



**HAL**  
open science

# Synthèse de nouveaux agents anticancéreux

Hussein Abou Hamdan

► **To cite this version:**

Hussein Abou Hamdan. Synthèse de nouveaux agents anticancéreux. Sciences pharmaceutiques. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAF012 . tel-02918197

**HAL Id: tel-02918197**

**<https://theses.hal.science/tel-02918197v1>**

Submitted on 20 Aug 2020

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

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

**ÉCOLE DOCTORALE des SCIENCES CHIMIQUES – ED 222**

**Laboratoire d'Innovation Thérapeutique – UMR 7200**

# THÈSE

présentée par :

**Hussein ABOU HAMDAN**

Soutenue le : **24 septembre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie médicinale

## Synthèse de nouveaux agents anticancéreux

**THÈSE dirigée par :**

**M. DÉSAUBRY Laurent**

Directeur de recherche au CNRS, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**M. DODD Robert**

Directeur de recherche au CNRS, ICSN, Paris

**M. BOUR Christophe**

Maître de conférences, Université Paris-Sud 11

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mme MIESCH Laurence**

Chargée de recherche au CNRS, Université de Strasbourg

# **Remerciement**

---

Il m'est agréable d'adresser mes sincères remerciements à tous ceux qui m'ont apporté de près ou de loin, aide et conseils lors de l'élaboration de cette thèse de doctorat.

J'aimerais bien commencer par celui qui a inspiré et dirigé ce travail, mais plus loin que cela, appris à grandir dans le monde de la recherche. Je voudrais remercier grandement mon directeur de thèse, le Dr Laurent Désaubry, pour toute son aide. Je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent au Pr Marcel Hibert, directeur du laboratoire, pour m'avoir accueilli pendant ces trois années.

Ce travail de thèse a pu être réalisé grâce à une bourse du ministère de l'enseignement supérieur et de l'innovation, dont je tiens à remercier les autorités.

Mes remerciements s'adressent également au Dr Robert Dodd (Directeur de recherche au CNRS à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles) et au Dr Christophe Bour (Maître de conférences à l'Université de Paris-Sud 11) pour avoir accepté de juger ce travail et d'honorer le jury de cette thèse.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude envers le Pr Celine Tarnus (Professeur à l'Université de Haute-Alsace) et le Dr Laurence Miesch (Chargée de recherche au CNRS à l'Université de Strasbourg) pour avoir accepté de consacrer du temps à l'examen de mes travaux.

Je tiens à remercier le Dr Qian Zhao pour son enthousiasme, ses précieux conseils, sa disponibilité et le partage de ses nombreuses connaissances lors de nos nombreuses discussions.

Je remercie chaleureusement les stagiaires, thésards et post-doctorants côtoyés au cours de ces trois années : Rédouane, Hassan, Sabria, Jordan, Filipa, Anthony, Amel. Merci pour toutes ces discussions, plus ou moins chimiques selon les circonstances.

Merci à tous les thésards et membres des autres laboratoires que j'ai eu l'occasion de rencontrer et avec le plaisir de passer ces trois années.

Pour tous mes amis qui m'ont apporté leur soutien moral pendant ces années d'études, je les en remercie sincèrement et plus particulièrement, le Dr Hassan Mortada et le future docteur Abbas Nasserline pour m'avoir soutenu et accompagné dans notre quotidien à des milliers de kilomètres de notre famille et de notre pays.

Enfin, mes plus profonds remerciements vont à mes parents. Tout au long de mon cursus, ils m'ont toujours soutenu, encouragé, et aidé. Ce travail représente l'aboutissement de leurs efforts indéfectibles. Je tiens aussi à remercier mon grand frère, le Dr Abbas Abou Hamdan,

pour son soutien, ses conseils et son aide. Je lui remercie d'avoir m'accompagner dans cette épreuve, comme il l'a fait à chaque étape de ma vie.



# Abbréviations

---

A	ACN	Acétonitrile
	Ac	Acétyle
	ADN	Acide DéoxyriboNucléique
	AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
	Akt	<i>Protein Kinase B</i>
	anhy	<i>anhydre</i>
	An	Anisyle
	Ar	Aryle
	ARN	Acide RiboNucléique
	ASM	Atrophie Spinale Musculaire
	ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein</i>	
B	<i>Bcl-2</i>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
	BINAP	2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphtyle
	Bn	Benzyle
	Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
	Bu	Butyle
B <sub>2</sub> pin <sub>2</sub>	<i>bis</i> (pinacolato)diborane	
C	<i>CamK</i>	<i>Calmodulin-dependent protein kinase</i>
D	dba	Dibenzylidèneacétone
	DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène
	DCM	Dichlorométhane
	DCE	1,2-Dichloroéthane
	DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate
	DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
	DMF	Diméthylformamide
	DMSO	Diméthyl sulfoxide
	dppf	1,1'- <i>bis</i> (diphénylphosphino)ferrocène
E	<i>EGF</i>	<i>Endothelial Growth Factor</i>
	<i>eIF4</i>	<i>eukaryotic Initiation Factors</i>
	équiv	équivalent
	<i>ERK</i>	<i>Extracellular-signal-Regulated kinase</i>
	<i>ESI</i>	<i>ElectroSpray Ionisation</i>
	Et	Ethyle
F	FL	Flavagline
G	Grp	<i>Gastrin-releasing peptide</i>
	GDP	Guanosine DiPhosphate
	GTP	Guanosine TriPhosphate
H	HBpin	Pinacolborane
	HFIP	Hexafluoropropan-2-ol
	HMDS	<i>bis</i> (triméthylsilyl)amine
	HR-MS	<i>High Resolution-Mass Spectrometry</i>

	HSF	<i>Heat Shock Factor</i>
	Hsp	<i>Heat shock protein</i>
I	IGF1	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
J	JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
	Josiphos	<i>(R)-1-[(S<sub>P</sub>)-2-(Diphénylphosphino)ferrocényl]éthylidicyclohexylphosphine</i>
L	LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
	LDA	<i>Lithium Diisopropylamide</i>
	L-selectride®	<i>Lithium tri-sec-butyl-borohydride</i>
M	MAP	<i>Mitogen Activated Proteins</i>
	m-CPBA	<i>Acide méta-chloroperoxybenzoïque</i>
	Me	<i>Méthyle</i>
	MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
	m-TOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
N	NAP	<i>2-Naphtylméthyle</i>
	n-BuLi	<i>n-Butyllithium</i>
	NBS	<i>N-bromosuccinimide</i>
	NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
	Ns	<i>Nosyle</i>
P	PCy <sub>3</sub>	<i>Tricyclohexylphosphine</i>
	Pd/C	<i>Palladium sur charbon</i>
	Ph	<i>Phényle</i>
	PHB	<i>Prohibitine</i>
	PhMe	<i>Toluène</i>
	PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
	PKC-δ	<i>Protéine kinase C</i>
	PMB	<i>para-Méthoxybenzyle</i>
	Pr	<i>Propyle</i>
	Py	<i>Pyridine</i>
R	Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
S	Shp	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase</i>
	SNar	<i>Substitution Nucléophile aromatique</i>
	SN2	<i>Substitution Nucléophile bimoléculaire</i>
	S-Phos	<i>2-Dicyclohexylphosphino-2',6'-diméthoxybiphényle</i>
T	tBu	<i>Tert-Butyle</i>
	TBAF	<i>Fluorure de tétra-n-butylammonium</i>
	TBDMS	<i>Tert-butyldiméthylsilyle</i>
	THF	<i>Tétrahydrofurane</i>
	TMS	<i>Triméthylsilyle</i>
	Tr	<i>Trityle</i>
	TXNIP	<i>Thioredoxin-Interacting Protein</i>
X	X-Phos	<i>2-Dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphényle</i>

# Sommaire

---

<b>1. Introduction.....</b>	<b>11</b>
1.1. Préambule : contexte et objectifs généraux.....	11
1.2. Amélioration de la synthèse du NVS-SM2, un activateur d'épissage.....	12
1.2.1. Introduction.....	12
1.2.2. Epissage des ARNm.....	12
1.2.3. Le spliceosome.....	13
1.2.4. Cancer et épissage.....	13
1.2.5. Les modulateurs de l'épissage.....	14
1.2.6. Découverte et intérêt du NVS-SM2.....	17
1.2.7. Mode d'action du NVS-SM2.....	19
1.2.8. Synthèse décrite du NVS-SM2.....	20
1.3. Synthèse de nouvelles flavaglines pour l'inhibition de KRAS.....	22
1.3.1. Les flavaglines : découverte, propriétés pharmacologiques, cible moléculaire et mécanismes d'action anticancéreux.....	22
1.3.1.1. <i>Découverte</i> .....	22
1.3.1.2. <i>Propriétés pharmacologiques</i> .....	23
1.3.1.3. <i>Cible moléculaire</i> .....	24
1.3.1.4. <i>Les mécanismes d'action anticancéreux</i> .....	25
1.3.2. Synthèse de Flavaglines.....	26
1.3.2.1. <i>Première synthèse totale du rocaglamide</i> .....	26
1.3.2.2. <i>Synthèse du rocaglamide à partir d'une benzofuranone</i> .....	27
1.3.2.3. <i>Synthèse de rocaglaol par l'équipe de Ragot</i> .....	28
1.3.2.4. <i>Synthèses des flavaglines par une réaction de Nazarov</i> .....	31
1.3.3. Les protéines RAS.....	34

1.3.3.1.	<i>Régulation de KRAS par les prohibitines.....</i>	35
1.3.3.2.	<i>RSA inhibition de l'activation de KRAS par les flavaglines.....</i>	37
<b>2.</b>	<b>Objectifs.....</b>	<b>41</b>
<b>3.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>45</b>
3.1.	Amélioration de la synthèse du NVS-SM2, un activateur d'épissage.....	45
3.1.1.	Première approche pour la synthèse du NVS-SM2 .....	45
3.1.1.1.	<i>Etude rétrosynthétique .....</i>	45
3.1.1.2.	<i>Synthèse de la pyridazinone 75 .....</i>	46
3.1.2.	Deuxième approche pour la synthèse du NVS-SM2.....	49
3.1.2.1.	<i>Etude rétrosynthétique .....</i>	49
3.1.2.2.	<i>Préparation de la partie A (20).....</i>	50
3.1.2.3.	<i>Préparation de la partie C.....</i>	51
3.1.2.4.	<i>Association de la pipéridine 20 et la diiodopyridazine 98 par un couplage catalysé au cuivre.....</i>	52
3.1.2.5.	<i>Association entre la pyridazine 104 et le boronate 97 par un couplage de Suzuki-Miyaura .....</i>	54
3.1.2.6.	<i>Couplage entre halogénoypyridazine et pipéridine 20.....</i>	55
3.1.2.7.	<i>Tentative de couplage de Suzuki-Miyaura entre la pyridazine 102 et le boronate 110.....</i>	57
3.1.2.8.	<i>Préparation de la chloropyridazine 118 .....</i>	57
3.1.2.9.	<i>Couplage de Suzuki-Miyaura entre halogénoypyridazine et boronate 110.....</i>	59
3.1.2.10.	<i>Préparation du boronate tritylé 125.....</i>	60
3.1.2.11.	<i>Couplage de Suzuki-Miyaura entre pyridazine 118 et boronate tritylé 125</i> <i>61</i>	61
3.1.2.12.	<i>Optimisation du couplage de Suzuki-Miyaura en utilisant le m-bromoanisole 87 comme substrat .....</i>	61
3.1.2.13.	<i>Tests de faisabilité de l'étape de déprotection du phénol.....</i>	62
3.1.2.14.	<i>Accomplissement de la synthèse .....</i>	63

3.2.	Synthèse de nouvelles flavaglines pour l'inhibition de KRAS .....	65
3.2.1.	Structures des flavaglines cibles .....	65
3.2.2.	Méthode de synthèse envisagée .....	66
3.2.3.	Tentative de synthèse de l'intermédiaire benzofuranone 143 .....	68
3.2.4.	La réaction Mukaiyama-Michael, une solution probable.....	72
3.2.5.	Cyclisation de l'aldéhyde <i>cis</i> (144a) .....	74
3.2.6.	Finalisation de la synthèse de l'IMD-026260 et de son diastéréoisomère 175	76
3.2.7.	Vers la synthèse des flavaglines cibles .....	78
3.2.8.	Vérification de l'inversion de configuration induite par le chlorure de diméthylcarbamoyle sur un autre substrat.....	82
3.2.9.	Préparation de l'urée <i>trans</i> (200) .....	89
3.3.	Etude pharmacologique du FL3 .....	90
<b>4.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>95</b>
<b>5.</b>	<b>Partie expérimentale .....</b>	<b>99</b>
5.1.	Procédures pour le chapitre 3.1.....	100
5.1.1.	Première approche de synthèse .....	100
5.1.2.	Deuxième approche de synthèse .....	105
5.2.	Procédures pour le chapitre 3.2.....	129
<b>6.</b>	<b>Publications.....</b>	<b>161</b>



# ***1.* INTRODUCTION**

---





# 1. Introduction

## 1.1. Préambule : contexte et objectifs généraux

Cette thèse comporte deux parties :

- le développement d'une synthèse permettant de préparer une quantité suffisante du composé NVS-SM2 pour explorer son potentiel thérapeutique dans les cancers ;
- la synthèse de dérivés de produits naturels, les flavaglines pour optimiser leur activité inhibitrice de KRAS.

Le NVS-SM2 est un puissant activateur de l'épissage de l'ARN ayant démontré des effets protecteurs dans un modèle d'atrophie spinale musculaire. Nos collaborateurs à l'Institut Curie nous ont demandé d'améliorer la synthèse de ce composé pour en fournir des quantités suffisantes pour des études approfondies dans des modèles de cancers chimiorésistants.

KRAS est l'oncogène le plus souvent muté dans les cancers. Des travaux antérieurs ont montré que des flavaglines peuvent inhiber KRAS. En nous basant sur ces travaux, nous avons synthétisé de nouveaux analogues susceptibles de présenter des activités anti-KRAS améliorées.

## 1.2. Amélioration de la synthèse du NVS-SM2, un activateur d'épissage

### 1.2.1. Introduction

Le génome humain génère jusqu'à un million de protéines différentes à partir d'un code génétique contenant un peu plus de 20 000 gènes distincts. Il y a donc une augmentation substantielle de la diversité entre le génome et le protéome qui contrôle comment les cellules se comportent, interagissent et forment des tissus et des organes complexes. L'un des principaux mécanismes de cette diversité est la génération de multiples formes d'ARN messager (ARNm), à partir d'une seule unité génétique par le processus d'épissage alternatif.<sup>1</sup>

### 1.2.2. Epissage des ARNm

L'épissage est un processus de réorganisation qui permet à la cellule et à l'organisme de modifier rapidement le produit du gène en réponse à différentes voies de signalisation. Au niveau du noyau, l'ADN transmet ses informations par sa transcription en ARNm, qui sert à son tour d'intermédiaire pour la traduction d'un gène en protéine. L'ARNm, avant d'être traduit, doit subir une étape de maturation, l'épissage. Cette dernière implique une élimination combinatoire hautement régulée des séquences intermédiaires du pré-ARNm, les introns (segments de séquences non codantes) suivi par la ligature des exons (segments de séquences codantes) pour former un ARNm mature, qui est ensuite exporté vers le cytosol à partir du noyau. Lorsqu'un exon peut être soit inclus soit exclu de l'ARNm, on parle d'épissage alternatif.

Récemment, Pan et *al.* ont montré que plus de 94% des gènes humains sont alternativement épissés.<sup>2</sup> Cela fait de l'épissage alternatif l'un des principaux moteurs de la diversité protéomique. Ce mécanisme complexe se fait en plusieurs étapes sous l'action d'une machinerie appelée « le spliceosome ».

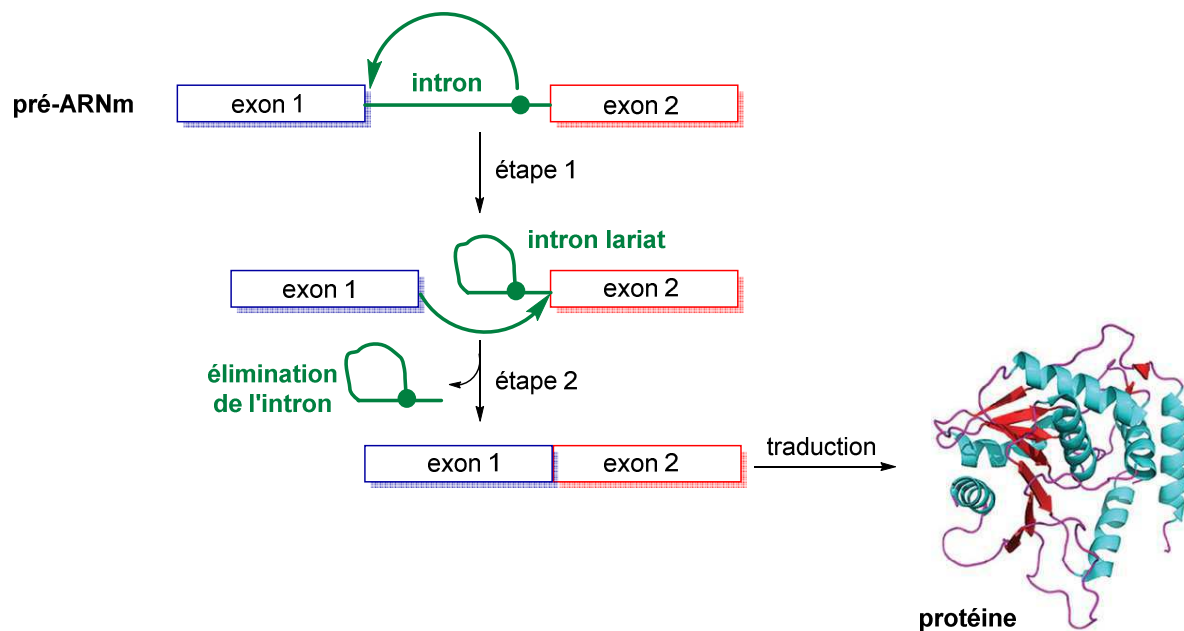
---

<sup>1</sup> Bates, D.O.; Morris, J. C.; Oltean, S.; Donaldson, L. F., *Pharmacol. Rev.*, **2017**, *69*, 63-79.

<sup>2</sup> Pan, Q.; Shai, O.; Lee, L. J.; Frey, B. J.; Blencowe, B. J., *Nature Genet.*, **2008**, *40*, 1413-1415.

### 1.2.3. Le spliceosome

Le spliceosome est un complexe moléculaire constitué de cinq particules ribonucléoprotéiques (snRNP) (U1, U2, U4, U5 et U6) et plus de 100 protéines associées.<sup>3</sup> Au cours de l'épissage, le spliceosome forme une série de complexes dont chacun sert à conduire une étape discrète nécessaire pour exciser un intron du pré-ARNm. Le processus passe par la transestérification d'un intron pour former un lariat (étape 1), qui sera libéré par un clivage (étape 2) pour fournir l'ARNm qui sera traduit en protéines (Schéma 1).



**Schéma 1.** Mécanisme simplifié de l'épissage. Elimination de l'intron et ligation des exons.

### 1.2.4. Cancer et épissage

Une altération de l'épissage est souvent observée dans les cellules cancéreuses. Comme c'est encore souvent le cas pour les tissus sains, la cause et les conséquences physiologiques de ces épissages aberrants restent mal compris, même s'il semble établi que cela augmente la diversité fonctionnelle des protéines concernées. Chacune des caractéristiques généralement liées au cancer sont affectées par un épissage aberrant. En particulier, l'apoptose et les métastases sont affectées par l'épissage alternatif d'un grand nombre de gènes, comme RAC1 par exemple (Tableau 1). L'expression de l'isoforme RAC1B

<sup>3</sup> Léon, B.; Kashyap, M. K.; Chan Warren, C.; Krug Kelsey, A.; Castro, J. E.; La Clair, J. J.; Burkart, M. D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56, 12052-12063.

augmente la prolifération cellulaire et le potentiel invasif des cellules cancéreuses, ainsi que son implication dans l'inflammation et l'instabilité génomique en provoquant une augmentation d'espèces d'oxygène réactive au niveau cellulaire.

Gènes	Caractéristiques associées au cancer
FN1, VEGFA	Induction de l'angiogenèse
CD44, CD82, CDH11, CTTN, ENHA, FGFR2, FAM3B, KLF6, MST1R, RAC1, TNC	Activation de l'invasion et des métastases
CD44, IRF3, PPARA, RAC1, STAT3	Tumeur favorisant l'inflammation
TERT	Immortalité répllicative
CEACAM1, HLA-G, IL7	Résistance à la destruction immunitaire
AIMP2, ANXA7, BIN1, RB1, TP53	Résistance aux suppresseurs de croissance
AR, BRAF, CCND1, EGFR, FGFR2, HRAS, KRAS, PTEN, RAC1	Maintien de la signalisation proliférative
GLS, LDHC, MAX, PFKFB3, PKM	Dérégulation énergétique cellulaire
BIRC5, BCL2L1, CASP2, CASP8, CASP9, FAS, CFLAR, MCL1, MDM2, TP53	Résistance à la mort cellulaire
MLH1, MRE11A, RAC1	Instabilité du génome et mutation

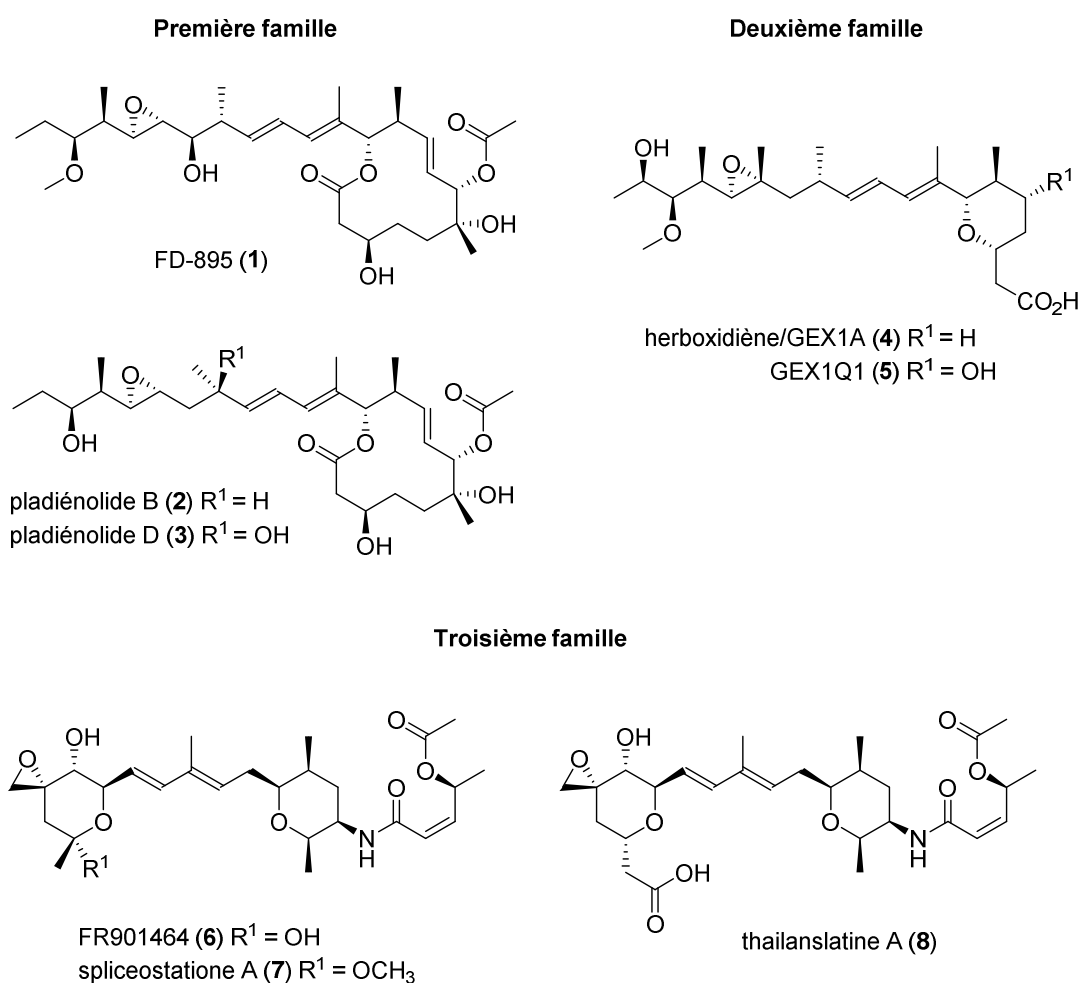
**Tableau 1.** Epissage alternatif et caractéristiques du cancer. L'épissage alternatif de gènes importants a été impliqué dans la régulation de chacune des caractéristiques du cancer. Certains gènes (en rouge) sont impliqués dans plusieurs de ces caractéristiques.<sup>4</sup>

### 1.2.5. Les modulateurs de l'épissage

À partir des années 1970, la compréhension des mécanismes complexes de l'épissage de l'ARN est devenue un domaine d'étude important en biologie. Alors que la majorité des études d'épissage ont été menées dans des laboratoires de génétique et de biologie de l'ARN, la découverte en 2007 des produits naturels ciblant les spliceosomes a ouvert la porte à des exploitations pharmacologiques. Au cours de cette même année, deux équipes japonaises ont montré que l'unité SF3b, un sous-complexe de l'unité U2 du spliceosome, pourrait être une

<sup>4</sup> Sveen, A.; Kilpinen, S.; Ruusulehto, A.; Lothe, R. A.; Skotheim, R. I., *Oncogene*, **2016**, 35, 2413-2427.

cible thérapeutique en oncologie.<sup>5, 6</sup> Ainsi, deux familles de polycétides naturels ont été identifiées comme modulateurs de l'épissage. Celles-ci comprennent le FD-895 (**1**), les pladiénolides (**2** et **3**) et les herboxidiènes (**4** et **5**) (Figure 1). Cela étant, une troisième famille de polycétide inhibiteur d'épissage a été ensuite découverte. Cette dernière est composée de quatre fragments chiraux discrets : deux cycles pyranes reliés par un fragment diène et une chaîne latérale acyclique liée au pyrane central par une liaison amide  $\alpha,\beta$ -insaturée. Elle comprend, par exemple, le FR901464 (**6**), la spliceostatine A (**7**) et la thailanstatine A (**8**) (Figure 1).<sup>7, 8</sup>



**Figure 1.** Familles de polycétides inhibiteurs de l'épissage.

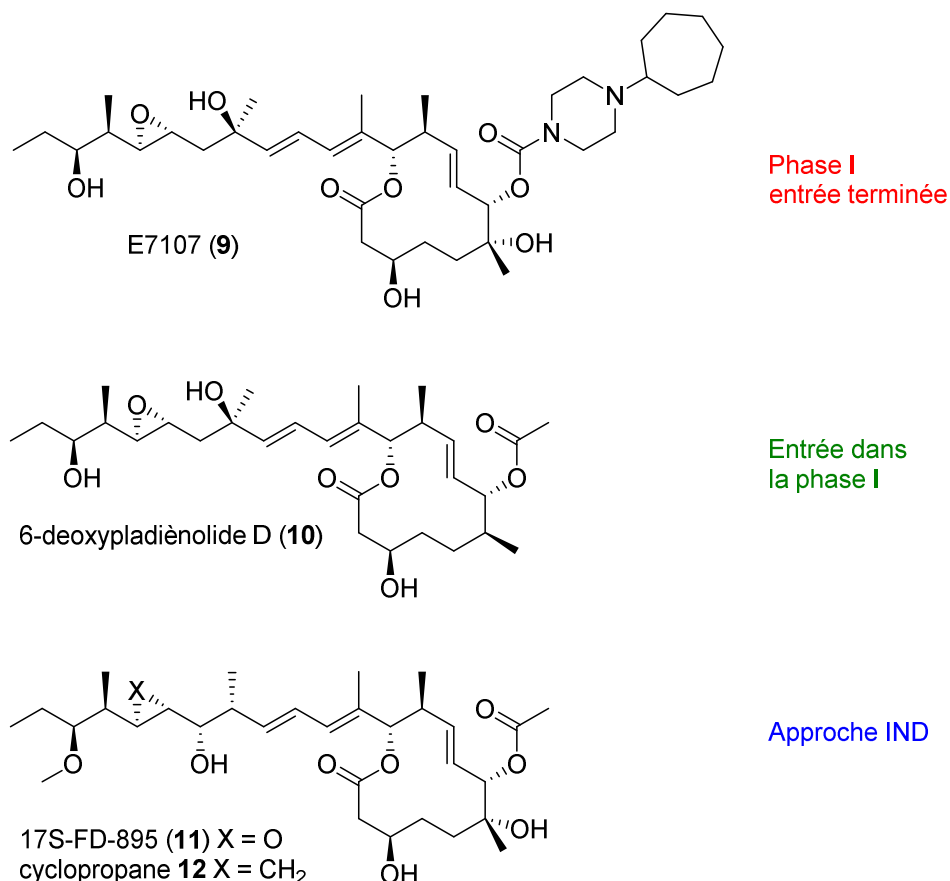
<sup>5</sup> Kotake, Y.; Sagane, K.; Owa, T.; Mimori-Kiyosue, Y.; Shimizu, H.; Uesugi, M.; Ishihama, Y.; Iwata, M.; Mizui, Y., *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, *3*, 570-575.

<sup>6</sup> Kaida, D.; Motoyoshi, H.; Tashiro, E.; Nojima, T.; Hagiwara, M.; Ishigami, K.; Watanabe, H.; Kitahara, T.; Yoshida, T.; Nakajima, H.; Tani, T.; Horinouchi, S.; Yoshida, M., *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, *3*, 576-583.

<sup>7</sup> H. Nakajima; B. Sato; T. Fujita; S. Takase; H. Terano; M. Okuhara, *J. Antibiot.*, **1996**, *49*, 1196-203.

<sup>8</sup> X. Liu; S. Biswas; M. G. Berg; C. M. Antapli; F. Xie; Q. Wang; M. C. Tang; G. L. Tang; L. Zhang; G. Dreyfuss; Y. Q. Cheng, *J. Nat. Prod.*, **2013**, *76*, 685-693.

À ce jour, il existe des informations structurales limitées concernant le site de liaison des modulateurs d'épissage sur SF3b. Malgré ce manque de données, les RSA détaillées des trois familles principales ont été déterminées et cela a permis la synthèse de nouveaux composés ciblant SF3b dont certains sont entrés dans des essais cliniques avec divers degrés de succès.<sup>3</sup> Parmi eux, le E7107 (**9**), a modifié l'épissage de l'ARN dans les tumeurs solides au cours de la phase I d'essais cliniques. Cependant, ces essais ont été interrompus en raison d'une toxicité sévère (Figure 2).<sup>3</sup>



**Figure 2.** Structure de l'E7107 (**9**), premier candidat à entrer dans les essais cliniques de phase 1 pour les patients atteints de tumeurs solides. Les analogues de la génération suivante 6-déoxypladienolide D (H3B-8800, **10**), 17S-FD-895 (**11**), et le cyclopropane **12** sont actuellement examinés dans des cancers hématologiques. IND = Investigational New Drug application.

De plus un produit naturel, le 6-déoxypladienolide D (**10**) synthétisé en 2014 par Arai et *al.* au sein du laboratoire H3 Biomedicine a montré une forte inhibition de la croissance des

cellules cancéreuses mutées pour SF3B1. Cet effet est consécutif à une liaison au complexe SF3b et une inhibition de l'épissage du pré-ARNm.<sup>9</sup>

Plus récemment, cette équipe a engagé le H3B-8800 (structure non encore révélée) dans les essais cliniques de la phase I. D'autres composés prometteurs incluent le 17S-FD-895 (**11**) et son dérivé cyclopropane **12**, ont récemment démontré une efficacité *in vivo* viable pour la leucémie myéloïde aiguë (LMA) en favorisant le maintien des cellules souches (Figure 2).<sup>3</sup>

A côté de ces composés inhibiteurs de l'épissage, il existe une molécule activatrice de ce dernier, le NVS-SM2.

### 1.2.6. Découverte et intérêt du NVS-SM2

L'extrême précision de l'épissage est essentielle à la synthèse d'ARN messagers fonctionnels et contribue donc à l'expression du génome. De nombreuses maladies génétiques, comme l'atrophie spinale musculaire (ASM), résultent d'une altération de l'épissage qui empêche l'expression correcte du gène muté.



**Figure 3.** Enfant souffrant de l'ASM (publié le 8 novembre 2012 par Allison Hersh pour le Savannah Morning News).

L'ASM est une maladie héréditaire caractérisée par une faiblesse et une atrophie des muscles. Elle affecte les cellules nerveuses avec une incidence mondiale estimée de 1 sur

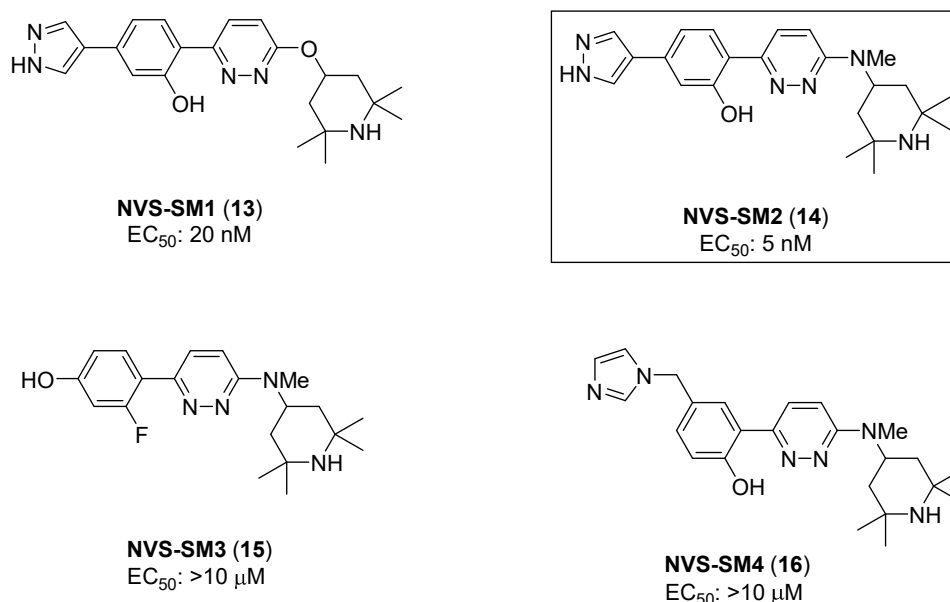
---

<sup>9</sup> Arai, K.; Buonamici, S.; Chan, B.; Corson, L.; Endo, A.; Gerard, B.; Hao, M.-H.; Karr, C.; Kira, K.; Lee, L.; Liu, X.; Lowe, J. T.; Luo, T.; Marcaurette, L. A.; Mizui, Y.; Nevalainen, M.; O'Shea, M. W.; Park, E. S.; Perino, S. A.; Prajapati, S.; Shan, M.; Smith, P. G.; Tivitmahaisoon, P.; Wang, J. Y.; Warmuth, M.; Wu, K.-M.; Yu, L.; Zhang, H.; Zheng, G.-Z.; Keane, G. F., *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 5560-5563.

11000 naissances vivantes. L'ASM est la cause génétique la plus fréquente de mortalité chez les enfants, avec plus de 50% des patients atteints par cette maladie avant l'âge de deux ans.

Cette affection résulte d'une déficience dans la protéine SMN (survie des motoneurones), qui provoque la mort des motoneurones  $\alpha$  dans la moelle épinière. Les humains ont deux gènes, SMN1 et SMN2, qui produisent des protéines SMN. La protéine complète SMN (FL-SMN) est avant tout un produit du gène SMN1. Environ 95% des cas d'ASM sont dus à une délétion homozygote du gène SMN1 et les autres cas sont attribués à des mutations ponctuelles dans ce gène. Le gène SMN2 ne peut pas totalement compenser la carence en SMN résultant, parce que sa transcription en ARN est souvent épissée incorrectement. Cependant, une seule transition nucléotidique dans le gène SMN2 provoque un épissage et une exclusion altérées de l'exon 7, ce qui ne génère que 10 à 20% de l'ARNm et de la protéine SMN complète. L'ARNm restant code pour une protéine tronquée et instable.

En 2015, Palacino et *al.* ont publié, à la suite de recherches visant à trouver des thérapies pour l'ASM, la découverte de petites pyridazines, actives oralement et activatrices de l'inclusion d'exon 7 de la SMN. Parmi ces molécules, la plus active est le NVS-SM2 (**14**) (Figure 4).<sup>10</sup>



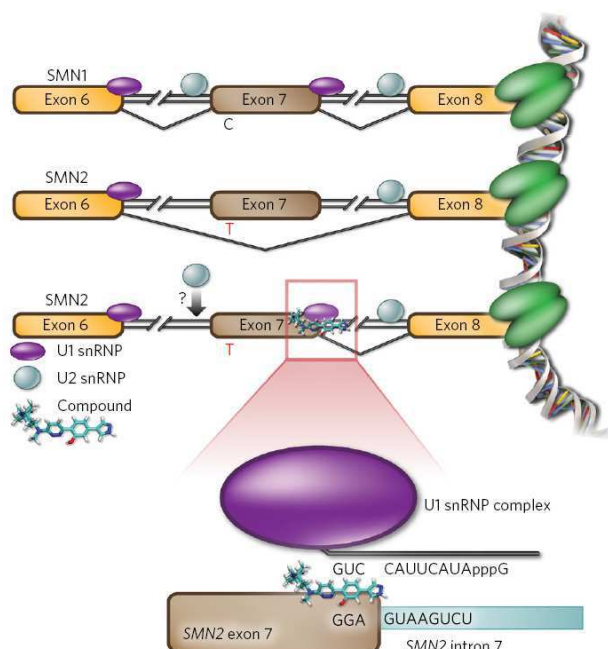
**Figure 4.** Structures des molécules activatrices de l'inclusion d'exon 7 de la SMN.<sup>10</sup>

<sup>10</sup> Palacino, J.; Swalley, S. E.; Song, C.; Cheung, A. K.; Shu, L.; Zhang, X.; Van Hoosear, M.; Shin, Y.; Chin, D. N.; Keller, C. G.; Beibel, M.; Renaud, N. A.; Smith, T. M.; Salcius, M.; Shi, X.; Hild, M.; Servais, R.; Jain, M.; Deng, L.; Bullock, C.; McLellan, M.; Schuierer, S.; Murphy, L.; Blommers, M. J.; Blaustein, C.; Berenshteyn, F.; Lacoste, A.; Thomas, J. R.; Roma, G.; Michaud, G. A.; Tseng, B. S.; Porter, J. A.; Myer, V. E.; Tallarico, J. A.; Hamann, L. G.; Curtis, D.; Fishman, M. C.; Dietrich, W. F.; Dales, N. A.; Sivasankaran, R., *Nat. Chem. Biol.*, **2015**, *11*, 511-7.



### 1.2.7. Mode d'action du NVS-SM2

Ces petites molécules modulatrices d'épissage du SMN2 agissent en stabilisant l'interaction entre l'unité snRNP U1 et le site 5' (5'ss) de l'exon 7 du pré-ARNm du SMN (Figure 5).



**Figure 5.** Modèle schématique du mécanisme d'action. L'épissage des transcrits SMN1 et SMN2 implique le recrutement des complexes snRNP U1 et U2 flanquant les exons.<sup>10</sup>

Le NVS-SM2 a amélioré l'épissage de la jonction Exon 7 – Exon 8 (Figure 5). En l'absence de ce composé, les transcrits de SMN2 sont mal reconnus à l'exon 7 par U1-U2, ce qui entraîne une fréquence élevée de sauts d'exon. Le NVS-SM2 améliore l'affinité de U1 au 5'ss de l'exon 7 du SMN et ainsi faciliter l'inclusion de l'exon 7. Ce modèle est cohérent avec les rapports antérieurs dans la littérature,<sup>11</sup> démontrant que des mutations du site d'épissage 5' ss de l'exon 7 affaiblissant la structure secondaire inhibent l'épissage, alors que des mutations qui stabilisent la structure secondaire au niveau de ce site renforcent l'épissage.

<sup>11</sup> Singh, N.N.; Singh, R.N.; Androphy, E.J., *Nucleic Acids Res.*, **2007**, *35*, 371–389.

### 1.2.8. Synthèse décrite du NVS-SM2

Une seule synthèse du NVS-SM2, à l'échelle de 8 mg, a été décrite par Novartis dans un brevet en 2014 (Schéma 2).<sup>12</sup> Elle comporte six étapes linéaires et commence par une borylation du phénol **17** pour former le boronate **18** avec un rendement de 58%. Ce dernier a été couplé, par un couplage de Suzuki-Miyaura, avec la 2-aminopyridazine **21** pour donner le phénol **22** avec un rendement qui n'a pas été communiqué. La pyridazine **21** a été préparée avec un rendement de 55% par une SNar entre la 2,6-dichloropyridazine **19** et la pipéridine **20**. La fonction phénol du composé **22** a été activée sous forme d'un triflate avant d'être couplée dans l'étape suivante avec le boronate **24**. Là encore, le rendement n'a pas été communiqué. La dernière étape a été une déméthylation du composé **25** avec du thiophénol pour donner le NVS-SM2 (**14**) avec 13% de rendement.

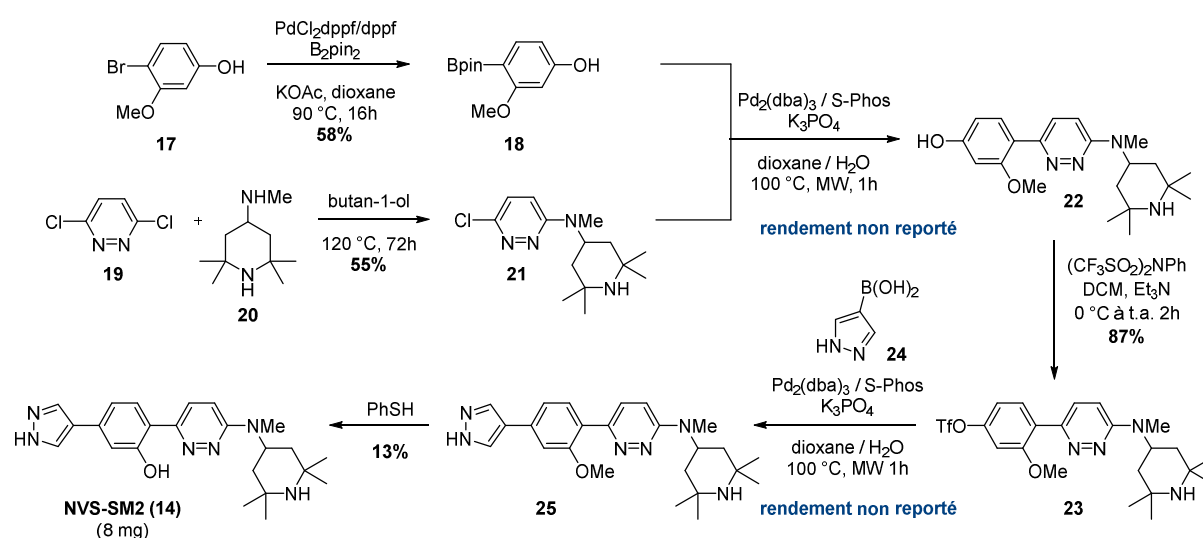


Schéma 2. Synthèse décrite par Novartis pour le NVS-SM2.<sup>12</sup>

L'inconvénient de cette synthèse réside dans la déméthylation, lors de la dernière étape, et l'introduction d'une amine stériquement encombrée qui se produisent respectivement avec un rendement de 13 et 55%. Un autre problème concerne les 2 couplages de Suzuki-Miyaura, dont les rendements n'ont pas été rapportés.

L'étude pharmacologique du NVS-SM2, sur l'ASM ainsi que sur d'autres maladies, est alors limitée par la disponibilité de cet agent. Notre collaborateur le Dr. Stephan Vagner, à l'institut Curie, nous a demandé de préparer une quantité suffisante de ce composé pour

<sup>12</sup> Cheung, A.; Chin, D. N.; Dales, N.; Fazal, A.; Hurley, T. B.; Kerrigan, J.; O'Brien, G.; Shu, L.; Sun, R.; Sung, M., WO2014028459A1, 2014.

l'examiner de manière approfondie dans des modèles de cancers chimiorésistants. Notre premier objectif a été donc, de développer une synthèse robuste du NVS-SM2.

### 1.3. Synthèse de nouvelles flavaglines pour l'inhibition de KRAS

#### 1.3.1. Les flavaglines : découverte, propriétés pharmacologiques, cible moléculaire et mécanismes d'action anticancéreux

##### 1.3.1.1. Découverte

Les flavaglines ont été isolées d'une trentaine d'espèces d'*Aglaiia*.<sup>13</sup> Ces arbustes appartiennent à la famille des Méliacées et se trouvent principalement dans la région tropicale du sud-est de l'Asie. Certaines espèces d'*Aglaiia* sont utilisées en médecine traditionnelle pour l'insuffisance cardiaque, le traitement de la diarrhée, la toux, l'inflammation et des blessures.<sup>14</sup> Les extraits d'*Aglaiia* sont aussi utilisés comme insecticides, bactéricides et en parfumerie.<sup>15</sup>

Le premier représentant des flavaglines, le rocaglamide (**26**), a été découvert en 1982 par King et ses collègues.<sup>16</sup> Depuis, une centaine de composés de la même famille ont été isolés d'une trentaine d'espèces d'*Aglaiia*. Parmi ceux-ci, les plus connus sont le rocaglamide (**26**), le rocaglaol (**27**) et le silverstrol (**28**) (Figure 6).<sup>17</sup>

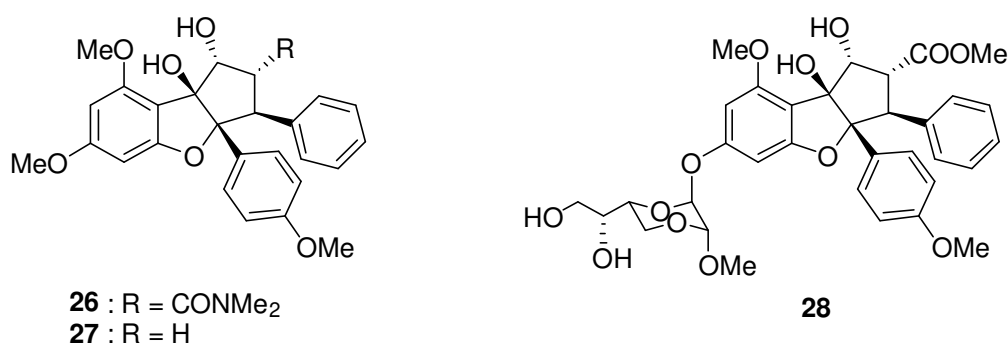


Figure 6. Exemples de flavaglines naturelles.

<sup>13</sup> Kim, S.; Salim, A.A.; Swanson, S.M.; Kinghorn, A.D., *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2006**, 6, 319-345.

<sup>14</sup> Proksch, P.; Edrada, R.; Ebel, R.; Bohnenstengel, F.I.; Nugroho, B.W., *Curr. Org. Chem.*, **2001**, 5, 923-938.

<sup>15</sup> Janaki, S.; Vijayasekaran, V.; Viswanathan, S.; Balakrishna, K., *J. Ethnopharmacol.*, **1999**, 67, 45-51.

<sup>16</sup> Lu King, M.; Chiang, C.-C.; Ling, H.-C.; Fujita, E.; Ochiai, M.; McPhail, A. T., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1982**, 20, 1150-1151.

<sup>17</sup> Basmadjian, C.; Thuaud, F.; Ribeiro, N.; Désaubry, L., *Fut. Med. Chem.*, **2013**, 5, 2185-2197.

### 1.3.1.2. Propriétés pharmacologiques

Divers activités biologiques, insecticides, antifongiques, anti-inflammatoires, neuroprotectrices et surtout anticancéreuses ont fait des flavaglines des molécules d'intérêt pour beaucoup de biologistes.<sup>17</sup> A présent, les activités anticancéreuses des flavaglines sont les plus étudiées.

Ces molécules présentent une forte activité cytostatique. Cet effet est spécifique des cellules tumorales, les cellules saines étant 1000 fois moins sensibles que les cellules tumorales.<sup>18</sup>

D'autre part, les flavaglines, à une concentration nanomolaire, présentent des activités anti-inflammatoires et cytoprotectrices. Elles induisent une forte immunosuppression via l'inactivation du facteur nucléaire des lymphocytes T activées, à la suite d'une activation des MAP kinases JNK et p38.<sup>19</sup>

En collaboration avec le Centre Allemand de Recherche sur le cancer (DKFZ) à Heidelberg, nous avons montré que les flavaglines se lient aux prohibitines, bloquant ainsi leur interaction avec C-RAF ce qui conduit à une inhibition de la voie C-Raf/MEK/ERK qui est cruciale à la survie et à la prolifération des cellules cancéreuses.<sup>20</sup>

Avec nos collaborateurs Christian Gaiddon et Canan Nebigil, tous deux à Strasbourg, nous avons découvert de nouvelles applications pharmacologiques, notamment la protection contre les effets iatrogènes de la doxorubicine.<sup>21</sup>

---

<sup>18</sup> Hausott, B.; Greger, H.; Marian, B., *Int. J. Cancer.*, **2004**, *109*, 933-940 ; Ribeiro, N.; Thuaud, F.; Bernard, Y., Gaiddon, C.; Cresteil, T.; Hild, A.; Hirsch, E.C.; Michel, P.P.; Nebigil, C.G.; Désaubry, L., *J. Med. Chem.*, **2012a**, *55*, 10064-10073 ; Su, B.N.; Chai, H.; Mi, Q.; Riswan, S.; Kardono, L.B.; Afriastini, J.J.; Santarsiero, B.D.; Mesecar, A.D.; Farnsworth, N.R.; Cordell, G.A., *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 960-972 ; Thuaud, F.; Ribeiro, N.; Gaiddon, C.; Cresteil, T.; Désaubry, L., *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 411-415 ; Zhu, J.Y.; Lavrik, I.N.; Mahlknecht, U.; Giaisi, M.; Proksch, P.; Krammer, P.H.; Li-Weber, M., *Int. J. Cancer*, **2007**, *121*, 1839-1846.

<sup>19</sup> Proksch, P.; Giaisi, M.; Treiber, M. K.; Palfi, K.; Merling, A.; Spring, H.; Krammer, P. H.; Li-Weber, M., *J. Immunol*, **2005**, *174*, 7075-7084.

<sup>20</sup> Polier G.; Neumann J.; Thuaud F.; Ribeiro N.; Gelhaus C.; Schmidt H.; Giaisi M.; Köhler R.; Müller WW.; Proksch P.; Leippe M.; Janssen O.; Désaubry L.; Krammer PH.; Li-Weber, M., *Chem Biol.*, **2012**, *19*, 1093-104.

<sup>21</sup> Bernard, Y.; Ribeiro, N.; Thuaud, F.; Turkeri, G.; Dirr, R.; Boulberdaa, M.; Nebigil, C.G.; Désaubry, L., *PLoS ONE*, **2011**, *6*, e25302 ; Ribeiro, N.; Thuaud, F.; Bernard, Y.; Gaiddon, C.; Cresteil, T.; Hild, A.; Hirsch, E. C.; Michel, P. P.; Nebigil, C. G.; Désaubry, L., *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 10064-10073 ; Qureshi, R.; Yildirim, O.; Gasser, A.; Basmadjian, C.; Zhao, Q.; Wilmet, J.-P.; Désaubry, L.; Nebigil, C. G., *PLoS ONE*, **2015**, *10*, e0141826.

### **1.3.1.3. Cible moléculaire**

Les flavaglines agissent sur deux familles de cibles moléculaires : les prohibitines (PHBs) et le facteur d'initiation de la traduction eIF4A.

#### **1.3.1.3.1. Les Prohibitines**

La PHB1 et son isoforme, la PHB2, sont des protéines d'échafaudage qui forment des oligomères entre elles ou des complexes avec d'autres protéines pour contrôler leurs activités.<sup>22</sup> Les fonctions des PHBs sont régulées par des phosphorylations par Akt, la CamK IV, la PKC- $\delta$ , Aurora A et par les récepteurs à l'insuline, l'IGF1 et l'EGF. Les PHBs peuvent aussi être conjuguées à de la *N*-acétylglucosamine ou de l'acide palmitique. Toutes ces modifications régulent la localisation intercellulaire des PHBs et leur interaction avec leurs protéines partenaires.

Les PHBs sont impliquées dans la régulation des fonctions mitochondriales, de la transcription, de l'apoptose et du métabolisme. Pour cela, les prohibitines coordonnent plusieurs voies de signalisation (PKC, PI3K/Akt/mTOR, Ras/C-Raf/MEK/ERK, E2F, p53, ...).

L'activation en particulier de C-Raf par Ras requiert impérativement la liaison de C-Raf aux prohibitines. Par ailleurs, la PHB1 est un biomarqueur surexprimé dans de nombreux cancers et représente une nouvelle cible thérapeutique pour ces affections.<sup>23</sup>

#### **1.3.1.3.2. eIF4A (facteur d'initiation eukaryotique de la traduction 4A)**

Ce facteur est nécessaire à la traduction d'un petit nombre d'ARNm codant principalement pour des facteurs qui contrôlent, l'angiogenèse, l'oncogenèse et la chimiorésistance.<sup>13</sup>

En 2009, Pelletier et collaborateurs avaient montré que les flavaglines renforcent la liaison entre l'ARNm et l'eIF4A, inhibant ce dernier et ainsi empêchant son recyclage.<sup>24</sup> Quatre ans plus tard, Rizzacasa et ses collègues ont démontré par chromatographie d'affinité

---

<sup>22</sup> Thuaud F.; Ribeiro N.; Nebigil CG.; Désaubry L., *Chem. Biol.*, **2013**, 20, 316-31.

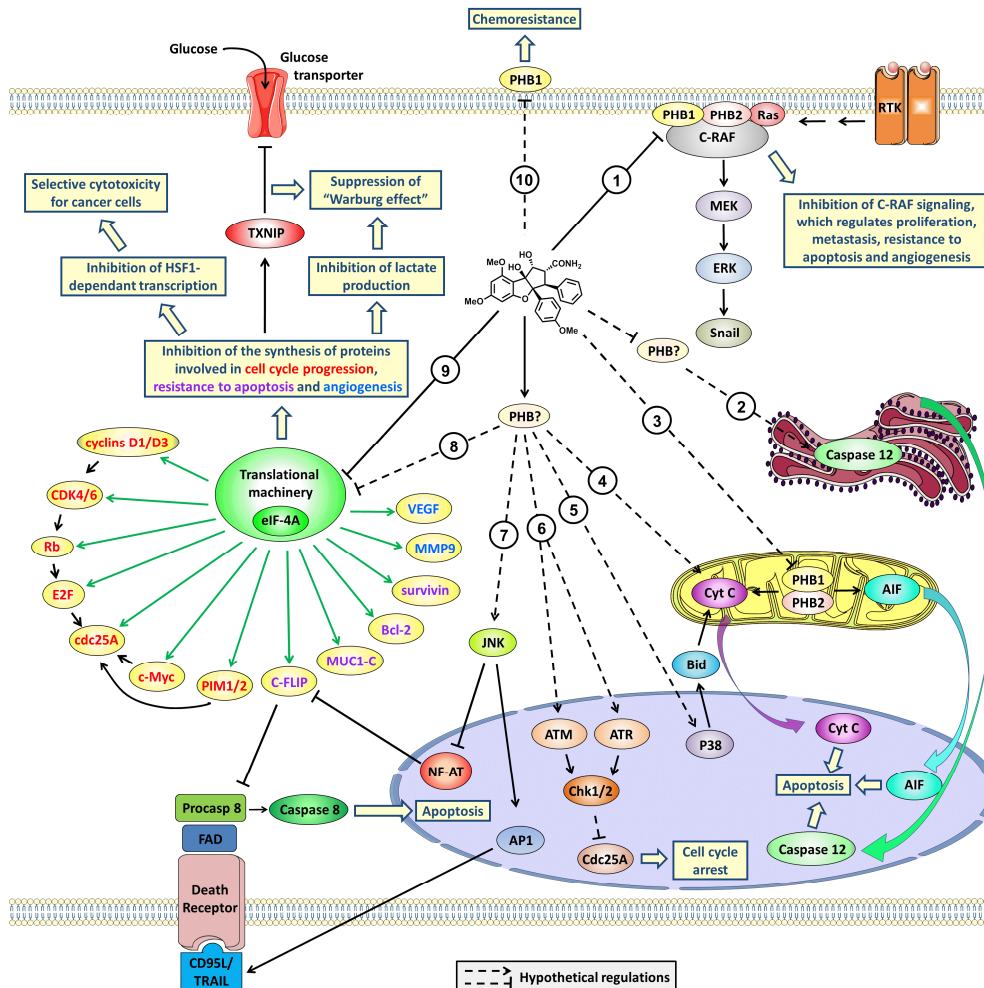
<sup>23</sup> Koushyar S; Jiang WG; Dart DA., *Cancer Lett.*, **2015**, 369, 316-22.

<sup>24</sup> Cencic, R.; Carrier, M.; Galicia-Vázquez, G.; Bordeleau, M.-E.; Sukarieh, R.; Bourdeau, A.; Brem, B.; Teodoro, J. G.; Greger, H.; Tremblay, M. L.; Porco, J. A. Jr.; Pelletier, J., *PLoS ONE*, **2009**, 4, e5223.

que les flavaglines se fixent directement à l'eIF4A.<sup>25</sup>

### 1.3.1.4. Les mécanismes d'action anticancéreux

Les flavaglines induisent la mort des cellules cancéreuses par une multitude de mécanismes résumés dans la Figure 7 ci-dessous.



**Figure 7.** Mécanismes anticancéreux des flavaglines (recopié de la référence 17).

En se liant aux PHBs, les flavaglines inhibent l'activation de C-RAF par Ras (voie 1, figure 7). Elles induisent également la translocation de la caspase-12, de l'AIF et de la cytochrome C au noyau pour entraîner l'apoptose (voies 2, 3 et 4). Elles activent la transcription médiée par p38 de la famille du Bcl-2 pro-apoptotique (voie 5). Elles induisent la voie ATM/ATR-Chk1/2-Cdc25A menant à l'arrêt du cycle cellulaire (voie 6). Elles induisent aussi l'activation de la transcription JNK-dépendante des protéines pro-apoptotiques c-FLIP

<sup>25</sup> Chambers, J. M.; Lindqvist, L. M.; Webb, A.; Huang, D. C. S.; Savage, G. P.; Rizzacasa, M. A., *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 1406-1409.

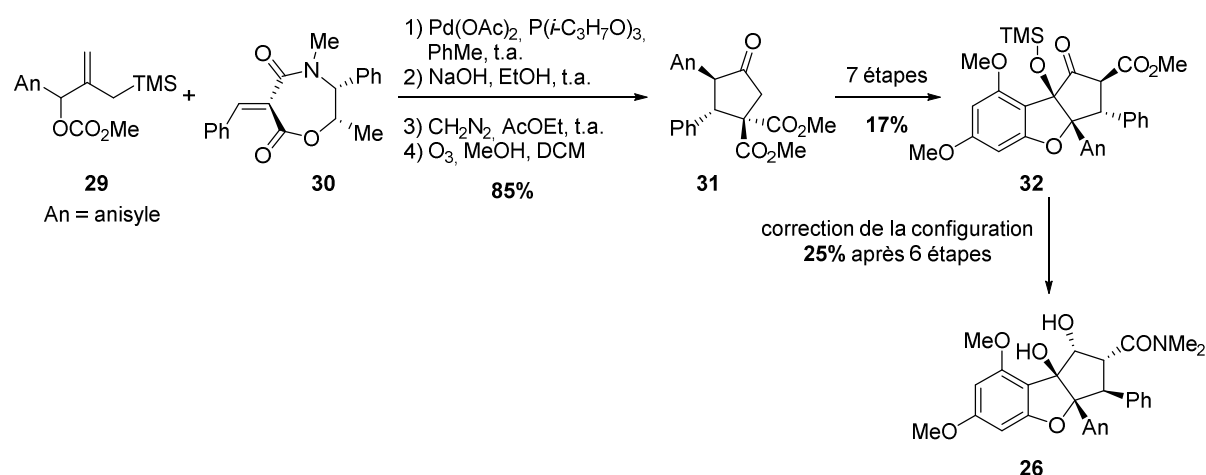
et du ligand de CD95 (voie 7) et encore l'inhibition hypothétique PHB-dépendante de la machinerie traductionnelle (voie 8). D'autre part, les flavaglines inhibent l'eIF4A menant à une baisse de l'expression des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire, la résistance à l'apoptose et l'angiogenèse (voie 9). Cette inhibition de la synthèse protéique s'accompagne d'une suppression de l'activité du facteur de transcription HSF1 et de la surexpression du suppresseur de tumeur TXNIP. TXNIP bloque l'absorption du glucose et empêche "l'effet Warburg". De plus les flavaglines induisent l'inhibition hypothétique de la chimiorésistance médiée par PHB1 à la surface cellulaire.

### 1.3.2. Synthèse de Flavaglines

Les flavaglines représentent une classe unique de produits naturels possédant un squelette compact cyclopenta[*b*]benzofurane avec deux centres chiraux quaternaires adjacents et deux cycles aromatiques en position *cis* sur un cyclopentyle très fonctionnalisé. Depuis les années 90, un grand nombre de chimistes organiciens travaillent à relever le défi de cette synthèse.<sup>26</sup>

#### 1.3.2.1. Première synthèse totale du rocaglamide

Cette synthèse publiée en 1990 par Trost est basée sur une cycloaddition [3+2] énantiosélective du composé **29** avec l'oxazépinedione **30** pour générer la cyclopentanone **31** en 4 étapes avec un rendement de 85% (Schéma 3).



**Schéma 3.** Synthèse énantiospécifique de Trost.<sup>27</sup>

<sup>26</sup> Zhao, Q.; Abou-Hamdan, H.; Desaubry, L., *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, 2016, 5908-5916.

<sup>27</sup> Trost, B.M.; Greenspan, P.D.; Yang, B.V.; Saulnier, M.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 9022-9024.



Ensuite, la formation du squelette flavagline suivie d'une correction de la configuration ont été effectués en 13 étapes pour donner le rocaglamide **26**. Bien que cette synthèse nécessite plusieurs étapes, elle reste la seule énantiospécifique.

### 1.3.2.2. Synthèse du rocaglamide à partir d'une benzofuranone

Dans les trois stratégies développées par Taylor, Dobler et Qin, l'intermédiaire commun, la benzofuranone **33**, a été engagée dans une addition de Michael intermoléculaire sur le *trans*-cinnamaldéhyde (Taylor et Dobler) ou sur un benzylidènemalonate (Qin) pour donner successivement l'aldéhyde *cis* **34** et la malonate **35** (Schéma 4).

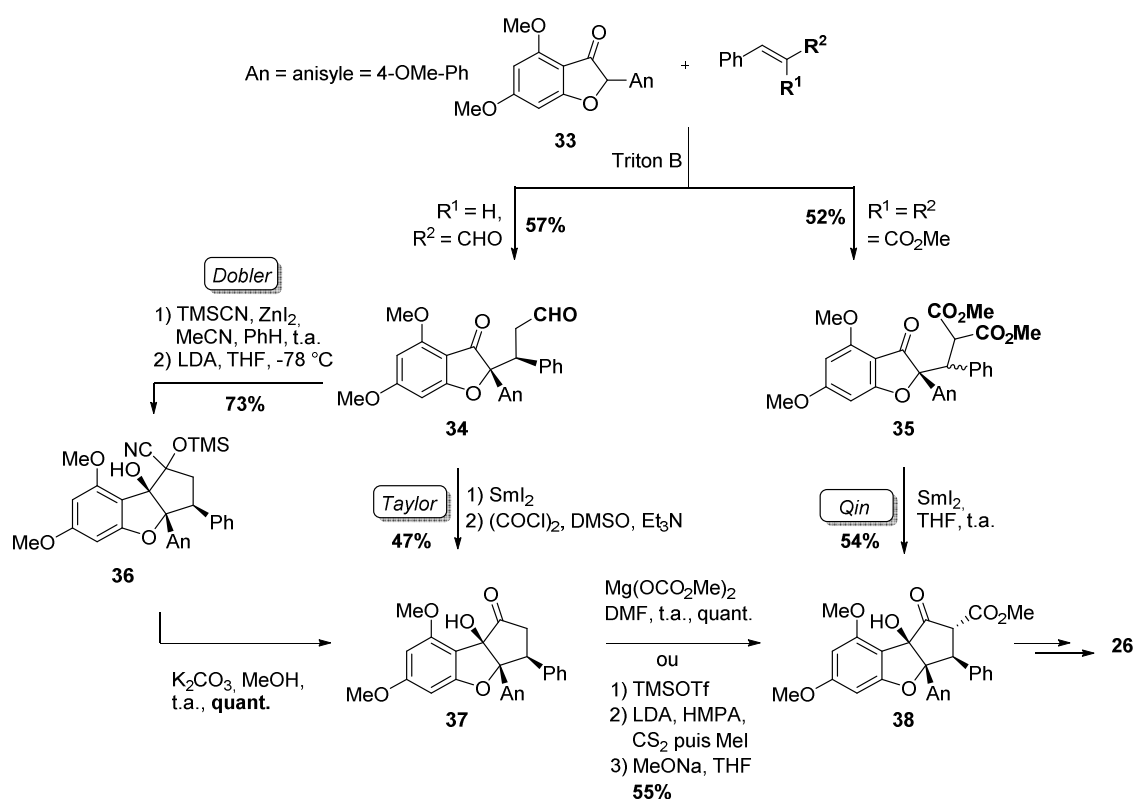


Schéma 4. Synthèse du rocaglamide par Taylor, Dobler et Qin.<sup>28, 29, 30</sup>

Une cyclisation intramoléculaire induite par du SmI<sub>2</sub> suivie d'une oxydation de Swern a permis à Taylor et collaborateurs d'obtenir la cyclopentanone **37**, qui en 3 étapes a été transformée en β-cétoester **38**. Ce dernier a été ensuite converti en rocaglamide (**26**).<sup>28</sup>

<sup>28</sup> Davey, A. E.; Schaeffer, M. J.; Taylor, R. J. K., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 0, 1137-1139 ; Davey, A. E.; Schaeffer, M. J.; Taylor, R. J. K., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1992**, 0, 2657- 2666.

<sup>29</sup> Dobler, M. R.; Bruce, I.; Cederbaum, F.; Cooke, N. G.; Diorazio, L. J.; Hall, R. G.; Irving, E., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 8281-8284.

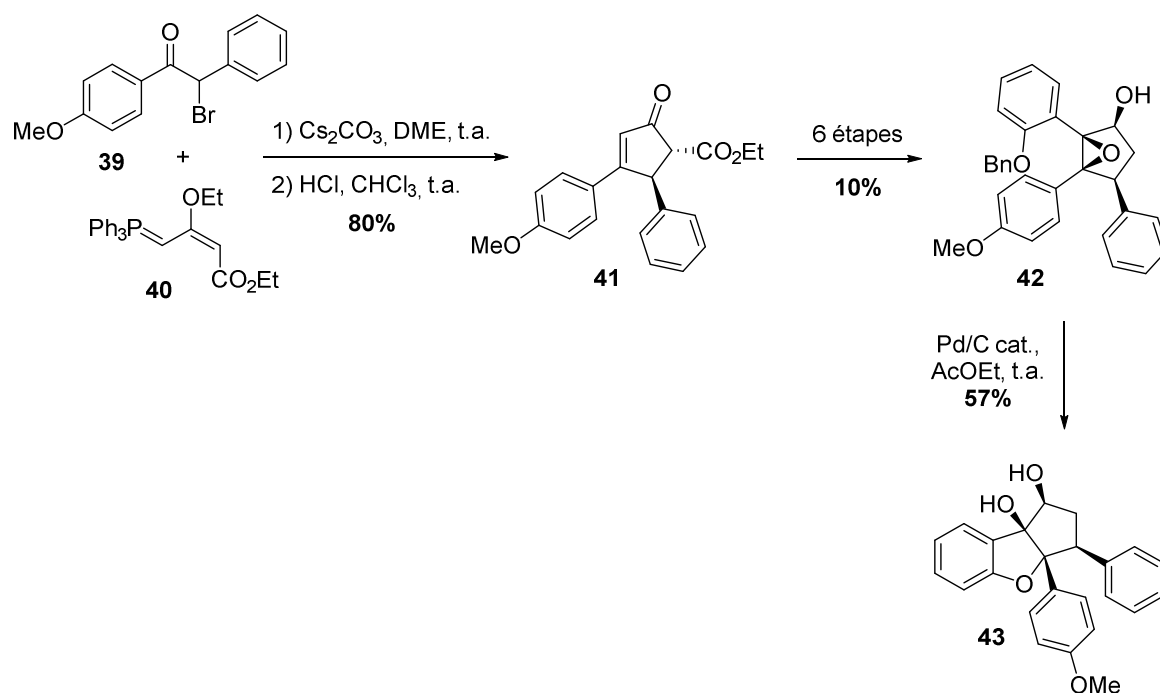
<sup>30</sup> Li, H.; Fu, B.; Wang, M. A.; Li, N.; Liu, W. J.; Xie, Z. Q.; Ma, Y. Q.; Qin, Z., *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 2008, 1753-1758.

La synthèse de la cyclopentanone **37** a été améliorée par Dobler *et al.* en transformant l'aldéhyde **34** en une cyanhydrine **36** qui par umpolung se cyclise pour générer, après une déprotection, la cétone **37** désiré. Ensuite, une carboxylation de cette dernière à l'aide du réactif de Stiles leur a donné le  $\beta$ -cétoster **38** qui a été converti en rocaglamide (**26**) en 3 étapes.<sup>29</sup>

L'introduction d'un groupe méthoxycarbonyle sur l'accepteur de Michael a permis à Qin et collaborateurs, après un couplage pinacolique initié par du  $\text{SmI}_2$ , d'accéder directement au  $\beta$ -cétoster **38** et ainsi au rocaglamide (**26**).<sup>30</sup>

### 1.3.2.3. Synthèse de rocaglaol par l'équipe de Ragot

En 2004, Ragot et ses collaborateurs ont publié une synthèse<sup>31</sup> du squelette du rocaglaol **43** avec une ouverture d'hydroxyépoxyde **42** comme étape finale (Schéma 5).

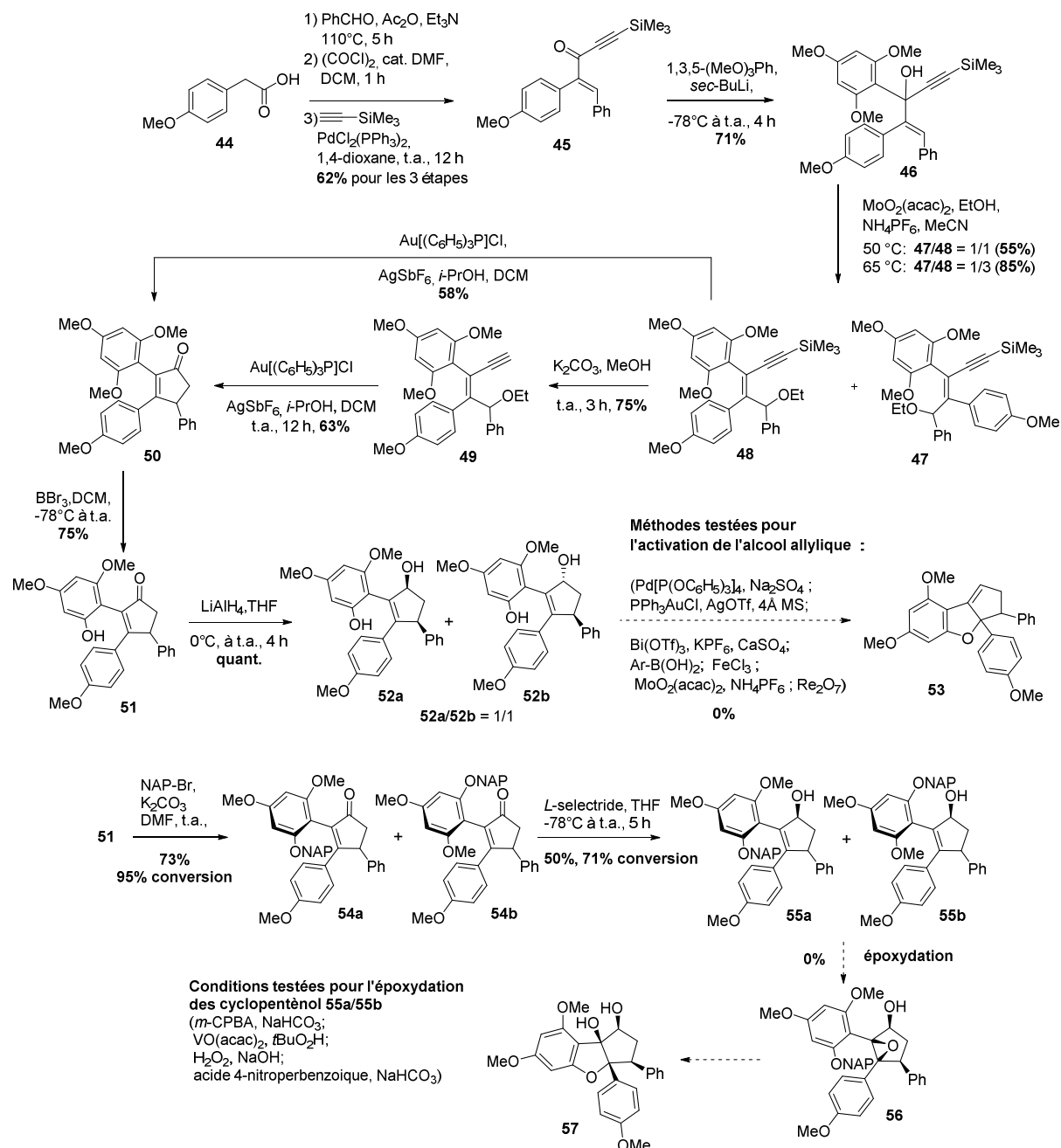


**Schéma 5.** Synthèse du squelette des flavaglines par Ragot.<sup>31</sup>

Deux étapes, à partir de la bromocétone **39** et de l'ylure de triphénylphosphine **40** ont permis d'obtenir la cyclopenténone **41**, qui en 6 étapes suivie d'une ouverture d'époxyde aboutit à la formation du didéméthoxyrocaglaol **43**.

<sup>31</sup> Thede, K.; Diedrichs, N.; Ragot, J. P., *Org. Lett.*, **2004**, 6, 4595-4597.

Cependant des travaux menés au laboratoire ont montré que cette approche ne peut pas être appliquée à la synthèse de composés fonctionnalisés par des groupements méthoxys nécessaires à l'activité pharmacologique (Schéma 6).



**Schéma 6.** Essai de synthèse de flavaglines fonctionnalisés en utilisant l'approche de Ragot et coll.<sup>32</sup>

Cette approche commence par une réaction de Perkin suivie d'une conversion de l'acide formé en chlorure d'acide, qui a été engagé dans un couplage de Sonogashira pour

<sup>32</sup> Basmadjian, C.; Zhao, Q.; Désaubry, L., *Tet. Lett.*, **2015**, *56*, 727-730.

former le composé **45**. L'alkylation de ce dernier par du triméthoxybenzène lithié a donné l'alcool propargylique **46**. Une étherification catalysée au molybdène (VI) a transformé le carbinol **46** en un mélange d'éthers **47** et **48**. Les isomères silylés **48** ou desilylés **49** ont abouti à la cyclopentènone **50** par une cyclisation à l'or (I) avec des rendements successifs de 58 et 63%. A partir de la cyclopentènone **50** une déméthylation sélective a permis d'obtenir l'énone **51** qui a été ensuite réduite en un mélange d'alcool **52a** et **52b**. Cependant aucune des méthodes d'activation de l'alcool allylique tentés n'as abouti à la synthèse du précurseur de flavagline **53**. Ces échecs ont été expliqués par une tension du cycle et une instabilité de l'intermédiaire carbocationique.

En suivant une autre stratégie, le phénol **51** a été protégé par un groupe 2-naphtylméthyle (NAP) pour donner une paire d'atropoisomères **54a** et **54b**. Une réduction en présence du *L*-sélectride a généré un mélange d'alcools **55a** et **55b**. Malheureusement, aucune des tentatives d'époxydation de ces derniers n'a abouti au composé **56**.

### 1.3.2.4. Synthèses des flavaglines par une réaction de Nazarov

En 2005, Magnus *et al.* ont pu synthétiser le squelette tricyclique des flavaglines en utilisant une cyclisation de Nazarov comme étape clé (Schéma 7).<sup>33</sup> Cette réaction a lieu en présence de tétrachlorure d'étain sur le composé **59**, préparé en six étapes à partir de l'alcyne **58**, pour donner le composé **60**. Finalement, le composé **61** a été obtenu en cinq étapes avec 19% de rendement.

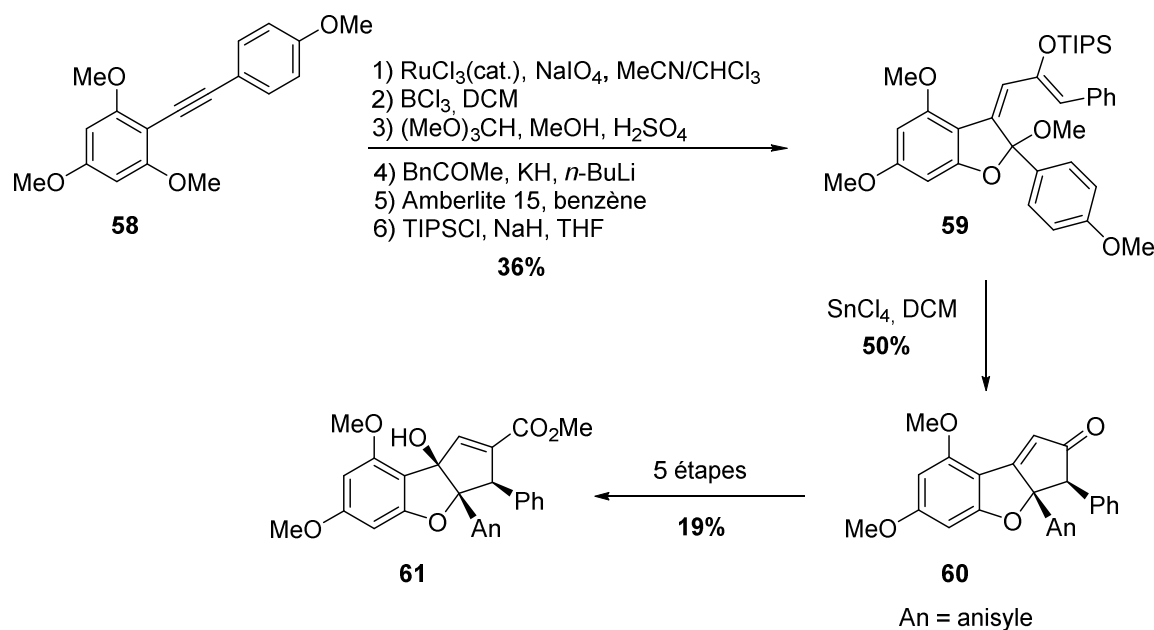
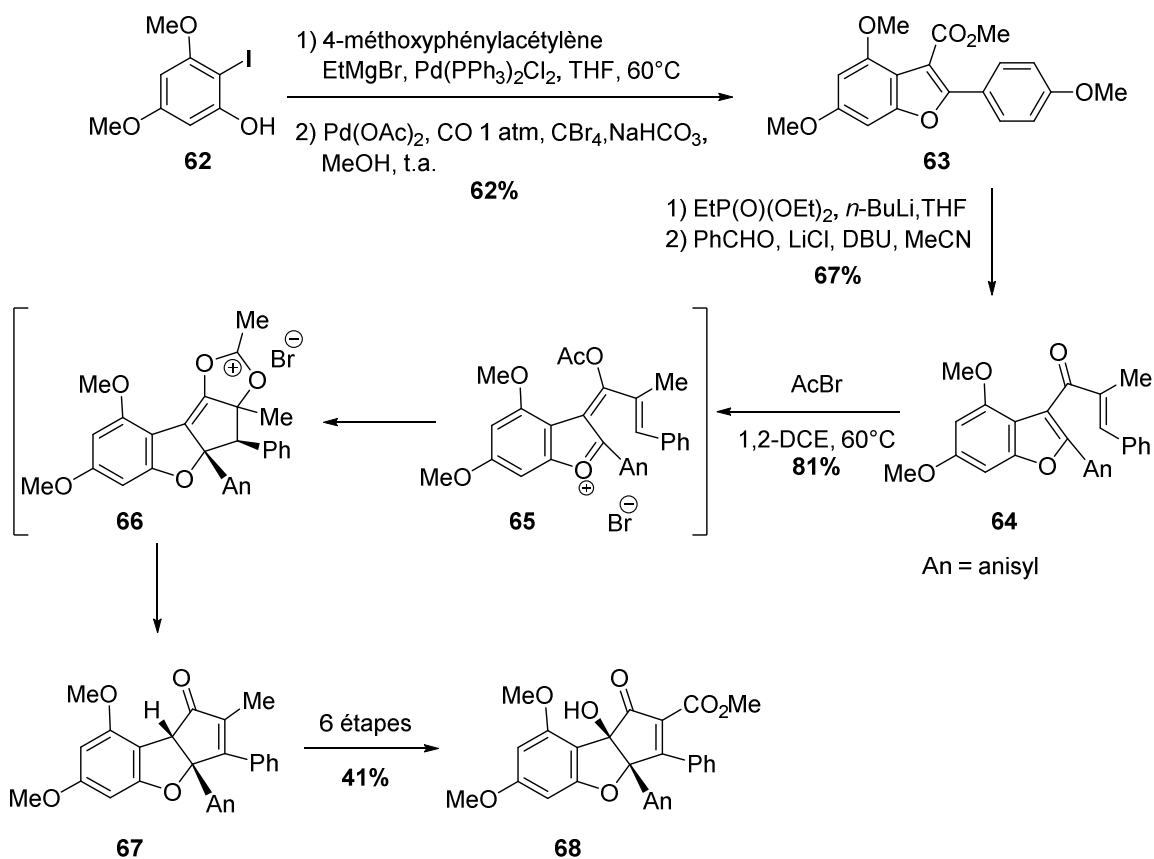


Schéma 7. Synthèse du (±)-1,2-anhydro-rocaglamide (**61**) par Magnus.<sup>33</sup>

Le (±)-1,2-anhydro-rocaglamide **61** a été obtenu par cette synthèse, mais pas le rocaglamide (**26**). Cette stratégie a été améliorée en utilisant une réaction de Nazarov induite par du bromure d'acétyle (Schéma 8).<sup>34</sup> Tout d'abord, l'iodophénol **62** a été engagé dans un couplage de Kumada/Sonogashira, suivi par une insertion de CO pour donner le composé **63**. L'ester a été transformé en phosphonate pour réagir avec le benzaldéhyde dans les conditions de Masamune-Roush pour donner l'adduit **64**. Une réaction de Nazarov en présence du bromure d'acétyle a permis la formation du squelette de flavaglines après passage par un oxonium **66**. La flavagline **67** a été ensuite transformée en déhydroflavagline **68** en 6 étapes avec un rendement de 41%.

<sup>33</sup> Magnus, P. ; Stent, M. A. H., *Org. Lett.*, **2005**, 7, 3853-3855.

<sup>34</sup> Magnus, P.; Freund, W. A.; Moorhead, E. J.; Rainey, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 6140-6142.



**Schéma 8.** Synthèse du rocaglate du méthyle **68** par Magnus.<sup>34</sup>

Une autre synthèse qui utilise également la réaction de Nazarov comme étape clé a été publiée par Frontier et collaborateurs en 2009 (Schéma 9).<sup>35</sup> La benzofuranone **33** a été transformé en 5 étapes à l'intermédiaire **69**. Ensuite, une cyclisation intramoléculaire de type Nazarov entre l'oxyde d'allène généré *in situ* par réaction avec du *m*-CPBA a permis la formation du squelette tricyclique des flavaglines **72**. Les 7 dernières étapes ont abouti au rocaglamide (**26**) avec un rendement de 8%.

<sup>35</sup> Malona, J. A.; Cariou, K.; Frontier, A. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 7560-7561.

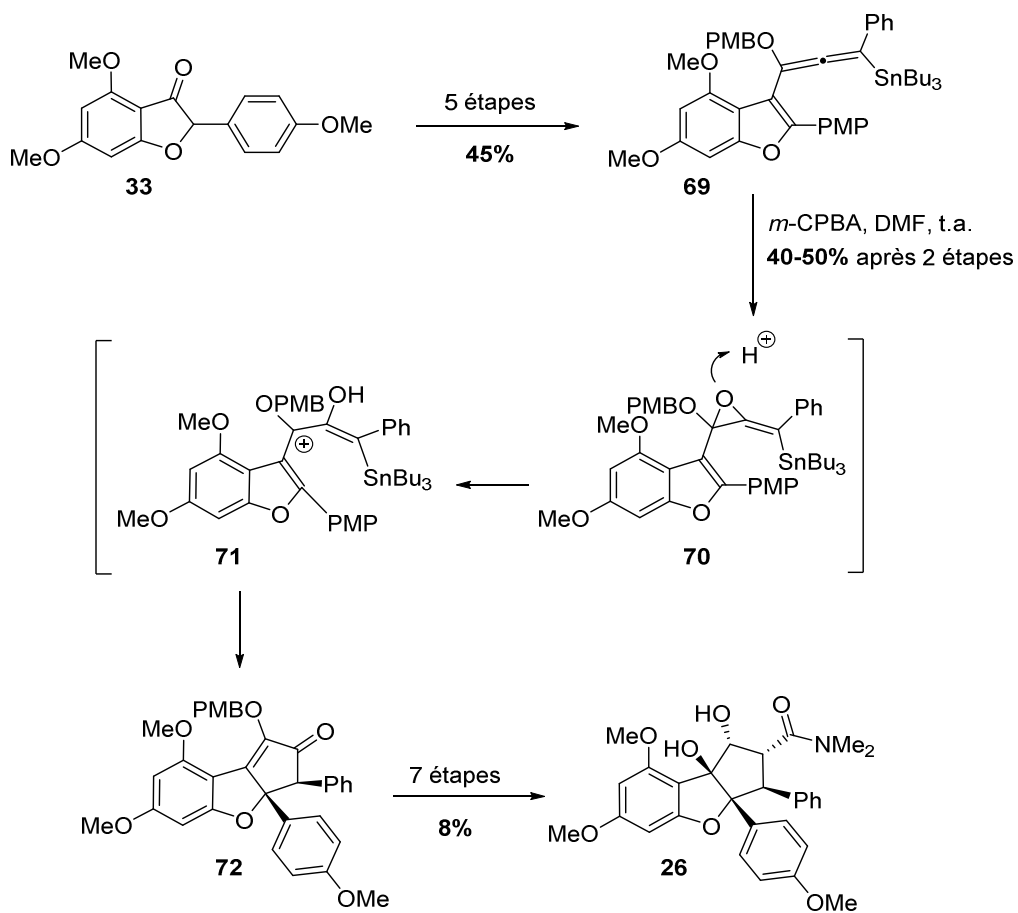


Schéma 9. Synthèse du rocaglamide (**26**) par Frontier.<sup>35</sup>

### 1.3.3. Les protéines RAS

Les protéines RAS sont des petites GTPases qui existent sous 4 formes : NRAS, HRAS, KRAS4A et KRAS4B, ces deux dernières résultant d'un épissage différentiel.<sup>36</sup> Elles sont activées par des récepteurs tyrosine kinases pour réguler des voies de signalisation impliquées notamment dans le contrôle du métabolisme, de la prolifération et de la survie cellulaire.

Actives quand elles sont couplées au guanosine triphosphate (GTP) et inactives quand elles sont liées au guanosine diphosphate (GDP), les protéines RAS sont régulées par d'autres protéines telles que les « G exchange factor » (GEF), « GTPase activating protein » (GAP) ou encore les prohibitines (PHB).

Un quart des patients souffrant d'un cancer présentent une mutation de RAS, ce qui en fait l'une des familles d'oncogènes les plus fréquemment mutés dans les cancers humains. Ces 3 gènes ne sont pas mutés avec la même fréquence : KRAS est le plus fréquemment mutés (85%), suivi de NRAS (12%) et HRAS (3%).<sup>36</sup> Les mutations qui activent KRAS sont retrouvées dans 75 à 95% des cancers du pancréas, près de 40% des cancers colorectaux et dans de nombreux autres types de cancer.

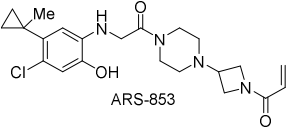
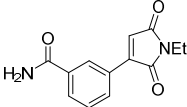
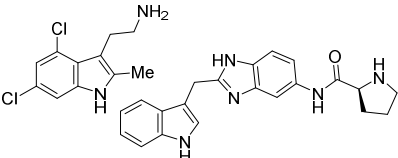
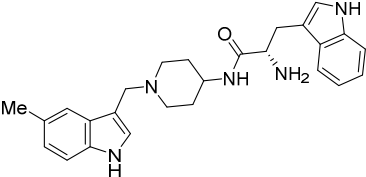
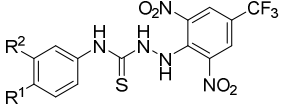
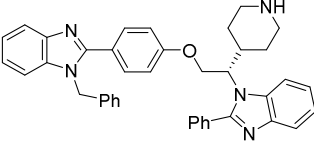
Malgré les recherches intensives durant plus de trente ans, aucun médicament ciblant KRAS n'est disponible. En effet, plusieurs types d'inhibiteurs de KRAS ont été développés, mais aucun ne combine efficacité thérapeutique et effets secondaires tolérables<sup>37</sup> (Tableau 2).

---

<sup>36</sup> McCormick F., *Clin Cancer Res.*, **2015**, 21, 1797-801.

<sup>37</sup> Ostrem J.; Shokat K., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2016**, 15, 771-785.



Structure des inhibiteurs de KRAS	Mécanisme d'action
 <p>ARS-853</p>	Inhibiteur spécifique du mutant oncogénique de KRAS-G12C.
	Inhibiteur irréversible qui alkyle le complexe RAS-SOS bloquant ainsi la liaison au GTP.
	Inhibiteurs qui ralentissent l'échange GDP → GDP.
	Activateur de l'échange GDP → GDP qui bloque l'activation des voies RAF/MEK/ERK et PI3K/Akt/mTOR.
 <p>R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = Cl: Kobe 0065 R<sup>1</sup> = F, R<sup>2</sup> = H: Kobe 2602</p>	Inhibiteurs qui se lient à GTP-RAS pour bloquer l'interaction avec RAF.
 <p>Deltarasine</p>	Inhibiteur de la phosphodiesterase δ (PDEδ) qui bloque l'interaction entre cette protéine et KRAS, perturbant ainsi la localisation intracellulaire de ce dernier.

**Tableau 2.** Exemples représentatifs de composés inhibant KRAS.<sup>38</sup>

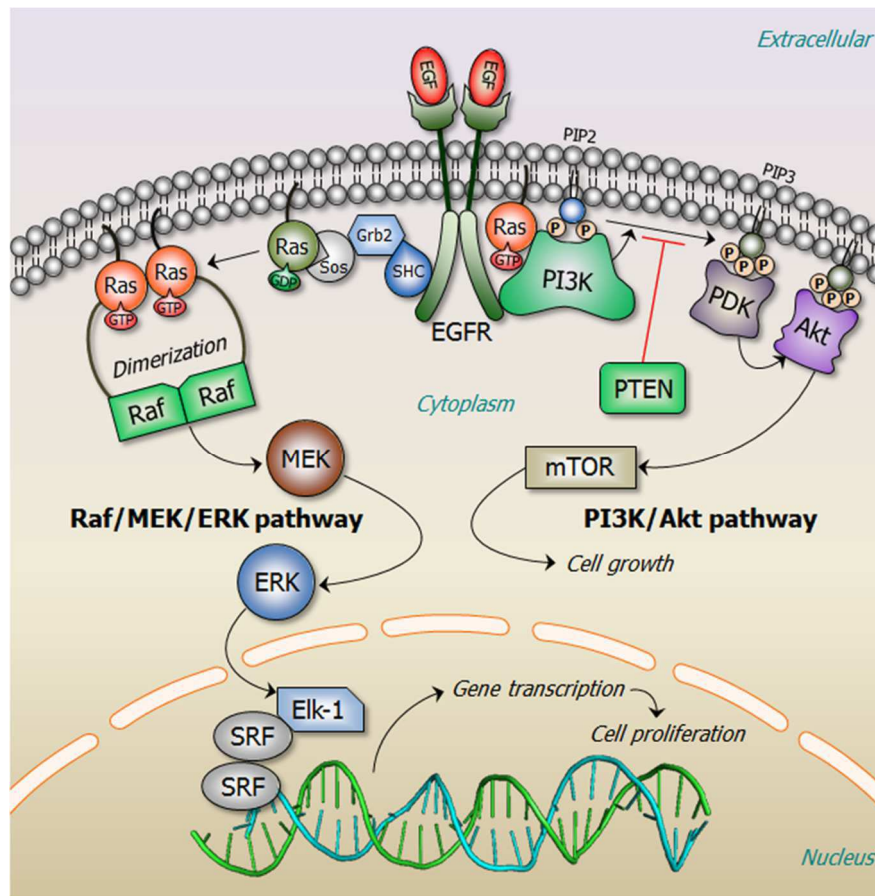
### 1.3.3.1. Régulation de KRAS par les prohibitives

En 2017, notre collaborateur le Pr. Rajalingam et son équipe à Mayence en Allemagne ont démontré que la PHB1 est surexprimée dans les cancers du poumon non à petites cellules (NSCLCs). Cette surexpression est corrélée à un pronostic défavorable.<sup>39</sup> D'une façon inattendue, ils ont observé que les flavaglines empêchent la fixation du GTP sur KRAS muté ou activé par la signalisation de l'EGF. A la suite d'une activation du récepteur à l'EGF, le recrutement de facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (GEF, comme SOS par exemple)

<sup>38</sup> Lu, S.; Jang, H.; Muratcioglu, S.; Gursoy, A.; Keskin, O.; Nussinov, R.; Zhang, J., *Chem. Rev.*, **2016**, *116*, 6607–6665.

<sup>39</sup> Yurugi, H.; Marini, F.; Weber, C.; David, K.; Zhao, Q.; Binder, H.; Désaubry, L.; Rajalingam, K., *Oncogene*, **2017**, *36*, 1-12.

se déclenche via les protéines adaptatrices SHC et Grb2 (Figure 8).<sup>38</sup> Cette association avec SOS induit le remplacement du GDP lié à RAS par du GTP et une dimérisation de cette protéine qui active ses effecteurs, notamment les kinases RAF ou les phosphoinositide 3-kinases (PI3K).



**Figure 8.** L'activation du récepteur à l'EGF induit une cascade d'événement conduisant à un échange du GDP lié à RAS par du GTP et à une activation des voies RAF/MEK/ERK et PI3K/Akt/mTOR.<sup>40</sup>

Cette équipe a aussi montré en 2005 que l'activation de B-RAF par RAS requiert une interaction directe entre B-RAF et les PHBs. En revanche, une régulation de l'échange GTP-GDP lié à RAS par les PHBs n'avait jamais été étudiée.<sup>41</sup>

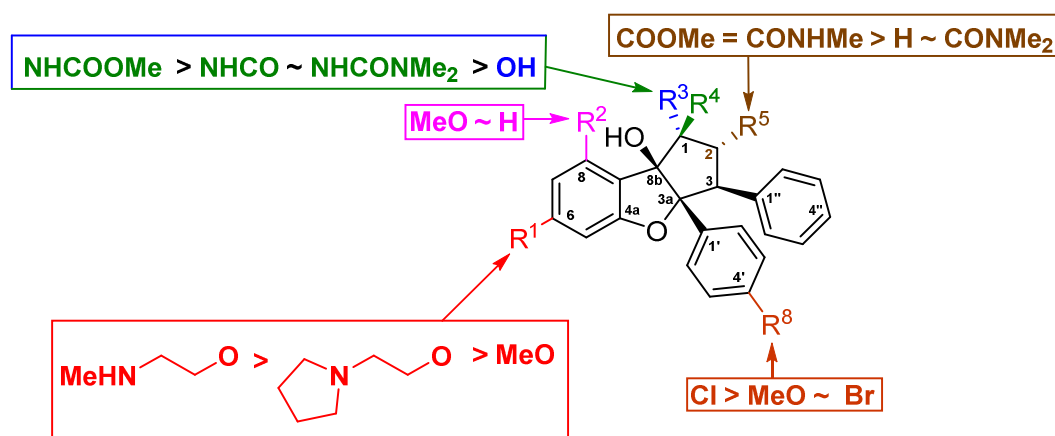
<sup>40</sup> Moncunill-Massaguer, C.; Saura-Esteller, J.; Pérez-Perarnau, A.; Palmeri, C.M.; Núñez-Vázquez, S.; Cosialls, A. M.; González-Gironès, D. M.; Pomares, H.; Korwitz, A.; Preciado, S.; Albericio, F.; Lavilla, R.; Pons, G.; Langer, T.; Iglesias-Serret, D.; Gil, J., *Oncotarget*, **2015**, *6*, 41750-41765.

<sup>41</sup> Rajalingam, K.; Wunder, C.; Brinkmann, V.; Churin, Y.; Hekman, M.; Sievers, C.; Rapp, U. R.; Rudel, T., *Nat. Cell Biol.*, **2005**, *7*, 837-843.

### 1.3.3.2. RSA inhibition de l'activation de KRAS par les flavaglines

Notre collaborateur, le professeur Rajalingam à l'Université médicale de Mayence avait montré en 2017 que le rocaglamide inhibe à des doses nanomolaires l'activation de KRAS.<sup>42</sup> Depuis, il a testé d'autres flavaglines, notamment celles synthétisées au laboratoire, ce qui a permis d'établir les premiers requis structuraux pour cette activité résumés dans la Figure 9.

Ces résultats préliminaires doivent être confirmés par une autre approche expérimentale actuellement en cours de développement dans ce laboratoire. Ces données suggèrent que le remplacement de l'hydroxy en position 1 par une diméthylurée ou surtout un carbamate de méthyle ayant une configuration opposée favorise l'effet anti- KRAS. De même l'introduction d'une chaîne aminée en position 8 (R<sup>1</sup>), ou la présence d'un chlore en position 4' (R<sup>8</sup>) à la place d'un méthoxy ou d'un brome renforcent l'activité anti-KRAS. Quant à la position 2 (R<sup>5</sup>), les effets les plus prononcés sont observés avec un ester méthylique ou un N-méthylamide.



**Figure 9.** Relations structure-activité liées à l'inhibition de l'activation de KRAS.

<sup>42</sup> Yurugi, H.; Marini, F.; Weber, C.; David, K.; Zhao, Q.; Binder, H.; Désaubry, L.; Rajalingam, K., *Oncogene*, **2017**, *36*, 4778-4789.



## **2. OBJECTIFS**

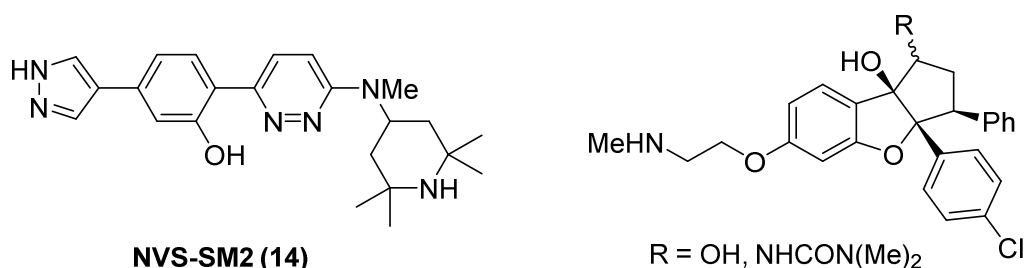
---



## 2. Objectifs

Le premier objectif de cette thèse a consisté à développer une synthèse améliorée du NVS-SM2 pour fournir suffisamment de ce composé à la communauté scientifique pour en explorer le potentiel thérapeutique.

Un deuxième objectif a consisté à synthétiser de nouvelles flavaglines pour améliorer leur effet inhibiteur de KRAS.



**Figure 10.** Structure du NVS-SM2 (**14**) et des flavaglines synthétisées.

Ces deux objectifs correspondent à deux besoins en oncologie :

- nos collaborateurs à l'Institut Curie nous ont demandé de leur fournir suffisamment de NVS-SM2 pour explorer son potentiel thérapeutique dans des modèles de cancers chimiorésistants,
- KRAS est l'oncogène le plus fréquemment mutés dans les cancers humains, et malgré trois décades de recherches intensives aucun inhibiteur de KRAS n'a encore atteint le marché. Des travaux antérieurs ayant montré que des flavaglines peuvent inhiber l'activation de KRAS, nous cherché à optimiser cette activité anti-KRAS.





## **3. RESULTATS**

---



### 3. Résultats

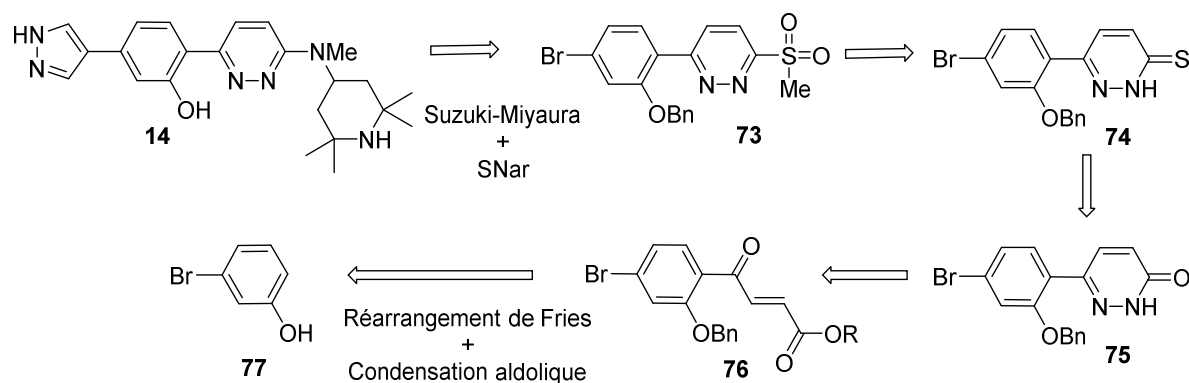
#### 3.1. Amélioration de la synthèse du NVS-SM2, un activateur d'épissage

Afin d'accéder à la synthèse du NVS-SM2, deux approches ont été examinées.

##### 3.1.1. Première approche pour la synthèse du NVS-SM2

###### 3.1.1.1. Etude rétrosynthétique

La première stratégie a été basée sur une formation de la partie pyridazine par une cyclisation intramoléculaire (Schéma 10). Nous avons proposé d'introduire les deux parties pyrazole et pipéridine par un couplage de Suzuki-Miyaura et une  $S_NAr$  en partant de la pyridazine **73**. Cette dernière peut être synthétisée à partir du *m*-bromophénol **77**, par un réarrangement de Fries suivi d'une benzoylation de la fonction hydroxyle, d'une condensation aldolique avec un dérivé d'acide glyoxylique, d'une cyclisation en présence d'hydrazine et d'un remplacement de la fonction amide par un imino sulfone en passant par un thioamide **74**.



**Schéma 10.** Etude rétrosynthétique pour la synthèse du NVS-SM2 (**14**).

Cette stratégie présente l'avantage de ne pas faire appel à un couplage de Suzuki-Miyaura problématique comme celui rencontré dans la synthèse décrite par les chercheurs de Novartis.

### 3.1.1.2. Synthèse de la pyridazinone 75

En 1994, Takeshiba *et al.* ont décrit dans un brevet japonais<sup>43</sup> la synthèse des dérivés de phénylpyridazinone **80** par une cyclisation des dérivés de l'acide phénylbuténoïque **78** (Schéma 11).

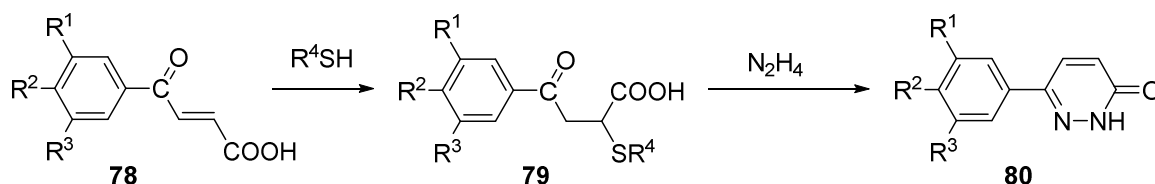


Schéma 11. Synthèse décrite pour la pyridazinone **80**.<sup>43</sup>

Cette méthode a été appliquée à notre stratégie pour former la pyridazinone **75**. Le *m*-bromophénol **77** a été engagé dans une *O*-acylation avec l'anhydride acétique suivie d'un réarrangement de Fries en présence du chlorure d'aluminium pour donner l'acétophénone **81** avec un rendement de 39%. L'hydroxyle libéré a été benzylé pour donner l'adduit **82**. Ensuite, différents essais de condensation aldolique ont été effectués pour former la chaîne butyrique ou buténoïque (Schéma 12).

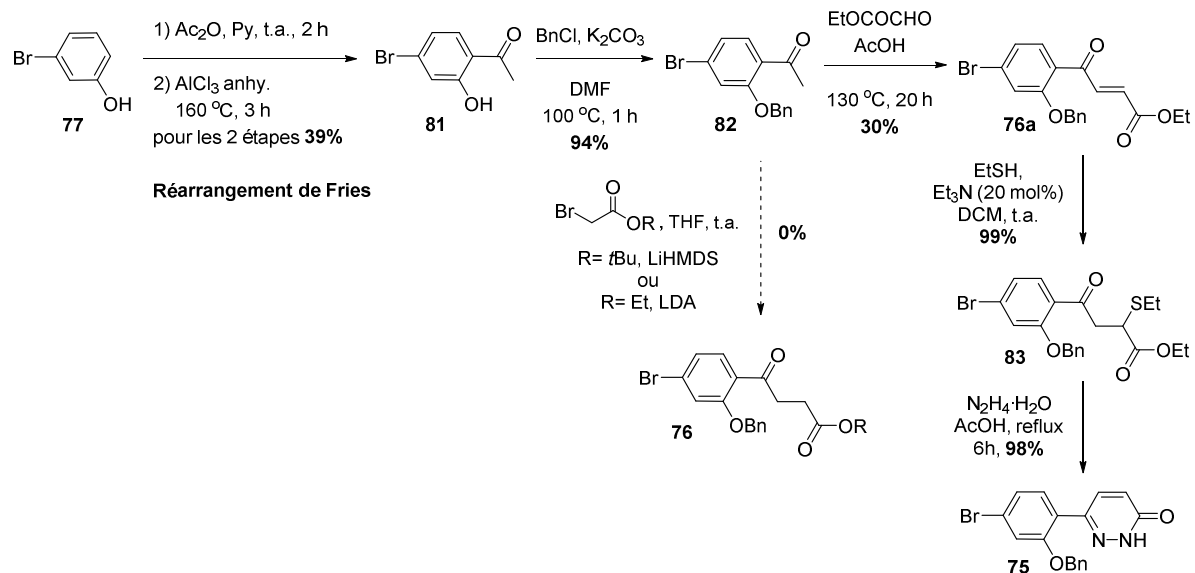
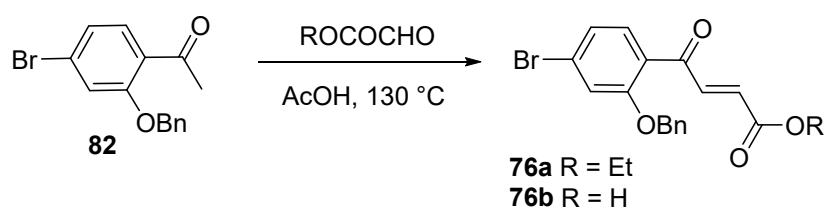


Schéma 12. Synthèse de la pyridazinone **75**.

<sup>43</sup> Takeshiba, H.; Otsu, T.; Jojima, T., JP06025184A, 1994.

Avec les conditions décrites dans un brevet<sup>44</sup> en 2008 par Kohno et *al.*, la réaction de l'acétophénone **82** avec un dérivé d'ester 2-bromoéthanoïque en présence d'une base forte tel LDA ou HMDS n'a pas abouti et seuls les produits de départs ont été récupérés. En revanche, dans les conditions décrites en 2011 par Li et *al.*,<sup>45</sup> la crotonisation entre l'acétophénone **82** et le glyoxylate d'éthyle fraîchement distillé dans l'acide acétique a pu être effectuée avec un rendement de 30%. L'ester **76a** a été attaqué par de l'éthanthiol pour donner après cyclisation, en présence d'hydrazine, la pyridazinone **75** (Schéma 12).

Malgré tous les essais effectués nous n'avons pas pu améliorer le rendement de la crotonisation (Tableau 3).



Entrée	R	Rdt(%)	Réf. <sup>b</sup>
1	Et	30	(44)
2		24 <sup>a</sup>	(46)
3	H	30	(47)

*a* : la réaction a eu lieu en présence de 0.35 équiv. du H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ; rendement estimé par RMN.

*b* : références décrivant les conditions dont nous nous sommes inspirés.

**Tableau 3.** Résultats des essais de la réaction de crotonisation entre l'acétophénone **82** et un dérivé de l'acide glyoxylique.

Cette réaction entre l'acétophénone **82** et le glyoxylate l'éthyle dans de l'AcOH en présence de l'acide orthophosphorique (Entrée 2, Tableau 3) ou en son absence (Entrée 1) sous chauffage à 130 °C, nous a donné le composé **76a** avec un rendement de 30%. Ce même résultat a été obtenu entre l'acétophénone **82** et l'acide glyoxylique en présence d'AcOH. Ces

<sup>44</sup> Kohno, Y.; Adams, D. R., *JP2008239558A*, **2008**.

<sup>45</sup> Li, X.; Liu, N.; Zhang, H.; Knudson, S. E.; Li, H.-J.; Lai, C.-T.; Simmerling, C.; Slayden, R. A.; Tonge, P. J., *ACS Med. Chem. Lett.*, **2011**, *2*, 818-823.

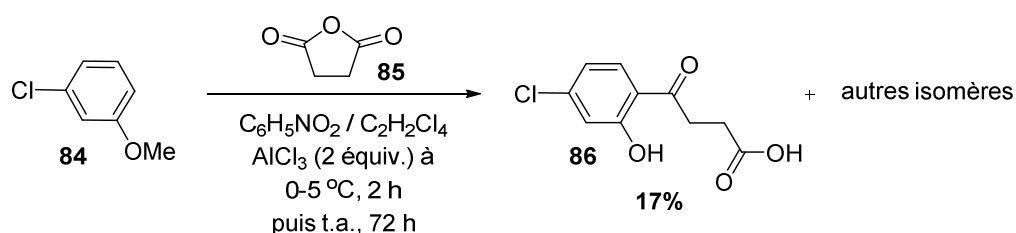
<sup>46</sup> Bourguignon, J. J.; Schoenfelder, A.; Schmitt, M.; Wermuth, C. G.; Hechler, V.; Charlier, B.; Maitre, M., *J. Med. Chem.*, **1988**, *31*, 893-897.

<sup>47</sup> Bianchi, M.; Butti, A.; Christidis, Y.; Perronnet, J.; Barzaghi, F.; Cesana, R.; Nencioni, A., *Eur. J. Med. Chem.*, **1988**, *23*, 45-52.

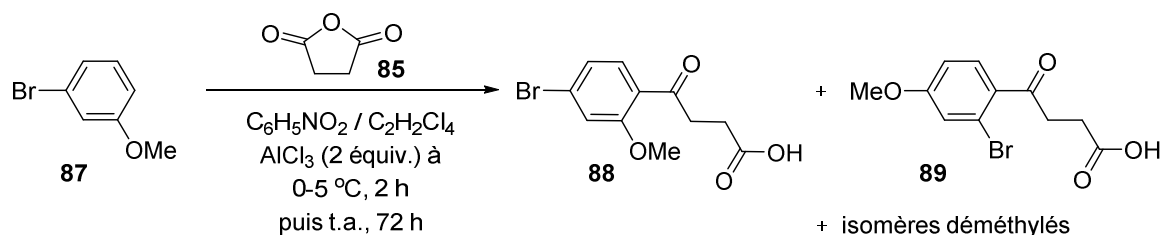
résultats nous ont poussés à examiner une autre méthode permettant d'avoir la pyridazinone désiré avec un rendement plus satisfaisant.

En 1967, F. G. Baddar *et al.* ont publié une réaction d'acylation de Friedel-Crafts<sup>48</sup> entre *m*-chloroanisole **84** avec l'anhydride succinique **85** où ils ont pu isoler l'acide butanoïque **86** avec un rendement de 17% (Schéma 13). Dans notre cas, en appliquant cette réaction sur le *m*-bromoanisole **87**, nous avons aussi obtenu un mélange d'isomères méthylés et déméthylés, mais nous n'avons pas pu isoler le composé désiré **88**.

#### Travaux de F.G. Baddar *et al.*



#### Travaux personnels



**Sch\u00e9ma 13.** R\u00e9actions de Friedel-Crafts des anisoles **84** et **87** avec l'anhydride succinique **85**.

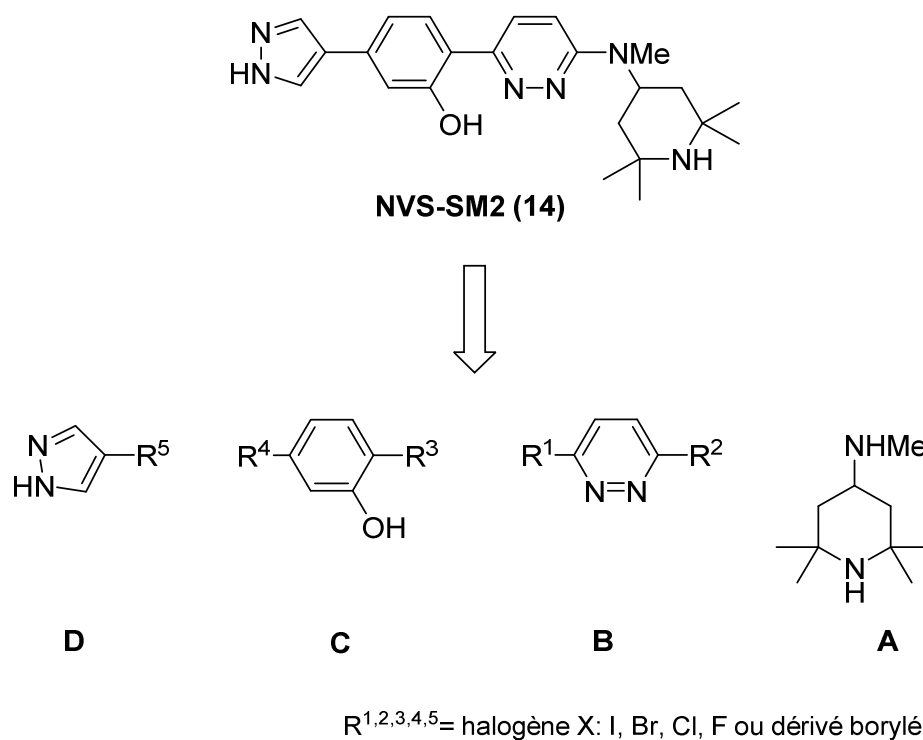
Cette approche n'est pas aussi pratique qu'esp\u00e9r\u00e9e. Nous l'avons donc abandonn\u00e9e et envisag\u00e9e une autre synth\u00e8se modulaire du NVS-SM2.

<sup>48</sup> Baddar, F. G.; Enayat, I.; Abdel-Wahab, S. M., *J. Chem. Soc. C.*, **1967**, 0, 343-346.

### 3.1.2. Deuxième approche pour la synthèse du NVS-SM2

#### 3.1.2.1. Etude rétrosynthétique

Le NVS-SM2 est une molécule linéaire présentant quatre cycles liés par des liaisons Csp<sup>2</sup>-Csp<sup>2</sup> ou Csp<sup>2</sup>-N. Elle peut être formée par assemblage entre ses différentes parties **A**, **B**, **C** et **D** (Schéma 14).



**Schéma 14.** Etude rétrosynthétique pour la synthèse du NVS-SM2 (**14**).

### 3.1.2.2. Préparation de la partie A (20)

Plusieurs méthodes ont été testées pour synthétiser la pipéridine **20**. La première repose sur une amination réductrice de la pyridinone **90**. Cela n'a pas fonctionné et seul le produit de départ a été récupéré (Schéma 15).

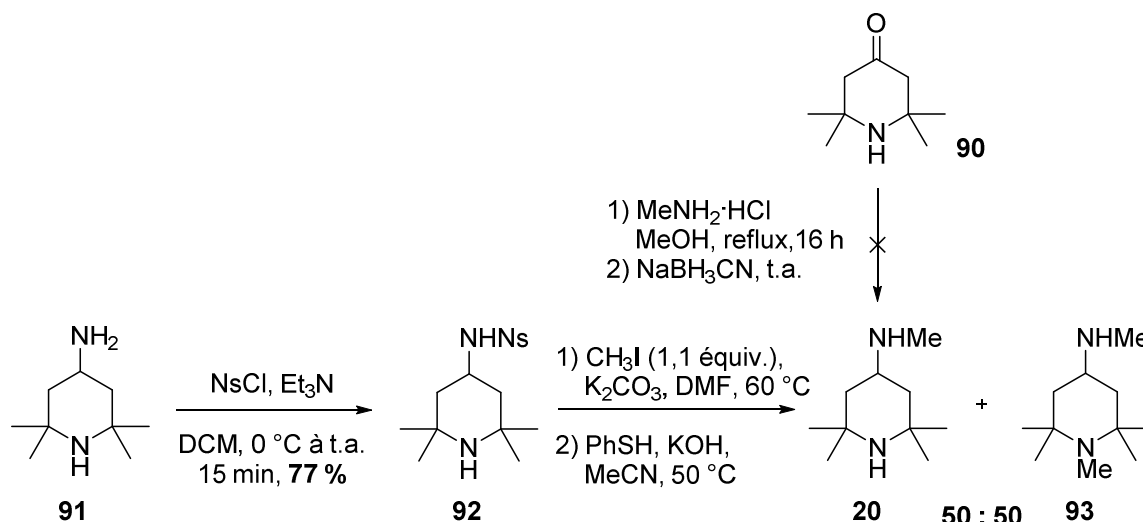


Schéma 15. Essais de synthèse de la pipéridine **20**.

En 2002 Fukuyama et *al.* ont publié une préparation d'amine secondaire à partir d'une amine primaire via la formation d'un 2-nitrobenzène sulfonamide.<sup>49</sup> La pipéridinamine **91** a été nosylée pour donner le composé **92**, qui a été engagé dans une réaction de *N*-méthylation suivie d'une déprotection avec du thiophénol. Cette réaction nous a donné un mélange de deux produits inséparables celui désiré (**20**) et celui diméthylé (**93**) (Schéma 15).

La troisième méthode a été de chauffer la pipéridinamine **91** dans du formiate d'éthyle pour former un formamide qui a été réduit en méthylamine avec du LiAlH<sub>4</sub>. Dans ce cas, le produit attendu **20** a été obtenu avec un rendement de 73% (Schéma 16).

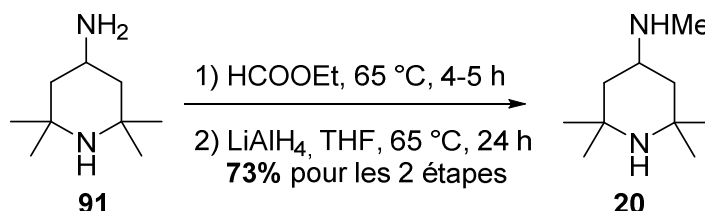


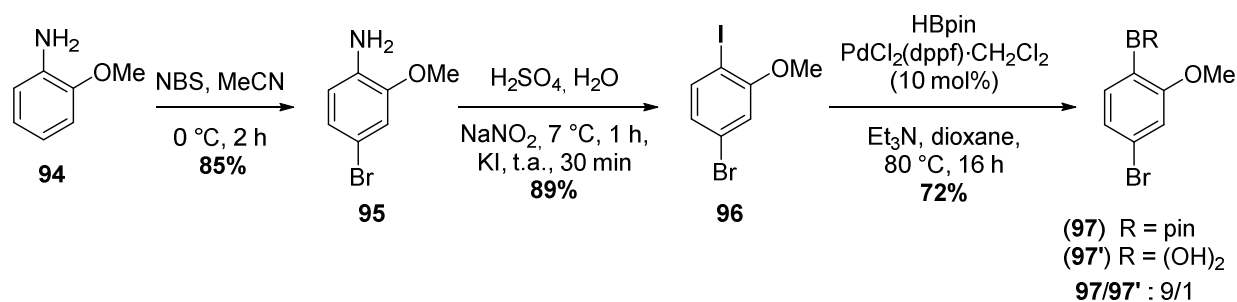
Schéma 16. Préparation de la pipéridine **20**.

<sup>49</sup> Wataru Kurosawa, T. K.; Fukuyama, T., *Org. Synth.*, **2002**, 79, 186.



### 3.1.2.3. Préparation de la partie C

Nous avons décidé d'introduire le synthon C via l'ester boronique **97**. Celui-ci a été synthétisé en trois étapes, avec un rendement global de 54%. L'*ortho*-anisidine **94** a subi une *para*-bromation en présence du NBS dans du MeCN pour donner le composé **95**. Ce dernier a été engagé dans une réaction de Sandmeyer permettant d'obtenir l'iodobenzène **96** avec un rendement de 89% (Schéma 17).



**Schéma 17.** Préparation du boronate **97**.

En 1997, Murata et *al.* ont publié une nouvelle réaction de couplage entre dialkoxyborane et halogénure d'aryle catalysée avec du palladium (0) aboutissant à la formation de boronates d'aryle.<sup>50</sup> La réaction d'iodobenzène **96** avec du pinacolborane, en présence de PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a fonctionné avec un rendement de 72% correspondant à un mélange **97** / **97'** (9 / 1).

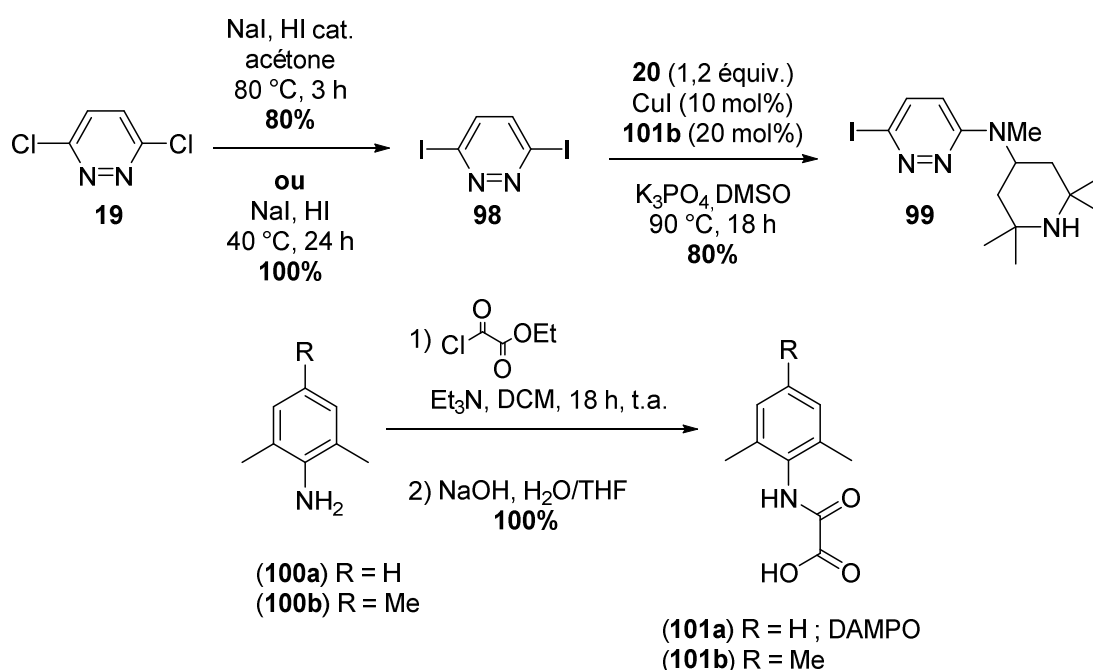
Après avoir préparé les deux synthons **A** et **C** (Schéma 14), plusieurs ordres d'assemblage des parties **A**, **B**, **C** et **D** ont été appliqués pour aboutir au NVS-SM2.

<sup>50</sup> Murata, M.; Watanabe, S.; Masuda, Y., *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 6458-6459.

### 3.1.2.4. Association de la pipéridine **20** et la diiodopyridazine **98** par un couplage catalysé au cuivre

La diiodopyridazine **98** a été préparée à partir de la pyridazine **19** en présence du NaI et d'une quantité catalytique du HI dans l'acétone à 80 °C avec un rendement de 80%. Une autre méthode a été appliquée, dans laquelle le HI joue un double rôle : réactif et solvant. Elle est plus lente que la première mais fournit quantitativement le composé désiré (Schéma 18).

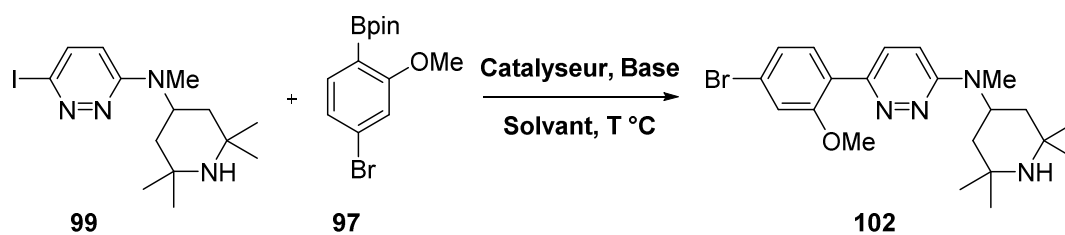
Zhang et *al.* ont publié en 2012 une *N*-arylation des amines secondaires acyclique catalysée au cuivre.<sup>51</sup> Cette réaction a été utilisée pour introduire la pipéridine **20** sur la diiodopyridazine **98**. Ce type de réaction avait été décrit avec le DAMPO (**101a**) comme ligand. Puisque nous avons au laboratoire de la 2,4,6-triméthylaniline (**100b**), nous avons synthétisé le ligand **101b** similaire à DAMPO. Celui-ci a permis d'obtenir l'adduit **99** avec 80% de rendement (Schéma 18).



**Schéma 18.** Préparation de la diiodopyridazine **98** et son couplage avec la pipéridine **20**.

L'étape suivante a été un couplage de Suzuki-Miyaura entre la 2-aminopyridazine **99** et le boronate **97**. Différentes conditions ont été testées (Tableau 4).

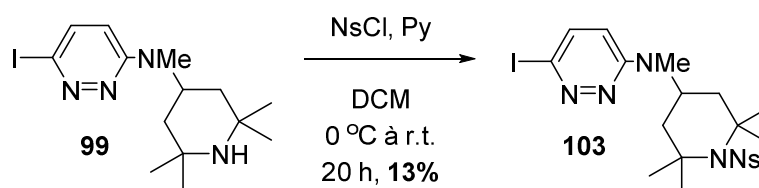
<sup>51</sup> Zhang, Y.; Yang, X.; Yao, Q.; Ma, D., *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 3056-3059.



Entrée	Catalyseur	Base (équiv.)	Solvant	Durée	T °C	Rdt(%)
1	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (5 mol%)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	PhMe/EtOH/ H <sub>2</sub> O	32 h	110	26
2	PdCl <sub>2</sub> (dppf)·CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10 mol%)	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (2)	Dioxane/H <sub>2</sub> O	40 h	80	18
3	Pd(OAc) <sub>2</sub> (3 mol%) S-Phos (6 mol%)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2,5)	MeCN/H <sub>2</sub> O	20 h	110	0

**Tableau 4.** Résultats du couplage de Suzuki-Miyaura entre la 2-aminopyridazine **99** et le boronate **97**.

Ce couplage en présence du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> ou du PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> nous a donné le composé **102** avec un rendement de 26 et 18% (Entrée 1 et 2). En revanche, il n'a pas fonctionné en présence du système catalytique Pd(OAc)<sub>2</sub>/S-Phos (Entrée 3). En supposant que la fonction amine secondaire NH influence sur l'efficacité du couplage en désactivant le catalyseur, nous avons tenté de la nosyler. Cette protection n'a pas marché efficacement, rendement 13% (Schéma 19).

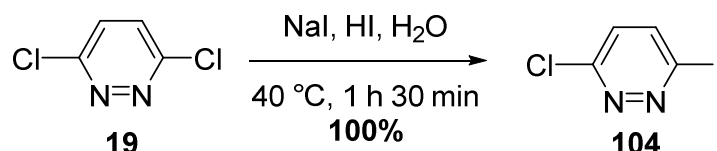


**Schéma 19.** Essai de protection de la fonction amine.

À la suite de ces résultats correspondant à un faible rendement pour le couplage de Suzuki-Miyaura, nous avons décidé de changer l'ordre d'assemblage des différentes parties du NVS-SM2.

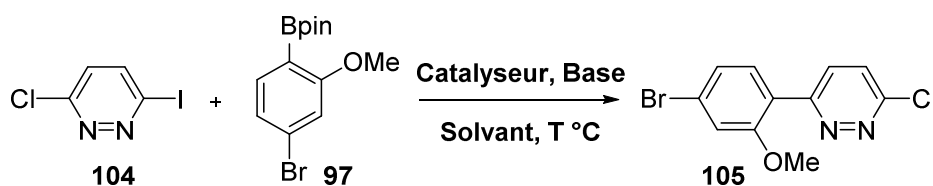
### 3.1.2.5. Association entre la pyridazine 104 et le boronate 97 par un couplage de Suzuki-Miyaura

Pour éviter un double couplage, la diiodopyridazine **98** a été remplacée par la 2-chloro-6-iodopyridazine **104**. Cette dernière a été synthétisée à partir de la pyridazine **19** selon la même méthode déjà utilisée, mais en contrôlant la durée de la réaction en effectuant une RMN tous les 20 min. Cette réaction est quantitative (Schéma 20).



**Schéma 20.** Préparation de la 2-chloro-6-iodopyridazine **104**.

Ici des tests du couplage de Suzuki-Miyaura entre la pyridazine **104** et le boronate **97** ont été effectués (Tableau 5).



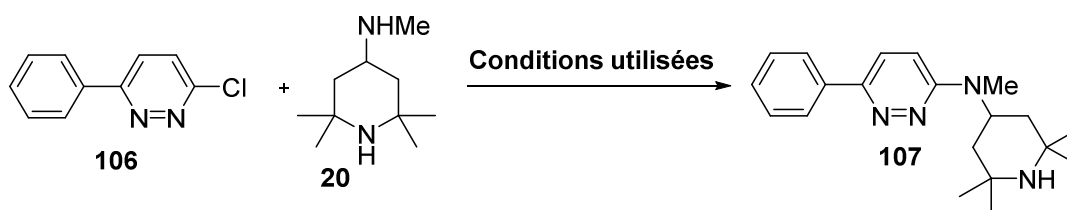
Entrée	Catalyseur	Base (équiv.)	Solvant	T °C	Rdt (%)
1	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (2 mol%) P( <i>t</i> Bu) <sub>3</sub> (3 mol%)	KF (3)	THF	80	Traces
2	Pd(OAc) <sub>2</sub> (10 mol%) S-Phos (20 mol%)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2,2)	MeCN/H <sub>2</sub> O	110	20
3	Pd(OAc) <sub>2</sub> (10 mol%) X-Phos (12 mol%)	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (2)	<i>n</i> -BuOH/H <sub>2</sub> O	110	21
4	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (5 mol%)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	PhMe/EtOH/ H <sub>2</sub> O	reflux	32
5	PdCl <sub>2</sub> (dppf)·CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10 mol%)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	DMF/H <sub>2</sub> O	100	40
6	PdCl <sub>2</sub> (dppf)·CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10 mol%)	CsF (0,5)	DMF/H <sub>2</sub> O	100	17
7	PdCl <sub>2</sub> (dppf)·CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10 mol%)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	THF/MeCN/H <sub>2</sub> O	100	12
8	PdCl <sub>2</sub> (dppf)·CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10 mol%)	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (3)	dioxane/H <sub>2</sub> O	90	70

**Tableau 5.** Résultats du couplage de Suzuki-Miyaura entre la pyridazine **104** et le boronate **97**.

Les tentatives initiales pour effectuer cette réaction en utilisant la condition de Fu<sup>52</sup>,<sup>53</sup> n'ont pas aboutis à l'adduit **105** attendu (Entrée 1, Tableau 5). Le passage à d'autres systèmes catalytiques en utilisant S-Phos, X-Phos ou PPh<sub>3</sub> comme ligands a donné le produit **105** avec une conversion de 20-32% (Entrées 2-4). En fin de compte, le PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> stable à l'air et à l'humidité<sup>54</sup> s'est avéré particulièrement efficace (Entrée 5). Finalement, plusieurs autres combinaisons de solvant et de base ont été examinées, et lorsque la réaction a été effectuée dans du dioxane/H<sub>2</sub>O avec du K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> comme base, un rendement de 70% a pu être obtenu (Entrée 8). Cette préférence pour K<sup>+</sup> en tant que contre-ion de la base suggère que ce couplage de Suzuki-Miyaura implique une étape d'oxydation rapide et une vitesse de réaction déterminée par l'étape de transmétallation.<sup>55</sup>

### 3.1.2.6. Couplage entre halogénoypyridazine et pipéridine **20**

Pour tester la réactivité d'une chloropyridazine avec une amine aussi encombrée que **20**, nous avons utilisé la pyridazine **106** comme substrat modèle (Tableau 6).



Entrée	Conditions utilisées	Rdt(%)
1	Pd(OAc) <sub>2</sub> , BINAP ou Josiphos, Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , DMF, 80 °C	Traces
2	Et <sub>3</sub> N, PhMe, 110 °C	Traces
3	Butan-1-ol, 120 °C	20

**Tableau 6.** Résultats de couplage entre la chloropyridazine **106** et la pipéridine **20**.

Ce couplage n'a pas fonctionné dans les conditions de Buchwald-Hartwig (Entrée 1, Tableau 6) ou dans du toluène en présence de la Et<sub>3</sub>N (Entrée 2). Cependant, en utilisant un solvant protique, le butan-1-ol,<sup>11</sup> sans base à 120 °C nous avons obtenu le composé **107** avec un rendement de 20% (Entrée 3). Ces résultats nous a poussé à remplacer l'iminochlorure par

<sup>52</sup> Kudo, N.; Perseghini, M.; Fu, G. C., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2006**, *45*, 1282–1284.

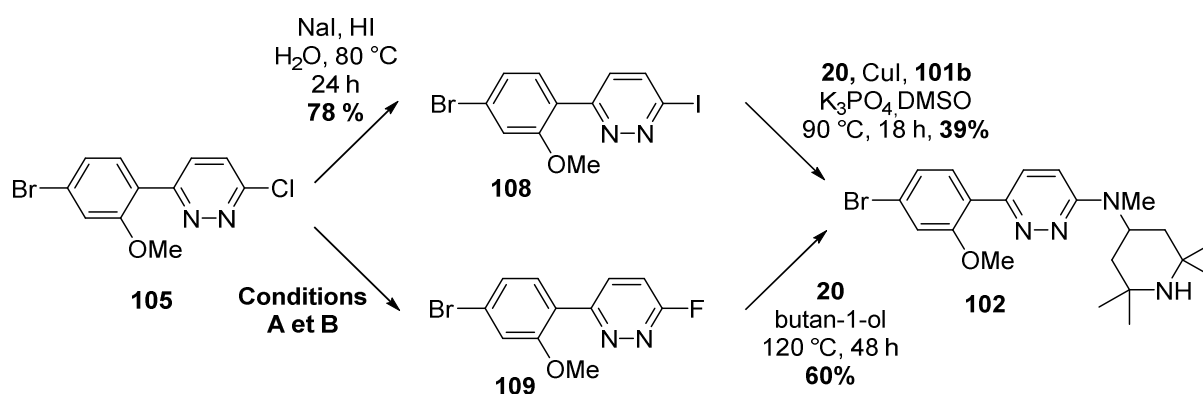
<sup>53</sup> Littke, A. F.; Dai, C.; Fu, G. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 4020–4028.

<sup>54</sup> Gildner, P. G.; Colacot, T. J., *Organometallics*, **2015**, *34*, 5497-5508.

<sup>55</sup> Amatore, C.; Jutand, A.; Le Duc, G., *Chem. - Eur. J.*, **2012**, *18*, 6616-6625.

un iminofluorure (plus réactif dans une S<sub>N</sub>Ar) ou un iminoiodure (plus réactive dans un couplage métallo-catalysé).

L'iodopyridazine **108** a été préparée à partir de la chloropyridazine **105** avec un rendement de 78%, dans les mêmes conditions déjà utilisées, en présence du NaI dans du HI à 80 °C. Ce produit obtenu a été engagé avec la pipéridine **20** dans un couplage catalysé au Cu pour donner le composé **102** avec un rendement de 39% (Schéma 21). D'autre part, la chloropyridazine **105** a été mis en réaction avec le KF dans du DMSO à 140 °C pour donner la fluoropyridazine **109** avec un rendement de 43-53% (Conditions A). Schimler et *al.* ont publié en 2015 une fluoration d'halogénures d'aryles et nitroarènes à température ambiante en utilisant du NMe<sub>4</sub>F anhydre.<sup>56</sup> Avec ces conditions, nous avons obtenu la fluoropyridazine **109** avec un rendement de 92% (Conditions B). Ce dernier a été engagé dans une S<sub>N</sub>Ar avec la pipéridine **20** dans du butanol à 120 °C pendant 48 h pour donner le composé **102** avec un rendement de 60% (Schéma 21).



**Conditions A:** KF(1,5 équiv.), DMSO, 140 °C, **43-53%**

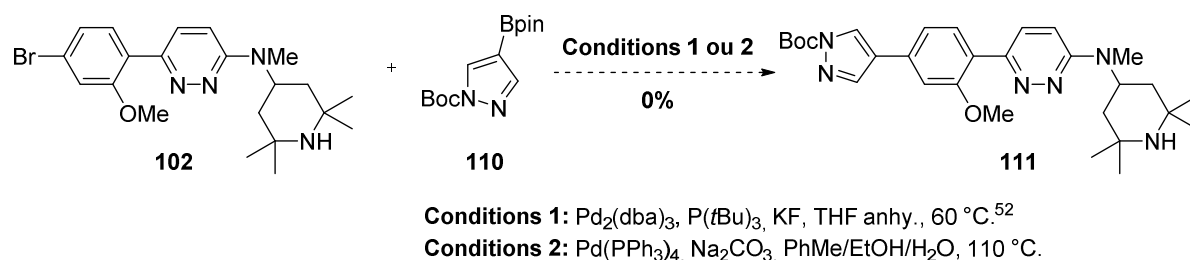
**Conditions B:** NMe<sub>4</sub>F anhy. (2 équiv.), DMF anhy., t.a., 24 h, **92%**

**Schéma 21.** Préparation du composé **102**.

<sup>56</sup> Schimler, S. D.; Ryan, S. J.; Bland, D. C.; Anderson, J. E.; Sanford, M. S., *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 12137-12145.

### 3.1.2.7. Tentative de couplage de Suzuki-Miyaura entre la pyridazine 102 et le boronate 110

La pyridazine **102** obtenue a été engagée dans divers tests de Suzuki-Miyaura avec le boronate **110**, mais aucune de ces réactions n'a abouti à l'adduit **111** (Schéma 22).

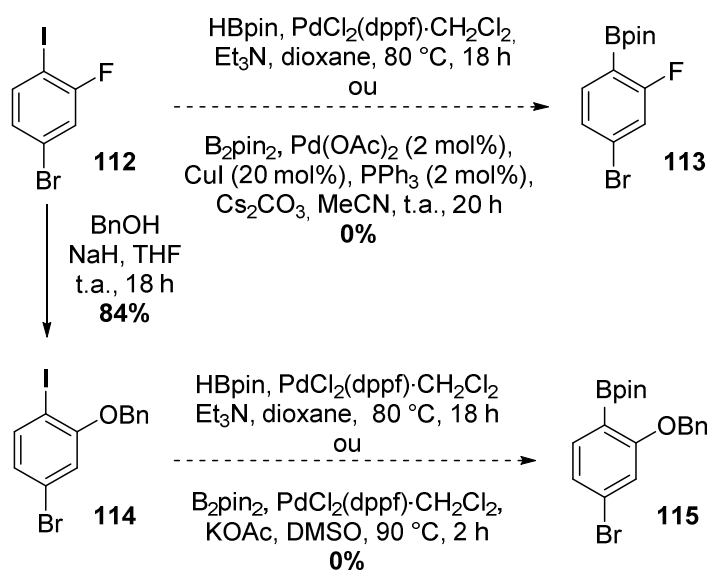


**Schéma 22.** Essais du couplage de Suzuki-Miyaura entre la pyridazine **102** et le boronate **110**.

En supposant toujours que l'amine secondaire désactive le catalyseur, nous avons pensé à effectuer le deuxième couplage de Suzuki-Miyaura avant la SNar. A noter aussi que dans la synthèse publiée dans un brevet par Novartis, les auteurs avaient un problème de déméthylation lors de la dernière étape. Pour éviter ce problème, nous avons décidé de démarrer avec un phénol protégé par un benzyle, plus facile à déprotéger.

### 3.1.2.8. Préparation de la chloropyridazine 118

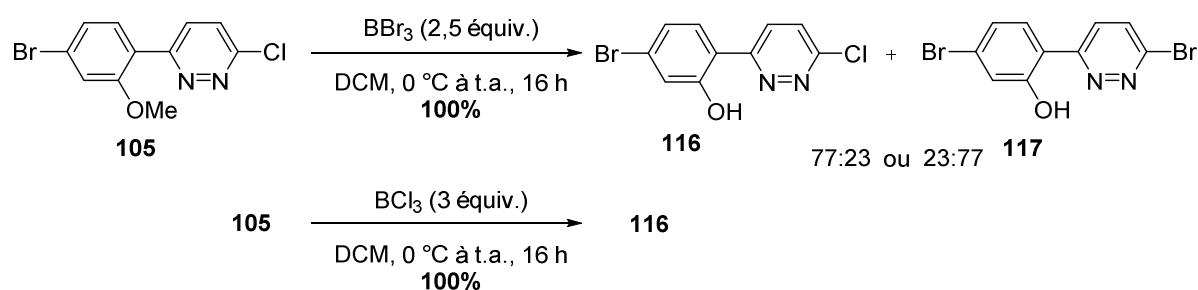
Tout d'abord des essais de borylation d'iodobenzène **112** ont été effectués pour obtenir le boronate **113**, mais aucune des conditions testées n'a abouti (Schéma 23).



**Schéma 23.** Essais de préparation des boronates **113** et **115**.

En supposant que le fluor influence ce couplage, nous l'avons substitué par un groupement benzyloxy pour obtenir l'intermédiaire **114** avec un rendement de 84%. Ce dernier avec les différentes conditions examinées n'a pas donné le boronate **115** désiré (Schéma 23).

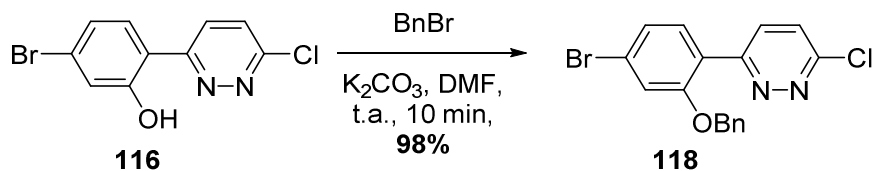
Nous avons alors choisi de remplacer le groupement methoxy par un bezyloxy plus aisé à déprotéger. La déméthylation de la chloropyridazine **105** avec du  $\text{BBr}_3$ , nous a donné un mélange du composé attendu **116** avec son homologue dibromé **117** résultant d'une réaction Finkelstein aromatique (conversion totale) avec une proportion de (77 / 23). Il ne nous a pas été possible de déterminer sans ambiguïté lequel des composés est majoritaire (Schéma 24).



**Schéma 24.** Déméthylation de la pyridazine **105**.

Ce problème a été résolu en utilisant du  $\text{BCl}_3$ , à la place du  $\text{BBr}_3$ , qui nous a donné la pyridazine **116** quantitativement (Schéma 24).

Nous avons ensuite benzylé quantitativement la pyridazine **116** avec du bromure de benzyle pour obtenir la pyridazine **118** (Schéma 25).

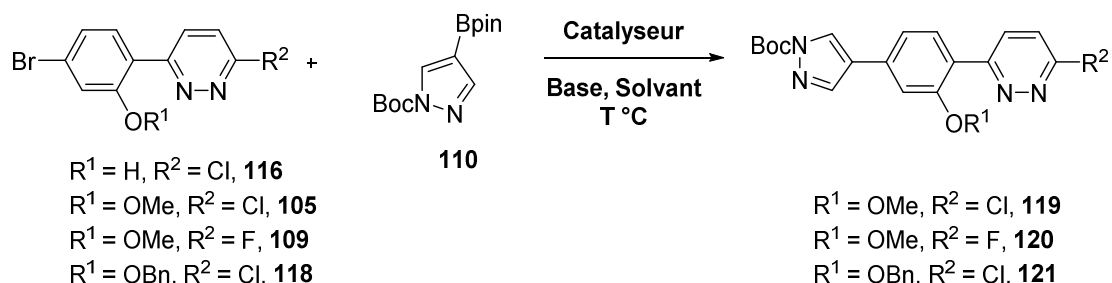


**Schéma 25.** Benzilation de la pyridazine **116**.



### 3.1.2.9. Couplage de Suzuki-Miyaura entre halogénopyridazine et boronate **110**

Les pyridazines **116**, **105**, **109** et **118** ont été engagées dans une réaction de Suzuki-Miyaura avec le boronate **110**. Diverses conditions ont été testées (Tableau 7).



Substrats	Catalyseur	Base (équiv.)	Solvant	T °C	Rdt (%)
<b>116</b>	PdCl <sub>2</sub> (dppf)·CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10 mol%)	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (3)	Dioxane/H <sub>2</sub> O	80	0
	Pd(PPh <sub>3</sub> ) (10 mol%)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (8)	DME/H <sub>2</sub> O	85	0
	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (2 mol%) P(tBu) <sub>3</sub> (3 mol%)	KF (3)	THF	80	0
<b>105</b>	PdCl <sub>2</sub> (dppf)·CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10 mol%)	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (3)	Dioxane/H <sub>2</sub> O	80	0
	PdCl <sub>2</sub> (dppf)·CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10 mol%)	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3)	Dioxane/H <sub>2</sub> O	90	0
	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (2 mol%) P(tBu) <sub>3</sub> (3 mol%)	KF (3)	THF	80	0-20 <sup>a</sup>
	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (6 mol%) S-Phos (12 mol%)	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (2)	Dioxane/H <sub>2</sub> O	100	0
<b>109</b>	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (10 mol%) P(tBu) <sub>3</sub> (24 mol%)	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (1,7)	Dioxane, H <sub>2</sub> O	70	10
	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (6 mol%) X-Phos (12 mol%)	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (2)	Dioxane/H <sub>2</sub> O	100	0
<b>118</b>	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (5 mol%) P(tBu) <sub>3</sub> (7 mol%)	KF (4)	THF	80	10-25 <sup>a</sup>
	PdCl <sub>2</sub> (dppf)·CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10 mol%)	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3)	THF/H <sub>2</sub> O	70	7
	PdCl <sub>2</sub> (dppf)·CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10 mol%)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,6)	Dioxane/H <sub>2</sub> O	70	Traces
	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (10 mol%)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3)	DME/H <sub>2</sub> O	70	15

<sup>a</sup> : rendement non reproductible.

**Tableau 7.** Résultats du couplage de Suzuki-Miyaura entre **116**, **105**, **109** et **118** avec le boronate **110**.

Aucune des conditions appliquées sur le phénol **116** n'a abouti. Ce qui justifie la nécessité de protéger la fonction hydroxyle qui peut probablement désactiver les catalyseurs utilisés. En démarrant avec les pyridazines **105**, **109** ou **118**, il y avait formation des produits **119**, **120** et **121**, mais avec des faibles rendements non reproductibles particulièrement avec les conditions décrites en 2000 par Fu et *al.* qui implique le système catalytique Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>/P(*t*-Bu)<sub>3</sub>. Ce résultat obtenu peut être expliqué par la labilité du groupement Boc dans les conditions examinées.

Comme le Boc se déprotège facilement par un simple chauffage, nous avons décidé de protéger le pyrazole par un trityle plus stable.

### 3.1.2.10. Préparation du boronate tritylé **125**

Le pyrazole **122** a été engagé dans une SEAr avec du NBS pour donner l'intermédiaire **123** avec un rendement de 93%. Ce dernier a été tritylé avec du chlorure de trityle puis borylé en utilisant du B<sub>2</sub>pin<sub>2</sub> et du PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pour aboutir au boronate **125** avec un rendement de 75% (Schéma 26).

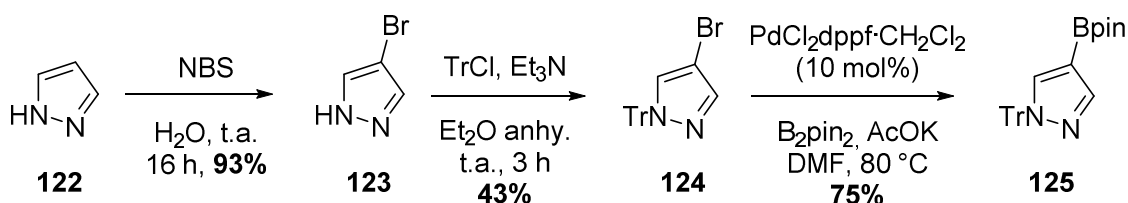
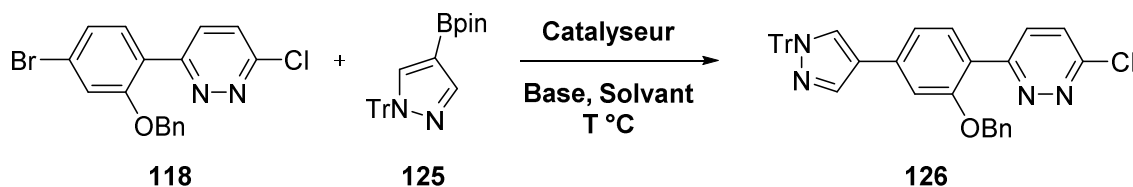


Schéma 26. Préparation du boronate **125**.

### 3.1.2.11. Couplage de Suzuki-Miyaura entre pyridazine **118** et boronate tritylé **125**

Diverses conditions de Suzuki-Miyaura ont été testées pour coupler la pyridazine **118** et le boronate **125** (Tableau 8).



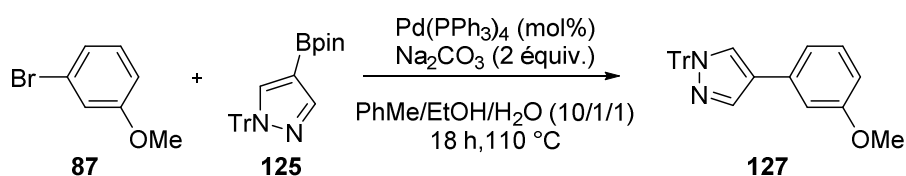
Entrée	Catalyseur	Base (équiv.)	Solvant	T °C	Rdt (%)
1	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (3 mol%) P( <i>t</i> Bu) <sub>3</sub> (7 mol%)	KF (3,3)	THF	70 °C	0
2	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (1 mol%) PCy <sub>3</sub> (2,4 mol%)	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (1,7)	Dioxane/H <sub>2</sub> O (2/1)	100 °C	0
3	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (10 mol%)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	DME/H <sub>2</sub> O (6/3)	15 min 150 °C MW	28
4	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (10 mol%)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	PhMe/EtOH/ H <sub>2</sub> O (10/1/1)	24h 110 °C	30

**Tableau 8.** Résultats du couplage de Suzuki-Miyaura entre la pyridazine **118** et le boronate **125**.

Ce couplage n'a pas fonctionné avec les conditions de Fu<sup>52, 53</sup> (Entrée 1 et 2, Tableau 8). En revanche, l'utilisation du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> a permis d'obtenir l'adduit **126** d'une façon reproductible avec un rendement de 30% (Entrée 3 et 4).

### 3.1.2.12. Optimisation du couplage de Suzuki-Miyaura en utilisant le *m*-bromoanisole **87** comme substrat

Nous avons ensuite cherché à optimiser la réaction de couplage du boronate dans une réaction modèle en utilisant du *m*-bromoanisole **87** (Tableau 9). Nous avons montré que le rendement du couplage était plus dépendant de la quantité du catalyseur que du boronate. Ainsi avec 20 mol% du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, nous avons observé un rendement de 70% (Entrée 3). Appliquées au boronate **110** protégé par un Boc, ces conditions optimisées n'ont pas permis d'obtenir l'adduit attendu.



Entrée	Bpin (équiv.)	Pd (mol%)	Rdt (%)
1	1,5	10	33
2	3	10	28
3	1,5	20	70

**Tableau 9.** Résultats du couplage de Suzuki-Miyaura entre *m*-bromoanisole **87** et le boronate **125**.

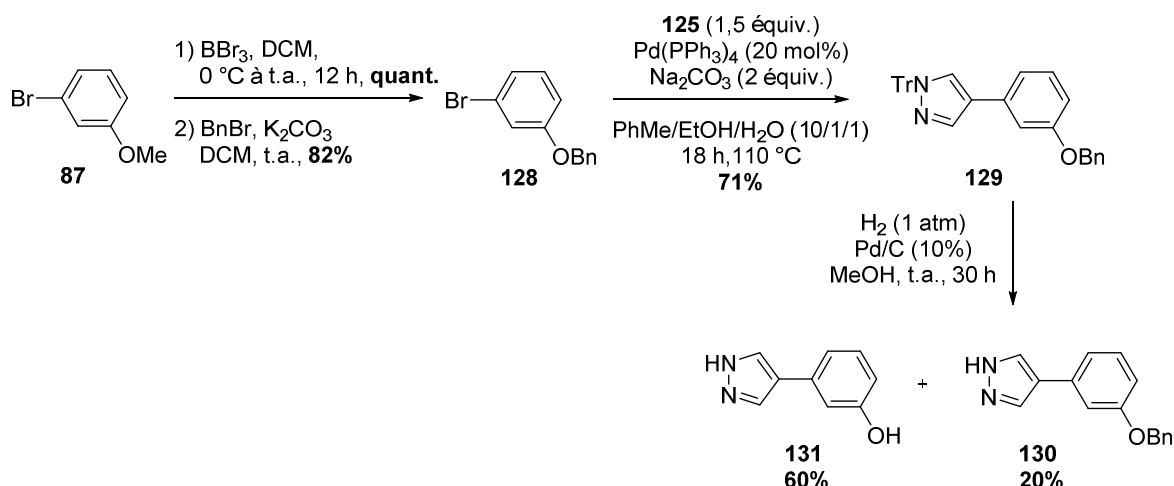
### 3.1.2.13. Tests de faisabilité de l'étape de déprotection du phénol

Le composé **127** a été engagé dans une réaction de déméthylation avec du BBr<sub>3</sub>. Cette réaction nous a donné un mélange de produits indéterminés (dégradation) (Schéma 27).



**Schéma 27.** Essai de déméthylation de l'adduit **127** avec du BBr<sub>3</sub>.

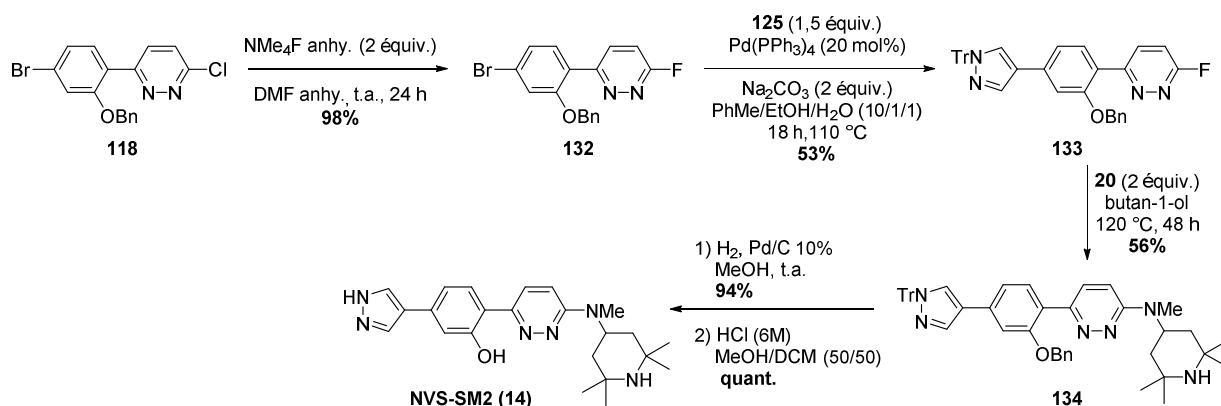
Ensuite, pour connaître l'influence du benzyle sur la réactivité via le couplage de Suzuki-Miyaura et la possibilité de débenzylation par hydrogénation, nous avons préparé l'adduit **128** à partir du *m*-bromoanisole **87** en effectuant une déméthylation avec du BBr<sub>3</sub> suivie d'une benzylation avec du bromure de benzyle. Le couplage de Suzuki-Miyaura entre l'adduit **128** et le boronate **125** nous a donné le composé **129** avec un rendement pareil à celui avec le composé **87** (70%, Entrée 3, Tableau 9). Après, une réaction de débenzylation du **129**, sous H<sub>2</sub> et en présence du Pd/C dans du MeOH a été effectuée. Cette réaction nous a donné un mélange de produit détritylé **130** accompagné du produit **131** à la fois détritylé et débenzylé (Schéma 28).



**Schéma 28.** Préparation et débenzylation du composé **129**.

### 3.1.2.14. Accomplissement de la synthèse

Tout d'abord nous avons effectué une fluoration de la pyridazine **118** avec du  $\text{NMe}_4\text{F}$  anhydre pour donner quantitativement le composé **132**. En appliquant sur ce dernier les conditions optimisées du couplage du Suzuki-Miyaura et de  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$  nous avons obtenu le produit **134** avec un rendement de 30% pour les deux étapes (Schéma 29).



**Schéma 29.** Accomplissement de la synthèse du NVS-SM2 (**14**).

Les deux dernières étapes ont été une hydrogénation suivie d'une détrytilation dans un milieu acide pour aboutir au produit final avec un rendement de 94%.

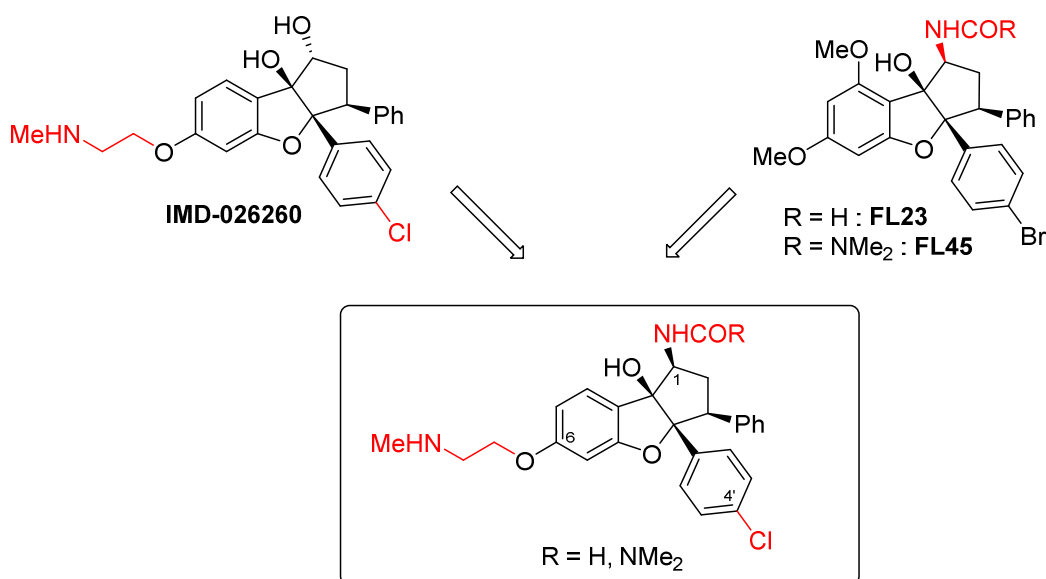
Cette synthèse du NVS-SM2 a donc été accomplie en 9 étapes linéaires avec un rendement global de 14% (rendement moyen de 82%). Elle implique plus d'étapes que l'original, mais nous avons optimisés toutes les étapes et certaines d'entre elles peuvent être effectuées de manière très pratique avec un rendement quantitatif. Par exemple, la

conversion de **105** en **118** a été réalisée en 2 étapes avec un rendement global de 98%, et l'intermédiaire obtenu a été utilisé directement dans la seconde étape sans effectuer de purification par chromatographie. En réalité, cette séquence peut être facilement réalisée en une demi-journée. La fluoration (**118** → **132**) et la déprotection (**133** → **134** → **14**) sont également effectuées avec un rendement élevé de manière très rapide. Ainsi, cette voie peut être envisagée dans le contexte de NVS-SM2 pour examiner en détail son potentiel thérapeutique dans le traitement de l'ASM ainsi que d'autres maladies associées à des altérations de l'épissage de l'ARN.

## 3.2. Synthèse de nouvelles flavaglines pour l'inhibition de KRAS

### 3.2.1. Structures des flavaglines cibles

Des études confidentielles menées par notre collaborateur le Pr. Rajalingam à Mayence ont montré que les flavaglines **IMD-026260**, **FL23** et **FL45** sont les plus puissants inhibiteurs de l'activation de KRAS parmi celles qu'il a testées avec de activités à des doses nanomolaires. Notre objectif a été de combiner les caractéristiques de ces molécules pour obtenir un inhibiteur de KRAS encore plus puissant (Schéma 30).



**Schéma 30.** Structure de l'IMD-026260, FL23, FL45 et de nos composés cibles.

Ces études ont montré que la présence d'une chaîne méthylamino éthoxy au niveau de la position 6 et d'un chlore au niveau de la position 4' rend la molécule plus active. De plus, un groupement NHCOR, au niveau de C1, en position cis avec son voisin hydroxyle augmente le pouvoir inhibiteur de l'activation de KRAS. Les molécules cibles qui combinent ces caractéristiques structurales pourraient être encore plus actives vis-à-vis de l'inhibition de KRAS.

### 3.2.2. Méthode de synthèse envisagée

En 2009, Diedrichs et *al.* ont publié dans un brevet<sup>57</sup> une synthèse en 11 étapes de la cétone **146** (Schéma 31). Ils ont démarré avec l'acétophénone **136** sur lequel ils ont effectué une réaction de Mitsunobu leur permettant d'obtenir le produit **137** monoalkylé avec un rendement de 55%.

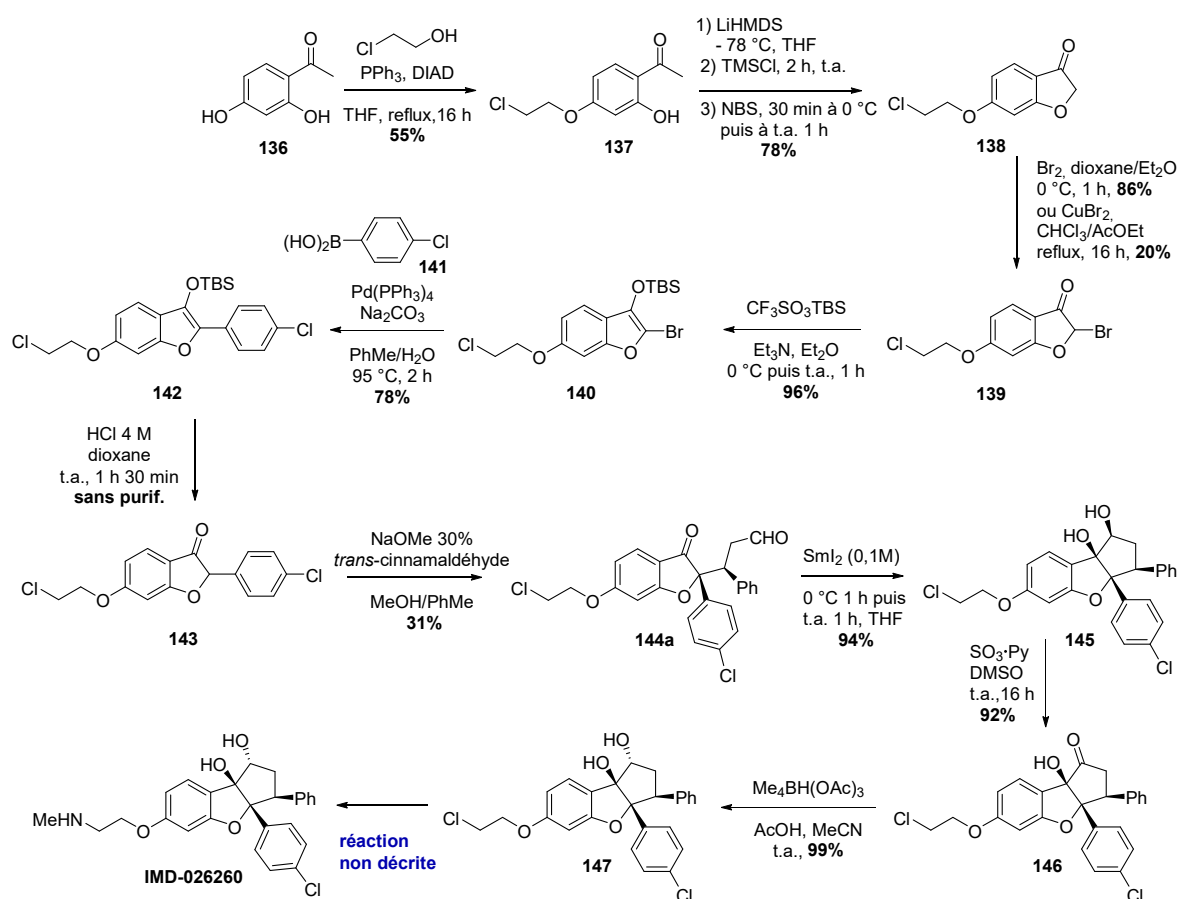


Schéma 31. Synthèse décrite de l'IMD-026260.<sup>57</sup>

Ensuite, une  $\alpha$ -cétobromation puis une cyclisation ont eu lieu pour former la benzofuranone **138** avec un rendement de 78%. Les étapes suivantes ont impliqué une deuxième  $\alpha$ -cétobromation, une silylation suivie d'un couplage de Suzuki-Miyaura avec l'acide *p*-chlorophénylboronique **141**, puis une désilylation en milieu acide pour aboutir à la benzofuranone **143**. Cette dernière a été engagée dans une addition de Michael avec le *trans*-cinnamaldéhyde pour donner le diastéréoisomère **144a** dans lequel les phényles sont en position *cis* avec un rendement de 31%. En adoptant la méthode de Taylor qui implique une

<sup>57</sup> Diedrichs, N.; Fahrig, T.; Gerlach, I.; Ragot, J.; Schuhmacher, J.; Thede, K., WO2005/113529A2, 2005.



cyclisation radicalaire à l'aide du  $\text{SmI}_2$ , ils ont obtenu le squelette des flavaglines avec un rendement de 94%. Dans la dernière étape, l'alcool secondaire **145** a été oxydé avec du  $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$  en cétone **146** avec un rendement de 92%.

Pour accéder aux molécules cibles, dans lesquelles un groupement  $\text{NHCOR}$  au niveau de C1 en position *cis* avec son voisin hydroxyle, nous avons adoptés la stratégie appliquée dans notre laboratoire auparavant pour la synthèse du **FL23** qui implique une réduction de l'oxime **149**, formée à partir de la cétone **148**, avec du borane suivi par un couplage de l'amine *cis* avec le chlorure d'acyle désiré (Schéma 32).

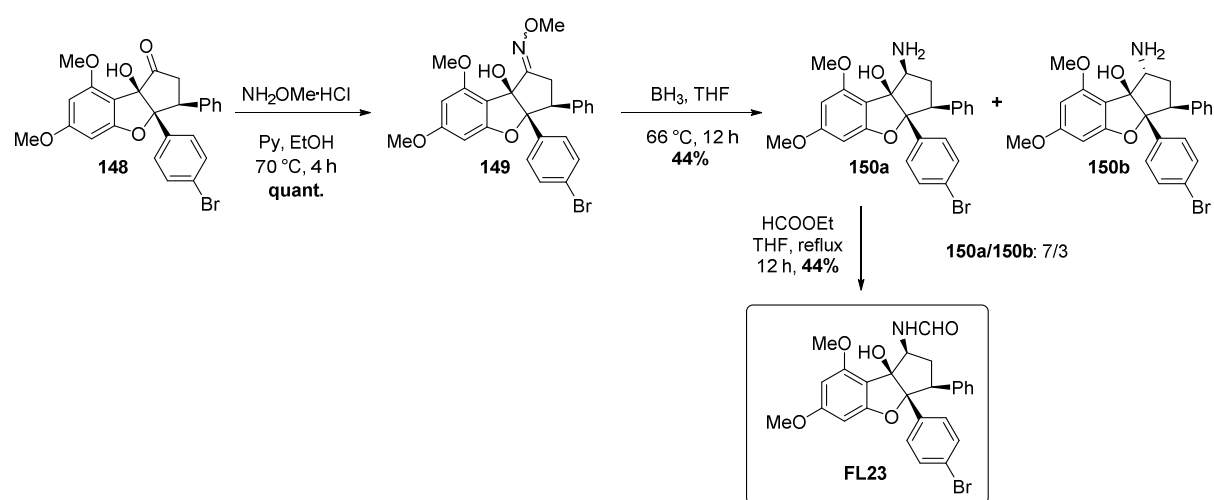
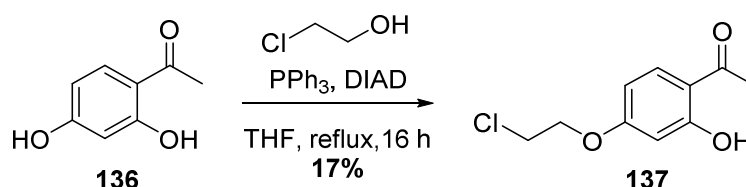


Schéma 32. Synthèse décrite du **FL23**.<sup>58</sup>

<sup>58</sup> Thuaud, F.; Ribeiro, N.; Gaiddon, C.; Cresteil, T.; Désaubry, L., *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 411-415.

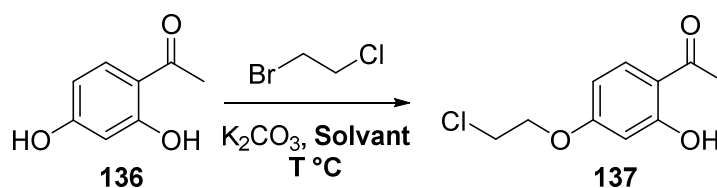
### 3.2.3. Tentative de synthèse de l'intermédiaire benzofuranone 143

En se basant sur ces travaux, nous avons commencé avec une même réaction de Mitsunobu. Cela nous a donné l'acétophénone **137** mais avec un rendement de 17%, très inférieur à celui décrit dans le brevet (55%)<sup>57</sup> (Schéma 33).



**Schéma 33.** Tentative d'alkylation de l'hydroxyle en *para* de l'acétophénone **136** par la réaction de Mitsunobu.

Un tel rendement n'étant pas satisfaisant pour la première étape d'une synthèse totale, nous avons choisi de développer une approche alternative. D'abord, des alkylations avec le 1-bromo-2-chloroéthane dans divers solvants ont été effectuées (Tableau 10).



Entrée	Solvant	T °C	Rdt (%)
1	DMF	t.a.	23 <sup>a</sup>
2	MeCN	reflux	(30) <sup>b</sup>
3	Acétone	reflux	24

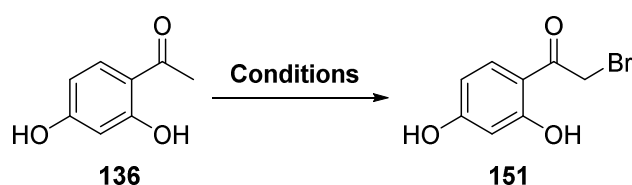
*a* : obtention d'un produit secondaire dialkylé.

*b* : réaction a eu lieu en présence de 1,1 équiv. de KI, rendement estimé par RMN, fraction obtenu contenant un mélange de deux isomères monoalkylés.

**Tableau 10.** Tentatives d'alkylation de l'hydroxyle en *para* de l'acétophénone **136** avec du 1-bromo-2-chloroéthane.

Les trois conditions testées nous ont donné l'acétophénone **137**, mais avec un rendement de l'ordre de 25%. Ces faibles rendements sont dus à la formation de produits secondaires résultants d'une alkylation de l'hydroxyle en *ortho*, ou même d'une double alkylation. Pour surmonter ce problème, nous avons envisagé d'effectuer une  $\alpha$ -bromation de la cétone **136** suivie d'une cyclisation en benzofuranone avant d'appliquer l'étape

d'alkylation. Plusieurs conditions d' $\alpha$ -cétobromation ont été tentées, mais aucune n'a abouti (Tableau 11).



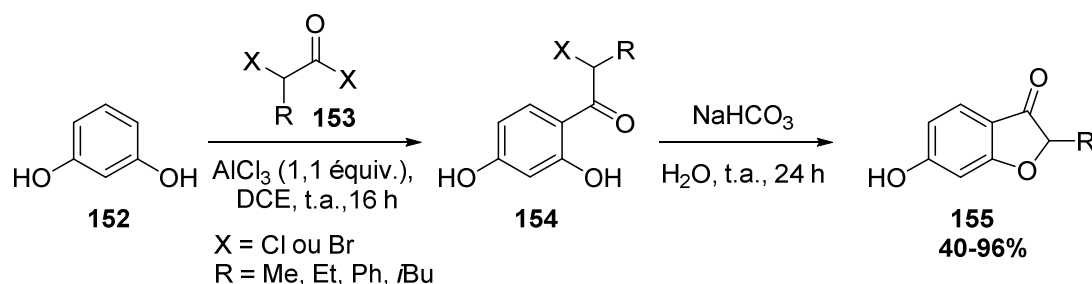
Entrée	Conditions	Rdt (%)	Réf <sup>b</sup>
1	NBS, <i>p</i> -toluènesulfonique, MeOH, sonification <sup>59</sup>	0 <sup>a</sup>	(59)
2	CuBr <sub>2</sub> , AcOEt/CHCl <sub>3</sub> , reflux <sup>60</sup>	0 <sup>a</sup>	(60)
3	Br <sub>2</sub> , Et <sub>2</sub> O, t.a. <sup>61</sup>	0 <sup>a</sup>	(61)

*a* : dans les trois cas, une dégradation a été observée.

*b* : références décrivant les conditions dont nous nous sommes inspirés.

**Tableau 11.** Essais d' $\alpha$ -bromation de l'acétophénone **136**.

Une stratégie inspirée d'un brevet chinois<sup>62</sup> publié par Ge et *al.* en 2016 a été examinée. Cela consiste en une acylation suivie d'un réarrangement de Fries entre le résorcinol **152** et un  $\alpha$ -halogénochlorure d'acyle **153**, en présence de chlorure d'aluminium, suivie d'une cyclisation en milieu basique pour aboutir à une benzofuranone **155** (Schéma 34).



**Schéma 34.** Synthèse de benzofuranone décrite par Ge et *al.*<sup>60</sup>

L'acide carboxylique **156** a été acylé avec du SOCl<sub>2</sub> puis bromé en  $\alpha$  avec du NBS pour former l'acyle **157** avec un rendement de 73%. Ce dernier a été engagé dans une acylation suivie d'un réarrangement de Fries avec le résorcinol (**152**) en présence de chlorure d'aluminium anhydre dans du DCE à température ambiante. Malheureusement, cette

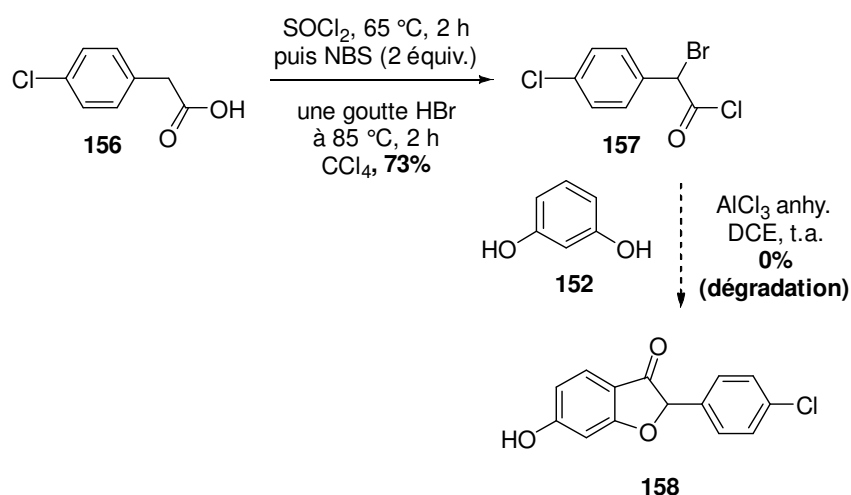
<sup>59</sup> Adhikari, M. V.; Samant, S. D., *Ultrason. Sonochem.*, **2002**, *9*, 107-111.

<sup>60</sup> Lee, C.-Y.; Chew, E.-H.; Go, M.-L., *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, *45*, 2957-2971.

<sup>61</sup> Chen, J.; Liu, D.; Butt, N.; Li, C.; Fan, D.; Liu, Y.; Zhang, W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 11632-11636.

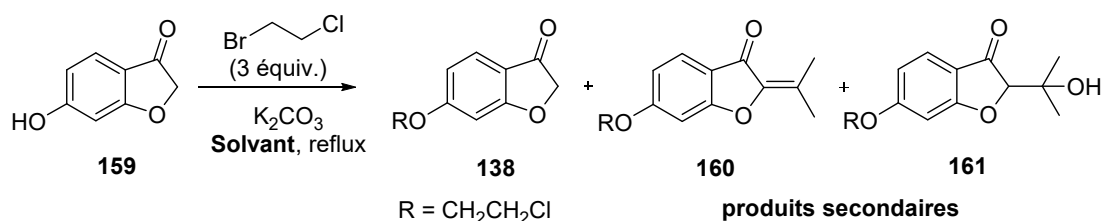
<sup>62</sup> Ge, C.; Liu, X.; Hu, D.; Li, W.; Liu, B.; Wu, Z., *CN105646414A*, **2016**.

méthode n'a pas permis d'obtenir le composé désiré **158**. Une dégradation du produit départ a été observée (Schéma 35).



**Schéma 35.** Préparation de l'acyle **157** et tentative de son couplage avec du résorcinol (**152**).

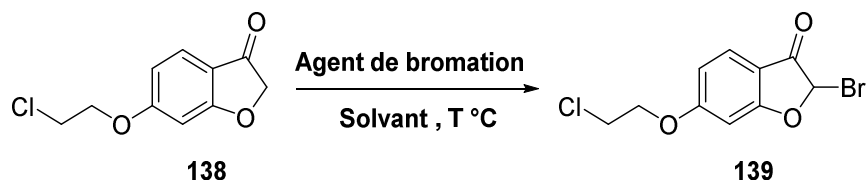
Après ces échecs, nous avons envisagé une autre approche à partir de la benzofuranone commerciale **159**. Cette dernière a été alkylée par du 1-bromo-2-chloroéthane dans l'acétone à reflux pour nous donner le composé **138** avec un rendement de 38% (Entrée 1, Tableau 12). Ce faible rendement est dû à la formation de deux produits secondaires (énone **160** et  $\beta$ -hydroxycétone **161**) par une attaque nucléophile de l'acétone par l'énolate du **138**. Pour résoudre ce problème, nous avons remplacé l'acétone par l'acétonitrile. Avec ce solvant nous avons obtenu la benzofuranone **138** avec un rendement de 82% (Entrée 2).



Entrée	Solvant	137 (%)
1	Acétone	38
2	MeCN	82

**Tableau 12.** Préparation de la benzofuranone **138**.

Après avoir optimisé la première étape, une  $\alpha$ -bromation de la cétone **138** a eu lieu. La méthode de bromation ( $\text{Br}_2$ , dioxane/ $\text{Et}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 86%) décrite dans le brevet<sup>57</sup> nous a donné un rendement de 27% du fait d'une polybromation (Entrée 1, Tableau 13). En revanche, l'utilisation d'un agent de bromation plus sélectif, le  $\text{Bu}_4\text{NBr}_3$ ,<sup>63</sup> a augmenté le rendement à 82% (Entrée 2).

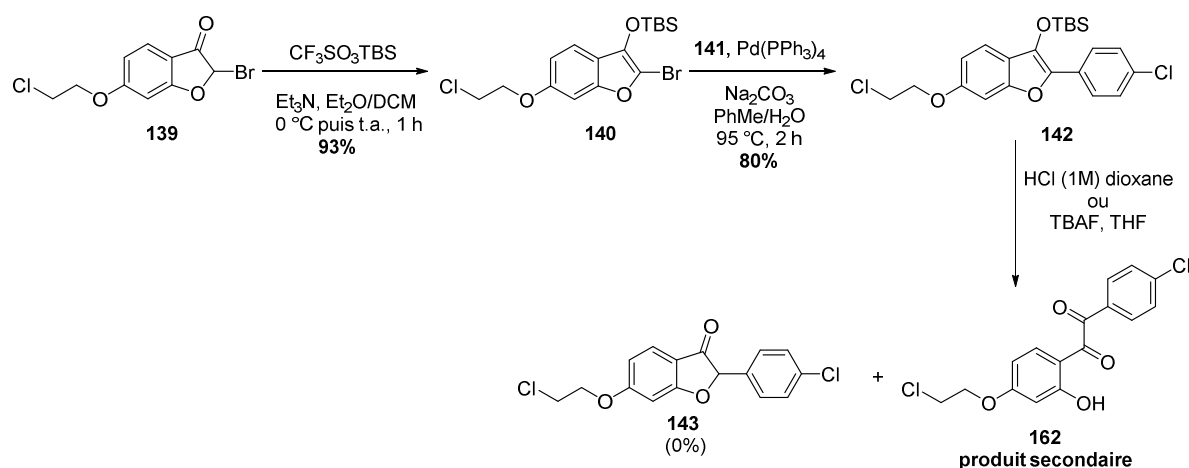


Entrée	Agent de bromation	Solvant	T °C	Rdt (%)
1	$\text{Br}_2$	Dioxane/ $\text{Et}_2\text{O}$	$0^\circ\text{C}$	27 <sup>a</sup>
2	$\text{Bu}_4\text{NBr}_3$	THF	t.a.	82

<sup>a</sup> : obtention de produits poly bromés.

**Tableau 13.**  $\alpha$ -Bromation de la cétone **138**.

La benzofuranone **139** a été silylé par du triflate du *tert*butyldiméthylsilyle pour aboutir au composé **140** avec un rendement de 93%. Ce dernier couplé avec l'acide *p*-chlorophénylboronique **141** en présence du  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , nous a donné l'intermédiaire **142** avec un rendement de 80% (Schéma 36).



**Schéma 36.** Préparation et tentatives de déprotection de l'intermédiaire **142**.

<sup>63</sup> Berthelot, J.; Guette, C.; Desbène, P.-L.; Basselier, J.-J.; Chaquin, P.; Masure, D., *Can. J. Chem.*, **1989**, 67, 2061-2066.

Aucune de nos tentatives de désilylation de l'intermédiaire **142** en utilisant une solution 1M de HCl dans du dioxane ou du TBAF dans du THF n'a abouti à la benzofuranone **143** (Schéma 36). Seul le produit secondaire **162**, résultant d'une  $\alpha$ -hydroxylation suivie d'un réarrangement aboutissant à l'ouverture du cycle, a pu être isolé.

### 3.2.4. La réaction Mukaiyama-Michael, une solution probable

Afin de résoudre ce problème, nous avons décidé d'effectuer une réaction de Mukaiyama-Michael,<sup>64</sup> en supposant qu'en effectuant la désilylation en présence du *trans*-cinnamaldéhyde, nous pouvons limiter l'oxydation en formant directement les aldéhydes diastéréoisomères **144a** et **144b**. Des tests de cette réaction (Entrée 1 et 2, Tableau 14) ont été effectués sur l'analogue silylé **164** qui a été préparé avec un rendement de 50% par silylation du composé **163**, que nous avons au laboratoire (Schéma 37).

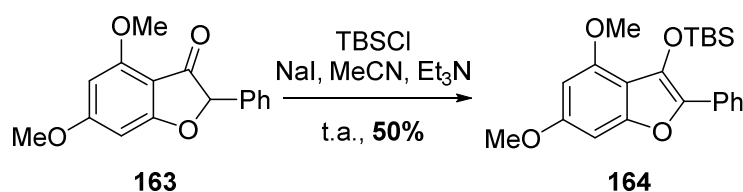
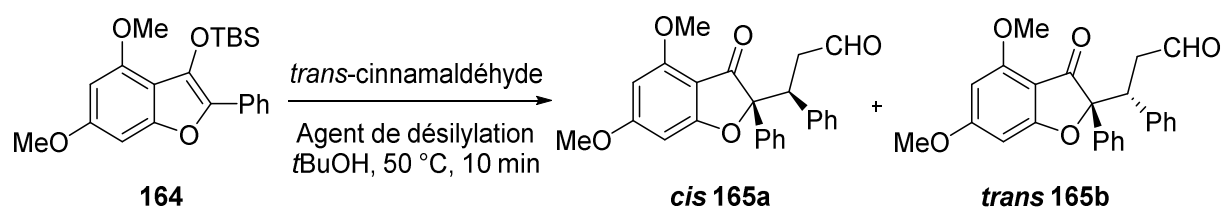


Schéma 37. Silylation de la benzofuranone **163**.



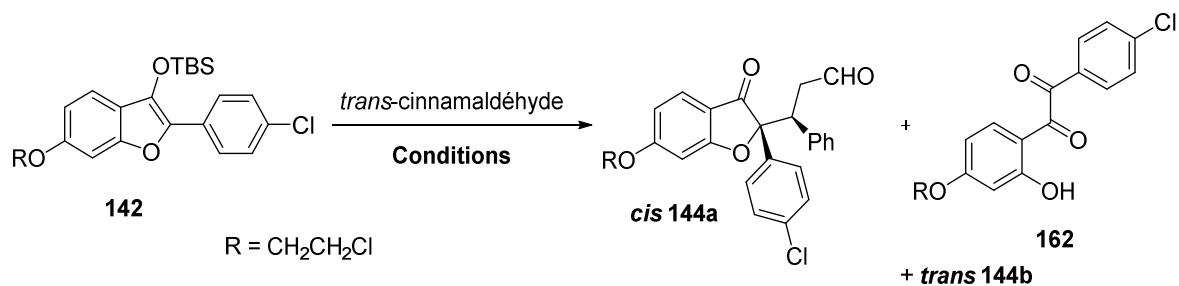
Entrée	Agent de désilylation	Rdt(%)
1	KF (1, 5 équiv.)	0
2	TBAF (1M) dans THF (1,5 équiv.)	<b>165a</b> (42) + <b>165b</b> (29) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> : rendement estimé par RMN.

Tableau 14. Résultats du couplage de Mukaiyama-Michael entre le composé **164** et le *trans*-cinnamaldéhyde.

<sup>64</sup> (a) Narasaka, K.; Soai, K.; Aikawa, Y.; Mukaiyama, T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1976**, *49*, 779-783 ; (b) RajanBabu, T. V., *J. Org. Chem.*, **1984**, *49*, 2083-2089 ; (c) Della Sala, G.; Sicignano, M.; Schettini, R.; De Riccardis, F.; Cavallo, L.; Minenkov, Y.; Batisse, C.; Hanquet, G.; Leroux, F.; Izzo, I., *J. Org. Chem.*, **2017**, *82*, 6629-6637.

Le couplage en présence du KF n'a pas abouti (Entrée 1, Tableau 14). En revanche, en utilisant une solution du TBAF (1M dans THF), les deux diastéréoisomères **165a** et **165b** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 42% et 29% (Entrée 2). En appliquant ces conditions sur l'intermédiaire **142**, nous avons obtenu le diastéréoisomère *cis* **144a** avec un rendement de 26% (Entrée 1, Tableau 15).



Entrée	Conditions	144a (%)
1	TBAF(1M) (1,5 équiv.), 50 °C, <i>t</i> BuOH, 10 min	26
2	TBAF(1M) (1,5 équiv.), 50 °C, <i>i</i> PrOH, 10 min	30
3	Cu(OTf) <sub>2</sub> , HFIP, PhMe, t.a., 16 h puis 50 °C, 1 h	6
4	I <sub>2</sub> , MeCN, t.a. 16 h puis 50 °C, 24 h	0

**Tableau 15.** Résultats du couplage de Mukaiyama-Michael entre le composé **142** et la *trans*-cinnamaldéhyde.

Ce faible rendement est dû à la formation du même produit secondaire **162** ( $\alpha$ -céto hydroxylation) déjà obtenu par la désilylation du composé **142**. Cette même réaction dans de *i*PrOH plus facile à manipuler que le *t*BuOH (solide à température ambiante) a augmenté le rendement à 30% (Entrée 2). Deux autres conditions ont été testées, la première a été décrite en 2012 par Fraile et *al.*,<sup>65</sup> elle consiste en un couplage de Mukaiyama-Michael en présence de Cu(OTf)<sub>2</sub> et de HFIP dans du toluène. Cela nous a donné **144a** avec un rendement de 6% (Entrée 3). Avec la condition catalysée à l'I<sub>2</sub> décrite en 2012 par Deuri et *al.*<sup>66</sup> seule les produits départs ont été récupérés (Entrée 4).

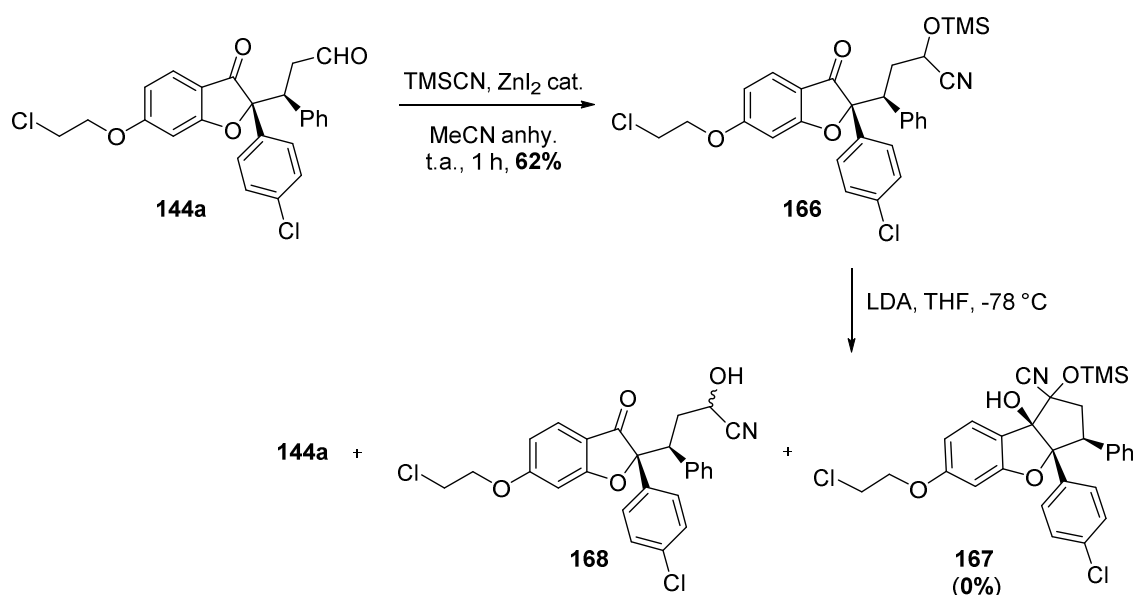
<sup>65</sup> Fraile, J. M.; García, N.; Herrerías, C. I.; Martín, M.; Mayoral, J. A., *ACS Catal.*, **2012**, 2, 56-64.

<sup>66</sup> Deuri, S.; Phukan, P., *J. Phys. Org. Chem.*, **2013**, 25, 1228-1235.

### 3.2.5. Cyclisation de l'aldéhyde *cis* (**144a**)

Pour former le squelette des flavaglines par cyclisation de l'aldéhyde **144a**, nous avons d'abord essayé la méthode de Dobler.<sup>29</sup> Cette dernière est la plus pratique pour la synthèse des flavaglines non substituées en position 2. Elle consiste en une cyanosilylation de l'aldéhyde en présence du TMSCN suivie d'une déprotonation pour former une  $\alpha$ -hydroxy-cyanhydrine protégée cyclique.

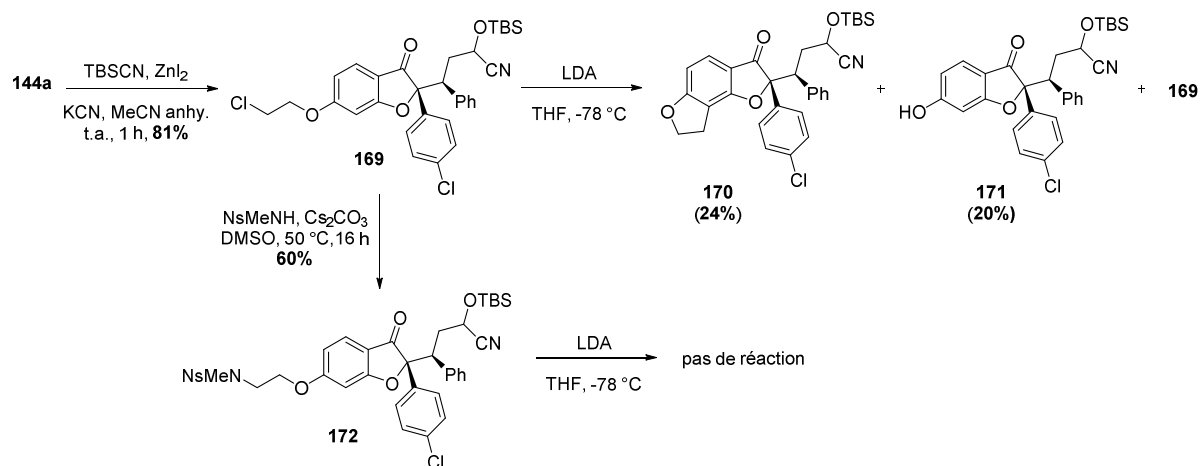
L'aldéhyde **144a** a été transformé en cyanhydrine silylée **166** sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères avec un rendement de 62%. Ce mélange a été engagé dans une réaction de cyclisation en présence d'une solution de LDA fraîchement préparée. De manière inattendue, cette réaction n'a pas fonctionné et un mélange du produit départ **144a** avec un produit désilylé **168** majoritaire ont été récupérés (Schéma 38).



**Schéma 38.** Préparation de la cyanhydrine **166** et tentative de cyclisation.

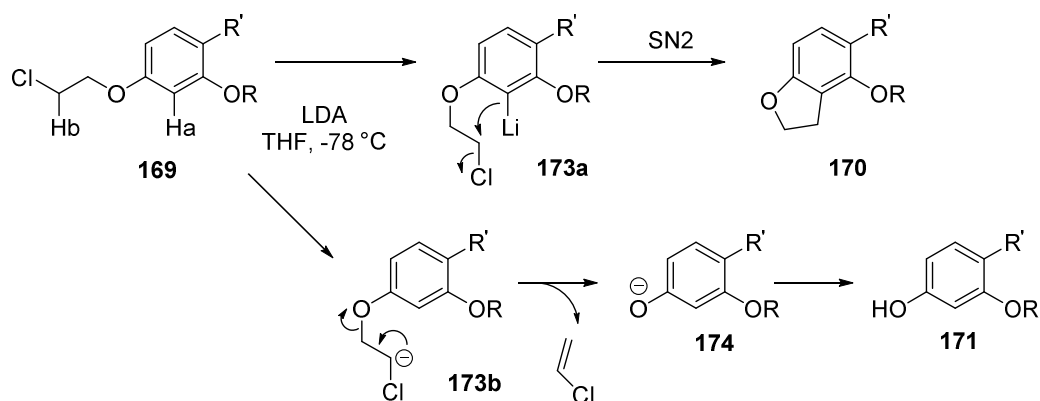
Nous avons pensé à remplacer le TMS par du TBS qui est plus stable. Ainsi, l'aldéhyde **144a** a été engagé dans une réaction de cyanosilylation avec du TBSCN en présence du KCN. La cyanhydrine **169** (mélange de diastéréoisomères) a été obtenue avec un rendement de 81%. Le traitement de celle-ci par du LDA nous a donné un mélange de deux produits secondaires **170** et **171**, en plus du produit départ **169** (Schéma 39).





**Schéma 39.** Préparation et tentatives de cyclisation des cyanhydrines **169** et **172**.

Le composé **170** résulte d'une cyclisation intramoléculaire, probablement par une déprotonation du proton le plus acide Ha suivie d'une SN2 permettant la formation du cycle à 5 (Schéma 40). Nous supposons aussi que la LDA peut aussi générer le carbanion **173b** qui subit une élimination pour générer le phénolate **174** correspondant et du chloroéthylène.

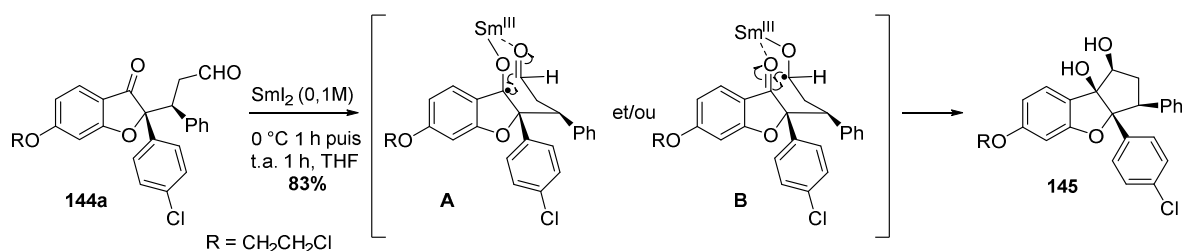


**Schéma 40.** Mécanisme proposé pour la formation des composés **170** et **171**.

À la suite de ces résultats nous avons décidé de remplacer le Cl par un *N*-nosylamine. La cyanhydrine **169** a réagi avec de la *N*-méthyl-nosylamine en présence de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  pour donner l'adduit **172** sous forme d'un mélange de diastéréoisomères avec un rendement de 60%. Malheureusement, les tentatives de cyclisation de ce dernier n'ont pas abouti non plus (Schéma 39). Nous avons été surpris par ce résultat négatif. Pour explorer la cause de cet échec, nous avons neutralisé le produit de lithiation de **172** par du MeOD et nous avons observé l'introduction d'un atome de deutérium au niveau de la cyanhydrine protégée. Loin

d'en être certain, nous supposons que l'intermédiaire lithié est stabilisé dans une conformation qui n'est pas propice à la cyclisation.

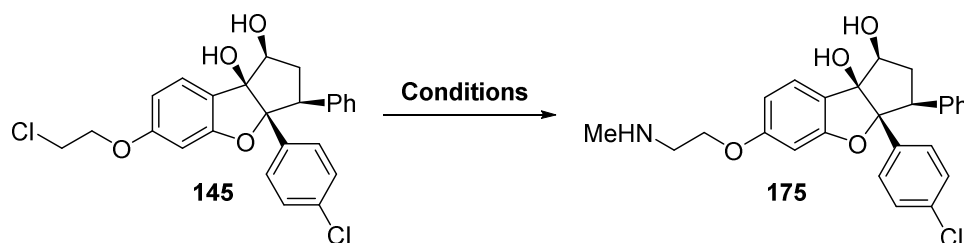
Ces échecs nous ont poussés à remplacer la méthode du Dobler par celle du Taylor, qui fait appel au  $\text{SmI}_2$ .<sup>28</sup> Cette dernière nous a permis d'obtenir le diol *cis* **145** avec un rendement de 83% (Schéma 41). Cette diastéréosélectivité peut être expliquée par un effet de chélation induit par le  $\text{SmI}_2$  lors de la formation des radicaux **A** ou **B**.<sup>67, 68</sup>



**Schéma 41.** Cyclisation de l'aldéhyde **144a** en flavagline **145**.

### 3.2.6. Finalisation de la synthèse de l'IMD-026260 et de son diastéréoisomère **175**

Le diastéréoisomère **175** de l'IMD-026260 a été préparé à partir du dérivé chloré **145**. En présence d'une solution de  $\text{MeNH}_2$  (32%) dans de l'éthanol ou du DMF à température ambiante, nous avons obtenu des traces du produit désiré (Entrées 1 et 2, Tableau 16).



Entrée	Conditions	Rdt(%)
1	$\text{MeNH}_2$ (32%)/EtOH	Traces
2	$\text{MeNH}_2$ (32%)/DMF	Traces
3	1) NaI, Acétone, reflux 2) $\text{MeNH}_2$ (39%)/MeCN	39%
4	$\text{MeNH}_2$ (39%)/MeCN, NaI	34%

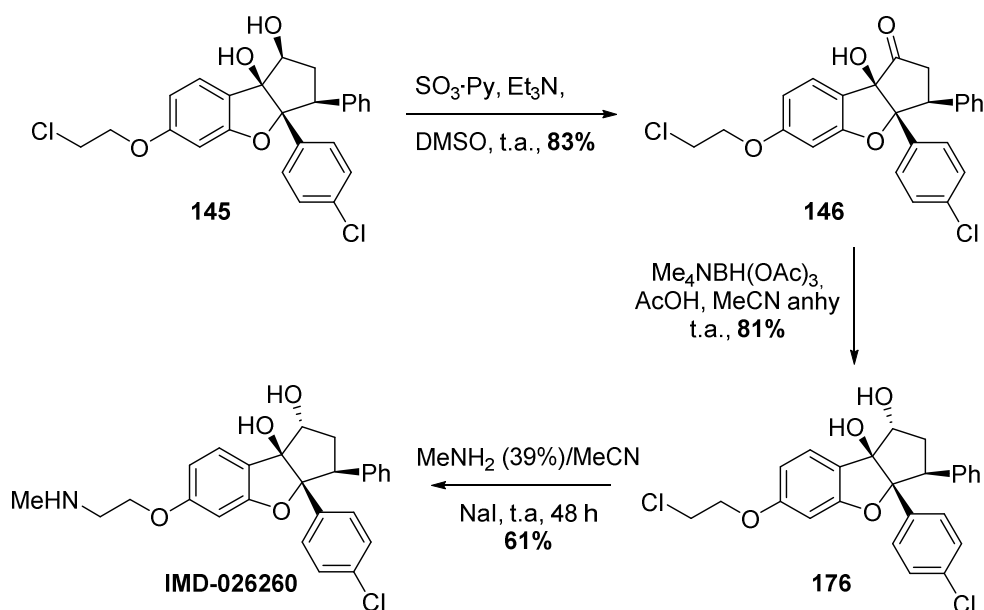
**Tableau 16.** Résultats de la préparation du produit **175**.

<sup>67</sup> Molander, G. A.; Kenny, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 8236-8246.

<sup>68</sup> Szostak, M.; Fazakerley, N. J.; Parmar, D.; Procter, D. J., *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 5959-6039.

Ensuite, nous avons cherché à remplacer le chlore par un iode plus réactif via une réaction de Finkelstein. Deux méthodes ont été effectuées : la première nous a en deux étapes donné le produit **175** avec un rendement de 39% (Entrée 3) (le problème de cette méthode est que la réaction de Finkelstein dure 2 jours et nécessite plusieurs extractions pour éliminer les ions chlorures ce qui aboutit à des pertes du produit). L'autre méthode se fait en une seule étape en présence du NaI et de méthylamine pour fournir le composé désiré avec un rendement de 34% (Entrée 4).

Pour préparer l'**IMD-026260**, le diol *cis* (**145**) a été transformé en diol *trans* (**176**) par une oxydation de l'alcool secondaire avec du SO<sub>3</sub>·Py en présence du Et<sub>3</sub>N dans du DMSO à température ambiante suivie d'une réduction de la cétone formée avec du Me<sub>4</sub>NBH(OAc)<sub>3</sub> en présence d'acide acétique. Ces deux étapes ont fonctionné avec des rendements successifs de 83% et 81% (Schéma 42).



**Schéma 42.** Préparation de l'**IMD-026260**.

La dernière étape a été l'introduction de la partie méthylamino selon la méthode de l'Entrée 4 dans le Tableau 16. Nous avons obtenu l'**IMD-026260** avec un rendement de 61% (Schéma 42). Il est curieux de constater que ce rendement est supérieur à celui observé avec l'isomère **145** ayant les deux groupements hydroxy en *cis*.

### 3.2.7. Vers la synthèse des flavaglines cibles

Nous avons traité la cétone **146** avec de la *O*-méthyl-hydroxylamine pour obtenir quantitativement l'oxime correspondant **177** (mélange de deux diastéréoisomères), qui a été ensuite réduite en amine par du borane. L'amine a été obtenue avec un rendement de 72% sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères en faveur de l'amine *trans* (**178a**) avec l'hydroxyle adjacent (56%) contre 16% pour l'amine *cis* (**178b**) (Schéma 43).

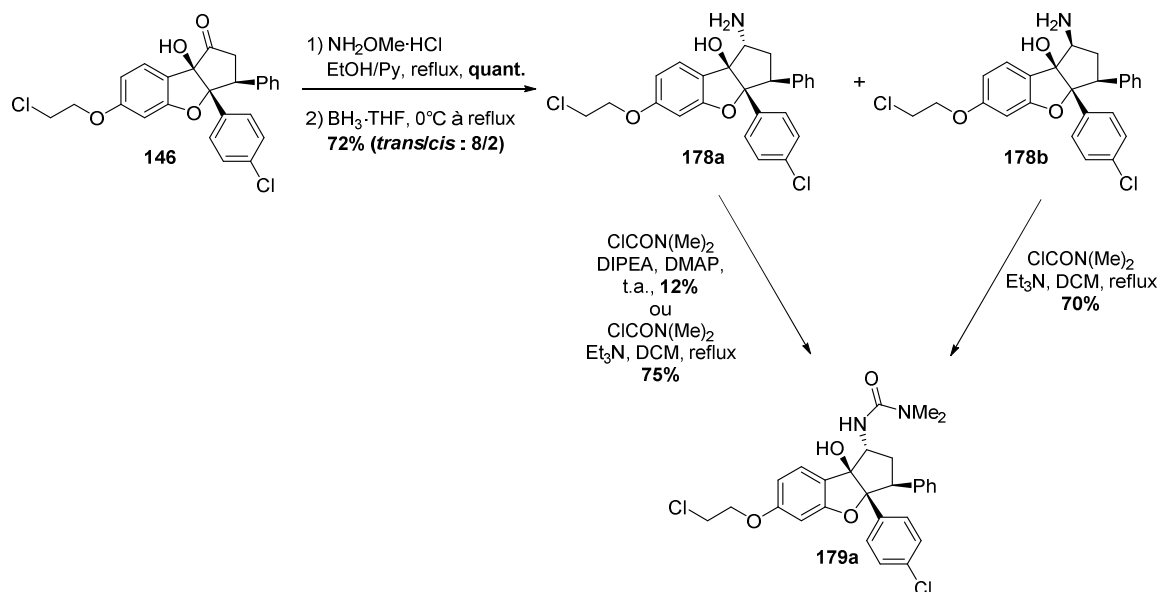
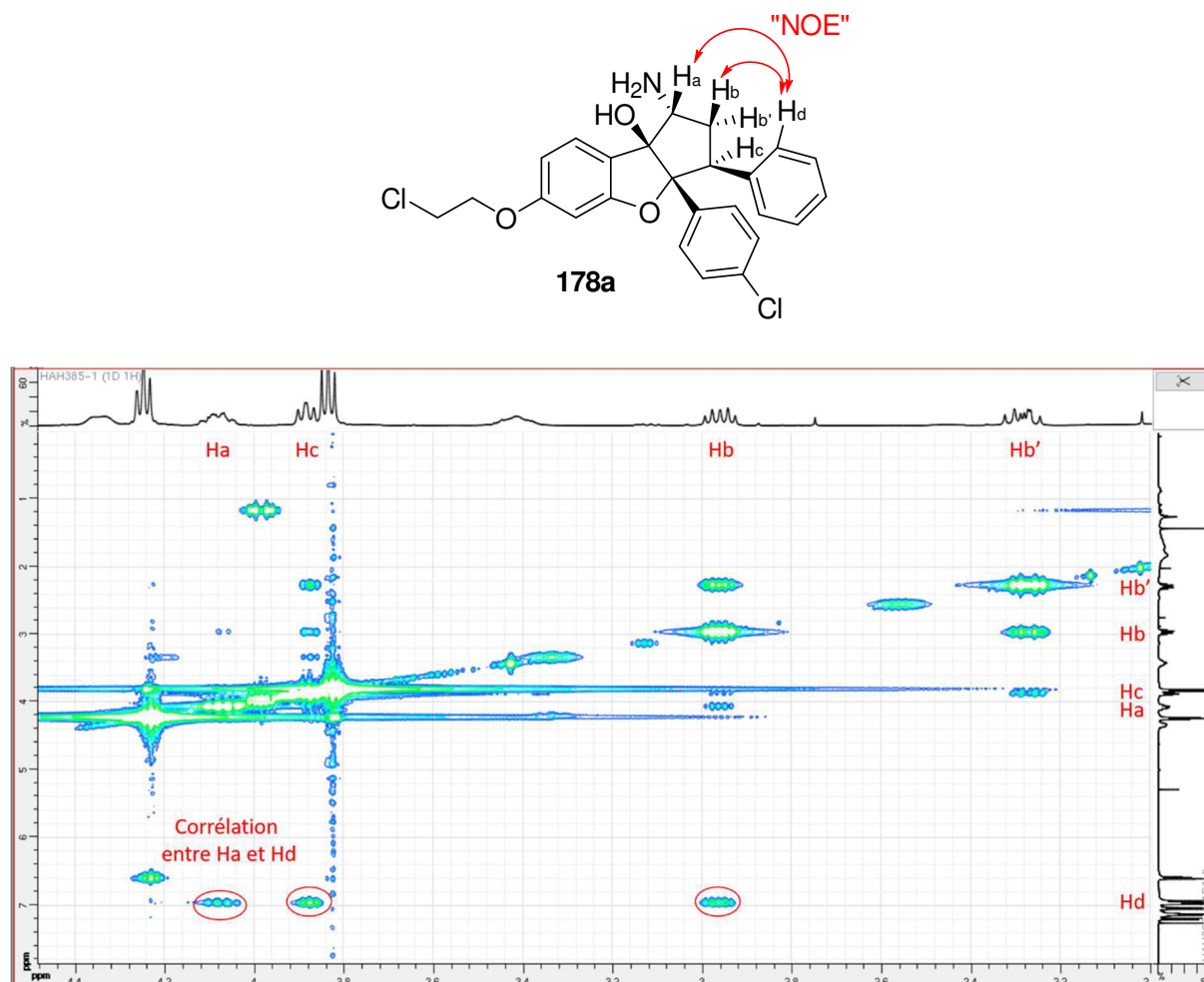


Schéma 43. Préparation de l'urée **179a**.

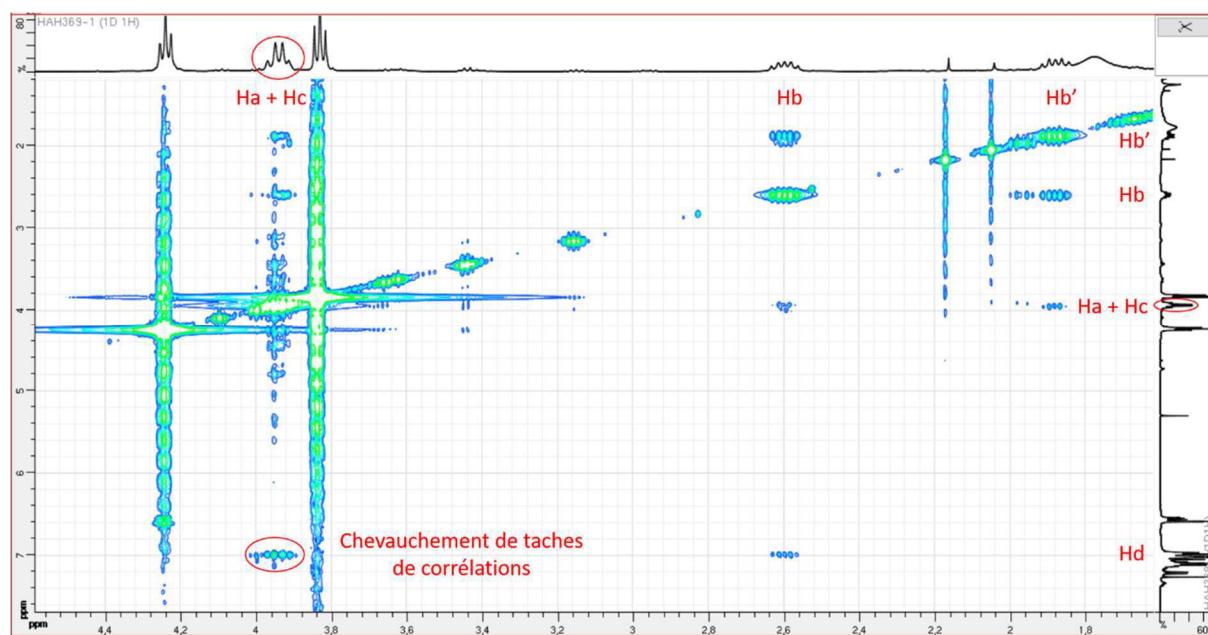
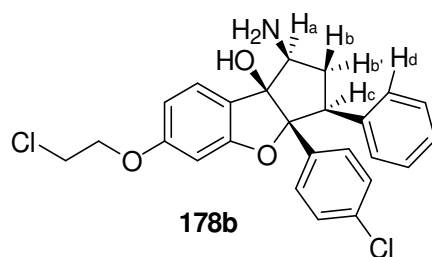
L'amine *trans* (**178a**) obtenue a été mise en réaction avec du chlorure de diméthylcarbamoyl en présence de DMAP et du DIPEA dans du  $\text{DCM}$  à température ambiante. Seulement 12% du produit **179a** désiré ont été obtenus. Cette réaction en présence de triéthylamine et en absence de DMAP mais en chauffant à reflux nous a donné l'adduit **179a** avec un rendement de 75%. Ces dernières conditions ont été appliquées sur l'amine *cis* (**178b**). D'une manière inattendue nous avons obtenu l'urée *trans* (**179a**) avec un rendement de 70%. Il y a donc eu une inversion de configuration du carbone portant l'amine. Autrement dit, l'acylation par le chlorure de diméthylcarbamoyl des 2 amines diastéréoisomériques **178a** et **178b** conduit au même adduit **179a**. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de précédent pour une telle inversion de configuration anormale. Pour vérifier qu'il ne s'agit pas d'un artéfact, nous avons effectué des analyses RMN 2D (HSQC, HMBC), surtout NOESY des deux diastéréoisomères **178a** et **178b**.

L'analyse NOESY du composé **178a** a montré une corrélation entre les protons du phényle (Hd) et celui en  $\alpha$  de  $\text{NH}_2$  (Ha) indiquant que ce composé est bien l'amine *trans* (Figure 11).



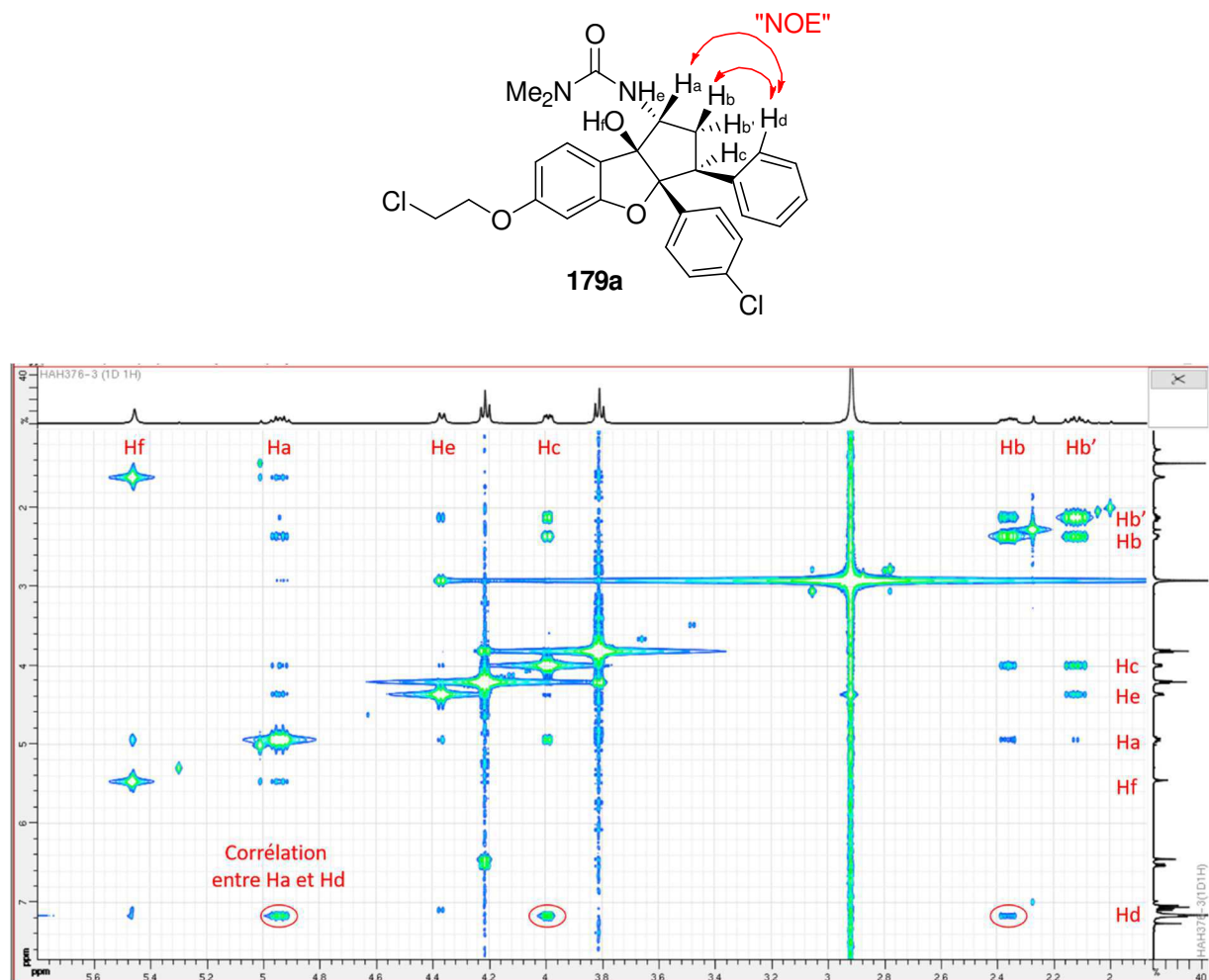
**Figure 11.** Résultat de NOESY du composé **178a**. Les taches entourées en rouge montrent une corrélation entre les protons Ha et Hb avec Hd (protons du phényle), indiquant que Ha est en *cis* avec le phényle.

Concernant le spectre NOESY de l'amine **178b**, le CHN (Ha) et le CHPh (Hc) ont le même déplacement chimique ce qui gêne l'interprétation de ce spectre (Figure 12).



**Figure 12.** Résultat de NOESY du composé **178b**. Ce NOESY ne nous a pas aidé, les protons Ha et Hc ayant le même déplacement chimique.

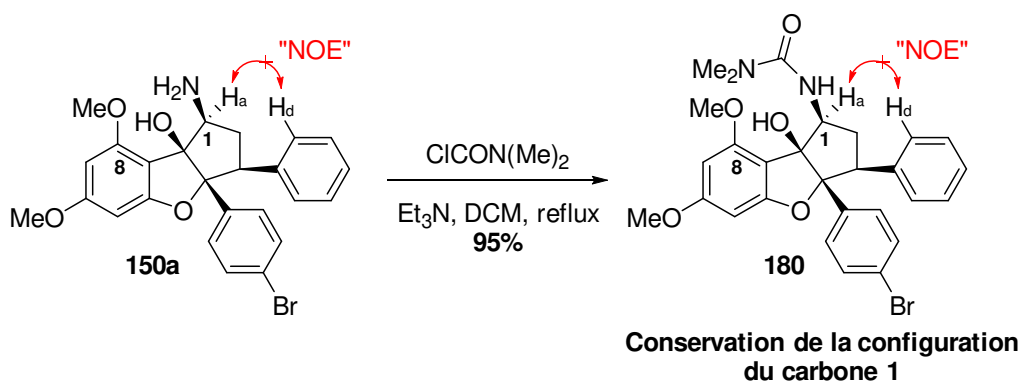
L'analyse NOESY du composé **179a** a montré une corrélation entre les protons du phényle (Hd) et celui en  $\alpha$  de  $\text{NH}_2$  (Ha) indiquant que ce composé est bien l'urée *trans* (Figure 13).



**Figure 13.** Résultat de NOESY de l'urée **179a**. Les taches entourées en rouge montrent une corrélation entre les protons  $\text{H}_a$  et  $\text{H}_b$  avec  $\text{H}_d$  (protons du phényle), indiquant que  $\text{H}_a$  est en position *cis* avec le phényle et avec le OH en  $\alpha$ .

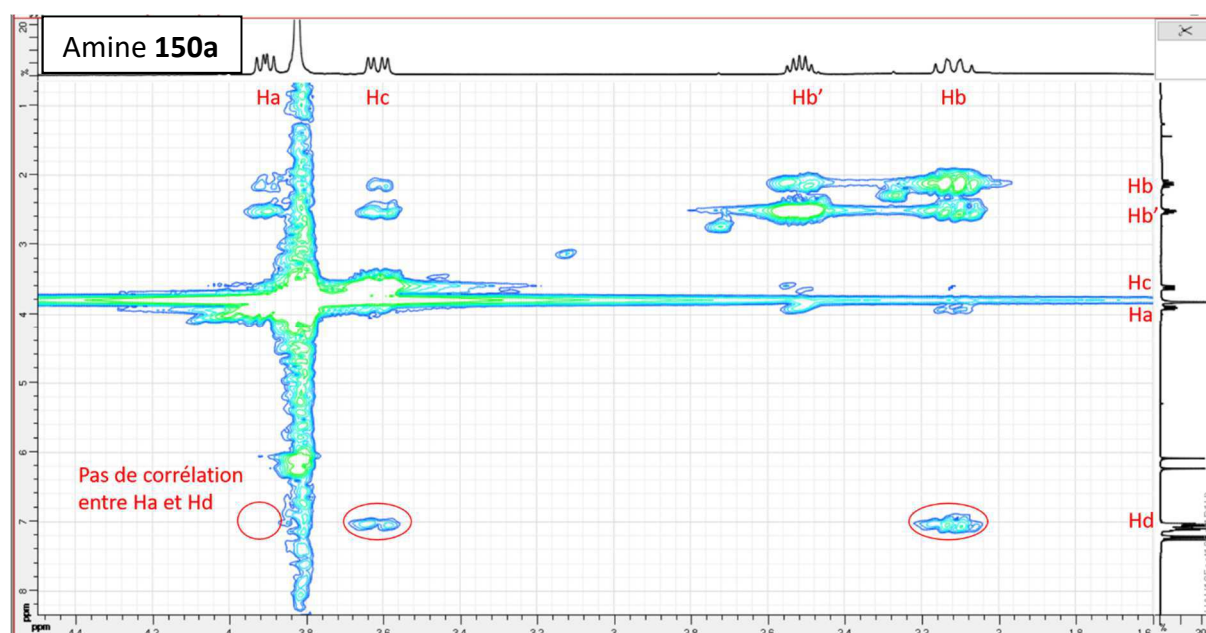
### 3.2.8. Vérification de l'inversion de configuration induite par le chlorure de diméthylcarbamoyle sur un autre substrat

Nous avons appliqué cette réaction anormale sur une flavagline *cis* (**150a**) que nous avons dans notre laboratoire. Dans ce cas, la configuration du carbone 1 portant l'amine a été conservée et nous avons obtenu l'urée *cis* (**180**) avec un rendement de 95% (Schéma 44).



**Schéma 44.** Acylation de l'amine **150a** par du chlorure de diméthylcarbamoyle.

Les analyses NOESY de l'amine **150a** et de son urée **180** ne montrent pas de corrélation entre les protons Ha avec celles des phényles Hd aryliques, ce qui semble indiquer que ces composés ont bien la stéréochimie *cis* proposée même si cet argument doit être pris avec beaucoup de précautions. En effet certaines corrélations peuvent être très difficile à observer, notamment quand le solvant n'a pas été dégazé (Figure 14).



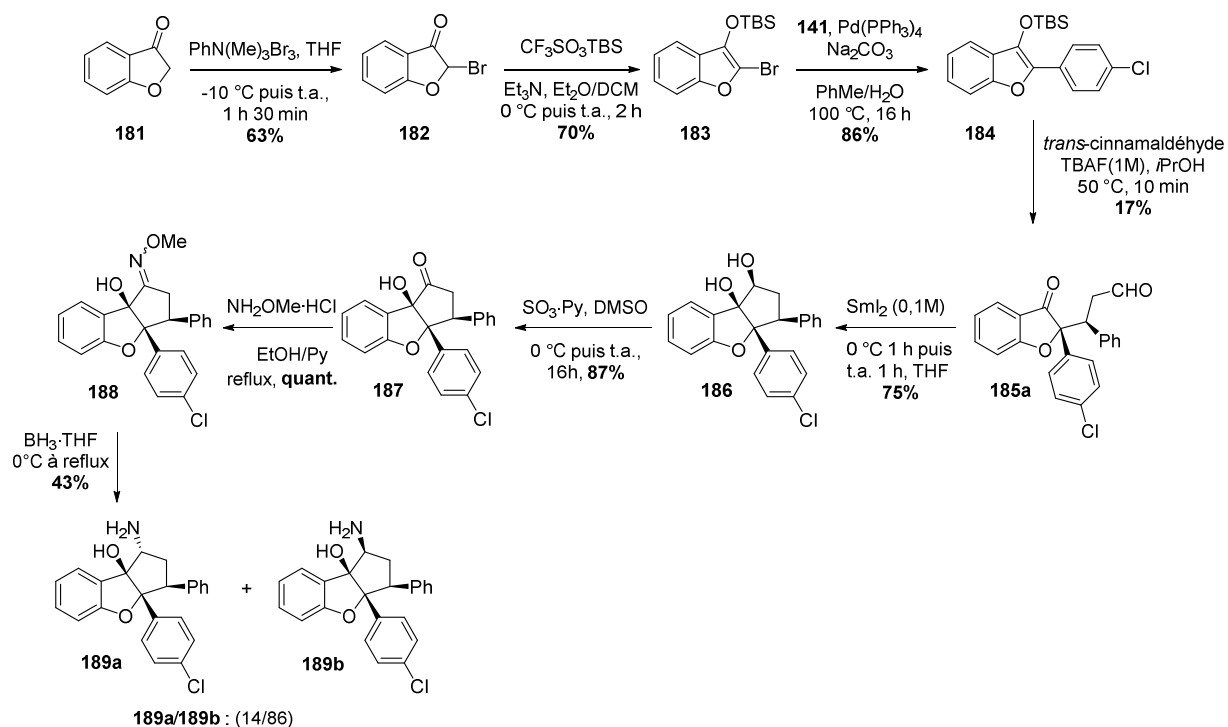




**Figure 14.** Résultats des NOESY de l'amine **150a** et de son urée **180**. Les taches entourées en rouge dans les deux spectres ne montrent pas de corrélation entre Ha (proton en  $\alpha$  de l'azote) et Hd (protons du phényle), indiquant que Ha est en position *trans* avec le phényle et avec le OH en  $\alpha$ .

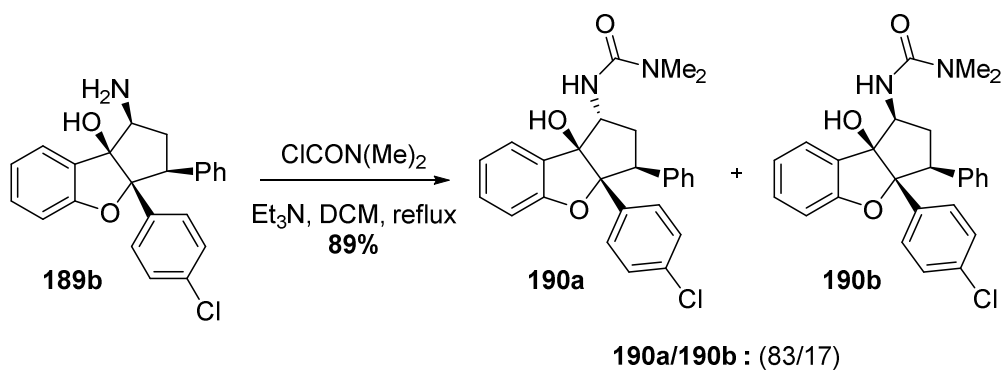
En supposant que le groupement OMe au niveau de la position 8 bloque l'inversion de configuration observée avec l'amine **178b**, nous avons décidé de préparer une amine *cis* (**189b**) dans laquelle le groupement OMe a été remplacé par un H (Schéma 45).

Nous avons démarré cette synthèse par une  $\alpha$ -bromation de la benzofuranone **181** suivie d'une silylation puis un couplage de Suzuki-Miyaura avec l'acide *p*-chlorophénylboronique **141** pour obtenir l'adduit **184** avec un rendement de 38% pour les 3 étapes. Ce dernier a été engagé dans une réaction de Mukaiyama-Michael avec le *trans*-cinnamaldéhyde dans les mêmes conditions déjà utilisés pour donner l'aldéhyde *cis* (**185a**) avec un rendement de 17%. Une cyclisation avec du  $\text{SmI}_2$  de cet aldéhyde a permis l'obtention de la flavagline **186** avec un rendement de 75%. Une oxydation de l'alcool secondaire en cétone **187** suivie par une réaction avec du *O*-méthyle-hydroxylamine ont eu lieu pour former quantitativement l'oxime **188** sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères (Schéma 45).



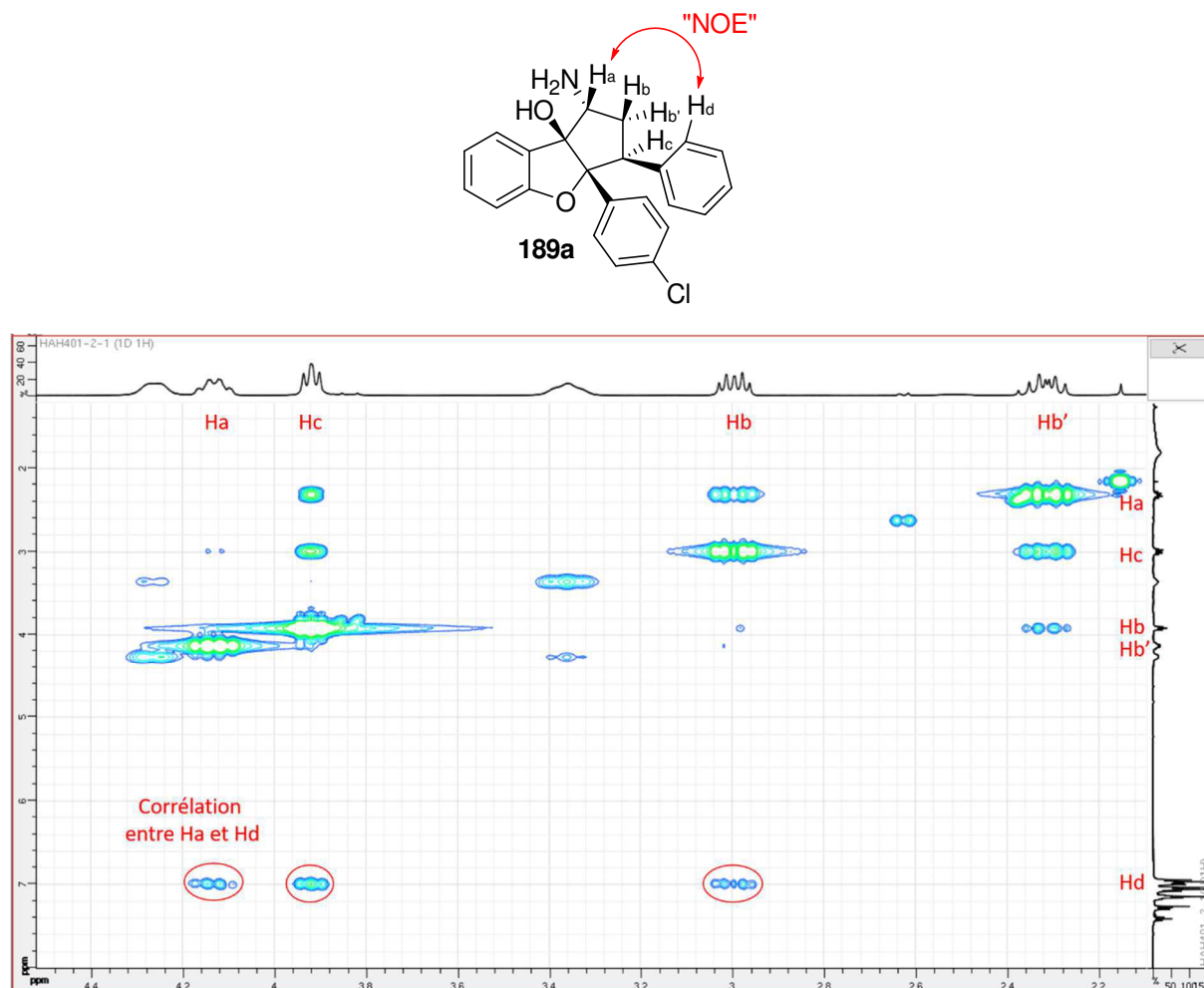
**Schéma 45.** Synthèse des amines **189a** et **189b**.

L'oxime **188** a été réduit avec du borane en un mélange de deux amines diastéréoisomères (**189a** et **189b**) avec un rendement de 43%, avec l'amine *cis* (**189b**) cette fois majoritaire (les spectres  $^1\text{H}$  des amines **189a** et **189b** collent respectivement avec ceux des amines **178a** et **178b**). L'amine *cis* (**189b**) a été mis en réaction avec du chlorure de diméthyle carbamoylé pour nous donner un mélange inséparable de deux diastéréoisomères (**190a/190b** : 83/17) (Schéma 46). L'urée *trans* (**190a**), pour lequel le carbone portant l'amine a subi une inversion de configuration est le majoritaire (le spectre  $^1\text{H}$  du composé **190a** correspond à celui de l'urée **179a**).



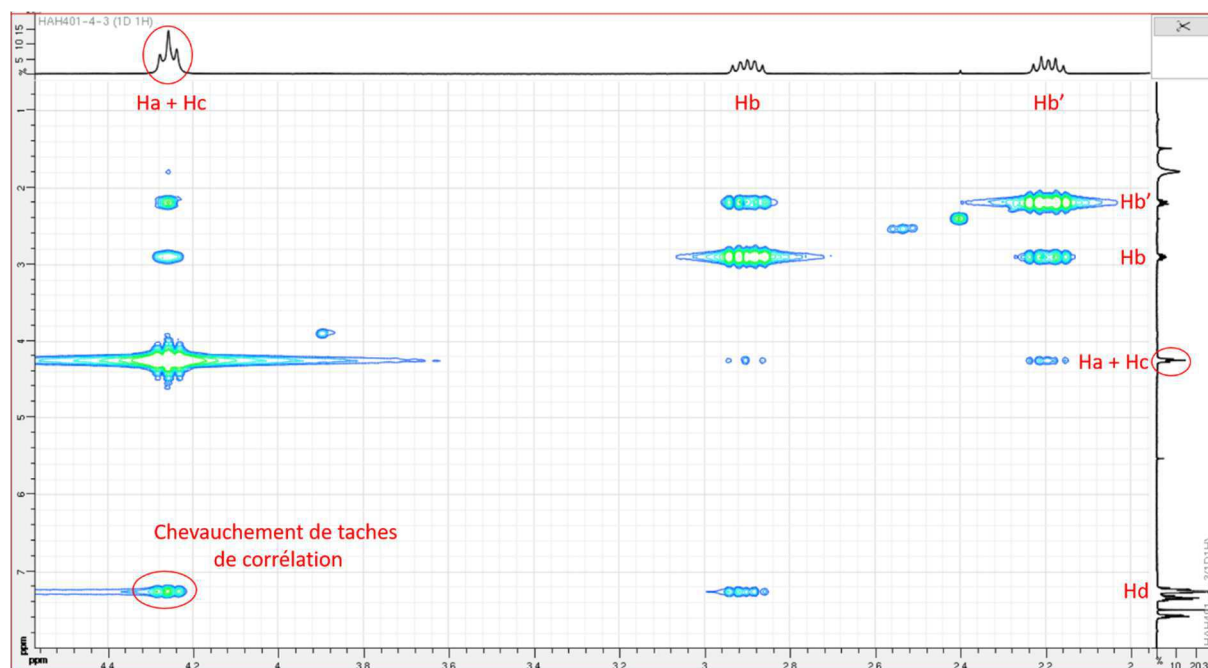
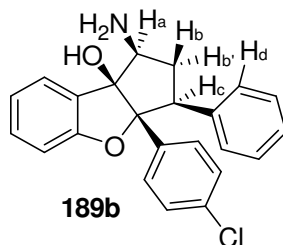
**Schéma 46.** Synthèse des urées **190a** et **190b**.

L'analyse NOESY du composé **189a** a montré une corrélation entre les protons du phényle (Hd) et celui en  $\alpha$  de  $\text{NH}_2$  (Ha) indiquant que ce composé est bien l'amine *trans* (Figure 15).



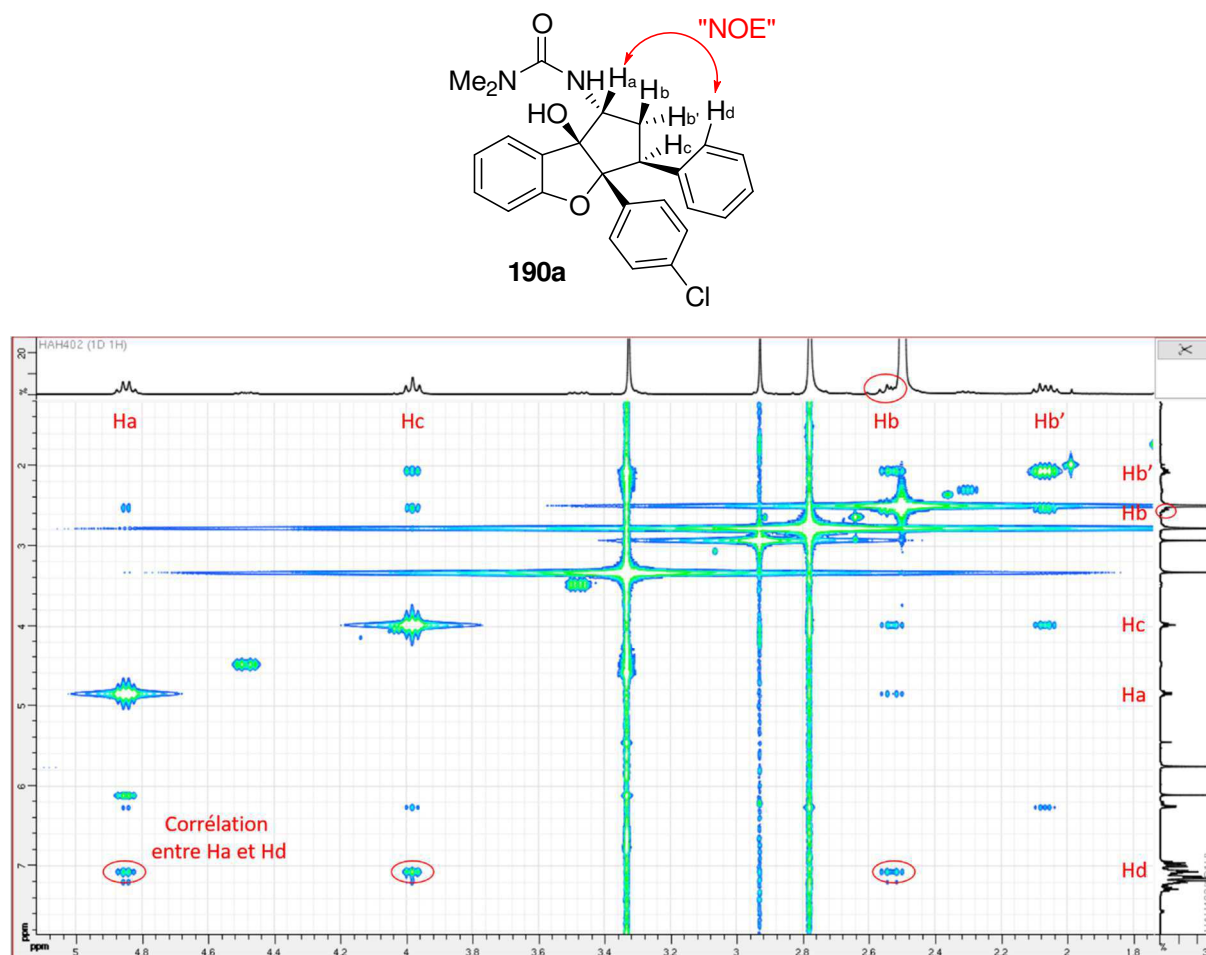
**Figure 15.** Spectre NOESY du composé **189a**. Les taches entourées en rouge montrent une corrélation entre les protons Ha et Hb avec Hd (protons du phényle), indiquant que Ha est en *cis* avec le phényle.

Tout comme dans le cas de l'amine *cis* (**178b**), nous n'avions pas pu interpréter le spectre NOESY de l'amine **189b** comme le CHN (Ha) et le CHPh (Hc) ont le même déplacement chimique (Figure 16).



**Figure 16.** Résultat de NOESY du composé **189b**. Ce NOESY ne nous a pas aidé pour confirmer la structure proposée, les protons Ha et Hc ayant le même déplacement chimique.

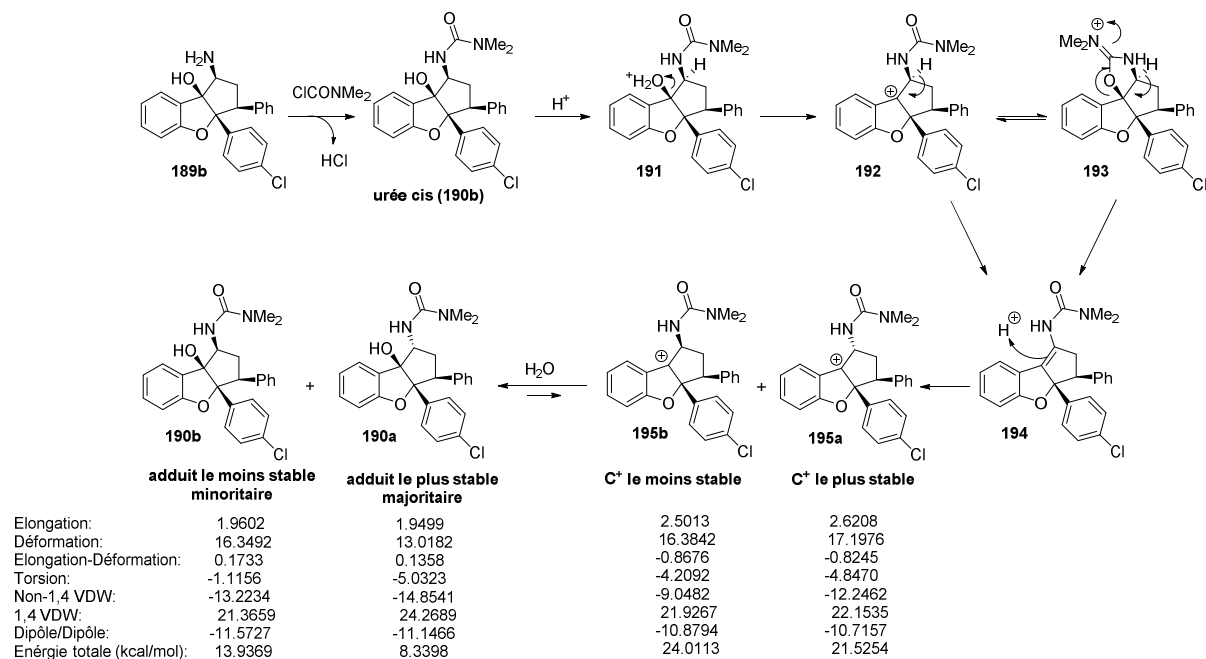
L'analyse NOESY du composé **190a** obtenu à partir de l'amine *cis* (**189b**) a montré une corrélation entre les protons du phényle (Hd) et celui en  $\alpha$  de  $\text{NH}_2$  (Ha) indiquant que ce composé est bien l'urée *trans* (Figure 17).



**Figure 17.** Résultat de NOESY de l'urée **190a**. Les taches entourées en rouge montrent une corrélation entre les protons Ha et Hd (protons du phényle), indiquant que Ha est en position *cis* avec le phényle et avec le OH en  $\alpha$ .

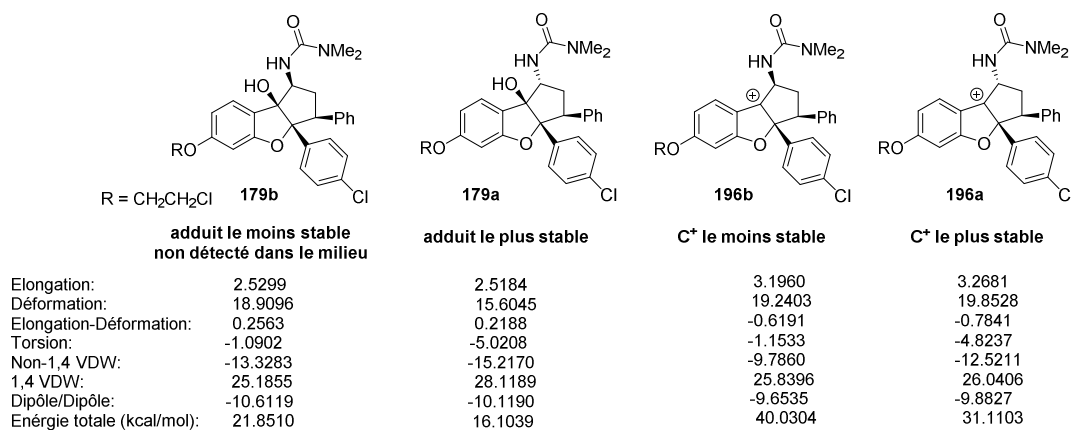
Ce résultat nous a permis de valider une inversion de configuration du carbone portant l'amine. Pour essayer d'expliquer cette inversion de configuration, nous proposons l'hypothèse présentée dans le Schéma 47. L'alcool **190b** peut être déshydraté en milieu acide pour générer le carbocation **192**, qui est en équilibre avec le tétrahydro-oxazolinium **193** formé par réaction du carbonyle de l'urée sur le carbocation. Ces deux isomères **192** et **193** peuvent aboutir à l'énamine **194** par élimination du proton en  $\alpha$  de l'amine. Une protonation de l'énamine **194** aboutit à un mélange de deux carbocations, **195a** et **195b**. Nous avons estimé l'énergie potentielle de ces intermédiaires par une simulation MM2 avec le

programme ChemBio3D ultra 14.0. Le carbocation **195a** et l'alcool correspondant **190a** possèdent des énergies totales plus basse (21.5 et 8.34 Kcal/mol) que leur isomère **195b** et **190b** (24.0 et 13.9 Kcal/mol) (Schéma 47), ce qui pourrait expliquer pourquoi la *cis*-hydroxy-urée **190b** est convertie majoritairement en milieu acide en *trans*-hydroxy-urée **190a** plus stable.



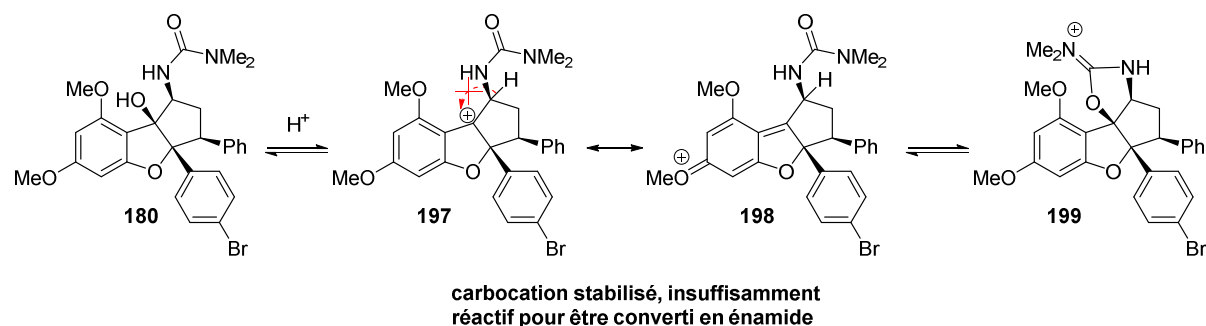
**Schéma 47.** Mécanisme proposé pour l'inversion de configuration induite par le chlorure de diméthyle carbamoylé.

Les mêmes calculs suggèrent que le carbocation **196a** et l'alcool correspondant **179a** possèdent des énergies totales plus basse (31.11 et 16.10 Kcal/mol) que leur isomère **196b** et **179b** (40.03 et 21.85 Kcal/mol) (Figure 18), ce qui supporte notre hypothèse concernant la transformation de la *cis*-hydroxy-urée **179b** en *trans*-hydroxy-urée **179a** plus stable.



**Figure 18.** Estimation des énergies potentielles des intermédiaires **179a**, **179b**, **196a** et **196b** obtenu par une simulation MM2 avec le programme ChemBio3D ultra 14.0.

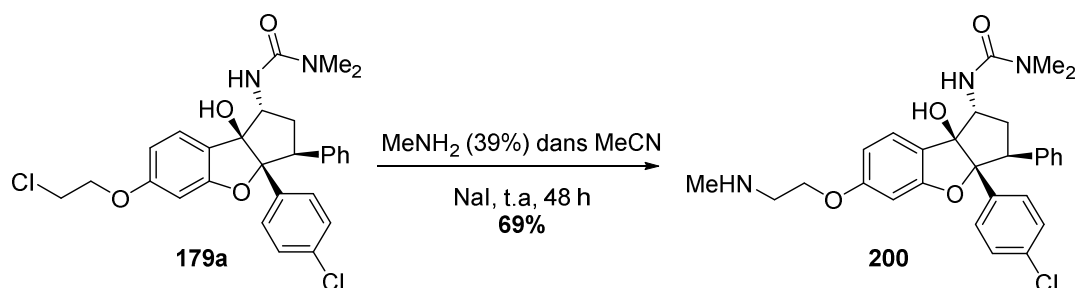
En revanche, la conservation de configuration observée avec l'adduit **180** peut être expliquée par la formation d'un carbocation très stabilisé **197** par les groupements méthoxy et donc insuffisamment réactif pour être converti en énamide (Schéma 48).



**Schéma 48.** Mécanisme proposé pour la conservation de configuration observée avec l'adduit **180**.

### 3.2.9. Préparation de l'urée *trans* (**200**)

Dans la dernière étape, l'urée **179a** a été engagée dans une réaction SN2 avec de la méthylamine dans les mêmes conditions que celles précédemment utilisées. Le produit final **200** a été obtenu avec un rendement de 69% (Schéma 49).



**Schéma 49.** Introduction de la partie méthylamino sur l'adduit **179a**.

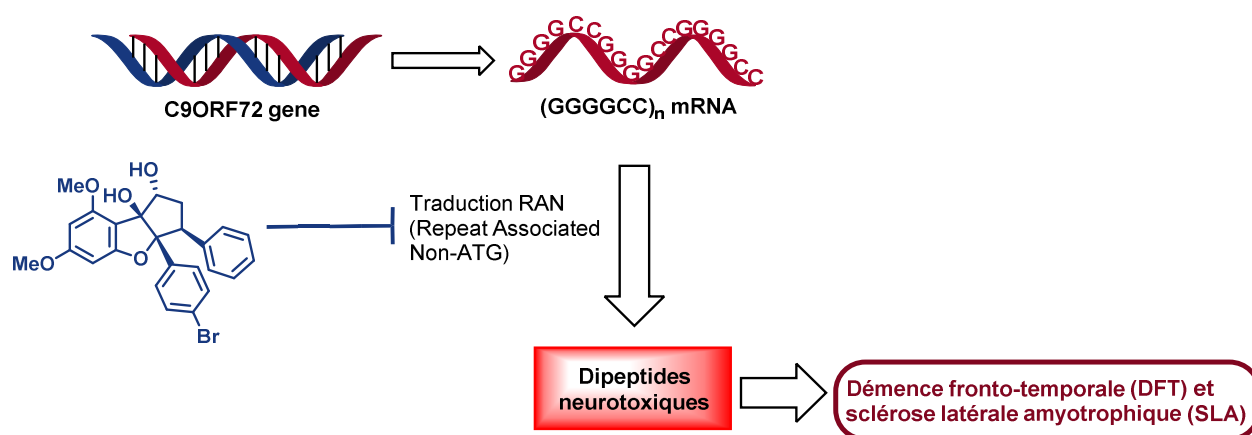
En conclusion, nous avons synthétisé de nouvelles flavaglines **175**, **200** et l'IMD-**026260**, qui permettront de préciser les requis structuraux pour l'inhibition de KRAS. En plus, nous avons développé et découvert de nouvelles réactions, notamment l'utilisation de la réaction de Mukaiyama-Michael pour préparer un intermédiaire avancé de la synthèse des flavaglines, l'aldéhyde *cis* **144a**, et aussi une inversion de configuration d'amines induite par du chlorure de diméthylcarbamoyle.

### 3.3. Etude pharmacologique du FL3

Au cours de ma thèse, j'ai été amené à resynthétiser la flavagline FL3 en quantité suffisante pour des études pharmacologiques menées par trois laboratoires avec qui nous collaborons :

- Le Pr Clotilde Lagier-Tourenne au Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, et Broad Institute.
- Le Pr. Alan J. Whitmarsh à l'Université de Manchester.
- Les Dr. Fangjian Zhou et Dan Xie du Centre d'Oncologie de l'Université Sun Yat-sen à Canton.

L'expansion de la récurrence de la séquence G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> du gène C9orf72 est la cause la plus fréquente de la démence fronto-temporale (DFT) et la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Ce gène muté est transcrit en un ARNm qui est traduit par un mécanisme non conventionnel appelé traduction RAN (Repeat Associated non-ATG) pour générer des dipeptides neurotoxiques. L'équipe du Pr Lagier-Tourenne a montré que le FL3 pouvait inhiber la traduction d'ARN et bloquer ainsi la production de dipeptides neurotoxiques (Figure 19).<sup>69</sup>



**Figure 19.** Schéma résumant l'effet neuroprotecteur du FL3 dans des modèles de démence fronto-temporale (DFT) et de sclérose latérale amyotrophique (SLA).

En cas de stress, certains ARNm peuvent s'associer à des protéines pour former des granules de stress. Le Pr. Whitmarsh a examiné ce phénomène chez un ver (*Caenorhabditis*

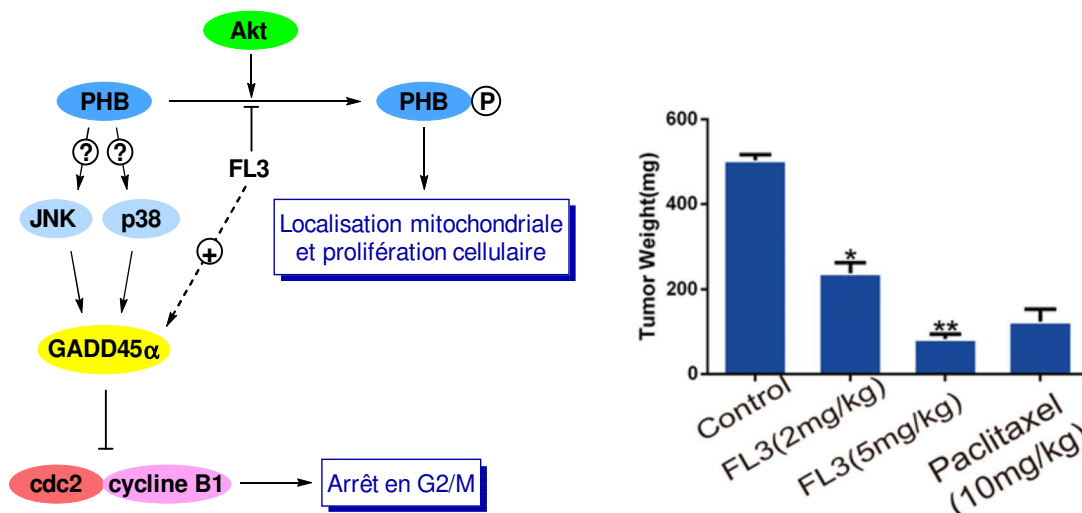
<sup>69</sup> Tabet, R.; Schaeffer, L.; Freyermuth, F.; Jambeau, M.; Workman, M.; Lee, C.-Z.; Lin, C.-C.; Jiang, J.; Jansen-West, K.; Abou-Hamdan, H.; Désaubry, L.; Gendron, T.; Petrucelli, L.; Martin, F.; Lagier-Tourenne, C. *Nat. Commun.*, **2018**, *9*, 152.



*elegans*) et a montré qu'une inhibition de eIF4A par le FL3 induit une localisation des protéines S6 kinases et RPS6 (faisant toutes deux parties du complexe mTORC1) au sein des granules de stress.<sup>70</sup>

L'équipe des Dr. Fangjian Zhou et Dan Xie a découvert un nouveau mécanisme impliqué dans l'activité antitumorale des flavaglines. Ces chercheurs ont en effet montré que dans le carcinome urothélial de la vessie la liaison du FL3 à la PHB1 inhibe sa phosphorylation par Akt, ce qui diminue la localisation de la PHB1 dans les mitochondries affectant ainsi la prolifération cellulaire.<sup>71</sup> De plus, des analyses génomiques ont montré que le FL3, ainsi qu'une invalidation génique de la PHB1, induisent une surexpression du gène GADD45 $\alpha$  (Growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 $\alpha$ ). Cette protéine nucléaire induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M suite à certains stress ou des atteintes de l'ADN. Il est probable que cette action soit consécutive à une activation des kinases de stress JNK ou p38.

*In vivo*, le FL3 (5 mg/kg) est capable d'inhiber la croissance de tumeurs UCB xénotreffées chez la souris d'une manière plus prononcée que le paclitaxel (10 mg/kg) (Figure 20).



**Figure 20.** Schéma résumant l'effet anticancéreux du FL3 dans le carcinome urothélial de la vessie et histogramme représentant la taille moyenne des tumeurs dans les différents groupes de souris xénotreffées avec un carcinome urothélial de la vessie.<sup>71</sup>

<sup>70</sup> Sfakianos, A. P.; Mellor, L. E.; Pang, Y. F.; Kritsiligkou, P.; Needs, H.; Abou-Hamdan, H.; Désaubry, L.; Poulin, G. B.; Ashe, M. P.; Whitmarsh, A. J., *Cell Death Differ.*, **2018**.

<sup>71</sup> Yuan, G.; Chen, X.; Liu, Z.; Wei, W.; Shu, Q.; Abou-Hamdan, H.; Jiang, L.; Li, X.; Chen, R.; Désaubry, L.; Zhou, F.; Xie, D., *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **2018**, 37, 21.



## **4. CONCLUSION**

---



## 4. Conclusion

Nous avons mis au point une synthèse du NVS-SM2 plus performante que celle originalement décrite par les chercheurs de Novartis. Cette synthèse a été accomplie en 9 étapes linéaires avec un rendement global de 14% (rendement moyen : 82%).<sup>72</sup> Elle implique quelques étapes de plus que l'original. En revanche, nous avons optimisé toutes les étapes et certains d'entre elles peuvent être effectués facilement avec un rendement quantitatif. Ainsi, cette route peut satisfaire la demande globale du NVS-SM2 pour examiner en détail son potentiel thérapeutique dans différents types d'affection. Ce produit est actuellement examiné pour ses activités anticancéreuses par notre collaborateur le Dr. Stefan Vagner à l'Institut Curie.

Concernant la 2<sup>ème</sup> partie de notre projet, nous avons synthétisé de nouveaux dérivés de flavaglines qui permettront de préciser les requis structuraux pour l'inhibition de l'activation de KRAS. Au cours de cette étude, nous avons été confrontés à des problèmes inattendus, notamment la lithiation des cyanhydrines protégés **169** et **172** et surtout l'inversion de configuration lors de l'acylation de l'amine *cis* (**178b**) par du chlorure de diméthylcarbamoyle. Il s'agit d'une réactivité originale que nous publierons une fois que les résultats biologiques auront été brevetés ou publiés.

De plus, au cours de cette thèse, j'ai resynthétisé le FL3 en une quantité suffisante pour des nouvelles études pharmacologiques approfondies dans des modèles de cancers et d'affections neurodégénératives (tel. la démence fronto-temporale et la sclérose latérale amyotrophique).

---

<sup>72</sup> Abou-Hamdan, H.; Désaubry, L., *J. Org. Chem.*, **2018**, 83, 2954-2958.



# **5. PARTIE EXPERIMENTALE**

---





## 5. Partie expérimentale

### Généralités :

Tous les réactifs commerciaux ont été utilisés sans purification. Les solvants anhydres utilisés sont commerciaux ou conservés sur tamis moléculaire. Les réactions sensibles à l'humidité ou l'oxygène ont été effectuées sous atmosphère d'argon et dans des ballons séchés à 110°C.

Les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince (plaque CCM Merck DC Platten Kieselgel 60 F<sub>254</sub>). La révélation des plaques a été effectuée par irradiation ultraviolette à 254 ou 365 nm, puis par immersion dans un révélateur (KMnO<sub>4</sub>) si nécessaire. Les colonnes chromatographiques ont été réalisées avec du gel de silice fine Merck 60 ; 0,040 - 0,065 mm (230 - 400 mesh) en utilisant comme éluant les solvants suivants : pentane, heptane, Et<sub>2</sub>O, DCM, AcOEt.

Les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C ont été enregistrés sur des spectromètres Brüker (400 MHz pour <sup>1</sup>H / 100 MHz pour <sup>13</sup>C) ou (500 MHz pour <sup>1</sup>H / 125 MHz pour <sup>13</sup>C). Les conditions sont spécifiées pour chaque spectre (température 25°C sauf indication contraire). Les multiplicités sont désignées comme suit : s, singulet ; d, doublet ; t, triplet ; q, quadruplet ; m, multiplet ; dd, doublet de doublet ; dt, doublet de triplet. Le déplacement chimique ( $\delta$ ) est donné en ppm. Les constantes de couplages (*J*) sont en Hz. Le pic résiduel de solvant sert de référence, CDCl<sub>3</sub> (7.26 ppm, <sup>1</sup>H ; 77.16 ppm pour le pic central, <sup>13</sup>C), (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO (2.50 ppm, <sup>1</sup>H ; 39.52 ppm pour le pic central, <sup>13</sup>C), CD<sub>3</sub>OD (3.31 ppm, <sup>1</sup>H ; 49.00 ppm pour le pic central <sup>13</sup>C).

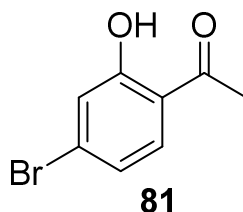
Les analyses par spectroscopie de masse basse et haute résolution ont été réalisées par le Service Commun d'Analyse (SCA) de la faculté de pharmacie d'Illkirch. Les spectres de masse basse résolution ont été réalisés avec un appareil Agilent 1200SL (LC-MS : simple quadripôle, source multimode ES/APCI). Les spectres de masse haute résolution ont été réalisés sur un appareil Brüker MicroTOF-Q (ESI Q-TOF).

Les points de fusion ont été enregistrés sur un appareil à point de fusion électrothermique et ne sont pas corrigés.

## 5.1. Procédures pour le chapitre 3.1

### 5.1.1. Première approche de synthèse

#### 1-(4-Bromo-2-hydroxyphényl)éthan-1-one (**81**)



Une solution de *m*-bromophénol **77** (13 mL, 21.2 g, 122.4 mmol) dans de la pyridine (64 mL) a été agitée à 0 °C pendant 30 min. Après, l'anhydride acétique (18.5 mL, 19.9 g, 195 mmol) a ensuite été additionné goutte à goutte à 0 °C puis l'ensemble a été agité à température ambiante pendant 2 h. Le mélange réactionnel a été neutralisé à l'aide d'une solution HCl (3M). La phase aqueuse a été extraite avec de l'AcOEt (60 mL x 3). Les phases organiques combinées ont été lavées avec une solution saturée de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et avec de la saumure puis séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées, concentrées pour donner l'intermédiaire 3-bromophényl acétate (17.7 g, 67%) sous forme d'une huile jaune, qui a été engagée directement dans l'étape suivante. Un ballon de 250 ml équipé d'un barreau aimanté a été chargé de l'intermédiaire déjà obtenu (17.7 g, 82 mmol) sous argon. AlCl<sub>3</sub> (9.3 g, 69.6 mmol) a été additionné en fraction puis le mélange a été agité à 160 °C pendant 3 h. Après retour à température ambiante, le brut a été versé dans un erlenmeyer contenant de la glace puis une solution de HCl concentrée a été additionnée. La phase aqueuse a été extraite à l'aide de l'AcOEt puis la phase organique a été lavée avec de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par une chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant le pentane / Et<sub>2</sub>O (10/0 à 9/1) comme éluant pour donner le phénol **81** (10.2 g, 58%) sous forme d'un solide blanc.

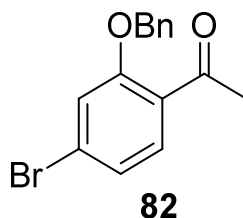
**Point de fusion** : 79-82 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.59 (3H, s), 7.02 (1H, dd, *J* = 1.9, 8.5 Hz), 7.16 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.56 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 12.33 (1H, s, OH).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 26.7, 118.7, 121.7, 122.6, 130.8, 131.7, 162.9, 204.0.

Ce composé présente un spectre  $^1\text{H}$  RMN identique à celui décrit par Gao *et al.* en 2015.<sup>73</sup>

### 1-(2-(Benzyloxy)-4-bromophényl)éthan-1-one (**82**)



A une solution du phénol **81** (10 g, 46.5 mmol) sous agitation dans du DMF anhydre (140 mL),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (19.3 g, 139.5 mmol) puis  $\text{BnCl}$  (6.5 g, 51.6 mmol) ont été ajoutés à température ambiante sous argon. Le mélange réactionnel a été agité à 100 °C pour 1 h. Après retour à température ambiante, le mélange a été neutralisé avec de la glace puis réagité pour 30 min. Le précipité blanc formé a été récupéré par filtration, lavé avec de l'eau puis séché sous vide pendant une nuit pour donner l'acétophénone **82** (13.3 g, 94%) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion** : 77-80 °C.

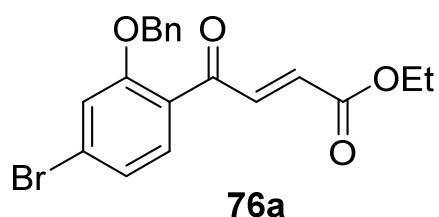
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.56 (3H, s), 5.14 (2H, s), 7.17 (1H, dd,  $J = 1.6, 8.3$  Hz), 7.20 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz), 7.35-7.50 (5H, m), 7.64 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz).

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  32.1, 71.2, 116.4, 124.3, 127.5, 127.8, 127.8, 128.6, 128.9, 131.8, 135.5, 158.5, 198.4.

Ce composé présente un spectre  $^1\text{H}$  RMN identique à celui décrit par Gao *et al.* en 2015.<sup>70</sup>

<sup>73</sup> Gao, H.; Su, P.; Shi, Y.; Shen, X.; Zhang, Y.; Dong, J.; Zhang, J., *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, *90*, 232-240.

**Ethyl (*E*)-4-(2-(benzyloxy)-4-bromophényl)-4-oxobut-2-énoate (76a)**



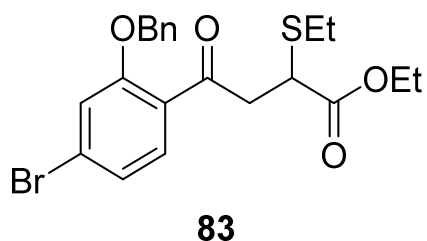
Un mélange de l'acétophénone **82** (2 g, 6.55 mmol) et du l'éthylglyoxalate distillé (0.86 mL, 863 mg, 8.45 mmol) dans de l'acide acétique (15 mL) a été chauffé à 130 °C pendant 16 h. Après retour à température ambiante, le mélange a été neutralisé à l'aide d'une solution de NaHCO<sub>3</sub> saturée puis la phase aqueuse a été extraite avec de l'Et<sub>2</sub>O. La phase organique a été séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par une chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant le pentane / Et<sub>2</sub>O (10/0 à 9/1) comme éluant pour donner le composé **76a** (759 mg, 30%) sous forme d'un solide rosâtre.

**Point de fusion** : 68-71 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.26 (3H, t, *J* = 7 Hz), 4.20 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 5.16 (2H, s), 6.70 (1H, d, *J* = 15.7 Hz), 7.21 (1H, dd, *J* = 1.6, 8.2 Hz), 7.23 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 7.32-7.44 (5H, m), 7.60 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.76 (1H, d, *J* = 15.7 Hz).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 14.3, 61.2, 71.3, 116.7, 124.7, 127.0, 127.7, 128.5, 128.7, 128.8, 130.4, 132.2, 135.2, 140.6, 158.5, 165.7, 190.3.

**Ethyl 4-(2-(benzyloxy)-4-bromophényl)-2-(éthylthio)-4-oxobutanoate (83)**



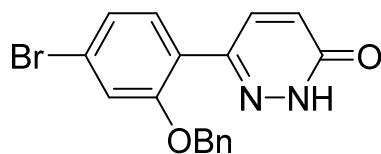
A une solution du composé **76a** (536 mg, 1.38 mmol) sous agitation dans du DCM (16 ml) sous argon, l'éthanethiol (0.12 mL, 85.7 mg, 1.38 mmol) puis de la triéthylamine (3.6  $\mu$ L, 2.73 mg, 0.027 mmol) ont été additionnés à température ambiante. Le mélange a été agité à cette température jusqu'à la consommation totale du produit départ. Le brut a été concentré puis séché sous vide pour donner le composé **83** (614 mg, 99%) sous forme d'un solide blanc, qui a été directement engagé dans la suite.

**Point de fusion** : 101-104 °C.

**$^1\text{H RMN}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.17 (3H, t,  $J = 7.5$  Hz), 1.26 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz), 2.40-2.62 (2H, m), 3.28 (1H, dd,  $J = 3.4, 17.9$  Hz), 3.65 (1H, m), 3.74 (1H, dd,  $J = 3.4, 10.7$  Hz), 4.18 (2H, q,  $J = 7$  Hz), 5.15 (1H, s), 7.16 (1H, dd,  $J = 1.4, 8.5$  Hz), 7.21 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz), 7.35-7.49 (5H, m), 7.68 (1H, d,  $J = 8.5$ Hz).

**$^{13}\text{C RMN}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.1, 14.2, 25.1, 40.9, 46.6, 61.1, 71.3, 116.3, 124.4, 125.8, 127.9, 128.4, 128.6, 128.8, 132.0, 135.1, 158.6, 172.2, 197.1.

**6-(2-(Benzyloxy)-4-bromophényl)pyridazin-3(2H)-one (75)**



**75**

A une solution de l'adduit **83** (200 mg, 0.44 mmol) sous agitation dans de l'acide acétique (0.5 mL), le  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.02 mL, 22.56 mg, 0.70 mmol) a été additionnée à température ambiante. Le mélange réactionnel a été chauffé à reflux pour 6 h. Après retour à température ambiante, le mélange a été concentré. Le brut a été dilué avec du DCM puis la phase organique a été lavée avec du  $\text{NaHCO}_3$  saturée, séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée, puis concentrée pour donner la pyridazinone **75** (154 mg, 98%) sous forme d'un solide blanc, qui a été directement engagé dans la suite.

**Point de fusion** : 178-181 °C.

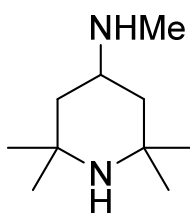
**$^1\text{H}$  RMN** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.10 (2H, s), 6.90 (1H, d,  $J = 9.9$  Hz), 7.18-7.23 (2H, m), 7.29-7.41 (5H, m), 7.50 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz), 7.76 (1H, d,  $J = 9.9$  Hz), 12.44 (1H, br s).

**$^{13}\text{C}$  RMN** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  71.2, 116.5, 123.9, 124.6, 124.9, 127.3, 128.5, 128.9, 131.5, 135.6, 135.7, 144.7, 156.7, 161.9, 171.3.

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$  :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculée pour  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}_2$  357,0239, trouvée 357,0237.

### 5.1.2. Deuxième approche de synthèse

#### ***N*,2,2,6,6-pentaméthylpipéridin-4-amine (20)**



**20**

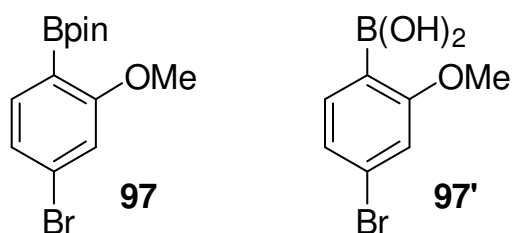
Une solution de la pipéridinamine **91** (4.4 mL, 0.026 mmol) dans du formate d'éthyle (6.5 mL, 0.078 mmol) a été chauffée à 65 °C pour 4-5 h. La suspension blanche épaisse résultante a été refroidie à température ambiante puis filtrée. Le solide obtenu a été lavé avec de l'AcOEt (20 mL) puis séché sous vide pour donner (3.8 g, 79%) du formamide désiré, qui a été engagé directement dans l'étape suivante. Un ballon de 250 ml équipé d'un barreau aimanté a été chargé de LiAlH<sub>4</sub> (1,17 g, 31 mmol) sous argon. THF (40 mL) a été additionné et la suspension résultante a été refroidie à 0 °C. Le formamide (3.8 g, 20.6 mmol) a été ajouté en portion pendant 10 min (Attention : dégagement de l'hydrogène !). Cela étant, le bain de glace a été remplacé par un bain d'huile, et la solution colorée a été chauffée à 65 °C pour 24 h sous argon. La suspension blanche résultante a été refroidie à 0 °C puis neutralisée par une addition lente de l'eau (10 mL) suivie par (20 mL) d'une solution aqueuse 20% de NaOH. Le mélange a été agité à température ambiante pour 15 min. MeOH (40 mL) a été additionné puis le mélange a été filtré sur célite. Le filtrat a été concentré puis le résidu a été dilué avec de l'AcOEt (50mL). La phase organique a été lavée avec de l'eau, de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et concentrée pour donner la pipéridine **20** (3.25 g, 93%) sous forme d'une huile jaunâtre, qui a été directement engagée dans la suite.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 0.72 (2H, t, *J* = 11.8 Hz), 1.00 (6H, s), 1.09 (6H, s), 1.68 (2H, dd, *J* = 3.4, 12.3 Hz), 2.26 (3H, s), 2.6 (1H, tdd, *J* = 3.5, 11.5, 11.5 Hz).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 28.5, 32.5, 34.3, 44.5, 49.7, 50.6.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub> 171.1856 ; trouvée 171.1853.

**2-(4-Bromo-2-méthoxyphényl)-4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolane (97) et l'acide (4-bromo-2-méthoxyphényl)boronique (97')**



A une solution d'iodobenzène **96** (7.3 g, 23.32 mmol) sous agitation dans du dioxane anhydre (27 mL) sous argon, ont été introduits successivement le PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (782 mg, 0.96 mmol, 10 mol%), la triéthylamine (4 mL, 2.9 g, 28.74 mmol) et le pinacolborane (2.08 mL, 1.84 g, 14.38 mmol) à température ambiante. Le mélange réactionnel a été chauffé à 90 °C pendant 16 h. Après retour à température ambiante, le brut a été dilué par l'addition du DCM. La phase organique a été lavée successivement avec de l'eau, de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, concentrée puis purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant le pentane / Et<sub>2</sub>O (10/0 à 9/1) comme éluant pour donner un mélange de boronates **97/97'** (**97/97'** : 9/1 ; 72%) sous forme d'une huile jaunâtre.

**Ester boronique 97**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.34 (12H, s), 3.82 (3H, s), 6.99 (1H, d, *J* = 1 Hz), 7.08 (1H, dd, *J* = 1, 7.9 Hz), 7.52 (1H, d, *J* = 7.9 Hz).

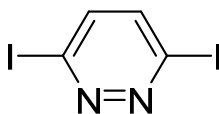
<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 24.9, 56.2, 83.8, 114.3, 123.5, 126.6, 138.0, 165.0.

L'acide boronique **97'** est décrit par Lin *et al.* en 2011, mais avec une autre méthode de synthèse.<sup>74</sup>

<sup>74</sup> Lin, D. W.; Masuda, T.; Biskup, M. B.; Nelson, J. D.; Baran, P. S., *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 1013-1030.



### 3,6-Diiodopyridazine (98)



**98**

Ce composé a été préparé par deux méthodes :

#### Méthode A :

A une solution de 3,6-dichloropyridazine **19** (2 g, 13.4 mmol) sous agitation dans l'acétone (50 mL), NaI (10 g, 67 mmol) et une quantité catalytique du HI ont été additionnés à température ambiante. Le mélange réactionnel a été chauffé à 80 °C pendant 3 h (une RMN a été effectuée tous les 30 min) puis il a été neutralisé avec de l'eau (20 mL). Le précipité formé a été récupéré par filtration sur Büchner puis séché sous vide pour donner la diiodopyridazine **98** (3.5 g, 80%) sous forme d'un solide marron, qui a été directement engagé dans la suite.

#### Méthode B :

Un mélange de la 3,6-dichloropyridazine **19** (5 g, 33.56 mmol), du NaI (6.75 g, 45 mmol) et d'une solution 57% HI dans l'eau (25 ml) a été agité à 50 °C jusqu'à consommation totale du produit départ (réaction suivie par RMN). Après retour à température ambiante, la réaction a été traitée avec une solution de NaOH (3M) pour atteindre un pH 12 puis le mélange a été agité pour 10 min à température ambiante. La phase aqueuse a été extraite avec du DCM. La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis concentrée pour donner la diiodopyridazine **98** (11.1 g, quant.) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion :** 150-153 °C.

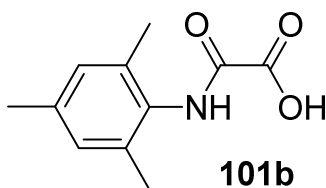
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 7.84 (2H, s).

Ce composé présente un spectre <sup>1</sup>H RMN identique à celui décrit par Heinisch *et al.*.<sup>75</sup>

---

<sup>75</sup> Heinisch, G.; Holzer, W., *Can. J. Chem.*, **1991**, 69, 972-977.

### Acide 2-(mésitylamino)-2-oxoacétique (**101b**)



Une solution de la 2,4,6-triméthylaniline **100b** (1.04 mL, 1 g, 7.39 mmol) et de la triéthylamine (1.13 mL, 823 mg, 8.13 mmol) dans du DCM (8 mL) a été additionnée goutte à goutte sur une solution d'éthyle 2-chloro-2-oxoacétate (0.91 mL, 1.1 g, 8.13 mmol) dans DCM (4 mL). Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pour 18 h. La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée pour donner une huile jaune qui se cristallise en cristaux blancs (1,56 g). Cet intermédiaire obtenu a été dissous dans un mélange H<sub>2</sub>O / THF (3,5 / 3,5) puis du NaOH (265 mg, 7.39 mmol) a été ajoutée. Le mélange a été agité à température ambiante pour 2 h puis il a été acidifié avec une solution de HCl (1N). La phase aqueuse a été extraite avec de l'AcOEt puis la phase organique a été séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée pour donner l'acide **101b** (1.38 g, quant.) sous forme d'un solide blanc, qui a été directement engagé dans la suite.

**Point de fusion** : 175-178 °C.

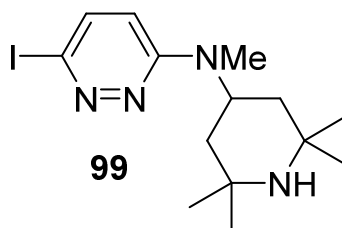
**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 2.08 (6H, s), 2.23 (3H, s), 6.90 (2H, s), 10.10 (1H, s).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 17.8, 20.4, 128.3, 131.2, 134.7, 136.0, 157.1, 162.2.

Ce composé présente un spectre <sup>1</sup>H RMN identique à celui décrit par Waltaman *et al.* en 2004.<sup>76</sup>

<sup>76</sup> Waltman, A. W.; Grubbs, R. H., *Organometallics*, **2004**, 23, 3105-3107.

### 6-Iodo-N-méthyl-N-(2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-4-yl)pyridazin-3-amine (99)



Dans un ballon de 20 mL sous argon, CuI (57.2 mg, 10 mol%), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1.27 g, 6 mmol), l'acide **101b** (124.2 mg, 20 mol%), la diiodopyridazine **98** (1 g, 3 mmol) et la pipéridine **20** (613 mg, 3.6 mmol) ont été introduits successivement à température ambiante. Les réactifs ont été dissous dans du DMSO anhydre (4 mL) puis le mélange a été chauffé à 90 °C pour 18 h. La réaction a été suivie par CCM jusqu'à la consommation totale de la pyridazine de départ. Le mélange a été traité avec de l'eau puis la phase aqueuse a été extraite avec de l'AcOEt. La phase organique a été lavée avec une solution saturée de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le DCM / MeOH (10/0 à 8/2) comme éluant pour donner la pyridazine **99** (893 mg, 80%) sous forme d'un solide marron.

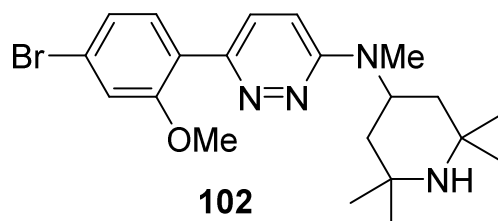
**Point de fusion** : 184-187 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.22 (6H, s), 1.34 (6H, s), 1.44 (2H, t, *J* = 12.4 Hz), 1.65 (2H, dd, *J* = 3, 12.2 Hz), 2.87 (3H, s), 5.14 (1H, m), 6.49 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 7.43 (1H, d, *J* = 9.5 Hz).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 28.6, 29.3, 35.0, 41.5, 47.5, 52.1, 110.0, 113.6, 137.0, 158.8.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>IN<sub>4</sub> 375.1046 ; trouvée 375.1055.

**6-(4-Bromo-2-méthoxyphényl)-N-méthyl-N-(2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-4-yl)pyridazin-3-amine (102)**



Ce composé a été préparé par 3 méthodes :

**Méthode 1 :**

Dans un ballon de 5 mL sous argon, la pyridazinamine **99** (80 mg, 0.21 mmol), le boronate **97** (90 mg, 0.24 mmol), la Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (46 mg, 0.43 mmol) ont été introduits successivement puis dissouts dans un mélange de PhMe / EtOH / H<sub>2</sub>O (1.5 mL / 0.15 mL / 0.15 mL) à température ambiante. Le ballon a été évacué et remplis d'argon plusieurs fois avant l'addition du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (12.4 mg, 5 mol%) puis le mélange réactionnel a été chauffé à reflux pour 32 h. Après retour à température ambiante, le résidu a été directement purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant le DCM / MeOH (10/0 à 8/2) comme éluant pour donner la pyridazinamine **102** (24 mg, 26%) sous forme d'un solide marron.

**Méthode 2 :**

Une solution du composé **109** (66 mg, 0.23 mmol) et de la pipéridine **20** (88 mg, 0.52 mmol) dans du butan-1-ol a été agité à 120 °C pour 48 h. Le solvant a été éliminé par évaporation puis le brut a été dilué avec du DCM. La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel silice en utilisant l'AcOEt / MeOH (8/2) comme éluant pour donner la pyridazinamine **102** (62 mg, 60%) sous forme d'un solide marron.

**Méthode 3 :**

Ce composé a été préparé en analogie avec le composé **99** à partir de l'iodopyridazine **108** (70 mg, 0.18 mmol) avec la pipéridine **20** (37 mg, 0.22 mmol) en présence du CuI (3.4 mg, 10 mol%), de l'acide **101b** (7.5 mg, 20 mol%) et du K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (76 mg, 0.36 mmol) dans du DMSO anhydre (0.5 mL). Le brut a été purifié par chromatographie flash en utilisant l'AcOEt / MeOH

(10/0 à 7/3) comme éluant pour donner la pyridazinamine **102** (32 mg, 39%) sous forme d'un solide blanc.

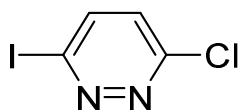
**Point de fusion** : 217-220 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.74 (6H, s), 1.80 (2H, dd, *J* = 2.9, 13.6 Hz), 1.90 (6H, s), 2.35 (2H, t, *J* = 12.8 Hz), 2.98 (3H, s), 3.85 (3H, s), 5.86 (1H, m), 6.81 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 7.12 (1H, d, *J* = 1.3 Hz), 7.22 (1H, dd, *J* = 1.3, 8.3 Hz), 7.76 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 7.77 (1H, d, *J* = 8.3 Hz).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 27.5, 29.3, 33.6, 40.4, 46.5, 53.3, 55.8, 110.5, 114.7, 123.0, 124.2, 125.6, 129.2, 131.5, 148.6, 157.2, 158.2.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>BrN<sub>4</sub>O 433.1603; trouvée 433.1608.

### 3-Chloro-6-iodopyridazine (**104**)



**104**

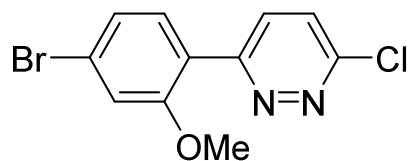
Ce composé a été préparé selon la **Méthode B** utilisée pour la préparation de la 2,6-diiodopyridazine **98**, à partir de la 2,6-dichloropyridazine **19** (6 g, 40.3 mmol) avec du NaI (7.8 g, 52.4 mmol) et du HI (57% dans H<sub>2</sub>O) (15 ml) à 40 °C pour 1 h 30 min (la réaction a été suivie par RMN). Après traitement, cette réaction a donné la pyridazine **104** (9.6 g, quant.) sous forme d'un solide jaunâtre, qui a été engagé directement par la suite.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.20 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.80 (1H, d, *J* = 8.8 Hz).

Ce composé présente un spectre <sup>1</sup>H RMN identique à celui décrit par Xia *et al.* en 2011.<sup>77</sup>

<sup>77</sup> Xia, Z.; Farhana, L.; Correa, R. G.; Das, J. K.; Castro, D. J.; Yu, J.; Oshima, R. G.; Reed, J. C.; Fontana, J. A.; Dawson, M. I., *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 3793-3816.

### 3-(4-Bromo-2-méthoxyphényl)-6-chloropyridazine (105)



### 105

Du PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (574 mg, 0.70 mmol) a été additionné à une solution de la pyridazine **104** (1.86 g, 7.73 mmol), des boronates (**97**, **97'**) (2.2 g, 7.03 mmol) et du phosphate de potassium (4.48 g, 21.08 mmol) dans dioxane (19 mL) / H<sub>2</sub>O (1 mL) à température ambiante sous argon (le ballon a été évacué et remplis d'argon 5 fois avant l'addition du Pd). La réaction a été chauffée à 90 °C pour 16 h. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel a été dilué avec de l'AcOEt (50 mL), filtré sur célite puis concentré. La phase organique a été lavée avec de l'eau, de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par une chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant le DCM (100%) comme éluant pour donner la pyridazine **105** (1.63 g, 70%) sous forme d'un solide blanc.

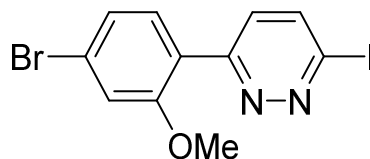
**Point de fusion** : 133-136 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.87 (3H, s), 7.16 (1H, d, *J* = 1.4 Hz), 7.26 (1H, dd, *J* = 1.4, 8.3 Hz), 7.49 (1H, d, *J* = 9 Hz), 7.84 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.98 (1H, d, *J* = 9 Hz).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 56.0, 115.0, 123.6, 124.6, 125.4, 127.2, 130.3, 132.2, 155.1, 157.1, 157.6.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>BrClN<sub>2</sub>O 298.9581, trouvée 298.9571.

### 3-(4-Bromo-2-méthoxyphényl)-6-iodopyridazine (108)



**108**

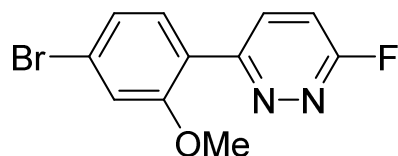
Un mélange de la chloropyridazine **105** (100 mg, 0.33 mmol), du NaI (64 mg, 0.43 mmol) dans du HI (57%, 2 mL) a été chauffé à 80 °C pour 24 h sous argon. Après refroidir à température ambiante, la réaction a été traitée avec une solution de NaOH 70% (pour ajuster le pH à 6). La phase aqueuse a été extraite avec du DCM puis la phase organique a été séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / Et<sub>2</sub>O (9/1 à 7/3) comme éluant pour donner l'iodopyridazine **108** (100 mg, 78%) sous forme d'un solide marron.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.87 (3H, s), 7.16 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 7.27 (1H, dd, *J* = 1.5, 8.5 Hz), 7.68 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.80-7.88 (2H, m).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 56.15, 115.3, 123.4, 123.9, 124.8, 125.5, 129.2, 132.2, 136.3, 157.2, 157.8.

BRMS (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>BrIN<sub>2</sub>O 390.894; trouvée 390.787.

### 3-(4-Bromo-2-méthoxyphényl)-6-fluoropyridazine (109)



**109**

Ce composé a été préparé par deux méthodes :

#### Méthode 1 :

A une solution de la chloropyridazine **105** (200 mg, 0.67 mmol) sous agitation dans du DMSO (1.5 mL), le KF (58 mg, 1 mmol) a été additionné à température ambiante sous argon. Le mélange a été agité à 140 °C pour 32 h (jusqu'à la consommation totale du produit de départ). Après retour à température ambiante, le brut a été dilué avec de l'AcOEt. La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / Et<sub>2</sub>O (8/2 à 7/3) comme éluant pour donner la fluoropyridazine **109** (100 mg, 53%) sous forme d'un solide blanc.

#### Méthode 2 :

A une solution de la chloropyridazine **105** (500 mg, 1.67 mmol) sous agitation dans du DMF anhydre (8.7 mL), le NMe<sub>4</sub>F anhydre (311 mg, 3.34 mmol) a été additionné à température ambiante sous argon puis le mélange a été agité à cette même température pour 24 h. Le brut a été dilué avec du DCM. La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée pour donner la fluoropyridazine **109** (434 mg, 92%) sous forme d'un solide blanc, qui a été engagé directement dans la suite.

**Point de fusion :** 131-134 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.87 (3H, s), 7.16 (1H, d, *J* = 1.2 Hz), 7.20 (1H, dd, *J* = 1.2, 9.2 Hz), 7.27 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.80 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.12 (1H, dd, *J* = 6.9, 8.3 Hz).

**<sup>19</sup>F RMN** decoupled <sup>1</sup>H (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -81.39 (1F, s).

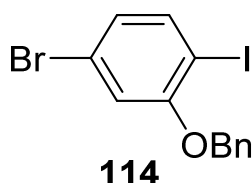
**<sup>19</sup>F RMN** coupled <sup>1</sup>H (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -81.39 (1F, d, *J* = 6.9 Hz).



<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 56.1, 114.8 (d, *J* = 33.1 Hz), 115.1, 123.9, 124.8, 125.3, 132.4, 133.6 (d, *J* = 7 Hz), 157.5, 157.7 (d, *J* = 2.6 Hz), 165.6 (d, *J* = 244.7 Hz) ;

HRMS (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>BrFN<sub>2</sub>O 282.9882; trouvée 282.9876.

### 2-(Benzyloxy)-4-bromo-1-iodobenzène (114)



A une solution de NaH (467 mg, 11.62 mmol) dans du THF (16 mL) à 0 °C sous argon, BnOH (1.01 g, 9.97 mmol) a été additionné lentement sous agitation pour 15 min. L'iodobenzène **112** (1 g, 3.32 mmol) a été ajouté et le mélange a été agité pour une nuit à température ambiante. Le brut a été traité avec une solution saturée du NH<sub>4</sub>Cl et la phase aqueuse a été extraite avec de l'AcOEt. La phase organique a été lavée avec de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane (100%) comme éluant pour donner l'iodobenzène **114** (1.06 g, 84%) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion** : 76-79 °C.

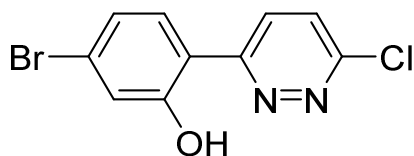
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.13 (2H, s), 6.88 (1H, dd, *J* = 1.4, 8.3 Hz), 6.99 (1H, d, *J* = 1.4 Hz), 7.34 (1H, m), 7.41 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 7.47-7.52 (2H, m), 7.63 (1H, d, *J* = 8.3 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 71.3, 85.1, 116.3, 122.9, 126.0, 127.2, 128.3, 128.8, 135.9, 140.4, 158.1.

Ce composé présente un spectre <sup>1</sup>H RMN identique à celui décrit par Kobayashi *et al.* en 2014.<sup>78</sup>

<sup>78</sup> Kobayashi, M.; Gotoh, Y.; Goto, WO2014174929A1, 2014.

### 5-Bromo-2-(6-chloropyridazin-3-yl)phénol (**116**)



### **116**

A une solution de la pyridazine **105** (500 mg, 1.67 mmol) sous agitation dans du DCM anhydre (50 mL), le  $\text{BCl}_3$  (5 mL, 5 mmol, 1M dans DCM) a été ajouté goutte à goutte à 0 °C sous argon. Le mélange réactionnel a été agité pour 3 h à température ambiante puis il a été neutralisé avec de l'eau. La phase aqueuse a été extraite avec du DCM (2 x 50 mL). Les phases organiques combinées ont été lavées avec de la saumure, séchées sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrées, concentrées pour donner le phénol **116** (470 mg, 99%) sous forme d'un solide jaune pâle, qui a été engagé directement dans la suite.

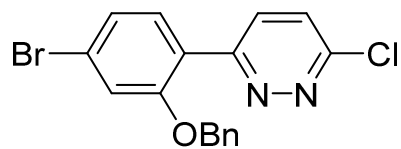
**Point de fusion** : 161-164 °C.

**$^1\text{H RMN}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.10 (1H, dd,  $J = 1.5, 8.5$  Hz), 7.29 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz), 7.52 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.67 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz), 8.01 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz).

**$^{13}\text{C RMN}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  114.9, 122.4, 122.9, 125.7, 127.1, 127.5, 130.1, 155.0, 159.5, 160.5.

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$  :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculée pour  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrClN}_2\text{O}$  284.9425 ; trouvée 284.9420.

### 3-[2-(Benzyloxy)-4-bromophényl]-6-chloropyridazine (118)



#### 118

A une solution du phénol **116** (130 mg, 0.45 mmol) sous agitation dans du DMF anhydre (1.5 mL), ont été ajoutés du  $K_2CO_3$  (126 mg, 0.9 mmol) puis du BnBr (86 mg, 0.5 mmol) à température ambiante sous argon. Le mélange réactionnel a été agité pour 10 min à cette même température, puis il a été dilué avec du DCM (15 mL). La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur  $MgSO_4$ , filtrée, concentrée pour donner la chloropyridazine **118** (167 mg, 98%) sous forme d'un solide blanc, qui a été utilisé sans purification.

**Point de fusion** : 177-180 °C.

**$^1H$  RMN** (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  5.12 (2H, s), 7.27-7.41 (8H, m), 7.89 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz), 7.98 (1H, d,  $J = 9$  Hz).

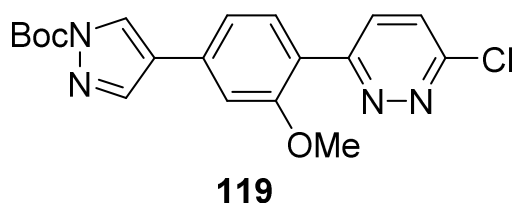
**$^{13}C$  RMN** (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  71.4, 116.6, 124.1, 125.1, 125.4, 127.2, 127.5, 128.6, 128.9, 130.4, 132.5, 135.6, 155.2, 156.9, 157.1.

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$  :  $[M+H]^+$  calculée pour  $C_{17}H_{13}BrClN_2O$  374.9894 ; trouvée 374.9883.

### Procédure générale 1 : couplage de Suzuki avec le boronate **110** (conditions de Fu)

Dans un ballon sous argon, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (2-5 mol%), P(*t*Bu)<sub>3</sub> (3-7 mol%), boronate **110** (1,1 équiv.), chloropyridazine (1 équiv.), KF (3-4 équiv.) et THF ont été introduits à température ambiante (le ballon a été évacué et remplis d'argon 5 fois avant l'addition du Pd). Le mélange a été chauffé à 80 °C pour 24 h. Après retour à température ambiante, le brut a été dilué avec de l'AcOEt puis filtré sur célite. Le filtrat a été lavé avec de l'eau, séché sur MgSO<sub>4</sub>, filtré, concentré puis purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice.

### *Tert*-butyl 4-(4-(6-chloropyridazin-3-yl)-3-méthoxyphényl)-1*H*-pyrazole-1-carboxylate (**119**)



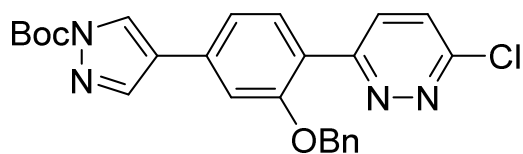
Ce composé a été synthétisé selon la **procédure générale 1** décrite précédemment à partir de la chloropyridazine **105** (100 mg, 0.33 mmol) et du boronate **110** (109 mg, 0.37 mmol) en présence du Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (6 mg, 2 mol%), de la P(*t*Bu)<sub>3</sub> (2.4 μL, 3 mol%) et du KF (58 mg, 0.99 mmol) dans du THF (1 mL). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / Et<sub>2</sub>O (8/2 à 1/9) comme éluant pour donner la chloropyridazine **119** (0-20%, *cette réaction n'est pas reproductible*) sous forme d'un solide blanc.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.68 (9H, s), 3.93 (3H, s), 7.12 (1H, s), 7.28 (1H, d, *J* = 8 Hz), 7.48 (1H, d, *J* = 8 Hz), 8.01-8.06 (3H, m), 8.38 (1H, s).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 28.0, 55.8, 86.0, 108.8, 119.1, 123.7, 124.9, 127.0, 127.1, 130.5, 131.8, 134.4, 141.8, 147.5, 154.9, 157.4, 157.6.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> 387.1219 ; trouvée 387,1224.

**Tert-butyl-4-(3-(benzyloxy)-4-(6-chloropyridazin-3-yl)phényl)-1H-pyrazole-1-carboxylate (121)**



**121**

Ce composé a été synthétisé selon la **procédure générale 1** décrite précédemment à partir de la chloropyridazine **118** (100 mg, 0.26 mmol) et du boronate **110** (86 mg, 0.29 mmol) en présence du Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (12 mg, 5 mol%), de la P(tBu)<sub>3</sub> (4.5 µL, 7 mol%) et du KF (62 mg, 1.06 mmol) dans du THF (1 mL). Le brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant le pentane / Et<sub>2</sub>O (10/0 à 3/7) comme éluant pour donner la chloropyridazine **121** (31 mg, 25%) sous forme d'un solide blanc.

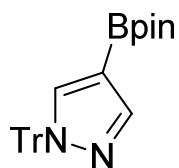
**Point de fusion :** 151-154 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.59 (9H, s), 5.09 (2H, s), 7.11 (1H, s), 7.15-7.32 (7H, m), 7.90 (1H, s), 7.94-7.97 (2H, m), 8.25 (1H, s).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 28.1, 71.2, 86.1, 110.6, 119.6, 124.2, 124.9, 127.1, 127.2, 127.5, 128.5, 128.9, 130.5, 132.1, 134.5, 136.1, 141.9, 147.6, 155.1, 157.0, 157.5.

**HRMS** (ESI-TOF) m/z : [M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> 463.1537 ; trouvée 463.1545.

#### 4-(4,4,5,5-Tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1-trityl-1H-pyrazole (125)



#### 125

A une solution du pyrazole **124** (2 g, 5.14 mmol) et du bis(pinacolato)diborane (1.44 g, 5.65 mmol) dans du DMF anhydre (14 mL), ont été additionnés du PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (420 mg, 0.51 mmol) et de l'acétate de potassium (1.51 g, 15.42 mmol) à température ambiante sous argon. Le mélange résultant a été chauffé à 80 °C pour 16 h. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel a été dilué avec du DCM (50 mL). La phase organique a été lavée avec de l'eau, de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / Et<sub>2</sub>O (10/0 à 8/2) comme éluant pour donner le boronate **125** (1.8 g, 75%) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion** : 190-193 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.33 (12H, s), 7.13-7.20 (6H, m), 7.28-7.34 (9H, m), 7.79 (1H, s), 7.98 (1H, s).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 24.9, 78.8, 83.4, 127.7, 127.8, 130.2, 138.8, 143.2, 145.9.

**HRMS** (ESI-TOF) m/z : [M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>28</sub>H<sub>29</sub>BN<sub>2</sub>NaO<sub>2</sub> 459.2214; trouvée 459.2210.

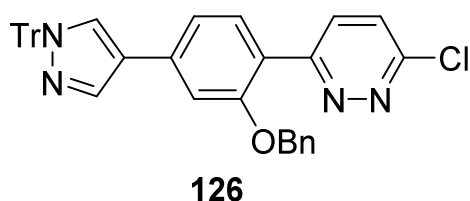
Ce composé présente un spectre <sup>1</sup>H RMN identique à celui décrit par Kershaw Cook *et al.* en 2016.<sup>79</sup>

<sup>79</sup> Kershaw Cook, L. J.; Kearsy, R.; Lamb, J. V.; Pace, E. J.; Gould, J. A., *Tetrahedron Lett.*, **2016**, 57, 895-898.

## Procédure générale 2 : couplage de Suzuki-Miyaura avec le boronate tritylé 125

A une solution de la chloropyridazine (1 équiv.), du boronate **125** (1.5 équiv.) et du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 équiv.) dans un mélange PhMe / EtOH / H<sub>2</sub>O (1 / 0.1 / 0.1), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (10 à 20 mol%) a été additionné à température ambiante sous argon (le ballon a été évacué et remplis d'argon 5 fois avant l'addition du Pd). Le mélange résultant a été agité pour 5 min à cette même température puis à 110 °C pour 18 h. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel a été dilué avec de l'AcOEt (25 mL). La phase organique a été lavée avec de l'eau, de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice.

### 3-(2-(Benzyloxy)-4-(1-trityl-1H-pyrazol-4-yl)phényl)-6-chloropyridazine (**126**)



Ce composé a été synthétisé selon la **procédure générale 2** décrite précédemment à partir de la chloropyridazine **118** (100 mg, 0.27 mmol) et du boronate **125** (174 mg, 0.40 mmol) en présence du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (117 mg, 0.53 mmol), du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (31 mg, 0.027 mmol) dans un mélange PhMe (3 mL) / EtOH (0.3 mL) / H<sub>2</sub>O (0.3 mL). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / Et<sub>2</sub>O (8/2 à 5/5) comme éluant pour donner la chloropyridazine **126** (50 mg, 30%) sous forme d'un solide blanc.

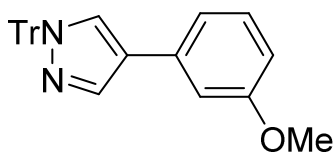
**Point de fusion** : 216-219 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.07 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 7.05 (1H, d, *J* = 0.9 Hz, CH), 7.07-7.20 (8H, m), 7.21-7.35 (14H, m), 7.60 (1H, s, CH), 7.88 (1H, s, CH), 7.90 (1H, d, *J* = 8 Hz, CH), 7.96 (1H, d, *J* = 9 Hz, CH).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 71.1, 79.1, 110.2, 119.1, 121.0, 123.0, 127.0, 127.5, 127.9, 128.0, 128.3, 128.8, 129.6, 130.2, 130.5, 131.7, 136.3, 137.4, 143.0, 154.7, 156.9, 157.6.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>39</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>4</sub>O 605.2103; trouvée 605.2108.

#### 4-(3-Méthoxyphényl)-1-trityl-1H-pyrazole (127)



**127**

Ce composé a été synthétisé selon la **procédure générale 2** décrite précédemment à partir du *m*-bromoanisole **87** (80 mg, 0.43 mmol) et du boronate **125** (281 mg, 0.64 mmol) en présence du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (91 mg, 0.86 mmol), du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (100 mg, 0.086 mmol) dans un mélange PhMe (3 mL) / EtOH (0.3 mL) / H<sub>2</sub>O (0.3 mL). Le brut a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant le pentane / Et<sub>2</sub>O (10/0 à 8/2) comme éluant pour donner le composé **127** (126 mg, 70%) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion** : 120-123 °C.

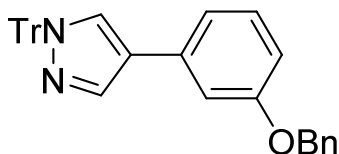
**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.82 (3H, s), 6.75 (1H, ddd, *J* = 1.0, 2.6, 8.4 Hz), 7.96 (1H, dd, *J* = 1.4, 2.6 Hz), 7.03 (1H, ddd, *J* = 1, 1.4, 7.7 Hz), 7.20-7.25 (7H, m), 7.30-7.35 (9H, m), 7.61 (1H, d, *J* = 0.8 Hz), 7.93 (1H, d, *J* = 0.8 Hz).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 55.3, 78.9, 111.4, 111.6, 118.2, 121.5, 127.8, 127.9, 129.3, 129.8, 130.2, 134.0, 137.3, 143.1, 160.0.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>29</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>NaO 439,1786 ; trouvée 439,1768.



#### 4-(3-(Benzyloxy)phényl)-1-trityl-1H-pyrazole (129)



**129**

Ce composé a été synthétisé selon la **procédure générale 2** décrite précédemment à partir du composé **128** (80 mg, 0.304 mmol) et du boronate **125** (200 mg, 0.45 mmol) en présence du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (65 mg, 0.61 mmol), du  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (70 mg, 10 mol%) dans un mélange PhMe (3 mL) / EtOH (0.3 mL) /  $\text{H}_2\text{O}$  (0.3 mL). Le brut a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant le pentane /  $\text{Et}_2\text{O}$  (10/0 à 8/2) comme éluant pour donner le pyrazole **129** (106 mg, 71%) sous forme d'un solide blanc.

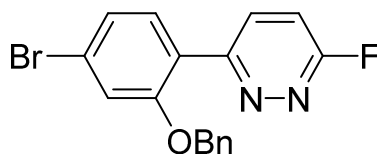
**Point de fusion:** 155-158 °C.

**$^1\text{H}$  RMN** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.01 (2H, s), 6.81 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.02-7.07 (2H, m), 7.16-7.22 (6H, m), 7.25 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz), 7.28-7.46 (14H, m), 7.60 (1H, s), 7.92 (1H, s).

**$^{13}\text{C}$  RMN** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  70.2, 79.0, 112.4, 112.8, 118.5, 121.6, 127.7, 127.9, 128.1, 128.7, 129.4, 130.0, 130.3, 134.2, 137.1, 137.4, 143.3, 159.3.

**HRMS** (ESI-TOF) m/z :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculée pour  $\text{C}_{35}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{NaO}$  515.2099 ; trouvée 515.2092.

### 3-[2-(Benzyloxy)-4-bromophényl]-6-fluoropyridazine (132)



**132**

A une solution de la chloropyridazine **118** (750 mg, 1.99 mmol) sous agitation dans du DMF anhydre (12 mL), NMe<sub>4</sub>F anhydre (375 mg, 3.98 mmol) a été additionné à température ambiante sous argon. Le mélange résultant a été agité à cette même température pour 24 h avant d'être dilué avec du DCM (70 mL). La phase organique a été lavée avec de l'eau, de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis concentrée pour donner le composé **132** (700 mg, 98%) sous forme d'un solide blanc, qui a été utilisé sans purification.

**Point de fusion** : 167-170 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.12 (2H, s), 7.13 (1H, dd, *J* = 1.5, 9.2 Hz), 7.27-7.40 (7H, m), 7.8 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.12 (1H, dd, *J* = 7.5, 8.2 Hz).

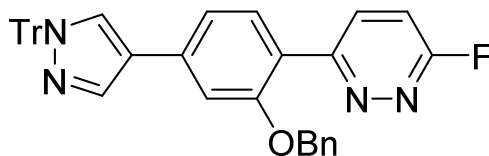
**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 71.3, 114.7 (d, *J* = 33 Hz), 116.5, 124.2, 125.1, 125.2, 127.5, 128.6, 128.9, 132.5, 133.7 (d, *J* = 7 Hz), 135.6, 156.7, 157.6 (d, *J* = 2.7 Hz), 165.7 (d, *J* = 245 Hz) ;

**<sup>19</sup>F RMN** decoupled <sup>1</sup>H (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -81.27 (1F, s).

**<sup>19</sup>F RMN** coupled <sup>1</sup>H (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -81.27 (1F, d, *J* = 7.5 Hz).

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>BrFN<sub>2</sub>O 359.0190 ; trouvée 359.0192.

### 3-[2-(Benzyloxy)-4-(1-trityl-1H-pyrazol-4-yl)phényl]-6-fluoropyridazine (133)



**133**

Ce composé a été synthétisé selon la **procédure générale 2** décrite précédemment à partir de la fluoropyridazine **132** (200 mg, 0.55 mmol) et du boronate **125** (364 mg, 0.83 mmol) en présence du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (117 mg, 1.1 mmol), du  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (129 mg, 0.11 mmol) dans un mélange PhMe (5 ml) / EtOH (0.5 ml) /  $\text{H}_2\text{O}$  (0.5 ml). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane /  $\text{Et}_2\text{O}$  (8/2 à 5/5) comme éluant pour donner la fluoropyridazine **133** (172 mg, 53%) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion** : 203-206 °C.

**$^1\text{H}$  RMN** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.19 (2H, s), 7.13 (1H, dd,  $J = 1.5, 9.2$  Hz), 7.18 (7H, d,  $J = 1.5$  Hz), 7.22 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz), 7.24-7.3 (6H, m), 7.32-7.43 (14H, m), 7.73 (1H, s), 7.99 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 8.00 (1H, s), 8.21 (1H, dd,  $J = 7.5, 8.2$  Hz).

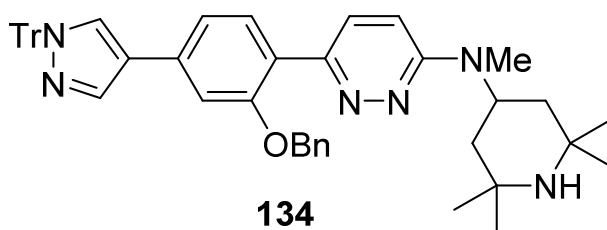
**$^{13}\text{C}$  RMN** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  71.1, 79.1, 110.2, 114.5 (d,  $J = 33$  Hz), 119.1, 121.0, 123.1, 127.4, 127.9, 128.0, 128.3, 128.7, 129.5, 130.2, 131.8, 133.6 (d,  $J = 6.8$  Hz), 136.1, 132.3, 137.5, 143.0, 156.6, 158.1 (d,  $J = 2.5$  Hz), 165 (d,  $J = 244$  Hz).

**$^{19}\text{F}$  RMN decoupled  $^1\text{H}$**  (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -81.99.

**$^{19}\text{F}$  RMN coupled  $^1\text{H}$**  (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -81.99 (dd,  $J = 1.4, 7.5$  Hz).

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$  :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculée pour  $\text{C}_{39}\text{H}_{29}\text{FN}_4\text{O}$  589.2398 ; trouvée 589.2395.

**6-[2-(Benzyloxy)-4-(1-trityl-1H-pyrazol-4-yl)phényl]-N-méthyl-N-(2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-4-yl)pyridazin-3-amine (134)**



A une solution de la fluoropyridazine **133** (230 mg, 0.39 mmol) sous agitation dans du butan-1-ol (4 mL), la pipéridine **20** (133 mg, 0.78 mmol) a été additionnée à température ambiante sous argon. Le mélange réactionnel a été chauffé à 120 °C pour 48 h. Après retour à température ambiante, le solvant a été éliminé par concentration puis le résidu a été dilué avec du DCM (50 mL). La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée et purifiée par une chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le DCM / MeOH (10/0 à 8/2) comme éluant pour donner le composé **134** (160 mg, 56%) sous forme d'un solide jaune.

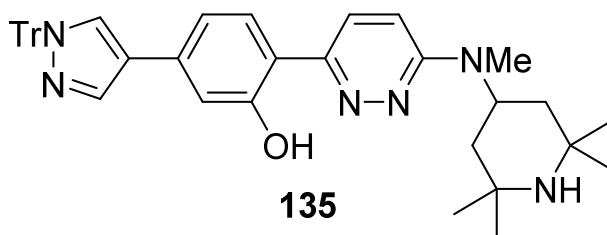
**Point de fusion** : 105-108 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.18 (6H, s), 1.35 (6H, s), 1.38 (2H, m), 1.70 (2H, dd, *J* = 2.1, 12 Hz), 2.96 (3H, s), 5.13 (2H, s), 5.15 (1H, m), 6.72 (1H, d, *J* = 9.7 Hz), 7.07 (1H, d, *J* = 1.3 Hz), 7.14 (1H, dd, *J* = 1.3, 8 Hz), 7.17-7.25 (6H, m), 7.28-7.4 (14H, m), 7.63 (1H, s), 7.84 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 7.92 (1H, s), 7.98 (1H, d, *J* = 8 Hz).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 28.8, 29.2, 35.3, 41.9, 47.5, 51.5, 71.0, 79.0, 110.4, 119.0, 121.4, 125.3, 127.3, 127.8, 127.9, 128.6, 129.2, 129.4, 130.2, 130.9, 134.1, 137.0, 137.4, 143.1, 149.1, 156.3, 158.2.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>49</sub>H<sub>51</sub>N<sub>6</sub>O 739.4119 ; trouvée 739.4138.

**2-[6-[Méthyl(2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-4-yl)amino]pyridazin-3-yl]-5-(1-trityl-1H-pyrazol-4-yl)phénol (**135**)**



A une solution de la pyridazinamine **134** (110 mg, 0.15 mmol) sous agitation dans du MeOH (7 mL), une quantité catalytique du 10% palladium sur charbon a été additionnée sous H<sub>2</sub>. Le mélange a été agité à température ambiante pour 48 h puis il a été filtré sur célite. Le filtrat a été concentré puis purifié par une chromatographie flash sur une colonne de gel de silice en utilisant le DCM / MeOH (10/0 à 8/2) comme éluant pour donner le phénol **135** (90 mg, 94%) sous forme d'un solide jaune.

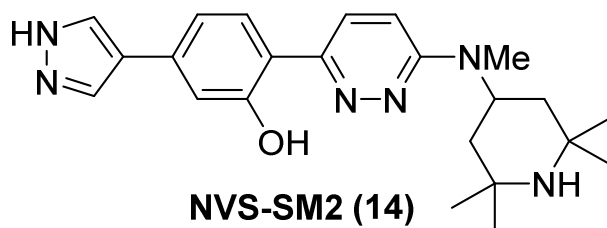
**Point de fusion** : 132-135 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.18 (6H, s), 1.35 (6H, s), 1.40 (2H, t, *J* = 12.3 Hz), 1.69 (2H, dd, *J* = 2.0, 12 Hz), 3.00 (3H, s), 4.88 (1H, m), 6.98 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 7.01 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.11 (1H, s), 7.16-7.23 (6H, m), 7.29-7.37 (9H, m), 7.52 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.66 (1H, s), 7.92 (1H, s), 7.79 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 7.98 (1H, s).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 28.9, 29.4, 35.3, 42.0, 48.4, 51.5, 79.1, 113.9, 114.8, 116.0, 116.8, 121.2, 124.5, 125.4, 128.0, 129.7, 130.3, 134.8, 137.5, 143.2, 151.6, 157.9, 159.4.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>42</sub>H<sub>45</sub>N<sub>6</sub>O 649.3649 ; trouvée 649.3634.

**2-[6-[Méthyl(2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-4-yl)amino]pyridazin-3-yl]-5-(1H-pyrazol-4-yl)phénol (14)**



A une solution du phénol **135** (80 mg, 0.12 mmol) sous agitation dans THF (2 ml) / MeOH (2 ml), HCl (6M) (2 mL) a été ajouté à température ambiante. Le mélange a été agité à cette même température pour 3h puis les solvants ont été éliminés par concentration. Le produit jaune obtenu sous forme sel a été dissous dans du DCM / MeOH (50 / 50) puis neutralisé par l'addition du NaHCO<sub>3</sub> solide. Le mélange a été filtré sur célite puis le filtrat a été concentré et purifié par une chromatographie flash sur gel de silice en utilisant le DCM / MeOH (10/0 à 8/2) comme éluant pour donner le NVS-SM2 (**14**) (48 mg, quant.) sous forme d'un solide jaune.

**Point de fusion** : 146-149 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, MeOD) δ 1.22 (6H, s), 1.35 (6H, s), 1.48-1.65 (4H, m), 2.87 (3H, s), 4.98 (1H, m), 7.04-7.17 (3H, m), 7.59 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.89 (1H, d, *J* = 9.4 Hz), 7.97 (2H, s).

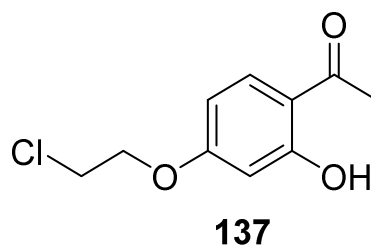
**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, MeOD) δ 27.5, 29.8, 33.6, 41.3, 54, 115, 116.3, 117.2, 117.6, 123, 126.4, 127.3, 136.2, 152.8, 159.2, 159.9.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>N<sub>6</sub>O 407.2554 ; trouvée 407.2550.

Ce composé est décrit par Cheung *et al.* dans un brevet en 2014, mais avec une autre méthode de synthèse.<sup>11</sup>

## 5.2. Procédures pour le chapitre 3.2

### 1-(4-(2-Chloroéthoxy)-2-hydroxyphényl)éthan-1-one (137)



Ce composé a été préparé par deux méthodes :

#### Méthode A (Réaction de Mitsunobu) :

2,4-dihydroxyacétophénone **136** (16 g, 105.16 mmol), 2-chloroéthanol (10.6 ml, 158 mmol) et PPh<sub>3</sub> (41 g, 158 mmol) ont été dissouts dans du THF (256 mL). A température ambiante, une solution de DIAD (31.2 mL, 158 mmol) dans du THF (102 mL) a été additionnée lentement. Le mélange réactionnel a été agité à reflux pour 16 h puis il a été refroidi et concentré pour donner une huile jaunâtre. Le résidu a été agité avec une solution NaOH (2M) (150 mL). Le précipité formé a été récupéré par filtration puis il a été agité dans de l'AcOEt. Le solide restant a été filtré à nouveau sur célite, lavé avec de l'AcOEt puis agité dans un mélange HCl (4M) avec de l'AcOEt. La phase organique a été récupérée, lavée avec de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / DCM (10/0 à 8/2) comme éluant pour donner l'acétophénone **137** (3.9 g, 17%) sous forme de cristaux blancs rosâtres.

#### Méthode B :

2,4-dihydroxyacétophénone **136** (300 mg, 1.97 mmol), 1-bromo-2-chloroéthane (0.21 mL, 2.56 mmol) et K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (409 mg, 2.96 mmol) ont été dissouts dans de l'acétone (20 mL). Le mélange a été agité à reflux pour 16h. Après retour à température ambiante, le sel a été éliminé par filtration et le filtrat a été concentré. Le brut obtenu a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / DCM (7/3) comme éluant pour donner l'acétophénone **137** (100 mg, 24%) sous forme de cristaux blancs rosâtres.

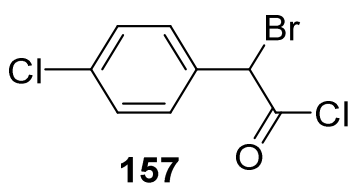
**Point de fusion** : 101-104 °C.

$^1\text{H}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.55 (3H, s), 3.81 (2H, t,  $J = 5.8$  Hz), 4.25 (2H, t,  $J = 5.8$  Hz), 6.40 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz), 6.47 (1H, dd,  $J = 1.9, 8.9$  Hz), 7.64 (1H, d,  $J = 8.9$  Hz), 12.70 (1H, s).

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  26.3, 41.6, 68.2, 101.7, 107.9, 114.5, 132.6, 164.6, 165.3, 202.8.

Ce composé présente un spectre  $^1\text{H}$  RMN identique à celui décrit par Diedrichs *et al.* dans un brevet en 2005.<sup>57</sup>

### Chlorure 2-bromo-2-(4-chlorophényl)acétyle (**157**)



A une solution de l'acide **156** (1g, 5.86 mmol) dans du  $\text{CCl}_4$  (0.6 mL), le chlorure de thionyle (1.7 mL, 23.5 mmol) a été additionné. Le mélange a été agité à 65 °C pour 2 h puis il a été dilué par l'addition de 3 mL du  $\text{CCl}_4$  suivie par l'addition du NBS (2.1 g, 11.72 mmol) et d'une goutte de HBr (48%). Le mélange a été réagité à 85 °C pour 2 h. Après retour à température ambiante, le mélange a été dilué avec de l'hexane (30 mL). Le solide formé a été éliminé par une filtration et le filtrat a été concentré plusieurs fois pour donner le chlorure d'acétyle **157** (1.16 g, 73%) sous forme d'une huile orange.

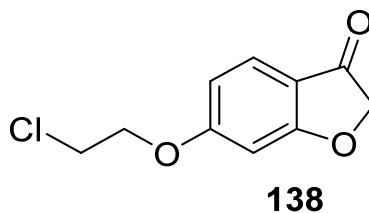
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.63 (1H, s), 7.38-7.46 (4H, m).

Ce composé présente un spectre  $^1\text{H}$  RMN identique à celui décrit par Li *et al.* en 2015.<sup>80</sup>

<sup>80</sup> Li, D.; Yang, T.; Su, H.; Yu, W., *Adv. Synth. Catal.*, **2015**, 357, 2529-2539.



### 6-(2-Chloroéthoxy)benzofuran-3(2H)-one (**138**)



A une solution de la benzofuranone **159** (12 g, 79.93 mmol) et du  $K_2CO_3$  (11 g, 79.93 mmol) dans de l'MeCN sous argon, le 1-bromo-2-chloroéthane (20 mL, 239.80 mmol) a été additionné à température ambiante. Le mélange a été chauffé à reflux pour 16 h. Après refroidir à température ambiante, le solide marron a été éliminé par une filtration sous vide (lavage avec de l'acétone). Le filtrat a été concentré puis dilué dans de l'AcOEt. La phase organique a été lavée avec de l'eau et avec de la saumure puis séchée sur  $MgSO_4$ , filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / AcOEt (10/0 à 8/2) comme éluant pour donner la benzofuranone **138** (13 g, 82%) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion** : 112-115 °C.

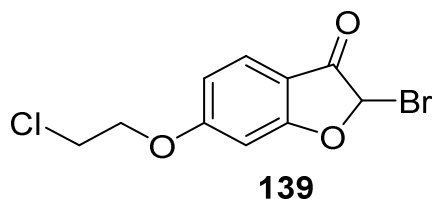
**$^1H$  RMN** (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  3.84 (2H, t,  $J = 5.8$  Hz), 4.29 (2H, t,  $J = 5.8$  Hz), 4.62 (2H, s), 6.55 (1H, d,  $J = 2$  Hz), 6.67 (1H, dd,  $J = 2, 8.6$  Hz), 7.58 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz).

**$^{13}C$  RMN** (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  41.4, 68.6, 75.7, 97.3, 111.8, 115.1, 125.4, 166.7, 176.4, 197.6 ;

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$  :  $[M+H]^+$  calculée pour  $C_{10}H_{10}ClO_3$  213.0318 ; trouvée 213.0303.

Ce composé est décrit Diedrichs *et al.* dans un brevet en 2005, mais avec une autre méthode de synthèse.<sup>56</sup>

### 2-Bromo-6-(2-chloroéthoxy)benzofuran-3(2H)-one (**139**)



A une solution de la benzofuranone **138** (12 g, 61.14 mmol) dans du THF (39 mL) à -10 °C sous argon, une solution de Bu<sub>4</sub>NBr<sub>3</sub> (27.4 g, 61.14 mmol) dans 120 mL du THF a été additionnée lentement. Le mélange a été agité à -10 °C pour 1 h 30 min puis à température ambiante pour 1h. Après concentration, le brut a été dilué avec du DCM. La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / DCM (8/2 à 6/4) comme éluant pour donner la benzofuranone **139** (14.6 g, 82%) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion** : 102-105 °C.

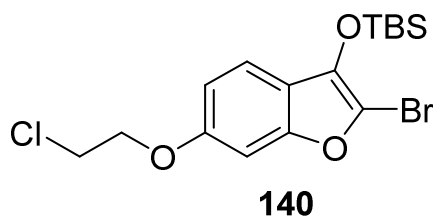
**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.85 (2H, t, *J* = 5.6 Hz), 4.31 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 6.48 (1H, s), 5.91 (1H, d, *J* = 2Hz), 6.78 (1H, dd, *J* = 2, 8.7 Hz), 7.67 (1H, d, *J* = 8.7 Hz).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 41.3, 68.8, 76.8, 98.2, 111.5, 113.2, 126.9, 167.4, 172.8, 192.4.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>BrClO<sub>3</sub> 290.9424; trouvée 290.9408.

Ce composé est décrit par Diedrichs *et al.* dans un brevet en 2005, mais avec une autre méthode de synthèse.<sup>56</sup>

**[(2-Bromo-6-(2-chloroéthoxy)benzofuran-3-yl)oxy](*tert*-butyl)diméthylsilane (140)**

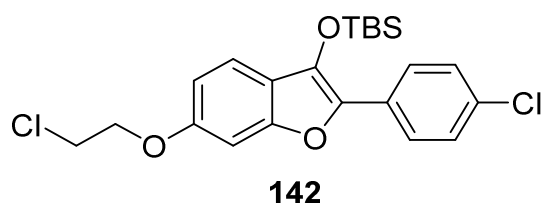


A une solution de la benzofuranone **139** (16.8 g, 57.62 mmol) et de la triéthylamine (8.6 mL, 63.39 mmol) dans un mélange Et<sub>2</sub>O (256 mL) / DCM (41 mL) à 0 °C sous argon, le triflate du *tert*butyldiméthylsilyle (14.6 mL, 63.39 mmol) a été additionné lentement. Le mélange a été agité à 0 °C pour 10 min puis à température ambiante pour 1 h. Le brut obtenu après concentration a été dissous dans l'Et<sub>2</sub>O. La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / DCM (10/0 à 9/1) comme éluant pour donner l'adduit **140** (21.6 g, 93%) sous forme d'une huile incolore.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.24 (6H, s), 1.07 (9H, s), 3.83 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 4.24 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 6.88 (1H, dd, *J* = 2.3, 8.5 Hz), 6.90 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.32 (1H, d, *J* = 8.5 Hz).

Ce composé est décrit par Diedrichs *et al.* dans un brevet en 2005.<sup>57</sup>

**Tert-butyl((6-(2-chloroéthoxy)-2-(4-chlorophényl)benzofuran-3-yl)oxy)diméthylsilane  
(142)**



A une solution de l'adduit **139** (4.85 g, 11.95 mmol) et de l'acide **141** (2.2 g, 14.34 mmol) dans du PhMe (88 mL) sous argon, une solution du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.8 g, 26.3 mmol) dans de l'eau (12 mL) puis du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (691 mg, 0.6 mmol, 5 mol%) ont été additionnés successivement). Le mélange réactionnel a été agité à 100 °C pour 3 h. Après retour à température ambiante, la phase aqueuse a été extraite avec de l'Et<sub>2</sub>O. La phase organique a été lavée avec une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl, de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / DCM (10/0 à 9/1) comme éluant pour donner l'adduit **142** (4.15 g, 80%) sous forme d'une huile incolore.

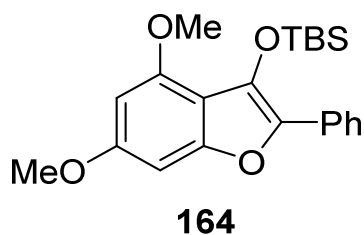
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.13 (6H, s), 1.08 (9H, s), 3.85 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 4.28 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 6.88 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.5 Hz), 6.96 (1H, d, 2.1 Hz), 7.36-7.4 (3H, m), 7.83 (1H, d, *J* = 8.7 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -3.7, 18.3, 25.9, 42.0, 68.8, 97.4, 112.3, 119.6, 126.1, 128.7, 129.3, 132.5, 135.2, 139.7, 153.3, 157.1.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Si 437.1107 ; trouvée 437.1113.

Ce composé est décrit par Diedrichs *et al.* dans un brevet en 2005.<sup>57</sup>

**Tert-butyl((4,6-diméthoxy-2-phénylbenzofuran-3-yl)oxy)diméthylsilane (164)**



A une solution du composé **163** (2 g, 7.4 mmol) dans l'MeCN (12 mL) sous argon, du NaI (1.33 g, 8.88 mmol), de la triéthylamine (1.2 mL, 8.88 mmol) puis du TBSCl (1.34 g, 8.88 mmol) ont été additionnés. Le mélange a été agité à température ambiante pour 4 h puis il été traité avec de l'eau. La phase aqueuse a été extraite avec du DCM. La phase organique a été séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane (100%) comme éluant pour donner le composé **164** (1.42 g, 50 %) sous forme d'une huile incolore.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.01 (6H, s), 1.04 (9H, s), 3.84 (3H, s), 3.87 (3H, s), 6.26(1H, d, *J* = 1.6 Hz), 6.57 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 7.19-7.25 (1H, m), 7.35-7.41 (2H, m), 7.81-7.86 (2H, m).

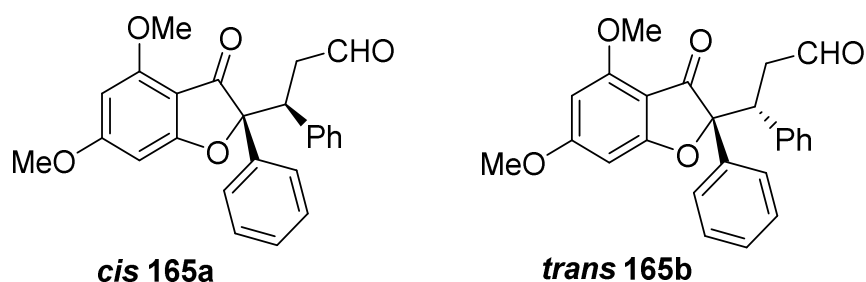
<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -4.4, 18.3, 25.8, 54.9, 55.8, 88.4, 94.2, 109.3, 125.2, 126.7, 128.3, 130.9, 134.6, 139.3, 153.9, 154.4, 159.4.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>Si 385,1835 ; trouvée 385.1821.

**Procédure générale 3 pour la réaction de Mukaiyama-Michael :**

Dans un tricol, une solution de la benzofuranone silylée (1 équiv.) avec le *trans*-cinnamaldéhyde (2 équiv.) dans du *t*BuOH ou de l'*i*PrOH a été chauffée à 50 °C pour 10 min sous argon. A cette même température, une solution du TBAF (1M dans THF, 1.5 équiv.) a été additionnée lentement (le ballon a été évacué et remplis d'argon 5 fois avant l'addition du TBAF). Après consommation totale du produit départ (~ 20 min), le mélange a été concentré et le brut a été dilué dans du DCM. La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée pour donner une huile jaune. Cette dernière a été purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice.

(±) 3-(4,6-Diméthoxy-3-oxo-2-phényl-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl)-3-phénylpropanal (**165a** et **165b**)



Ces deux diastéréoisomères (**165a** et **165b**) ont été synthétisés selon la **procédure générale 3** décrite précédemment à partir du composé **164** (300 mg, 0.78 mmol) avec le *trans*-cinnamaldéhyde (0.2 mL, 1.56 mmol) en présence d'une solution du TBAF (1.17 mL, 1.17 mmol, 1M dans THF) dans du *t*BuOH (13 mL). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / Et<sub>2</sub>O (10/0 à 6/4) comme éluant pour donner les deux aldéhydes **165a** et **165b** (224 mg, 71% ; **165a** = 42% et **165b** = 29%) sous forme de solides jaunâtres. *Les rendements des deux aldéhydes cis et trans ont été estimés par RMN.*

**Point de fusion du mélange** : 119-122 °C.

**Aldéhyde *cis* (165a) :**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.60-2.68 (1H, m), 2.96-3.09 (1H, m), 3.69 (3H, s), 3.85 (3H, s), 4.25 (1H, dd, *J* = 4.1, 10.8 Hz), 5.79 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 6.22 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 7.07-7.16 (5H, m), 7.29-7.38 (3H, m), 7.74 (1H, dd, *J* = 1.1, 7.4 Hz), 9.38 (1H, m).

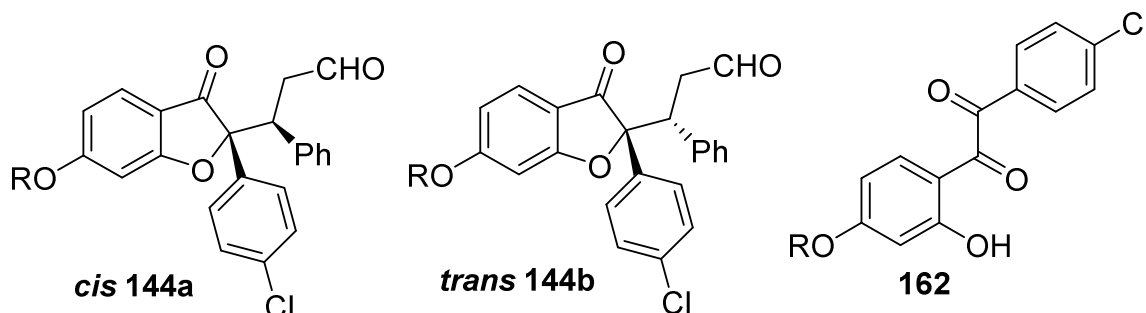
**Aldéhyde *trans* (165b) :**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.60-2.68 (1H, m), 2.96-3.09 (1H, m), 3.87 (3H, s), 3.90 (3H, s), 4.18 (1H, dd, *J* = 3.5, 10.9 Hz), 6.00 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 6.33 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 7.07-7.16 (5H, m), 7.29-7.38 (3H, m), 7.47 (1H, dd, *J* = 1.3, 8 Hz), 9.48 (1H, m).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) **165a + 165b** δ 44.1, 44.4, 47.2, 48.0, 56.0, 56.0, 56.2, 88.6, 88.9, 93.0, 93.5, 93.9, 94.3, 104.1, 104.5, 125.2, 125.3, 127.2, 127.5, 127.9, 128.1, 128.3, 128.4, 128.8, 129.6, 129.7, 136.5, 136.7, 136.8, 137.7, 159.2, 159.4, 169.9, 170.4, 174.3, 174.7, 194.8, 195.7, 200.1, 200.3.

HRMS (ESI-TOF) m/z : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>O<sub>5</sub> 403,1545 ; trouvée 403.1533.

(±) 3-(6-(2-Chloroéthoxy)-2-(4-chlorophényl)-3-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl)-3-phénylpropanal (**144a** et **144b**) et 1-(4-(2-chloroéthoxy)-2-hydroxyphényl)-2-(4-chlorophényl)éthane-1,2-dione (**162**)



Ces deux diastéréoisomères (**144a** et **144b**) ont été synthétisés selon la **procédure générale 3** décrite précédemment à partir du composé **142** (8 g, 18.29 mmol) et du *trans*-cinnamaldéhyde (4.6 mL, 36.58 mmol) en présence d'une solution du TBAF (28 mL, 27.43 mmol, 1M dans du THF) dans de l'*i*PrOH (320 mL). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant l'heptane / DCM (10/0 à 2/8) comme éluant pour donner l'aldéhyde *cis* (**144a**) (2.5 g, 30%) et l'aldéhyde *trans* (**144b**) (1.5 g, 18%) sous forme de solides jaunâtres.

**Aldéhyde *cis* (144a) :**

**Point de fusion :** 64-67 °C.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.64 (1H, ddd, *J* = 1.4, 17.4 Hz), 3.17 (1H, ddd, *J* = 2.1, 10.8, 17.4 Hz), 3.83 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 4.20 (1H, dd, *J* = 4, 10.7 Hz), 4.27 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 6.46 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.7 Hz), 6.6 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 7.06-7.14 (3H, m), 7.22 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.24-7.29 (3H, m), 7.37 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.71 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 9.42 (1H, dd, *J* = 1.1, 2.1 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 41.4, 44.1, 47.3, 68.6, 93.7, 96.8, 111.7, 114.1, 126.2, 126.7, 127.8, 128.4, 129.1, 129.6, 134.8, 136.3, 166.8, 173.5, 197.0, 199.7.

**Aldéhyde *trans* (144b) :**

**Point de fusion :** 64-67 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.55 (1H, ddd, *J* = 1, 3.8, 16.9 Hz), 2.99 (1H, ddd, *J* = 2.6, 10.9, 16.9 Hz), 3.87 (2H, t, *J* = 5.6 Hz), 4.13 (1H, dd, *J* = 3.8, 10.9 Hz), 4.34 (2H, td, *J* = 0.9, 5.6 Hz), 6.69 (1H, dd, *J* = 2, 8.5 Hz), 6.72 (1H, d, *J* = 2 Hz), 7.11-7.17 (7H, m), 7.41 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.56 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 9.47 (1H, dd, *J* = 0.9, 2.4 Hz).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 41.4, 44.0, 68.70, 94.04, 97.08, 112.53, 114.3, 126.4, 126.7, 127.6, 128.3, 128.4, 129.5, 134.2, 134.7, 137.2, 167.4, 173.9, 198.0, 200.0.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 455.0811 ; trouvée 455.0808.

L'aldéhyde *cis* **144a** est décrit par Diedrichs *et al.* dans un brevet en 2005, mais avec une autre méthode de synthèse.<sup>57</sup>

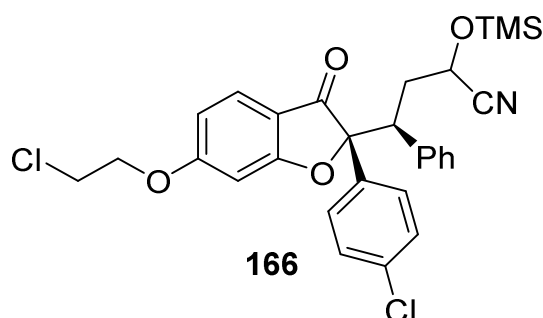
Produit secondaire **162**

**<sup>1</sup>H RMN** (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.82 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 4.28 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 6.46 (1H, dd, *J* = 2.5, 8.9 Hz), 6.50 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 7.38 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 7.49 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.92 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 11.80 (1H, s).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 41.3, 68.3, 102.0, 109.1, 111.4, 129.5, 131.3, 131.4, 134.1, 141.8, 166.2, 166.6, 190.6, 196.2.



(±) (4S)-4-((R)-6-(2-Chloroéthoxy)-2-(4-chlorophényl)-3-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl)-4-phényl-2-((triméthylsilyl)oxy)butanenitrile (**166**)



A une solution de l'aldéhyde *cis* (**144a**) (300 mg, 0.66 mmol) dans du MeCN anhydre (3.4 mL) sous argon, TMSCN (0.26 mL, 1.98 mmol) a été additionné lentement suivie par l'ajout d'une quantité catalytique du ZnI<sub>2</sub> (2.1 mg, 1 mol%). Le mélange a été agité à température ambiante pour 1 h puis il a été concentré. Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / DCM (8/2 à 5/5) comme éluant pour donner la cyanhydrine **166** (213 mg, 62%, mélange de deux diastéréoisomères) sous forme d'un solide blanc.

**Diastéréoisomère 1 :**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.01 (9H, s), 2.05 (1H, m), 2.36 (1H, m), 3.79 (1H, dd, *J* = 3.1, 12.2 Hz), 3.84 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 3.88 (1H, dd, *J* = 2.5, 11.3 Hz), 4.28 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 6.44 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.7 Hz), 6.61 (1H, d, *J* = 2 Hz), 7.08-7.16 (3H, m), 7.18-7.22 (3H, m), 7.38 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.64 (2H, d, *J* = 8.7 Hz).

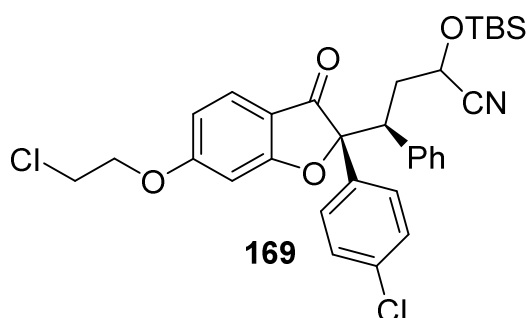
<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -0.4, 29.9, 36.1, 41.4, 48.2, 58.3, 68.6, 94.2, 96.8, 111.7, 114.0, 120.1, 126.2, 126.6, 128.1, 128.5, 128.8, 129.2, 130.0, 134.7, 134.7, 166.9, 173.7.

**Diastéréoisomère 2 :**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.03 (9H, s), 2.04 (1H, m), 2.4 (1H, m), 3.77 (1H, dd, *J* = 3, 12.7 Hz), 3.83 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 3.91 (1H, dd, *J* = 4.8, 10.3 Hz), 4.28 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 6.46 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.7 Hz), 6.62 (1H, d, *J* = 2 Hz), 7.10-7.18 (3H, m), 7.21 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.28 (2H, m), 7.38 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.68 (1H, d, *J* = 8.7 Hz).

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>4</sub>Si 554.1316 ; trouvée 554.1301.

(±) (4S)-2-((*Tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-4-((*R*)-6-(2-chloroéthoxy)-2-(4-chlorophényl)-3-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl)-4-phénylbutanenitrile (**169**)



A une solution de l'aldéhyde *cis* (**144a**) (550 mg, 1.21 mmol) dans du MeCN anhydre (11 mL) sous argon, TBSCN (461 mg, 3.26 mmol) et KCN (48 mg, 0.72 mmol) ont été additionnés à température ambiante. Le mélange a été agité à cette même température pour 1 h. Le brut a été dilué dans l'AcOEt. La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / DCM (10/0 à 6/4) comme éluant pour donner la cyanhydrine **169** (280 mg, 81%, mélange de deux diastéréoisomères) sous forme d'un solide blanc.

**Diastéréoisomère 1 :**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -0.12 (3H, s), 0.03 (3H, s), 0.92 (9H, s), 2.07 (1H, m), 2.40 (1H, m), 3.82 (1H, m), 3.84 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 3.90 (1H, dd, *J* = 2.3, 11 Hz), 4.28 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 6.45 (1H, dd, *J* = 2, 8.5 Hz), 6.60 (1H, d, *J* = 2 Hz), 7.09-7.23 (6H, m), 7.38 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.63 (2H, d, *J* = 8.7 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -5.4, -5.1, 18.1, 25.7, 36.6, 41.4, 48.3, 58.8, 68.6, 94.3, 96.8, 111.7, 113.9, 120.2, 126.2, 126.6, 128.1, 128.5, 129.1, 130.0, 134.7, 134.7, 134.9, 166.8, 173.7, 197.1

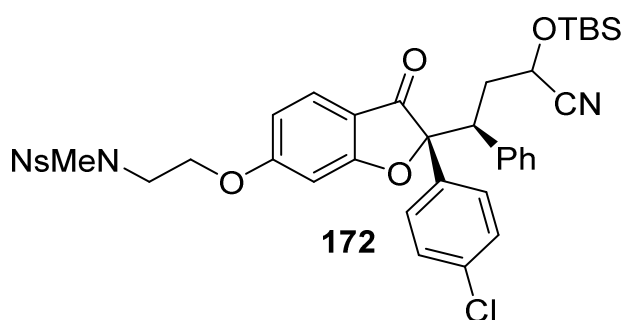
**Diastéréoisomère 2 :**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -0.05 (3H, s), -0.02 (3H, s), 0.81 (9H, s), 2.03 (1H, m), 2.37 (1H, m), 3.78 (1H, dd, *J* = 3, 12.7 Hz), 3.84 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 3.93 (1H, dd, *J* = 4.5, 10.5 Hz), 4.28 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 6.46 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.5 Hz), 6.64 (1H, d, *J* = 2 Hz), 7.10-7.18 (3H, m), 7.21 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.28 (2H, m), 7.40 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.70 (2H, d, *J* = 8.8 Hz).

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -5.3, -5.2, 18.1, 25.6, 36.4, 41.4, 48.7, 61.1, 68.6, 94.0, 96.9, 111.6, 114.0, 119.0, 126.3, 126.6, 128.2, 128.6, 129.2, 129.5, 134.7, 134.7, 135.2, 166.8, 173.6, 196.8.

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculée pour  $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{NO}_4\text{Si}$  596.1785; trouvée 596.1767.

(±) ***N***-2-(((2*R*)-2-((1*S*)-3-((*Tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-3-cyano-1-phénylpropyl)-2-(4-chlorophényl)-3-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)oxy)éthyl)-*N*-méthyl-4-nitrobenzènesulfonamide (**172**)



A une solution de la cyanhydrine **169** (230 mg, 0.39 mmol) dans du DMSO anhydre (3.5 mL) sous argon, NsMeNH (167 mg, 0.77 mmol) et  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (251 mg, 0.77 mmol) ont été additionnés à température ambiante. Le mélange a été chauffé à 50 °C pendant 16 h. Après retour à température ambiante, le brut a été dilué avec de l'AcOEt. La phase organique a été lavée avec de l'eau, avec une solution  $\text{NaHCO}_3$  saturée, de la saumure, séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane /  $\text{Et}_2\text{O}$  (10/0 à 7/3) comme éluant pour donner la cyanhydrine **172** (180 mg, 60%, mélange de deux diastéréoisomères) sous forme d'un solide blanc.

**Diastéréoisomère 1 :**

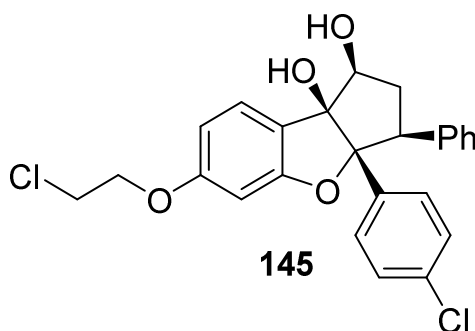
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -0.12 (3H, s), 0.03 (3H, s), 0.92 (9H, s), 2.07 (1H, m), 2.41 (1H, m), 3.82 (1H, m), 2.98 (3H, s), 3.53 (2H, m), 3.78-3.94 (2H, m), 4.23 (2H, m), 6.35 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz), 6.60 (1H, s), 7.10-7.27 (6H, m), 7.38 (2H, d,  $J = 8$  Hz), 7.65 (2H, d,  $J = 8$  Hz), 8.00 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz), 8.37 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz).

### Diastéréoisomère 2 :

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -0.05 (3H, s), -0.02 (3H, s), 0.80 (9H, s), 2.04 (1H, m), 2.36 (1H, m), 2.98 (3H, s), 3.53 (2H, m), 3.77 (1H, dd,  $J = 2.8, 12.5$  Hz), 3.92 (1H, dd,  $J = 4.5, 10.4$  Hz), 4.24 (2H, m), 6.37 (1H, dd,  $J = 1.9, 8.5$  Hz), 6.60 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz), 7.10-7.20 (4H, m), 7.25-7.30 (2H, m), 7.38 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz), 7.68 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz), 8.00 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz), 8.37 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz).

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$  :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calculée pour  $\text{C}_{39}\text{H}_{42}\text{ClN}_3\text{NaO}_8\text{SSi}$  798.2043 ; trouvée 798.2017.

(±) (1*S*,3*S*,3*aR*,8*bS*)-6-(2-Chloroéthoxy)-3*a*-(4-chlorophényl)-3-phényl-1,2,3,3*a*-tétrahydro-8*bH*-cyclopenta[*b*]benzofuran-1,8*b*-diol (**145**)



A une solution de  $\text{SmI}_2$  0.1M dans du THF (38 mL) sous argon à 0 °C, une solution de l'aldéhyde cis (**144a**) (577 mg, 1.27 mmol) dans du THF anhydre (7 mL) a été additionnée lentement. Le mélange a été agité à 0 °C pour 1 h puis à température ambiante pour 2 h. La réaction a été traitée avec une solution  $\text{NaHCO}_3$  saturée. La phase aqueuse a été extraite avec du DCM. La phase organique a été lavée avec de la saumure, séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane /  $\text{Et}_2\text{O}$  (10/0 à 7/3) comme éluant pour donner le diol **145** (480 mg, 83%) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion** : 182-185 °C.

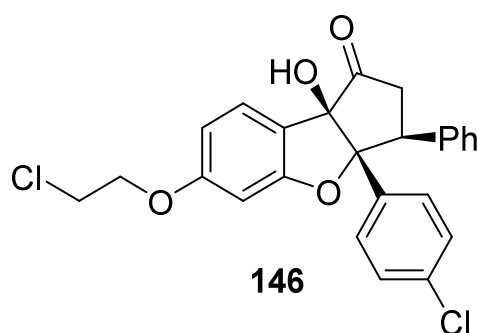
$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.39 (1H, m), 2.65 (1H, m), 3.16 (1H, d,  $J = 4.5$  Hz), 3.5 (1H, dd,  $J = 7.2, 14.2$  Hz), 3.84 (2H, t,  $J = 6$  Hz), 4.26 (2H, t,  $J = 5.8$  Hz), 4.61 (1H, m), 6.60-6.63 (2H, m), 6.98-7.00 (2H, m), 7.07-7.14 (5H, m), 7.22 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz), 7.29 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz).

$^{13}\text{C}$  RMN (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  37.2, 41.9, 50.6, 68.5, 74.7, 86.8, 98.1, 102.2, 109.2, 124.1, 125.4, 126.8, 127.7, 128.0, 128.1, 129.0, 133.4, 133.9, 137.8, 159.3, 161.3.

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calculée pour  $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{O}_3$  439.0868 ; trouvée 439.0847.

Ce composé est décrit par Diedrichs *et al.* dans un brevet en 2005.<sup>56</sup>

(±) (3*S*,3*aR*,8*bR*)-6-(2-Chloroéthoxy)-3*a*-(4-chlorophényl)-8*b*-hydroxy-3-phényl-2,3,3*a*,8*b*-tétrahydro-1*H*-cyclopenta[*b*]benzofuran-1-one (**146**)



A une solution du diol *cis* (**145**) (350 mg, 0.76 mmol) dans du DMSO anhydre (2.3 ml) sous argon à 0 °C, la triéthylamine (1.17 mL, 8.42 mmol) puis une solution du  $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$  (365 mg, 2.29 mmol) dans du DMSO (1.4 mL) ont été additionnés lentement. Le mélange a été agité à température ambiante pour une nuit. Le brut a été traité avec une solution froide de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturée. Le solvant a été éliminé par filtration et le précipité a été dissous dans du DCM. La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane /  $\text{Et}_2\text{O}$  (10/0 à 7/3) comme éluant pour donner la cétone **146** (290 mg, 83%) sous forme d'un solide blanc.

Point de fusion : 73-76 °C ;

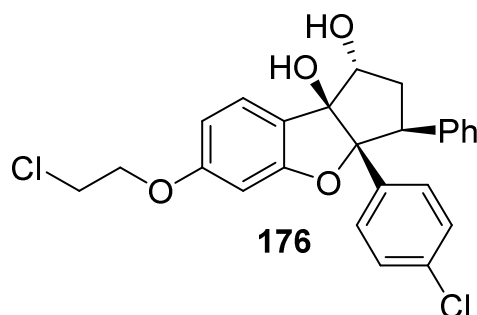
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.68 (1H, brs), 2.92-3.10 (2H, m), 3.80 (1H, dd,  $J = 9.4, 13.1$  Hz), 3.85 (2H, t,  $J = 5.8$  Hz), 4.28 (2H, td,  $J = 1.1, 5.8$  Hz), 6.64 (1H, dd,  $J = 2.3, 8.4$  Hz), 6.73 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz), 6.92-6.96 (2H, m), 7.02 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz), 7.11-7.16 (5H, m), 7.35 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz)

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  40.1, 41.8, 48.6, 68.6, 87.9, 98.9, 101.3, 109.7, 119.5, 125.9, 127.4, 127.9, 128.1, 128.3, 132.5, 133.9, 136.4, 160.0, 162.4, 210.6 ;

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calculée pour  $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{NaO}_4$  477.0631 ; trouvée 477.0621.

Ce composé est décrit par Diedrichs *et al.* dans un brevet en 2005.<sup>56</sup>

**(±) (1*R*,3*S*,3*aR*,8*bS*)-6-(2-Chloroéthoxy)-3*a*-(4-chlorophényl)-3-phényl-1,2,3,3*a*-tétrahydro-8*bH*-cyclopenta[*b*]benzofuran-1,8*b*-diol (176)**



A une solution du  $\text{Me}_4\text{NBH}(\text{OAc})_3$  (468 mg, 1.78 mmol) dans l'ACN anhydre (1.3 mL) sous argon, l'acide acétique (1 mL) a été additionné puis le mélange a été agité à température ambiante pour 30 min. Une solution de la cétone **146** (90 mg, 0.20 mmol) dans du MeCN anhydre (1.5 mL) a été additionnée goutte à goutte. Le mélange a été réagité pour une nuit à la même température. Après consommation totale de la cétone, le mélange a été traité avec une solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  saturée puis la phase aqueuse a été extraite avec de l'AcOEt plusieurs fois. La phase organique a été séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane /  $\text{Et}_2\text{O}$  (10/0 à 6/4) comme éluant pour donner le diol *trans* (**176**) (73 mg, 81%) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion :** 70-73 °C.

**$^1\text{H}$  RMN** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.51 (1H, m), 2.94 (1H, m), 4.04 (2H, t,  $J = 5.9$  Hz), 4.42 (1H, dd,  $J = 6.9, 12.3$  Hz), 4.47 (2H, t,  $J = 5.9$  Hz), 4.87 (1H, dd,  $J = 2.8, 5$  Hz), 6.80 (1H, dd,  $J = 2.1, 8.2$  Hz), 6.83 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz), 7.20-7.35 (9H, m), 7.50 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz).

**$^{13}\text{C}$  RMN** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  37.0, 41.9, 53.7, 68.5, 78.4, 94.1, 97.6, 102.9, 108.8, 119.5, 126.5, 126.5, 127.6, 128.1, 128.2, 129.0, 133.4, 134.2, 138.7, 160.8, 161.6.

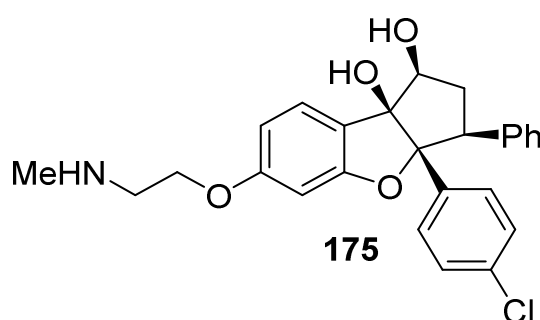
**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$  :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calculée pour  $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{O}_3$  439.0868 ; trouvée 439.0847.

Ce composé est décrit par Diedrichs *et al.* dans un brevet en 2005.<sup>57</sup>

#### Procédure générale 4 pour l'introduction de la partie méthylamino :

Le chlorure d'éthyle a été dissous dans un large excès d'une solution de MeNH<sub>2</sub> (39%) dans du MeCN. Addition du NaI (1 à 2 équiv.) puis le mélange a été agité à température ambiante pour deux nuits. Après concentration, le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice.

#### (±) (1*S*,3*S*,3*aR*,8*bS*)-3*a*-(4-Chlorophényl)-6-(2-(méthylamino)éthoxy)-3-phényl-1,2,3,3*a*-tétrahydro-8*bH*-cyclopenta[*b*]benzofuran-1,8*b*-diol (**175**)



Ce composé a été synthétisé selon la **procédure générale 4** décrite précédemment à partir du diol *cis* (**145**) (97 mg, 0.21 mmol), d'un large excès d'une solution de MeNH<sub>2</sub> (39%) dans du MeCN (2 mL) et du NaI (64 mg, 0.42 mmol). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le DCM / MeOH (10/0 à 8/2) comme éluant pour donner le diol **175** (33 mg, 34%) sous forme d'un solide blanc.

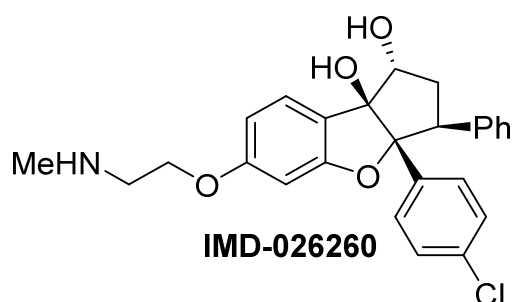
**Point de fusion** : 212-215 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 2.21 (1H, m), 2.34 (3H, s), 2.44 (1H, m), 2.83 (2H, t, *J* = 5.5 Hz), 3.28 (1H, m), 4.04 (2H, t, *J* = 5 Hz), 4.10 (1H, brs), 4.44 (1H, t, *J* = 7.2 Hz), 5.05 (1H, brs), 5.87 (1H, brs), 6.59 (1H, dd, *J* = 1.9, 8.3 Hz), 6.67 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.92 (2H, d, *J* = 7 Hz), 7.00-7.12 (3H, m), 7.16 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.21 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.26 (1H, d, *J* = 8.3 Hz).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 36.1, 36.5, 50.1, 50.3, 67.6, 73.4, 86.1, 97.0, 101.5, 108.4, 125.3, 125.5, 126.3, 126.7, 127.6, 127.9, 129.3, 131.1, 135.5, 138.4, 158.3, 160.8.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>ClNO<sub>4</sub> 452.1623 ; trouvée 452.1621.

(±) (1*R*,3*S*,3*aR*,8*bS*)-3*a*-(4-Chlorophényl)-6-(2-(méthylamino)éthoxy)-3-phényl-1,2,3,3*a*-tétrahydro-8*bH*-cyclopenta[*b*]benzofuran-1,8*b*-diol (IMD-026260)



Ce composé a été synthétisé selon la **procédure générale 4** décrite précédemment à partir du diol *trans* (**176**) (60 mg, 0.13 mmol) en présence d'un excès d'une solution MeNH<sub>2</sub> (39%) dans du MeCN (2 mL) et de NaI (23 mg, 0.16 mmol). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le DCM / MeOH (10/0 à 9/1) comme éluant pour donner l'**IMD-026260** (36 mg, 61%) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion** : 217-220 °C.

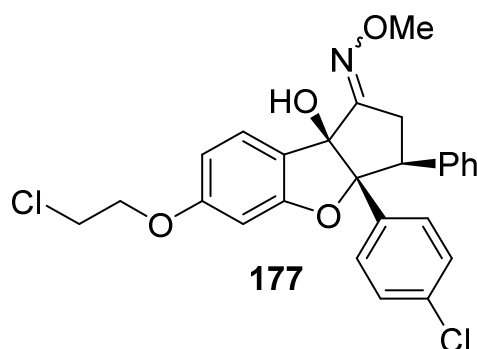
**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 1.91 (1H, m), 2.34 (3H, s), 2.65 (1H, m), 2.82 (2H, t, *J* = 5.5 Hz), 3.84 (1H, dd, *J* = 7.5, 12.2 Hz), 4.02 (2H, t, *J* = 5 Hz), 4.57 (1H, m), 5.15 (1H, m), 5.24 (1H, brs), 6.52 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.2 Hz), 6.61 (1H, d, *J* = 1.8 Hz), 6.95 (2H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.00-7.12 (7H, m), 7.31 (1H, d, *J* = 8.2 Hz).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 36.1, 36.5, 50.3, 52.7, 67.4, 77.9, 92.3, 96.2, 102.1, 107.3, 121.8, 126.0, 126.4, 127.6, 127.9, 128.2, 129.3, 130.9, 135.7, 139.2, 159.1, 160.5.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>ClNO<sub>4</sub> 452.1623 ; trouvée 452.1621.



(±) ((3*S*,3*aR*,8*bS*)-6-(2-Chloroéthoxy)-3*a*-(4-chlorophényl)-8*b*-hydroxy-3-phényl-2,3,3*a*,8*b*-tétrahydro-1*H*-cyclopenta[*b*]benzofuran-1-one *O*-méthyl oxime (**177**))



A une solution de la cétone **146** (390 mg, 0.86 mmol) dans un mélange EtOH / Py anhydre (15.6 mL / 15.6 mL) sous argon à température ambiante, NH<sub>2</sub>OMe.HCl (358 mg, 4.28 mmol) a été additionné. Le mélange a été agité à reflux pour 3 h. Après retour à température ambiante, le solvant a été évaporé sous pression réduite et le solide a été repris dans de l'AcOEt. La phase organique a été lavée avec deux fois HCl (1M), avec une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturée et de la saumure, puis elle a été séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et concentrée pour donner l'oxime **177** (414 mg, quant., mélange de deux diastéréoisomères) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion du mélange :** 156-159 °C.

**Diastéréoisomère 1 :**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.90 (1H, dd, *J* = 8, 17.7 Hz), 3.23 (1H, dd, *J* = 14.2, 17.7), 3.64 (1H, m), 3.84 (2H, m), 4.11 (3H, s), 4.27 (2H, m), 6.59 (1H, dd, *J* = 2.3, 8.5 Hz), 6.65 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 6.90 (2H, m), 7.07-7.19 (7H, m), 7.63 (1H, d, *J* = 8.5 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 32.3, 50.4, 53.4, 62.5, 68.4, 87.1, 98.3, 101.7, 109.1, 122.8, 127.0, 127.1, 127.5, 127.7-127.9 (2C), 128.6, 132.6, 133.4, 136.4, 159.1, 160.6, 161.4.

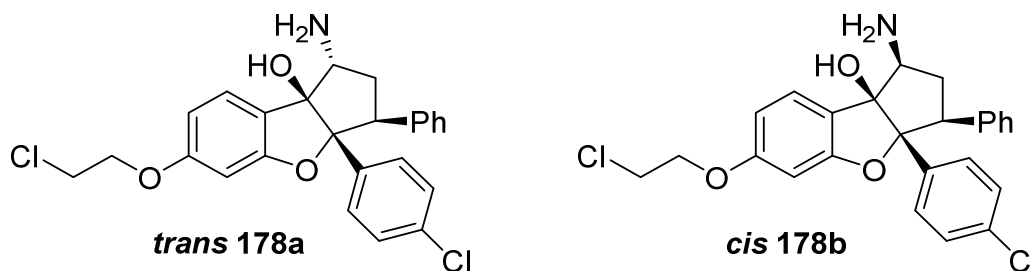
**Diastéréoisomère 2 :**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.38 (1H, brs), 3.10 (2H, d, *J* = 11.2 Hz), 3.60 (1H, t, *J* = 11 Hz), 3.84 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 4.08 (3H, s), 4.27 (2H, m), 6.64-6.69 (2H, m), 6.94-6.98 (2H, m), 7.07-7.19 (7H, m), 7.51 (1H, d, *J* = 8.2 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 29.9, 41.7, 49.9, 62.6, 68.4, 86.4, 98.5, 101.8, 109.4, 122.0, 126.1, 127.0, 127.8, 127.9, 128.0, 128.2, 132.9, 133.5, 136.9, 158.9, 160.6, 161.6.

HRMS (ESI-TOF) m/z : [M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>Cl<sub>2</sub>NNaO<sub>4</sub> 506.0902; trouvée 506.0911.

(±) (3*S*,3*aR*,8*bS*)-1-amino-6-(2-Chloroéthoxy)-3*a*-(4-chlorophényl)-3-phényl-1,2,3,3*a*-tétrahydro-8*bH*-cyclopenta[*b*]benzofuran-8*b*-ol (**178a** et **178b**)



A une solution de l'oxime **177** (340 mg, 0.70 mmol) dans du THF (25 mL) anhydre, une solution de BH<sub>3</sub>·THF (1M) (9.8 mL, 9.83 mmol) a été additionnée à 0 °C. Le mélange a été agité à reflux pour une nuit. Après retour à température ambiante, une solution de NaOH (3M) a été additionnée. La phase aqueuse a été extraite avec de l'AcOEt plusieurs fois. La phase organique a été lavée avec de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / AcOEt (7/3 à 0/10) comme éluant pour donner l'amine *trans* (**178a**) (180 mg, 56%) et l'amine *cis* (**178b**) (50 mg, 16%) sous forme de solides blancs.

**Amine *trans* (178a) :**

**Point de fusion :** 102-105 °C.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.82 (1H, m), 2.96 (1H, m), 3.41 (1H, brs), 3.83 (2H, t, *J* = 5.6 Hz), 3.88 (1H, dd, *J* = 6.4, 7.5 Hz), 4.08 (1H, m), 4.25 (2H, t, *J* = 5.6 Hz), 4.35 (1H, brs), 6.58-6.62 (2H, m), 6.94 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.95-6.98 (2H, m), 7.04 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.10-7.16 (3H, m), 7.20 (1H, d, *J* = 8.2 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 31.4, 41.7, 53.7, 67.7, 68.6, 91.5, 98.2, 103.3, 109.3, 118.0, 125.7, 127.0, 127.5, 128.3, 128.7, 129.2, 133.3, 133.9, 137.7, 160.5, 162.2.

HRMS (ESI-TOF) m/z : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> 456,1133 ; trouvée 456.1119.

**Amine *cis* (178b) :**

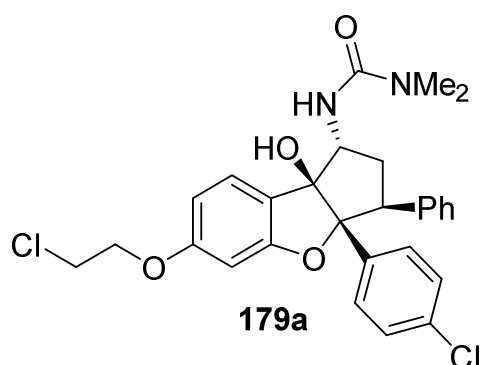
**Point de fusion :** 79-82 °C ;

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.78 (2H, brs), 1.88 (1H, m), 2.60 (1H, m), 3.83 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 3.94 (2H, m), 4.24 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 6.55 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.2 Hz), 6.58 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 6.96-7.13 (9H, m), 7.21 (1H, d, *J* = 8.3 Hz) ;

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 36.6, 41.9, 53.7, 61.5, 68.4, 92.9, 97.3, 103.3, 108.3, 120.5, 126.5, 126.6, 127.2, 128.0, 128.6, 129.1, 133.1, 134.7, 139.2, 160.3, 161.1 ;

L'amine *trans* **178a** est décrit par Diedrichs *et al.* dans un brevet en 2005, mais avec une autre méthode de synthèse.<sup>57</sup>

(±) **3-((1*R*,3*S*,3*aR*,8*bS*)-6-(2-Chloroéthoxy)-3*a*-(4-chlorophényl)-8*b*-hydroxy-3-phényl-2,3,3*a*,8*b*-tétrahydro-1*H*-cyclopenta[*b*]benzofuran-1-yl)-1,1-diméthylurée (179a)**



A une solution de l'amine *trans* (**178a**) (50 mg, 0.11 mmol) dans du DCM (1.7 mL) à température ambiante sous argon, ont été ajoutés successivement de la triéthylamine (50 µL, 0.36 mmol) et du chlorure de diméthylcarbamoyle (25 µL, 0.27 mmol). Le mélange a été agité à reflux pour deux nuits. Après retour à température ambiante, le mélange a été concentré puis purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / Et<sub>2</sub>O (9/1 à 3/7) comme éluant pour donner l'urée **179a** (43 mg, 75%) sous forme de solide blanc.

**Point de fusion :** 171-174 °C ;

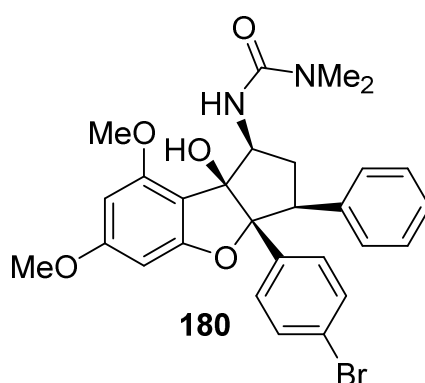
**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 2.12 (1H, m), 2.36 (1H, m), 2.92 (6H, s), 3.81 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 4.99 (1H, dd, *J* = 3.1, 7.5 Hz), 4.21 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 4.35 (1H, d, *J* = 6.7 Hz), 4.94 (1H, m), 5.56

(1H, brs), 6.44 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz), 6.52 (1H, dd,  $J = 2.3, 8.3$  Hz), 7.04 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz), 7.08 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz), 7.14-7.18 (7H, m) ;

$^{13}\text{C RMN}$  (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  30.5, 35.0, 36.6, 42.0, 53.3, 63.0, 68.4, 91.0, 96.9, 103.2, 108.1, 122.3, 126.0, 126.6, 127.3, 128.2, 129.2, 129.8, 133.4, 135.0, 140.1, 159.7, 159.8, 160.6 ;

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$  :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calculée pour  $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{NaO}_4$  549.1324 ; trouvée 549.1346.

**(±) 3-((1S,3S,3aR,8bS)-3a-(4-Bromophényl)-8b-hydroxy-6,8-diméthoxy-3-phényl-2,3,3a,8b-tétrahydro-1H-cyclopenta[*b*]benzofuran-1-yl)-1,1-diméthylurée (180)**



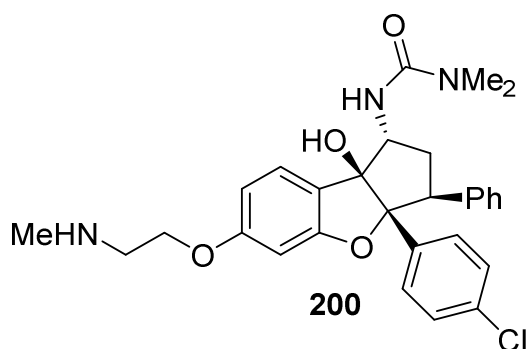
Ce composé a été synthétisé en analogie avec l'urée **179a** à partir de l'amine *cis* (**150a**) (50 mg, 0.10 mmol) avec le chlorure de diméthylcarbamoyle (19  $\mu\text{L}$ , 0.21 mmol) en présence de la triéthylamine (37  $\mu\text{L}$ , 0.27 mmol). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le  $\text{Et}_2\text{O}$  /  $\text{AcOEt}$  (9 / 1) comme éluant pour donner un mélange l'urée **180** (54 mg, 95%) sous forme d'un solide blanc.

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.31 (1H, m), 2.76 (1H, m), 2.95 (6H, s), 3.67-3.75 (4H, m), 3.78 (3H, s), 4.52 (1H, m), 5.72 (1H, d,  $J = 5.8$  Hz), 6.00 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz), 6.19 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz), 7.03-7.12 (7H, m), 7.21 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz).

$^{13}\text{C RMN}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  30.4, 36.3, 36.7, 51.9, 55.5, 55.7 ; 57.5, 88.0, 88.8, 92.5, 102.3, 110.3, 121.2, 126.4, 127.9, 128.1, 129.4, 130.3, 135.3, 138.2, 157.7, 158.5, 159.8, 163.7.

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$  :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calculée pour  $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{BrN}_2\text{NaO}_5$  575.1158; trouvée 575.1136.

(±) 3-((1*R*,3*S*,3*aR*,8*bS*)-3*a*-(4-Chlorophényl)-8*b*-hydroxy-6-(2-(méthylamino)éthoxy)-3-phényl-2,3,3*a*,8*b*-tétrahydro-1*H*-cyclopenta[*b*]benzofuran-1-yl)-1,1-diméthylurée (**200**)



Ce composé a été synthétisé selon la **procédure générale 4** décrite précédemment à partir de l'urée **179a** (95 mg, 0.18 mmol) en présence d'un excès d'une solution MeNH<sub>2</sub> (39%) dans du MeCN (2 mL) et de NaI (30 mg, 0.21 mmol). Après concentration, le brut a été traité avec une solution de NaOH (3M) puis la phase aqueuse a été extraite avec de l'AcOEt. La phase organique a été lavée avec de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le DCM / MeOH (10/0 à 9/1) comme éluant pour donner l'urée **200** (65 mg, 69%) sous forme d'un solide blanc.

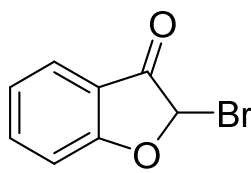
**Point de fusion** : 182-185 °C.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 2.13 (1H, m), 2.70 (1H, m), 2.77 (3H, s), 2.90 (6H, s), 3.42 (2H, t, *J* = 4.9 Hz), 3.96 (1H, t, *J* = 8.2 Hz), 4.28 (2H, t, *J* = 5.1 Hz), 4.98 (1H, t, *J* = 7.7 Hz), 6.66 (1H, dd, *J* = 2.3, 8.3 Hz), 6.69 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 7.02-7.13 (7h, m), 7.17-7.22 (3H, m).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 34.1, 35.1, 36.7, 49.7, 55.0, 62.5, 65.0, 93.2, 98.1, 104.1, 109.0, 123.8, 127.5, 127.7, 128.1, 129.7, 130.7, 133.8, 136.6, 140.7, 161.0, 161.2, 161.8.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M-H<sub>2</sub>O +H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub> 504,2054 ; trouvée 504.2045.

### 2-Bromobenzofuran-3(2H)-one (182)



**182**

Ce composé a été synthétisé en analogie avec la benzofuranone **139** à partir de la benzofuranone **181** (8 g, 60 mmol) dans du THF (106 mL) avec une solution du  $\text{Ph}(\text{Me})_3\text{NBr}_3$  (24 g, 64 mmol) dans du THF (81 mL). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / DCM (10/0 à 9/1) comme éluant pour donner la benzofuranone **182** (8 g, 63%) sous forme d'une huile jaunâtre.

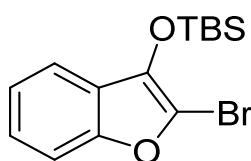
$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.50 (1H, s), 7.17 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz), 7.22 (1H, td,  $J = 0.8, 7.8$  Hz), 7.69 (1H, m), 7.77 (1H, ddd,  $J = 0.6, 1.4, 7.8$  Hz).

$^{13}\text{C RMN}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  75.8, 114.0, 118.0, 124.1, 125.6, 138.9, 170.3, 194.6.

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$  :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculée pour  $\text{C}_8\text{H}_6\text{BrO}_2$  212.9551 ; trouvée 212.9537.

Ce composé est présent dans une publication décrite par Diedrichs *et al.* en 2005, mais sans analyse.<sup>81</sup>

### ((2-Bromobenzofuran-3-yl)oxy)(*tert*-butyl)diméthylsilane (183)



**183**

Ce composé a été synthétisé en analogie avec le composé **140** à partir de la benzofuranone **182** (3.6 g, 17.18 mmol), en présence de la triéthylamine (2.6 mL, 18.90 mmol) et du triflate du *tert*butyldiméthylsilyle (4.3 mL, 18.90 mmol) dans un mélange  $\text{Et}_2\text{O}$  (73 mL) / DCM (18 mL). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le

<sup>81</sup> Diedrichs, N.; Ragot, J. P.; Thede, K., *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 2005, 1731-1735.

pentane (100%) comme éluant pour donner l'adduit **183** (3.9 g, 70%) sous forme d'une huile jaunâtre.

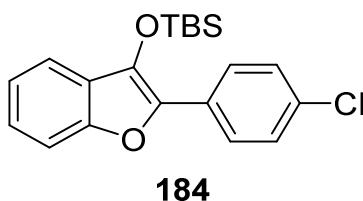
**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.26 (6H, s), 1.09 (9H, s), 7.18-7.28 (2H, m), 7.34-7.38 (1H, m), 7.45-7.48 (1H, m).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -3.8, 18.3, 25.8, 111.5, 115.2, 118.1, 122.9, 124.5, 124.6, 136.7, 153.6.

**HRMS** (ESI-TOF) m/z : [M+H<sup>+</sup>] calculée pour C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>BrO<sub>2</sub>Si 327.0416 ; trouvée 327.0405.

Ce composé est présent dans une publication décrite par Diedrischs *et al.* en 2005, mais sans analyse.<sup>78</sup>

#### **Tert-butyl((2-(4-chlorophényl)benzofuran-3-yl)oxy)diméthylsilane (184)**



Ce composé a été synthétisé en analogie avec **142** à partir de l'adduit **183** (4 g, 12.22 mmol) avec l'acide *p*-chlorophénylboronique **141** (2.3 g, 14.66 mmol) en présence du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (705 mg, 0.61 mmol, 5 mol%), d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.8 g, 26.8 mmol) dans de l'eau (12 mL) et le tout dans du toluène (90 mL). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane (100%) comme éluant pour donner l'adduit **184** (3.8 g, 86%) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion:** 78-81 °C.

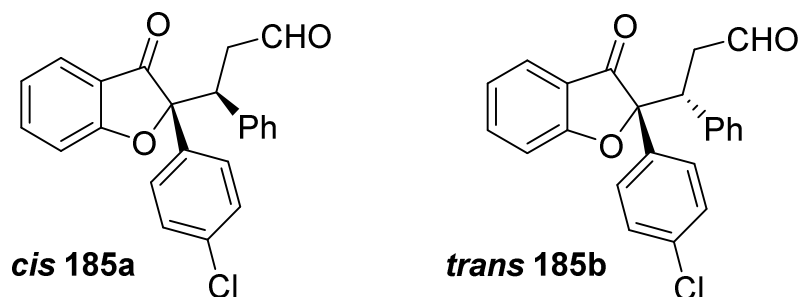
**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -0.02 (6H, s), 0.95 (9H, s), 7.05-7.15 (2H, m), 7.23-7.29 (3H, m), 7.37 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.75 (1H, d, *J* = 8.7 Hz).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -3.7, 18.3, 25.9, 111.7, 119.2, 122.5, 125.0, 125.4, 126.6, 128.3, 128.7, 129.2, 132.9, 135.2, 140.1, 152.4.

**HRMS** (ESI-TOF) m/z : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>ClO<sub>2</sub>Si 359.1234 ; trouvée 359.1243.

Ce composé est présent dans une publication décrite par Diedrichs *et al.* en 2005, mais sans analyse. <sup>78</sup>

(±) (S)-3-((R)-2-(4-Chlorophényl)-3-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl)-3-phénylpropanale (185a et 185b)



Ces deux diastéréoisomères (**185a** et **185b**) ont été synthétisés selon la **procédure générale 3** décrite précédemment pour la réaction de Mukaiyama-Michael à partir du composé **184** (3.6 g, 10.02 mmol) et du *trans*-cinnamaldéhyde (2.5 mL, 20 mmol) en présence d'une solution du TBAF (15 mL, 15 mmol, 1M dans du THF) dans de l'*i*PrOH (174 mL). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / DCM (10/0 à 5/5) comme éluant pour donner l'aldéhyde *cis* (**185a**) (641 mg, 17%) et l'aldéhyde *trans* (**185b**) (302 mg, 8%) sous forme de solides jaunâtres.

**Aldéhyde *cis* (185a) :**

**Point de fusion :** 63-66 °C.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.66 (1H, ddd, *J* = 1, 4, 17.6 Hz), 3.16 (1H, ddd, *J* = 2.1, 10.7, 17.4 Hz), 4.21 (1H, dd, *J* = 4, 10.8 Hz), 6.88 (1H, td, *J* = 0.5, 7.7 Hz), 7.01-7.11 (3H, m), 7.16 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.25-7.3 (3H, m), 7.37 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.52 (1H, m), 7.73 (2H, *J* = 8.7 Hz), 9.44 (1H, dd, *J* = 1, 2 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 44.1, 47.4, 92.8, 112.8, 120.5, 122.4, 124.8, 126.8, 127.8, 128.3, 129.2, 129.6, 134.5, 134.9, 136.2, 138.2, 171.4, 199.5, 199.7.

**Aldéhyde *trans* (185b) :**

**Point de fusion :** 64-67 °C.



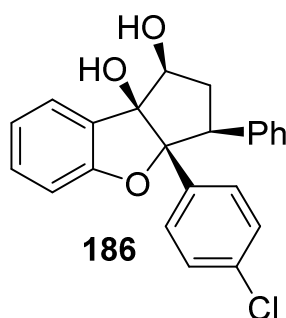
**<sup>1</sup>H RMN** (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.50 (1H, dd, *J* = 1, 3.8 Hz), 2.54 (dd, *J* = 1.1, 3.6 Hz), 3.01 (1H, ddd, 2.5, 10.9, 16.9 Hz), 4.15 (1H, dd, *J* = 3.8, 10.9 Hz), 7.09-7.19 (8H, m), 7.29 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.43 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.64-7.70 (2H, m), 9.47 (1H, dd, *J* = 1, 2.4 Hz).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 44.0, 48.2, 93.1, 113.4, 120.8, 122.9, 125.1, 126.8, 127.6, 128.3, 128.5, 129.6, 134.3, 134.4, 137.1, 138.8, 171.7, 199.5, 200.5.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+H]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>ClO<sub>3</sub> 377.0944; trouvée 377.0929.

L'aldéhyde *cis* **185a** est présent dans une publication décrite par Diedrichs *et al.* en 2005, mais sans analyse. <sup>78</sup>

(±) (1*S*,3*S*,3*aR*,8*bS*)-3a-(4-Chlorophényl)-3-phényl-1,2,3,3a-tétrahydro-8*bH*-cyclopenta[*b*]benzofuran-1,8*b*-diol (**186**)



Ce composé a été synthétisé en analogie avec le diol **145** à partir de l'aldéhyde **185a** (500 mg, 1.33 mmol) dans THF (8 mL) avec une solution de Sml<sub>2</sub> (0.1M dans du THF (40 mL)). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le DCM (100%) comme éluant pour donner le diol *cis* (**186**) (380 mg, 75%) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion** : 80-83 °C.

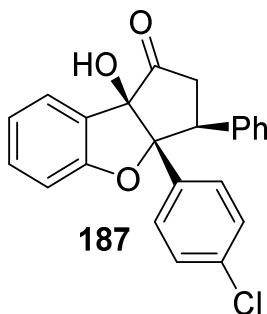
**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.40 (1H, m), 2.44 (1H, brs), 2.65 (1H, m), 3.16 (1H, d, *J* = 4.6 Hz), 3.52 (1H, dd, *J* = 7, 14.3 Hz), 4.65 (1H, m), 6.98-7.14 (9H, m), 7.23 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.35-7.42 (2H, m).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 37.2, 50.6, 74.9, 87.1, 101.1, 111.5, 122.1, 124.8, 126.7, 127.7, 128.0, 128.1, 129.1, 131.1, 131.2, 133.3, 133.9, 137.8, 157.8.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>ClNaO<sub>3</sub> 401.0920 ; trouvée 401.0911.

Ce composé est présent dans une publication décrite par Diedrischs *et al.* en 2005, mais sans analyse. <sup>78</sup>

(±) (3*S*,3*aR*,8*bR*)-3*a*-(4-Chlorophényl)-8*b*-hydroxy-3-phényl-2,3,3*a*,8*b*-tétrahydro-1*H*-cyclopenta[*b*]benzofuran-1-one (**187**)



Ce composé a été synthétisé en analogie avec la cétone **146** à partir du diol **186** (360 mg, 0.95 mmol) dans du DMSO (2.9 mL) avec une solution de SO<sub>3</sub>·Py (454 mg, 2.85 mmol) dans du DMSO (1.7 mL). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le pentane / DCM (3 / 7) comme éluant pour donner la cétone **187** (310 mg, 87%) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion** : 88-91 °C.

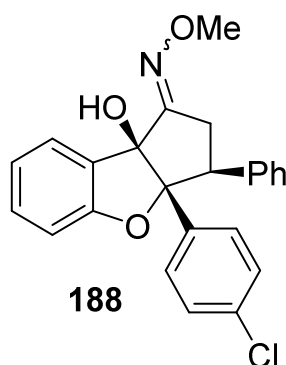
**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.80 (1H, s), 2.93-3.12 (2H, m), 3.80 (1H, dd, *J* = 9.4, 13.1 Hz), 6.93-6.96 (2H, m), 7.03-7.20 (9H, m), 7.43-7.47 (2H, m).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 40.1, 48.5, 77.4, 88.3, 100.2, 112.4, 122.6, 125.2, 126.7, 127.4, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 132.5, 133.8, 136.4, 158.4, 210.9.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z* : [M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>ClNaO<sub>3</sub> 399.0764 ; trouvée 399.0746.

Ce composé est présent dans une publication décrite par Diedrischs *et al.* en 2005, mais sans analyse. <sup>78</sup>

(±) (3*S*,3*aR*,8*bS*)-3*a*-(4-Chlorophényl)-8*b*-hydroxy-3-phényl-2,3,3*a*,8*b*-tétrahydro-1*H*-cyclopenta[*b*]benzofuran-1-one *O*-méthyle oxime (**188**)



Ce composé a été synthétisé en analogie avec l'oxime **177** à partir de la cétone **187** (300 mg, 0.80 mmol) en présence de la  $\text{NH}_2\text{OMe}\cdot\text{HCl}$  (333 mg, 4 mmol) dans un mélange EtOH / Py anhydre (15 mL / 15mL). L'oxime **188** (320 mg, mélange de deux diastéréoisomères) a été obtenu quantitativement sous forme d'un solide blanc, qui a été utilisé sans purification.

**Point de fusion du mélange :** 184-187 °C.

**Diastéréoisomère 1 :**

**$^1\text{H}$  RMN** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.90 (1H, dd,  $J = 8.0, 17.7$  Hz), 3.23 (1H, dd,  $J = 13.9, 17.7$ ), 3.64 (1H, m), 4.13 (3H, s), 4.40 (1H, brs), 6.91 (2H, m), 7.01-7.19 (9H, m), 7.39 (1H, m), 7.76 (1H, dd,  $J = 0.9, 7.5$  Hz).

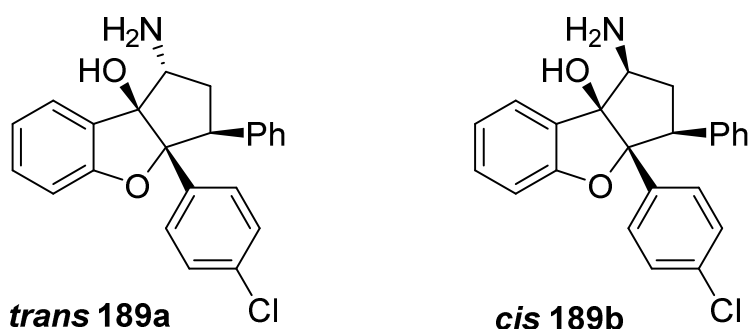
**Diastéréoisomère 2 :**

**$^1\text{H}$  RMN** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.48 (1H, brs), 3.10 (2H, d,  $J = 10.8$  Hz), 3.60 (1H, t,  $J = 11.2$  Hz), 4.09 (3H, s), 6.96-7.00 (2H, m), 7.01-7.19 (9H, m), 7.39 (1H, m), 7.64 (1H, dd,  $J = 1.0, 7.7$  Hz).

**$^{13}\text{C}$  RMN** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) **Dia 1+ Dia 2**  $\delta$  30.0, 32.5, 49.9, 50.3, 62.7, 62.8, 86.9, 87.8, 100.8, 100.9, 112.1, 112.2, 122.2, 122.4, 125.6, 126.5, 127.1, 127.2, 127.6, 127.9 (2C), 128.0, 128.1 (2C), 128.4, 128.8, 129.2, 129.9, 131.7, 132.8, 133.1, 133.5, 133.6, 136.6, 137.0, 157.6 (2C), 160.7, 160.8.

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$  :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calculée pour  $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{ClNNaO}_3$  428.1029 ; trouvée 428.1042.

(±) (3*S*,3*aR*,8*bS*)-1-Amino-3*a*-(4-chlorophényl)-3-phényl-1,2,3,3*a*-tétrahydro-8*bH*-cyclopenta[*b*]benzofuran-8*b*-ol (**189a** et **189b**)



Ces deux diastéréoisomères (**189a** et **189b**) ont été synthétisés en analogie avec les diastéréoisomères (**178a** et **178b**) à partir de l'oxime **188** (310 mg, 0.76 mmol) en présence d'une solution de  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$  (10.7 mL, 10.7 mmol, 1M) dans THF (24 mL). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le DCM / MeOH (95 / 5) comme éluant pour donner l'amine *trans* (**189a**) (17 mg, 6%) et l'amine *cis* (**189b**) (106 mg, 43%) sous forme de solides blancs.

**Amine *trans* (189a) :**

**Point de fusion :** 95-98 °C.

**$^1\text{H}$  RMN** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.31 (1H, m), 2.99 (1H, m), 3.36 (1H, m), 3.92 (1H, m), 4.12 (1H, m), 4.26 (1H, brs), 6.93-7.18 (11H, m), 7.28 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz), 7.41 (1H, m).

**$^{13}\text{C}$  RMN** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  31.4, 53.7, 67.8, 91.8, 102.4, 111.6, 122.4, 125.1, 125.4, 127.1, 127.5, 128.3, 128.7, 129.3, 132.5, 133.2, 133.9, 137.7, 159.0.

**Amine *cis* (189b) :**

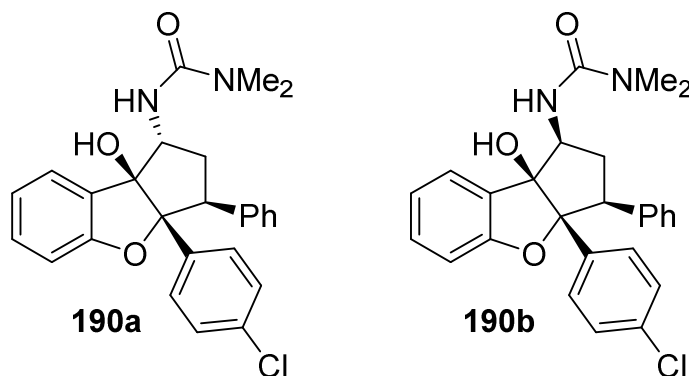
**Point de fusion :** 89-92 °C.

**$^1\text{H}$  RMN** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.96 (1H, m), 2.67 (1H, m), 4.02 (2H, m), 6.96-7.15 (11H, m), 7.31-7.37 (2H, m).

**$^{13}\text{C}$  RMN** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  36.9, 53.9, 61.8, 93.4, 102.4, 110.7, 121.4, 126.0, 126.5, 127.3, 127.8, 128.0, 128.6, 129.2, 131.1, 133.2, 134.7, 139.3, 159.0.

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$  :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculée pour  $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{ClNO}_2$  378.1261 ; trouvée 378.1250.

(±) 3-((3*S*,3*aR*,8*bS*)-3*a*-(4-Chlorophényl)-8*b*-hydroxy-3-phényl-2,3,3*a*,8*b*-tétrahydro-1*H*-cyclopenta[*b*]benzofuran-1-yl)-1,1-diméthylurée (190*a* et 190*b*)



Ces deux diastéréoisomères (**190a** et **190b**) ont été synthétisés en analogie avec l'urée **179a** à partir de l'amine *cis* (**189b**) (120 mg, 0.32 mmol) avec le chlorure de diméthylcarbamoyl (59  $\mu$ L, 0.63 mmol) en présence de la triéthylamine (0.12 mL, 0.82 mmol). Le brut a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant le DCM / AcOEt (95 / 5) comme éluant pour donner un mélange inséparable de deux urées **190a** et **190b** (126 mg, 89%, **190a/190b** : 83/17) sous forme d'un solide blanc.

**Point de fusion du mélange** : 191-194 °C.

**Urée trans (190a) :**

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO):  $\delta$  2.07 (1H, m), 2.53 (1H, m), 2.78 (6H, s), 3.98 (1H, d,  $J$  = 8.2 Hz), 4.85 (1H, dd,  $J$  = 7.5, 15.1 Hz), 6.11 (1H, s), 6.25 (1H, d,  $J$  = 7.4 Hz), 6.94-7.31 (13H, m).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO):  $\delta$  33.6, 36.1, 52.8, 61.0, 91.7, 101.3, 109.9, 120.5, 126.1, 126.3, 126.5, 127.6, 127.7, 128.3, 129.4, 129.7, 130.0, 131.2, 135.8, 139.7, 157.5, 159.0.

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$  : [M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub> 471.1451 ; trouvée 471.1439.



## **6. PUBLICATIONS**

---

## **Publication N° 1**

Scalable 9-step synthesis of the splicing modulator  
NVS-SM2

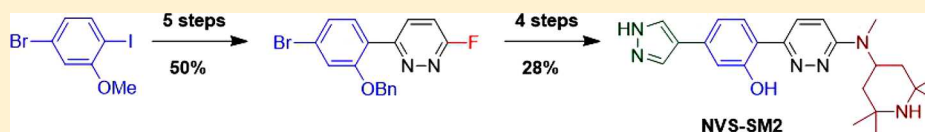
Abou-Hamdan, H.; Désaubry, L., *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 2954-2958.



## Scalable 9-Step Synthesis of the Splicing Modulator NVS-SM2

Hussein Abou-Hamdan<sup>†,‡</sup> and Laurent Désaubry<sup>\*,†,‡,§</sup><sup>†</sup>Laboratory of Therapeutic Innovation (UMR 7200), University of Strasbourg–CNRS, Faculty of Pharmacy, 67401 Illkirch, France<sup>‡</sup>Laboratory of Biomolecules (UMR7203), Sorbonne University–CNRS, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

## Supporting Information



**ABSTRACT:** NVS-SM2, the first activator of pre-mRNA splicing, displays remarkable pharmacological in vivo activities in models of spinal muscular atrophy. Herein we describe an improved approach to the synthesis of this compound, which features a convenient introduction of sterically encumbered amine moiety onto a fluoropyridazine intermediate.

In 2015, Novartis' scientists reported the discovery of NVS-SM2 (**1**, Scheme 1), the first activator of pre-mRNA splicing.<sup>1</sup> This orally active small molecule doubled the life-span in a majority of treated mice in a model of spinal muscular atrophy (SMA). SMA is a major genetic cause of infant mortality caused by a mutation of the gene SMN that is essential to pre-mRNA splicing. The pharmacological investigation of **1** in SMA and other diseases is highly hindered by the availability of this compound. Indeed its preparation on an 8 mg scale has only been reported in one patent by Novartis' scientists.<sup>2</sup> The caveat in this synthesis lies in the deprotection of the phenol and the introduction of sterically hindered amine that respectively occurred with 13 and 55% yields, and also with the Suzuki–Miyaura coupling of highly functionalized aryl and heteroaryl moieties, the yield of which was not reported (Scheme 1). In this communication, the execution of a 9-step, scalable synthesis of **1** is presented.

To overcome the limitation of the original synthesis of NVS-SM2, we explored several routes and we finally envisioned to protect the phenol as a benzyloxy and to introduce the congested amine onto a reactive fluoropyridazine. We considered also to assemble the aryl and heterocyclic moieties of the Suzuki coupling under the optimized reactions (Scheme 2).

Our synthesis commenced with a palladium-catalyzed borylation<sup>3</sup> of iodide **2** that afforded a mixture (90:10) of boronates **3** and **3'**, which was directly used in a Suzuki–Miyaura coupling with iodopyridazine **4** to furnish adduct **5** (Scheme 3).<sup>4</sup> Initial attempts to perform this reaction using Fu's condition<sup>5,6</sup> did not yield the expected adduct **5** (entry 1, Table 1). Switching to other catalytic systems using S-Phos, X-Phos, or PPh<sub>3</sub> as ligands provided the desired adduct with a conversion of 20–32% (entries 2–4). Ultimately, the air and moisture stable PdCl<sub>2</sub>(dppf) proved to be particularly effective (entry 5). Finally, several other combinations of solvent and base were examined, and when the reaction was carried out in dioxane/H<sub>2</sub>O with the use of K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> as a base, a 70% yield

could be achieved (entry 8). This preference for K<sup>+</sup> as a counteraction of the base suggests that this Suzuki coupling involves a fast oxidation step and a rate-determining transmetalation.<sup>7</sup>

Further continuation of the synthesis required the replacement of the methoxy by a benzyloxy that can be efficiently deprotected in the final step. Indeed, Novartis' scientists reported in their patent that the demethylation at a latter step is performed with a 13% yield only.<sup>2</sup> Thus, demethylation with boron trichloride of **5**, followed by benzylation, gave the requisite intermediate **7** in a 98% yield.

With the intermediate **7** in hand, we proceeded to its coupling with the pyrazolylboronate moiety. Original attempts to perform this reaction using a pyrazolylboronate protected with a Boc were not satisfactory, due to the lability of the Boc in the examined conditions. To circumvent this issue, we incorporated a trityl protecting group onto the pyrazolylboronate. This reagent was conveniently prepared in 3 steps from pyrazole **8** (Scheme 4).

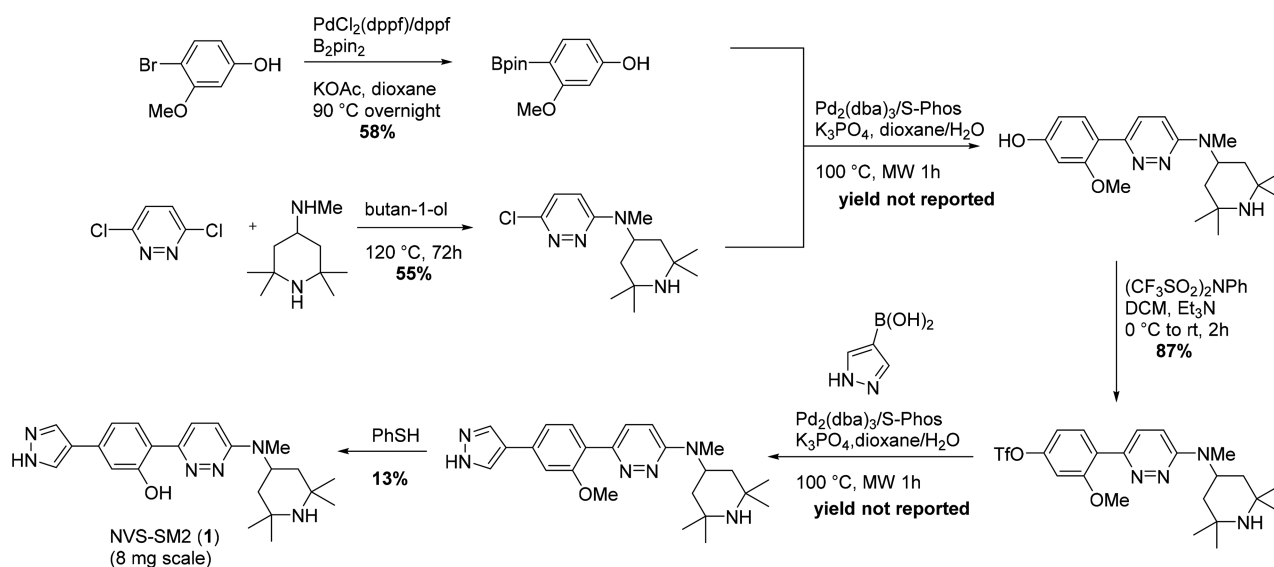
After extensive studies, we found that aryl bromide **7** can be coupled in the presence of Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> with boronate **11** to prepare adduct **12** in a 30% yield (entries 3 and 4, Table 2). Initial attempts to use unprotected pyrazole-4-boronic acid did not deliver the expected adducts. When we examined this reaction with the reactant protected as a Boc, the yield was not reproducible and lied between 0 and 20%.

To improve this reaction condition, we examined the coupling of **11** with 3-bromoanisole **13** using Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in PhMe/EtOH/H<sub>2</sub>O.<sup>8</sup> Our initial assay afforded the expected adduct in a 33% yield (entry 1, Table 3). Increasing the amount of boronate **11** did not modify the yield (entry 2). Gratefully, doubling the amount of catalyst improved the yield up to 70% (entry 3), suggesting that the catalyst is unstable in this condition.

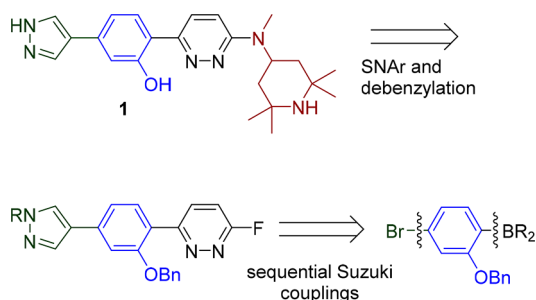
Received: November 29, 2017

Published: February 8, 2018

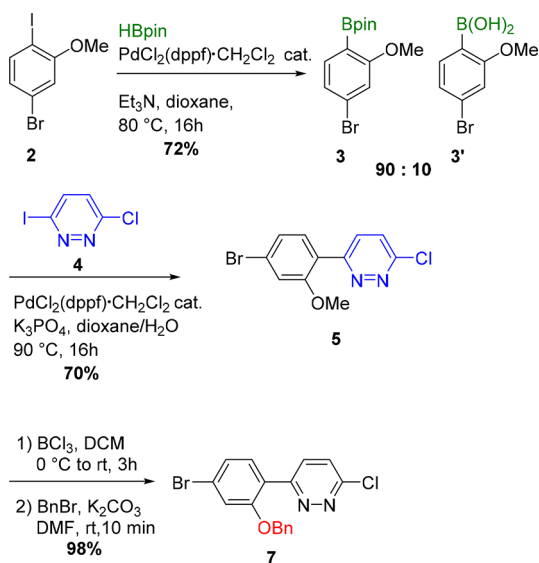
## Scheme 1. Novartis Synthesis of NVS-SM2



## Scheme 2. Synthesis Plan for NVS-SM2 (1)



## Scheme 3. Synthesis of Intermediate 7



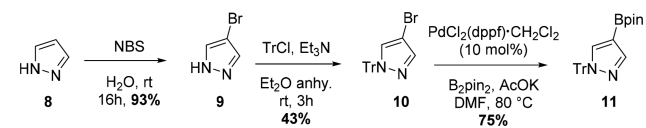
With an optimized Suzuki–Miyaura coupling of boronate **11** in hand, an efficient route to synthesize advanced intermediate **16** was developed (Scheme 5). First, the iminochloride **7** was treated with anhydrous tetramethylammonium fluoride under Sanford's condition<sup>9</sup> to smoothly furnish fluoropyridazine **15**, in 98% yield. The latter has two main advantages compared to the cognate chloropyridazine **7**:

Table 1. Optimization of the First Suzuki–Miyaura Coupling

$3, 3' + 4 \xrightarrow[\text{solvent, T } ^\circ\text{C}]{\text{cat., base}} 5$

entry	catalyst	base (equiv)	solvent	T (°C)	yield (%)
1	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (2 mol %) P( <i>t</i> Bu) <sub>3</sub> (3 mol %)	KF (3)	THF	80	trace
2	Pd(OAc) <sub>2</sub> (10 mol %) S-Phos (20 mol %)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.2)	ACN/H <sub>2</sub> O	110	20
3	Pd(OAc) <sub>2</sub> (10 mol %) X-Phos (12 mol %)	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (2)	<i>n</i> -BuOH/ H <sub>2</sub> O	110	21
4	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (5 mol %)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	EtOH/ toluene/ H <sub>2</sub> O	reflux	32
5	PdCl <sub>2</sub> (dppf)·CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10 mol %)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	DMF/ H <sub>2</sub> O	100	40
6	PdCl <sub>2</sub> (dppf)·CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10 mol %)	CsF (0.5)	DMF/ H <sub>2</sub> O	100	17
7	PdCl <sub>2</sub> (dppf)·CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10 mol %)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	THF/ ACN/ H <sub>2</sub> O	100	12
8	PdCl <sub>2</sub> (dppf)·CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10 mol %)	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (3)	dioxane/ H <sub>2</sub> O	90	70

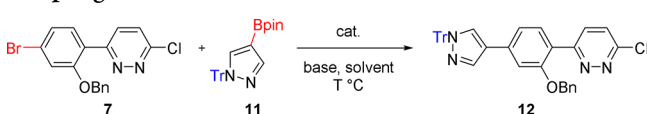
## Scheme 4. Preparation of Tritylpyrazolylboronate 11



the iminochloride moiety is resistant to Suzuki coupling, and importantly, it is much more reactive in SNAr reactions. The coupling of boronate **11** with **15** delivered adduct **16** in 53% yield.

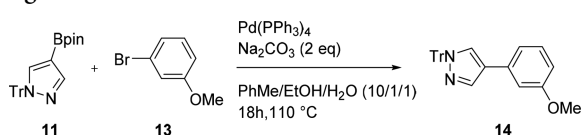
The synthesis of diamine **18** was conveniently achieved by formylation of **17** with ethyl formate and by reduction of the obtained formamide with LiAlH<sub>4</sub>. Its condensation with fluoropyridazine **16** gave aminopyridazine **19** in a satisfactory yield (56%) (Scheme 6). We originally considered performing this reaction with a chloropyridazine, but all of our attempts failed to deliver the expected adduct. Completion of the

Table 2. Optimization of the Second Suzuki–Miyaura Coupling



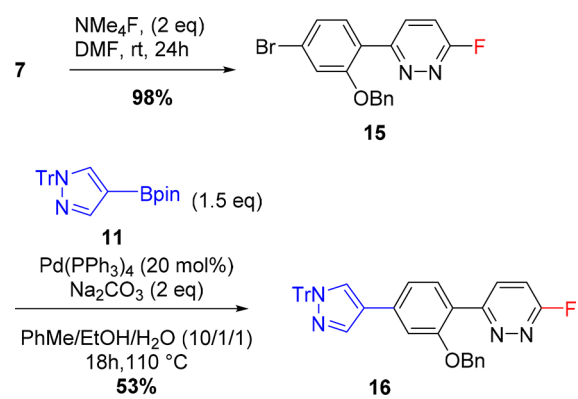
entry	catalyst	base (equiv)	solvent	T (°C)	yield (%)
1	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (3 mol %) P( <i>t</i> Bu) <sub>3</sub> (7 mol %)	KF (3.3)	THF	70	0
2	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (1 mol %) PCy <sub>3</sub> (2.4 mol %)	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (1.7)	dioxane/H <sub>2</sub> O	100	0
3	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (10 mol %)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	DME/H <sub>2</sub> O (6/3)	MW 150	28
4	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (10 mol %)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	PhMe/EtOH/H <sub>2</sub> O (10/1/1)	110	30

Table 3. Optimization of the Second Suzuki–Miyaura Using 3-Bromoanisole 13 As a Substrate



entry	11 (equiv)	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (mol %)	yield (%)
1	1.5	10	33
2	3	10	28
3	1.5	20	70

Scheme 5. Synthesis of the Advanced Intermediate

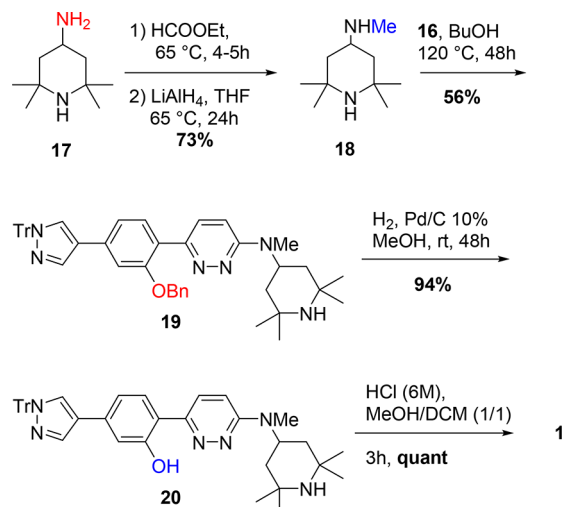


synthesis was accomplished by a double deprotection of the phenol and pyrazole moieties with a 94% yield for both steps.

In conclusion, the synthesis of NVS-SM2 has been accomplished in 9 linear steps with an overall yield of 14% (average yield 82%). It involves a few more steps than the original one; however, we optimized all of the steps, and some of them can be carried out in a very convenient manner with a near quantitative yield. For example, the conversion of 5 into 7 was performed in 2 steps with an overall yield of 98%, and the intermediate of this sequence was directly used in the second step without purification. Actually, this sequence can be easily achieved in half a day. The fluoridation (7 → 15) and deprotection (19 → 20 → 1) steps are also performed with a high yield in a very expedient manner.

Thus, this route can satisfy the global demand for NVS-SM2 to examine in detail its therapeutic potential to treat SMA and other diseases associated with alterations in RNA

Scheme 6. Endgame of the Synthesis



splicing. In addition, the efficacy of the synthesis reported herein offers an opportunity to explore further the pharmacological effects of chemical modifications in the structure of NVS-SM2.

## EXPERIMENTAL SECTION

All commercial reagents were used without purification. All of the anhydrous solvents used are commercial or are conserved on molecular sieves. All reactions sensitive to moisture or oxygen were carried out under an argon atmosphere and in flasks dried at 110 °C. Reactions were stirred with a magnetic stir bar. Temperatures for the reactions refer to bath temperatures. Reactions were monitored by TLC (0.2 mm, Merck DC Platten Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) with detection by UV light ( $\lambda = 254$  nm) and treatment with anisaldehyde and potassium permanganate stain. Melting points were recorded on an Electrothermal melting point apparatus and are uncorrected. NMR spectra were acquired on a Bruker DRX-400 spectrometer in CDCl<sub>3</sub> (referenced to 7.26 ppm for <sup>1</sup>H and 77.0 ppm for <sup>13</sup>C), (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO (referenced to 2.50 ppm for <sup>1</sup>H and 39.5 ppm for <sup>13</sup>C), or CD<sub>3</sub>OD (referenced to 3.31 ppm for <sup>1</sup>H and 49 ppm for <sup>13</sup>C) as a solvent. Coupling constants (*J*) are in Hz. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm). The multiplicities of the signals are described using the following abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet. High resolution mass spectra were recorded on a Bruker MicroTOF-Q (ESI Q-TOF) spectrometer.

**3-(4-Bromo-2-methoxyphenyl)-6-chloropyridazine (5).** 1,1'-Bis(diphenylphosphinoferrocene)-palladium(II) dichloride CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> complex (574 mg, 0.70 mmol) was added to a dioxane (19 mL)/H<sub>2</sub>O (1 mL) solution of iodopyridazine 4 (1.86 g, 7.73 mmol), boronates (3, 3') (2.2 g, 7.03 mmol), and potassium phosphate (4.48 g, 21.08 mmol) at room temperature under an argon atmosphere. (The flask was evacuated and refilled with argon five times before adding a Pd complex.) The reaction was heated at 90 °C for 16 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with EtOAc (50 mL), filtered through Celite with copious washings, and then concentrated. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, concentrated, and purified by column chromatography on silica gel using DCM (100%) as an eluent to give 5 (1.63 g, 70%) as a white solid: mp = 133–136 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.87 (3H, s), 7.16 (1H, d, *J* = 1.4 Hz), 7.26 (1H, dd, *J* = 1.4, 8.3 Hz), 7.49 (1H, d, *J* = 9 Hz), 7.84 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.98 (1H, d, *J* = 9 Hz); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  56.0, 115.0, 123.6, 124.6, 125.4, 127.2, 130.3, 132.2, 155.1, 157.1, 157.6; HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M + H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>BrClN<sub>2</sub>O 298.9581, found 298.9571.

**5-Bromo-2-(6-chloropyridazin-3-yl)phenol (6).** To a stirred solution of 5 (500 mg, 1.67 mmol) in dry DCM (50 mL) was added

$\text{BCl}_3$  (5 mL, 5 mmol, 1 M in DCM) dropwise at 0 °C under an argon atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred over 3 h at room temperature and then quenched with water. The aqueous layer was extracted with DCM (2 × 50 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated to give **6** (470 mg, 99%) as a pale-yellow solid, which was used without further purification: mp = 161–164 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.10 (1H, dd,  $J$  = 1.5, 8.5 Hz), 7.29 (1H, d,  $J$  = 1.5 Hz), 7.52 (1H, d,  $J$  = 8.5 Hz), 7.67 (1H, d,  $J$  = 9.3 Hz), 8.01 (1H, d,  $J$  = 9.3 Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  114.9, 122.4, 122.9, 125.7, 127.1, 127.5, 130.1, 155.0, 159.5, 160.5; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrClN}_2\text{O}$  284.9425, found 284.9420.

**3-[2-(Benzyloxy)-4-bromophenyl]-6-chloropyridazine (7).** To a stirred solution of phenol **6** (130 mg, 0.45 mmol) in dry DMF (1.5 mL) was added potassium carbonate (126 mg, 0.9 mmol) and then benzyl bromide (86 mg, 0.5 mmol) at room temperature under an argon atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred over 10 min at the same temperature and then diluted with DCM (15 mL). The organic layer was washed with water, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated to give chloropyridazine **7** (167 mg, 98%) as a white solid, which was used without further purification: mp = 177–180 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.12 (2H, s), 7.27–7.41 (8H, m), 7.89 (1H, d,  $J$  = 8.3 Hz), 7.98 (1H, d,  $J$  = 9 Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  71.4, 116.6, 124.1, 125.1, 125.4, 127.2, 127.5, 128.6, 128.9, 130.4, 132.5, 135.6, 155.2, 156.9, 157.1; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{BrClN}_2\text{O}$  374.9894, found 374.9883.

**4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1-trityl-1H-pyrazole (11).** To a stirred solution of 4-bromo-tritylpyrazole **10** (2 g, 5.14 mmol) and bis(pinacolato)diboron (1.44 g, 5.65 mmol) in DMF (14 mL) were added 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene-palladium(II) dichloride  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  complex (420 mg, 0.51 mmol) and potassium acetate (1.51 g, 15.42 mmol) at room temperature under an argon atmosphere. The resulting mixture was heated at 80 °C for 16 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with DCM (50 mL). The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , filtered, concentrated, and purified by column chromatography on silica gel using pentane/ $\text{Et}_2\text{O}$  (10/0 to 8/2) as an eluent to give boronate **11** (1.8 g, 75%) as a white solid: mp = 190–193 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.33 (12H, s), 7.13–7.20 (6H, d, m), 7.28–7.34 (9H, d, m), 7.79 (1H, s), 7.98 (1H, s);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  24.9, 78.8, 83.4, 127.7, 127.8, 130.2, 138.8, 143.2, 145.9; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{BN}_2\text{NaO}_2$  459.2214, found 459.2210.

**3-(2-(Benzyloxy)-4-(1-trityl-1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-6-chloropyridazine (12).**  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (31 mg, 0.027 mmol) was added to a stirred solution of chloropyridazine **7** (100 mg, 0.27 mmol), boronate **11** (174 mg, 0.40 mmol), and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (117 mg, 0.53 mmol) in PhMe (3 mL)/EtOH (0.3 mL)/ $\text{H}_2\text{O}$  (0.3 mL) at room temperature under an argon atmosphere. (The flask was purged five times with argon before adding the Pd complex). The resultant mixture was stirred at the same temperature for 5 min and then at 110 °C for 18 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with EtOAc (25 mL). The organic layer was washed with water and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , concentrated, and purified by column chromatography on silica gel using pentane/ $\text{Et}_2\text{O}$  (8/2 to 5/5) as an eluent to give chloropyridazine **12** (50 mg, 30%) as a white solid: mp = 216–219 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.07 (2H, s), 7.05 (1H, d,  $J$  = 0.9 Hz), 7.07–7.20 (8H, m), 7.21–7.35 (14H, m), 7.60 (1H, s), 7.88 (1H, s), 7.90 (1H, d,  $J$  = 8 Hz), 7.96 (1H, d,  $J$  = 9 Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  71.1, 79.1, 110.2, 119.1, 121.0, 123.0, 127.0, 127.5, 127.9, 128.0, 128.3, 128.8, 129.6, 130.2, 130.5, 131.7, 136.3, 137.4, 143.0, 154.7, 156.9, 157.6; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{39}\text{H}_{30}\text{ClN}_4\text{O}$  605.2103, found 605.2108.

**4-(3-Methoxyphenyl)-1-trityl-1H-pyrazole (14).** The title compound was prepared similarly to the synthesis of chloropyridazine **12** starting from 3-bromoanisole **13** (80 mg, 0.054 mmol), boronate **11** (281 mg, 0.64 mmol), sodium carbonate (91 mg, 0.86

mmol),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (100 mg, 0.086 mmol), and PhMe (3 mL)/EtOH (0.3 mL)/ $\text{H}_2\text{O}$  (0.3 mL). The crude product was purified by chromatography on silica gel using pentane/ $\text{Et}_2\text{O}$  (10/0 to 80/20) as an eluent to give pyridazine **14** (126 mg, 70%) as a white solid: mp = 120–123 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.82 (3H, s), 6.75 (1H, ddd,  $J$  = 1.0, 2.6, 8.4 Hz), 7.96 (1H, dd,  $J$  = 1.4, 2.6 Hz), 7.03 (1H, ddd,  $J$  = 1, 1.4, 7.7 Hz), 7.20–7.25 (7H, m), 7.30–7.35 (9H, m), 7.61 (1H, d,  $J$  = 0.8 Hz), 7.93 (1H, d,  $J$  = 0.8 Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  55.3, 78.9, 111.4, 111.6, 118.2, 121.5, 127.8, 127.9, 129.3, 129.8, 130.2, 134.0, 137.3, 143.1, 160.0; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{NaO}$  439.1786, found 439.1768.

**3-[2-(Benzyloxy)-4-bromophenyl]-6-fluoropyridazine (15).** To a stirred solution of chloropyridazine **7** (750 mg, 1.99 mmol) in dry DMF (12 mL) was added anhydrous  $\text{NMe}_4\text{F}$  (375 mg, 3.98 mmol) at room temperature under an argon atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred at the same temperature for 24 h before it was diluted with DCM (70 mL). The organic layer was washed with water (3 × 120 mL) and brine (1 × 100 mL), dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated to give fluoropyridazine **15** (700 mg, 98%) as a white solid, which was used without further purification: mp = 167–170 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.12 (2H, s), 7.13 (1H, dd,  $J$  = 1.5, 9.2 Hz), 7.27–7.40 (7H, m), 7.8 (1H, d,  $J$  = 8.2 Hz), 8.12 (1H, dd,  $J$  = 7.5, 8.2 Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  71.3, 114.7 (d,  $J$  = 33 Hz), 116.5, 124.2, 125.1, 125.2, 127.5, 128.6, 128.9, 132.5, 133.7 (d,  $J$  = 7 Hz), 135.6, 156.7, 157.6 (d,  $J$  = 2.7 Hz), 165.7 (d,  $J$  = 245 Hz);  $^{19}\text{F}$  NMR decoupled  $^1\text{H}$  (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -81.27 (1F, s);  $^{19}\text{F}$  NMR coupled  $^1\text{H}$  (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -81.27 (1F, d,  $J$  = 7.5 Hz); HRMS (ESI-TOF)  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{BrFN}_2\text{O}$  359.0190, found 359.0192.

**3-[2-(Benzyloxy)-4-(1-trityl-1H-pyrazol-4-yl)phenyl]-6-fluoropyridazine (16).** The title compound was prepared similarly to the synthesis of chloropyridazine **12** starting from fluoropyridazine **15** (200 mg, 0.55 mmol), boronate **11** (364 mg, 0.83 mmol), sodium carbonate (117 mg, 1.1 mmol),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (129 mg, 0.11 mmol), and PhMe (5 mL)/EtOH (0.5 mL)/ $\text{H}_2\text{O}$  (0.5 mL). The crude product was purified by chromatography on silica gel using pentane/ $\text{Et}_2\text{O}$  (8/2 to 5/5) as an eluent to give fluoropyridazine **16** (172 mg, 53%) as a white solid: mp = 203–206 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.19 (2H, s), 7.13 (1H, dd,  $J$  = 1.5, 9.2 Hz), 7.18 (7H, d,  $J$  = 1.5 Hz), 7.22 (1H, d,  $J$  = 8.3 Hz), 7.24–7.3 (6H, m), 7.32–7.43 (14H, m), 7.73 (1H, s), 7.99 (1H, dd,  $J$  = 1.4, 8.2 Hz), 8.00 (1H, s), 8.21 (1H, dd,  $J$  = 7.5, 8.3 Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  71.1, 79.1, 110.2, 114.5 (d,  $J$  = 33 Hz), 119.1, 121.0, 123.1, 127.4, 127.9, 128.0, 128.3, 128.7, 129.5, 130.2, 131.8, 133.6 (d,  $J$  = 6.8 Hz), 136.1, 132.3, 137.5, 143.0, 156.6, 158.1 (d,  $J$  = 2.5 Hz), 165 (d,  $J$  = 244 Hz);  $^{19}\text{F}$  NMR decoupled  $^1\text{H}$  (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -81.99;  $^{19}\text{F}$  NMR coupled  $^1\text{H}$  (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -81.99 (dd,  $J$  = 1.4, 7.5 Hz); HRMS (ESI-TOF)  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{39}\text{H}_{29}\text{FN}_4\text{O}$  589.2398, found 589.2395.

**N,2,2,6,6-Pentamethylpiperidin-4-amine (18).** A solution of **17** (4.4 mL, 0.026 mmol) in ethyl formate (6.5 mL, 0.078 mmol) was heated at 65 °C for 4–5 h. The resulting thick, white suspension was cooled to room temperature and filtered. After the filter cake was washed with EtOAc (20 mL), the solid was dried under a vacuum to give 3.8 g (79% yield) of *N*-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)formamide, which was used directly in the next step. A 250 mL round-bottom flask equipped with a large Teflon-coated stir bar was charged with  $\text{LiAlH}_4$  (1.17 g, 31 mmol), fitted with a reflux condenser, and purged with argon. THF (40 mL) was added, and the resulting suspension was cooled to 0 °C. *N*-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)formamide (3.8 g, 20.6 mmol) was added in portions over 10 min (CAUTION: hydrogen gas evolution). The cooling bath was replaced with an oil bath, and the colorless solution was heated at 65 °C for 24 h under a slow stream of argon. The resulting white suspension was cooled to 0 °C and then carefully quenched by the dropwise addition of water (10 mL; CAUTION: violently exothermic reaction, evolution of hydrogen gas) followed by a 20% aq NaOH solution (20 mL).



The resulting suspension was stirred at room temperature for 15 min. MeOH (40 mL) was added, and then the mixture was filtered on Celite. The filtrate was concentrated, and then the residue was dissolved with EtOAc (50 mL). The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated to give diamine **18** (3.25 g, 93%) as a yellow liquid, which was used without further purification:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  0.72 (2H, t,  $J = 11.8$  Hz), 1.00 (6H, s), 1.09 (6H, s), 1.68 (2H, dd,  $J = 3.4, 12.3$  Hz), 2.26 (3H, s), 2.6 (1H, tdd,  $J = 3.5, 11.5, 11.5$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  28.5, 32.5, 34.3, 44.5, 49.7, 50.6; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{N}_2$  171.1856, found 171.1853.

**6-[2-(Benzyloxy)-4-(1-trityl-1H-pyrazol-4-yl)phenyl]-N-methyl-N-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)pyridazin-3-amine (19).** To a stirred solution of **16** (230 mg, 0.39 mmol) in butan-1-ol (4 mL) was added diamine **18** (133 mg, 0.78 mmol) at room temperature under an argon atmosphere. The mixture was heated at 120 °C for 48 h. After the mixture was cooled to room temperature, butan-1-ol was removed using a rotary evaporator, and then the residue was diluted with DCM (50 mL). The organic layer was washed with water, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , filtered, concentrated, and purified by flash chromatography on silica gel using DCM/MeOH (10/0 to 8/2) as an eluent to give **19** (160 mg, 56%) as a yellow solid: mp = 105–108 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.18 (6H, s), 1.35 (6H, s), 1.38 (2H, m), 1.70 (2H, dd,  $J = 2.1, 12$  Hz), 2.96 (3H, s), 5.13 (2H, s), 5.15 (1H, m), 6.72 (1H, d,  $J = 9.7$  Hz), 7.07 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz), 7.14 (1H, dd,  $J = 1.3, 8$  Hz), 7.17–7.25 (6H, m), 7.28–7.4 (14H, m), 7.63 (1H, s), 7.84 (1H, d,  $J = 9.5$  Hz), 7.92 (1H, s), 7.98 (1H, d,  $J = 8$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  28.8, 29.2, 35.3, 41.9, 47.5, 51.5, 71.0, 79.0, 110.4, 119.0, 121.4, 125.3, 127.3, 127.8, 127.9, 128.6, 129.2, 129.4, 130.2, 130.9, 134.1, 137.0, 137.4, 143.1, 149.1, 156.3, 158.2; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{49}\text{H}_{51}\text{N}_6\text{O}$  739.4119, found 739.4138.

**2-[6-[Methyl(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)amino]pyridazin-3-yl]-5-(1-trityl-1H-pyrazol-4-yl)phenol (20).** To a stirred solution of **19** (110 mg, 0.15 mmol) in MeOH (7 mL) was added a catalytic amount of 10% palladium on carbon under a  $\text{H}_2$  atmosphere. The mixture was stirred for 48 h at room temperature and then filtered on Celite. The filtrate was concentrated and purified by flash chromatography on silica gel using DCM/MeOH (10/0 to 8/2) as an eluent to give phenol **20** (90 mg, 94%) as a yellow solid: mp = 132–135 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.18 (6H, s), 1.35 (6H, s), 1.40 (2H, t,  $J = 12.3$  Hz), 1.69 (2H, dd,  $J = 2, 12$  Hz), 3.00 (3H, s), 4.88 (1H, m), 6.98 (1H, d,  $J = 9.8$  Hz), 7.01 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 7.11 (1H, s), 7.16–7.23 (6H, m), 7.29–7.37 (9H, m), 7.52 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz), 7.66 (1H, s), 7.92 (1H, s), 7.79 (1H, d,  $J = 9.8$  Hz), 7.98 (1H, s);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  28.9, 29.4, 35.3, 42.0, 48.4, 51.5, 79.1, 113.9, 114.8, 116.0, 116.8, 121.2, 124.5, 125.4, 128.0, 129.7, 130.3, 134.8, 137.5, 143.2, 151.6, 157.9, 159.4; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{42}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{O}$  649.3649, found 649.3634.

**2-[6-[Methyl(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)amino]pyridazin-3-yl]-5-(1H-pyrazol-4-yl)phenol (NVS-SM2, 1).** To a stirred solution of **20** (80 mg, 0.12 mmol) in THF (2 mL)/MeOH (2 mL) was added 2 mL of HCl (6M) at room temperature. The mixture was stirred at the same temperature. After 3 h, the solvents were removed using a rotary evaporator. The yellow product obtained in salt form was dissolved in DCM/MeOH (50/50) and neutralized with the addition of solid  $\text{NaHCO}_3$ . Then the mixture was filtered through Celite. The filtrate was concentrated and purified by flash chromatography using DCM/MeOH (10/0 to 8/2) as eluent to give NVS-SM2 (**1**) (48 mg, quant) as a yellow solid: mp = 146–149 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$  1.22 (6H, s), 1.35 (6H, s), 1.48–1.65 (4H, m), 2.87 (3H, s), 4.98 (1H, m), 7.04–7.17 (3H, m), 7.59 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz), 7.89 (1H, d,  $J = 9.4$  Hz), 7.97 (2H, s);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta$  27.5, 29.8, 33.6, 41.3, 54, 115, 116.3, 117.2, 117.6, 123, 126.4, 127.3, 136.2, 152.8, 159.2, 159.9; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}$  407.2554, found 407.2550.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.joc.7b03009.

Spectral data for the compounds (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: [desaubry@unistra.fr](mailto:desaubry@unistra.fr).

### ORCID

Laurent Désaubry: 0000-0002-1192-2970

### Present Address

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

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de l’Innovation” for a fellowship to H.A.-H.

## ■ REFERENCES

- (1) Palacino, J.; Swalley, S. E.; Song, C.; Cheung, A. K.; Shu, L.; Zhang, X.; Van Hoosear, M.; Shin, Y.; Chin, D. N.; Keller, C. G.; Beibel, M.; Renaud, N. A.; Smith, T. M.; Salcius, M.; Shi, X.; Hild, M.; Servais, R.; Jain, M.; Deng, L.; Bullock, C.; McLellan, M.; Schuierer, S.; Murphy, L.; Blommers, M. J.; Blaustein, C.; Berenshteyn, F.; Lacoste, A.; Thomas, J. R.; Roma, G.; Michaud, G. A.; Tseng, B. S.; Porter, J. A.; Myer, V. E.; Tallarico, J. A.; Hamann, L. G.; Curtis, D.; Fishman, M. C.; Dietrich, W. F.; Dales, N. A.; Sivasankaran, R. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 511–517.
- (2) Cheung, A.; Chin, D. N.; Dales, N.; Fazal, A.; Hurley, T. B.; Kerrigan, J.; O’Brien, G.; Shu, L.; Sun, R.; Sung, M. Patent WO2014028459A1.
- (3) Murata, M.; Watanabe, S.; Masuda, Y. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6458–6459.
- (4) We considered starting our synthesis with a reagent protected by a benzyl, but the borylation step (similar to **2** → **3** and **3'**) did not afford the expected compound.
- (5) Kudo, N.; Perseghini, M.; Fu, G. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1282–1284.
- (6) Littke, A. F.; Dai, C.; Fu, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4020–4028.
- (7) Amatore, C.; Jutand, A.; Le Duc, G. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 6616–6625.
- (8) Aryl bromides have been shown to afford a higher yield than the cognate triflates on these types of substrates: Yang, Y.; Oldenhuis, N. J.; Buchwald, S. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 615–619.
- (9) Schimler, S. D.; Ryan, S. J.; Bland, D. C.; Anderson, J. E.; Sanford, M. S. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 12137–121.

## Publication N° 2

Recent advances in the synthesis of flavaglines, a family of potent bioactive natural compounds originating from traditional Chinese medicine

Zhao, Q.; Abou-Hamdan, H.; Désaubry, L., *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 5908-5916.

## Total Synthesis

## Recent Advances in the Synthesis of Flavaglines, a Family of Potent Bioactive Natural Compounds Originating from Traditional Chinese Medicine

Qian Zhao,<sup>[a]</sup> Hussein Abou-Hamdan,<sup>[a]</sup> and Laurent Désaubry\*<sup>[a,b]</sup>

**Abstract:** Flavaglines constitute a distinctive family of plant metabolites isolated from medicinal plants of the genus *Aglaiia*. These compounds exhibit a broad spectrum of distinctive pharmacological properties, including anti-inflammatory, neuroprotective, cardioprotective, and anticancer activities. These natural cyclopenta[*b*]benzofurans are characterized by densely functionalized tricyclic frameworks, as exemplified by the structures

of rocaglamide or silvestrol, which makes them extremely attractive targets for total synthesis, in addition to their therapeutic potential. In this review we describe the various synthetic approaches to the total synthesis of flavaglines, culminating in a new generation of diastereo- and enantioselective total syntheses.

## 1. Introduction

In the post-genomics era, natural products continue to be a major source of inspiration for the development of new medicines, especially in oncology. Indeed, fourteen natural product derivatives were approved for treatment of cancer between 2007 and 2013.<sup>[1]</sup> This context, coupled with major discoveries in cell biology, explains the renewed interest in the pharmacological potential of flavaglines to treat cancer.<sup>[2]</sup> Flavaglines are a unique class of natural compounds characterized by a cyclopenta[*b*]benzofuran scaffold. In nature they have so far exclusively been found in plants of the genus *Aglaiia*. These compounds were first identified by King and colleagues in 1982.<sup>[3]</sup> This Taiwanese group determined the structure of rocaglamide (**1**, Figure 1) and demonstrated its antileukemic activity. It took 20 years to identify the molecular target. We now know that flavaglines display their pharmacological effects due to their

binding to prohibitins-1 and 2 (PHB1/2) and the translation initiation factor eIF4A.<sup>[4]</sup> These discoveries greatly accelerated the

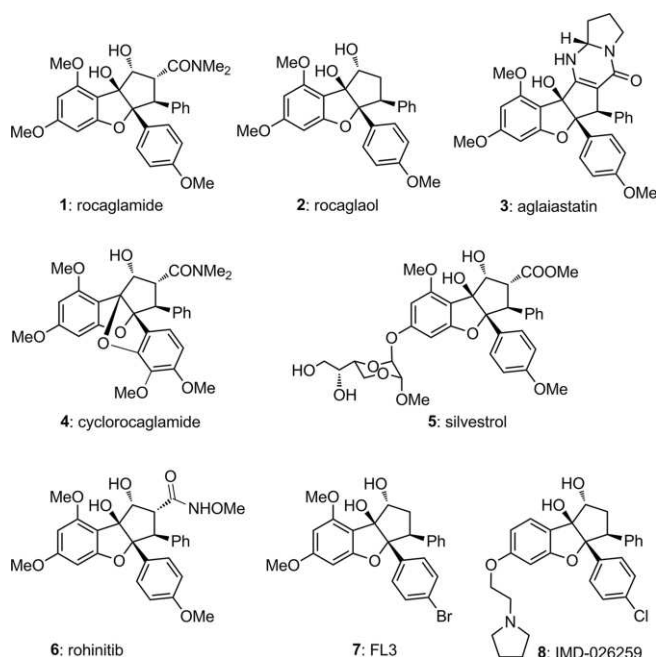


Figure 1. Selected examples of natural (**1–5**) and synthetic (**6–8**) flavaglines.

[a] *Laboratory of Therapeutic Innovation (UMR 7200), Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg-CNRS, Illkirch, France*  
E-mail: [desaubry@unistra.fr](mailto:desaubry@unistra.fr)  
<http://desaubry.u-strasbg.fr>

[b] *Sino-French Joint Lab of Food Nutrition/Safety and Medicinal Chemistry, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, P. R. China*



Laurent Désaubry (center) obtained a Ph.D. degree in medicinal chemistry in 1992 from the University Louis Pasteur in Strasbourg. From 1993 to 1996 he was a postdoctoral fellow at SUNY at Stony Brook under the mentorship of Prof. Roger A. Johnson. In 2007 he returned to France as a postdoctoral fellow in the laboratory of Prof. Pierre Chambon at the University of Strasbourg, before obtaining the position of CNRS Research Senior Scientist at the same university. He was promoted to the position of CNRS research director in 2014, and also became an adjunct professor in 2015 at the Tianjin University of Science and Technology (TUST) in China. Qian Zhao (right) received a B.S. degree in 2009 from Dalian Medical University, China, and a M.S. degree in 2012 from the University of Rennes, France. She is currently preparing her Ph.D. under the guidance of Laurent Désaubry.

Hussein Abou-Hamdan (left) received a B.S. degree in 2013 from the Lebanese University in Beirut and a M.S. degree in 2015 from Paris-Sud University. He is currently preparing his Ph.D. under the guidance of Laurent Désaubry.

pharmacological investigation of these drugs, principally for the treatment of cancer, but also in the context of other ailments including neurological, cardiac, and inflammatory diseases. Their most striking feature is that they induce the death of cancer cells and promote the survival of non-cancer cells against many stresses at nanomolar and subnanomolar concentrations.<sup>[2]</sup> The reasons for this unusual pharmacological profile remain enigmatic, but these compounds are attracting the attention of a growing number of scientists.

Since the discovery of rocaglamide, more than one hundred other natural flavaglines, such as rocaglaol (**2**), aglaiastatin (**3**), cyclorocaglamide (**4**), and silvestrol (**5**), have been found (Figure 1). In addition, several synthetic, pharmacologically active analogues have been developed. The most intensively studied of these are rohinitib (**6**), FL3 (**7**), and IMD-026259 (**8**). Rohinitib displays anticancer<sup>[5]</sup> and antiviral effects.<sup>[6]</sup> It also prevents hair loss (alopecia) induced by chemotherapies.<sup>[7]</sup> FL3 exhibits potent anticancer,<sup>[4b,8]</sup> cardioprotective,<sup>[9]</sup> anti-Parkinsonian,<sup>[10]</sup> anti-inflammatory,<sup>[11]</sup> and antiviral properties.<sup>[12]</sup> It also protects the heart<sup>[9]</sup> and neurons<sup>[10]</sup> against the adverse effects of cancer chemotherapies. IMD-026259 (**8**, Figure 1) is a promising pre-clinical candidate developed by the German biotech company IMD Natural Solutions to treat Parkinson's disease.<sup>[13]</sup>

A histogram of publications on flavaglines reflects the growing interest in these compounds (Figure 2). The identification of their molecular targets (the scaffold proteins "prohibitins" and the protein synthesis initiation factor eIF4A), coupled with several recent articles in *Science*<sup>[5b]</sup> and *Nature*<sup>[5a,8d]</sup> on their extraordinary anticancer effects, have provided supporting evi-

dence of their therapeutic potential and stimulated an intense effort to develop additional synthetic flavaglines.

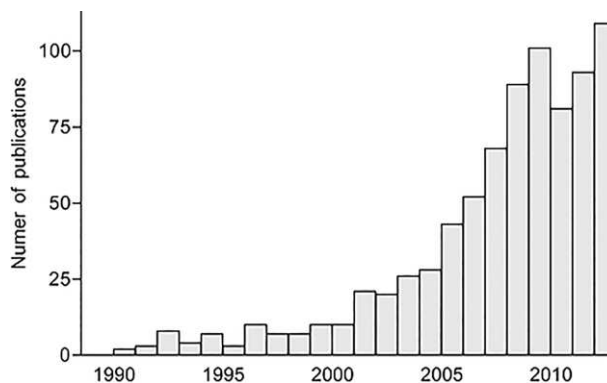


Figure 2. Histogram of publications on flavaglines (Scifinder, CAPLUS database).

With their high density of functionality, which includes the two contiguous quaternary chiral centers C-3a and C-8b, the total synthesis of flavaglines represents a challenge that has attracted the attention of some of the most prominent chemists. Over the last years, several reviews have described the identification, synthesis, and pharmacological activities of flavaglines.<sup>[2,14]</sup> The purpose of this article is to provide an updated presentation of their total syntheses. Much effort has also been spent on preparing analogues for medicinal chemistry studies, but that is beyond the scope of this review. This report

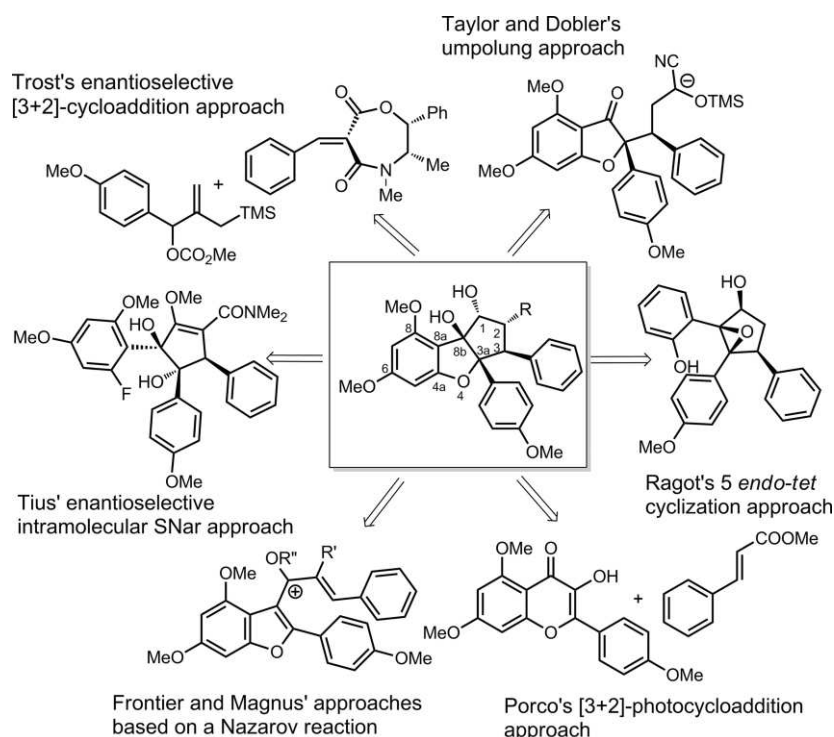


Figure 3. Approaches to the total synthesis of flavaglines.



is organized according to synthetic strategies to create the flavagline skeleton, as illustrated in Figure 3.

## 2. Trost's Enantioselective [3+2] Cycloaddition Approach

With the synthesis of rocaglamide (**1**) in 1990, Trost et al. disclosed the first total synthesis of a flavagline.<sup>[15]</sup> Their strategy was based on the enantioselective [3+2] cycloaddition between **10** and the chiral oxazepinedione **9** to give the cyclopentene **11** (Scheme 1). Cleavage of the chiral auxiliary and ozonolysis gave the cyclopentanone **12**, which was condensed with 3,5-dimethoxyphenol to provide cyclopentene **13**.

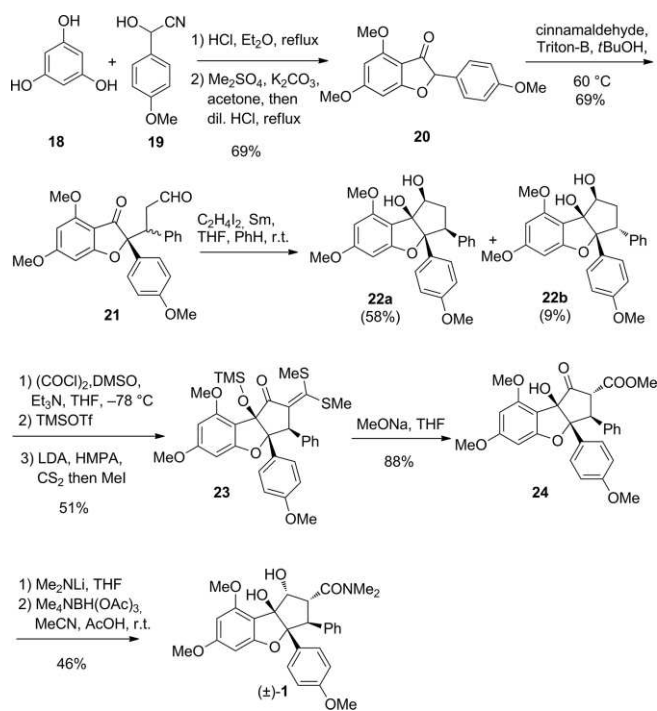
Monotransesterification with benzyl alcohol, followed by oxidative ring-closure mediated by DDQ, gave rise to the intermediate **14**, which has the basic skeleton of the flavaglines, but with the wrong relative configuration at C-3a and C-3. After catalytic hydroxylation, Moffatt–Doering oxidation, silylation, and decarbobenzoylation, the stereochemistry of protected intermediate **16** was adjusted by its oxidation into enone **17**, followed by a catalytic hydrogenation. Subsequent deprotection and amidation under Weinreb's conditions efficiently completed the total synthesis of rocaglamide. This accomplishment also established the absolute stereochemistry of this natural compound.

## 3. Taylor and Dobler's Umpolung Approaches

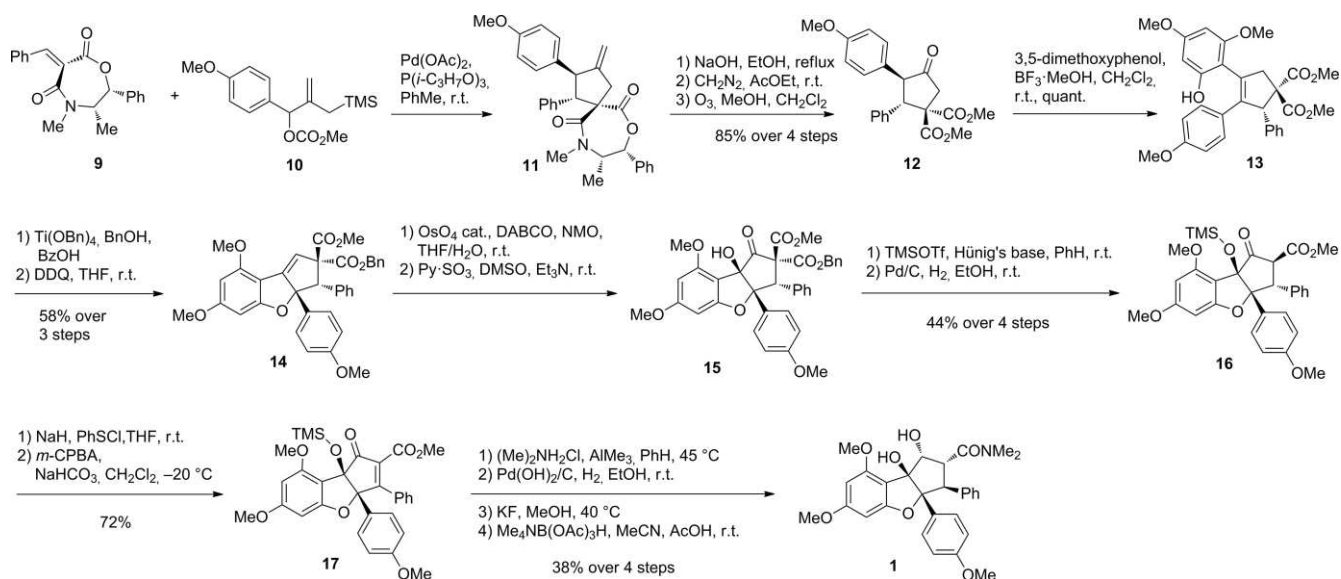
One year after Trost's accomplishment, Taylor and co-workers developed a shorter racemic synthesis of rocaglamide,<sup>[16]</sup> which was later improved by the groups of Dobler and Qin.<sup>[17]</sup>

Taylor's synthesis commenced with a Hoesch reaction between cyanohydrin **19** and phloroglucinol **18** to prepare benzo-

furanone **20** (Scheme 2).<sup>[16a]</sup> A Michael addition with *trans*-cinnamaldehyde gave rise to the adduct **21**. A straightforward SmI<sub>2</sub>-mediated pinacol coupling of this keto aldehyde generated, with good diastereoselectivity (6:1), *epi*-rocaglaol **22a** and its epimer **22b**, which could be separated. Completion of the synthesis was accomplished in six steps, including a Swern oxidation, the generation of a ketene dithioacetal, its transformation into an amide via an ester, and a diastereoselective NMe<sub>4</sub>BH(OAc)<sub>3</sub>-mediated reduction.

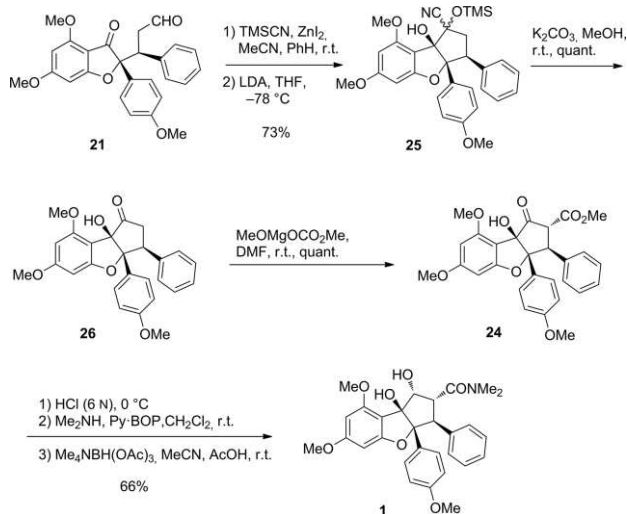


Scheme 2. Taylor's synthesis of racemic rocaglamide (**1**).<sup>[16]</sup>



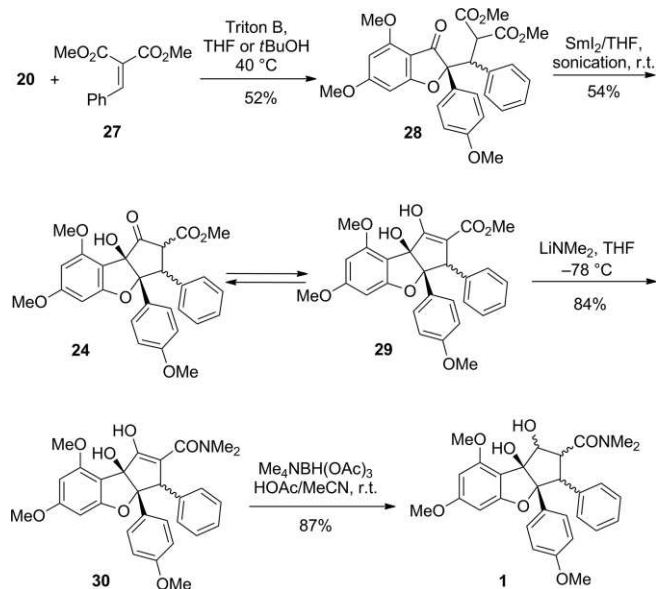
Scheme 1. First (and enantioselective) total synthesis of a flavagline (rocaglamide), by Trost et al.<sup>[15]</sup>

This elegant and efficient strategy was later improved by Dobler and colleagues, who replaced  $\text{Sml}_2$ -induced cyclization by an umpolung reaction with cyanohydrin **25** to generate the cyclopentanone **26** (Scheme 3). The carboxyl moiety was then straightforwardly introduced by use of the Stiles reagent, which circumvented the ketene dithioacetal intermediate.



Scheme 3. Dobler's synthesis of racemic rocaglamide.<sup>[17a]</sup>

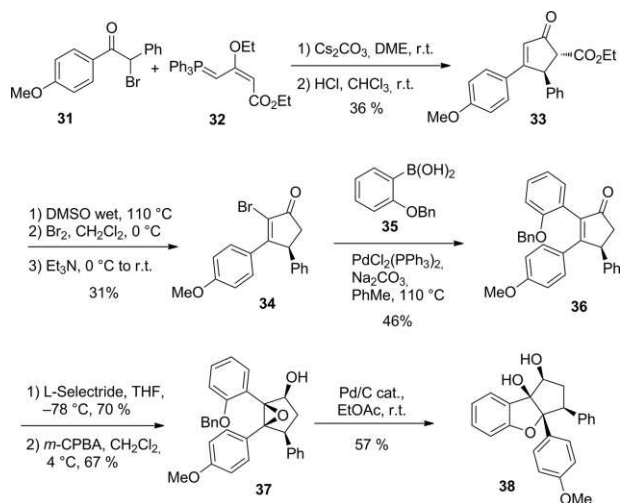
In 2008, Qin and his group further shortened the number of steps by using the benzylidenemalonate **27** as a Michael acceptor to generate keto-diester **28**, which was then able to undergo an  $\text{Sml}_2$ -induced cyclization (Scheme 4).<sup>[17b]</sup> Amidation and reduction of the  $\beta$ -ketoamide furnished a diastereomeric mixture of cyclopenta[*b*]benzofurans in only four steps from benzofuranone **20**.



Scheme 4. Qin's synthesis of racemic rocaglamide.<sup>[17b]</sup>

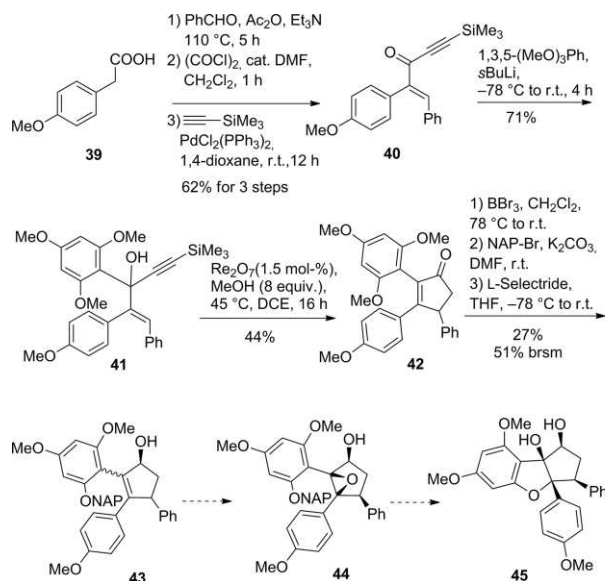
## 4. Rago's 5 *endo-tet* Cyclization Approach

In 2004, Rago's group developed a strategy based on the intramolecular 5 *endo-tet* cyclization of a phenolic epoxide to generate the flavagline skeleton (Scheme 5).<sup>[18]</sup> Their synthesis began with the condensation of bromoketone **31** and triphenylphosphorane **32** to provide cyclopentenone **33**. After decarboxylation and bromination,  $\alpha$ -bromoenone **34** was engaged in a Suzuki reaction with boronate **35** to give rise to enone **36**. Diastereoselective reduction and epoxidation of **36** yielded key intermediate **37**, which underwent spontaneous cyclization into didemethoxyrocaglaol **38** triggered by phenol deprotection.



Scheme 5. Rago's synthesis of the flavagline skeleton.<sup>[18]</sup>

We tried to use this approach to synthesize rocaglaol (**2**), which bears the methoxy groups necessary for pharmacological activity (Scheme 6).<sup>[19]</sup> Our synthesis of the cyclopentenone core commenced with a Perkin reaction between carboxylic acid **39** and benzaldehyde, followed by a Sonogashira coupling to deliver ketone **40** solely as the *E* isomer. This was treated



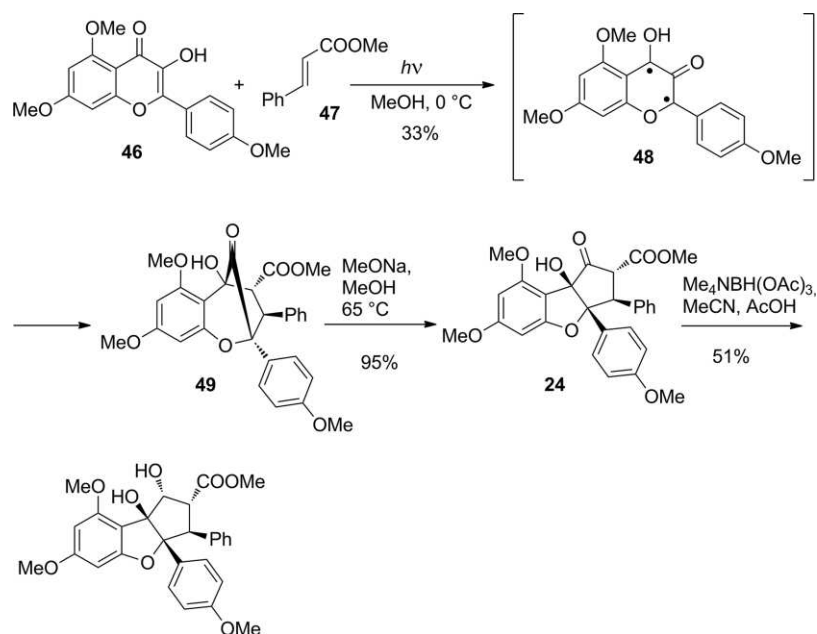
Scheme 6. Désaubry's attempt to synthesize rocaglaol.<sup>[19]</sup>

with lithiated trimethoxybenzene to provide carbinol **41**, which easily underwent an unprecedented annulation reaction in acidic medium to give, in only one step, the adduct cyclopentanone **42** with a 44 % yield.<sup>[20]</sup> Finally, selective demethylation, protection with a 2-naphthylmethyl (NAP) group (which can be easily removed by hydrogenolysis), and ketone reduction afforded the intermediates **43** as a pair of atropoisomers. Extensive trials directed towards transforming these compounds into epirocaglaol **45** via epoxide **44** were unfruitful, suggesting that the scope of Ragot's method is narrow. Indeed, their later article and patent only report the use of  $\text{SmI}_2$ -mediated pinacol coupling to synthesize pharmacologically active flavaglines.<sup>[21]</sup>

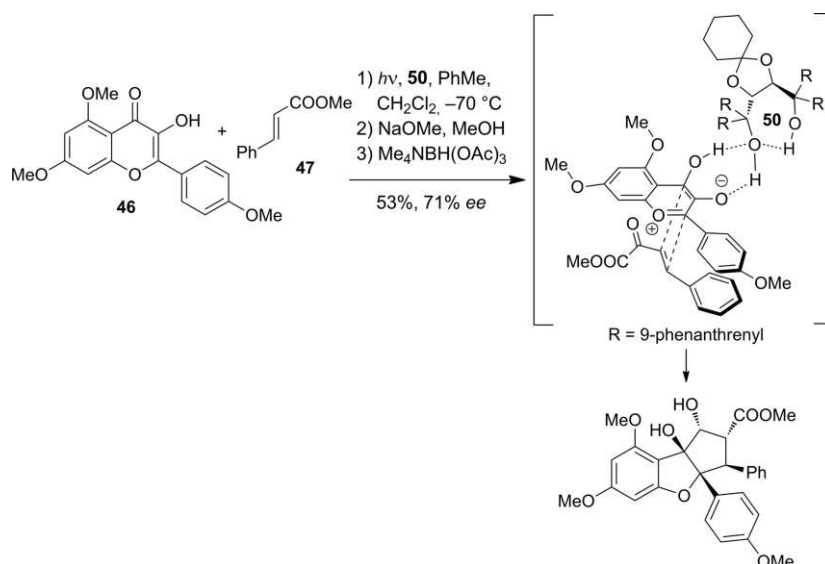
## 5. Porco's [3+2] Photocycloaddition Approach

In 2004, Porco and co-workers disclosed a brilliant synthesis of flavaglines inspired by the biosynthesis previously published by Proksch (Scheme 7).<sup>[14f]</sup> The key step of this approach was an original photochemical [3+2] cycloaddition between 3-hydroxyflavone **46** and cinnamic ester **47**, involving photoexcited triplet biradical **48**, to furnish again **49**.<sup>[22]</sup> This was treated with sodium methoxide to provide flavagline **24** (Scheme 2) through a  $\beta$ -acyloin rearrangement.

These authors later applied this elegant [3+2] photocycloaddition to a variety of dipolarophiles,<sup>[23]</sup> and made this trans-



Scheme 7. Porco's biomimetic synthesis of flavaglines.<sup>[22]</sup>



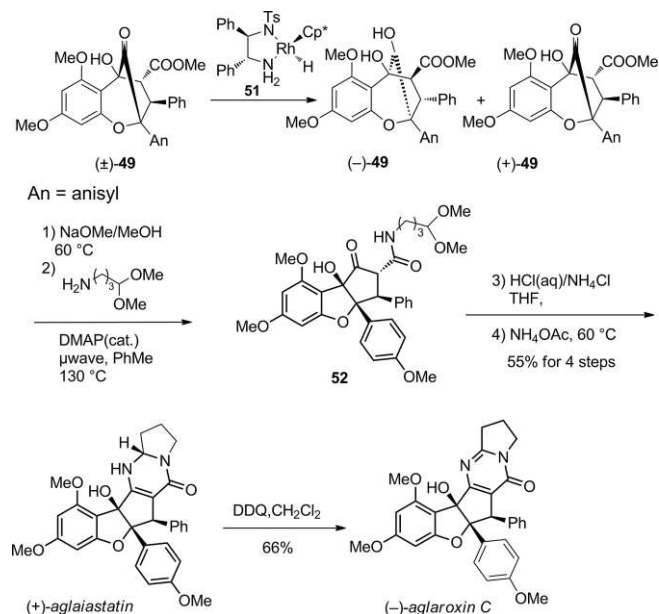
Scheme 8. Porco's enantioselective synthesis of flavaglines.<sup>[24a]</sup>

formation enantioselective by using TADDOL derivative **50** (Scheme 8).<sup>[24a]</sup> Another improvement to this reaction was disclosed by Tremblay and colleagues, who used flow chemistry to produce ten grams of racemic photoadducts in only a few hours.<sup>[25]</sup>

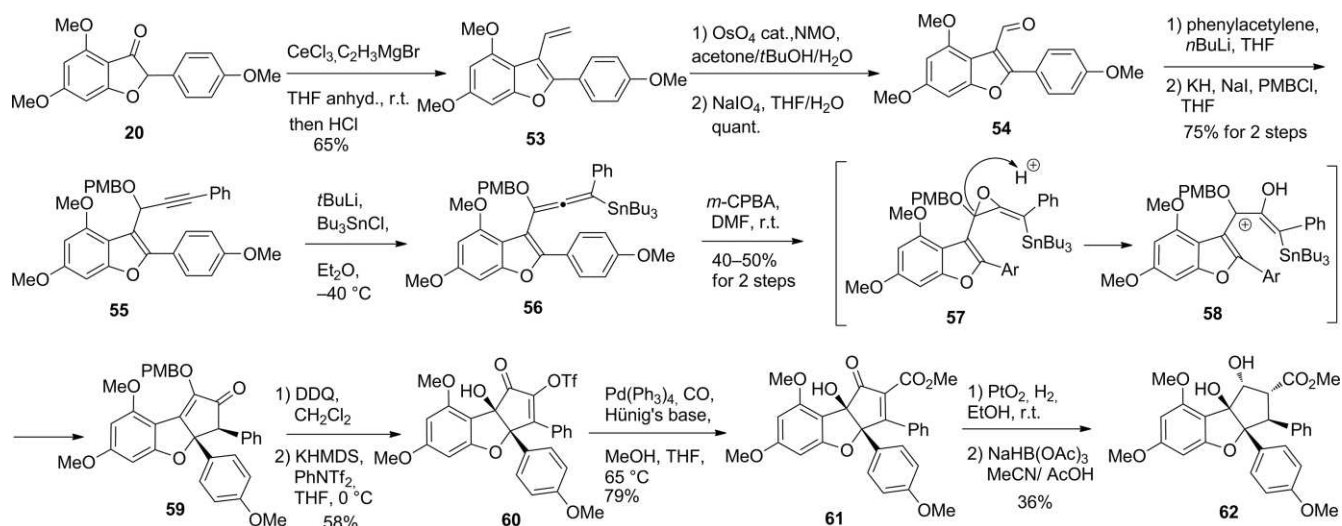
More recently, Porco and co-workers developed a kinetic resolution of the bridged ketone **49** utilizing an enantioselective transfer hydrogenation catalyzed by the Rh<sup>III</sup> complex **51** (Scheme 9).<sup>[24b]</sup> This approach was efficiently applied to the asymmetric synthesis of (+)-aglaiastatin and (-)-aglaroxin C.

## 6. Frontier's and Magnus' Approaches Based on a Nazarov Reaction

The approach of Frontier and co-workers to fashioning the flavagline skeleton elegantly exploited an original Nazarov-type



Scheme 9. Porco's kinetic-resolution-based asymmetric synthesis of (+)-aglaiastatin and (-)-aglaroxin C.<sup>[24b]</sup>



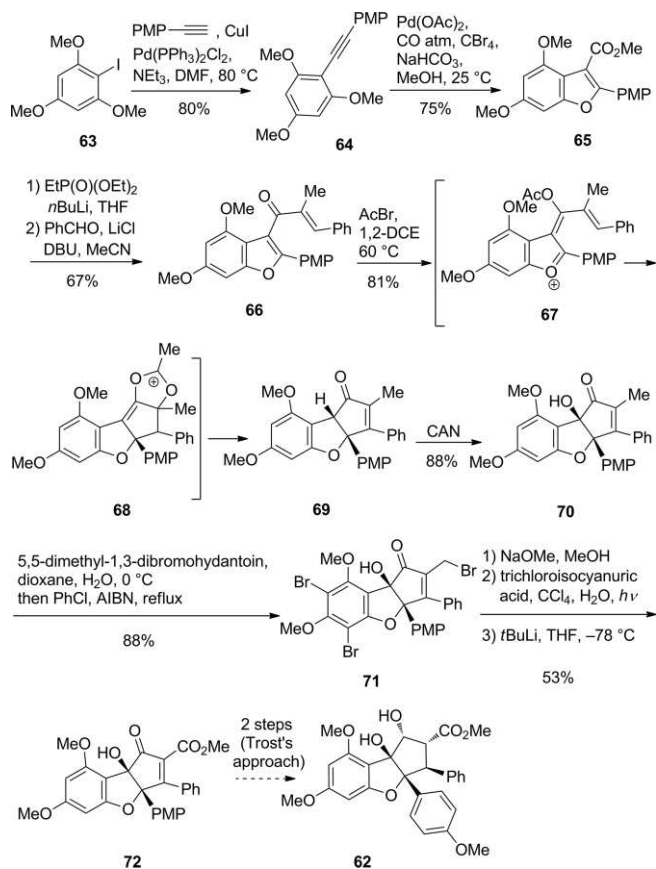
Scheme 10. Frontier's synthesis of racemic rocaglamide based on a Nazarov reaction.<sup>[26]</sup>

reaction designed for this purpose (Scheme 10).<sup>[26]</sup> Their synthesis began with the homologation of benzofuranone **20** to provide aldehyde **54** in three steps. Alkylation with phenylacetylene and protection of the alcohol gave propargyl ether **55**, which was then deprotonated and quenched with *n*Bu<sub>3</sub>SnCl to give stannyl alkoxyallene **56**. Epoxidation of this with *m*-CPBA generated a transient epoxide that underwent further transformation to establish the flavagline skeleton through an atypical Nazarov reaction. Deprotection, conversion into a triflate, and Pd-mediated carbonylation yielded dehydroflavagline **61**. The strategy was completed in two more steps by Trost's approach.

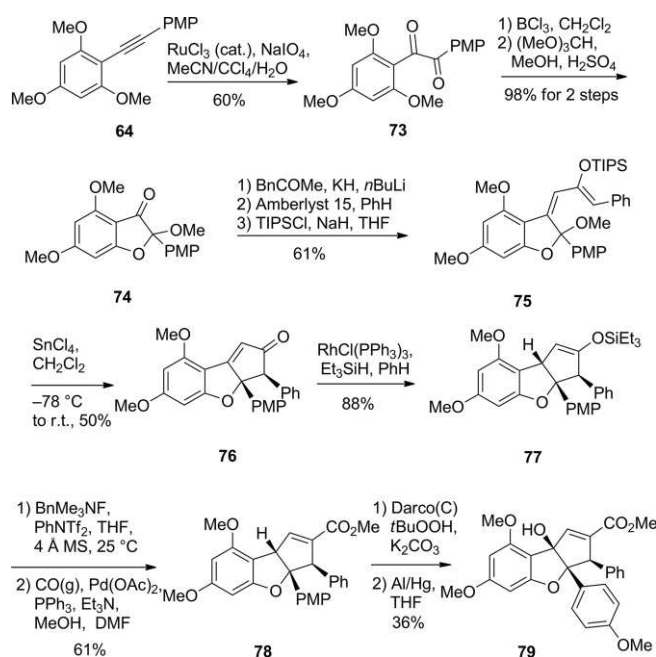
Two other strategies based on a Nazarov reaction were developed by Magnus and co-workers.<sup>[27]</sup> In their first approach, Magnus and co-workers developed a unique Nazarov cyclization that provides a straightforward means to generate the flavagline skeleton (Scheme 11).<sup>[27a]</sup> This route began with the Sonogashira cross-coupling of iodoarene **63** with 4-methoxyphenylacetylene. A palladium-catalyzed carbonylative annulation of the obtained alkyne **64** provided benzofuran **65**, which was then converted into enone **66**. Although treatment with many Lewis acids resulted in the fragmentation of this compound, Magnus and co-workers found that acetyl bromide efficiently promotes the Nazarov cyclization with an 81 % yield, probably through intermediates **67** and **68**. Oxidation with ceric ammonium nitrate (CAN) efficiently installed the tertiary hydroxy group. Further redox manipulations provided dehydroflavagline **72**, which was treated under the condition described by Trost to afford methyl rocaglate **62** in two steps.

The second approach began with the conversion of alkyne **64** into benzofuranone **74** in three steps (Scheme 12).<sup>[27b]</sup> Condensation of the latter with benzyl methyl ketone, then *O*-silylation, provided **75**, which was subjected to the Nazarov reaction in the presence of SnCl<sub>4</sub> to yield the cyclopentenone **76**. Hydro-silylation, palladium-mediated carboxymethylation, and hydroxylation gave rise to the dehydrated flavagline **79**.





Scheme 11. Magnus' first synthesis of racemic flavaglines.<sup>[27a]</sup>

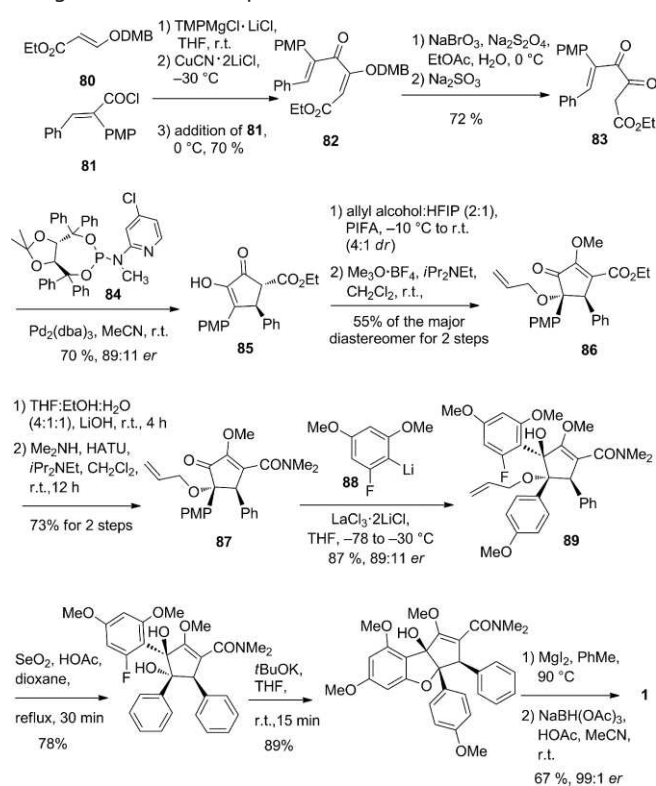


Scheme 12. Magnus' racemic synthesis of methyl rocaglate.<sup>[27b]</sup>

## 7. Tius' Enantioselective Intramolecular $S_NAr$ Approach

In 2015, Tius and co-workers reported a new synthesis of flavaglines. It was also based on a Nazarov reaction, but their strategy

used a different disconnection from that used by Frontier and Magnus.<sup>[28]</sup> The preparation of dienone **82** employed a selective deprotonation of **80** with  $\text{TMPMgCl}\cdot\text{LiCl}$  (TMP = 2,2,6,6-tetramethylpiperidyl) and its condensation with acid chloride **81**. Subsequent removal of the 3,4-dimethoxybenzyl (DMB) protecting group, followed by an enantioselective  $\text{Pd}^0$ -catalyzed Nazarov-type cyclization, afforded the cyclic product **85** in 70% yield and 89:11 *er*. Then, an allyloxy group was stereoselectively introduced under oxidative (PIFA) conditions to provide enol ether **86** after an *O*-methylation step with Meerwein's salt. Conversion of the ester into a dimethyl amide and alkylation with lithiated 1-fluoro-3,5-dimethoxybenzene in the presence of  $\text{LaCl}_3\cdot 2\text{LiCl}$  efficiently gave rise to tertiary alcohol **89** as a single isomer.  $\text{SeO}_2$ -mediated oxidative cleavage of the allyl protecting group and a subsequent intramolecular  $S_NAr$  efficiently generated the flavagline scaffold, which was further advanced to rocaglamide in two steps (Scheme 13).

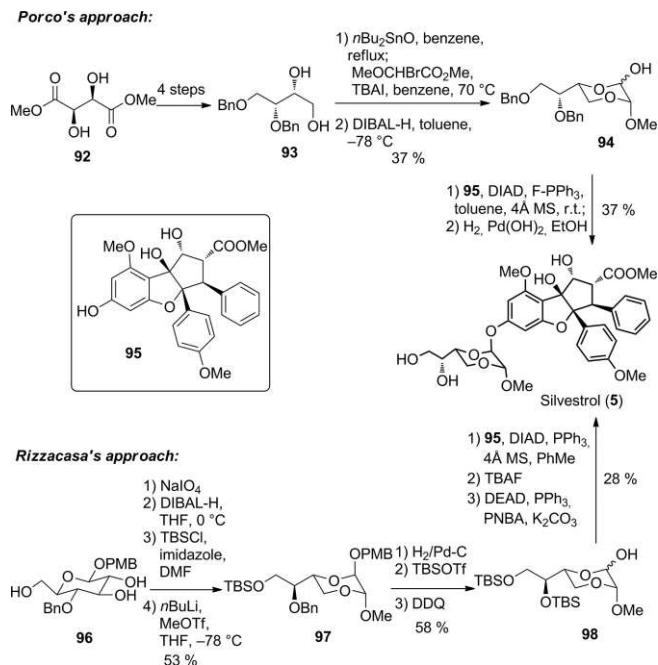


Scheme 13. Tius' enantioselective synthesis of rocaglamide.<sup>[28]</sup>

## 8. Porco's and Rizzacasa's Syntheses of Silvestrol (5)

The enantioselective synthesis of silvestrol (**5**) was independently disclosed in the same issue of *Angewandte Chemie* by Porco's and Rizzacasa's groups in 2007 (Scheme 14).<sup>[29]</sup> Both teams relied on Porco's [3+2] photocycloaddition to prepare the cyclopenta[*b*]benzofuran core. The main difference between Porco's and Rizzacasa's strategies is in the preparation of the pseudosugar moiety. Porco and co-workers started from *D*-dimethyl tartrate to prepare the lactol **94** via the known diol **93**,<sup>[30]</sup> whereas Rizzacasa and co-workers prepared a similar syn-

thon through periodic cleavage of D-glucose derivative **96** (Scheme 14). These approaches were used to prepare several pharmacologically active silvestrol analogues.<sup>[5c,26,29a,31]</sup>



Scheme 14. Porco's and Rizzacasa's syntheses of silvestrol (**5**).<sup>[29]</sup>

## 9. Concluding Remarks

In summary, the synthetic studies directed towards the creation of flavaglines have been rich in intellectual excitement and have not only stimulated the discovery of new reactions but have also paved the way for SAR studies and subsequent promising preclinical investigations for the treatment of cancers and of neurological, cardiac, and inflammatory diseases. In addition, the recent demonstration that eIF4a and prohibitins are valid targets for treatment of cancer is expected to foster this field of research.

## Acknowledgments

This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) (grant numbers 3940, SFI20111204054, and PJA 20141201909). The authors also thank the AAREC Folia Research, the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) and the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENSUR) for fellowships to Q. Z. and H. A.-H.

**Keywords:** Natural products · Total synthesis · Synthesis design · Medicinal chemistry · Antitumor agents

[1] C. Basmadjian, Q. Zhao, E. Bentouhami, A. Djehal, C. G. Nebigil, R. A. Johnson, M. Serova, A. de Gramont, S. Faivre, E. Raymond, L. G. Désaubry, *Front. Chem.* **2014**, *2*, 20.

- [2] C. Basmadjian, F. Thuaud, N. Ribeiro, L. Désaubry, *Future Med. Chem.* **2013**, *5*, 2185–2197.
- [3] M. L. King, C. C. Chiang, H. C. Ling, E. Fujita, M. Ochiai, A. T. McPhail, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 1150–1151.
- [4] a) J. M. Chambers, L. M. Lindqvist, A. Webb, D. C. Huang, G. P. Savage, M. A. Rizzacasa, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1406–1409; b) G. Polier, J. Neumann, F. Thuaud, N. Ribeiro, C. Gelhaus, H. Schmidt, M. Gaiasi, R. Kohler, W. W. Muller, P. Proksch, M. Leippe, O. Janssen, L. Désaubry, P. H. Krammer, M. Li-Weber, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1093–1104; c) H. Sadlish, G. Galicia-Vazquez, C. G. Paris, T. Aust, B. Bhullar, L. Chang, S. B. Helliwell, D. Hoepfner, B. Knapp, R. Riedl, S. Roggo, S. Schuierer, C. Studer, J. A. Porco, J. Pelletier, N. R. Movva, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1519–1527.
- [5] a) A. L. Wolfe, K. Singh, Y. Zhong, P. Drewe, V. K. Rajasekhar, V. R. Sanghvi, K. J. Mavrakis, M. Jiang, J. E. Roderick, J. Van der Meulen, J. H. Schatz, C. M. Rodrigo, C. Zhao, P. Rondou, E. de Stanchina, J. Teruya-Feldstein, M. A. Kelliher, F. Speleman, J. A. Porco, J. Pelletier, G. Ratsch, H.-G. Wendel, *Nature* **2014**, *513*, 65–70; b) S. Santagata, M. L. Mendillo, Y.-c. Tang, A. Subramanian, C. C. Perley, S. P. Roche, B. Wong, R. Narayan, H. Kwon, M. Koeva, A. Amon, T. R. Golub, J. A. Porco Jr., L. Whitesell, S. Lindquist, *Science* **2013**, *341*, 1238303; c) C. M. Rodrigo, R. Cencic, S. P. Roche, J. Pelletier, J. A. Porco, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 558–562.
- [6] D. K. Rozelle, C. M. Filone, N. Kedersha, J. H. Connor, *Mol. Cell Biol.* **2014**, *34*, 2003–2016.
- [7] Z. Nasr, L. E. Dow, M. Paquet, J. Chu, K. Ravindar, R. Somaiah, P. Deslongchamps, J. A. Porco, S. W. Lowe, J. Pelletier, *BMC Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *14*, 58/51–58/12.
- [8] a) F. Thuaud, N. Ribeiro, C. Gaidon, T. Cresteil, L. Désaubry, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 411–415; b) F. Thuaud, Y. Bernard, G. Turkeri, R. Dirr, G. Aubert, T. Cresteil, A. Baguet, C. Tomasetto, Y. Svitkin, N. Sonenberg, C. G. Nebigil, L. Désaubry, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5176–5187; c) F. Emhemmed, S. Ali Azouaou, F. Thuaud, V. Schini-Kerth, L. Désaubry, C. D. Muller, G. Fuhrmann, *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *89*, 185–196; d) L. Boussemart, H. Malka-Mahieu, I. Girault, D. Allard, O. Hemmingsson, G. Tomasich, M. Thomas, C. Basmadjian, N. Ribeiro, F. Thuaud, C. Mateus, E. Routier, N. Kamsu-Kom, S. Agoussi, A. M. Eggermont, L. Désaubry, C. Robert, S. Vagner, *Nature* **2014**, *513*, 105–109.
- [9] Y. Bernard, N. Ribeiro, F. Thuaud, G. Turkeri, R. Dirr, M. Boulberdaa, C. G. Nebigil, L. Désaubry, *PLoS One* **2011**, *6*, e25302.
- [10] N. Ribeiro, F. Thuaud, Y. Bernard, C. Gaidon, T. Cresteil, A. Hild, E. C. Hirsch, P. P. Michel, C. G. Nebigil, L. Désaubry, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10064–10073.
- [11] J. Han, Q. Zhao, C. Basmadjian, L. Désaubry, A. L. Theiss, *Inflamm. Bowel Dis.* **2016**, *22*, 55–67.
- [12] P. Wintachai, F. Thuaud, C. Basmadjian, S. Roytrakul, S. Ubol, L. Désaubry, D. R. Smith, *Microbiol. Immunol.* **2015**, *59*, 129–141.
- [13] IMD-026259: an innovative drug for disease modifying treatment of Parkinson's diseases [www.michaeljfox.org/foundation/grantdetail.php?grant\\_id=1020](http://www.michaeljfox.org/foundation/grantdetail.php?grant_id=1020).
- [14] a) S. S. Ebada, N. Lajkiewicz, J. A. Porco Jr., M. Li-Weber, P. Proksch, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **2011**, *94*, 1–58; b) S. Kim, A. A. Salim, S. M. Swanson, A. D. Kinghorn, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2006**, *6*, 319–345; c) L. Pan, J. L. Woodard, D. M. Lucas, J. R. Fuchs, A. D. Kinghorn, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 924–939; d) P. Proksch, R. Edrada, R. Ebel, F. I. Bohnstengel, B. W. Nugroho, *Curr. Org. Chem.* **2001**, *5*, 923–938; e) N. Ribeiro, F. Thuaud, C. Nebigil, L. Désaubry, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1857–1864; f) P. Proksch, R. Edrada, R. Ebel, F. Bohnstengel, B. W. Nugroho, *Curr. Chem.* **2001**, *5*, 923–938.
- [15] B. M. Trost, P. D. Greenspan, B. V. Yang, M. G. Saulnier, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9022–9024.
- [16] a) A. E. Davey, M. J. Schaeffer, R. J. K. Taylor, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1137–1139; b) A. E. Davey, R. J. K. Taylor, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 25–27.
- [17] a) M. R. Dobler, I. Bruce, F. Cederbaum, N. G. Cooke, L. J. Diorazio, R. G. Hall, E. Irving, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8281–8284; b) H. Li, B. Fu, M. A. Wang, N. Li, W. J. Liu, Z. Q. Xie, Y. Q. Ma, Z. Qin, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1753–1758.
- [18] K. Thede, N. Diedrichs, J. P. Ragot, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4595–4597.
- [19] C. Basmadjian, Q. Zhao, L. Désaubry, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 727–730.
- [20] C. Basmadjian, F. Zhang, L. Désaubry, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 1017–1022.

- [21] a) N. Diedrichs, T. Fahrige, I. Gerlach, J. Ragot, J. Schuhmacher, K. Thede, E. Horvath, in: *Preparation of cyclopenta[b]benzofuran derivatives as inhibitors of interleukin-8*, Bayer Healthcare AG, Germany, **2005**, p. 202; b) N. Diedrichs, J. P. Ragot, K. Thede, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 1731–1735.
- [22] B. Gerard, G. Jones II, J. A. Porco Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13620–13621.
- [23] S. P. Roche, R. Cencic, J. Pelletier, J. A. Porco Jr., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6533–6538; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6683.
- [24] a) B. Gerard, S. Sangji, D. J. O'Leary, J. A. Porco Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7754–7755; b) S. D. Stone, N. J. Lajkiewicz, L. Whitesell, A. Hilmy, J. A. Porco Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 525–530.
- [25] T. Liu, S. J. Nair, A. Lescarbeau, J. Belani, S. Peluso, J. Conley, B. Tillotson, P. O'Hearn, S. Smith, K. Slocum, K. West, J. Helble, M. Douglas, A. Bahadour, J. Ali, K. McGovern, C. Fritz, V. J. Palombella, A. Wylie, A. C. Castro, M. R. Tremblay, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8859–8878.
- [26] a) J. A. Malona, K. Cariou, W. T. Spencer III, A. J. Frontier, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1891–1908; b) J. A. Malona, K. Cariou, A. J. Frontier, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7560–7561.
- [27] a) P. Magnus, M. A. H. Stent, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3853–3855; b) P. Magnus, W. A. Freund, E. J. Moorhead, T. Rainey, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6140–6142.
- [28] Z. Zhou, M. A. Tius, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6037–6040; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 6135.
- [29] a) M. El Sous, M. L. Khoo, G. Holloway, D. Owen, P. J. Scammells, M. A. Rizzacasa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7835–7838; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7981; b) B. Gerard, R. Cencic, J. Pelletier, J. A. Porco, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7831–7834; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7977.
- [30] S. Takano, A. Kurotaki, Y. Sekiguchi, S. Satoh, M. Hirama, K. Ogasawara, *Synthesis* **1986**, 811–817.
- [31] a) T. E. Adams, M. El Sous, B. C. Hawkins, S. Hirner, G. Holloway, M. L. Khoo, D. J. Owen, G. P. Savage, P. J. Scammells, M. A. Rizzacasa, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1607–1616; b) J. M. Chambers, D. C. Huang, L. M. Lindqvist, G. P. Savage, J. M. White, M. A. Rizzacasa, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1500–1504; c) B. C. Hawkins, L. M. Lindqvist, D. Nhu, P. P. Sharp, D. Segal, A. K. Powell, M. Campbell, E. Ryan, J. M. Chambers, J. M. White, M. A. Rizzacasa, G. Lessene, D. C. S. Huang, C. J. Burns, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 1556–1566.

---

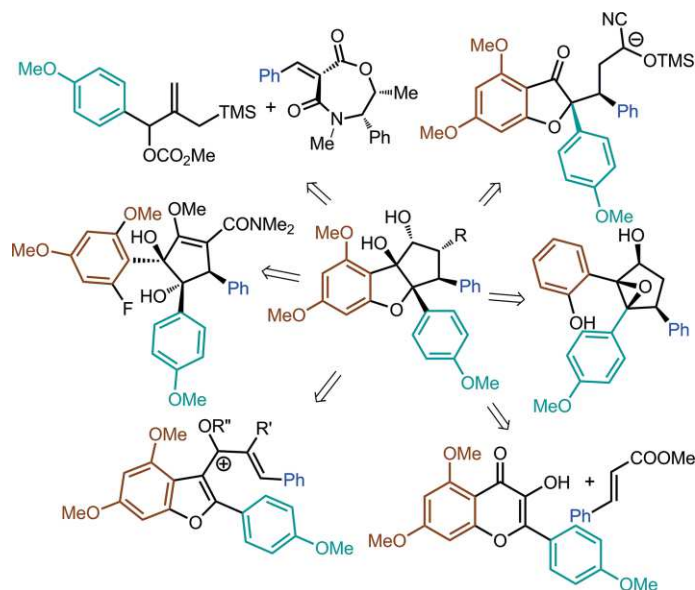
 Received: April 7, 2016

Published Online: ■

**Total Synthesis**

Q. Zhao, H. Abou-Hamdan,  
L. Désaubry\* ..... 1–10

**Recent Advances in the Synthesis of Flavaglines, a Family of Potent Bioactive Natural Compounds Originating from Traditional Chinese Medicine**



With their fascinating pharmacological profiles and complex molecular architectures, the flavaglines have provided a fertile playing field for synthetic or-

ganic chemists. This microreview highlights the achievements in the total synthesis of these complex natural products.

DOI: 10.1002/ejoc.201600437



## Publication N° 3

CUG initiation and frameshifting enable production of dipeptide repeat proteins from ALS/FTD C9ORF72 transcripts



Tabet, R.; Schaeffer, L.; Freyermuth, F.; Jambeau, M.; Workman, M.; Lee, C.-Z.; Lin, C.-C.; Jiang, J.; Jansen-West, K.; Abou-Hamdan, H.; Désaubry, L.; Gendron, T.; Petrucelli, L.; Martin, F.; Lagier-Tourenne, C., *Nat. Commun.*, **2018**, 9, 152.

ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-017-02643-5

OPEN

# CUG initiation and frameshifting enable production of dipeptide repeat proteins from ALS/FTD C9ORF72 transcripts

Ricardos Tabet<sup>1,2</sup>, Laure Schaeffer<sup>3</sup>, Fernande Freyermuth<sup>1,2</sup>, Melanie Jambeau<sup>1,2</sup>, Michael Workman<sup>1</sup>, Chao-Zong Lee<sup>1</sup>, Chun-Chia Lin<sup>1</sup>, Jie Jiang<sup>4</sup>, Karen Jansen-West<sup>5</sup>, Hussein Abou-Hamdan<sup>6</sup>, Laurent Désaubry<sup>6</sup>, Tania Gendron<sup>5</sup>, Leonard Petrucelli<sup>5</sup>, Franck Martin<sup>3</sup>  & Clotilde Lagier-Tourenne<sup>1,2</sup> 

Expansion of G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeats in the *C9ORF72* gene is the most prevalent inherited form of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. Expanded transcripts undergo repeat-associated non-AUG (RAN) translation producing dipeptide repeat proteins from all reading frames. We determined *cis*-factors and *trans*-factors influencing translation of the human *C9ORF72* transcripts. G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> translation operates through a 5′–3′ cap-dependent scanning mechanism, requiring a CUG codon located upstream of the repeats and an initiator Met-tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub>. Production of poly-GA, poly-GP, and poly-GR proteins from the three frames is influenced by mutation of the same CUG start codon supporting a frameshifting mechanism. RAN translation is also regulated by an upstream open reading frame (uORF) present in mis-spliced *C9ORF72* transcripts. Inhibitors of the pre-initiation ribosomal complex and RNA antisense oligonucleotides selectively targeting the 5′-flanking G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> sequence block ribosomal scanning and prevent translation. Finally, we identified an unexpected affinity of expanded transcripts for the ribosomal subunits independently from translation.

<sup>1</sup> Department of Neurology, MassGeneral Institute for Neurodegenerative Disease (MIND), Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA 02114, USA. <sup>2</sup> Broad Institute of Harvard University and MIT, Cambridge, MA 02142, USA. <sup>3</sup> Architecture et Réactivité de l'ARN, UPR 9002, Université de Strasbourg, CNRS, F-67000 Strasbourg, France. <sup>4</sup> Ludwig Institute for Cancer Research, University of California San Diego, La Jolla, CA 92093, USA. <sup>5</sup> Department of Neuroscience, Mayo Clinic, Jacksonville, FL 32224, USA. <sup>6</sup> Therapeutic Innovation Laboratory (UMR 7200), Faculty of Pharmacy, CNRS/University of Strasbourg, 67401 Illkirch, Cedex, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.M. (email: [f.martin@ibmc-cnrs.unistra.fr](mailto:f.martin@ibmc-cnrs.unistra.fr)) or to C.L.-T. (email: [clagier-tourenne@mgh.harvard.edu](mailto:clagier-tourenne@mgh.harvard.edu))

Amiotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD) are devastating neurodegenerative disorders with a considerable clinical and pathological overlap, which is further substantiated by the discovery of *C9ORF72* repeat expansions as the most frequent genetic cause for both diseases<sup>1,2</sup>. Indeed, expansion of a G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> hexanucleotide repeat in the first intron of the *C9ORF72* gene is identified in ~40% and ~25% of familial ALS and FTD, respectively, as well as 5% of sporadic patients<sup>3</sup>. The number of G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeats is normally lower than 30 and can extend to several hundred repeats in patients. As in other microsatellite diseases, *C9ORF72* expansions are transcribed from both sense and antisense strands (reviewed in ref. 4). Bidirectional transcription of the *C9ORF72* locus results in the production of transcripts containing either G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> or C<sub>4</sub>G<sub>2</sub> repeats that accumulate into RNA foci<sup>1,5–10</sup>. The G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>-containing RNAs were proposed to form G-quadruplex secondary structures and sequester several RNA-binding proteins (RBPs) including hnRNP H1/F, ALYREF, SRSF2, hnRNPA1, hnRNPA3, ADARB2, Pur- $\alpha$ , and Nucleolin (reviewed in ref. 4). In addition, *C9ORF72* expanded transcripts are translated into dipeptide repeat (DPR) proteins through unconventional translation, known as repeat-associated non-AUG (RAN) translation<sup>11</sup>. RAN translation occurs in absence of an AUG start codon, in multiple reading frames of the same repeat-containing transcript, and within coding as well as non-coding regions<sup>12</sup>. This mechanism has now been described in several microsatellite expansion diseases, including spinocerebellar ataxia type 8 (SCA8)<sup>11</sup>, myotonic dystrophy (DM1 and DM2)<sup>11,13</sup>, Huntington's disease (HD)<sup>14</sup>, fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)<sup>15</sup>, spinocerebellar ataxia type 31<sup>16</sup>, and *C9ORF72* ALS/FTD<sup>10,17–20</sup>. Both G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> sense and C<sub>4</sub>G<sub>2</sub> antisense transcripts are translated from the three coding frames into five DPR proteins, which aggregate in *C9ORF72* ALS/FTD patients<sup>10,13,18–21</sup>. Poly-Glycine-Alanine (poly-GA) and poly-Glycine-Arginine (poly-GR) are translated from the sense strand G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> transcripts, while poly-Proline-Alanine (Poly-PA) and poly-Proline-Arginine (poly-PR) are produced from the antisense strand C<sub>4</sub>G<sub>2</sub> RNA. Poly-Glycine-Proline (poly-GP) may be produced from both RNA strands. These DPR proteins are the main components of cytoplasmic p62-positive, TDP-43-negative aggregates that represent a unique pathological hallmark in *C9ORF72* ALS/FTD patients<sup>22,23</sup>. Evidence supports that DPR proteins, in particular arginine-rich poly-GR and poly-PR proteins, are toxic and play a central role in neurodegeneration due to *C9ORF72* expansions (reviewed in ref. 24).

However, how RAN translation of *C9ORF72* expanded transcripts occurs and which factors are required is unknown. Translation initiation of canonical mRNAs is a complex process that requires numerous eukaryotic initiation factors (eIFs) and is crucial for regulation of gene expression. The 40S ribosomal subunit binds to the 5' cap and then scans along the mRNA until encountering an initiation codon. Most of the regulation is exerted at the first stage, where the AUG start codon is identified and decoded by the methionyl-tRNA specialized for initiation (Met-tRNA<sup>Met</sup>)<sup>25</sup>. The efficiency of start codon selection is strongly influenced by surrounding sequences and the recruitment of eIFs. Certain viral and cellular messenger RNAs escape the canonical translation pathway to attract the ribosomes in a cap-independent scanning mechanism. These RNAs contain highly structured sequence, called internal ribosome entry site (IRES), mimicking initiation factors to directly recruit the ribosome at the start codon<sup>26,27</sup>. Repeat-containing RNAs may also adopt stable structures, such as stem loops or G-quadruplexes and an IRES-like mechanism could be at the origin of RAN translation in microsatellite expansion diseases<sup>12,28–32</sup>. Against this hypothesis, RAN translation of CGG repeats associated with

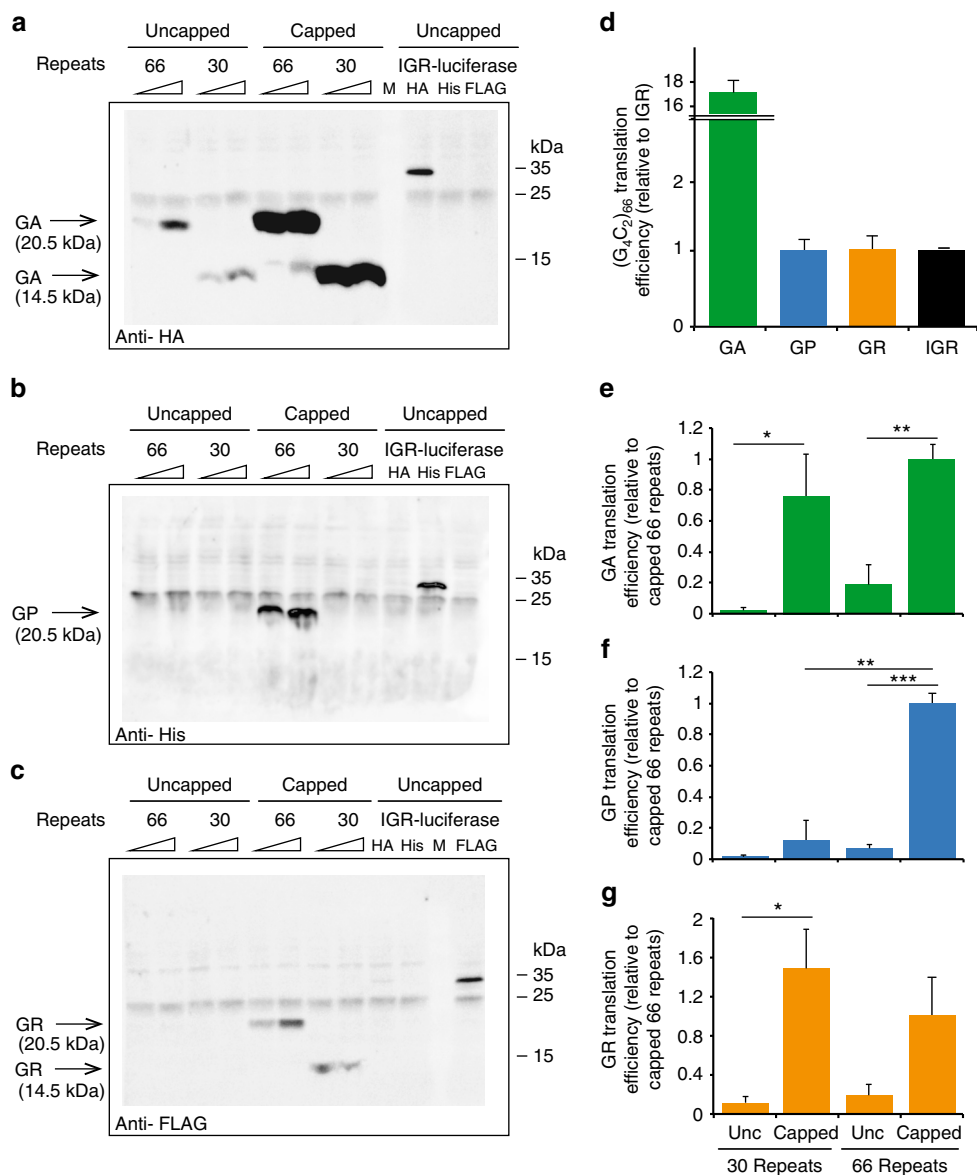
FXTAS was recently shown to involve a canonical cap-dependent scanning mechanism<sup>33</sup>. The *cis*-factors and *trans*-factors influencing the translation of the human *C9ORF72* expansion transcripts are not yet identified. Determining whether hexanucleotide G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> transcripts recruit the ribosome following the canonical translation initiation or using an IRES mechanism is a crucial step for the development of therapeutic approaches targeting RAN translation in *C9ORF72* ALS/FTD patients.

Herein, we provide mechanistic insights delineating the different steps needed to recruit the ribosome and initiate RAN translation from G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> expansions to produce poly-GA, GP, and GR proteins. Similar to a canonical mechanism of translation<sup>34</sup>, the production of DPR proteins from expanded transcripts requires a 5' cap insertion, involves the initiator methionine and strongly relies on sequences upstream of the repeat. G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> RAN translation proceeds by a 5'–3' canonical scanning mechanism to start translation at a near-cognate CUG codon and produce DPR proteins by frameshifting. Consistent with this mechanism, we also demonstrate that G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> RAN translation is downregulated by an upstream open reading frame (uORF) present in abnormally spliced *C9ORF72* transcripts<sup>35</sup>. Inhibitors of the pre-initiation ribosomal complex and RNA antisense oligonucleotides (ASOs) targeting the sequence upstream of the repeats inhibit G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> RAN translation, confirming a scanning-dependent mechanism that may be targeted for therapeutic intervention. Finally, G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>-containing RNAs are found to be associated with ribosomal subunits in a translation independent manner supporting a new RNA gain of function mechanism in *C9ORF72* disease.

## Results

**Translation efficiency of G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> RAN translation.** To identify *cis*-factors and *trans*-factors influencing the translation of G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeats in the context of the *C9ORF72* gene, we used a construct containing 66 repeats that was shown to undergo RAN translation in all three frames when expressed in cultured cells and in the mouse central nervous system<sup>20,36</sup>. This construct was modified to generate a series of vectors with different sequences flanking the repeat at the human *C9ORF72* locus (Supplementary Fig. 1 and Table 1). Sequences encoding for a specific tag in each of the three reading frames were inserted downstream of the repeat to monitor the production of poly-GA (HA in the +1 frame), poly-GP (His in the +2 frame), and poly-GR (FLAG in the +3 frame). RAN translation from all three reading frames is therefore examined from the same G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> construct.

A cell-free translation assay based on rabbit reticulocyte lysates (RRL) was developed to monitor RAN translation efficiency from *C9ORF72* transcripts. In vitro RAN translation was observed in all three frames from capped RNAs with 66 repeats (Fig. 1a–c, Supplementary Fig. 2a). To accurately compare the translation efficiency of the repeat in each frame, we used as reference Renilla luciferases with either HA, His, or FLAG tags under the control of the intergenic region (IGR) IRESs from cricket paralysis virus (CrPV). IRES are structural RNA elements that allow ribosome hijacking and trigger translation in a cap-independent manner<sup>26,27</sup>. Among them, IGR promotes highly efficient translation without any AUG start codon, does not need eIF or the initiator tRNA<sup>Met</sup><sup>37,38</sup>, and was shown to be efficiently translated in RRL<sup>39</sup>. Indeed, canonical translation under the 5'UTR of the  $\beta$ -globin is only one fold more efficient than translation under the control of the IGR (Supplementary Fig. 2b–d). We compared the efficiency of *C9ORF72* RAN translation in the three reading frames with the translation of tagged-luciferase reporter mRNAs that are controlled by the CrPV IGR. A striking difference in translation efficiency was observed between the three frames. Indeed, translation of the capped (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>66</sub> mRNA in the +1 poly-



**Fig. 1**  $G_4C_2$  RAN translation is length dependent and displays different efficiencies across reading frames. RNA transcripts with  $(G_4C_2)_{30}$  or  $(G_4C_2)_{66}$  repeats were transcribed in vitro with T7 RNA polymerase, capped or not capped and subjected to translation in rabbit reticulocyte lysate (RRL) system. Increasing RNA concentrations (100 and 200 nM) were used for translation in RRL. RAN translation was probed on immunoblot with antibodies to (a) HA tag in the +1 poly-GA frame, (b) His tag in the +2 poly-GP frame, and (c) FLAG tag in the +3 poly-GR frame. Schematics of constructs with 30 repeats (#3) and 66 repeats (#4) are shown in Figure S1. (d) Efficiencies of RAN translation in the different frames were measured relatively to Renilla Luciferase with the corresponding tags driven by the intergenic region (IGR) IRES from the cricket paralysis virus. The efficiencies of RAN translation from capped RNAs were compared to uncapped RNAs at 100 nM for (e) poly-GA, (f) poly-GP, (g) poly-GR with 30 or 66  $G_4C_2$  repeats, relatively to the capped 66 repeats. Graphs represent mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . Student's  $t$ -test, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

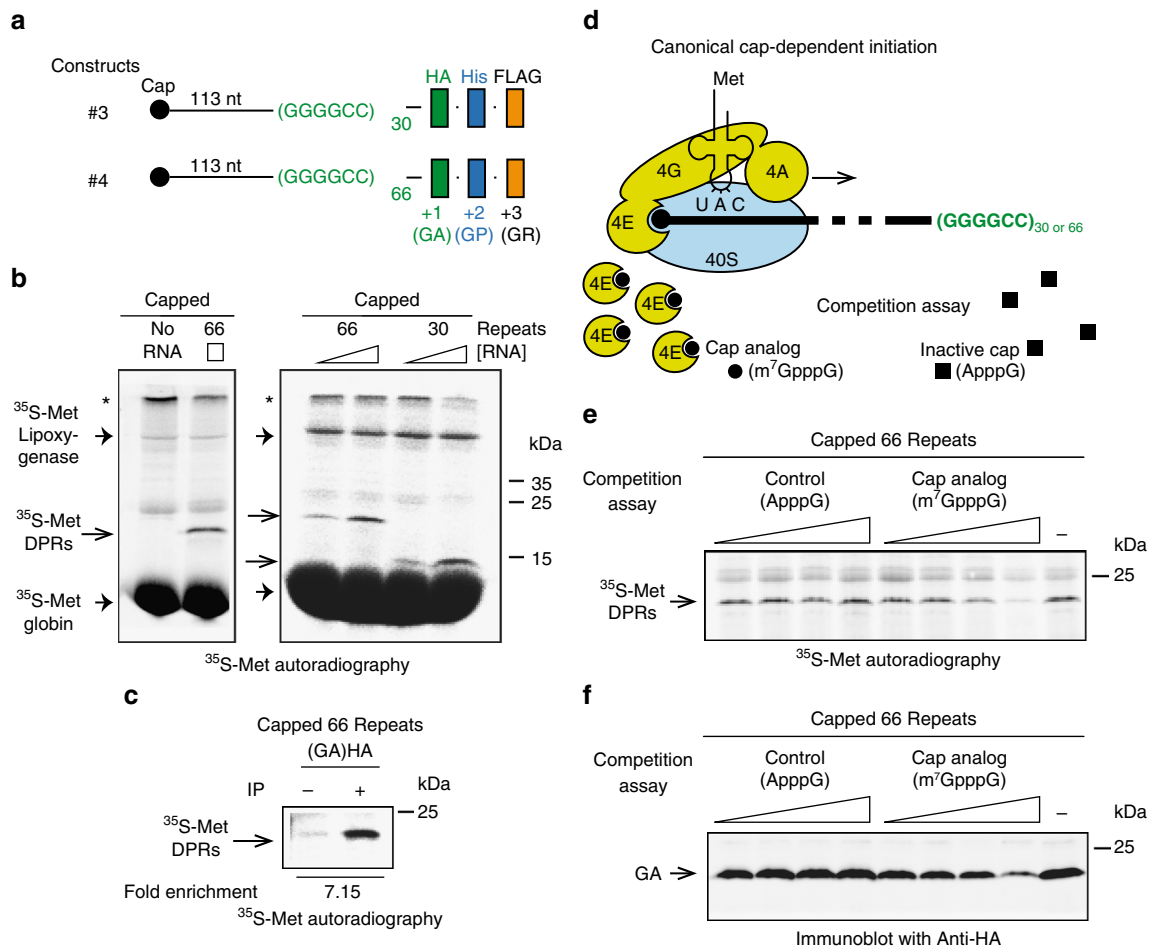
GA frame was 17 times more efficient than the IGR-luciferase reporter (Fig. 1a, d). In contrast, translation efficiency from poly-GP in the +2 frame and poly-GR in the +3 frame was equivalent to the translation of IGR-luciferase (Fig. 1b–d). Notably, poly-GA aggregates are the most prevalent DPR proteins accumulated in post-mortem brain samples from *C9ORF72* ALS/FTD patients (Supplementary Fig. 3)<sup>17,40</sup> supporting that translation of the *C9ORF72* repeat is most efficient in the +1 frame both in vitro and in vivo.

We also uncovered that the size of the expansion does not equally influence translation of the different frames. Production of poly-GP in the +2 frame was strongly influenced by the size of the repeat when comparing 30 and 66 repeats (Fig. 1b, f, Supplementary Fig. 1; constructs #3 vs. #4). In contrast, no

significant difference was observed for poly-GA or poly-GR, which were equally expressed from both 30 and 66  $G_4C_2$  repeats (Fig. 1a, c, e, g).

#### Cap-dependent $G_4C_2$ translation initiates with methionine.

Our in vitro assay provided the opportunity to determine whether RAN translation of the *C9ORF72* repeat depends on the presence of a 5' $m^7G$  cap. Levels of poly-GA produced from 66 repeats increased more than five times when transcripts were capped (Fig. 1a, e) and poly-GP/GR syntheses were strongly repressed in absence of the cap, supporting a canonical cap-dependent mechanism of translation for all three DPR proteins (Fig. 1a, b, c, e, f, g).



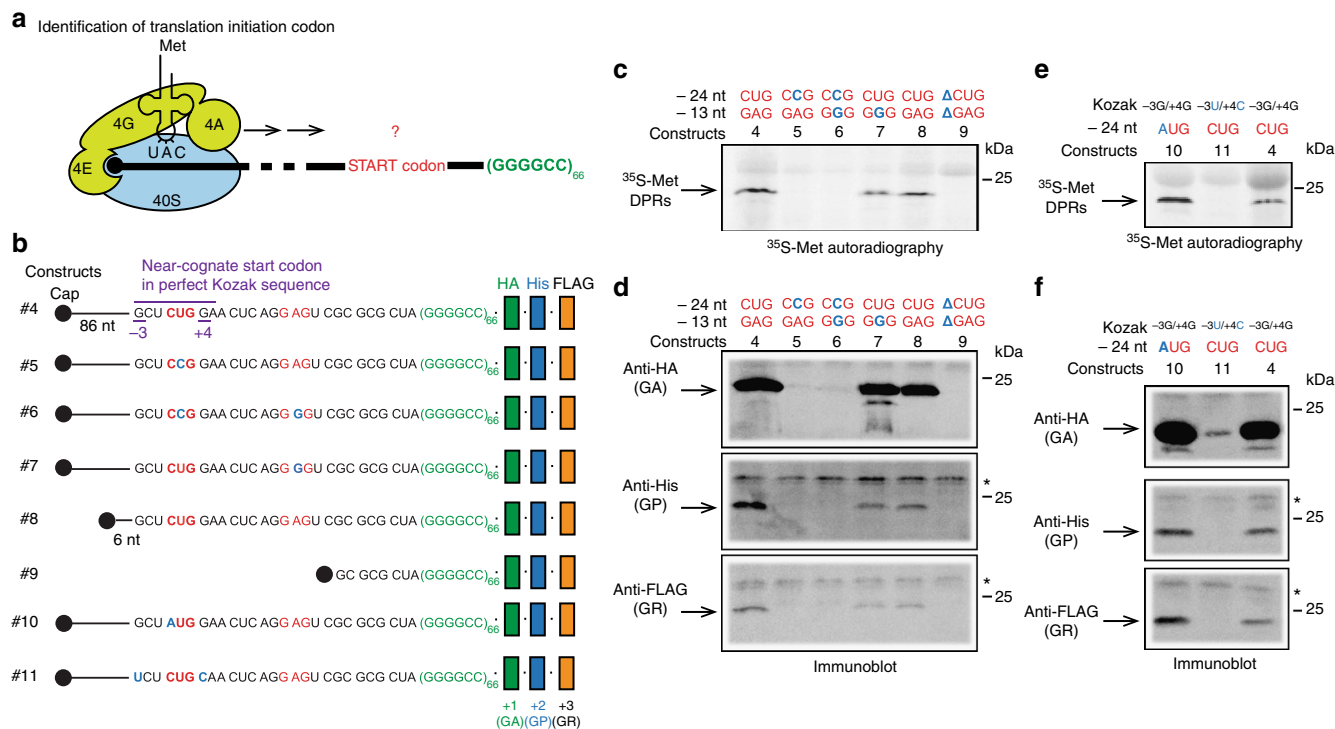
**Fig. 2**  $G_4C_2$  RAN translation is cap-dependent and initiates with a methionine. **(a)** Schemes of the RNA with  $(G_4C_2)_{30}$  (#3) or  $(G_4C_2)_{66}$  (#4) repeats that were transcribed in vitro with T7 RNA polymerase, capped and subjected to translation in RRL. **(b)** Translation was performed in the presence of [<sup>35</sup>S]-methionine and capped RNA #3 or #4 at 100 and 200 nM. RAN translation products were detected by autoradiography. Asterisk indicates bands in the stacking gel. **(c)** Translation was performed in presence of [<sup>35</sup>S]-methionine and capped RNA #4 followed by immunoprecipitation with antibody against HA-tag and detection of immunoprecipitated [<sup>35</sup>S]-methionine proteins by autoradiography. **(d)** Scheme of the canonical translation involving the cap-binding protein eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E), the protein platform (eIF4G) and the helicase (eIF4A) that recruit the 40S ribosomal subunit. This pre-initiation complex scans the 5' of the transcript for an appropriate start codon. Compounds used for the competition assay in **(e)** and **(f)** are represented by dark circles and squares for the cap analog ( $m^7$ GpppG) and the inactive form (ApppG), respectively. **(e-f)** Translation was performed in presence of [<sup>35</sup>S]-methionine, capped  $(G_4C_2)_{66}$  RNA #4 and an increased concentration of inactive cap (control, ApppG) or cap analog (competitor of the cap,  $m^7$ GpppG). [<sup>35</sup>S]-methionine RAN translation products and poly-GA were detected by **(e)** autoradiography and **(f)** immunoblot with an antibody against HA-tag, respectively

Canonical translational initiation consists of base-pairing between the initiator Met-tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub> anticodon and the AUG start codon. The incorporation of [<sup>35</sup>S]-methionine during the translation of transcripts expressing 30 repeats (#3) or 66 repeats (#4) was measured to determine whether RAN translation requires Met-tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub> for the production of DPR proteins (Fig. 2a, b). Notably, the sequence of the transcripts #3 and #4 do not contain any AUG codon and the presence of [<sup>35</sup>S]-methionine in RAN products cannot derive from the incorporation of an internal methionine (Supplementary Fig. 1 and Table 1). A specific [<sup>35</sup>S]-methionine band was detected at the expected 14.5 and 20.5 kDa molecular weight from constructs expressing 30 and 66 repeats, respectively (Fig. 2b). The level of [<sup>35</sup>S]-methionine labeled polypeptide(s) was proportional to RNA concentration indicating that RAN translation is observed in sub-saturating conditions. Immunoprecipitation of poly-GA products with a HA-specific antibody confirmed that RAN translation initiates with the incorporation of a methionine residue (Fig. 2c). To further demonstrate that  $G_4C_2$  RAN translation starts with a

methionine, we inhibited the activity of the methionylated initiator tRNA<sup>Met</sup> carrier eIF2 by inducing the phosphorylation of its  $\alpha$  subunit with poly(I:C)/salubrinal treatment as previously described<sup>41</sup> (Supplementary Fig. 4a). While this treatment did not have any impact on the non-canonical translation of IGR-renilla luciferase, it inhibited the translation of a capped-dependent renilla luciferase reporter and the incorporation of [<sup>35</sup>S]-methionine in DPR products (Supplementary Fig. 4b).

To gain further insights in the mechanism of RAN translation, we investigated the requirement of eukaryotic initiation factor eIF4E. In canonical translation the cap binding protein eIF4E is part of a larger complex called eIF4F, which also contains the platform protein eIF4G and the RNA helicase eIF4A<sup>34</sup> (Fig. 2d). To test whether eIF4E is involved in the RAN translation of  $G_4C_2$  repeats we monitored the translation efficiency in the presence of an excess of cap analog ( $m^7$ GpppG) or its non-functional ApppG counterpart. The competition assay was performed in RRL (Fig. 2e, f) and wheat germ extract (WGE) (Supplementary Fig. 4c, d), a highly cap-dependent system<sup>42</sup>. Increasing





**Fig. 3**  $G_4C_2$  RAN translation of all reading frames initiates at the same near-cognate CUG start codon in RRL. **(a)** Scheme of the pre-initiation complex loaded at the 5' cap and the 40S ribosomal subunit ready to scan toward the start codon. RAN translation occurs in absence of an AUG codon. **(b)** Schemes of the transcripts #4 to #11 showing mutations in the 5' flanking sequence of  $(G_4C_2)_{66}$  used in **(c-f)**. Construct #4 contains the native sequence of 113 nucleotides upstream of the  $G_4C_2$  repeat. Construct #5 has a CUG > CCG mutation in a near-cognate start codon located in a perfect Kozak sequence 24 nucleotides upstream of the repeat. Construct #6 has CUG > CCG and GAG > GGG (blue nucleotides) mutations in two potential start codons located 24 and 13 nucleotides upstream of the repeat, respectively. Construct #7 contains a GAG > GGG mutation in a potential near-cognate start codon located 13 nucleotides upstream of the repeat. Constructs #8 and #9 harbor a deletion leaving 33 nucleotides (including CUG and GAG codons) and eight nucleotides (deleting both CUG and GAG codons) upstream of the repeat, respectively. Construct #10 has a CUG > AUG mutation in the near-cognate start codon. Construct #11 has GCUCUGG > UCUCUGC mutations in the Kozak sequence. **(c-f)** Translation was performed in presence of [<sup>35</sup>S]-methionine using each RNA variant separately (#4 to #11). **(c** and **e)** [<sup>35</sup>S]-methionine RAN translation products were detected by autoradiography. **(d** and **f)** Poly-GA, poly-GP, and poly-GR were detected by immunoblot using antibodies against HA-tag, His-tag, and FLAG-tag, respectively. Asterisk indicates unspecific proteins translated in the RRL system

concentrations of cap analog, but not ApppG, lead to eIF4E titration thereby affecting the efficiency of eIF4F-dependent translation. The levels of [<sup>35</sup>S]-methionine-DPRs (Fig. 2e, Supplementary Fig. 4c) and poly-GA accumulation (Fig. 2f, Supplementary Fig. 4d) were reduced by increased concentrations of cap analog, demonstrating the role of the canonical initiation factor eIF4E in *C9ORF72* RAN translation.

#### $G_4C_2$ translation initiates at a near-cognate CUG start codon.

We next sought to identify the codon(s) used to initiate translation of *C9ORF72* transcripts (Fig. 3a). The presence of a single band on SDS-PAGE for the different DPR products (Fig. 1), corroborated by [<sup>35</sup>S]-methionine labeling (Fig. 2), suggests that the translation of  $G_4C_2$  starts at a specific position. In addition, in vitro RAN translation products obtained from 66 repeats had the same estimated molecular weight of 20.5 kDa in all three frames (Fig. 1a-c) suggesting that translation in the different frames is initiated from a single or neighboring start codons.

A candidate start site is a near-cognate CUG codon located 24 nucleotides upstream of the repeats in the +1 frame and embedded in a perfect Kozak sequence<sup>43</sup> (G/A in -3 and G in +4) (Supplementary Fig. 1, Fig. 3b, and Supplementary Table 1). Site-directed mutagenesis of this codon from CUG to CCG was sufficient to abolish the production of [<sup>35</sup>S]-methionine labeled DPR proteins in RRL, demonstrating that this CUG is used as

start codon to translate *C9ORF72*  $G_4C_2$  repeats (Fig. 3b, c; construct #4 vs. #5). In contrast, a point mutation from GAG to GGG in another putative start site located 13 nucleotides upstream of the repeats in the +2 frame only slightly reduced the level of [<sup>35</sup>S]-methionine DPR proteins (Fig. 3b, c; construct #4 vs. #7). Transcripts containing mutations at both putative start codons confirmed the necessity of the CUG codon to initiate RAN translation of the *C9ORF72* repeat (Fig. 3b, c; construct #4 vs. #6). This was further corroborated by using constructs with 5' truncations either preserving the near cognate CUG codon (#8) or deleting the entire region (#9) (Fig. 3b, c; construct #8 vs. #9). Importantly, immunoblot analyses revealed that syntheses of all three DPRs, poly-GA, poly-GP, and poly-GR, are equally disabled by the CUG mutation located 24 nucleotides upstream of the repeats (Fig. 3d; construct #4 vs. #5). In contrast, mutation of the GAG codon located 13 nucleotides upstream of the repeats reduced the levels of the three DPRs without abolishing their production (Fig. 3d; construct #4 vs. #7). Site-directed mutagenesis of the near cognate CUG codon to a canonical start codon AUG increases the incorporation of [<sup>35</sup>S]-methionine in DPR products (Fig. 3b, e; construct #10 vs. #4) and concomitantly the level of DPRs from all three frames, poly-GA, poly-GP, and poly-GR (Fig. 3b, f; construct #10 vs. #4). Interestingly, mutating the Kozak sequence inhibits the production of DPR proteins detected by [<sup>35</sup>S]-methionine autoradiography (Fig. 3b, e; construct #11 vs.

#4), as well as immunoblots for poly-GA, poly-GP, and poly-GR (Fig. 3b, f; construct #11 vs. #4). This striking result demonstrates that RAN translation producing DPR proteins from the three frames starts at the same CUG codon, and implies that production of poly-GP and poly-GR requires frameshifting events, +1 and -1, respectively. An additional smaller poly-GA product was translated from construct #7 suggesting that mutation of GAG to GGG induces another translation initiation event further downstream in frame +1 that is less efficient than initiation at CUG. The frameshifting necessary to produce +2 (poly-GP) and +3 (poly-GR) DPR proteins might explain the yield of DPR productions observed in Fig. 1 and patient tissues (Supplementary Fig. 3). Indeed, poly-GA translated from the +1 frame is the predominant DPR protein, poly-GP and poly-GR require one frameshifting event (-1 or +1) and are therefore significantly less produced.

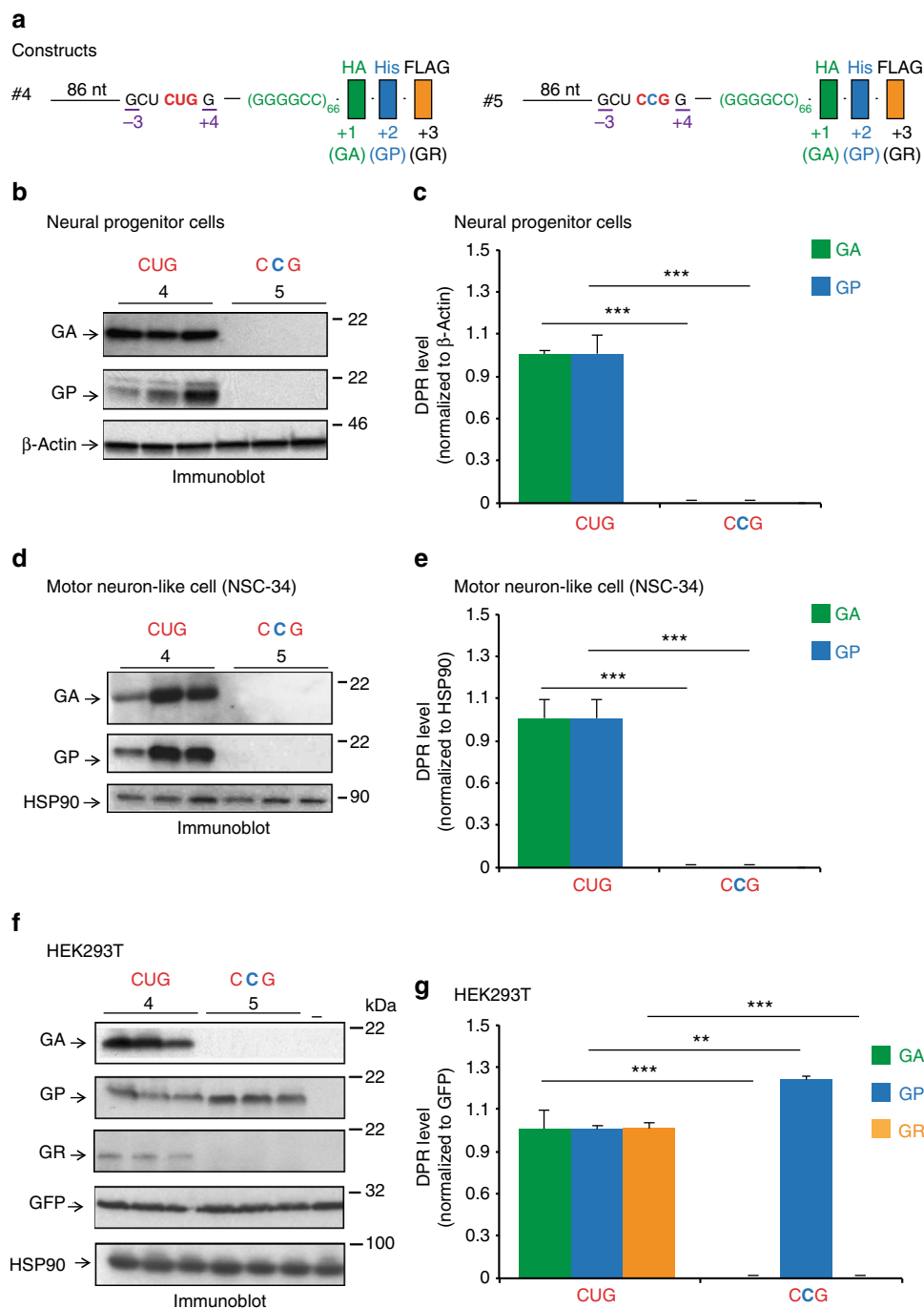
The crucial role of the CUG translation initiation codon located 24 nucleotides upstream of the *C9ORF72* repeat was further confirmed in vivo by expressing 66 repeats with either a CUG codon (construct #4) or its mutated CCG version (construct #5) in human neural progenitor cells (ReNcell VM)<sup>44</sup>, mouse motor neuron-like cells (NSC-34), and human embryonic kidney 293T cells (HEK293T) (Fig. 4). Immunoblots using antibodies that recognize each DPR protein identified products at a comparable molecular weight in the three cell types and RRL demonstrating similar RAN translation of the wild-type construct (#4) in all systems (Figs. 3 and 4). RAN translation of poly-GA and poly-GP was abolished by mutation of the CUG codon in human neural progenitors (Fig. 4b, c, Supplementary Fig. 5a, b; construct #4 vs. #5) and motor neuron-like cells (Fig. 4d, e; construct #4 vs. #5), confirming results observed in RRL (Fig. 3; construct #4 vs. #5). RAN translation of poly-GR could not be detected with any of the constructs in these cell lines. As shown in RRL experiments (Fig. 3), G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> RAN translation in the poly-GA +1 frame and the poly-GR +3 frame was also abolished by mutation of the CUG codon in HEK293T cells (Fig. 4f, g, Supplementary Fig. 5d; construct #4 vs. #5). However, in contrast to RRL and the two neuronal models, mutating the CUG codon did not inhibit production of poly-GP in HEK293T cells but instead induced a 20% increase detected by antibodies recognizing either poly-GP (Fig. 4f, g; Supplementary Fig. 5e; construct #4 vs. #5) or the HIS tag (Supplementary Fig. 5c). This observation supports that poly-GP translation from an alternative start site may be influenced in HEK293T by additional *trans*-acting factor(s) that are absent in RRL, motor neuron-like NSC-34 and neural progenitor cells. Overall, these results identify a mechanism where cap-dependent translation of the *C9ORF72* G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat requires Met-tRNA<sup>Met</sup><sub>1</sub> to initiate translation in all reading frames at a near-cognate CUG codon located upstream of the expansion.

**An uORF represses G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> translation.** Recently, Niblock et al. identified poly-adenylated *C9ORF72* RNA species that retain the repeat-containing intron 1 and in which downstream exons are correctly spliced<sup>35</sup>. This finding opens the possibility that G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> RAN translation occurs from a *C9ORF72* mRNA variant with an enlarged 5'-untranslated region containing the G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeats. Notably, retention of intron 1 creates a potential uORF with 55 codons flanked by an AUG start codon and two consecutive stop codons (UGA and UAA) (Supplementary Fig. 1 and Table 1). Emerging evidence suggests that the presence of uORF may regulate the expression of downstream ORF<sup>25,45,46</sup>. Indeed, translation of uORFs located in the 5'UTRs of transcripts often inhibits translation of the downstream ORF likely by reducing its accessibility to the preinitiation complex<sup>47,48</sup>. Hence, we tested whether the uORF created by the retention of intron 1 in

*C9ORF72* transcripts may influence RAN translation of DPR proteins (Fig. 5a). We generated a construct with 66 repeats and the entire 5' end sequence of *C9ORF72* starting with exon 1A (Fig. 5b, Supplementary Fig. 1; construct #1). The uORF was found to strongly repress RAN translation in all frames of *C9ORF72* repeat. Indeed, [<sup>35</sup>S]-methionine labeled DPR proteins were not detected in presence of the uORF (Fig. 5c, construct #1 vs. #4). Immunoblot analysis confirmed the influence of the uORF with a severe reduction of poly-GA (+1 frame) levels and non-detectable poly-GP (+2) and poly-GR (+3) products (Fig. 5d; construct #1 vs. #4). Mutation of the uORF AUG start codon into CCG (Fig. 5b, construct #2) restored G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> RAN translation from all reading frames confirming its role in repressing RAN translation (Fig. 5c, d; construct #2 vs. #1). Overall, these findings strongly support that RAN translation operates through a 5'-3' scanning mechanism and is regulated by an uORF in *C9ORF72* transcripts that retain intron 1.

**5'-3' scanning-dependent mechanism for G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> translation.** To further demonstrate that RAN translation uses a canonical 5'-3' scanning mechanism we investigated whether the eIF4A, an RNA helicase required for efficient scanning during translation initiation, is involved in G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> RAN translation (Fig. 6a-e). FL3, an eIF4A-specific inhibitor<sup>49</sup>, was found to reduce RAN translation in RRL as demonstrated by the levels of [<sup>35</sup>S]-methionine labeled DPR proteins (Supplementary Fig. 6a,b; construct #4) and poly-GA (Fig. 6b, Supplementary Fig. 6c; construct #4) generated from two different concentrations of expanded RNAs. Consistently, FL3 treatment significantly reduced the levels of poly-GA, poly-GP, and poly-GR in HEK293T (Fig. 6c, d) without affecting the level of the repeat-containing transcripts (Fig. 6e). To confirm the role of eIFs and a 5'-3' scanning mechanism in RAN translation, we used a longer transcript that includes exon 1a and the entire intronic region upstream of the *C9ORF72* repeat with a AUG > CCG mutation in the uORF start codon (Supplementary Fig. 6a; construct #2). Consistent with our previous results, production of DPR proteins was partially restored in presence of the mutated uORF, but was strongly inhibited after treatment with FL3 (Supplementary Fig. 6a-c; construct #2). Another important component for scanning is the platform eIF4G, which links the cap binding factor eIF4E with the small ribosomal subunit (Fig. 6a). To investigate whether eIF4G is required for G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> RAN translation we used 4EIRCat, an inhibitor that prevents the direct interaction between eIF4E and eIF4G<sup>50</sup>. Consistently, synthesis of poly-GA from two different RNA concentrations was also reduced by 4EIRCat (Fig. 6b). Finally, we found that both edeine and cycloheximide completely inhibited the RAN translation from all three reading frames (Fig. 6b, Supplementary Fig. 6b-d). Edeine is a translation inhibitor that prevents the interaction of Met-tRNA<sup>Met</sup><sub>1</sub> anticodon with the start codon in the P site of the ribosome (Fig. 6a). Cycloheximide binds between the E site and P site of the ribosome and thereby blocks translocation to the next codon (Fig. 6a)<sup>51</sup>. The profound effect of these inhibitors on RAN translation is consistent with our previous results showing that G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> RAN translation uses a canonical translation mechanism and initiates at a CUG codon with Met-tRNA<sup>Met</sup><sub>1</sub> anticodon interaction in the P site of the ribosome (Figs. 2-4). Overall, the effect of specific translation inhibitors on the production of DPR proteins demonstrate that G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> RAN translation requires eIF4F components (4E, 4G and 4A) to promote efficient cap-dependent 5'-3' scanning.

**Inhibition of G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> translation by RNA ASOs.** We previously showed that DNA ASOs targeting sense strand G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>-containing transcripts mediate their cleavage through action of the primarily

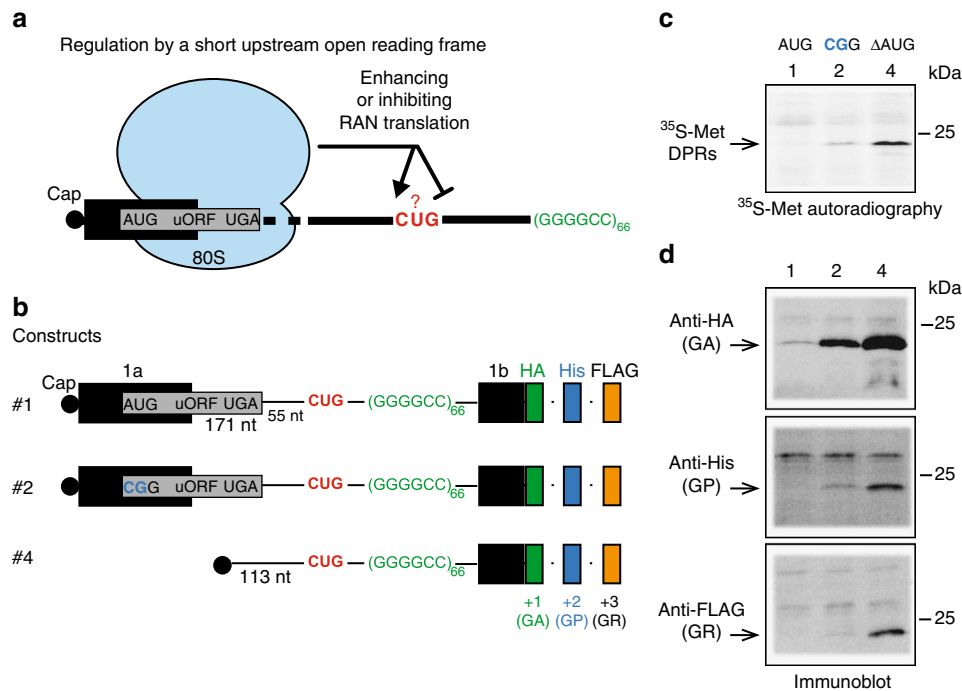


**Fig. 4** Poly-GA, poly-GP, and poly-GR RAN translation initiate at the near-cognate CUG start codon in cells. **(a)** Schematic representations of constructs #4 and #5 containing the near cognate start codon CUG or mutant CCG upstream of (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>66</sub> repeats. These constructs are driven by a CMV early enhancer/chicken β actin (CAG) promoter. Human neural progenitor cells **(b-c)**, mouse motor neuron like cells (NSC-34) **(d-e)** and human HEK293T cells **(f-g)** were co-transfected with the constructs #4 or #5 along with a GFP plasmid reporter. GFP, Hsp90 or β-Actin proteins were analyzed by immunoblot to control for the transfection efficiency and protein loading. Poly-GA, poly-GP, and poly-GR proteins were identified by immunoblot using antibodies raised against poly-GA, poly-GP, and poly-GR. Levels of the different DPR proteins were quantified and normalized to GFP, HSP90 or β-Actin. Error bars indicate SEM of three independent transfections. Student's *t*-test, \*\* and \*\*\* indicate *p* < 0.01 and *p* < 0.001, respectively

nuclear enzyme RNase H, reducing the level of RNA foci and DPR proteins in a *C9ORF72* transgenic mouse model and patient fibroblasts<sup>7,52</sup>. To determine whether RNA ASOs targeting the 5' flanking G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> sequence can block the scanning of ribosomes and inhibit RAN translation without inducing RNase-H-dependent degradation, we generated ASOs selectively targeting the region upstream of the repeats and tested their potency in inhibiting G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> RAN translation in RRL system (Fig. 6f-h). One RNA

*C9ORF72* ASO (RNA-ASO1) was complementary to a sequence that overlaps the near-cognate CUG codon, and two ASOs (RNA-ASO2, RNA-ASO3) were chosen to cover sequences located at 41 and 82 nucleotides distal from the repeats, respectively (Fig. 6f). Corresponding RNA sense oligonucleotides (RNA-SOs) were used as controls (RNA-SO1, RNA-SO2, and RNA-SO3, Fig. 6f). All three RNA-ASOs induced a dose-dependent reduction of DPR proteins produced from the capped G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> 66 repeats RNAs





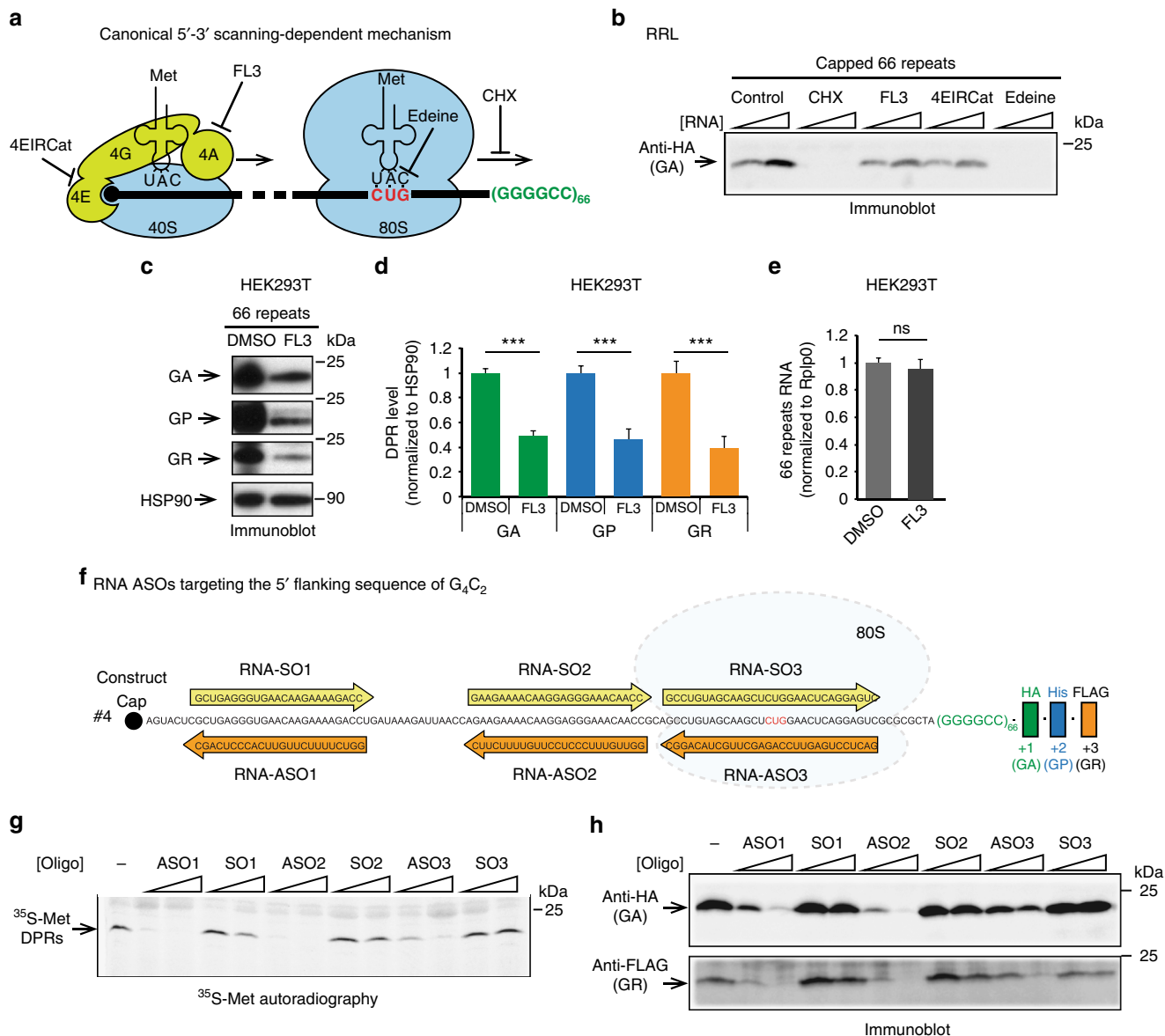
**Fig. 5** RAN translation of  $G_4C_2$  repeats is down-regulated by a short upstream open reading frame (uORF). **(a)** Retention of intron 1 in *C9ORF72* repeat-containing transcripts creates a uORF located 226 nucleotides upstream of the start CUG codon. This uORF may inhibit or enhance  $G_4C_2$  RAN translation. **(b)** To interrogate the regulation of RAN translation by this uORF, RNAs harboring the 5' full-length sequence including *C9ORF72* exon 1A (#1) and a AUG > CCG mutation in the uORF start codon (#2) were compared to RAN translation from RNA without the uORF (#4). Black boxes represent exons 1a and 1b and the gray box represents the uORF overlapping exon 1a and intron 1. **(c)** Translation in RRL system was performed in presence of [ $^{35}$ S]-methionine and capped RNA (#1, #2, or #4) followed by detection of [ $^{35}$ S]-methionine proteins by autoradiography. **(d)** Poly-GA, poly-GP, and poly-GR were detected by immunoblots using antibodies against HA-tag, His-tag, and FLAG-tag, respectively

as measured by [ $^{35}$ S]-methionine-labeling (Fig. 6g) and immunoblot (Fig. 6h). In contrast, SO controls did not affect the levels of DPR proteins. These results demonstrate that RNA ASOs targeting the 5' flanking  $G_4C_2$  sequence are sufficient to block RAN translation independently of *C9ORF72* RNAs degradation and identify the 5'-3' scanning of ribosomes as a potential therapeutic target in *C9ORF72* ALS/FTD.

#### $G_4C_2$ RNAs bind ribosomes independently from translation.

To assess ribosome loading onto  $(G_4C_2)_{exp}$  RNAs, we performed sucrose gradient analysis with radiolabeled capped RNAs containing either 30 or 66 repeats. As a control for canonical translation we used radiolabeled capped human  $\beta$ -globin mRNA. Radiolabeled capped RNAs with 66 antisense  $C_4G_2$  repeats were also used as control for RAN translation (Fig. 7a). Sucrose gradient analysis with 30 and 66  $G_4C_2$  repeat transcripts showed that RNA-containing repeats are mainly associated with polysomes (Fig. 7a, b green graph, Supplementary Fig. 6e orange graph; heavy fractions 0–20). Only a small proportion of RNAs was free (RNP; ribonucleoproteins), associated with the ribosomal small subunit in complex with initiation factors (48S) or with monosomes (80S), which is consistent with active RAN translation (Fig. 1). Since transcripts containing expanded repeats, including  $G_4C_2$  RNAs, were recently shown to undergo abnormal phase transition and form gel-like structures in vitro<sup>53</sup>, we determined whether the presence of radiolabeled  $G_4C_2$  RNAs in the heavy fractions could be due to self-aggregation rather than association with polyribosomes. Against this possibility,  $G_4C_2$ -free RNAs remained in the light fractions of sucrose gradients strongly supporting that expanded RNAs associate with polyribosomes in RRL. Contrary to the sense  $(G_4C_2)_{66}$  RNAs, transcripts

containing the antisense  $(C_4G_2)_{66}$  repeat sedimented mainly in the light fractions or were associated to monosomes, consistent with a low translation efficiency of the antisense transcripts (Fig. 7a, b; blue graph)<sup>40</sup>. Unexpectedly, treatment with edeine, that blocks the translation (Fig. 6b) and lead to the accumulation of  $\beta$ -globin mRNA in the light fractions (Fig. 7c, Supplementary Fig. 6f; light fractions 20–40, red graphs), did not prevent loading of polysomes on transcripts with 66 or 30  $G_4C_2$  repeats (Fig. 7c, Supplementary Fig. 6f; heavy fractions 0–20, green and orange graphs). The same abnormal sedimentation of  $G_4C_2$  transcripts in heavy fractions was observed after treatment with GMP-PNP, a non-hydrolysable GTP analog that normally leads to the accumulation of the transcripts in the fraction corresponding to the 48S particles, showing that  $G_4C_2$  RNAs can recruit ribosomes in a translation-independent manner (Supplementary Fig. 6g). As expected, blocking ribosomal translocation with cycloheximide induced the accumulation of the control  $\beta$ -globin mRNAs in the fraction corresponding to monosomes 80S that are prevented from translocating after assembly (Fig. 7d, Supplementary Fig. 6h; red graphs). In contrast, inhibiting RAN translation with cycloheximide (Fig. 6b, Supplementary Fig. 6b–d) did not prevent ribosomal loading on expanded transcripts with 30 or 66 repeats (Fig. 7d, Supplementary Fig. 6h; heavy fractions 0–20, green and orange graphs). As expected the 80S peak was slightly increased consistent with a small proportion of expanded  $G_4C_2$  RNAs being associated with monosomes after cycloheximide treatment, but most transcripts remained present in the heavy fractions despite cycloheximide blockage of translation. Notably, radiolabeled  $(G_4C_2)_{66}$  transcripts were more abundant in heavy fractions when they were folded in presence of  $K^+$  ions that stabilize G-quadruplex structures, comparatively to  $Na^+$  and  $Li^+$  ions (Supplementary Fig. 6i). Finally, to confirm that  $G_4C_2$  RNAs recruit

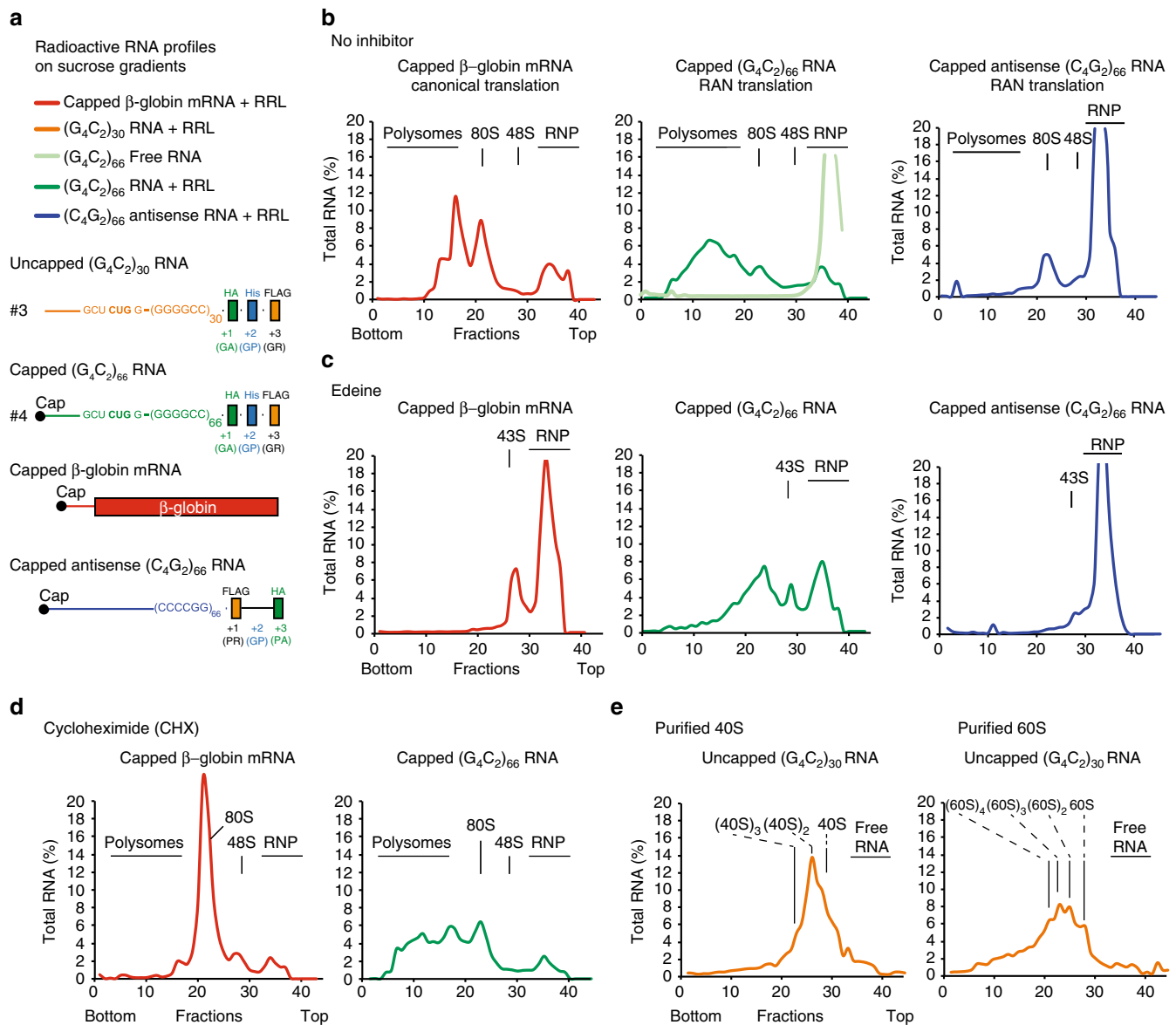


**Fig. 6** Inhibition of RAN translation by eIFs inhibitors and RNA ASOs support a 5'-3' scanning-dependent mechanism. **(a)** Illustration of translation inhibitors used to delineate the recruitment of the ribosome at the CUG start codon: 4EIRCat prevents the interaction between eIF4E (4E) and eIF4G (4G). FL3 inhibits RNA helicase eIF4A (4A). Edeine blocks the codon-anticodon interaction. Cycloheximide (CHX) blocks the translational elongation. **(b)** Translation was performed in presence of CHX, FL3, 4EIRCat, or Edeine in RRL followed by immunoblot detection of anti-HA (poly-GA) antibody. **(c-e)** HEK293T cells were transfected with the construct #4 expressing 66 G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeats and treated with FL3 or DMSO control. **(c)** Immunoblots using antibodies against poly-GA, poly-GP, poly-GR, and HSP-90 proteins. **(d)** Levels of poly-GA, poly-GP, and poly-GR after FL3 treatment were quantified and normalized to HSP90 and DMSO-treated cells. Graphs represent mean ± SEM, n = 5. Student's *t*-test, \*\*\* indicate *p* < 0.001. **(e)** Levels of repeat-containing transcripts determined by quantitative RT-PCR and normalized to the Rplp0 transcripts and DMSO treated cells. **(f)** Schematic representations of construct #4 with sequences of sense (RNA-SO) and antisense (RNA-ASO) RNA oligonucleotides used to inhibit RAN translation. **(g-h)** Translation of capped (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>66</sub> RNAs (construct #4) was performed in RRL in presence of two concentrations of sense or antisense RNA oligonucleotides. **(g)** [<sup>35</sup>S]-methionine RAN translation products were detected by autoradiography. **(h)** Poly-GA and poly-GR were detected by immunoblot using anti-HA (Poly-GA) and -FLAG (Poly-GR) antibodies, respectively

the ribosome independently from DPR translation, we performed sucrose gradient analysis with purified ribosomal 40S and 60S. Expanded transcripts with 30 repeats were able to recruit and load several 40S and 60S ribosomal subunits without the need of 5'-cap and any other initiation factors (Fig. 7e). Overall, we demonstrate here that G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat-containing transcripts associate with ribosomal subunits independently of translational factors.

**Discussion**

G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> hexanucleotide expansions in the *C9ORF72* gene were recently discovered as the major genetic cause of ALS and FTD, two fatal neurodegenerative disorders<sup>1,2</sup>. Emerging evidence supports pathogenic RNA gain-of-function mechanisms, where expanded G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> transcripts form RNA foci sequestering RNA-binding proteins in the nuclei or undergo RAN translation to produce toxic DPR proteins<sup>4</sup>. We developed robust assays to

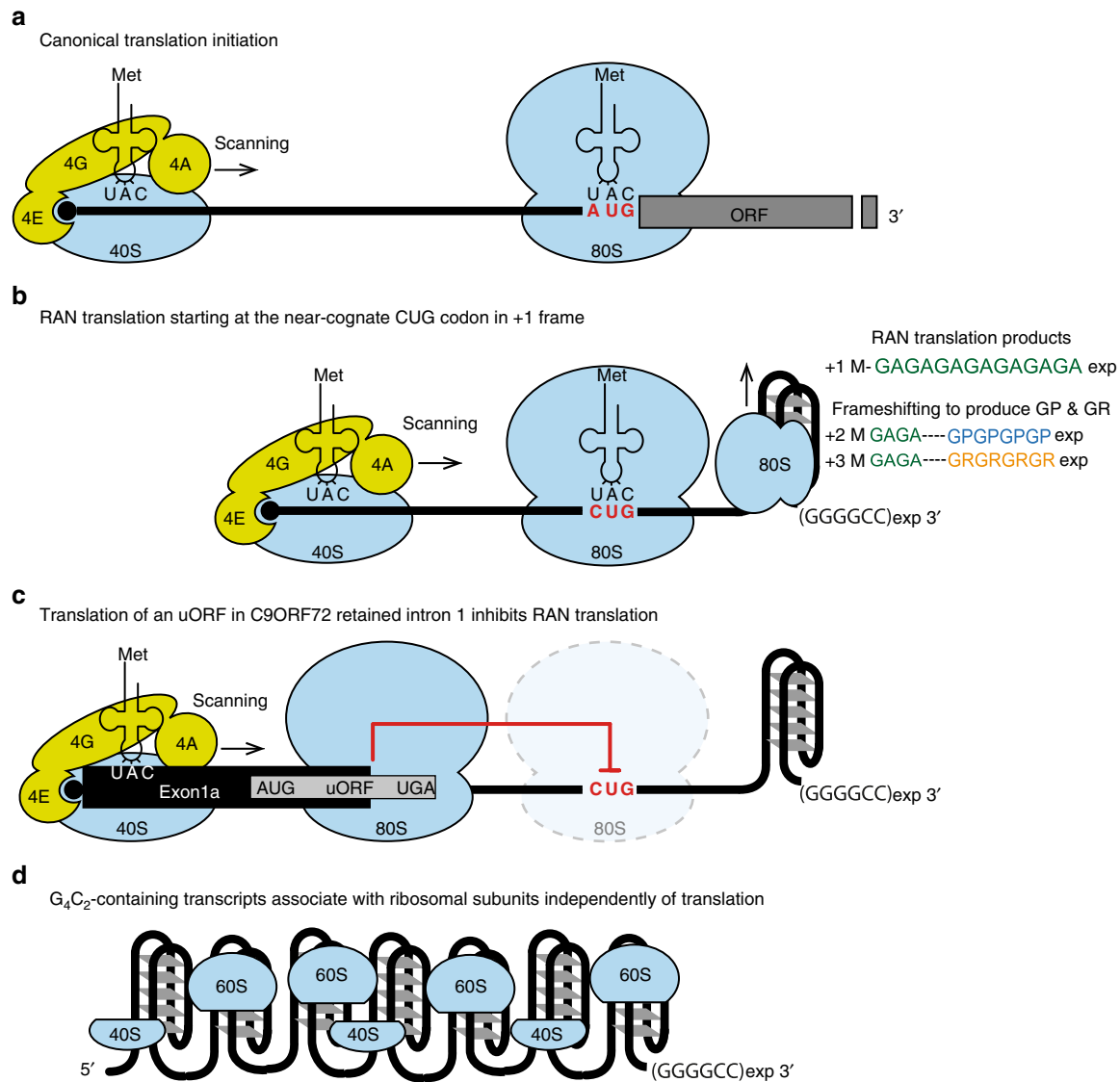


**Fig. 7**  $G_4C_2$  containing transcripts have intrinsic ribosome binding capacity independently of their translation. **(a)** Scheme of the capped  $(G_4C_2)_{66}$  RNA (#4) and uncapped  $(G_4C_2)_{30}$  transcripts (#3) used for translation in RRL and polyribosome fractionation on sucrose gradients. As controls, capped  $\beta$ -globin and capped  $(C_2G_4)_{66}$  antisense repeat RNAs were used in the same system. **(b–d)** Radiolabeled capped  $(G_4C_2)_{66}$  RNA profile by polyribosome fractionation in RRL comparatively to capped  $\beta$ -globin mRNA and  $(C_2G_4)_{66}$  antisense RNAs. Fractionation on sucrose gradients was performed without inhibitor **(b)**, in presence of Edeine **(c)** or CHX **(d)**. **(e)** Sucrose gradient fractionation of radiolabeled uncapped  $(G_4C_2)_{30}$  transcripts (#3) was performed in presence of purified 40S or 60S ribosomal subunits

study RAN translation and determine specific *cis*-requirements and *trans*-requirements for expanded  $G_4C_2$  translation.  $G_4C_2$  RAN translation was found to share many aspects with canonical translation initiation, including the requirement of a 5' cap structure, methionylated initiator tRNA<sup>Met</sup>, and the recruitment of the 40S subunit by the eIF4F complex (eIF4A, E, and G) to begin scanning toward the start codon (Fig. 8a, b). These findings are consistent with mechanisms involved in RAN translation of CGG triplet repeats in the fragile X *FMRI* gene which also depends on a cap-dependent scanning mechanism<sup>15,33,54</sup>. Since eIF4F's functions were shown to be critical in dysregulation of the translational machinery in cancers, major efforts have been undertaken to develop specific compounds directed against its components for therapeutic purposes<sup>55</sup>. Our work highlights the importance of eIF4F in ALS/FTD pathogenesis, thereby opening

the potential for new therapeutic strategies using existing eIF4F inhibitors to mitigate the effects of this neurodegenerative disease.

Ribosome profiling on higher eukaryotes showed that translation occurs on numerous ORFs without an AUG-initiator but operates with near-cognate start codons (CUG > GUG > UUG > ACG > others)<sup>56,57</sup>. We discovered that the CUG codon located 24 nucleotides upstream of the  $G_4C_2$  repeat, in the +1 (GA) frame and in an optimal Kozak sequence, is utilized as a start codon to produce DPR proteins. Mutations of this CUG codon or the Kozak sequence abolish production of all three DPR proteins in RRL supporting a frameshifting model where the ribosome starts at the CUG and slips to translate GP (+2) and GR (+3) (Fig. 8b). As in RRL, RAN translation in all three frames was affected by mutation of the CUG codon in human neural progenitor, mouse motor neuronal cells and HEK293T cells. However, while poly-



**Fig. 8** Model of translation mechanisms associated with  $G_4C_2$  expansions in *C9ORF72* ALS/FTD. **(a)** Pre-Initiation ribosomal complex (PIC) assembles on the 5' cap of mRNA by interacting with eIF4F complex formed by the cap binding factor eIF4E, the platform eIF4G and the RNA helicase eIF4A. The PIC complex scans the 5' end for an appropriate AUG start codon, where the 60S ribosomal subunit joins the 40S to form a functional 80S ribosome ready to translate the coding sequence. **(b)**  $G_4C_2$  RAN translation initiation shares the same pathway as the canonical one to translate poly-GA dipeptides, including the need of 5' cap, eIF4E, eIF4G, eIF4A, initiator methionyl-tRNA, and the scanning mechanism. However, it initiates on a near-cognate CUG codon embedded in a perfect Kozak sequence, in frame with poly-GA, instead of a canonical AUG start codon. The ability of  $G_4C_2$  expansions to form stable G-quadruplex structures forces the ribosome to occasionally undergo frameshifting to translate poly-GP and poly-GR in the +2 and +3 frames, respectively. **(c)** When  $G_4C_2$  repeats are expanded, a subset of *C9ORF72* mRNA is mis-spliced retaining intron 1 with the repeats<sup>35</sup>. RAN translation from these RNAs is inhibited by a uORF that is translated canonically. **(d)**  $G_4C_2$  expanded transcripts associate with ribosomal subunits independently from their translation

GP translation was prevented by mutation of the CUG repeat in RRL and the two neuronal models, poly-GP levels were slightly increased in HEK293T cells supporting a context-dependent regulation that differs between the three frames when the CUG is absent. The presence of specific RNA helicases might explain the differences on poly-GP translation between the different cell types, such as DDX21 recently shown to unfold RNA G-quadruplex structures in HEK293T<sup>58</sup>. Notably, an UAG stop codon in phase with the poly-GP frame is present at the beginning of the  $G_4C_2$  repeats (UAG GGG CC sequence, Supplementary Fig. 1), indicating that the ribosome must initiate in another reading frame and then frameshift to produce poly-GP or directly initiate within the repeat. As we observed a single band on SDS-PAGE with comparable molecular weight between all reading frames and systems used (Figs. 3 and 4), initiation further

downstream inside the repeats is less likely to occur from  $(G_4C_2)_{66}$  transcripts. When comparing translation efficiencies for the three reading frames, poly-GA (+1) is predominant, followed by poly-GP (+2) and poly-GR (+3), which is in agreement with a frameshifting model. This is also consistent with staining and immunoassay from human post-mortem tissues, where poly-GA accumulates at higher levels than poly-GP and poly-GR (Supplementary Fig. 3)<sup>17,40,59,60</sup>.

$G_4C_2$  RAN translation initiation is influenced by repeat length, with different sensitivity among the three reading frames. While RAN translation efficiency is only reduced in the +1 poly-GA and +3 poly-GR frames with shorter repeat length, it is completely abolished for poly-GP at 30 comparatively to 66 repeats (Fig. 1). This repeat length dependence could reflect secondary structures, which differentially affect ribosomal scanning, translation



elongation or force the ribosome to undergo a frameshifting. Indeed,  $G_4C_2$  expansions can adopt RNA G-quadruplexes<sup>28–32</sup>, a structure that was recently demonstrated to induce frameshifting during translation<sup>61,62</sup>. These RNA secondary structures are stable in presence of monovalent cations, in the order of  $K^+ > Na^+ > Li^+$ <sup>63</sup>. Thus, variations of ion concentration in the cell or specific RNA binding proteins<sup>58</sup> may modulate the presence of G-quadruplex structure in  $G_4C_2$ -containing transcripts and could influence frameshifting or initiation at non-AUG start codon.

Another major finding is the down-regulation of  $G_4C_2$  RAN translation by a short uORF. Indeed, in mis-spliced *C9ORF72* transcripts that retain intron 1, an uORF is present with an AUG and two in-frame stop codons located 76 nucleotides upstream of the  $G_4C_2$  repeats. Notably, the AUG codon in exon 1A is the only AUG identified in the 5' end of the mis-spliced RNA. Upstream ORF are *cis*-acting elements that regulate the expression of downstream protein coding sequences<sup>25,45,46</sup>. We demonstrated that mutating the AUG start codon of the uORF is sufficient to increase  $G_4C_2$  RAN translation in all three reading frames, confirming that this uORF is efficiently used by the ribosome during 5'–3' scanning and is therefore inhibiting the translation of the downstream  $G_4C_2$  repeat (Figs. 5 and 8c). It is noteworthy that translation of synaptic mRNA(s) was shown to be downregulated by uORF(s) located in their 5'UTR, but upregulated upon metabotropic glutamate receptor activation<sup>64–66</sup>. Thus, it will be important to determine whether the uORF in mis-spliced *C9ORF72* transcripts influences  $G_4C_2$  RAN translation level upon synaptic activation or external stimuli in neurons.

Notably, ASOs directing RNase-H-dependent degradation of *C9ORF72* transcripts are under therapeutic development<sup>5–7,52</sup>. The identification of sequences upstream of the repeat that influence RAN translation (CUG near-cognate start codon and uORF) opens the possibility of using alternative strategies based on ASOs that modulate translation without reducing transcript levels<sup>67,68</sup>. In agreement, we demonstrated that several RNA ASOs specifically targeting the region immediately upstream of the repeats block ribosomal scanning and efficiently reduce the level of RAN translation products (Fig. 6f–h).

Finally, we show that  $G_4C_2$  repeat transcripts unexpectedly associate with ribosomal subunits in a translation independent manner (Fig. 8d). Indeed, blocking cap initiation factors, codon–anticodon interaction, 80S ribosome assembly and ribosomal elongation did not avert the sedimentation of radiolabeled  $G_4C_2$  RNAs in the heavy fractions of sucrose gradients (Fig. 7). In addition, removing the 5' cap, shortening the repeat size, or using purified ribosomal subunits did not prevent the assembly of the transcript to multiple ribosomal subunits. On the contrary, antisense transcripts with  $C_4G_2$  repeat did not associate with the ribosome. This striking finding supports a RNA gain-of-function mechanism, independent from RAN translation and DPR proteins accumulation. Ribosomal subunits are assembled in the nucleolus and exported to the cytoplasm by multiple export receptors<sup>69</sup>. It will be important to determine whether sequestration of ribosomal subunits by expanded repeats and disruption of nucleocytoplasmic transport recently identified in *C9ORF72* disease<sup>4</sup> negatively impact overall translation in cells with *C9ORF72* expansions.

Overall, we provide new insights into RAN translation of *C9ORF72*  $G_4C_2$  repeat which uses a cap-dependent mechanism initiating at a near-cognate CUG codon. A novel mechanism of toxicity associated to *C9ORF72* expansion is supported by the association of  $G_4C_2$  transcripts with ribosomal subunits independently of their translation. Importantly, this work identifies sequences upstream of the  $G_4C_2$  repeats and specific initiation factors as possible therapeutic targets to inhibit RAN translation in *C9ORF72* ALS/FTD patients.

## Methods

**Generation of *C9ORF72* constructs with  $G_4C_2$  repeats.** To generate the different constructs listed in Supplementary Fig. 1 and Table 1, a plasmid pAG3 containing 66 repeats<sup>20,36</sup> was first digested with restriction sites BssHII and SacI to isolate the intronic region of human *C9ORF72* with ( $G_4C_2$ )<sub>66</sub>, including 8 bp of 5', 99 bp of 3' flanking sequences and three tags in frame with DPR proteins. BssHII is a restriction site naturally present in the human *C9ORF72* gene located two nucleotides upstream of the repeats. Second, pUC18 (ThermoFisher, # SD0051) was modified to contain the three HindIII, BssHII, and SacI restriction sites, enabling the insertion of the digested BssHII/SacI *C9ORF72* insert and the addition of any 5' end sequence between the HindIII and BssHII sites. After cloning the *C9ORF72* insert in modified pUC18 with BssHII and SacI, primers listed in Supplementary Table 2 were used to generate the different constructs listed in Supplementary Fig. 1. Primers were designed to add the T7 Promoter for in vitro transcription (construct #9), followed immediately by 113 bp of 5' flanking  $G_4C_2$  sequence with CUG > CCG mutation (construct #5), GAG > GGG mutation (construct #6) and double mutations CUG > CCG + GAG > GGG (construct #7). Also, primers were designed to add T7 promoter followed by 320 bp of 5' sequence (construct #1), 320 bp with AUG > CCG mutations (construct #2) and to generate a short 5' end by adding T7 promoter with 33 bp (construct #8). All primers were designed to harbor the HindIII restriction site at the 5' end and BssHII site at the 3' end. After phosphorylation with T4 Polynucleotide Kinase (ThermoFisher, #EK0031) of the primers at the 5' end and hybridization of corresponding forward and reverse primers, the generated inserts were cloned in HindIII-BssHII pUC18 with ( $G_4C_2$ )<sub>66</sub> repeats. The original plasmid was modified to contain T7 promoter by cloning using the HindIII restriction site (construct #4). Construct #3 with 30  $G_4C_2$  repeats was generated by expansion retraction during amplification of the construct #4 with 66 repeats. Finally, construct #5 containing CUG > CCG mutation was digested with HindIII and NotI to be cloned in pAG3 downstream of the CMV early enhancer/chicken  $\beta$ -actin (CAG) promoter for human cell transfection.

The  $C_4G_2$  antisense construct used as control in Fig. 7 was cloned by digesting pAG3 containing 66 repeats<sup>20,36</sup> with restriction sites BssHII and NotI to isolate the intronic region of human *C9ORF72* with ( $G_4C_2$ )<sub>66</sub> and cloning it into puc18 harboring T7 promoter in antisense direction. This construct was designed to harbor Flag tag in poly-PR +1 frame and HA tag in +3 poly-PA frame.

**In vitro transcription.** The different variants of *C9ORF72* ( $G_4C_2$ )<sub>exp</sub> constructs were cloned downstream of T7 promoter in pUC18 as detailed in Supplementary Fig. 1 and Table 1. Vectors were digested by *XhoI* and used for run-off in vitro transcription with T7 RNA polymerase. Uncapped RNAs were separated on denaturing PAGE (4%) and RNA were recovered from the gel slices by electroelution. The resulting pure RNA transcripts were capped at their 5' end with the ScriptCap m<sup>7</sup>G Capping System (Epicenter Biotechnologies).

**In vitro translation in RRL.** Translation reactions were performed in self-made rabbit reticulocyte lysate system (RRL) as previously described<sup>42</sup>, without RNase treatment (used in commercially available extracts) that was shown to be detrimental to the translation efficiency from extracts, especially for cap-dependent translation<sup>70</sup>. Briefly, reactions were incubated at 30 °C for 60 min and included 100 and 200 nM of each transcript and 10.8  $\mu$ Ci [<sup>35</sup>S]Met. Aliquots of translation reactions were analyzed by 15% SDS-PAGE and Western Blots. The cap dependency was analyzed by preincubation of increasing m<sup>7</sup>GpppG concentrations ranging from 0.5 to 1.5 mM for 5 min at room temperature. The experiments were performed in the presence of MgCl<sub>2</sub> at a constant [MgCl<sub>2</sub>]/[cap analog] ratio of 0.8. For translation in presence of RNA sense (RNA-SO) and antisense (RNA-ASO) oligonucleotides (Supplementary Table 3) were annealed to 100 nM capped 66 repeat RNA (construct #4) in 20 mM Hepes-K (pH 7.6) and 100 mM KCl for 5 min at 65 °C and 20 min at room temperature with a 10 or 50 fold molar excess of oligonucleotides over construct #4. This annealing mixture was kept on ice before addition to the translation reaction. RRL were incubated 5 min at 30 °C in presence of the different translational inhibitors at the following concentrations: 150 ng mL<sup>-1</sup> for the poly(I:C), 15  $\mu$ M for salubrinal, 4.5 mg mL<sup>-1</sup> cycloheximide, 10  $\mu$ M edeine, 15  $\mu$ M FL3, and 5  $\mu$ M 4E1RCat.

**Sucrose-gradient analysis.** For sucrose-gradient analysis, 5'-<sup>32</sup>P-labeled or 3'-<sup>32</sup>P-labeled mRNA were incubated in RRL or with purified 40S and 60S ribosomal subunits, in the presence of specific inhibitors (Edeine leads to 43S accumulation, GMP-PNP leads to 48S formation, cycloheximide blocks translocation and leads to 80S accumulation) or without inhibitor to assemble polysomes. Translational inhibitors were incubated with RRL 5 min prior to addition of radiolabeled mRNAs. The translation initiation complexes were separated on a 7–47% linear sucrose gradient in buffer (25 mM Tris-HCl [pH 7.4], 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT). The reactions were loaded on the gradients and spun (23,411 $\times$ g for 2.5 h at 4 °C) in a SW41 rotor. mRNA sedimentation on sucrose gradients was monitored by Cerenkov counting after fractionation. In Supplementary Fig. 6i, capped ( $G_4C_2$ )<sub>66</sub> transcripts were folded in presence of KCl, NaCl or LiCl at 195 mM, by denaturing 1 min at 95 °C, followed by 5 min at 20 and 4 °C until adding the RRL (75 mM final ion concentrations).

**Cell culture and plasmid transfection.** The HEK293T cells were cultured in DMEM 10% (v/v) FBS and penicillin/streptomycin. ReNcell VM human neural progenitors (Millipore; Catalog number SCC008) were maintained in high-glucose DMEM/F12 (ThermoFisher Scientific) media supplemented with 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  heparin (StemCell Technologies, #07980), 2% (v/v) B27 neural supplement (ThermoFisher Scientific, #175004044), 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  hEGF (Sigma-Aldrich, #E9644), 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  bFGF (Stemgent, #03-0002) and 1% penicillin/streptomycin (ThermoFisher Scientific) and were plated onto BD Matrigel (BD Biosciences)-coated cell culture flasks with B27, EGF, FGF, and heparin on precoated Matrigel dishes. The NSC-34 cells (CELLutions Biosystems Inc; Catalog number—CLU140) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U  $\text{mL}^{-1}$  penicillin, and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ . HEK293T were plated 24 h prior transfection with different C9ORF72 (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>66</sub> expansion constructs (Supplementary Fig. 1 and Table 1) and a reporter pGFPmax (Lonza) expressing GFP using a construct:pGFPmax ratio of 5:1. The lipofectamine 2000 reagent was used according to manufacturer instruction (Invitrogen) for HEK293T and NSC-34 transfections. Nucleofection using Nucleofector kit (Lonza, #VPG 1005) was used for neural progenitor cell to achieve high efficiency of transfection of plasmids. Twenty-four hours after transfection, the cells were washed with PBS 1X and collected for RNA and protein extractions.

**FL3 treatment in cells.** HEK293T were cultured 24 h prior treatment into 10 cm dish, following by transfection with lipofectamine 2000 of construct #4 as described previously. After 4 h of incubation in the transfection reagents, cells were treated with 10  $\mu\text{M}$  FL3 for 24 h and collected for immunoblot analysis

**Immunoblotting.** The cell pellets were re-suspended in 400  $\mu\text{l}$  of 2X Laemmli sample buffer (Biorad #1610737). The proteins were homogenized with pestle, then denatured at 95 °C for 10 min. The total protein extract was separated on gradient 4–20% SDS-PAGE gels and 18% SDS-PAGE gels, transferred onto PVDF membranes, blocked with 5% (v/v) non fat dry milk (NFM) in Tris-buffered saline (TBS) pH 7.5. The membranes were incubated with primary antibodies (Supplementary Table 4) overnight at 4 °C in TBS and 5% (v/v) NFM, washed with TBS-Tween 20 0.1%, incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (donkey anti-rabbit GE Healthcare Life Sciences #NA934, sheep anti-mouse GE Healthcare Life Sciences #NA931, goat anti-rat abcam #97057), washed with TBS-Tween 20 0.1% and signal was revealed with autoradiographic films.

**Immunofluorescence.** HEK293T cells were cultured on 24-well plates prior transfection with lipofectamine 2000, following the recommendations of supplier. Twenty-four hours after transfection, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde and washed twice with PBS. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min at room temperature. They were washed twice again with PBS and blocked with 1% bovine albumin in PBS for 1 h at room temperature. Cells were incubated at 4 °C for 24 h with primary antibodies anti-GA or anti-GP (Supplementary Table 4) at 1:500 dilution in the blocking solution supplemented with 0.02% Tween-20. Rabbit fluorescently tagged secondary antibody conjugated to Alexa 595 (ThermoFisher Scientific) was incubated for 1 h at room temperature in the blocking buffer. The nuclei were stained with ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (ThermoFisher, # P36935) and mounted on slides for confocal microscopy.

**Immunohistochemistry of human brain sections.** Paraffin sections (8  $\mu\text{m}$ ) from the cerebellum were deparaffinized with CitriSolv (Thermo Fisher Scientific, #04-355-121) and incubated in 100% EtOH, 90% EtOH, 70% EtOH, 50%, and Milli-Q® water. Sections were incubated in 0.6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in methanol at room temperature for 15 min, treated with antigen unmasking solution (Vector Laboratories, #H-3300) in the steam chamber for 45 min, and blocked at room temperature with 1% FBS/0.1% Triton X-100/PBS for 25 min. Sections were then incubated at 4 °C overnight with anti-GA rabbit antibody (Rb4334) (1:1000), anti-GR rabbit antibody (Rb4995) (1:1000), or anti-GP rabbit antibody (Rb7633) (1:1000)<sup>52</sup> diluted in 1% FBS/PBS. Next, sections were stained with secondary antibody ImmPRESSTM HRP (peroxidase) anti-Rabbit IgG Reagent (Vector Laboratories, #MP-7401) at room temperature for 1 h, developed with VECTOR NovaRED Peroxidase (HRP) Substrate Kit (Vector Laboratories, #SK-4800), treated with hematoxylin stain solution (RICCA, #3530-32) and bluing reagent Scott's tap water substitute (Leica Biosystems, #3802901), and mounted with Richard-Allan Scientific™ Mounting Medium (Thermo Fisher Scientific, #4112).

**Data availability.** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request. All constructs and reagents generated in this study will be shared upon request.

Received: 28 April 2017 Accepted: 14 December 2017

Published online: 11 January 2018

## References

- DeJesus-Hernandez, M. et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in non-coding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* **72**, 245–256 (2011).
- Renton, A. E. et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* **72**, 257–268 (2011).
- Majounie, E. et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.* **11**, 323–330 (2012).
- Gitler, A. D. & Tsuiji, H. There has been an awakening: emerging mechanisms of C9orf72 mutations in FTD/ALS. *Brain Res.* **1647**, 19–29 (2016).
- Donnelly, C. J. et al. RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron* **80**, 415–428 (2013).
- Sareen, D. et al. Targeting RNA foci in iPSC-derived motor neurons from ALS patients with a C9ORF72 repeat expansion. *Sci. Transl. Med.* **5**, 208ra149 (2013).
- Lagier-Tourenne, C. et al. Targeted degradation of sense and antisense C9orf72 RNA foci as therapy for ALS and frontotemporal degeneration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, E4530–E4539 (2013).
- Mizielinska, S. et al. C9orf72 frontotemporal lobar degeneration is characterised by frequent neuronal sense and antisense RNA foci. *Acta Neuropathol.* **126**, 845–857 (2013).
- Mori, K. et al. hnRNP A3 binds to GGGGCC repeats and is a constituent of p62-positive/TDP43-negative inclusions in the hippocampus of patients with C9orf72 mutations. *Acta Neuropathol.* **125**, 413–423 (2013).
- Zu, T. et al. RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, E4968–E4977 (2013).
- Zu, T. et al. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 260–265 (2011).
- Cleary, J. D. & Ranum, L. P. New developments in RAN translation: insights from multiple diseases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **44**, 125–134 (2017).
- Zu, T. et al. RAN translation regulated by muscleblind proteins in myotonic dystrophy type 2. *Neuron* **95**, 1292–1305.e1295 (2017).
- Banez-Coronel, M. et al. RAN translation in Huntington disease. *Neuron* **88**, 667–677 (2015).
- Todd, P. K. et al. CGG repeat-associated translation mediates neurodegeneration in fragile X tremor ataxia syndrome. *Neuron* **78**, 440–455 (2013).
- Ishiguro, T. et al. Regulatory role of RNA chaperone TDP-43 for RNA misfolding and repeat-associated translation in SCA31. *Neuron* **94**, 108–124.e107 (2017).
- Mori, K. et al. The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. *Science* **339**, 1335–1338 (2013).
- Mori, K. et al. Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat are translated into aggregating dipeptide repeat proteins. *Acta Neuropathol.* **126**, 881–893 (2013).
- Ash, P. E. A. et al. Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron* **77**, 639–646 (2013).
- Gendron, T. F. et al. Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta Neuropathol.* **126**, 829–844 (2013).
- Kearse, M. G. & Todd, P. K. Repeat-associated non-AUG translation and its impact in neurodegenerative disease. *Neurotherapeutics* **11**, 721–731 (2014).
- Mackenzie, I. R. et al. Dipeptide repeat protein pathology in C9ORF72 mutation cases: clinico-pathological correlations. *Acta Neuropathol.* **126**, 859–879 (2013).
- Mahoney, C. J. et al. Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain* **135**, 736–750 (2012).
- Freibaum, B. D. & Taylor, J. P. The role of dipeptide repeats in C9ORF72-related ALS-FTD. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 35 (2017).
- Hinnebusch, A. G., Ivanov, I. P. & Sonenberg, N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science* **352**, 1413–1416 (2016).
- Filbin, M. E. & Kieft, J. S. Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 267–276 (2009).
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. & Pestova, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 113–127 (2010).
- Grigg, J. C., Shumayrikh, N. & Sen, D. G-quadruplex structures formed by expanded hexanucleotide repeat RNA and DNA from the neurodegenerative disease-linked C9orf72 gene efficiently sequester and activate heme. *PLoS One* **9**, e106449 (2014).
- Fratta, P. et al. C9orf72 hexanucleotide repeat associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia forms RNA G-quadruplexes. *Sci. Rep.* **2**, 1016 (2012).
- Reddy, K., Zamiri, B., Stanley, S. Y., Macgregor, R. B. Jr & Pearson, C. E. The disease-associated r(GGGGCC)<sub>n</sub> repeat from the C9orf72 gene forms tract length-dependent uni- and multimolecular RNA G-quadruplex structures. *J. Biol. Chem.* **288**, 9860–9866 (2013).

31. Haeusler, A. R. et al. C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature* **507**, 195–200 (2014).
32. Conlon E.G. et al. The C9ORF72 GGGGCC expansion forms RNA G-quadruplex inclusions and sequesters hnRNP H to disrupt splicing in ALS brains. *Elife* **5**, e17820 (2016).
33. Kearsley, M. G. et al. CGG repeat-associated non-AUG translation utilizes a cap-dependent scanning mechanism of initiation to produce toxic proteins. *Mol. Cell* **62**, 314–322 (2016).
34. Hinnebusch, A. G. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 779–812 (2014).
35. Niblock, M. et al. Retention of hexanucleotide repeat-containing intron in C9orf72 mRNA: implications for the pathogenesis of ALS/FTD. *Acta Neuropathol. Commun.* **4**, 18 (2016).
36. Chew, J. et al. Neurodegeneration. C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits. *Science* **348**, 1151–1154 (2015).
37. Murray J. et al. Structural characterization of ribosome recruitment and translocation by type IV IRES. *Elife* **5**, e13567 (2016).
38. Fernandez, I. S., Bai, X. C., Murshudov, G., Scheres, S. H. & Ramakrishnan, V. Initiation of translation by cricket paralysis virus IRES requires its translocation in the ribosome. *Cell* **157**, 823–831 (2014).
39. Pestova, T. V. & Hellen, C. U. Translation elongation after assembly of ribosomes on the Cricket paralysis virus internal ribosomal entry site without initiation factors or initiator tRNA. *Genes Dev.* **17**, 181–186 (2003).
40. Mackenzie, I. R. et al. Quantitative analysis and clinico-pathological correlations of different dipeptide repeat protein pathologies in C9ORF72 mutation carriers. *Acta Neuropathol.* **130**, 845–861 (2015).
41. Namer, L. S. et al. An ancient pseudoknot in *TNF-α* Pre-mRNA activates PKR, inducing eIF2α phosphorylation that potentially enhances splicing. *Cell Rep.* **20**, 188–200 (2017).
42. Martin, F. et al. Cap-assisted internal initiation of translation of histone H4. *Mol. Cell* **41**, 197–209 (2011).
43. Kozak, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283–292 (1986).
44. Choi, S. H. et al. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature* **515**, 274–278 (2014).
45. Chew, G. L., Pauli, A. & Schier, A. F. Conservation of uORF repressiveness and sequence features in mouse, human and zebrafish. *Nat. Commun.* **7**, 11663 (2016).
46. Liang, X. H. et al. Translation efficiency of mRNAs is increased by antisense oligonucleotides targeting upstream open reading frames. *Nat. Biotechnol.* **34**, 875–880 (2016).
47. Barbosa, C., Peixeiro, I. & Romão, L. Gene expression regulation by upstream open reading frames and human disease. *PLoS Genet.* **9**, e1003529 (2013).
48. Calvo, S. E., Pagliarini, D. J. & Mootha, V. K. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 7507–7512 (2009).
49. Boussemart, L. et al. eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature* **513**, 105–109 (2014).
50. Robert, F. et al. Translation initiation factor eIF4F modifies the dexamethasone response in multiple myeloma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 13421–13426 (2014).
51. Garreau de Loubresse, N. et al. Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome. *Nature* **513**, 517–522 (2014).
52. Jiang, J. et al. Gain of toxicity from ALS/FTD-linked repeat expansions in C9ORF72 is alleviated by antisense oligonucleotides targeting GGGGCC-containing RNAs. *Neuron* **90**, 535–550 (2016).
53. Jain, A. & Vale, R. D. RNA phase transitions in repeat expansion disorders. *Nature* **546**, 243–247 (2017).
54. Sellier, C. et al. Translation of expanded CGG repeats into FMRpolyG is pathogenic and may contribute to fragile X tremor ataxia syndrome. *Neuron* **93**, 331–347 (2017).
55. Bhat, M. et al. Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 261–278 (2015).
56. Ingolia, N. T., Lareau, L. F. & Weissman, J. S. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* **147**, 789–802 (2011).
57. Jackson, R. & Standart, N. The awesome power of ribosome profiling. *RNA* **21**, 652–654 (2015).
58. McRae, E. K. S. et al. Human DDX21 binds and unwinds RNA guanine quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **45**, 6656–6668 (2017).
59. Gendron, T. F. et al. Cerebellar c9RAN proteins associate with clinical and neuropathological characteristics of C9ORF72 repeat expansion carriers. *Acta Neuropathol.* **130**, 559–573 (2015).
60. Davidson, Y. et al. Neurodegeneration in frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease associated with expansions in C9orf72 is linked to TDP-43 pathology and not associated with aggregated forms of dipeptide repeat proteins. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **42**, 242–254 (2016).
61. Yu, C. H., Teulade-Fichou, M. P. & Olthoorn, R. C. Stimulation of ribosomal frameshifting by RNA G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.* **42**, 1887–1892 (2014).
62. Kapur, M., Monaghan, C. E. & Ackerman, S. L. Regulation of mRNA translation in neurons—a matter of life and death. *Neuron* **96**, 616–637 (2017).
63. Millevoi, S., Moine, H. & Vagner, S. G-quadruplexes in RNA biology. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **3**, 495–507 (2012).
64. Di Prisco, G. V. et al. Translational control of mGluR-dependent long-term depression and object-place learning by eIF2α. *Nat. Neurosci.* **17**, 1073–1082 (2014).
65. Bal, N. V. et al. Upstream open reading frames located in the leader of protein kinase Mzeta mRNA regulate its translation. *Front. Mol. Neurosci.* **9**, 103 (2016).
66. Lee, J. et al. An upstream open reading frame impedes translation of the huntingtin gene. *Nucleic Acids Res.* **30**, 5110–5119 (2002).
67. Kole, R., Kraimer, A. R. & Altman, S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 125–140 (2012).
68. Johansson, H. E., Belsham, G. J., Sproat, B. S. & Hentze, M. W. Target-specific arrest of mRNA translation by antisense 2'-O-alkyloligoribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4591–4598 (1994).
69. Kohler, A. & Hurt, E. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 761–773 (2007).
70. Soto Rifo, R., Ricci, E. P., Decimo, D., Moncorge, O. & Ohlmann, T. Back to basics: the untreated rabbit reticulocyte lysate as a competitive system to recapitulate cap/poly(A) synergy and the selective advantage of IRES-driven translation. *Nucleic Acids Res.* **35**, e121 (2007).

## Acknowledgements

We thank Dr Doo Yeon Kim for his support in culturing ReNcell VM, Amélie Laugel, Michael Baughn, Dr Anna-Claire Devlin, and Dr Ying Sun for technical assistance, Dr Gilbert Eriani, members of Dr Brian J. Wainger and Dr Mark W. Albers laboratories, Dr Merit Cudkovic, Dr Shuying Sun, Dr Raymond Kaempfer, Dr Frank Rigo, and Dr Don W. Cleveland for helpful discussions and continuous support. R.T. was supported by a grant from the Philippe Foundation. This work was supported by CNRS, Université de Strasbourg, a grant from the ANR to F.M. (ANR-11-SVSE802501). C.L.-T. was supported by the Department of Neurology at the Massachusetts General Hospital and grants from Target ALS (13-04827) and from NINDS/NIH (R01NS087227).

## Author contributions

R.T., F.M. and C.L.-T. designed research; R.T., F.F., F.M. and C.L.-T. analyzed the data; R.T., L.S., F.M., F.F., M.J., M.W., C.-Z.L., C.-C.L. and T.G. performed research; J.J., L.D., H.A.-H., K.J.-W., T.G. and L.P. contributed key reagents and methodology. R.T., F.F., F.M. and C.L.-T. wrote the manuscript.


## Additional information

**Supplementary Information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02643-5>.

**Competing interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Reprints and permission** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

## Publication N° 4

The mTOR-S6 kinase pathway promotes stress  
granule assembly

Sfakianos, A. P.; Mellor, L. E.; Pang, Y. F.; Kritsiligkou, P.; Needs, H.; Abou-Hamdan, H.; Désaubry, L.; Poulin, G. B.; Ashe, M. P.; Whitmarsh, A. J., *Cell Death Diff.*, **2018**.





# The mTOR-S6 kinase pathway promotes stress granule assembly

Aristeidis P. Sfakianos<sup>1</sup> · Laura E. Mellor<sup>1</sup> · Yoke Fei Pang<sup>1</sup> · Paraskevi Kritsiligkou<sup>1</sup> · Hope Needs<sup>1</sup> · Hussein Abou-Hamdan<sup>2</sup> · Laurent Désaubry<sup>2</sup> · Gino B. Poulin<sup>1</sup> · Mark P. Ashe<sup>1</sup> · Alan J. Whitmarsh<sup>1</sup>

Received: 14 July 2017 / Revised: 20 December 2017 / Accepted: 10 January 2018  
© The Author(s) 2018. This article is published with open access

## Abstract

Stress granules are cytoplasmic mRNA-protein complexes that form upon the inhibition of translation initiation and promote cell survival in response to environmental insults. However, they are often associated with pathologies, including neurodegeneration and cancer, and changes in their dynamics are implicated in ageing. Here we show that the mTOR effector kinases S6 kinase 1 (S6K1) and S6 kinase 2 (S6K2) localise to stress granules in human cells and are required for their assembly and maintenance after mild oxidative stress. The roles of S6K1 and S6K2 are distinct, with S6K1 having a more significant role in the formation of stress granules via the regulation of eIF2 $\alpha$  phosphorylation, while S6K2 is important for their persistence. In *C. elegans*, the S6 kinase orthologue RSKS-1 promotes the assembly of stress granules and its loss of function sensitises the nematodes to stress-induced death. This study identifies S6 kinases as regulators of stress granule dynamics and provides a novel link between mTOR signalling, translation inhibition and survival.

## Introduction

Cells employ a number of mechanisms to adapt and survive stressful conditions [1, 2]. Many stresses cause repression of translation coincident with the formation of stress granules (SGs) [3, 4]. This is primarily mediated by the phosphorylation of translation initiation factor 2 alpha (eIF2 $\alpha$ ) by stress-responsive protein kinases [3–5]. Independent of this, SGs are induced by the inhibition of other translation factors, including the mRNA helicase eIF4A [6, 7]. SGs are large non-membrane bound cytoplasmic entities that contain mRNAs, translation initiation complexes and other RNA-binding proteins (RNPs) [3, 8]. Stress-induced

translation inhibition leads to specific RNPs binding to stalled mRNAs in translation complexes and nucleating SGs by promoting transient interactions between their disordered regions [8–12]. Recent studies have indicated that SGs exist as liquid droplets with a solid core surrounded by a fluid shell and that they form via liquid–liquid phase separation dependent upon the local concentration of mRNAs and RNPs [13–17]. SGs are highly dynamic, triaging and storing mRNAs to enable cells to re-programme translation and mount a protective response [3, 8, 18]. In addition, there is accumulating evidence that SGs regulate cellular signalling pathways to coordinate changes in translation with altered cell fate [4, 19, 20]. Recent studies have indicated that the interplay between the mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway and SGs is important for regulating cell fate [21–23].

The mTOR protein kinase is a component of the mTORC1 complex that targets many proteins involved in translation [24]. It phosphorylates and inactivates 4EBP proteins causing them to release eIF4E for binding to eIF4G1 and thus permitting translation initiation [24]. It also phosphorylates the p70 S6 kinases S6K1 and S6K2, leading to their activation and phosphorylation of substrates that promote translation initiation, including S6 ribosomal protein (RPS6) [24]. In yeast, TORC1 activity is suppressed by its sequestration into SGs following heat stress and this protects against DNA damage [21]. Similarly, mTORC1 components are sequestered into mammalian SGs, resulting

---

Edited by D. Aberdam

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41418-018-0076-9>) contains supplementary material, which is available to authorised users.

---

✉ Alan J. Whitmarsh  
alan.j.whitmarsh@manchester.ac.uk

<sup>1</sup> School of Biological Sciences, Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, Michael Smith Building, Oxford Road, Manchester M13 9PT, UK

<sup>2</sup> Laboratory of Therapeutic Innovation (UMR 7200), CNRS, University of Strasbourg, 67401 Illkirch, France

in reduced mTORC1 assembly and suppression of mTORC1 hyperactivation-induced apoptosis [22, 23]. Whilst the actions of mTORC1 can be inhibited by SGs, paradoxically, there is evidence that mTORC1 can suppress translation and facilitate SG assembly [25, 26]. Thus, it is important to gain a better understanding of the complex role of the mTOR pathway in SG dynamics. In this study, we demonstrate that the mTORC1 effector kinases S6K1 and S6K2 have distinct roles in SG assembly and maintenance in cultured human cells and that the S6 kinase orthologue, RSKS-1, promotes SG assembly in *Caenorhabditis elegans*.

## Results

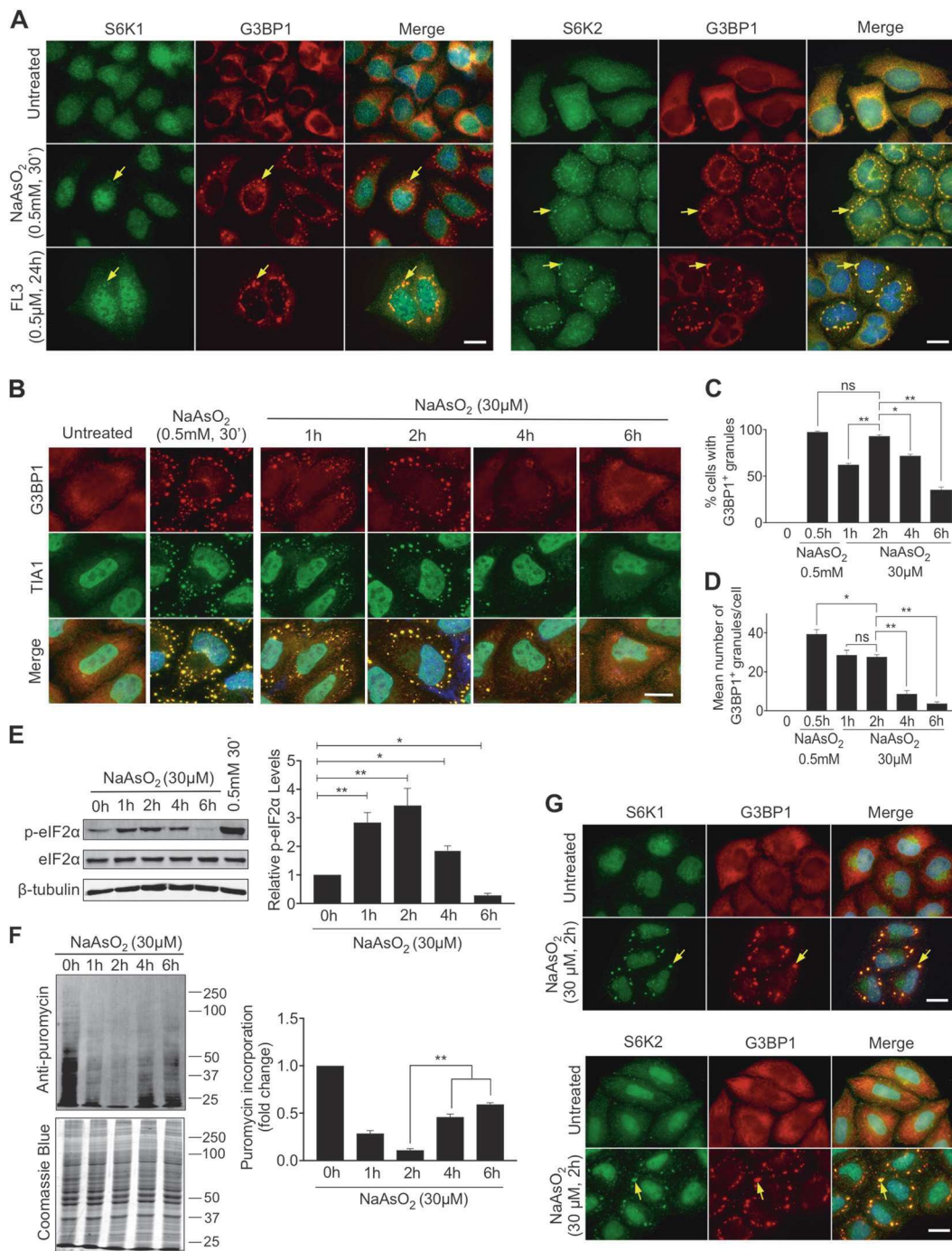
### S6K1 and S6K2 localise to SGs

Consistent with previous studies [22, 23], we observed the localisation of the mTORC1 associated proteins mTOR, RAPTOR and ASTRIN with the SG marker G3BP1 in HeLa cells treated with 0.5 mM sodium arsenite for 30 min to cause an acute oxidative stress (Fig. S1A-C). We also observed robust localisation of S6K2 to SGs with less pronounced co-localisation of S6K1 and the S6 kinase substrate RPS6 (Fig. 1a, S1D). Sodium arsenite treatment causes translational repression and SG formation via promoting the phosphorylation of Ser51 on eIF2 $\alpha$  [27] but SGs also form independent of this following inhibition of eIF4A [6, 7]. We found that mTORC1 components, S6 kinases and RPS6 all localised to SGs following treatment with FL3, an eIF4A inhibitor [28, 29] (Fig. 1a, S1). As expected, FL3 suppressed translation without increasing eIF2 $\alpha$  phosphorylation (Fig. S2). We conclude that S6K2, and to a lesser extent S6K1, are present in SGs formed by both eIF2 $\alpha$  phosphorylation-dependent and independent mechanisms. The acute oxidative stress induced by high concentrations of sodium arsenite (e.g., 0.5 mM) may not be reflective of physiological conditions, so we investigated the formation of SGs under milder oxidative stress. Cells were treated with 30  $\mu$ M sodium arsenite for up to 6 h and assessed for SG formation by immunostaining for the SG marker proteins G3BP1 and TIA1 (Fig. 1b). SG formation increased up to 2 h of treatment before declining (Fig. 1b–d) and this temporal profile correlated with the abundance of phosphorylated eIF2 $\alpha$  (Fig. 1e). To determine how the changes in phospho-eIF2 $\alpha$  levels were related to translational inhibition, we performed a puromycin incorporation assay [30]. Puromycin acts as an analogue of aminoacyl-tRNA and we found that its incorporation into newly synthesised proteins inversely correlated with phospho-eIF2 $\alpha$  levels across the time course (Fig. 1f), indicating that mild oxidative stress promotes the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  coincident with decreased translation. Interestingly, cells

subjected to 30  $\mu$ M sodium arsenite for 24 h still displayed SGs (Fig. S3A), suggesting that SG formation may be oscillatory with a peak at 2 h, declining by 6 h, but with SGs re-appearing in most cells by 24 h. Importantly, we found that the SGs formed after mild arsenite stress have distinct characteristics compared to those induced by acute arsenite treatment. The aliphatic alcohol 1,6-hexanediol dissolves liquid structures by breaking weak hydrophobic bonds while leaving solid aggregates unaffected [14, 31], thus can distinguish between the liquid phase and solid aggregates within SGs. It is reported that high concentrations of this reagent induces SGs [18], so we used a concentration (0.5%) that we determined does not promote granule formation. Under these conditions, there was a decrease in the size of SGs formed after mild arsenite treatment but not after acute treatment (Fig. S4A-C), suggesting that SGs induced by mild oxidative stress contain a higher liquid composition. Further evidence that SGs formed after mild oxidative stress are distinct came from the use of ISRIB, which inhibits the actions of phosphorylated eIF2 $\alpha$  [27]. SG formation under mild arsenite treatment was suppressed by ISRIB but this did not occur in response to the acute stress (Figs. S4D, E). Together, these data suggest that distinct types of SGs exist dependent on the level of oxidative stress. We found that S6K1 was significantly more abundant in SGs formed after mild arsenite treatment compared to those formed following acute arsenite stress, whilst S6K2 showed robust localisation to SGs in both conditions (Fig. 1a, g, S3B). Furthermore, the different isoforms of S6K1 and S6K2 [32, 33] all localised to SGs in response to mild arsenite treatment when ectopically expressed in HeLa cells (Fig. S5). Our data demonstrate that S6 kinases accumulate in distinct SGs formed following mild oxidative stress.

### S6K1 and S6K2 are required for SG formation

We next determined if S6 kinases played a role in regulating SG dynamics. Treatment with LYS6K2, an inhibitor of S6 kinase activity [34], caused a decrease in cells displaying SGs in response to mild arsenite stress (Fig. 2a, S6A, B). To confirm the importance of S6 kinases for SG assembly and investigate the specific roles of S6K1 and S6K2, their expression was knocked-down using siRNA (Fig. 2b, S6C). S6K1 depletion decreased SG number and size after mild arsenite treatment, as judged by immunostaining for the SG marker proteins G3BP1 and TIA1 (Fig. 2c, f–h, S7). S6K2 depletion caused a more modest decrease in the number of cells displaying SGs after 2 h of arsenite treatment (Fig. 2d, S7), but there were fewer granules per cell and they were smaller than in control cells (Fig. 2f–h, S7). At later time points of arsenite treatment, S6K2 depletion did significantly decrease the number of cells with SGs (Fig. 2d,



S7C). The depletion of both S6K1 and S6K2 together did not produce an accumulative effect on SG formation or size (Fig. 2e–h). Importantly, the depletion of either S6K1 or S6K2 did not affect SG formation in response to acute arsenite stress (Fig. S8A–D). In conclusion, S6K1 and S6K2 are both required for SG assembly in response to mild oxidative stress. To determine if they also regulate SG assembly in response to other stimuli, we performed a similar analysis using heat stress and the eIF4A inhibitor,

FL3. We found that S6K1 knockdown significantly decreased the number of cells with SGs and SG size in response to heat, while S6K2 knockdown only impacted on SG size (Fig. S9). In contrast, knockdown of S6K1 did not affect SG formation in response to FL3, while S6K2 knockdown reduced the number of cells displaying SGs as well as their size (Fig. S10). Our data suggest that S6 kinases play distinct roles in SG assembly dependent on the type of stress.



◀ **Fig. 1** S6 kinases accumulate in stress granules. **a** HeLa cells were treated with either 0.5 mM of NaAsO<sub>2</sub> for 30 min or 0.5 μM FL3 for 24 h and stress granules labelled using an antibody against G3BP1 (red). The localisation of S6K1 and S6K2 were observed by immunofluorescence staining (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Merged images are shown. Yellow arrows indicate examples of stress granules. Scale bar = 25 μm. **b** HeLa cells were treated with either 0.5 mM of NaAsO<sub>2</sub> for 30 min or 30 μM NaAsO<sub>2</sub> for 1, 2, 4 or 6 h. Stress granule formation was assessed by immunofluorescence staining of G3BP1 (red) or TIA1 (green). **c, d** Quantification of the % of cells containing stress granules after treatment and the mean number of stress granules in the cells displaying stress granules. 100 cells were counted in each of the 3 biological repeats. Scale bar = 20 μm. **e** HeLa cells were treated with either 0.5 mM of NaAsO<sub>2</sub> for 30 min or 30 μM NaAsO<sub>2</sub> for 1, 2, 4 or 6 h and protein extracts immunoblotted for phosphorylated eIF2α (p-eIF2α), eIF2α and β-tubulin. Quantification was performed from three independent experiments. **f** HeLa cells were treated with 30 μM NaAsO<sub>2</sub> for 1, 2, 4 or 6 h. In the last 5 min of treatment, cells were incubated with 5 μg/ml puromycin. Incorporation of puromycin into newly synthesised protein was assessed by immunoblotting. Band intensities for each lane were measured in the biological repeats and normalised against intensity of Coomassie Blue staining. For **c–f**, error bars are s.e.m and the data were analysed using one-way Anova (\**p* < 0.04; \*\**p* < 0.0002). **g** HeLa cells were treated with 30 μM NaAsO<sub>2</sub> for 2 h and stress granules were observed by immunofluorescence staining of G3BP1 (red). The distribution of S6K1 and S6K2 were analysed by immunostaining (green). Yellow arrows indicate examples of stress granules. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 25 μm

### S6K2 promotes SG persistence

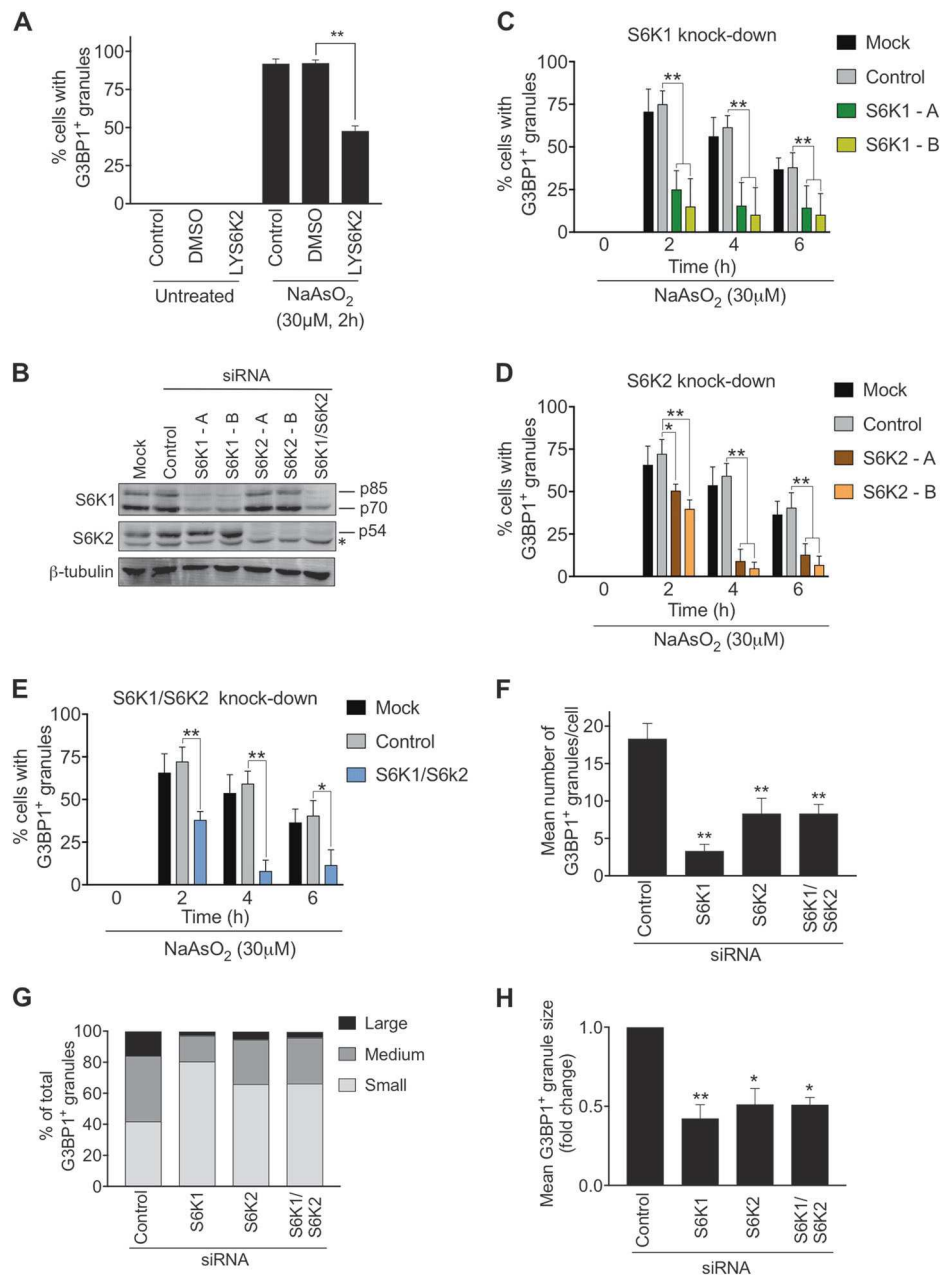
Our observation that S6K2 knockdown caused only a partial reduction in the number of cells with SGs after 2 h of mild arsenite treatment, but a robust decrease after longer treatments (Fig. 2d), led us to speculate that it might play a more predominant role in maintaining SGs. To address this, we ectopically expressed S6K1p70 or S6K2p54 isoforms in cells (Fig. 3a–c). Even in the absence of arsenite treatment, around 10% of the S6K1-expressing cells and 25% of S6K2-expressing cells displayed SGs (Fig. 3d, S5F, S11). After 2 h of 30 μM arsenite treatment, around 75% of control cells formed SGs and this was enhanced in S6K1- and S6K2-expressing cells (Fig. 3d). However, the number of control and S6K1-expressing cells displaying SGs decreased at later time points, but SGs remained present in all the S6K2-expressing cells (Fig. 3d, S11). To determine if S6K2 could maintain SGs after stress removal, cells were treated with 30 μM arsenite for 1 h and left to recover. SGs persisted in the S6K2-expressing cells compared to the control cells in which the SGs rapidly dissolved (Fig. 3g). S6K1-expressing cells displayed a modest effect on maintaining SGs during the recovery period (Fig. 3g). These data suggest that S6K2 may play a major role in promoting the persistence of SGs.

### S6 kinases promote SG assembly dependent upon their kinase activity

The observations that mild oxidative stress and FL3 treatment both increase S6 kinase activity (Fig. S12) and that an S6 kinase inhibitor reduces SG formation (Fig. 2a) strongly suggests a key enzymatic role for S6 kinases in SG regulation. In support of this, ectopic expression of a kinase-inactive form of S6K1p70 did not support SG assembly or persistence in response to mild arsenite stress (Fig. 3e, f, h, i, S11). However, around 25% of cells expressing kinase-inactive S6K2 still displayed SGs, although the number in each cell was reduced (Fig. 3e, f, S11). Furthermore, SG persistence after arsenite withdrawal was only partially suppressed by kinase-inactive S6K2 (Fig. 3h, i, S11). This suggests that S6K2 may have both kinase-dependent and kinase-independent roles in SG regulation. We next investigated how the ectopic expression of the S6 kinases affected the response to FL3. We found that S6K2, but not S6K1, strongly promoted SG formation in the presence of FL3 and this was dependent on S6K2 kinase activity (Fig. S13). This supports our data from knockdown experiments demonstrating that S6K2, but not S6K1, can regulate SG assembly and persistence in response to eIF4A inhibition (Fig. S10). Taken together, these data suggest that the enzymatic activity of S6 kinases is important for promoting SG assembly and persistence.

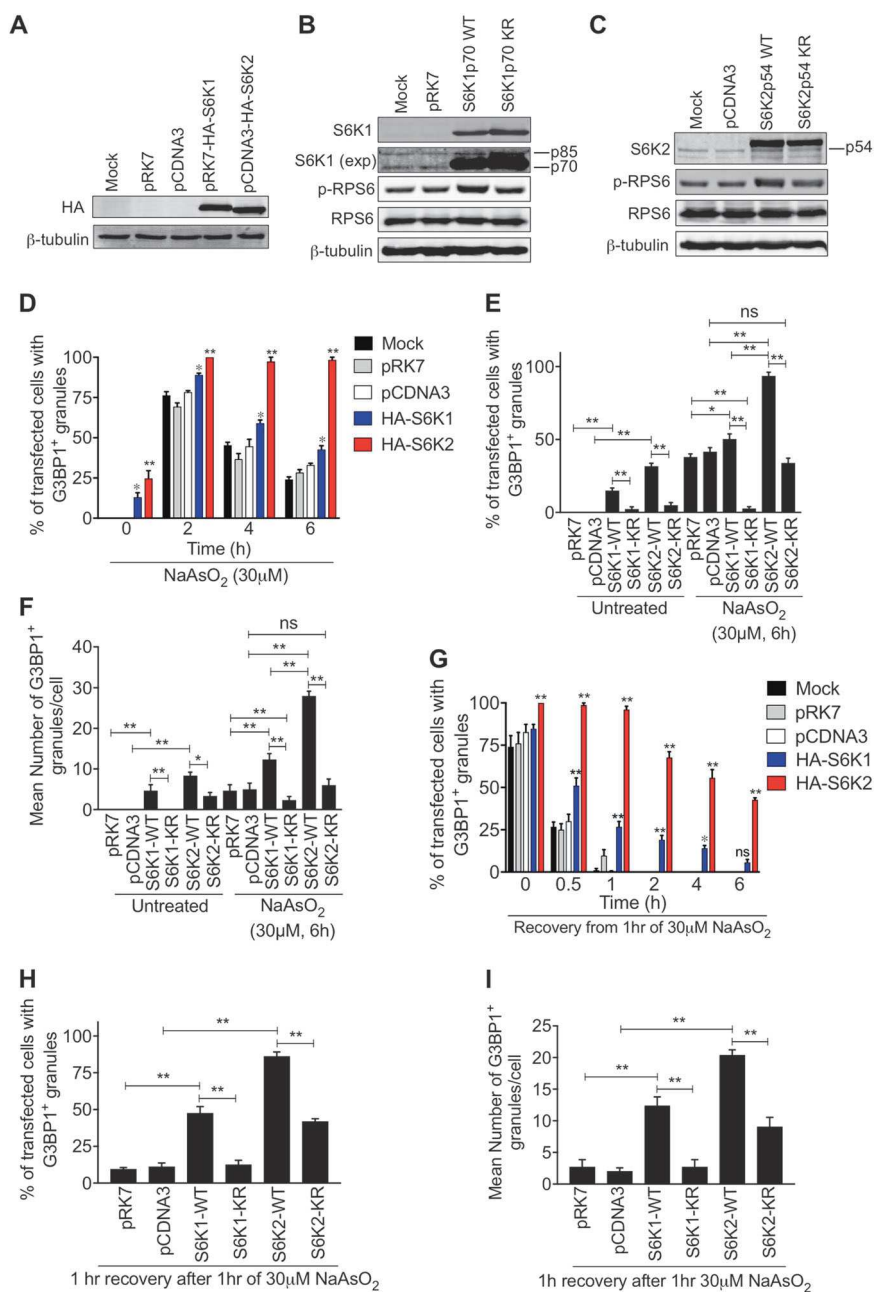
### Signalling by mTORC1 promotes SG formation

S6 kinases are downstream targets of mTORC1 and the treatment of cells with the mTORC1 inhibitor rapamycin or knockdown of the mTORC1 component RAPTOR decreased S6 kinase activity and the number of cells displaying SGs after mild arsenite treatment (Fig. 4a–d). Rapamycin also suppressed the ability of overexpressed S6K1p70 and S6K2p54 to promote SG assembly and persistence in untreated cells (Fig. 4e, S14). However, it did not affect SG assembly in response to acute arsenite treatment (Fig. S8E–H). In the presence of 30 μM arsenite for 6 h, a condition where the expression of S6K2 but not S6K1 promotes SG persistence (Fig. 3d), rapamycin caused only a partial decrease in the number of S6K2-expressing cells displaying SGs (Fig. 4f, S14). When arsenite stress was removed and cells allowed to recover, SG persistence was substantially decreased by rapamycin in the S6K2-expressing cells, but not to the level in control or S6K1-expressing cells (Fig. 4g, S14). These results suggest that there are mTORC1-dependent and independent roles for S6K2 in promoting SG persistence, consistent with our data indicating a potential kinase-independent function of S6K2 (Fig. 3e, h, i).



**Fig. 2** S6K1 and S6K2 are required for stress granule assembly. **a** HeLa cells were pre-treated or not with 0.5 mM LYS6K2 for 12 h and then treated with or without 30 μM of NaAsO<sub>2</sub> for 2 h. Quantification of cells with G3BP1-positive granules under the indicated conditions is presented. 100 cells were analysed in each of the 3 biological repeats. Statistical analysis was carried out using one-way Anova ( $*p < 0.0002$ ). **b** HeLa cells were transfected with siRNAs against S6K1 and S6K2 and the levels of knockdown were confirmed via immunoblotting of cell lysates. β-tubulin levels were analysed to ensure equal loading of lysates. A non-specific band in the S6K2 blot is indicated with a star (\*). **c–e** Quantification of cells with stress granules after treatment with 30 μM of NaAsO<sub>2</sub> for the indicated times and either siRNAs against S6K1 (S6K1-A and S6K1-B), S6K2 (S6K2-A

and S6K2-B) or both S6K1 and S6K2 (S6K1-B and S6K2-B). 100 cells were analysed in each of the 4 biological repeats. Error bars are s. e.m. Data were analysed using two-way Anova ( $*p < 0.04$ ;  $**p < 0.0002$ ). **f** Mean number of granules per cell in those cells that displayed stress granules after 2 h treatment with 30 μM of NaAsO<sub>2</sub>. **g, h** Analysis of the size of stress granules following siRNA knockdown of S6K1 or S6K2 in cells treated for 2 h with 30 μM of NaAsO<sub>2</sub>. SGs were clustered into 3 groups according to their size: small, intermediate and large (see Materials and Methods) (**g**). Mean granule size was also measured (**h**). 100 cells were analysed in each of the 3 biological repeats. For **f** and **h**, error bars are s.e.m and data were analysed using one-way Anova ( $*p < 0.04$ ;  $**p < 0.0002$ )



### The mTORC1-S6K pathway regulates eIF2 $\alpha$ phosphorylation and translation initiation in response to mild oxidative stress

Having established the importance of the mTORC1-S6K pathway for SG assembly and persistence, we investigated how this might occur. Both the inhibition of mTORC1 activity by rapamycin and the depletion of S6K1 or S6K2 led to reduced levels of eIF2 $\alpha$  (Ser51) phosphorylation and suppression of the translation inhibition observed after mild arsenite treatment (Fig. 5a–e). Notably, S6K1 depletion caused a more significant suppression of arsenite-induced

translation inhibition compared to S6K2 depletion (Fig. 5d, e), consistent with the greater suppression of eIF2 $\alpha$  phosphorylation observed after S6K1 depletion (Fig. 5c). Acute arsenite stress led to a robust inhibition of translation that was not affected by depletion of either S6 kinase (Fig. 5c–e), providing further evidence that there are distinct signalling mechanisms promoting SG assembly dependent on the level of oxidative stress. In agreement with the S6 kinase knockdown experiments, ectopic expression of S6K1 or S6K2 increased eIF2 $\alpha$  phosphorylation and partially suppressed translation (Fig. 5f, g, S15). Taken together, our findings indicate that the mTORC1-S6K pathway

◀ **Fig. 3** S6 kinases promote stress granule assembly and persistence dependent on their kinase activities. **a–c** Immunoblots of lysates from HeLa cells expressing HA-tagged S6K1p70 or S6K2p54 and corresponding kinase-inactive versions (KR).  $\beta$ -tubulin levels were analysed to ensure equal loading of lysates. Transfection with the parent vectors pRK7 and pCNA3 was used as a control. Representative blots using antibodies against the HA-tag (**a**), S6K1 (**b**) and S6K2 (**c**) are shown. Comparison between the levels of ectopically expressed and endogenous S6K1 and S6K2 can be observed. The endogenous S6K1 (p85 and p70) can be observed in a longer exposure of the S6K1 blot (exp) and the endogenous S6K2 is labelled as p54. Levels of phosphorylated RPS6 (p-RPS6) and RPS6 are also shown. **(d)** HeLa cells expressing HA-S6K1p70 or HA-S6K2p54 were treated with 30  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> for the indicated times and the % of cells with stress granules was quantified. **e, f** HeLa cells expressing HA-S6K1p70, HA-S6K2p54 or kinase-inactive mutants (KR) were treated with 30  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> for 6 h. The % of cells with stress granules (**e**) and the mean number of granules in the cells that displayed stress granules were quantified (**f**). **g** HeLa cells expressing HA-tagged S6K1p70 or S6K2p54 were subjected to 30  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> for 1 h and left to recover for the indicated times. The % of cells displaying stress granules was quantified. **h, i** HeLa cells expressing HA-S6K1p70, HA-S6K2p54 or kinase-inactive mutants (KR) were treated with 30  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> for 1 h and left to recover for 1 h. The % of cells with stress granules (**h**) and the mean number of granules in the cells that displayed stress granules were quantified (**i**). All quantifications are from 100 cells per condition in each of the 3 biological repeats. Error bars are s.e.m. For **d** and **g**, statistical analysis was performed using two-way Anova and for **e, f, h** and **i** by one-way Anova (ns = not significant; \* $p < 0.04$ ; \*\* $p < 0.0002$ )

may promote SG assembly in response to mild oxidative stress via eIF2 $\alpha$  phosphorylation. To explore this further, we analysed whether ISRIB further exacerbated the suppression of SG assembly that occurs following S6 kinase knockdown. ISRIB did not further reduce SG formation following S6K1 depletion (Fig. S16), indicative of S6K1 and eIF2 $\alpha$  acting in the same pathway. However, ISRIB did enhance the reduction in SG assembly caused by S6K2 depletion (Fig. S16), suggesting that S6K2 contributes to SG assembly via eIF2 $\alpha$  phosphorylation and additional mechanisms.

### The *C. elegans* S6 kinase orthologue, RSKS-1, promotes assembly of SGs

Many studies have focussed on the function of SGs in cultured cells, but their role in metazoan stress responses is poorly characterised. Therefore, it was important to determine if S6 kinases were required for SG assembly *in vivo*. SGs have been characterised in the nematode worm *C. elegans* and shown to regulate their response to stress [35–38]. *C. elegans* express a single S6 kinase orthologue, RSKS-1, which we targeted with RNAi. We utilised a reporter strain featuring pharyngeal muscle expression of the SG protein TIAR-2 fused to the fluorescent protein Venus [38]. Previous studies have demonstrated robust formation of SGs in *C. elegans* in response to heat stress

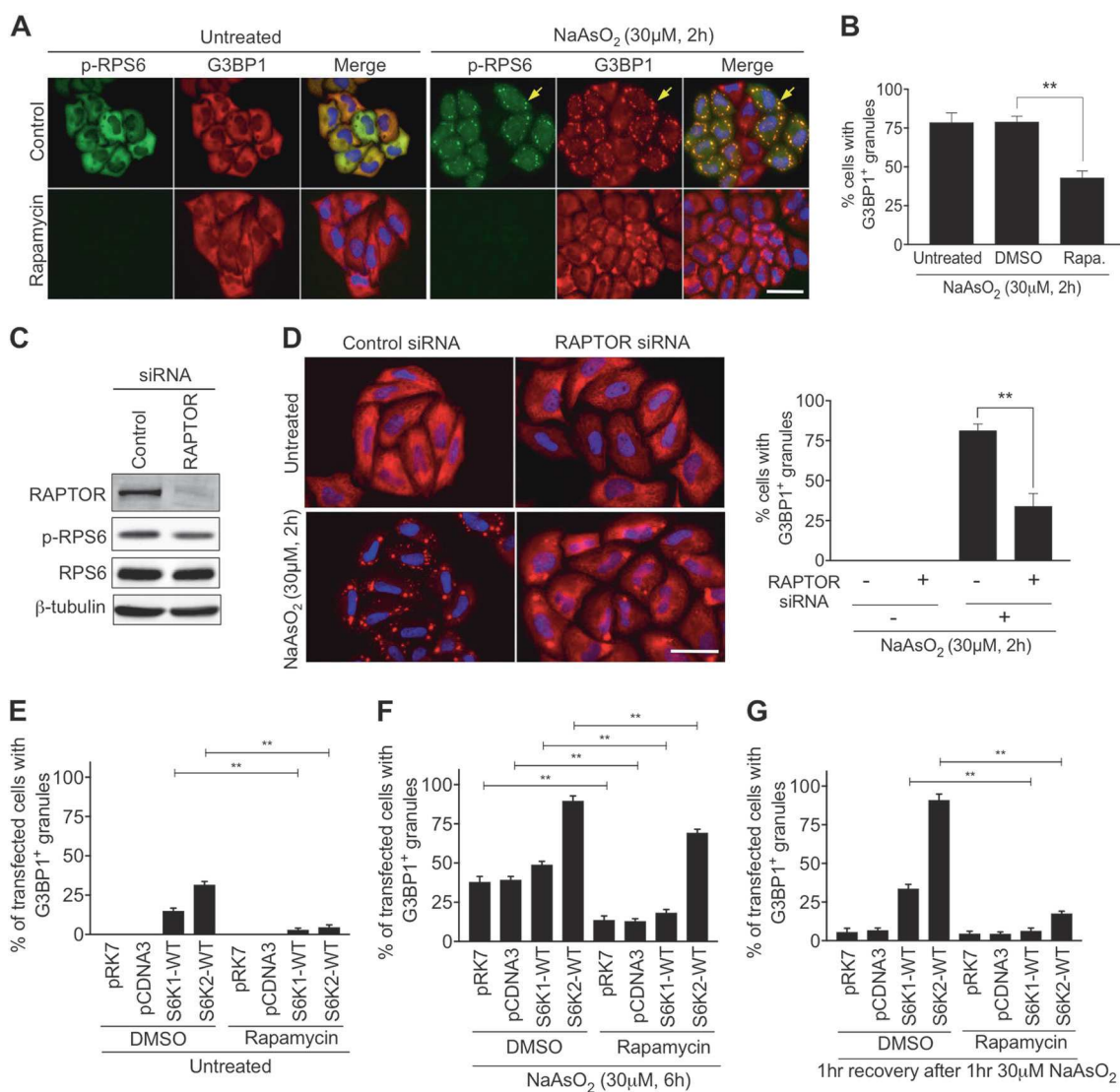
[37, 38], a condition that requires S6 kinases for optimal SG assembly in HeLa cells (Fig. S9). We therefore determined the effect of the *rsks-1(RNAi)* on SG formation in *C. elegans* subjected to heat stress. The number and size of TIAR-2 positive granules increased upon heat stress in wild-type nematodes but not after RSKS-1 knockdown (Fig. 6a, b), indicating the requirement for RSKS-1. Furthermore, we employed a loss-of-function strain [39] to demonstrate that RSKS-1 was important for survival in response to heat stress (Fig. 6c), consistent with a previous study [40]. To determine if the increased sensitivity of the *rsks-1* mutant worms is due to their inability to efficiently form SGs, we performed an epistasis assay with *gtbp-1*, the orthologue of mammalian *G3BP1*. As in mammalian cells, GTBP-1 is required for SG assembly (Fig. S17). Consistent with a role for SGs in protecting *C. elegans* from heat stress, we found that *gtbp-1(RNAi)* reduced *C. elegans* survival by around 50% (Fig. 6d). However, when knockdown of GTBP-1 was performed in the *rsks-1* mutant, survival was not further decreased (Fig. 6d). This suggests that RSKS-1 and GTBP-1 are likely to be acting in the same pathway required for SG assembly. Taken together, these data indicate that promotion of SG formation by S6 kinase plays a role in *C. elegans* survival during heat stress and are supportive of S6 kinases being evolutionarily conserved mediators of SG assembly.

## Discussion

Recent studies have indicated a complex relationship between mTOR signalling and SGs in mediating cellular responses to stress. mTORC1 components accumulate in SGs leading to suppression of mTORC1 signalling [21–23] whilst, on the other hand, there is evidence that mTORC1 signalling may be important for the formation and maintenance of SGs [25, 26]. Here, we show that the mTORC1 effector kinases S6K1 and S6K2 play important roles in SG assembly and persistence in human cells and that the S6 kinase orthologue RSKS-1 is required for robust SG formation and protection from heat stress in *C. elegans*.

We demonstrate that S6K1 and S6K2 are novel components of SGs (Fig. 1) and this is supported by a recent report showing that ectopically expressed S6K2 is present in cytoplasmic granules [41]. Both kinases play a regulatory role in SG assembly in response to mild oxidative stress but not in response to acute stress (Figs. 2 and 3, S8). This is consistent with the distinct properties of SGs under these different conditions, with those formed after mild oxidative stress being more dependent on the actions of phosphorylated eIF2 $\alpha$  and containing a higher liquid content (Fig. 5, S4). Importantly, the roles of S6K1 and S6K2 in SG regulation are distinct. The initial assembly of SGs in response





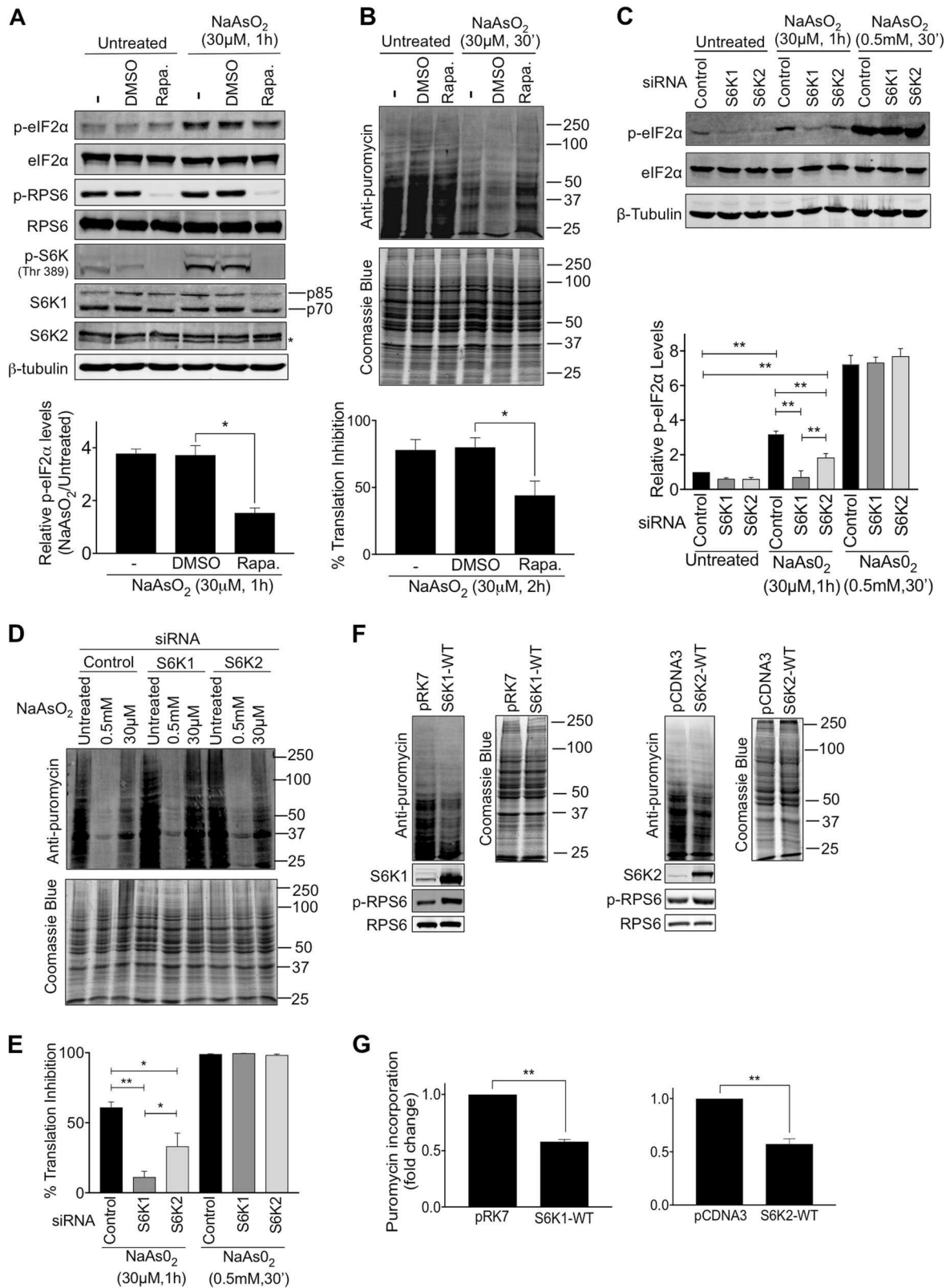
**Fig. 4** The mTORC1-S6K signalling pathway is required for stress granule assembly. **a** HeLa cells were pre-treated with 50 nM Rapamycin for 2 h prior to exposure to 30  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> for a further 2 h. Cells were immunostained for G3BP1 (red) and the phosphorylated form of RPS6 (p-RPS6) (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Yellow arrows indicate examples of stress granules. Scale bar = 25  $\mu$ m. **b** Quantification of cells forming stress granules under the indicated conditions. **c** HeLa cells were subjected to siRNA directed against RAPTOR. Immunoblots of cell extracts with antibodies to RAPTOR, phosphorylated RPS6 (p-RPS6), RPS6 and  $\beta$ -tubulin are

shown. **d** Images of cells treated with or without 30  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> for 2 h and subjected to RAPTOR siRNA. Cells were immunostained for G3BP1 (red). Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 50  $\mu$ m. Quantification of cells forming stress granules under the indicated conditions is presented. **e-g** Cells expressing S6K1p70 or S6K2p54 were pre-treated with DMSO or rapamycin for 2 h and then subjected to either 30  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> for a further 6 h (**f**) or 30  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> for 1 h and left to recover for 1 h (**g**). For all quantifications, 100 cells per condition were counted in each of the 3 biological repeats. Error bars are s.e.m. Data were analysed using one-way Anova (\*\* $p < 0.0002$ )

to mild oxidative stress appears more dependent on S6K1, whilst S6K2 plays a more predominant role in SG persistence (Figs. 2, 3 and 7) and has both kinase-dependent and kinase-independent functions in SG regulation (Figs. 3 and 4f, g). The knockdown of both S6 kinases together did not further impact on SG formation or persistence (Fig. 2e), possibly due to this causing a more severe translational inhibition that promotes some SG assembly independently of S6 kinases (as occurs in response to high levels of arsenite stress). S6K1, and to a lesser extent

S6K2, regulate eIF2 $\alpha$  phosphorylation at Ser51 and the suppression of translation (Fig. 5c-e, S16). HRI kinase is required for eIF2 $\alpha$  phosphorylation in response to arsenite [5, 42], so it is possible that S6 kinases promote HRI activity. Alternatively, they may regulate phosphatases that target eIF2 $\alpha$  [43, 44], or promote the binding of eIF2B to phosphorylated eIF2 $\alpha$ , by protecting it from dephosphorylation. Whilst we observe a correlation between eIF2 $\alpha$  phosphorylation and translation inhibition, other S6 kinase-dependent mechanisms may also be





important. For example, it is reported that the phosphorylation of RPS6 by S6 kinases can negatively affect global translation [45], so the reduction in RPS6 phosphorylation

caused by the knockdown of S6 kinases could contribute to the suppression of the translation inhibition observed in response to mild oxidative stress.

◀ **Fig. 5** S6 kinases promote the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  and translation inhibition. **a** Immunoblotting of HeLa cell lysates for Ser51 phosphorylation on eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) after treating cells with or without 30  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> for 1 h in the presence of either DMSO or 50 nM rapamycin. Levels of phosphorylated RPS6 (p-RPS6) and S6 kinases (p-S6K) are shown to indicate the effectiveness of rapamycin at inhibiting mTORC1 activity. Blots for total eIF2 $\alpha$ , RPS6, S6K1 and S6K2 protein levels are also presented. Quantification of p-eIF2 $\alpha$  band intensities from 4 independent experiments is shown. The p-eIF2 $\alpha$  levels were normalised against  $\beta$ -tubulin levels and are presented as relative increase in phosphorylation between untreated samples and those treated with NaAsO<sub>2</sub>. **b** HeLa cells were treated with 30  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> for 30 min and the incorporation of puromycin into newly synthesised protein was assessed by immunoblotting. Band intensities for each lane were measured in 4 independent experiments and normalised against the intensity of Coomassie blue staining and presented as % translation inhibition. **c** HeLa cells transfected with siRNAs against S6K1 or S6K2 were treated with either 30  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> for 1 h or 0.5 mM NaAsO<sub>2</sub> for 30 min. Protein extracts were immunoblotted for p-eIF2 $\alpha$  and total eIF2 $\alpha$  protein levels. Quantification of p-eIF2 $\alpha$  band intensities from 5 independent experiments is shown. The p-eIF2 $\alpha$  levels were normalised against  $\beta$ -tubulin levels. **d, e** HeLa cells transfected with siRNAs against S6K1 or S6K2 were treated with either 30  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> for 1 h or 0.5 mM NaAsO<sub>2</sub> for 30 min and the incorporation of puromycin into newly synthesised protein was assessed by immunoblotting. Band intensities for each lane were measured in 3 independent experiments and normalised against the intensity of Coomassie blue staining and presented as % translation inhibition (**e**). **f, g** HeLa cells transfected with empty plasmids or plasmids expressing HA-S6K1p70 or HA-S6K2p54 were assessed for the incorporation of puromycin into newly synthesised protein by immunoblotting. The expression of the S6 kinases increased the levels of phosphorylated RPS6 (p-RPS6). Quantification of puromycin incorporation normalised against the intensity of Coomassie blue staining in 3 independent experiments is presented (**g**). Error bars are s.e.m and the data analysed using one-way Anova (\* $p < 0.04$ ; \*\* $p < 0.0002$ )

The relative importance of the S6K1 and S6K2 can vary depending on the form of stress. We found that S6K1 plays a more dominant role than S6K2 in SG assembly in response to heat stress (Fig. S9) but it is not required for SG formation following inhibition of eIF4A, which is independent of eIF2 $\alpha$  phosphorylation (Fig. S10). This supports the case that S6K1 regulates eIF2 $\alpha$  phosphorylation to promote SG assembly whilst S6K2 has additional actions, indicative of a broader function in SG assembly and persistence. While the precise mechanisms by which S6 kinases regulate SGs remain to be elucidated, their localisation to SGs suggests they could directly target other SG components. The fluid shell of SGs may provide an environment that promotes specific enzymatic reactions, as well as enhancing protein–protein interactions [17]. Interestingly, S6K2 is reported to phosphorylate hnRNP A1, which re-localises from nuclei to SGs upon arsenite stress [46, 47]. As S6K2 also localises to nuclei (Fig. 1g), it is possible that it may translocate with hnRNP A1 to SGs and they act together to regulate SG assembly or persistence. Such a co-dependency between the protein kinase RSK2 and the SG protein TIA1 in SG assembly has previously been proposed [20].

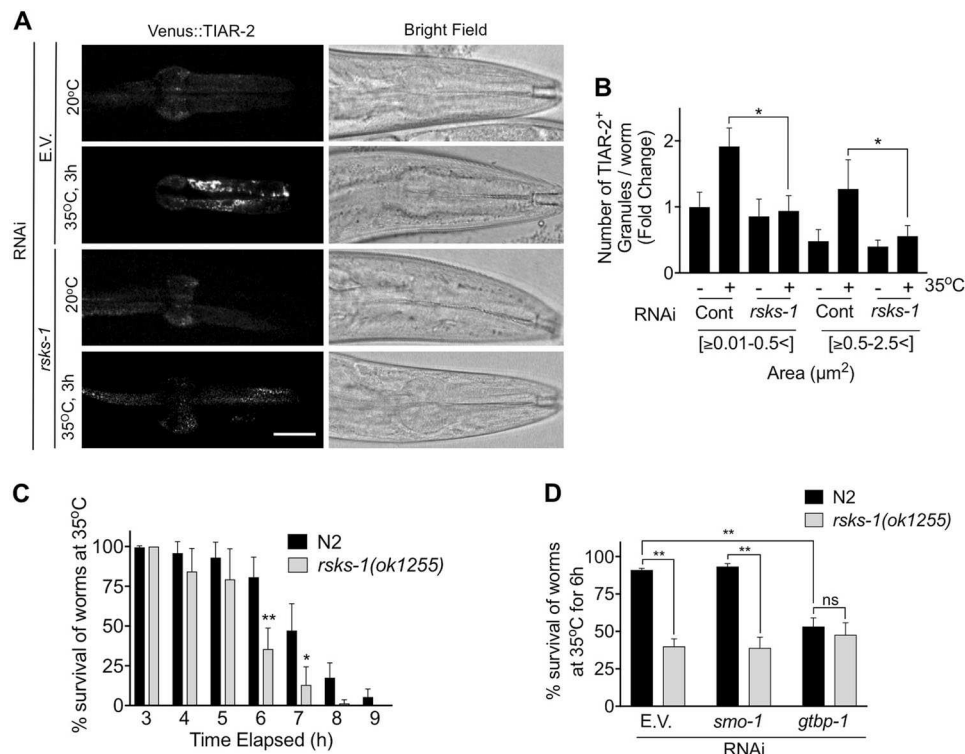
Overall, our data support an important role for mTORC1 effectors in promoting SG formation and functioning and complements previous research showing that mTORC1 phosphorylation of 4EBP1 was necessary for formation of SGs [25]. However, an important question is how to rationalise the requirement of mTORC1 effectors for SG assembly with the observation that SGs inhibit mTORC1 signalling (Fig. 7) [22, 23]. A possibility is that S6 kinases and 4EBP1 are important for SG assembly and persistence under mild stress conditions, but once the level of stress reaches a certain threshold, then mTORC1 signalling is inhibited to prevent its hyperactivation that can lead to apoptosis. The complex relationship between mTORC1 signalling and SGs may be mirrored in other stress-regulated pathways. For example, the JNK MAP kinase pathway promotes SG formation [48], but JNK activity and apoptosis can be suppressed by the sequestration of the upstream kinase MEKK4 into SGs [19].

SGs are part of a conserved adaptive mechanism to promote survival in response to stressful conditions [3, 4]. Using the multicellular organism *C. elegans*, we demonstrated that S6 kinase is important for heat-induced SG formation and that this correlates with stress resistance (Fig. 6, S17). Interestingly, the dynamic nature of SGs becomes more restricted with age in *C. elegans*, with the formation of solid aggregates that correlate with decreased fitness [38]. Genetic interventions that restore SG dynamics lead to increased lifespan [38]. Although *rsks-1* mutants have increased sensitivity to stress, they display increased lifespan [39, 40], so it is possible RSKS-1 may contribute to the formation of solid SG aggregates during ageing. There is also increasing evidence that SG proteins are important components of aggregates that underpin a number of neurodegenerative disorders [49] and that enhanced mTORC1/S6 kinase signalling contributes to this [50]. Aberrant regulation of S6 kinases and SGs may also be relevant to other pathologies, including cancer [51–53].

## Materials and methods

### Cell culture and SG induction

HeLa cells (from ATCC) were cultured in Dulbecco's Modified Eagles Medium (D6429, Gibco® Life Technologies) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (S181H, Biowest) and 1% penicillin–streptomycin solution (P4333, Sigma). Cells were grown at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. For immunoblotting and immunofluorescence assays, 100,000 cells/well were added to 6-well dishes. For immunofluorescence experiments, cells were grown on cover slips. SGs were induced by addition of NaAsO<sub>2</sub> or FL3 at the concentrations indicated in the figure legends. Heat stress



**Fig. 6** The *C. elegans* S6 kinase orthologue, RSKS-1, promotes stress granule formation in vivo. **a** Worms expressing a pharyngeal Venus::TIAR-2 reporter were fed *rsk-1* RNAi and subjected to heat shock at 35 °C for 3 h. Images of the pharynx of worms are shown for the indicated conditions. Left-hand panels show reporter expression and the right-hand panels are corresponding bright field images. Scale bar = 25  $\mu\text{m}$ . **b** Quantification of the number of TIAR-2 positive granules separated by size, either small ( $0.01-0.5 \mu\text{m}^2$ ) or large ( $0.5-2.5 \mu\text{m}^2$ ). 30 worms were analysed per condition in 3 biological repeats and data analysed by two-way Anova (ns = not significant;  $*p < 0.04$ ). **c** Worm survival assay. N2 or *rsk-1(ok1255)* mutant worms were subjected to

heat shock at 35 °C and the number of worms alive at the indicated times was scored. At least 30 worms were assessed in each of the 3 biological repeats and data were analysed using two-way Anova ( $*p < 0.04$ ;  $**p < 0.0002$ ). **d** Epistasis experiment to determine the relationship between *rsk-1* and *gtbp-1*. N2 and *rsk-1(ok1255)* worms were fed with *gtbp-1*(RNAi) and subjected to heat stress (35 °C for 6 h). Worm survival was recorded. The *smo-1* RNAi was used as a negative control as it does not suppress stress granule assembly. 30 worms were analysed per condition in 3 biological repeats and data were analysed using one-way Anova (ns = not significant;  $**p < 0.0002$ )

was applied by incubating cells at 42 °C for 1.5 h. Rapamycin (R0395) and ISRIB (SML0843) were obtained from Sigma-Aldrich. LYS6K2 (ab146199) was from Abcam.

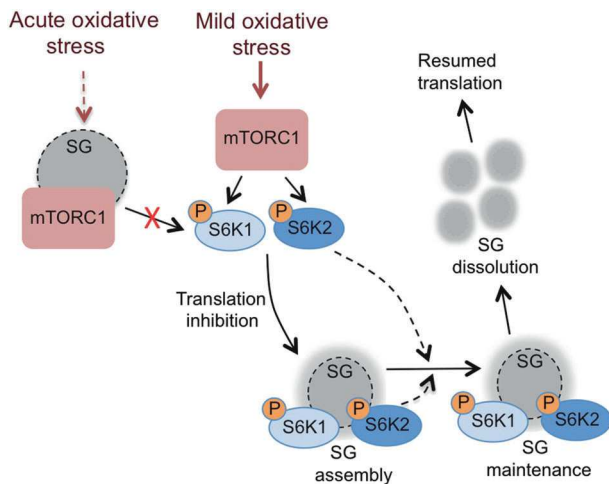
### Transfection of plasmids and siRNAs

Plasmids were transfected into cells using JetPEI® (101B-010N, Polyplus Transfections) and siRNAs using Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent (13778150, ThermoFisher Scientific). Cells were incubated overnight in the presence of plasmid or siRNA and the medium was then changed and cells incubated a further 24 h prior to analysis. Plasmids pRK7-HA-S6K1-WT (#8984), pRK7-HA-S6K1-KR (#8985), pcDNA3-HA-S6K2p54-WT (#17729) and pcDNA3-HA-S6K2p54-KR (#17730) were obtained from Addgene. Plasmids pcDNA3-HA-S6K1p70, pcDNA3-HA-S6K1p85 and pcDNA3-HA-S6K2p56 were constructed by the Whitmarsh lab (details on request). Control siRNA (D-001810-02-05 and D-001810-02-05), S6K2 siRNA-B (L-

004671-00-0005) and RAPTOR siRNA (J-004107-05-0002) were from Dharmacon. S6K1 siRNA-A (SI00301721), S6K1 siRNA-B (SI00048608) and S6K2 siRNA-A (SI00288120) were from Qiagen.

### Immunoblotting

Cells were washed with PBS and lysed in Triton lysis buffer (TLB) containing 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM  $\text{Na}_3\text{V}_4$ , 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin. Protein amount was quantified using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's protocol. About 25  $\mu\text{g}$  of protein lysate was loaded on 10% polyacrylamide gels and electrophoresis performed at 130 V for 1.5 h. Resolved proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Millipore) using a semidry procedure (15 V for 2 h). Membranes



**Fig. 7** Schematic of the role of the mTORC1-S6 kinase pathway in stress granule assembly and maintenance. Distinct types of stress granule (SG) are formed depending on the level of oxidative stress. In response to acute oxidative stress, mTORC1 components are sequestered into solid SGs thus inhibiting mTORC1 activity [22, 23]. In response to mild oxidative stress, mTORC1 activates S6 kinases leading to inhibition of translation and the assembly of SGs that contain a solid core surrounded by a liquid shell. Both S6K1 and S6K2 can accumulate in SGs and S6K2 helps maintain SGs via an unknown mechanism. On recovery from the stress, the SGs dissolve and protein translation resumes

were blocked with 5% BSA in TBST (Tris-buffered saline, 0.2% Tween-20) and incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. Membranes were washed in TBST buffer and incubated for 1 h at room temperature with secondary antibody diluted in 5% BSA-TBST supplemented with 0.02% SDS, prior to washing with TBST buffer and imaging using the Odyssey infrared system (LI-COR Biosciences). Antibodies used are described in Table S1. For phospho-Ser51 eIF2 $\alpha$  blots, blocking was performed with 5% milk-TBST at 4 °C overnight and membranes incubated with primary antibody diluted in 5% milk-TBST at room temperature for 2 h, prior to washing with TBST and incubation with secondary antibody in 5% milk-TBST supplemented with 0.02% SDS. Unprocessed scans of all immunoblots are provided in Figures S19 and S20.

### Puromycin incorporation assay

Performed as described [30]. Puromycin was added to cells for 5 min at a final concentration of 5  $\mu$ g/ml prior to harvesting and lysis. The anti-Puromycin antibody (see Table S1 for details) was used at a dilution of 1:25,000.

### Immunofluorescence microscopy

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature and permeabilised with PBS buffer

containing 0.2% Triton X-100 (PBST) for 20 min. Cells were blocked with 3% BSA in PBST for 30 min and incubated overnight at 4 °C with the relevant primary antibodies (see Table S1). Following washes with TBST, cells were incubated in 3% BSA in PBST solution containing the relevant secondary antibody for 1 h at room temperature, before further washes in PBST and mounting using the ProLong<sup>®</sup> Diamond-DAPI (Life Technologies). Imaging was performed with a Leica DM500 B Fluorescence microscope with filter sets for DAPI, FITC and Texas Red. Images were collected with a Leica DCF340 FX camera at a magnification of 60 $\times$  and an exposure of 100 ms. Images were processed with Image J software. A threshold was applied at a value of 142, images shifted to binary and the granules outlined. According to the size of the granules, three groups were identified: small: 0.01–0.6  $\mu$ m<sup>2</sup>, medium: 0.61–2  $\mu$ m<sup>2</sup> and large: 2.01–5  $\mu$ m<sup>2</sup>. The mean granule size was also recorded. For co-localisation studies, Pearson's correlation coefficient analysis was performed; 50 cells were analysed in ImageJ for each condition. The co-localisation was assessed using colocal 2. The data are presented in Figure S18.

### C. elegans strains, maintenance and synchronisation

Strains were grown at 20 °C on nematode growth media (NGM, 50 mM NaCl, 0.25% (w/v) Bacto-Peptone, 1.7% (w/v) Agar supplemented with CaCl<sub>2</sub> (1 mM), MgSO<sub>4</sub> (1 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (25 mM), Cholesterol (5  $\mu$ g/ml) spotted with OP50 *Escherichia coli* [54]. Strains used: Bristol N2; *rsk-1(ok1255)* RB1206 which is a loss-of-function strain [39] resulting from the deletion of 1700 bp in exon 4 (obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center); DCD194: N2; *uqEx41[Pmyo-2::venus::tiar-2]* provided by Della David (German Center for Neurodegenerative Diseases, Tubingen) [38]. To acquire a synchronised population, gravid adults were washed in 15 ml falcon tubes with M9 buffer (42 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 86 mM NaCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>) and then incubated in 1 ml bleaching solution for 3–4 min (8 M NaOH, 20% (v/v) sodium hypochlorite). Resulting embryos were washed in M9 three times and seeded on NGM plates without food.

### C. elegans RNAi

RNAi by feeding was carried out as previously described [55]. Briefly, NGM plates were supplemented with Carbenicillin (50  $\mu$ g/ml), IPTG (1 mM) and Nystatin (50 U/ml). Worms were randomly allocated to either control plates with HT115 (DE3) *E. coli* bacteria transformed with empty L4440 plasmid vector or to plates with HT115 (DE3) *E. coli* expressing RNAi targeting *rsk-1* (ORF-ID Y47D3A.16) and *gthp-1* (ORF-ID K08F4.2) (purchased from the Vidal



library of ORF-RNAi available at SourceBioScience). RNAi targeting *smo-1* (ORF-ID K12C11.2), the *C. elegans* orthologue of mammalian *SUMO1*, was obtained from the Ahringer RNAi library [55] and used as a negative control. Its efficacy was checked by observing known *smo-1* RNAi phenotypes including low brood size [56]. RNAi vectors were fed to synchronised L4 worms and the F1 generation kept on RNAi until analysis at day 1 of adulthood. The nematodes were placed at 35 °C for 3 h and SG formation was imaged immediately afterwards.

### C. elegans imaging

For live imaging, worms were paralysed in 20 mM tetra-misole for 2 min before mounting onto agarose pads. A Leica DM500 B Fluorescence microscope was used with filter sets for DAPI and FITC. Images were collected with a Leica DCF340 FX camera at a magnification of 60× and an exposure of 100 ms. Images were processed with Image J software. A threshold was applied between values of 130–50, images shifted to binary and the granules outlined. The representative images presented here were obtained using a Leica TCS SP5 AOBS inverted confocal using a 63×/0.6–1.40 Plan Fluotar objective. The confocal settings were as follows, pinhole [1 airy unit], scan speed [1000 Hz unidirectional] and format [512 × 512] or [1024 × 1024]. Images were collected using PMT detectors with the following detection mirror settings; FITC 494–530 nm using the 488 nm (20%) laser line.

### Survival assay

*C. elegans* strains were synchronised at day 1 of adulthood and then moved to 35 °C for the indicated times. Worm viability was assessed by gentle prodding with a platinum wire. At each time point, the total number of worms (alive and dead) was counted and living worms were expressed as a percentage of the total number of worms.

### Statistical analysis

For cell immunofluorescence experiments, statistical analysis was carried out on 3 biological repeats unless otherwise stated. In each repeat, either 50 or 100 cells were counted per sample as stated in figure legends. The analysis was carried out using PRISM software and ordinary one- or two-way Anova. For *C. elegans* granule size measurements, 30 worms were imaged for the *rsk-1* RNAi and 20 worms for the *gtbp-1* RNAi and analysed using imageJ. The comparative analysis was carried out using ordinary one-way Anova. For the survival assay, at least 30 worms were counted at each time point in each of the 3 biological repeats and the results were analysed by two-way Anova.

Error bars are s.e.m and variances are similar between the groups being compared and conform to a normal distribution. No statistical method was used to determine the sample sizes. Cells or worms were only excluded from analysis if the images were of insufficient quality.

**Acknowledgements** We thank Della David (German Center for Neurodegenerative Diseases, Tubingen) for providing the reporter strain DCD194. The *rsk-1(ok1255)* RB1206 strain was distributed via CGC (funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs [P40 OD010440]) and was originally generated by the *C. elegans* Gene Knockout Project at the Oklahoma Medical Research Foundation which is part of the International *C. elegans* Gene Knockout Consortium. We thank members of the Ashe and Whitmarsh labs for helpful discussions. This work was supported by Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) project grants BB/K005979/1 and BB/N000757/1 to MPA and BB/J014834/1 and BB/J014478/1 to AJW and GBP. APS is funded as part of the Wellcome Trust Ph.D studentship programme.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

### References

1. Kultz D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:225–57.
2. Spriggs KA, Bushell M, Willis AE. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell.* 2010;40:228–37.
3. Buchan JR, Parker R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell.* 2009;36:932–41.
4. Kedersha N, Ivanov P, Anderson P. Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase. *Trends Biochem Sci.* 2013;38:494–506.
5. Aulas A, Fay MM, Lyons SM, Achorn CA, Kedersha N, Anderson P, et al. Stress-specific differences in assembly and composition of stress granules and related foci. *J Cell Sci.* 2017;130:927–37.
6. Dang Y, Kedersha N, Low WK, Romo D, Gorospe M, Kaufman R, et al. Eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ -independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *J Biol Chem.* 2006;281:32870–8.
7. Mazroui R, Sukarieh R, Bordeleau ME, Kaufman RJ, Northcote P, Tanaka J, et al. Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 2006;17:4212–9.

8. Protter DS, Parker R. Principles and properties of stress granules. *Trends Cell Biol.* 2016;26:668–79.
9. Sama RR, Ward CL, Kaushansky LJ, Lemay N, Ishigaki S, Urano F, et al. FUS/TLS assembles into stress granules and is a pro-survival factor during hyperosmolar stress. *J Cell Physiol.* 2013;228:2222–31.
10. Tourriere H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, et al. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol.* 2003;160:823–31.
11. Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM, et al. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell.* 2004;15:5383–98.
12. Guil S, Long JC, Cáceres JF. hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Mol Cell Biol.* 2006;26:5744–58.
13. Brangwynne CP, Eckmann CR, Courson DS, Rybarska A, Hoeghe C, Gharakhani J, et al. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science.* 2009;324:1729–32.
14. Molliex A, Temirov J, Lee J, Coughlin M, Kanagaraj AP, Kim HJ, et al. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell.* 2015;163:123–33.
15. Lin Y, Protter DS, Rosen MK, Parker R. Formation and maturation of phase-separated liquid droplets by RNA-binding proteins. *Mol Cell.* 2015;60:208–19.
16. Jain S, Wheeler JR, Walters RW, Agrawal A, Barsic A, Parker R. ATPase-modulated stress granules contain a diverse proteome and substructure. *Cell.* 2016;164:487–98.
17. Sfakianos AP, Whitmarsh AJ, Ashe MP. Ribonucleoprotein bodies are phased in. *Biochem Soc Trans.* 2016;44:1411–6.
18. Wheeler JR, Matheny T, Jain S, Abrisch R, Parker R. Distinct stages in stress granule assembly and disassembly. *eLife.* 2016;5:e18413.
19. Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, Takekawa M. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat Cell Biol.* 2008;10:1324–32.
20. Eisinger-Mathason TSK, Andrade J, Groehler AL, Clark DE, Muratore-Schroeder TL, Pasic L, et al. Codependent functions of RSK2 and the apoptosis-promoting factor TIA-1 in stress granule assembly and cell survival. *Mol Cell.* 2008;31:722–36.
21. Takahara T, Maeda T. Transient sequestration of TORC1 into stress granules during heat stress. *Mol Cell.* 2012;47:242–52.
22. Thedieck K, Holzwarth B, Prentzell MT, Boehlke C, Kläsener K, Ruf S, et al. Inhibition of mTORC1 by astrin and stress granules prevents apoptosis in cancer cells. *Cell.* 2013;154:859–74.
23. Wippich F, Bodenmiller B, Trajkovska MG, Wanka S, Aebersold R, Pelkmans L. Dual specificity kinase DYRK3 couples stress granule condensation/dissolution to mTORC1 signaling. *Cell.* 2013;152:791–805.
24. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanism of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10:307–18.
25. Fournier MJ, Coudert L, Mellaoui S, Adjibade P, Gareau C, Cote MF, et al. Inactivation of the mTORC1-eukaryotic translation initiation factor 4E pathway alters stress granule formation. *Mol Cell Biol.* 2013;33:2285–301.
26. Ryu HH, Jun MH, Min KJ, Jang DJ, Lee YS, Kim HK, et al. Autophagy regulates amyotrophic lateral sclerosis-linked fused in sarcoma-positive stress granules in neurons. *Neurobiol Aging.* 2014;35:2822–31.
27. Sidrauski C, McGeachy AM, Ingolia NT, Walter P. The small molecule ISRIB reverses the effects of eIF2 $\alpha$  phosphorylation on translation and stress granule assembly. *eLife.* 2015;4:e05033.
28. Thuaud F, Bernard Y, Tokeri G, Dirr R, Aubert G, Cresteil T, et al. Synthetic analogue of rocaglaol displays a potent selective cytotoxicity in cancer cells: involvement of apoptosis inducing factor and caspase-12. *J Med Chem.* 2009;52:5176–87.
29. Boussemart L, Malka-Mahieu H, Girault I, Allard D, Hemmingson O, Tomasic G, et al. eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature.* 2014;513:105–9.
30. Panas MD, Kedersha N, McInerney GM. Methods for the characterization of stress granules in virus infected cells. *Methods.* 2015;90:57–64.
31. Kroschwald S, Maharana S, Mateju D, Malinowska L, Nuske E, Poser I, et al. Promiscuous interactions and protein disaggregates determine the material state of stress-inducible RNP granules. *eLife.* 2015;4:e06807.
32. Grove JR, Banerjee P, Balasubramanyam A, Coffey PJ, Price DJ, Avruch J, et al. Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini. *Mol Cell Biol.* 1991;11:5541–50.
33. Pardo OE, Seckl MJ. S6K2: the neglected S6 kinase family member. *Front Oncol.* 2013;3:191.
34. Li S, Brown MS, Goldstein JL. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:3441–6.
35. Jud MC, Czerwinski MJ, Wood MP, Young RA, Gallo CM, Bickel JS, et al. Large P body-like RNPs form in *C. elegans* oocytes in response to arrested ovulation, heat shock, osmotic stress, and anoxia and are regulated by the major sperm protein pathway. *Dev Biol.* 2008;318:38–51.
36. Noble SL, Allen BL, Goh LK, Nordick K, Evans TC. Maternal mRNAs are regulated by diverse P body-related mRNP granules during early *Caenorhabditis elegans* development. *J Cell Biol.* 2008;182:559–72.
37. Huelgas-Morales G, Silva-Garcia CG, Salinas LS, Greenstein D, Navarro RE. The stress granule RNA-binding protein TIAR-1 protects female germ cells from heat shock in *Caenorhabditis elegans*. *G3.* 2016;6:1031–47.
38. Lechler MC, Crawford ED, Groh N, Widmaier K, Jung R, Kirstein J, et al. Reduced insulin/IGF-1 signaling restores the dynamic properties of key stress granule proteins during ageing. *Cell Rep.* 2017;18:454–67.
39. Pan KZ, Palter JE, Rogers AN, Olsen A, Chen D, Lithgow GJ, et al. Inhibition of mRNA translation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* 2007;6:111–9.
40. Chen D, Li PW, Goldstein BA, Cai W, Thomas EL, Hubbard AE, et al. Germline signaling mediates the synergistically prolonged longevity produced by double mutations in *daf-2* and *rsk-1* in *C. elegans*. *Cell Rep.* 2013;5:1600–10.
41. Pavan IC, Yokoo S, Granato DC, Meneguello L, Carnielli CM, Tavares MR, et al. Different interactomes for p70-S6K1 and p54-S6K2 revealed by proteomic analysis. *Proteomics.* 2016;16:2650–66.
42. McEwen E, Kedersha N, Song B, Scheuner D, Gilks N, Han A, et al. Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation and mediates survival upon arsenite exposure. *J Biol Chem.* 2005;280:16925–33.
43. Connor JH, Weiser DC, Li S, Hallenbeck JM, Shenolikar S. Growth arrest and DNA damage inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Mol Cell Biol.* 2001;21:6841–50.
44. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *J Cell Biol.* 2001;153:1011–22.
45. Chauvin C, Koka V, Nouchi A, Mieulet V, Hoareau-Aveilla C, Dreazen A, et al. Ribosomal protein S6 kinase activity controls the

- ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene*. 2014;33:474–83.
46. Roy R, Durie D, Li H, Liu BQ, Skehel JM, Mauri F, et al. hnRNPA1 couples nuclear export and translation of specific mRNAs downstream of FGF-2/S6K2 signalling. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:12483–97.
47. Kim HJ, Kim NC, Wang YD, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, et al. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature*. 2013;495:467–73.
48. Wasserman T, Katsenelson K, Daniliuc S, Haslin T, Choder M, Aronheim A. A novel c-Jun N-terminal kinase (JNK)-binding protein WDR62 is recruited to stress granules and mediates a nonclassical JNK activation. *Mol Biol Cell*. 2010;21:117–30.
49. Vanderweyde T, Youmans K, Liu-Yesucevitz L, Wolozin B. Role of stress granules and RNA-binding proteins in neurodegeneration: a mini-review. *Gerontology*. 2013;59:524–33.
50. Perluigi M, Di Domenico F, Butterfield DA. mTOR signaling in aging and neurodegeneration: at the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy. *Neurobiol Dis*. 2015;84:39–49.
51. Anderson P, Kedersha N, Ivanov P. Stress granules, P bodies and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1849:861–70.
52. Yoshida S, Matsumoto K, Arao T, Taniguchi H, Goto I, Hanafusa T, et al. Gene amplification of ribosomal protein S6 kinase-1 and -2 in gastric cancer. *Anticancer Res*. 2013;33:469–75.
53. Pérez-Tenorio G, Karlsson E, Waltersson MA, Olsson B, Holmlund B, Nordenskjöld B, et al. Clinical potential of the mTOR targets S6K1 and S6K2 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;128:713–23.
54. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974;77:71–94.
55. Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, et al. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*. 2003;421:231–7.
56. Poulin G, Dong Y, Fraser AG, Hopper NA, Ahringer J. Chromatin regulation and sumoylation in the inhibition of Ras-induced vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J*. 2005;24:2613–23.

## Publication N° 5

Flavagline analog FL3 induces cell cycle arrest in urothelial carcinoma cell of the bladder by inhibiting the Akt/PHB interaction to activate the GADD45 $\alpha$  pathway

Yuan, G.; Chen, X.; Liu, Z.; Wei, W.; Shu, Q.; Abou-Hamdan, H.; Jiang, L.; Li, X.; Chen, R.; Désaubry, L.; Zhou, F.; Xie, D., *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **2018**, 37, 21.



RESEARCH

Open Access



# Flavagline analog FL3 induces cell cycle arrest in urothelial carcinoma cell of the bladder by inhibiting the Akt/PHB interaction to activate the GADD45a pathway

Gangjun Yuan<sup>1,2†</sup>, Xin Chen<sup>1,2†</sup>, Zhuowei Liu<sup>2†</sup>, Wensu Wei<sup>1,2</sup>, Qinghai Shu<sup>3</sup>, Hussein Abou-Hamdan<sup>4</sup>, Lijuan Jiang<sup>1</sup>, Xiangdong Li<sup>1</sup>, Rixin Chen<sup>2</sup>, Laurent Désaubry<sup>4,5\*</sup>, Fangjian Zhou<sup>1,2\*</sup> and Dan Xie<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Prohibitin 1 (PHB) is a potential target for the treatment of urothelial carcinoma of the bladder (UCB). FL3 is a newly synthesized agent that inhibits cancer cell proliferation by targeting the PHB protein; however, the effect of FL3 in UCB cells remains unexplored.

**Methods:** FL3 was identified to be a potent inhibitor of UCB cell viability using CCK-8 (cell counting kit-8) assay. Then a series of *in vitro* and *in vivo* experiments were conducted to further demonstrate the inhibitory effect of FL3 on UCB cell proliferation and to determine the underlying mechanisms.

**Results:** FL3 inhibited UCB cell proliferation and growth both *in vitro* and *in vivo*. By targeting the PHB protein, FL3 inhibited the interaction of Akt and PHB as well as Akt-mediated PHB phosphorylation, which consequently decreases the localization of PHB in the mitochondria. In addition, FL3 treatment resulted in cell cycle arrest in the G2/M phase, and this inhibitory effect of FL3 could be mimicked by knockdown of PHB.

Through the microarray analysis of mRNA expression after FL3 treatment and knockdown of PHB, we found that the mRNA expression of the growth arrest and DNA damage-inducible alpha (*GADD45a*) gene were significantly upregulated. When knocked down the expression of *GADD45a*, the inhibitory effect of FL3 on cell cycle was rescued, suggesting that FL3-induced cell cycle inhibition is *GADD45a* dependent.

**Conclusion:** Our data provide that FL3 inhibits the interaction of Akt and PHB, which in turn activates the *GADD45a*-dependent cell cycle inhibition in the G2/M phase.

**Keywords:** FL3, PHB, Urothelial carcinoma of the bladder, *GADD45a*, Cell cycle

\* Correspondence: [desaubry@unistra.fr](mailto:desaubry@unistra.fr); [zhoufj@sysucc.org.cn](mailto:zhoufj@sysucc.org.cn); [xiedan@sysucc.org.cn](mailto:xiedan@sysucc.org.cn)

†Equal contributors

<sup>4</sup>Therapeutic Innovation Laboratory, UMR7200, CNRS/University of Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Oncology in South China; Collaborative Innovation Center for Cancer Medicine, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China

Full list of author information is available at the end of the article



## Background

Urothelial carcinoma of the bladder (UCB) is the most common malignancy involving in the genitourinary system, it presents a high risk of recurrence and mortality [1]. Especially, muscle-invasive bladder cancer (MIBC) patients suffer from a poor 5-year survival rate of less than 35% [2]. Adjuvant chemotherapy is helpful to delay the progression of this disease, however, presents limited effects and serious side-effects [3]. Thus, there is an urgent need to develop novel drugs that are both effective and safe.

Prohibitin 1 (PHB) is an evolutionarily conserved adaptor protein involved in diverse biological processes such as transcriptional regulation, cell proliferation, mitochondrial function, and resistance to apoptosis [4, 5]. It is ubiquitously expressed in diverse cellular compartments including the nucleus, cytoplasm and mitochondria [6]. PHB is critical of PHB localization within mitochondria by that PHB involves in and maintains the integrity of mitochondria [7]. Recently, numerous studies have revealed that PHB is largely involved in the pathogenesis of several types of human cancers including prostate, breast, lung and gastric cancers [3, 8–10]. Our previous study also demonstrated that PHB is over-expressed in UCB tissues and correlates with a poor prognosis in UCB patients [3, 11]. Moreover, PHB localization in mitochondria is critical for promoting UCB cell proliferation and this process is in the requirement of Akt-mediated phosphorylation [11]. These data, taken together, suggest that PHB is a potential target for the treatment of UCB.

Flavaglines are natural products that newly isolated from medicinal plants in Asia and were found to have anti-tumor effects in human cancer cell lines without being toxic to healthy cells [12–14]. A recent study reported that Flavaglines target the PHB protein and thus, substantially inhibit cell proliferation in leukemic Jurkat cells by repressing activation of the CRaf-MEK-ERK signaling pathway [12]. Similar effects were observed in several human cancer cell lines such as melanoma, colon cancer, breast cancer, leukemia, and lung cancer [15]. To date, however, the potential inhibitory effect of Flavaglines and its underlying mechanisms in UCB cells remain unexplored.

FL3, a derivative analogue of Flavaglines, is identified to be a potent inhibitor of cancer cell proliferation [16]. To date, however, its biological functions and underlying mechanisms in UCB pathogenesis has not been elucidated. Thus, in the present study, by using a series in vitro and in vivo assays, we investigated the potential inhibitory activity of FL3 in UCB cells and studied if FL3 could also target PHB protein to block the Akt/PHB interaction and consequently influence certain critical signal pathways in UCB proliferation.

## Methods

### Materials

Synthetic PHB ligands and FL3-conjugated compound 6 (an amino linker) were provided from The Laboratory for Therapeutic Innovation, University of Strasbourg (Strasbourg France). All of the drugs were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  as solids, and were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) before use.

### Cell culture

UCB cell lines T24, BIU and 5637, and normal bladder uroepithelial cell line SV-HUC-1 were cultured at  $37^{\circ}\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$  in RPMI 1640 media supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### Cell viability assay

Cell viability was determined using the Cell Counting Kit-8 (CCK8) Kit (Dojindo, Kumamoto, Japan). After incubation with concentrations of FL3 and paclitaxel for indicated hours, absorbance was measured at 450 nm according to the manufacture's introduction. Cell viability was expressed as the percentage of absorbance of cells treated with FL3 or paclitaxel compared with cells treated with DMSO.

### Colony formation

Cells were plated as a density of 500 cells/well in 6-well plates and incubated overnight. Then different concentrations of FL3 were added to each well followed by incubation for 4–5 days. After a growth period, colonies were fixed in methanol for 30 min and stained with 0.1% crystal violet for 1 h.

### Western blot analysis

Cells were harvested and lysed, followed by isolation of the supernatant and measurement of the protein concentration using the bicinchoninic method. Then the protein extracts were separated on 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels, and electrotransferred to a PVDF membrane at 250 mA for 2 h at room temperature. Then, the membrane was blocked in 5% bovine serum albumin, and incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with primary antibodies (Akt, phospho-Akt Ser 473, prohibitin-1, phospho (Ser/Thr)-Akt substrate, and cyclin-dependent kinase antibodies were from Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; REA antibody was from Millipore, Billerica, MA, USA; histone H3, Cox IV, GADD45 $\alpha$ , and GAPDH antibodies were from Proteintech Group Inc., Rosemont, IL, USA). The membrane was washed and incubated with secondary antibody for 1 h at room temperature. The signal was measured using the ECL detection system (Tanon, Shanghai, China).

### Immunoprecipitation

Cells ( $1 \times 10^8$ ) were harvested after incubation with 0.5  $\mu$ M FL3 or DMSO for 24 h. Then the cells were lysed with immunoprecipitation (IP) lysate buffer (Beyotime, Shanghai, China) and the protein extracts were isolated. A volume of 20  $\mu$ l Protein G-agarose beads/tube were washed three times with buffer, followed by incubation with anti-PHB antibody, anti-phospho-Akt antibody or IgG antibody at 4 °C with rotation for 3 h. Equal amounts of protein (21  $\mu$ g) were incubated with beads overnight at 4 °C. After incubation, The beads were re-suspended in 1 $\times$  LDS Sample Buffer and boiled for 5 min. Then the proteins were resolved on 10% SDS-PAGE gels for Western blot analysis.

### Generation of the FL3-Affigel

FL3-Affigel beads were generated according to the protocol by Thuaud [16]. Briefly, a volume of 1 ml packed Affigel 10 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) was washed on a glass filter with acetonitrile (ACN) and added to a solution of FL3-conjugated compound 6 (3 mg) in ACN (0.8 ml) and triethylamine (20  $\mu$ l). This suspension was gently rotated for 12 h at room temperature. Ethanolamine (50  $\mu$ l) was added and after 4 h, the resin was thoroughly washed with ACN, ethanol and water. Coupled AffiGel-10 agarose beads were stored in PBS containing 0.02%  $\text{NaN}_3$  at 4 °C until further use. PBS was used as the negative control (NC).

### Identification of FL3 binding to PHB protein

T24 cells ( $1 \times 10^8$ ) cells were harvested to obtain total protein extracts. 30  $\mu$ l FL3- or NC-Affigel beads/tube were incubated with total cell extracts at 4 °C with gentle rotation overnight. After incubation, the bound mixtures were re-suspended in 1 $\times$  LDS buffer and subjected to SDS-PAGE for Western blot analysis with primary PHB antibody.

### Detection of PHB protein in the subcellular compartments

Approximately  $1 \times 10^8$  cells were harvested after incubation with DMSO (control) or FL3 0.5  $\mu$ M for 24 h. Using the Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit and Cell Mitochondria Isolation Kit (Beyotime), proteins of the nucleus, cytoplasm, and mitochondria were separately extracted according to the manufacturer's introductions. Then the extracts were subjected for Western blot analysis.

### Knockdown experiment

The Lenti-Pac HIV Expression Packaging Kit (GeneCopoeia, Rockville, MD, USA) was used to construct stable low-expressing PHB T24 cell lines according to the manufacturer's protocol. Stable PHB-silenced cells were

selected with 0.1% puromycin (Invitrogen, Darmstadt, Germany).

### Apoptosis assay

The percentage of apoptotic cells was determined by using an Annexin V-PE apoptosis detection kit (KeyGen Biotech, Jiangsu, China) according to the manufacturer's introduction. In brief, a total of  $10^5$  T24 and BIU cells were harvested after incubation with FL3 for 24 h, then stained these cells with Annexin V and PE subsequently. Finally, the cells were subjected to apoptosis analysis with the ACEA NovoExpress System (ACEA Biosciences Inc., CA, USA).

### Cell cycle analysis

The Cell Cycle Assay Kit (Beyotime) was used to analyze the cell cycle distribution. According to the manufacturer's introduction, FL3-treated or control T24 cells were harvested and dealt with PI, RNase A, Triton X-100 subsequently, followed by cell cycle analysis with the MoFlo XDP Flow Cytometry System (Beckman Coulter, CA, USA).

### Subcutaneous and orthotopic xenografts in Balb/c nude mice

Four-week-old Balb/c nude mice were purchased from Charles River Laboratories (Beijing, China). All of the animal experiments were approved by the Animal Ethics Committee of Sun Yat-sen University (Guangzhou, China). A total of  $5 \times 10^5$  cells were subcutaneously inoculated into the right flank of mice. When the tumor sizes reached to about 4–6  $\text{mm}^3$ , the mice were randomly divided into four groups with seven mice each, and intraperitoneally injected with FL3 (2 mg/kg, 5 mg/kg), palicetaxel (10 mg/kg, positive control), or DMSO (NC) every 2 days for a total of eight times. Body weights and tumor volume were measured and recorded at the time of administration. At the end of the study, the tumors and main organs including livers, kidneys, lungs, and hearts were removed for further immunohistochemistry experiments. The following formula was used to measure tumor volumes: tumor volume =  $1/2 L \times W^2$ , where  $L$  represents length and  $W$  denotes width.

### Immunohistochemistry

The removed organs and tumors were fixed in formalin and then embedded in paraffin. Sections (4  $\mu$ m thick) were cut and stained with hematoxylin and eosin (H & E). For further immunohistochemical analysis, sections were de-paraffinized in xylene, hydrated in graded alcohol, and blocked in 3% hydrogen peroxide to inhibit endogenous peroxidase activity. Antigen retrieval was completed by incubating the slides for

5 min in Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) buffer (pH 8.0). After incubation with 10% goat serum, the slides were incubated with anti-PHB antibody (1:400; Santa Cruz) overnight at 4 °C, followed by incubation with secondary goat anti-rabbit antibody at 37 °C for 30 min. Then, the slides were stained with DAB staining solution for less than 5 min, and re-stained with hematoxylin for 1 min followed by polarization for less than 10 s.

**Statistical analysis**

All statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All data both in vitro and in vivo are presented as mean ± S.D. and assessed by two-tailed Student’s *t*-test with three

independent experiments. *P* values of < 0.05 was considered statistically significant.

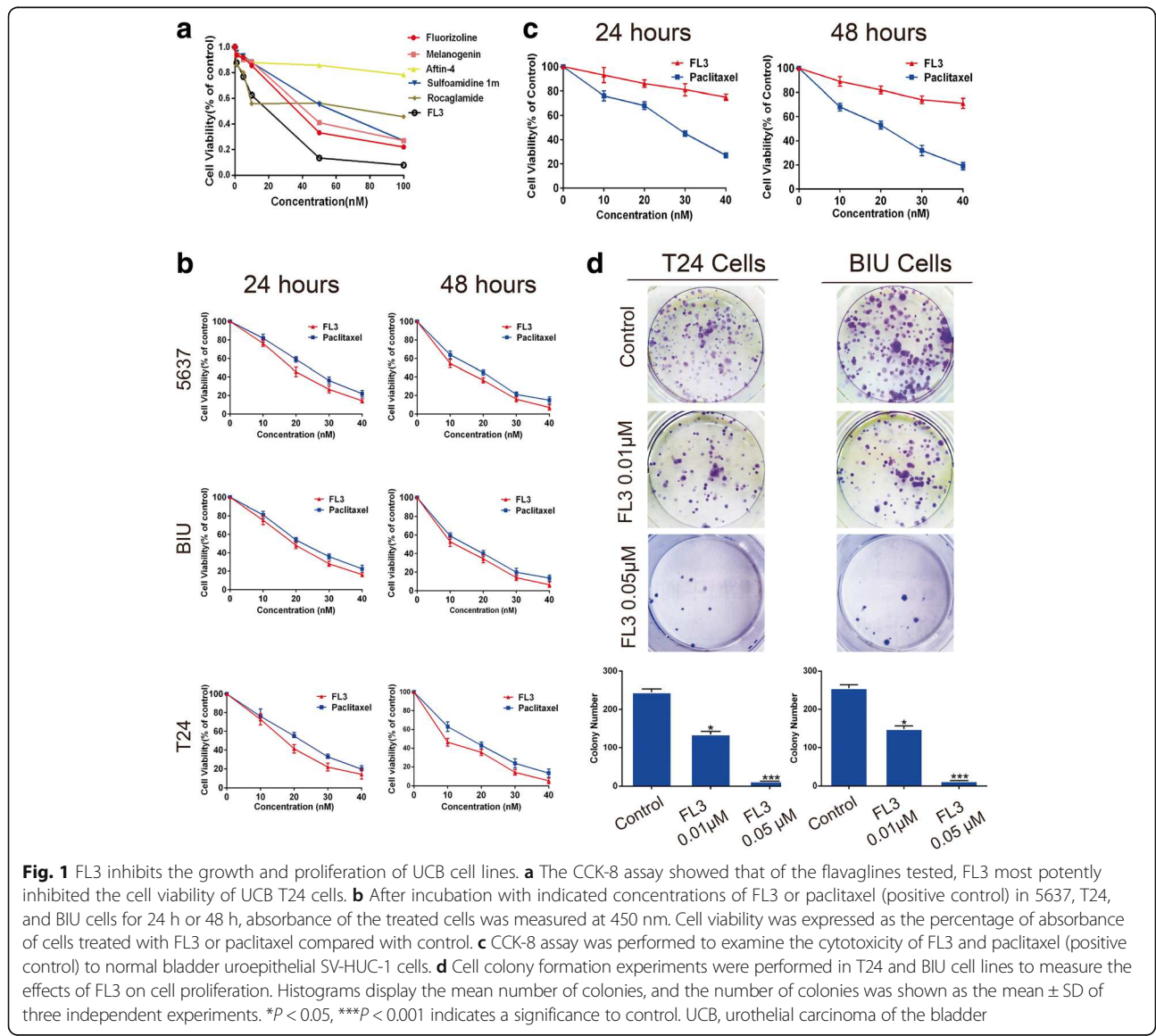
**Results**

**FL3 is a potent inhibitor of UCB cell growth**

To determine if Flavaglines had anti-tumor effects in UCB cells, we measured the cell viability of UCB T24 cells after treatment with various PHB ligands for 24 h. As shown in Fig. 1a, all of PHB ligands used decreased cell viability of T24 cells, in which FL3 exhibited the most potent effect to inhibit cell growth.

**FL3 suppresses UCB cell proliferation in vitro**

Next, we explored the inhibitory effect of FL3 on UCB cell proliferation in vitro. To this end, the cell viability



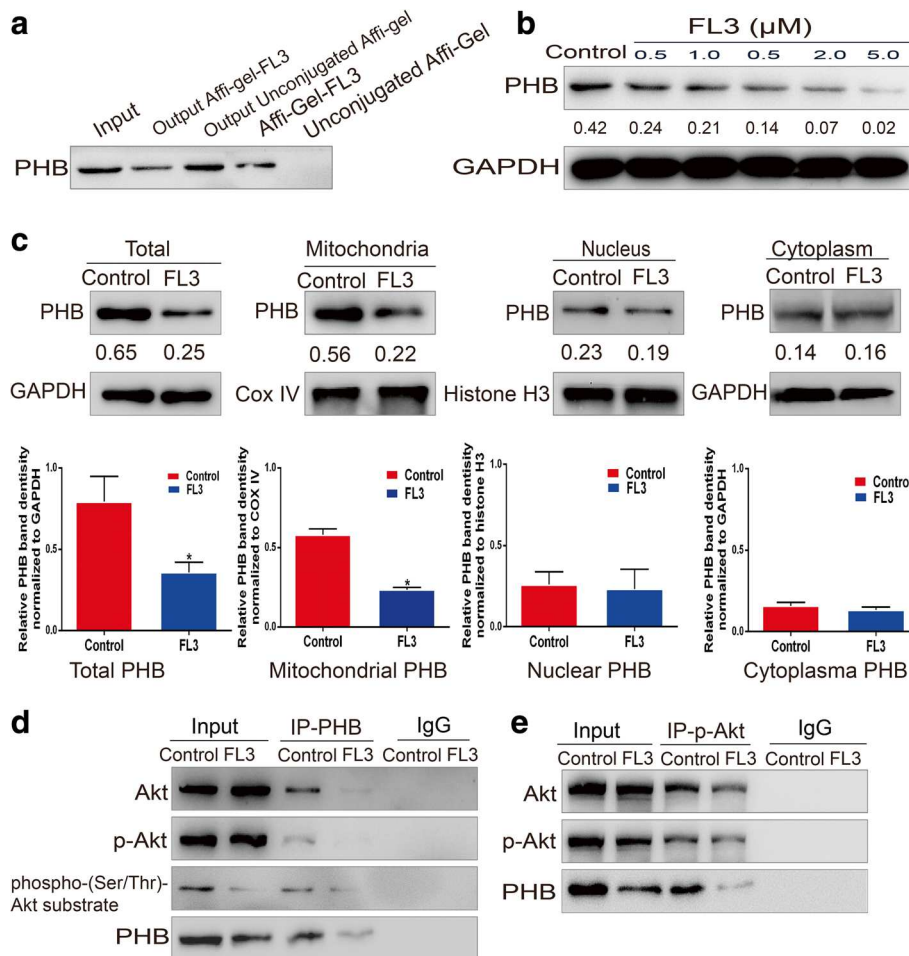


assay was performed in three UCB cell lines after FL3 treatment. Paclitaxel, a well-known anticancer agent for some human cancers including UCB, was used as a positive control. As shown in Fig. 1b, FL3 dominantly inhibited the cell viability of three UCB cell lines in a time- and dose-dependent manner. Compared to paclitaxel, FL3 presented less cytotoxicity to normal bladder uroepithelial SV-HUC-1 cells (Fig. 1c). The colony formation assay showed that FL3 treatment significantly inhibited the colony formation ability of T24 and BIU cells compared to the control (Fig. 1d). Taken together, these

results showed that FL3 suppressed UCB cell proliferation in vitro.

**FL3 binds to the PHB protein**

Because PHB is the direct target of Flavaglines in Jurkat T cells [12], FL3-Affigel-10 beads were used to determine whether FL3 targets PHB protein in UCB cell lines using immunoprecipitation assay. As shown in Fig. 2a, PHB protein was pulled down by the FL3-Affigel-10 beads, but there was no PHB binding to the



**Fig. 2** FL3 binds to PHB protein and inhibits the Akt/PHB interaction. **a** FL3-conjugated or unconjugated beads were incubated with total cell lysates from T24 cells. The eluted proteins were resolved on 10% SDS-PAGE gels for Western blotting with primary PHB antibody. **b** After incubation with indicated concentrations of FL3 for 24 h, total proteins of T24 cells were extracted and subjected to Western blot with primary PHB antibody. The Western blots have been quantified by densitometry and the quantitative values have been incorporated below the Western blot bands. **c** Subcellular fractions including cytoplasm, nucleus and mitochondria were isolated from the FL3-treated or control T24 cells. Then these fractions were lysed to obtain their total proteins, followed by Western blot analysis. Histograms show PHB protein intensity normalized to GAPDH, COX IV and Histone H3, respectively. The values represent the mean ± SD of three independent experiments. \*P denotes < 0.05. The Western blots have been quantified by densitometry and the quantitative values have been incorporated below the Western blot bands. **d** After treatment with 0.5 μM FL3, total cell lysates of T24 cells were immunoprecipitated with primary PHB antibody. Then the eluted proteins were subjected to Western blot analysis with primary antibodies as indicated (left panel). **e** After treatment with 0.5 μM FL3, total cell lysates of T24 cells were immunoprecipitated with primary phospho-Akt (p-Akt) antibody. Then the eluted proteins were subjected to Western blot analysis with primary antibodies as indicated (left panel)

unconjugated-Affigel-beads, indicating that FL3 binds to PHB protein.

#### **FL3 decreases PHB localization in the mitochondria**

A recent study showed that FL3 treatment could influence the localization of PHB in cardiomyocytes by promoting PHB translocation from nucleus to mitochondria [13], however, it remains to be determined in UCB cells. We first measured the total PHB protein levels of FL3-treated T24 cells, and the result showed that the protein levels of PHB was slowly decreased by FL3 treatment (Fig. 2b). Although ubiquitously existed in multiple cellular compartments and each location stands for different functions, PHB mainly distributes in the mitochondria and participates in the stability of mitochondrial structure and functions [4, 7, 17–19]. We detected the change of PHB protein levels in main cellular fractions after FL3 treatment, and the results revealed that mitochondrial PHB levels was dramatically decreased, whereas nuclear PHB expression and cytoplasmic PHB expression were not significantly changed (Fig. 2c), suggesting that FL3 dose not promote PHB translocation from mitochondria to nucleus and cytoplasm.

#### **FL3 inhibits the Akt/PHB interaction and decreases PHB phosphorylation**

PHB is a substrate of Akt, it is activated and transferred to the mitochondria after phosphorylation by Akt at Thr-258 site [11, 20]. FL3 might impede PHB localization within the mitochondria by blocking the interaction of PHB with Akt, which subsequently inhibits the phosphorylation process of PHB. To test this, total proteins of FL3-treated T24 cells were subjected to immunoprecipitation assay with primary PHB or phospho-Akt (Ser 473) antibody followed by western blot analysis. When proteins were immunoprecipitated with PHB antibody, FL3 treatment resulted in significant decrease of pulled-down PHB, Akt and phospho-Akt (p-Akt) compared to the control (Fig. 2d). If the proteins were immunoprecipitated with p-Akt antibody, pulled-down Akt and phospho-Akt levels were not significantly different, whereas the pulled-down PHB was significantly decreased compared to control (Fig. 2e).

Due to the shortage of available antibody recognizing phosphorylated PHB protein, we indirectly detected phosphorylated levels of PHB with a phospho-(Ser/Thr) Akt substrate (PAS) antibody, which can preferentially recognize peptides and proteins containing phospho-Ser/Thr preceded by Lys/Arg at positions – 5 and – 3 in a manner largely independent of other surrounding amino acids. As shown in Fig. 2d, a protein between 25 and 35 kDa was pulled down by PAS, and its expression was clearly reduced by FL3 compared to the control.

This result indirectly showed that FL3 treatment decreased PHB phosphorylated levels.

Taken together, these data showed that FL3 inhibited the interaction of Akt and PHB, which in turn decreased PHB phosphorylation and localization in the mitochondria.

#### **FL3 does not induce cell apoptosis in UCB cells**

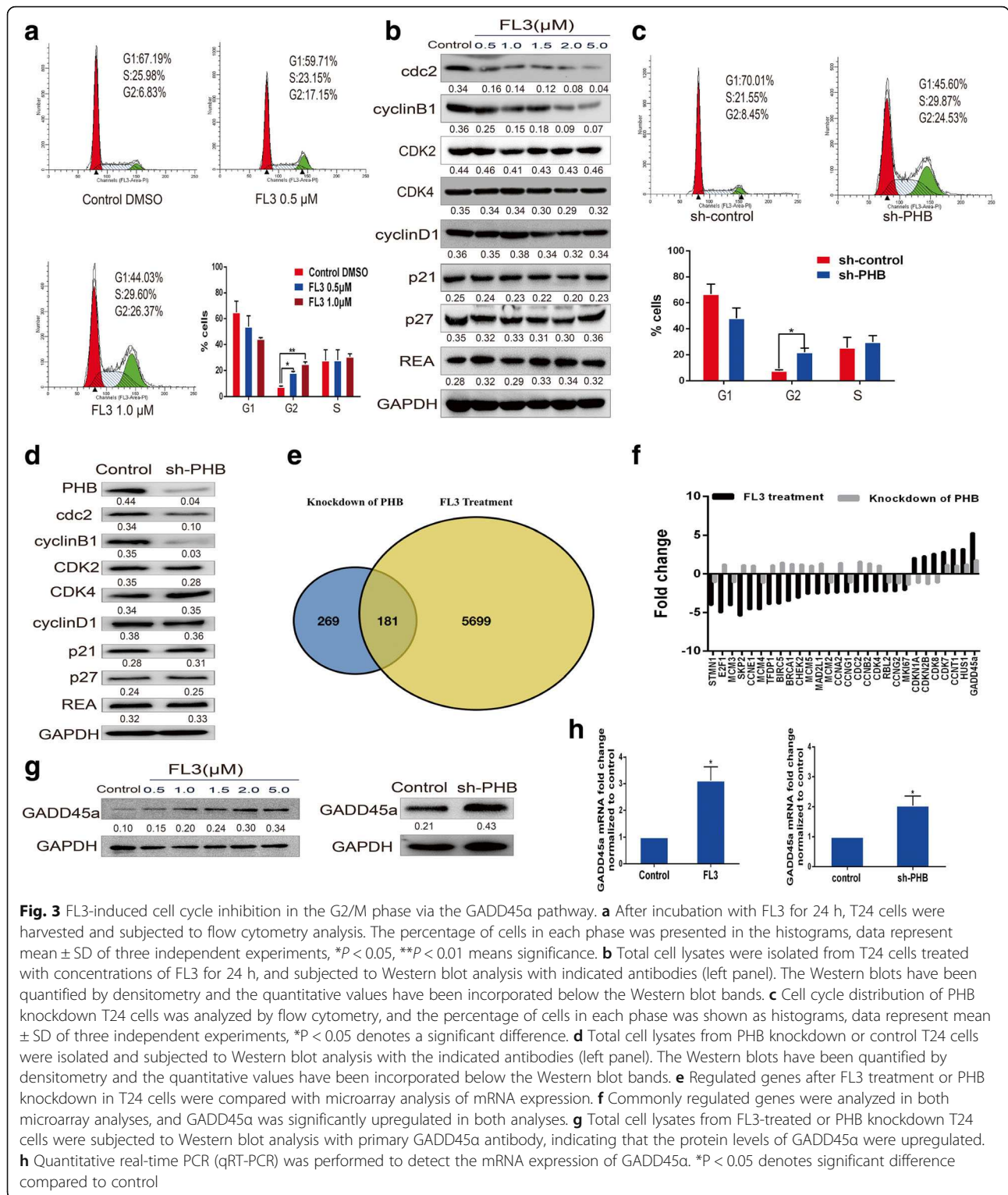
A recent study has revealed the apoptotic activity of FL3 in certain cancer cells, such as HL60 and Hela cells, by triggering the translocation of Apoptosis Inducing Factor (AIF) and caspase-12 to the nucleus [16]. We also examined the apoptotic activity of FL3 in UCB T24 and BIU cells by flow cytometry assay. However, our results did not show a similar result that FL3 treatment did not significantly increase the apoptotic number of both T24 and BIU cells, suggesting that FL3 does not induce cell apoptosis in UCB cells (Additional file 1: Figure S1).

#### **FL3 induces cell cycle arrest in the G2/M phase**

It has been shown that FL3 affects cell cycle distribution in Jurkat T cells [12], so we determined whether it has similar effects in UCB cells. As Fig. 3a shown, FL3 resulted in cell cycle arrest in the G2/M phase by increasing the percentage of cells in the G2 phase from 6.83% in control cells to 17.15% and 26.37% in FL3 -treated T24 cells, and the percentage of cells in S phase nonsignificantly ranged from 25.98% to 23.15% and 29.60%. In addition, protein expressions of cdc2 and cyclin B1, which are implicated with G2-M transition [21], were dramatically decreased (Fig. 3b). In contrast, protein expressions of G1-S transition related cyclins such as CDK2, CDK4, and cyclin D1 were unchanged. Also, several key regulators of cell cycle including p21, p27 and REA (repressor of estrogen receptor activity) [22–24] were also analyzed, the results showed that their protein expressions were not significantly changed after FL3 treatment (Fig. 3b).

#### **PHB knockdown mimics the inhibitory effect of FL3 on the cell cycle progression in UCB T24 cells**

To clarify the action of FL3 on PHB signaling, we knocked down PHB expression in T24 cells to determine whether PHB knockdown would mimic the inhibitory effect of FL3 on cell cycle progression. Flow cytometry assay was performed and the results showed that PHB knockdown increased the percentage of cells in the G2 phase from 8.45% to 24.53%, accompanying with slight and insignificant increase of cells in the S phase from 21.55% to 29.87% (Fig. 3c). Meanwhile, the protein levels of cdc2 and cyclin B1 were decreased, whereas that of CDK2, CDK4, cyclin D1, p21, p27 and REA were not significantly changed (Fig. 3d). These data suggests that knockdown of PHB mimics the inhibitory effect of FL3 on cell cycle progression.



**Fig. 3** FL3-induced cell cycle inhibition in the G2/M phase via the GADD45a pathway. **a** After incubation with FL3 for 24 h, T24 cells were harvested and subjected to flow cytometry analysis. The percentage of cells in each phase was presented in the histograms, data represent mean  $\pm$  SD of three independent experiments, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  means significance. **b** Total cell lysates were isolated from T24 cells treated with concentrations of FL3 for 24 h, and subjected to Western blot analysis with indicated antibodies (left panel). The Western blots have been quantified by densitometry and the quantitative values have been incorporated below the Western blot bands. **c** Cell cycle distribution of PHB knockdown T24 cells was analyzed by flow cytometry, and the percentage of cells in each phase was shown as histograms, data represent mean  $\pm$  SD of three independent experiments, \* $P < 0.05$  denotes a significant difference. **d** Total cell lysates from PHB knockdown or control T24 cells were isolated and subjected to Western blot analysis with the indicated antibodies (left panel). The Western blots have been quantified by densitometry and the quantitative values have been incorporated below the Western blot bands. **e** Regulated genes after FL3 treatment or PHB knockdown in T24 cells were compared with microarray analysis of mRNA expression. **f** Commonly regulated genes were analyzed in both microarray analyses, and GADD45a was significantly upregulated in both analyses. **g** Total cell lysates from FL3-treated or PHB knockdown T24 cells were subjected to Western blot analysis with primary GADD45a antibody, indicating that the protein levels of GADD45a were upregulated. **h** Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed to detect the mRNA expression of GADD45a. \* $P < 0.05$  denotes significant difference compared to control

### GADD45a is upregulated after FL3 treatment and PHB knockdown

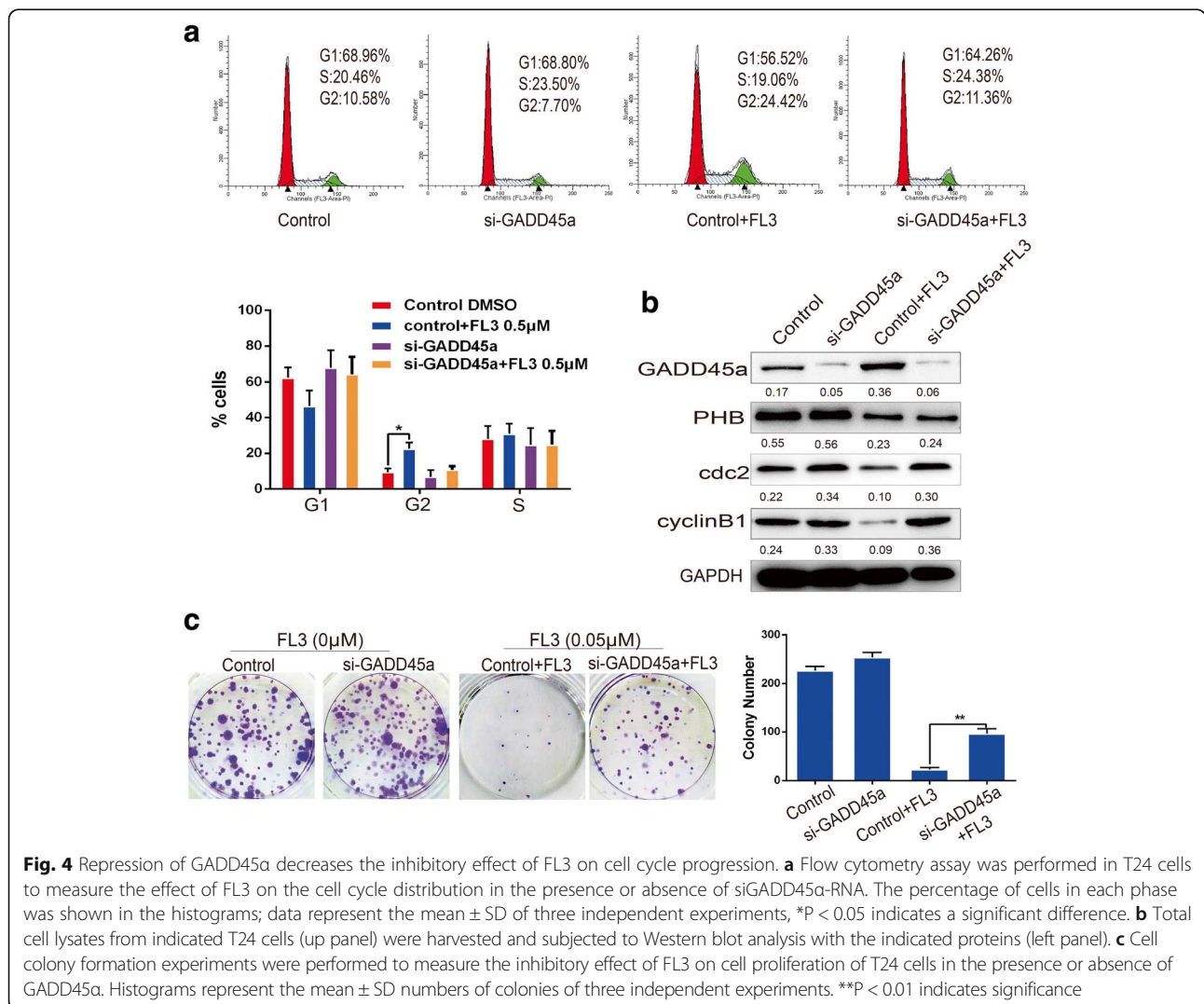
To identify the common pathways regulated by FL3 treatment or PHB knockdown, microarray analyses of mRNA expression were performed in FL3-

treated or PHB knockdown T24 cells. Totally regulated genes were compared and presented as shown in Fig. 5e, a total of 181 genes were commonly regulated in both analyses. Since FL3 and PHB knockdown inhibits cell cycle progression in the G2/M

phase, we tried to explore the underlying mechanism of this effect. A total of 84 cell cycle-related genes [25] were compared with each other in both analyses. Significantly regulated genes (more than 1.7-fold) were selected out in Additional file 2: Table S1, 28 genes were significantly regulated by FL3. Comparing the 28 genes in microarray analysis of PHB knockdown cells, 11 genes were commonly regulated by FL3 and PHB knockdown (Fig. 3f), among of which GADD45α (the growth arrest and DNA damage-inducible alpha), a checkpoint gene during the G2-M transition [26], was verified as the only significantly regulated gene (5.26 vs. 1.76-fold). Upregulation of GADD45α was further validated by western blotting and quantitative real time-PCR (qRT-PCR) (Fig. 3g-h). The results indicated that FL3-induced cell cycle arrest might be GADD45α-dependent.

**FL3-mediated cell cycle inhibition is GADD45α-dependent**

To determine whether FL3-induced cell cycle arrest is GADD45α-dependent, a rescue experiment was performed by repressing GADD45α expression with siRNA in T24 cells. Flow cytometry assay demonstrated that FL3 treatment did not significantly change the percentage of cells in the G2 phase (from 7.70% to 11.36%) in GADD45α-silenced cells, whereas the percentage of cells in this phase increased from 10.58% to 24.42% in the control cells (Fig. 4a, b). Thus, repression of GADD45α rescued the inhibitory effect of FL3 on cell cycle progression. In addition, repression of GADD45α did not change the protein levels of PHB, cdc2 and cyclinB1 (Fig. 4c). Moreover, repression of GADD45α attenuated the inhibitory effect of FL3 on the colony formation ability of T24 cells (Fig. 4d), indicating that GADD45α is critical for UCB cell proliferation. Taken together, FL3-induced cell cycle inhibition is GADD45α-dependent.



**Fig. 4** Repression of GADD45α decreases the inhibitory effect of FL3 on cell cycle progression. **a** Flow cytometry assay was performed in T24 cells to measure the effect of FL3 on the cell cycle distribution in the presence or absence of siGADD45α-RNA. The percentage of cells in each phase was shown in the histograms; data represent the mean ± SD of three independent experiments, \*P < 0.05 indicates a significant difference. **b** Total cell lysates from indicated T24 cells (up panel) were harvested and subjected to Western blot analysis with the indicated proteins (left panel). **c** Cell colony formation experiments were performed to measure the inhibitory effect of FL3 on cell proliferation of T24 cells in the presence or absence of GADD45α. Histograms represent the mean ± SD numbers of colonies of three independent experiments. \*\*P < 0.01 indicates significance



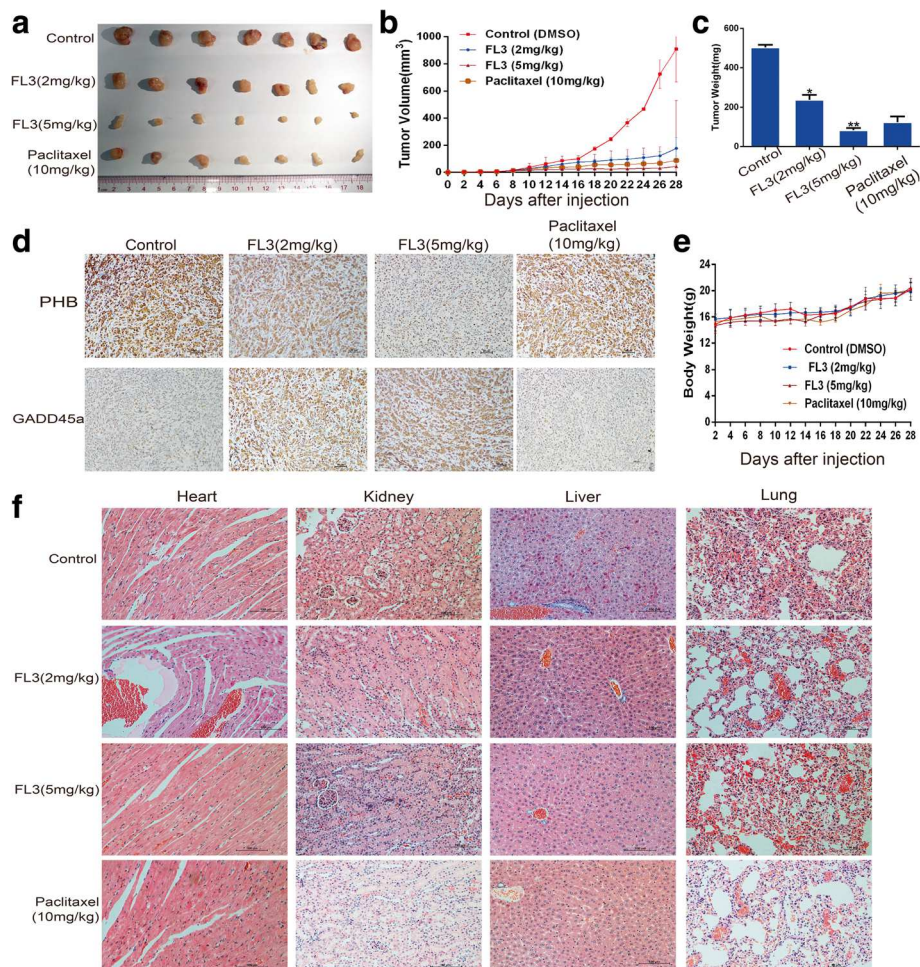
### FL3 suppresses xenograft tumor growth in vivo

To further verify the inhibitory role of FL3 on cell proliferation in vivo, xenograft tumor models were constructed (Fig. 5a). Both FL3 and paclitaxel treatments significantly inhibited the volumes and weights of tumors compared to the control (Fig. 5b, c). Furthermore, immunohistochemistry assay presented that FL3 treatment resulted in slightly decreased expression of PHB protein compared to the control (Fig. 5d). In contrast, the expression of GADD45 $\alpha$  was slightly elevated. Meaningfully, there was no significant body weight loss in FL3-treated mice compared to the control (Fig. 5e). H&E staining of the livers, lungs, hearts, and kidneys showed no major organ-related toxicities from FL3 treatment compared to the control group (Fig. 5f).

### Discussion

Current chemotherapeutic drugs have limited effectiveness and intolerable toxicities in most cases of UCB. Therefore, there is an urgent need for developing novel therapeutic modalities of UCB. It has been widely reported that PHB is critical for many cellular biologic responses including senescence, development and tumorigenesis [4, 7, 16, 27–30]. Our previous study revealed that in UCBs, PHB is frequently overexpressed in >80% clinical patients, and UCB with high expression of PHB predicts a poor disease-free survival of the patient, suggesting a potential therapeutic target of PHB in UCB [11].

Recent studies have shown that flavaglines can directly binds to PHB to inhibit the activation of PHB-mediated signaling pathways, consequently leading to inhibition of protein synthesis, cell cycle progression, and cell growth



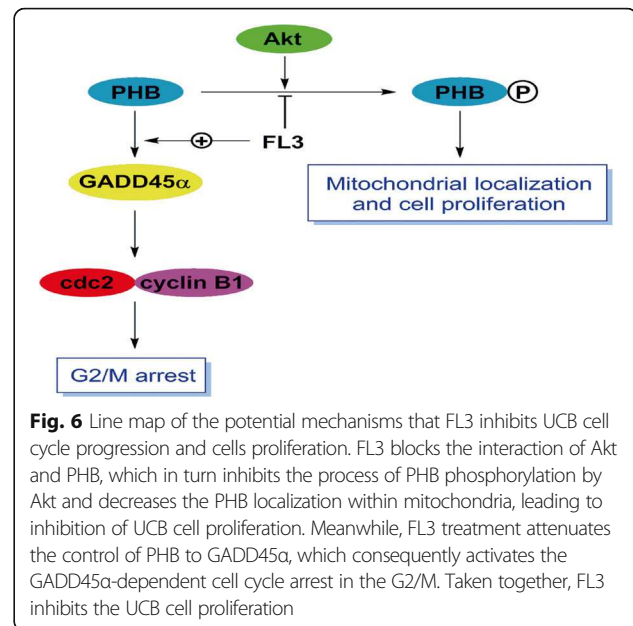
**Fig. 5** FL3 inhibits growth of UCB tumor xenografts in vivo. **a** The xenograft tumors were isolated from mice at the end of study. **b** Tumor volumes were recorded from the date of injection to the end of the study (mean,  $n = 7$ ). **c** Histograms present the mean tumor weight in each group, means  $\pm$  SD ( $n = 7$ ). **\*\*** $P < 0.01$ , **\*\*\*** $P < 0.001$  indicates a significant difference between FL3-treated mice and control mice. **d** Tumors were embedded in paraffin and 5  $\mu$ m thick sections were used for immunohistochemistry analysis with PHB or GADD45 $\alpha$  antibody. **e** Body weights of mice were recorded along with the records of tumor volumes as dashed lines (mean,  $n = 7$ ). **f** Main organs including heart, kidney, liver, and lung were removed from mice and embedded in paraffin for further hematoxylin eosin staining

in cancer cells [12, 31, 32]. Meanwhile, flavaglines present little cytotoxicity to healthy cells at nanomolar concentrations [13, 16, 33, 34]. Therefore, the discovery of flavaglines brings new hope for the treatment of UCB. In our present study, we have demonstrated that FL3, a derivative of flavaglines, directly targets PHB and inhibits UCB cell proliferation both in vitro and in vivo.

The PI3K/Akt pathway has been implicated in many cellular biological responses and the development of carcinogenesis [35–38]. We found that both Akt and PHB were upregulated in UCB tissues and correlated with the poor prognosis of UCB patients [11]. Recent studies have demonstrated that PHB is a substrate of Akt, and Akt-mediated phosphorylation is required for PHB localization within the mitochondria as well as UCB cell proliferation [11, 39]. Mitochondrial PHB is closely associated with mitochondrial functions including mitochondrial stabilization, resistance of apoptosis, the respiratory chain, and components of mitochondrial DNA [40, 41]. Correlating with cell proliferation, reduction of PHB expression in the mitochondria might lead to mitochondria-related apoptosis and cell cycle inhibition. In this study, our results showed that FL3 treatment decreased the interaction of Akt and PHB as well as PHB localization within mitochondria. However, we did not observe the similar effect of inducing apoptosis in UCB cells as FL3 dose in HL60 and Hela cells. We thought that the functions of FL3 to induce cellular apoptosis might be tumor type-specific.

Since the activity of FL3 is based on its binding with PHB protein, knockdown of PHB could mimic the inhibitory effect of FL3 on UCB cell cycle progression. We found that the expression of GADD45 $\alpha$ , a regulator of cell cycle, was significantly upregulated after either FL3 treatment or PHB knockdown. GADD45 $\alpha$  is a member of the growth arrest and DNA damage 45 (GADD45) gene family, which encodes three highly homologous proteins GADD45 $\alpha$ , GADD45 $\beta$ , and GADD45 $\gamma$  [37]. GADD45 $\alpha$  localizes to the nucleus and involves in the inhibition of cell cycle G2-M transition by inhibiting the activation of cdc2/cyclin B1 kinases, leading to the initiation of the G2/M checkpoint mechanism and subsequently arrests cell cycle progression in the G2/M phase [21, 26, 42, 43]. Consistent with these studies, the expression of GADD45 $\alpha$  expression was upregulated while the expression of cdc2 and cyclin B1 were decreased after FL3 treatment in UCB cells. If the expression of GADD45 $\alpha$  is repressed, the inhibitory effect of FL3 on cell cycle would be rescued. Thus, our results has strongly suggested that FL3-induced G2/M cell cycle inhibition is GADD45 $\alpha$ -dependent.

GADD45 $\alpha$  involved cell cycle regulation is controlled by Akt/FOXO3A pathway by that Akt represses the activity of GADD45 $\alpha$  and promotes cell cycle progression [44]. In our results, the expression of GADD45 $\alpha$  is also



controlled by PHB. Taking together, GADD45 $\alpha$  expression is negatively regulated by Akt/PHB. By directly targeting with PHB protein, FL3 blocks the interaction of Akt and PHB and in turn attenuates the control of Akt/PHB to GADD45 $\alpha$ , with a consequence of upregulation of GADD45 $\alpha$  and cell cycle inhibition in the G2/M phase.

## Conclusions

This study provides data to elucidate the mechanism of FL3 inhibiting UCB cell proliferation (Fig. 6), suggesting that FL3 might be a therapeutic agent for the treatment of UCB in the future.

All data in this study have been recorded at Sun Yat-sen University Cancer Center (Number RDDB2017000176).

## Additional files

**Additional file 1: Figure S1.** FL3 does not induce apoptosis in UCB T24 and BIU cells. After incubation with 0.5  $\mu$ M and 1.0  $\mu$ M FL3 for 24 h, T24 and BIU cells were harvested and stained with Annexin V-FITC/PE to count the numbers of apoptotic cells. Q3–1, dead cells; Q3–2, late apoptotic cells; Q3–3, live cells; Q3–4, early apoptotic cells. This experiment was independently repeated for three times. Histograms display the number of cells as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. (TIFF 67307 kb)

**Additional file 2: Table S1.** List of cell cycle-related genes regulated by FL3 treatment or PHB knockdown in T24 cells using microarray analysis of mRNA expression. (DOC 94 kb)

## Acknowledgments

No applicable.

## Funding

This work was supported by grants from the National Key R&D Program of China (No. 2017YFC1309001 and No. 2016YFC1302305), the Natural Science Foundation of China (No. 81572359, 81772716, 81602233, 81472385,

81672530, 81673296), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (NO. 2016A030310219, 2015A030313009), the Chinese Postdoctoral Science Foundation, the Foundation of Shenzhen science and Technology Innovation Committee (JCYJ20160429104111283). A generous financial support for this work was also provided by the 'Association pour la Recherche sur le Cancer' to LD.

#### Authors' contributions

ZWL, FJZ and DX involved in the study concept and design; LD and H A-H provided the PHB ligands and involved in the study concept; XC designed the study and drafted the manuscript; WSW performed flow cytometry analysis; QHS performed Generation of the FL3-Affigel; XDL, LJJ, and RXC performed microarray analysis. All authors read and approved the final manuscript.

#### Ethics approval

All animal experiments were approved by the Animal Ethics Committee of Sun Yat-sen University cancer center.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### Author details

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Oncology in South China; Collaborative Innovation Center for Cancer Medicine, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China. <sup>2</sup>Department of Urology, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou, China. <sup>3</sup>School of Material Science and Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing, China. <sup>4</sup>Therapeutic Innovation Laboratory, UMR7200, CNRS/University of Strasbourg, Strasbourg, France. <sup>5</sup>Sino-French Joint Lab of Food Nutrition/Safety and Medicinal Chemistry, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, China.

Received: 25 October 2017 Accepted: 31 January 2018

Published online: 07 February 2018

#### References

- Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(2):115–32.
- DeSantis CE, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64:252–71.
- Mitsui Y, Yasumoto H, Arichi N, Honda S, Shiina H, Igawa M. Current chemotherapeutic strategies against bladder cancer. *Int Urol Nephrol*. 2012; 44(2):431–41.
- Mishra S, Murphy LC, Nyomba BL, Murphy LJ. Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends Mol Med*. 2005;11:192–7.
- McClung JK, et al. Isolation of a cDNA that hybrid selects antiproliferative mRNA from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;164:1316–22.
- Koushyar S, Jiang WG, Dart DA. Unveiling the potential of prohibitin in cancer. *Cancer Lett*. 2015;369:316–22.
- Peng YT, Chen P, Ouyang RY, Song L. Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis. *Apoptosis*. 2015;20:1135–49.
- Gamble SC, et al. Androgens target prohibitin to regulate proliferation of prostate cancer cells. *Oncogene*. 2004;23:2996–3004.
- Canevari RA, et al. Identification of novel biomarkers associated with poor patient outcomes in invasive breast carcinoma. *Tumour Biol*. 2016;37:13855–70.
- Kang X, et al. Prohibitin: a potential biomarker for tissue-based detection of gastric cancer. *J Gastroenterol*. 2008;43:618–25.
- Jiang L, Dong P, Zhang Z, Li C, Li Y, Liao Y, Li X, Wu Z, Guo S, Mai S, et al. Akt phosphorylates Prohibitin 1 to mediate its mitochondrial localization and promote proliferation of bladder cancer cells. *Cell Death Dis*. 2015;6: e1660.
- Polier G, et al. The natural anticancer compounds rocaglamides inhibit the Raf-MEK-ERK pathway by targeting prohibitin 1 and 2. *Chem Biol*. 2012;19: 1093–104.
- Qureshi R, Yildirim O, Gasser A, Basmadjian C, Zhao Q, Wilmet JP, Désaubry L, Nebigil CG. FL3, a synthetic Flavagline and ligand of Prohibitins, protects cardiomyocytes via STAT3 from doxorubicin toxicity. *PLoS One*. 2015;10(11): e0141826.
- Basmadjian C, Thuaud F, Ribeiro N, Désaubry L. Flavaglines: potent anticancer drugs that target prohibitins and the helicase eIF4A. *Future Med Chem*. 2013;5(18):2185–97.
- Kim S, Salim AA, Swanson SM, Kinghorn AD. Potential of cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia* species in cancer chemotherapy. *Anti Cancer Agents Med Chem*. 2006;6:319–45.
- Thuaud F, Bernard Y, Türkeri G, Dirr R, Aubert G, Cresteil T, Baguet A, Tomasetto C, Svitkin Y, Sonenberg N, et al. Synthetic analogue of rocaglaol displays a potent and selective cytotoxicity in cancer cells: involvement of apoptosis inducing factor and caspase-12. *J Med Chem*. 2009;52(16):5176–87.
- McClung JK, Jupe ER, Liu XT, Dell'Orco RT. Prohibitin: potential role in senescence, development, and tumor suppression. *Exp Gerontol*. 1995;30: 99–124.
- Thuaud F, Ribeiro N, Nebigil CG, Désaubry L. Prohibitin ligands in cell death and survival: mode of action and therapeutic potential. *Chem Biol*. 2013;20: 316–31.
- Zhou TB, Qin YH. Signaling pathways of prohibitin and its role in diseases. *J Recept Signal Transduct Res*. 2013;33:28–36.
- Ande SR, Mishra S. Prohibitin interacts with phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) and modulates insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390:1023–8.
- Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:153–66.
- Chen RY, Fan YM, Zhang Q, Liu S, Li Q, Ke GL, Li C, You Z. Estradiol inhibits Th17 cell differentiation through inhibition of ROR $\gamma$ T transcription by recruiting the ER $\alpha$ /REA complex to estrogen response elements of the ROR $\gamma$ T promoter. *J Immunol*. 2015;194(8):4019–28.
- Dai L, Liu Y, Liu J, Wen X, Xu Z, Wang Z, Sun H, Tang S, Maguire AR, Quan J, et al. A novel cyclinE/cyclinA-CDK inhibitor targets p27(Kip1) degradation, cell cycle progression and cell survival: implications in cancer therapy. *Cancer Lett*. 2013;333(1):103–12.
- Park HY, Kim GY, Moon SK, Kim WJ, Yoo YH, Choi YH. Fucoidan inhibits the proliferation of human urinary bladder cancer T24 cells by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Molecules*. 2014;19(5):5981–98.
- Cell Cycle of PCR Arrays in QIAGEN Website. SABiosciences Corporation, Maryland, US. 2017. <https://www.sabiosciences.com/cn/shop/pcr/primer-sets/rt2-profiler-pcr-arrays/?catno=PAHS-020Z#geneglobe>. Accessed 21 Aug 2017.
- Wang XW, et al. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:3706–11.
- Ande SR, Nguyen KH, Nyomba BL, Mishra S. Prohibitin in adipose and immune functions. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27:531–41.
- Chowdhury I, Thomas K, Thompson WE. Prohibitin (PHB) roles in granulosa cell physiology. *Cell Tissue Res*. 2016;363:19–29.
- Li L, Guo JD, Wang HD, Shi YM, Yuan YL, Hou SX. Prohibitin 1 gene delivery promotes functional recovery in rats with spinal cord injury. *Neuroscience*. 2015;286:27–36.
- Chowdhury I, Thompson WE, Thomas K. Prohibitins role in cellular survival through Ras-Raf-MEK-ERK pathway. *J Cell Physiol*. 2014;229:998–1004.
- Luan Z, He Y, Alattar M, Chen Z, He F. Targeting the prohibitin scaffold-CRAF kinase interaction in RAS-ERK-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer*. 2014;13:38.
- Yurugi H, Marini F, Weber C, David K, Zhao Q, Binder H, Désaubry L, Rajalingam K. Targeting prohibitins with chemical ligands inhibits KRAS-mediated lung tumours. *Oncogene*. 2017;
- Ribeiro N, et al. Flavaglines as potent anticancer and cytoprotective agents. *J Med Chem*. 2012;55:10064–73.
- Callahan KP, et al. Flavaglines target primitive leukemia cells and enhance anti-leukemia drug activity. *Leukemia*. 2014;28:1960–8.
- Bahrami A, et al. The potential value of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for assessing prognosis in cervical cancer and as a target for therapy. *J Cell Biochem*. 2017;
- Nan Y, et al. Combinatorial therapy with adenoviral-mediated PTEN and a PI3K inhibitor suppresses malignant glioma cell growth in vitro and in vivo by regulating the PI3K/AKT signaling pathway. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017;
- Lien EC, Dibble CC, Toker A. PI3K signaling in cancer: beyond AKT. *Curr Opin Cell Biol*. 2017;45:62–71.
- Mayer IA, Arteaga CL. The PI3K/AKT pathway as a target for cancer treatment. *Annu Rev Med*. 2016;67:11–28.

39. Han EK, Mcgonigal T, Butler C, Giranda VL, Luo Y. Characterization of Akt overexpression in MiaPaCa-2 cells: prohibitin is an Akt substrate both in vitro and in cells. *Anticancer Res.* 2008;28:957–63.
40. Berger KH, Yaffe MP. Prohibitin family members interact genetically with mitochondrial inheritance components in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1998;18:4043–52.
41. Bogenhagen DF, Wang Y, Shen EL, Kobayashi R. Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Mol Cell Proteomics.* 2003;2:1205–16.
42. Zhan Q, et al. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene.* 1999;18:2892–900.
43. Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.* 2005;30:630–41.
44. Salvador JM, Brown-Clay JD, Fornace AJ. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* 2013;793:1–19.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





# Synthèse de nouveaux agents anticancéreux

## Résumé

Les cancers représentent un problème majeur de santé public d'où la nécessité de rechercher de nouvelles classes de médicaments. Parmi les pistes pour développer de nouveaux traitements, deux ont retenu notre attention et celle de nos collaborateurs : la modulation de l'épissage par des composés comme le NVS-SM2, et l'inhibition de l'oncogène KRAS par des dérivés de produits naturels, les flavaglines.

Dans ce contexte, nous avons développé la première synthèse robuste du NVS-SM2, qui peut satisfaire la demande globale de cet agent pour examiner en détail son potentiel thérapeutique dans différents types d'affection. En outre, la stratégie de synthèse rapportée ici pourrait être étendue à de nouveaux analogues de ce composé.

D'autre part, nous avons synthétisé de nouvelles flavaglines qui sont en cours d'étude pour leurs effets sur l'inhibition de KRAS. Au cours de cette étude, nous avons découvert de nouvelles réactions, notamment une inversion de configuration d'amines induite par du chlorure de diméthylcarbamoyle.

**Mots-clés:** Modulateurs d'épissage, NVS-SM2, pyridazine, réaction de Suzuki-Miyaura, flavagline, KRAS, chimie hétérocyclique.

## Synthesis of new anticancer agents

## Abstract

Cancers represent a major public health problem hence the need to use new classes of medicines. Among the opportunities for developing new treatments, two have caught our attention and that of our collaborators: the modulation of splicing by compounds such as NVS-SM2, and the inhibition of the oncogene KRAS by derivatives of natural products, the flavaglines.

In this context, we have developed the first robust synthesis of NVS-SM2, which can satisfy the global demand of this agent to examine in detail its therapeutic potential in different types of disorders. In addition, the synthetic strategy reported here could be extended to new analogues of this compound.

Furthermore, we have synthesized new flavaglines that have been examined for their effects on KRAS inhibition. During this study, we discovered new reactions, including a dimethylcarbamoyl chloride-induced amine inversion of configuration.

**Key words:** Splicing modulators, NVS-SM2, pyridazine, Suzuki-Miyaura reaction, flavaglines, KRAS, heterocyclic chemistry.