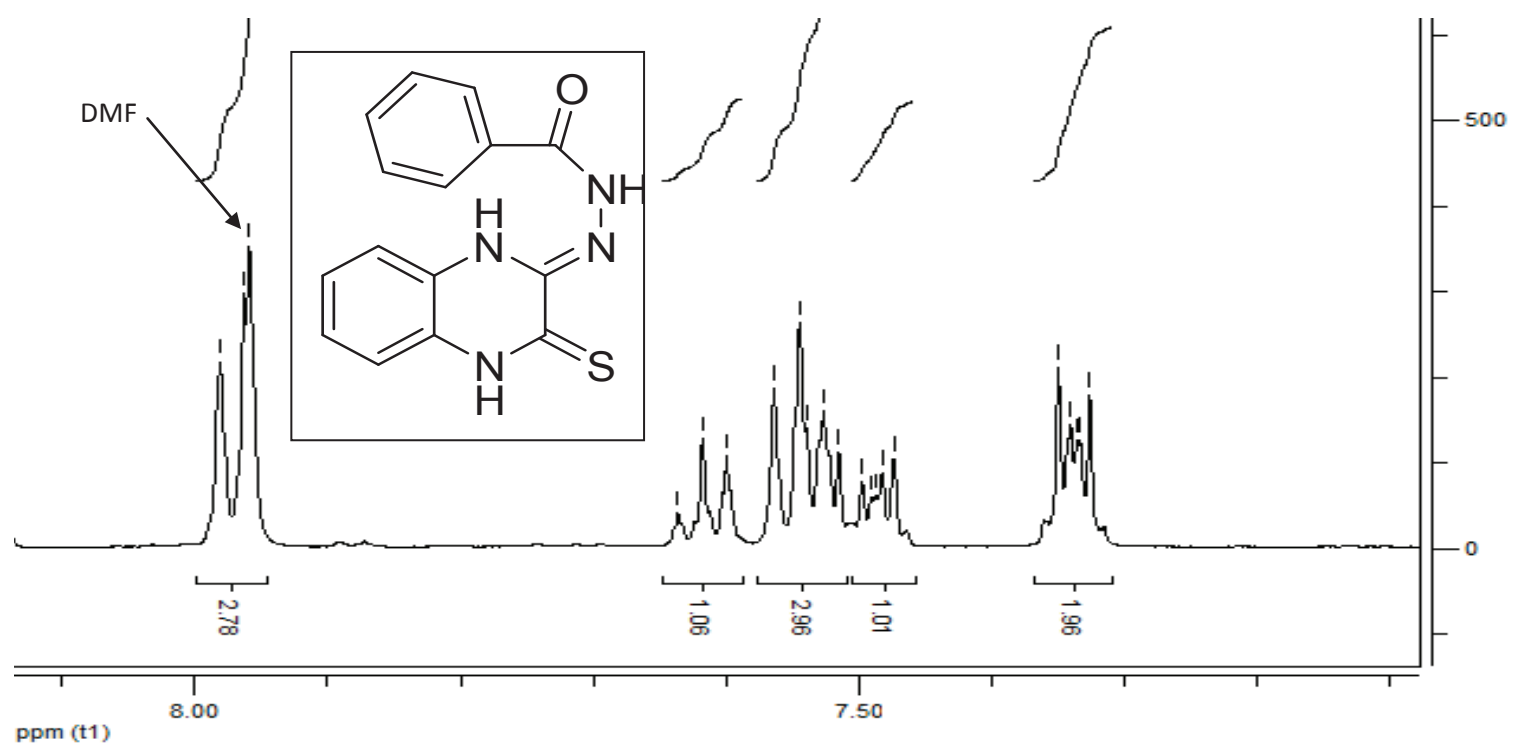
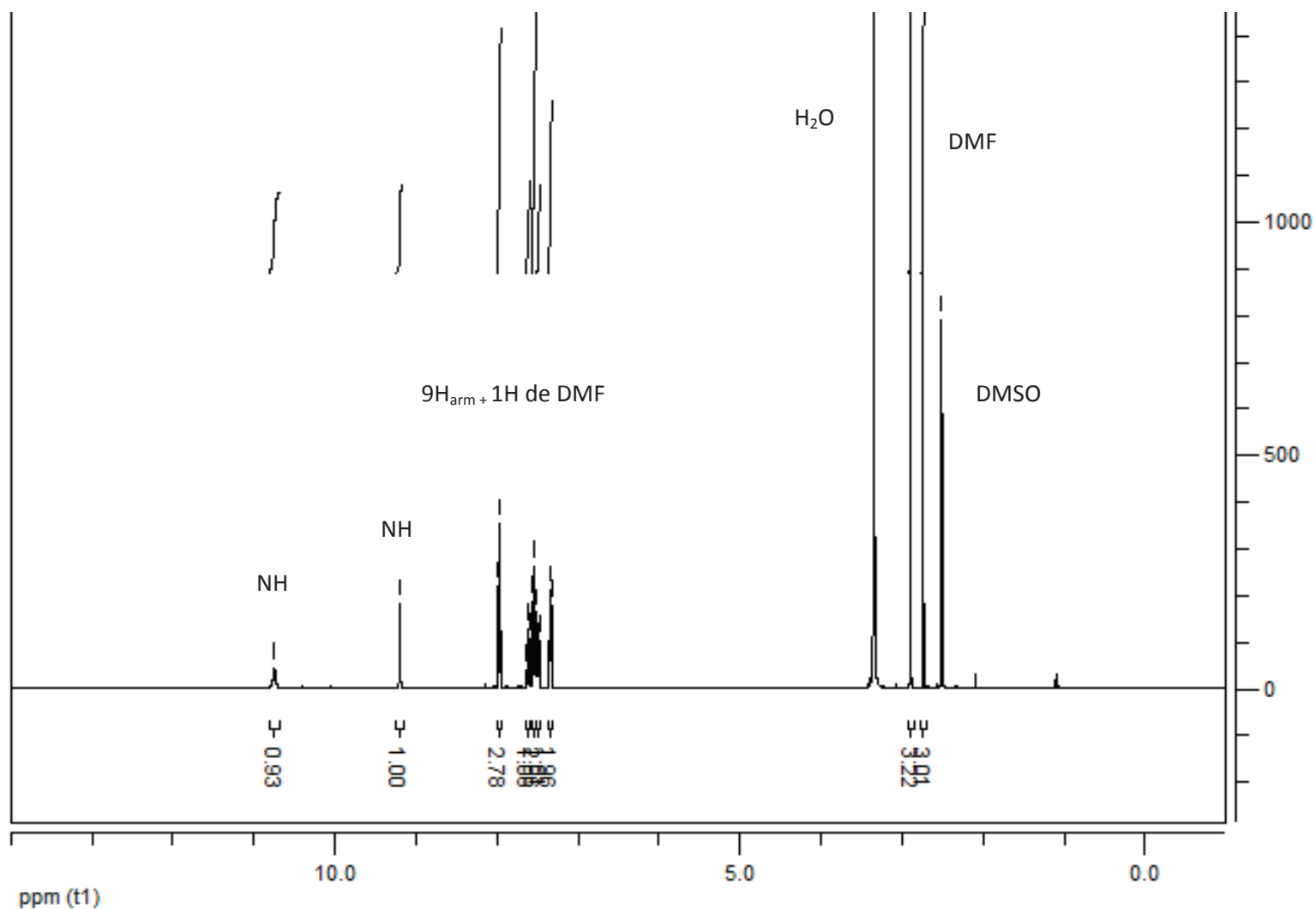
Spectre 15: spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) du produit **8a** dans D<sub>2</sub>O



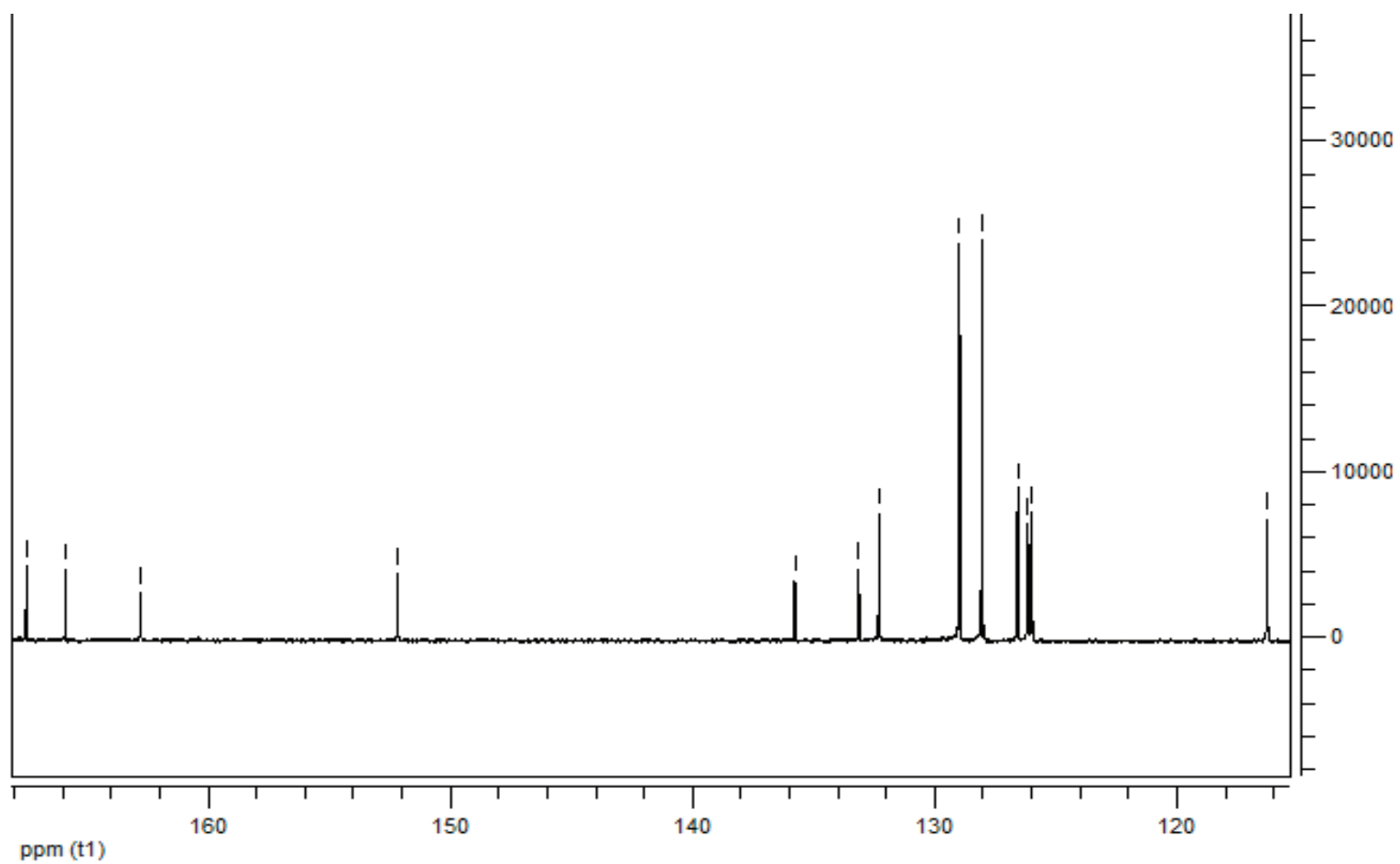
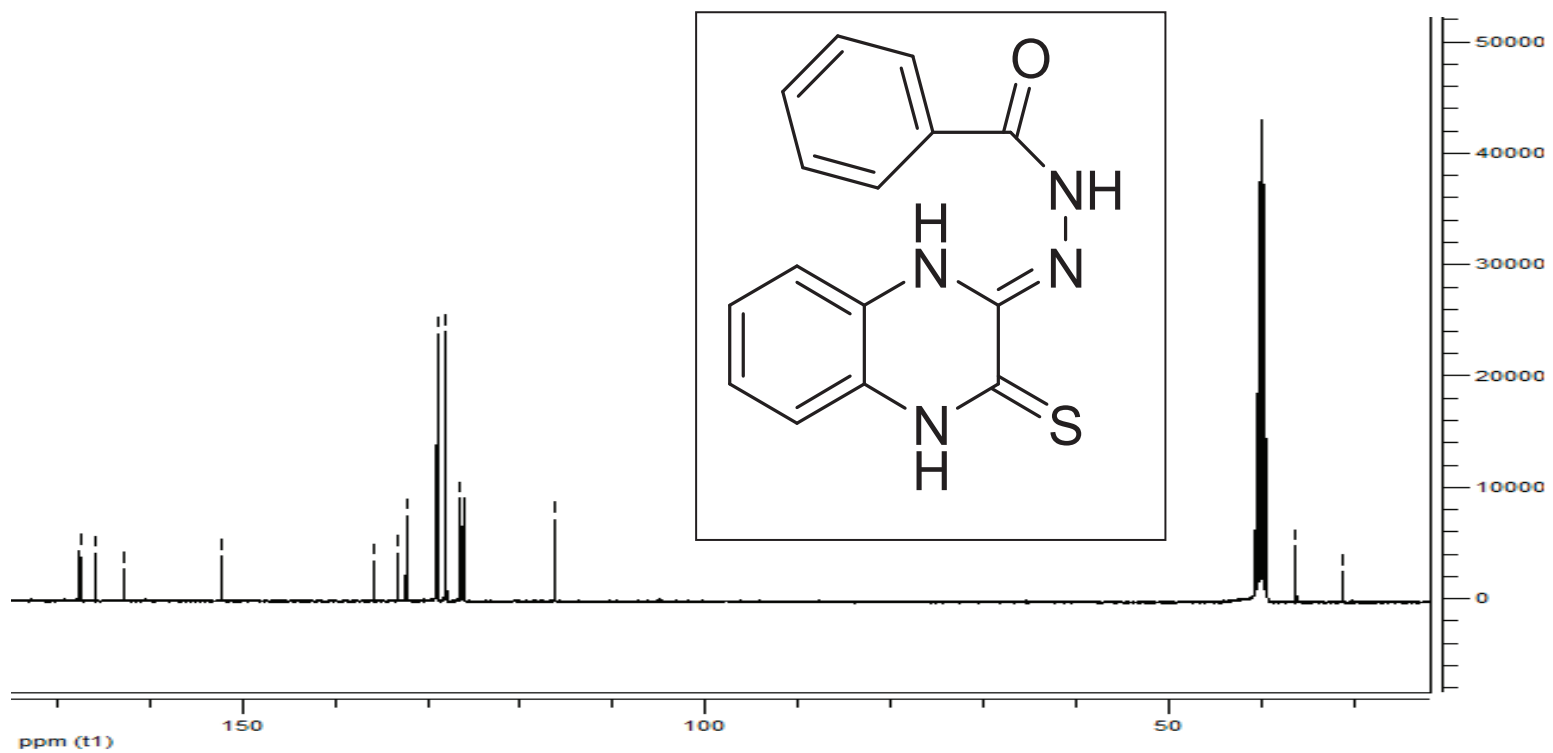
# *ANNEXE "C"*



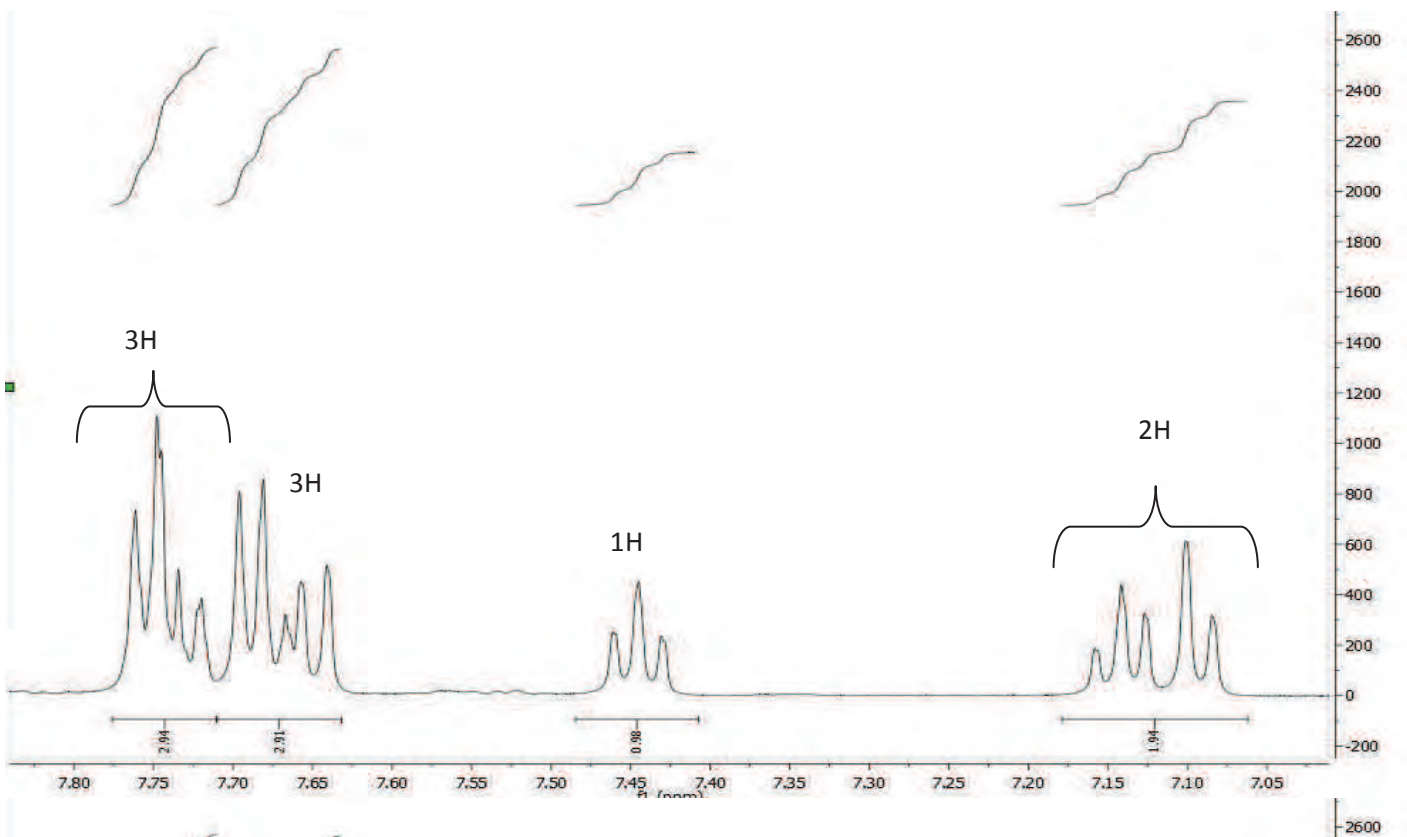
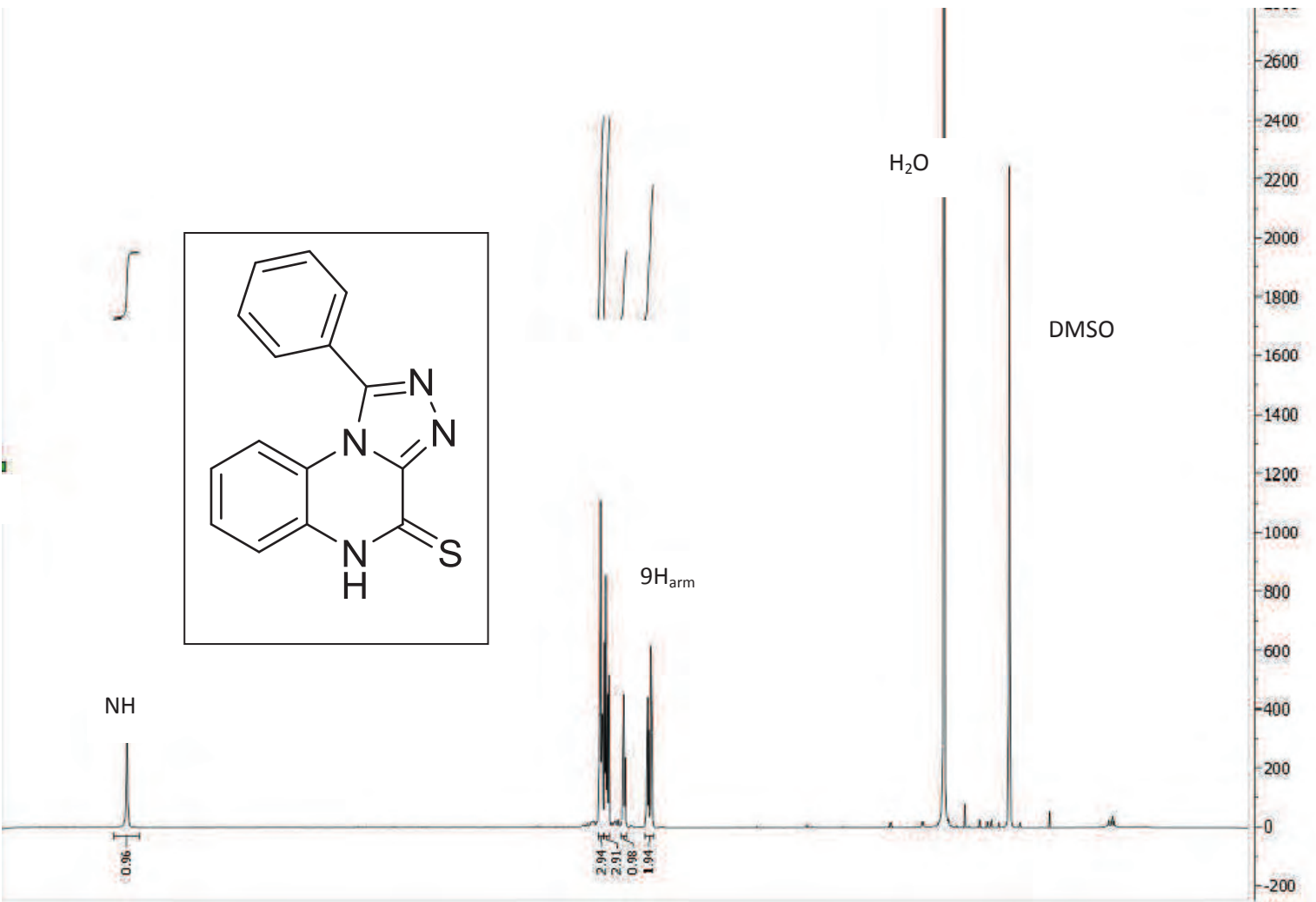




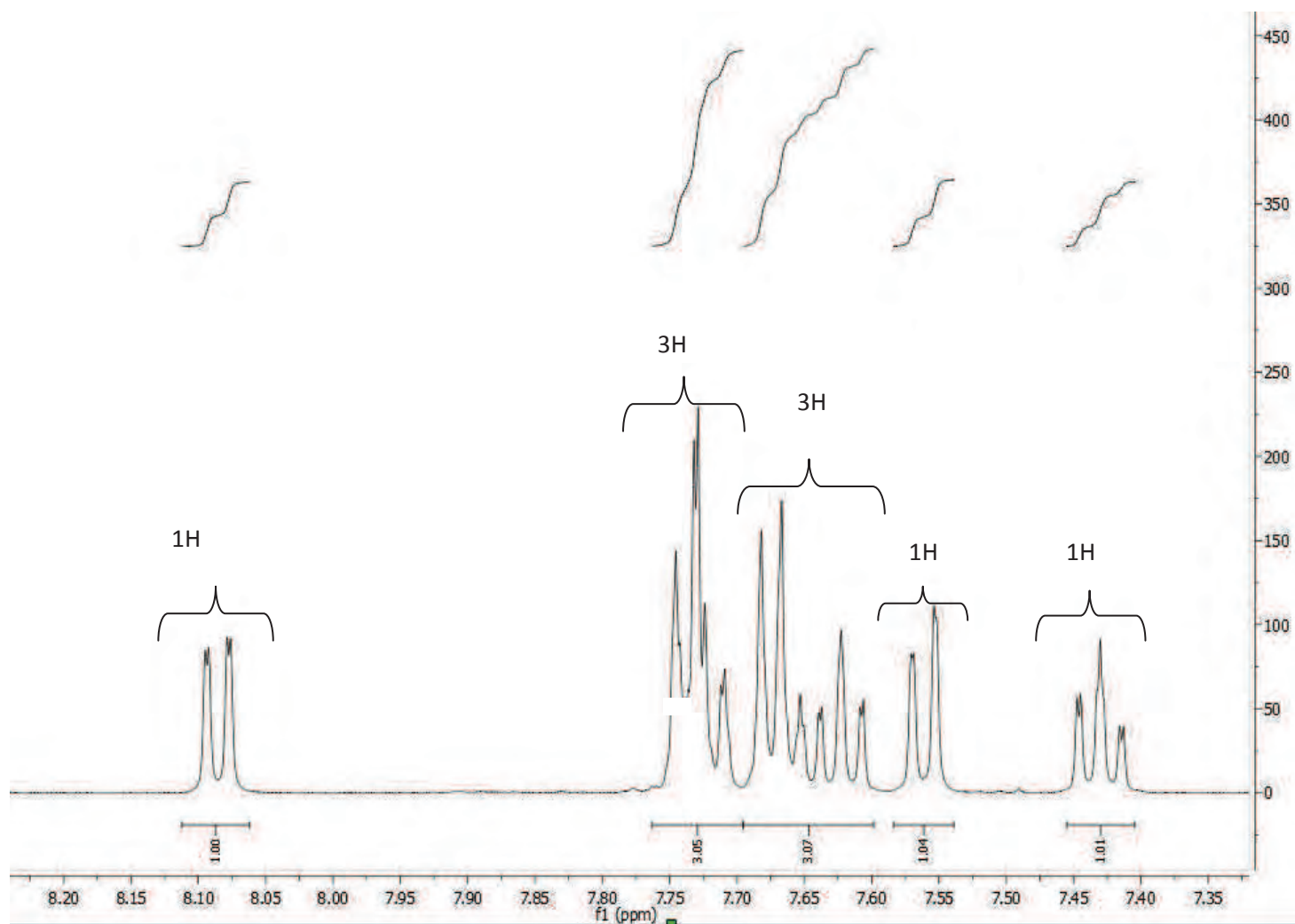
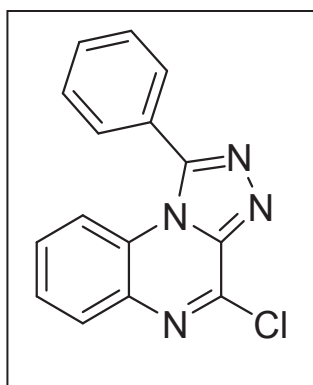
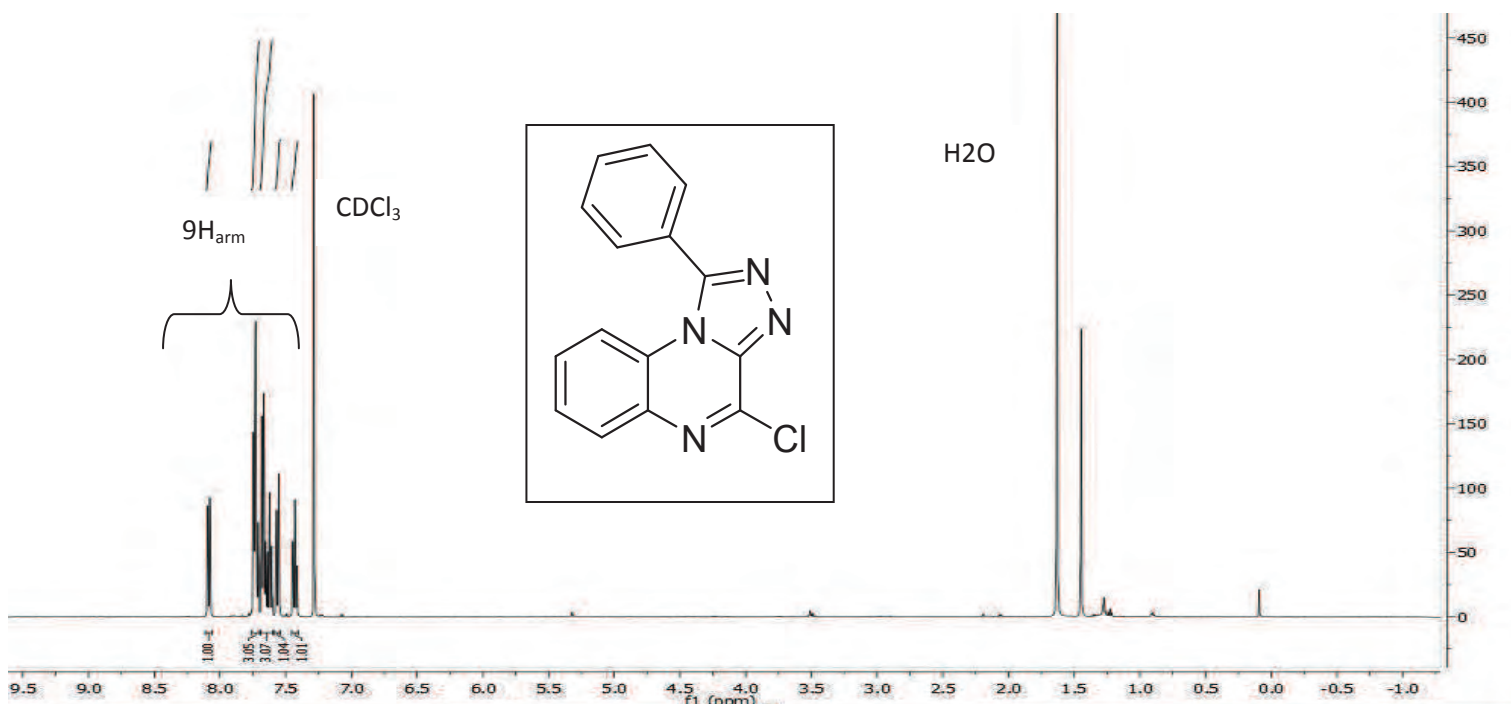
**Spectre 1:** spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) du produit 9 dans DMSO  $\text{d}_6$



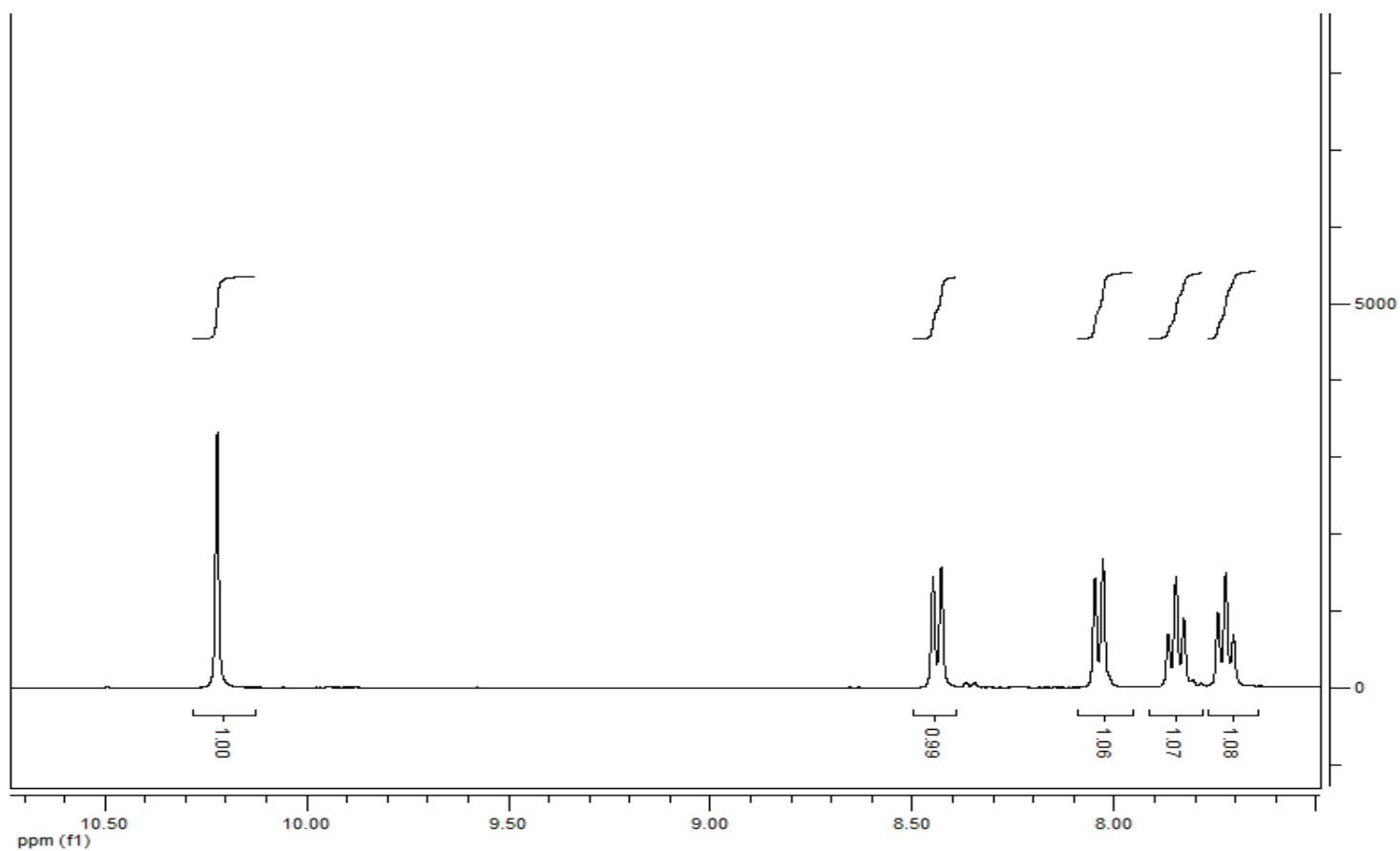
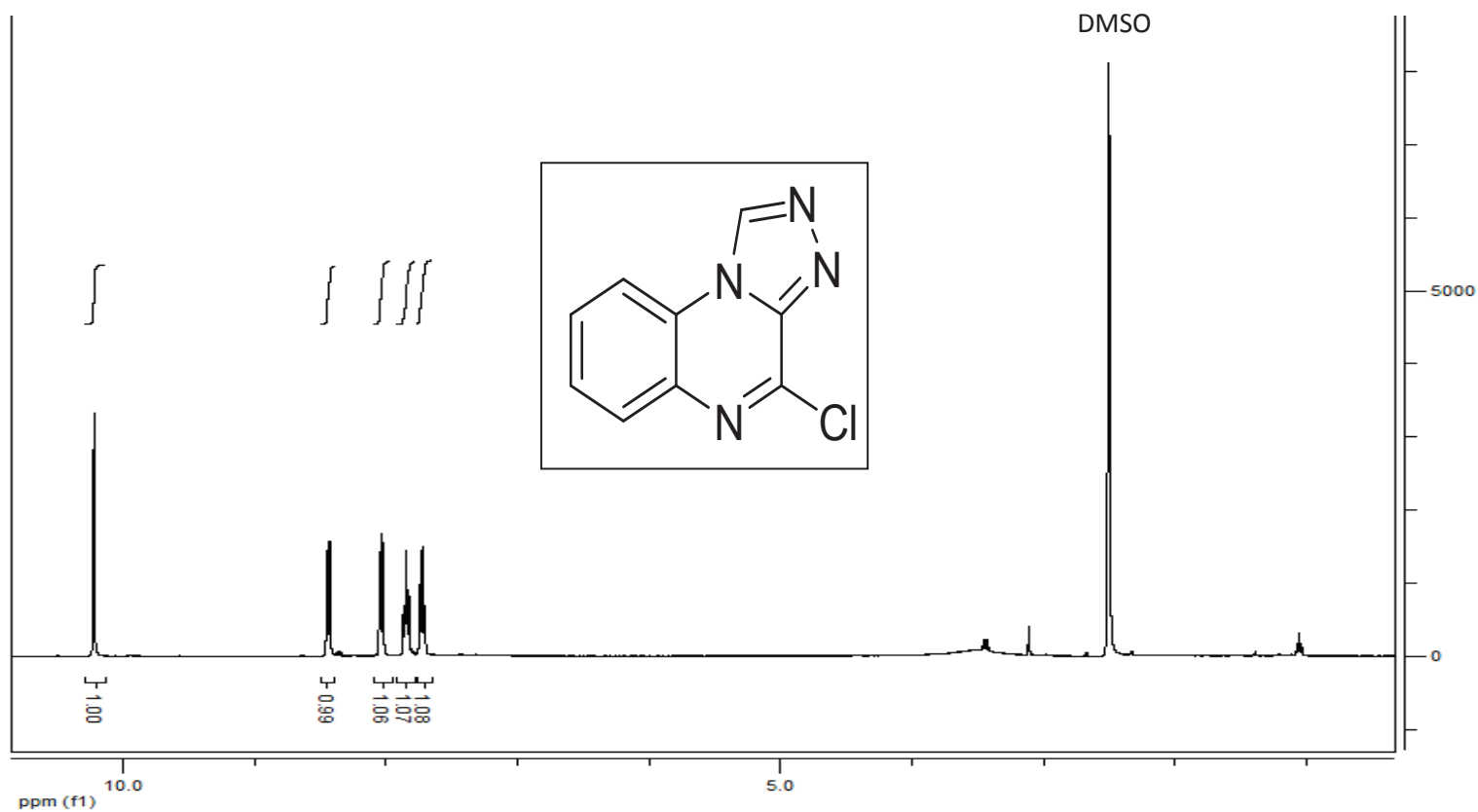
**Spectre 2:** spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (500 MHz) du produit **9** dans  $\text{DMSO-d}_6$



**Spectre 3:** spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) du produit **10** dans DMSO  $\text{d}_6$



Spectre 4: spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) du produit **14** dans CDCl<sub>3</sub>



**Spectre 5:** spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) du produit 15 dans DMSO  $\text{d}_6$



*Publication*





Acta Crystallographica Section E

## Structure Reports

Online

ISSN 1600-5368

# *N'*-(3-Sulfanylidene-3,4-dihydroquinoxalin-2-yl)benzohydrazide dimethylformamide monosolvate

Asmae Zanzoul,<sup>a,b\*</sup> El Mokhtar Essassi,<sup>a</sup> Geneviève Pratviel,<sup>b</sup> Mohamed Saadi<sup>c</sup> and Lahcen El Ammari<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Chimie Organique Hétérocyclique, URAC 21, Pôle de Compétences Pharmacochimie, Université Mohammed V-Agdal, BP 1014 Avenue, Ibn Batouta, Rabat, Morocco, <sup>b</sup>Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS 205, Route de Narbonne 31077, Toulouse, France, and <sup>c</sup>Laboratoire de Chimie du Solide Appliquée, Faculté des Sciences, Université Mohammed V-Agdal, Avenue Ibn Battouta, BP 1014, Rabat, Morocco  
Correspondence e-mail: a\_zanzoul@yahoo.fr

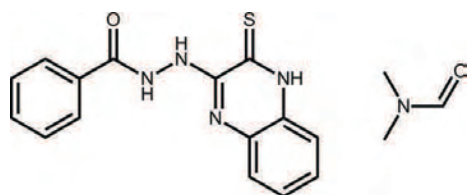
Received 28 June 2013; accepted 10 July 2013

Key indicators: single-crystal X-ray study;  $T = 180$  K; mean  $\sigma(\text{C}-\text{C}) = 0.003$  Å;  $R$  factor = 0.047;  $wR$  factor = 0.119; data-to-parameter ratio = 17.7.

The 2-sulfanylidene-3,4-dihydroquinoxalin-2-yl ring system of the title solvate,  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS}\cdot\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ , is essentially planar, the maximum deviation from the mean plane being 0.024 (2) Å for the thione C atom. The mean plane through the fused-ring system is almost perpendicular to the terminal phenyl ring, as indicated by the dihedral angle of 70.05 (8)°. In the crystal, the main and solvent molecules are linked by  $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$  hydrogen bonds, forming a layer parallel to (010).

## Related literature

For potential applications of quinoxaline derivatives, see: Cheon *et al.* (2004); Jackson *et al.* (1991); Benzeid *et al.* (2012).



## Experimental

### Crystal data

 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS}\cdot\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$  $M_r = 369.44$ Monoclinic,  $P2_1/c$  $a = 10.4053$  (2) Å $b = 16.8563$  (5) Å $c = 10.3624$  (2) Å $\beta = 100.882$  (2)° $V = 1784.83$  (7) Å<sup>3</sup> $Z = 4$ Mo  $K\alpha$  radiation $\mu = 0.21$  mm<sup>-1</sup> $T = 180$  K $0.20 \times 0.12 \times 0.04$  mm

### Data collection

Oxford Diffraction Xcalibur (Eos, Gemini ultra) diffractometer  
Absorption correction: multi-scan (CrysAlis RED; Oxford Diffraction, 2012)

 $T_{\min} = 0.960$ ,  $T_{\max} = 0.992$ 

15848 measured reflections  
4153 independent reflections  
3090 reflections with  $I > 2\sigma(I)$   
 $R_{\text{int}} = 0.043$

### Refinement

 $R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.047$  $wR(F^2) = 0.119$  $S = 1.03$ 

4153 reflections

235 parameters

H-atom parameters constrained

 $\Delta\rho_{\max} = 0.30$  e Å<sup>-3</sup> $\Delta\rho_{\min} = -0.25$  e Å<sup>-3</sup>

Table 1

Hydrogen-bond geometry (Å, °).

$D-\text{H}\cdots A$	$D-\text{H}$	$\text{H}\cdots A$	$D\cdots A$	$D-\text{H}\cdots A$
$\text{N3}-\text{H3N}\cdots\text{O2}^{\text{i}}$	0.88	2.14	2.906 (2)	146
$\text{N4}-\text{H4N}\cdots\text{O2}^{\text{ii}}$	0.88	2.04	2.906 (2)	166
$\text{N1}-\text{H1}\cdots\text{O1}^{\text{iii}}$	0.88	2.01	2.8331 (19)	154

Symmetry codes: (i)  $x, y, z + 1$ ; (ii)  $-x + 1, -y, -z$ ; (iii)  $-x + 2, -y, -z + 1$ .

Data collection: CrysAlis CCD (Oxford Diffraction, 2012); cell refinement: CrysAlis RED (Oxford Diffraction, 2012); data reduction: CrysAlis RED; program(s) used to solve structure: SIR97 (Altomare *et al.*, 1999); program(s) used to refine structure: SHELXL97 (Sheldrick, 2008); molecular graphics: ORTEP-3 for Windows (Farrugia, 2012); software used to prepare material for publication: WinGX (Farrugia, 2012) and publCIF (Westrip, 2010).

Supplementary data and figures for this paper are available from the IUCr electronic archives (Reference: TK5236).

## References

- Altomare, A., Burla, M. C., Camalli, M., Cascarano, G. L., Giacovazzo, C., Guagliardi, A., Moliterni, A. G. G., Polidori, G. & Spagna, R. (1999). *J. Appl. Cryst.* **32**, 115–119.
- Benzeid, H., Mothes, E., Essassi, E. M., Faller, P. & Pratviel, G. (2012). *Compt. Rend. Chim.* **15**, 79–85.
- Cheon, H.-G., Lee, C.-M., Kim, B.-T. & Hwang, K.-J. (2004). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 2661–2664.
- Farrugia, L. J. (2012). *J. Appl. Cryst.* **45**, 849–854.
- Jackson, P. F., Davenport, T. W., Resch, J. F., Scott Lehr, G. & Pullan, L. M. (1991). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1**, 751–756.
- Oxford Diffraction (2012). Oxford Diffraction Ltd, Yarnton, England.
- Sheldrick, G. M. (2008). *Acta Cryst.* **A64**, 112–122.
- Westrip, S. P. (2010). *J. Appl. Cryst.* **43**, 920–925.

Acta Crystallographica Section E

## Structure Reports

Online

ISSN 1600-5368

# *N'*-(3-Sulfanylidene-3,4-dihydroquinoxalin-2-yl)benzohydrazide dimethylformamide monosolvate

Asmae Zanzoul,<sup>a,b,\*</sup> El Mokhtar Essassi,<sup>a</sup> Geneviève Pratviel,<sup>b</sup> Mohamed Saadi<sup>c</sup> and Lahcen El Ammari<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Chimie Organique Hétérocyclique, URAC 21, Pôle de Compétences Pharmacochimie, Université Mohammed V-Agdal, BP 1014 Avenue, Ibn Batouta, Rabat, Morocco, <sup>b</sup>Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS 205, Route de Narbonne 31077, Toulouse, France, and <sup>c</sup>Laboratoire de Chimie du Solide Appliquée, Faculté des Sciences, Université Mohammed V-Agdal, Avenue Ibn Battouta, BP 1014, Rabat, Morocco  
Correspondence e-mail: a\_zanzoul@yahoo.fr

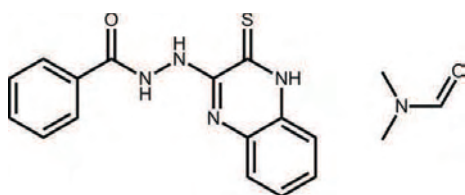
Received 28 June 2013; accepted 10 July 2013

Key indicators: single-crystal X-ray study;  $T = 180$  K; mean  $\sigma(\text{C}-\text{C}) = 0.003$  Å;  $R$  factor = 0.047;  $wR$  factor = 0.119; data-to-parameter ratio = 17.7.

The 2-sulfanylidene-3,4-dihydroquinoxalin-2-yl ring system of the title solvate,  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS}\cdot\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ , is essentially planar, the maximum deviation from the mean plane being 0.024 (2) Å for the thione C atom. The mean plane through the fused-ring system is almost perpendicular to the terminal phenyl ring, as indicated by the dihedral angle of 70.05 (8)°. In the crystal, the main and solvent molecules are linked by  $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$  hydrogen bonds, forming a layer parallel to (010).

## Related literature

For potential applications of quinoxaline derivatives, see: Cheon *et al.* (2004); Jackson *et al.* (1991); Benzeid *et al.* (2012).



## Experimental

### Crystal data

 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS}\cdot\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$  $M_r = 369.44$ 

Monoclinic,  $P2_1/c$   
 $a = 10.4053$  (2) Å  
 $b = 16.8563$  (5) Å  
 $c = 10.3624$  (2) Å  
 $\beta = 100.882$  (2)°  
 $V = 1784.83$  (7) Å<sup>3</sup>

$Z = 4$   
Mo  $K\alpha$  radiation  
 $\mu = 0.21$  mm<sup>-1</sup>  
 $T = 180$  K  
 $0.20 \times 0.12 \times 0.04$  mm

### Data collection

Oxford Diffraction Xcalibur (Eos, Gemini ultra) diffractometer  
Absorption correction: multi-scan (CrysAlis RED; Oxford Diffraction, 2012)  
 $T_{\min} = 0.960$ ,  $T_{\max} = 0.992$   
15848 measured reflections  
4153 independent reflections  
3090 reflections with  $I > 2\sigma(I)$   
 $R_{\text{int}} = 0.043$

### Refinement

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.047$   
 $wR(F^2) = 0.119$   
 $S = 1.03$   
4153 reflections  
235 parameters  
H-atom parameters constrained  
 $\Delta\rho_{\text{max}} = 0.30$  e Å<sup>-3</sup>  
 $\Delta\rho_{\text{min}} = -0.25$  e Å<sup>-3</sup>

Table 1

Hydrogen-bond geometry (Å, °).

$D-H\cdots A$	$D-H$	$H\cdots A$	$D\cdots A$	$D-H\cdots A$
$\text{N3}-\text{H3N}\cdots\text{O2}^{\text{i}}$	0.88	2.14	2.906 (2)	146
$\text{N4}-\text{H4N}\cdots\text{O2}^{\text{ii}}$	0.88	2.04	2.906 (2)	166
$\text{N1}-\text{H1}\cdots\text{O1}^{\text{iii}}$	0.88	2.01	2.8331 (19)	154

Symmetry codes: (i)  $x, y, z + 1$ ; (ii)  $-x + 1, -y, -z$ ; (iii)  $-x + 2, -y, -z + 1$ .

Data collection: CrysAlis CCD (Oxford Diffraction, 2012); cell refinement: CrysAlis RED (Oxford Diffraction, 2012); data reduction: CrysAlis RED; program(s) used to solve structure: SIR97 (Altomare *et al.*, 1999); program(s) used to refine structure: SHELXL97 (Sheldrick, 2008); molecular graphics: ORTEP-3 for Windows (Farrugia, 2012); software used to prepare material for publication: WinGX (Farrugia, 2012) and publCIF (Westrip, 2010).

Supplementary data and figures for this paper are available from the IUCr electronic archives (Reference: TK5236).

## References

- Altomare, A., Burla, M. C., Camalli, M., Cascarano, G. L., Giacovazzo, C., Guagliardi, A., Moliterni, A. G. G., Polidori, G. & Spagna, R. (1999). *J. Appl. Cryst.* **32**, 115–119.  
Benzeid, H., Mothes, E., Essassi, E. M., Faller, P. & Pratviel, G. (2012). *Compt. Rend. Chim.* **15**, 79–85.  
Cheon, H.-G., Lee, C.-M., Kim, B.-T. & Hwang, K.-J. (2004). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 2661–2664.  
Farrugia, L. J. (2012). *J. Appl. Cryst.* **45**, 849–854.  
Jackson, P. F., Davenport, T. W., Resch, J. F., Scott Lehr, G. & Pullan, L. M. (1991). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1**, 751–756.  
Oxford Diffraction (2012). Oxford Diffraction Ltd, Yarnton, England.  
Sheldrick, G. M. (2008). *Acta Cryst.* **A64**, 112–122.  
Westrip, S. P. (2010). *J. Appl. Cryst.* **43**, 920–925.

## supplementary materials

*Acta Cryst.* (2013). E69, o1268 [doi:10.1107/S1600536813019181]

## ***N'*-(3-Sulfanylidene-3,4-dihydroquinoxalin-2-yl)benzohydrazide dimethylformamide monosolvate**

**Asmae Zanzoul, El Mokhtar Essassi, Geneviève Pratviel, Mohamed Saadi and Lahcen El Ammari**

### **Comment**

Quinoxaline derivatives have been discovered as leads for a novel series of dipeptidyl peptidase-IV molecules (Cheon *et al.*, 2004). They are also used as ligands for the strychnine-insensitive glycine site (Jackson *et al.*, 1991) and as new fluorescent probes for amyloid- $\beta$  fibrils (Benzeid *et al.*, 2012).

The crystal structure of title compound is build up from two fused six-membered rings (N1, N2 C1–C8) linked to a benzohydrazide system (N3, N4, O1, C9–C15) and a dimethylformamide solvent molecule as shown in Fig. 1. The fused rings system is almost planar with the maximum deviation from the mean plane being  $-0.024(2)$  Å for the C1 atom. The dihedral angle between the terminal phenyl ring and the fused ring system is  $70.05(8)^\circ$ . In the crystal structure, the molecules and the solvent are linked by N—H $\cdots$ O hydrogen bond to form a layer parallel to (0 1 0), Table 1.

### **Experimental**

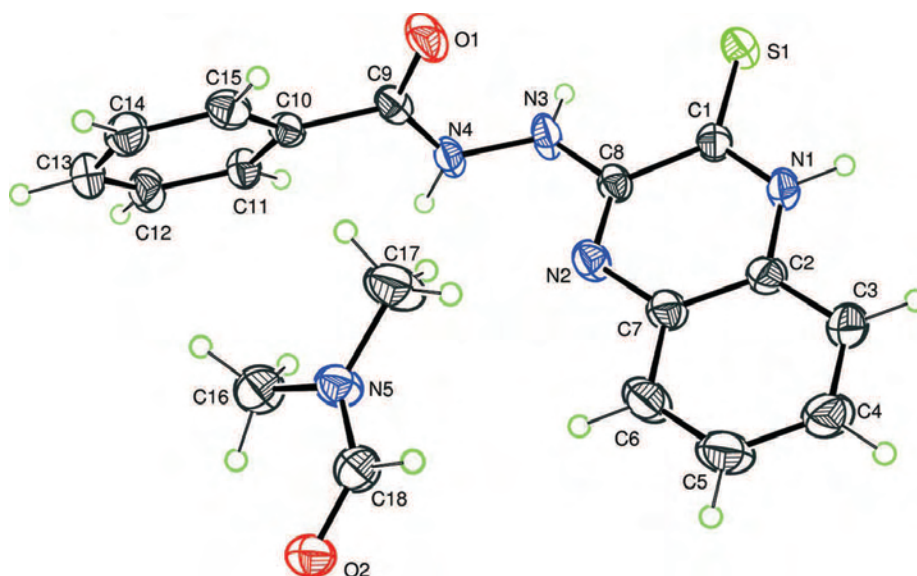
A mixture of quinoxaline-2,3-dithione (1 g,  $5.15 \times 10^{-3}$  mol), benzhydrazide (1.4 g, 0.01 mol) and DMF (40 ml) was boiled under reflux for 48 h. The volume of DMF was reduced under reduced pressure (2 ml) and the residue was taken up into 100 ml of diethyl ether. An oily product precipitated quickly after addition of diethyl ether. After centrifugation the diethyl ether phase was recovered and the precipitate (oily product) was washed with diethyl ether (2 x 3 ml). The product crystallized in the diethyl ether phase overnight at room temperature. Crystals were collected, washed with diethyl ether (5 ml) and dried under vacuum. Yield: 700 mg, 46%.

### **Refinement**

All H atoms could be located in a difference Fourier map. However, they were placed in calculated positions with C—H =  $0.95$  Å (aromatic), N—H =  $0.88$  Å and C—H =  $0.98$  Å (methyl) and refined as riding on their parent atoms with  $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2 U_{\text{eq}}(\text{aromatic and N})$  and  $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.5 U_{\text{eq}}(\text{methyl})$ .

### **Computing details**

Data collection: *CrysAlis CCD* (Oxford Diffraction, 2012); cell refinement: *CrysAlis RED* (Oxford Diffraction, 2012); data reduction: *CrysAlis RED* (Oxford Diffraction, 2012); program(s) used to solve structure: *SIR97* (Altomare *et al.*, 1999); program(s) used to refine structure: *SHELXL97* (Sheldrick, 2008); molecular graphics: *ORTEP-3 for Windows* (Farrugia, 2012); software used to prepare material for publication: *WinGX* (Farrugia, 2012) and *pubCIF* (Westrip, 2010).


**Figure 1**

Molecular structures of the components of the title compound showing the atom-labelling scheme. Displacement ellipsoids are drawn at the 50% probability level.

### *N'*-(3-Sulfanylidene-3,4-dihydroquinoxalin-2-yl)benzohydrazide dimethylformamide monosolvate

#### Crystal data

$C_{15}H_{12}N_4OS \cdot C_3H_7NO$

$M_r = 369.44$

Monoclinic,  $P2_1/c$

Hall symbol:  $-P\ 2ybc$

$a = 10.4053$  (2) Å

$b = 16.8563$  (5) Å

$c = 10.3624$  (2) Å

$\beta = 100.882$  (2)°

$V = 1784.83$  (7) Å<sup>3</sup>

$Z = 4$

$F(000) = 776$

$D_x = 1.375$  Mg m<sup>-3</sup>

Mo  $K\alpha$  radiation,  $\lambda = 0.71073$  Å

Cell parameters from 4153 reflections

$\theta = 3.1$ – $27.9$ °

$\mu = 0.21$  mm<sup>-1</sup>

$T = 180$  K

Plate, yellow

$0.20 \times 0.12 \times 0.04$  mm

#### Data collection

Oxford Diffraction Xcalibur (Eos, Gemini ultra) diffractometer

Graphite monochromator

Detector resolution: 16.1978 pixels mm<sup>-1</sup>

$\omega$  scans

Absorption correction: multi-scan

(*CrysAlis RED*; Oxford Diffraction, 2012)

$T_{\min} = 0.960$ ,  $T_{\max} = 0.992$

15848 measured reflections

4153 independent reflections

3090 reflections with  $I > 2\sigma(I)$

$R_{\text{int}} = 0.043$

$\theta_{\max} = 27.9$ °,  $\theta_{\min} = 3.1$ °

$h = -13 \rightarrow 13$

$k = -21 \rightarrow 21$

$l = -13 \rightarrow 13$

#### Refinement

Refinement on  $F^2$

Least-squares matrix: full

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.047$

$wR(F^2) = 0.119$

$S = 1.03$

4153 reflections

235 parameters

0 restraints

Primary atom site location: structure-invariant direct methods

Secondary atom site location: difference Fourier map

Hydrogen site location: difference Fourier map  
 H-atom parameters constrained  
 $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0514P)^2 + 0.657P]$   
 where  $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$

$(\Delta/\sigma)_{\max} = 0.001$   
 $\Delta\rho_{\max} = 0.30 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$   
 $\Delta\rho_{\min} = -0.25 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$

*Special details*

**Geometry.** All s.u.'s (except the s.u. in the dihedral angle between two l.s. planes) are estimated using the full covariance matrix. The cell s.u.'s are taken into account individually in the estimation of s.u.'s in distances, angles and torsion angles; correlations between s.u.'s in cell parameters are only used when they are defined by crystal symmetry. An approximate (isotropic) treatment of cell s.u.'s is used for estimating s.u.'s involving l.s. planes.

**Refinement.** Refinement of  $F^2$  against ALL reflections. The weighted  $R$ -factor  $wR$  and goodness of fit  $S$  are based on  $F^2$ , conventional  $R$ -factors  $R$  are based on  $F$ , with  $F$  set to zero for negative  $F^2$ . The threshold expression of  $F^2 > 2\sigma(F^2)$  is used only for calculating  $R$ -factors(gt) etc. and is not relevant to the choice of reflections for refinement.  $R$ -factors based on  $F^2$  are statistically about twice as large as those based on  $F$ , and  $R$ -factors based on ALL data will be even larger.

*Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2$ )*

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	$U_{\text{iso}}^*/U_{\text{eq}}$
C1	0.90077 (17)	0.07517 (11)	0.52315 (18)	0.0238 (4)
C2	0.97172 (18)	0.13196 (12)	0.33400 (19)	0.0277 (4)
C3	1.0611 (2)	0.18006 (13)	0.2856 (2)	0.0353 (5)
H3	1.1320	0.2040	0.3438	0.042*
C4	1.0448 (2)	0.19226 (15)	0.1524 (2)	0.0451 (6)
H4	1.1046	0.2249	0.1179	0.054*
C5	0.9401 (2)	0.15666 (16)	0.0673 (2)	0.0475 (6)
H5	0.9300	0.1649	-0.0248	0.057*
C6	0.8519 (2)	0.11001 (15)	0.1155 (2)	0.0403 (5)
H6	0.7808	0.0868	0.0565	0.048*
C7	0.86557 (18)	0.09631 (12)	0.25101 (19)	0.0289 (4)
C8	0.79327 (17)	0.03925 (11)	0.42633 (17)	0.0231 (4)
C9	0.64594 (16)	-0.12910 (12)	0.37671 (17)	0.0245 (4)
C10	0.53941 (17)	-0.17643 (11)	0.29440 (17)	0.0230 (4)
C11	0.40700 (17)	-0.15997 (12)	0.28901 (18)	0.0264 (4)
H11	0.3817	-0.1175	0.3391	0.032*
C12	0.31276 (19)	-0.20563 (13)	0.2106 (2)	0.0339 (5)
H12	0.2226	-0.1951	0.2083	0.041*
C13	0.3494 (2)	-0.26669 (13)	0.1356 (2)	0.0357 (5)
H13	0.2843	-0.2962	0.0787	0.043*
C14	0.4802 (2)	-0.28490 (12)	0.14304 (19)	0.0332 (5)
H14	0.5049	-0.3278	0.0934	0.040*
C15	0.57487 (19)	-0.24034 (12)	0.22322 (18)	0.0290 (4)
H15	0.6647	-0.2534	0.2298	0.035*
C16	0.5145 (2)	-0.09973 (14)	-0.0642 (2)	0.0382 (5)
H16A	0.4905	-0.0777	0.0155	0.057*
H16C	0.5032	-0.1575	-0.0649	0.057*
H16B	0.4582	-0.0768	-0.1418	0.057*
C17	0.7469 (2)	-0.09952 (17)	0.0508 (2)	0.0474 (6)
H17A	0.8339	-0.0827	0.0381	0.071*
H17B	0.7472	-0.1568	0.0666	0.071*
H17C	0.7246	-0.0716	0.1265	0.071*
C18	0.6865 (2)	-0.05175 (12)	-0.17353 (19)	0.0314 (4)

H18	0.7771	-0.0417	-0.1684	0.038*
N1	0.98526 (15)	0.11775 (9)	0.46798 (15)	0.0263 (4)
H1	1.0539	0.1380	0.5203	0.032*
N2	0.77741 (15)	0.04876 (10)	0.29977 (15)	0.0277 (4)
N3	0.70812 (15)	-0.00590 (10)	0.47938 (15)	0.0306 (4)
H3N	0.7111	-0.0052	0.5648	0.037*
N4	0.61647 (15)	-0.05320 (10)	0.39948 (15)	0.0264 (4)
H4N	0.5395	-0.0336	0.3639	0.032*
N5	0.65059 (16)	-0.08079 (10)	-0.06642 (15)	0.0312 (4)
O1	0.75344 (13)	-0.15906 (9)	0.42053 (14)	0.0373 (4)
O2	0.61339 (14)	-0.03660 (9)	-0.27891 (13)	0.0342 (3)
S1	0.91904 (5)	0.06336 (3)	0.68523 (5)	0.03039 (15)

Atomic displacement parameters ( $\text{\AA}^2$ )

	$U^{11}$	$U^{22}$	$U^{33}$	$U^{12}$	$U^{13}$	$U^{23}$
C1	0.0196 (8)	0.0200 (9)	0.0310 (10)	0.0026 (7)	0.0027 (7)	-0.0020 (7)
C2	0.0236 (9)	0.0272 (10)	0.0317 (10)	0.0012 (8)	0.0033 (8)	0.0048 (8)
C3	0.0263 (10)	0.0356 (12)	0.0422 (12)	-0.0059 (9)	0.0017 (9)	0.0084 (9)
C4	0.0325 (11)	0.0529 (15)	0.0495 (13)	-0.0053 (10)	0.0066 (10)	0.0223 (11)
C5	0.0351 (12)	0.0684 (18)	0.0373 (12)	-0.0015 (12)	0.0028 (10)	0.0218 (12)
C6	0.0291 (11)	0.0580 (15)	0.0308 (11)	-0.0051 (10)	-0.0018 (9)	0.0078 (10)
C7	0.0219 (9)	0.0338 (11)	0.0306 (10)	-0.0001 (8)	0.0037 (8)	0.0043 (8)
C8	0.0192 (8)	0.0234 (10)	0.0256 (9)	0.0012 (7)	0.0016 (7)	-0.0026 (7)
C9	0.0180 (8)	0.0364 (11)	0.0193 (9)	-0.0036 (8)	0.0043 (7)	0.0022 (8)
C10	0.0222 (8)	0.0265 (10)	0.0197 (8)	-0.0018 (7)	0.0020 (7)	0.0027 (7)
C11	0.0229 (9)	0.0269 (10)	0.0290 (10)	-0.0018 (8)	0.0040 (8)	-0.0027 (8)
C12	0.0233 (9)	0.0340 (12)	0.0411 (11)	-0.0028 (8)	-0.0020 (8)	-0.0018 (9)
C13	0.0369 (11)	0.0318 (12)	0.0340 (11)	-0.0097 (9)	-0.0041 (9)	-0.0025 (9)
C14	0.0454 (12)	0.0270 (11)	0.0274 (10)	0.0004 (9)	0.0072 (9)	-0.0033 (8)
C15	0.0275 (9)	0.0335 (11)	0.0262 (9)	0.0027 (8)	0.0060 (8)	0.0025 (8)
C16	0.0374 (11)	0.0440 (13)	0.0349 (11)	-0.0037 (10)	0.0114 (9)	0.0034 (10)
C17	0.0407 (13)	0.0691 (17)	0.0308 (11)	0.0010 (12)	0.0030 (10)	0.0126 (11)
C18	0.0308 (10)	0.0328 (11)	0.0312 (10)	-0.0021 (9)	0.0075 (8)	0.0017 (8)
N1	0.0198 (7)	0.0260 (9)	0.0312 (9)	-0.0047 (6)	0.0006 (6)	-0.0010 (7)
N2	0.0214 (8)	0.0350 (10)	0.0260 (8)	-0.0024 (7)	0.0025 (6)	-0.0003 (7)
N3	0.0284 (8)	0.0413 (10)	0.0213 (8)	-0.0152 (7)	0.0031 (7)	-0.0067 (7)
N4	0.0199 (7)	0.0328 (9)	0.0246 (8)	-0.0067 (7)	-0.0008 (6)	-0.0023 (7)
N5	0.0300 (9)	0.0392 (10)	0.0241 (8)	0.0000 (7)	0.0048 (7)	0.0041 (7)
O1	0.0192 (7)	0.0457 (9)	0.0432 (8)	0.0007 (6)	-0.0041 (6)	-0.0027 (7)
O2	0.0356 (8)	0.0374 (8)	0.0286 (7)	-0.0017 (6)	0.0033 (6)	0.0069 (6)
S1	0.0267 (2)	0.0378 (3)	0.0253 (3)	-0.0027 (2)	0.00135 (19)	-0.0026 (2)

Geometric parameters ( $\text{\AA}$ ,  $^\circ$ )

C1—N1	1.343 (2)	C11—H11	0.9500
C1—C8	1.483 (2)	C12—C13	1.386 (3)
C1—S1	1.6661 (19)	C12—H12	0.9500
C2—N1	1.390 (2)	C13—C14	1.383 (3)
C2—C3	1.396 (3)	C13—H13	0.9500

## supplementary materials

C2—C7	1.401 (3)	C14—C15	1.384 (3)
C3—C4	1.374 (3)	C14—H14	0.9500
C3—H3	0.9500	C15—H15	0.9500
C4—C5	1.401 (3)	C16—N5	1.456 (3)
C4—H4	0.9500	C16—H16A	0.9800
C5—C6	1.372 (3)	C16—H16C	0.9800
C5—H5	0.9500	C16—H16B	0.9800
C6—C7	1.404 (3)	C17—N5	1.456 (3)
C6—H6	0.9500	C17—H17A	0.9800
C7—N2	1.384 (2)	C17—H17B	0.9800
C8—N2	1.300 (2)	C17—H17C	0.9800
C8—N3	1.360 (2)	C18—O2	1.234 (2)
C9—O1	1.233 (2)	C18—N5	1.330 (3)
C9—N4	1.347 (3)	C18—H18	0.9500
C9—C10	1.495 (2)	N1—H1	0.8800
C10—C15	1.394 (3)	N3—N4	1.390 (2)
C10—C11	1.396 (2)	N3—H3N	0.8800
C11—C12	1.383 (3)	N4—H4N	0.8800
N1—C1—C8	113.62 (16)	C14—C13—H13	119.8
N1—C1—S1	122.24 (13)	C12—C13—H13	119.8
C8—C1—S1	124.13 (14)	C13—C14—C15	119.64 (19)
N1—C2—C3	120.68 (17)	C13—C14—H14	120.2
N1—C2—C7	117.32 (17)	C15—C14—H14	120.2
C3—C2—C7	122.00 (18)	C14—C15—C10	120.48 (18)
C4—C3—C2	118.92 (19)	C14—C15—H15	119.8
C4—C3—H3	120.5	C10—C15—H15	119.8
C2—C3—H3	120.5	N5—C16—H16A	109.5
C3—C4—C5	120.2 (2)	N5—C16—H16C	109.5
C3—C4—H4	119.9	H16A—C16—H16C	109.5
C5—C4—H4	119.9	N5—C16—H16B	109.5
C6—C5—C4	120.7 (2)	H16A—C16—H16B	109.5
C6—C5—H5	119.7	H16C—C16—H16B	109.5
C4—C5—H5	119.7	N5—C17—H17A	109.5
C5—C6—C7	120.7 (2)	N5—C17—H17B	109.5
C5—C6—H6	119.7	H17A—C17—H17B	109.5
C7—C6—H6	119.7	N5—C17—H17C	109.5
N2—C7—C2	121.65 (17)	H17A—C17—H17C	109.5
N2—C7—C6	120.77 (17)	H17B—C17—H17C	109.5
C2—C7—C6	117.58 (18)	O2—C18—N5	126.27 (19)
N2—C8—N3	120.54 (16)	O2—C18—H18	116.9
N2—C8—C1	124.59 (17)	N5—C18—H18	116.9
N3—C8—C1	114.87 (16)	C1—N1—C2	124.49 (15)
O1—C9—N4	123.04 (17)	C1—N1—H1	117.8
O1—C9—C10	120.98 (18)	C2—N1—H1	117.8
N4—C9—C10	115.98 (15)	C8—N2—C7	118.23 (16)
C15—C10—C11	119.35 (17)	C8—N3—N4	120.40 (15)
C15—C10—C9	118.19 (16)	C8—N3—H3N	119.8
C11—C10—C9	122.44 (17)	N4—N3—H3N	119.8

## supplementary materials

C12—C11—C10	119.86 (18)	C9—N4—N3	119.73 (15)
C12—C11—H11	120.1	C9—N4—H4N	120.1
C10—C11—H11	120.1	N3—N4—H4N	120.1
C11—C12—C13	120.21 (19)	C18—N5—C17	121.23 (17)
C11—C12—H12	119.9	C18—N5—C16	121.41 (17)
C13—C12—H12	119.9	C17—N5—C16	117.25 (17)
C14—C13—C12	120.34 (18)		

### Hydrogen-bond geometry (Å, °)

<i>D</i> —H $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> —H	H $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> —H $\cdots$ <i>A</i>
N3—H3N $\cdots$ O2 <sup>i</sup>	0.88	2.14	2.906 (2)	146
N4—H4N $\cdots$ O2 <sup>ii</sup>	0.88	2.04	2.906 (2)	166
N1—H1 $\cdots$ O1 <sup>iii</sup>	0.88	2.01	2.8331 (19)	154

Symmetry codes: (i)  $x, y, z+1$ ; (ii)  $-x+1, -y, -z$ ; (iii)  $-x+2, -y, -z+1$ .



**AUTEUR :** Asmae ZANZOUL

**TITRE :** synthèse de ligands hétérocycliques polyaromatiques dérivés de quinoxaline pour le ciblage de l'ADN G-quadruplex télomérique

## **RESUME**

Ce travail sur la synthèse de ligands hétérocycliques polyaromatiques dérivés de quinoxaline pour le ciblage de l'ADN G-quadruplex télomérique s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux agents anti-cancéreux. L'objectif du travail est la conception des molécules capables d'inhiber la télomérase par stabilisation des G-quadruplex au niveau des télomères. Trois familles de composés polyaromatiques dérivés de quinoxaline ont été synthétisées : (i) la famille benzimidazopyridoquinoxaline, (ii) la famille indoloquinoxaline et (iii) la famille triazoloquinoxaline. Ces macrocycles ont été ensuite quaternarisés pour améliorer la solubilité dans l'eau et l'affinité vers l'ADN quadruplex.

Nous décrivons la synthèse d'un noyau pentacyclique dérivé du benzimidazole à partir de la sérine et l'*o*-phénylènediamine non substituée dans un milieu acide. La quaternarisation de cette molécule avec le triflate de méthyle donne un produit méthylé soluble dans l'eau.

Puis nous décrivons la synthèse de quatre noyaux tetracyclique dérivés du 6H-indolo[2,3-*b*]quinoxaline en deux étapes : une alkylation d'indole-2,3-dione suivie d'une condensation de ces isatines substituées avec l'*o*-phénylènediamine dans un milieu acide. La quaternarisation de ces composés a été effectuée avec le sulfate de diméthyle pour obtenir des produits solubles dans l'eau.

Enfin nous avons préparé quelques molécules polycycliques de la famille triazoloquinoxaline, ainsi qu'un produit de forme ouverte que nous avons isolé sous forme cristalline.

Dans une dernière partie l'étude des interactions des ligands de la famille de benzimidazopyridoquinoxaline et d'indoloquinoxaline avec l'ADN G-quadruplex télomérique par la méthode de FRET a été réalisée. Cette étude a montré que le composé aromatique et cationique de la série benzimidazopyridoquinoxaline, décrite dans le chapitre II, est apparu comme un ligand de l'ADN G-quadruplex modeste mais sélectif pour l'ADN quadruplex. Le composé pentacyclique sous forme de croissant semble plus prometteur que les aromatiques linéaires plus classiques comme les dérivés d'ellipticine ou d'indoloquinoxaline décrits dans le chapitre III.

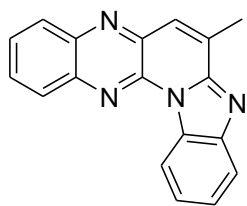
Certains composés ont été également testés comme inhibiteurs de l'enzyme InhA de *Mycobacterium tuberculosis*. Le composé 6(diéthylaminoéthyl)indoloquinoxaline que nous avons synthétisés au chapitre III peut être considéré comme une molécule « lead » pour la conception de nouveaux inhibiteurs d'INH A.

Mots clés : benzimidazopyridoquinoxaline, indoloquinoxaline, triazoloquinoxaline, ADN G-quadruplex, enzyme InhA de *Mycobacterium tuberculosis*.

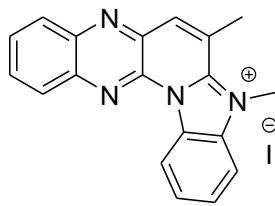


## *Produits AZ*

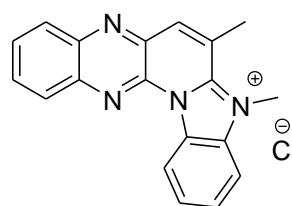




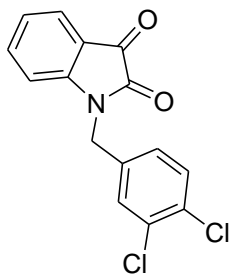
4



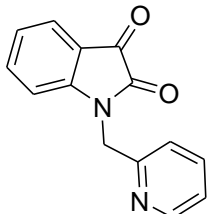
4'



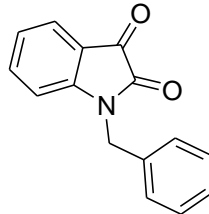
4''



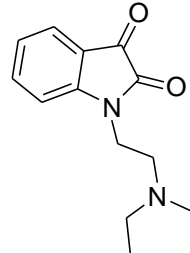
5<sub>1</sub>



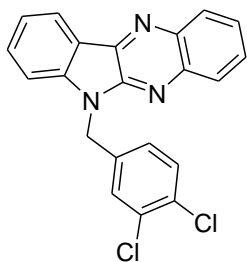
5<sub>2</sub>



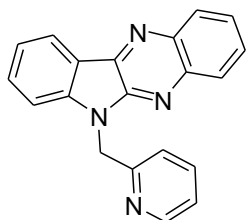
5<sub>3</sub>



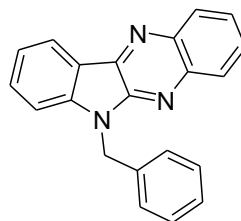
5<sub>4</sub>



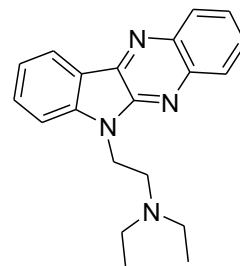
6<sub>1</sub>



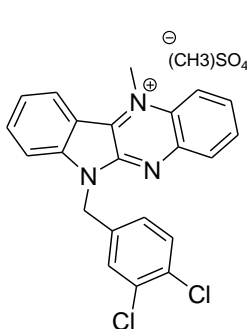
6<sub>2</sub>



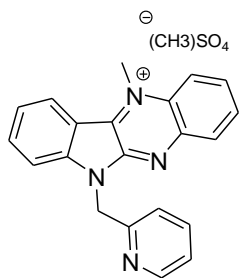
6<sub>3</sub>



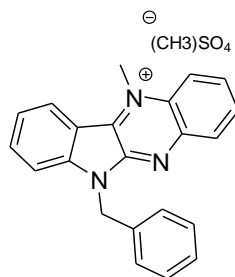
6<sub>4</sub>



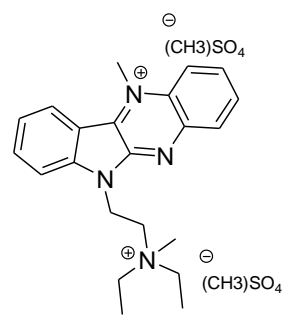
7<sub>1</sub>



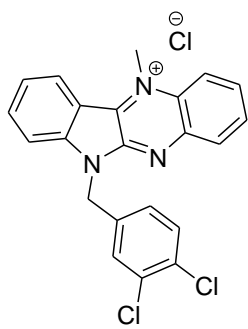
7<sub>2</sub>



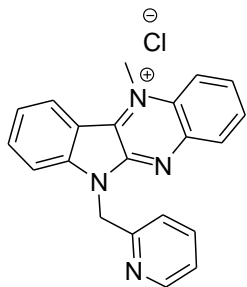
7<sub>3</sub>



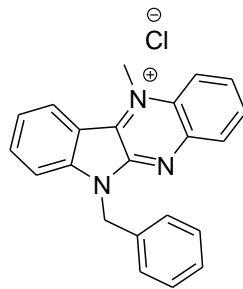
7<sub>4</sub>



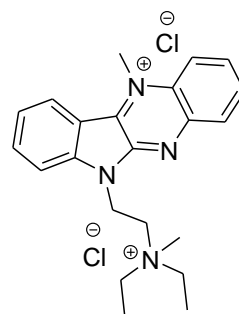
**8<sub>1</sub>**



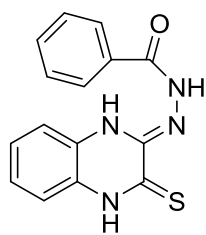
**8<sub>2</sub>**



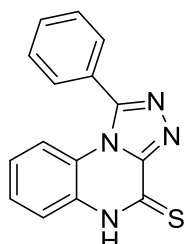
**8<sub>3</sub>**



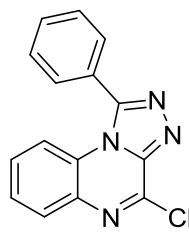
**8<sub>4</sub>**



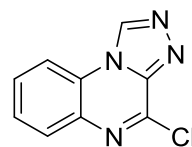
**9**



**10**



**14**



**15**

**AUTEUR** : Asmae ZANZOUL

**TITRE** : Synthèse de ligands hétérocycliques polyaromatiques dérivés de quinoxaline pour le ciblage de l'ADN G-quadruplex télomérique

## **RESUME**

Ce travail sur la synthèse de ligands hétérocycliques polyaromatiques dérivés de quinoxaline pour le ciblage de l'ADN G-quadruplex télomérique s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux agents anti-cancéreux. L'objectif du travail est la conception des molécules capables d'inhiber la télomérase par stabilisation des G-quadruplex au niveau des télomères. Trois familles de composés polyaromatiques dérivés de quinoxaline ont été synthétisées : (i) la famille benzimidazopyridoquinoxaline, (ii) la famille indoloquinoxaline et (iii) la famille triazoloquinoxaline.

Ces macrocycles ont été ensuite quaternarisés pour améliorer la solubilité dans l'eau et l'affinité vers l'ADN quadruplex. Nous décrivons la synthèse d'un noyau pentacyclique dérivé du benzimidazole à partir de la sérine et l'o-phénylènediamine non substituée dans un milieu acide. La quaternarisation de cette molécule avec le triflate de méthyle donne un produit méthylé soluble dans l'eau.

Puis nous décrivons la synthèse de quatre noyaux tetracyclique dérivés du 6H-indolo[2,3-b]quinoxaline en deux étapes : une alkylation d'indole-2,3-dione suivie d'une condensation isatines substituées avec l'o-phénylènediamine dans un milieu acide. La quaternarisation de ces composés a été effectuée avec le sulfate de diméthyle pour obtenir des produits solubles dans l'eau.

Enfin nous avons préparé quelques molécules polycycliques de la famille triazoloquinoxaline, ainsi qu'un produit de forme ouverte que nous avons isolé sous forme cristalline.

Dans une dernière partie l'étude des interactions des ligands de la famille de benzimidazopyridoquinoxaline et d'indoloquinoxaline avec l'ADN G-quadruplex télomérique par la méthode de FRET a été réalisée. Cette étude a montré que le composé aromatique et cationique de la série benzimidazopyridoquinoxaline, décrite dans le chapitre II, est apparu comme un ligand de l'ADN G-quadruplex modeste mais sélectif pour l'ADN quadruplex. Le composé pentacyclique sous forme de croissant semble plus prometteur que les aromatiques linéaires plus classiques comme les dérivés d'ellipticine ou d'indoloquinoxaline décrits dans le chapitre III.

Certains composés ont été également testés comme inhibiteurs de l'enzyme InhA de *Mycobacterium tuberculosis*. Le composé 6(diéthylaminoéthyl)indoloquinoxaline que nous avons synthétisés au chapitre III peut être considéré comme une molécule « lead » pour la conception de nouveaux inhibiteurs d'INH A.

Mots clés : benzimidazopyridoquinoxaline, indoloquinoxaline, triazoloquinoxaline, ADN G-quadruplex, enzyme InhA de *Mycobacterium tuberculosis*.