HAL
open science

Développement préclinique de dérivés imidazo [1,2-a] quinoxaliniques à visée anticancéreuse : synthèse chimique, formulation galénique et validation de méthode de dosage en milieu biologique

Adrien Chouchou

▶ **To cite this version:**

Adrien Chouchou. Développement préclinique de dérivés imidazo [1,2-a] quinoxaliniques à visée anticancéreuse : synthèse chimique, formulation galénique et validation de méthode de dosage en milieu biologique. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT034 . tel-01947402

HAL Id: tel-01947402

https://theses.hal.science/tel-01947402v1

Submitted on 6 Dec 2018

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Chimie Thérapeutique

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche : UMR 5247 - Institut des Biomolécules Max Mousseron

Développement préclinique de dérivés imidazo[1,2-*a*]quinoxaliniques à visée anticancéreuse : synthèse chimique, formulation galénique et validation de méthode de dosage en milieu biologique.

Présentée par Adrien CHOUCHOU

Le 13 septembre 2018

Sous la direction de Carine MASQUEFA et la co-direction de Pierre-Antoine BONNET

Devant le jury composé de

Pr Pierre-Antoine BONNET, Université de Montpellier	Co-directeur de thèse
Dr Bernard BOURRIE, Meliès Business Angels	Examinateur
Pr Carine MASQUEFA, Université de Montpellier	Directeur de thèse
Pr Catherine PERRIN, Université de Montpellier	Président de jury
Pr Patrice PROGNON, Université de Paris Sud	Rapporteur
Pr Nadia WALCHSHOFER, Université de Lyon 1	Rapporteur

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

A ma mère, avec toute ma reconnaissance et mon amour.

A ma grand-mère, avec toute ma gratitude et ma fierté.

Remerciements

Je remercie tout d'abord Monsieur le Professeur **Patrice Prognon** et Madame le Professeur **Nadia Walchshofer** d'avoir accepté de vous investir dans le rôle de rapporteur. J'en profite pour remercier en particulier Madame Walshchofer pour sa bienveillance et sa pédagogie qui m'ont permis d'aimer la Chimie Organique lors de mon cursus de Pharmacie à l'Université Claude Bernard Lyon 1.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame le Professeur **Catherine Perrin** et à Monsieur le Docteur **Bernard Bourrié** pour avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examinateur. Votre présence dans ce jury m'honore sincèrement.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe F16 "Oncopharmacochimie & Pharmacotoxicologie Cutanée" de l'IBMM. Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire qui m'ont aidé à réaliser ce travail, par de petites ou de grandes contributions. Je remercie également l'ensemble des collaborateurs avec qui j'ai eu la chance de travailler sur ce projet.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Pierre-Antoine Bonnet** pour m'avoir accueilli au sein de son équipe au laboratoire de Chimie Organique de la faculté de Pharmacie de Montpellier. Merci de m'avoir encadré tout au long de ces trois années de thèse, d'avoir fait preuve de patience et de m'avoir fait confiance pour intégrer ce projet « Imiqualines ».

J'adresse mes plus sincères remerciements à Madame le Professeur **Carine Masquefa**, qui a dirigé cette thèse, pour son encadrement, sa présence, sa patience et ses conseils tout au long de ces trois années de travaux. Merci pour sa disponibilité, sa générosité, son immense gentillesse et sa bienveillance. Merci d'avoir su me supporter et me gérer au quotidien. Merci infiniment pour tout.

Je souhaite également témoigner ma reconnaissance au Docteur **Cindy Patinote** pour son implication, ses conseils avisés et son soutien dans ces travaux. Au-delà de la relation professionnelle, je la remercie pour l'amitié que nous avons développée pendant ces années de "colocation de bureau".

Je souhaite témoigner ma gratitude à Madame le Docteur **Françoise Bressolle-Gomeni** pour ses conseils, ses encouragements, sa disponibilité et sa très précieuse aide. Merci à Monsieur **Roberto Gomeni** pour son expertise. Merci à Madame le Professeur **Christine Enjalbal** pour sa précieuse aide et sa disponibilité. Merci également à Monsieur le Professeur **Michel Audran** de m'avoir permis de travailler au sein de son laboratoire. Merci à **Bénédicte Marion** et à **Céline Roques** pour m'avoir aidé à dompter la spectrométrie de masse. Merci également à **Leticia Trigo** pour ses nombreux conseils.

Je remercie particulièrement les membres de l'équipe MACS de l'ICGM qui ont permis la collaboration sur la partie formulation galénique. Un immense merci au Docteur **Anne Aubert-Pouëssel** ainsi qu'au Docteur **Sylvie Bégu** pour m'avoir encadré lors de ces travaux. Merci aux Professeurs **Joël Chopineau** et **Jean-Marie Devoisselle** d'avoir permis cette collaboration. Merci à **Christophe Dorandeu** pour son aide et un énorme merci à Monsieur **Pradial Peralta**, au Docteur **Marie Morille** pour tous ces moments partagés dans la bonne humeur.

Merci aux membres de l'équipe F16 : Monsieur le Professeur **Pierre Cuq** pour ses nombreux conseils, Madame le Professeur **Gilberte Marti-Mestres**, le Docteur **Hinda Dabboue**, le Docteur **Kamel Hadj-Kaddour**, le Docteur **Laure-Anaïs Vincent**, le Docteur **Romain Larive**, le Docteur **Myriam Richaud** et **Marie-Hélène Cuvillier** pour son aide précieuse.

Merci également à Monsieur le Professeur **Philippe Legrand** et à Monsieur le Docteur **Jean-Francois Guichou** pour leur présence au sein de mes comités de suivi de thèse.

Je remercie par ailleurs Monsieur le Professeur **Gilles Subra** et Madame le Professeur **Christine Enjalbal** pour m'avoir permis de rejoindre le Master 2 Chimie des Biomolécules pour la Santé, parcours Stratégie de Découverte de Molécules Bioactives.

Merci également aux personnes ayant travaillé sur le projet avant mon arrivée et m'ayant permis de reprendre un projet déjà très bien avancé : le Docteur **Georges Moarbess**, le Docteur **Sonia Khier**, le Docteur **Zahraa Zghaib** et le Docteur **Florence Gattacceca** en particulier.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du laboratoire de Chimie Analytique et en particulier Madame le Professeur **Catherine Perrin** pour m'avoir permis d'intégrer son équipe. Merci à l'ensemble de l'équipe pour le soutien en cette fin de rédaction : merci au Docteur **Coussot Gaëlle**, au Docteur **Yoann Ladner**, au Docteur **Claudia Muracciole-Bich**, à **Jérôme Montels**, à **Chantal Paradis-Gimeno**, à **Yvan Sorbs** et aux doctorants **Omar Ahmed** et **Meriem Dadouch**.

Je souhaite remercier le **Centre Hospitalier Universitaire Régional de Montpellier** pour le financement de cette thèse par l'intermédiaire de la filière Innovation Pharmaceutique et Recherche de l'Internat en Pharmacie. Je remercie également la **SATT AxLR** et Monsieur **Marc Criton** pour le soutien financier du projet « Imiqualines ».

Une pensée toute particulière pour ma famille.

A mon **grand frère** qui a ouvert la voie. C'est en lisant ton travail que les idées ont poussé. Merci pour l'exemple que tu me donnes comme chercheur, et surtout en tant qu'homme. Merci également à **Maud**.

A **mon père** qui m'a toujours soutenu. Merci pour ta présence, ton infini soutien et ton immense fierté. Merci également à **Patricia**.

A mes neveux, **Matéo**, **Robin** et **Paul**. Merci pour votre patience. En espérant vous voir plus souvent dans les années à venir. Que ce travail vous rappelle que tout est possible.

A **Salima**, **Hind**, **Soumya**, **Rayanne** et **Redouane**. Merci pour votre soutien inconditionnel. J'espère être plus disponible à présent.

A mes cousins **Karim** et **Djamil** ainsi qu'à leurs enfants.

Je remercie également tous mes amis de faculté de Lyon: **Turgay**, **Majdi**, **Ayoub**, **Chamo**, **Touf**, **Tij**, **Cécilia**, **Nizar** et tous les autres…

Je remercie bien-sûr tous mes amis de Montpellier : en particulier les tartifs **Estelle**, **Gilou**, **Hinda**, **Mathieu**, **Muriel**, **Saad**, **Sophie**, mes co-internes… Merci également à tous les copains de course avec qui j'ai pu borner pour évacuer le stress : **Clément**, **Baptiste**, **Yann**, etc…

Merci à tous les membres du laboratoire de Chimie Organique : **Stéphanie Paniagua-Gayraud** pour son immense gentillesse et sa bonne humeur permanente, à **Jean-François** pour sa sympathie, à **Christelle** pour sa gentillesse. Merci également à **Nour** (ou plutôt le Docteur **Nour Bou Karroum**) pour ses bons moments partagés.

Merci à tous les membres du laboratoire de *Synthèse de lipides bioactifs*: **Camille** pour sa bonne humeur et ces moments d'échange en toute convivialité. Merci également à **Valérie**, **Alex**, **Carine**, **Espérance**, **Guillaume**, **Céline**, **Jean-Marie**, **Laurence** et à Monsieur **Thierry Durand**.

Merci aux membres du DAPP : **Lucie** et **Sébastien** pour ses moments conviviaux et relaxants devant les mots fléchés, **Yen** pour sa sympathie, **Alain Chavanieu** pour ses conseils.

Merci à toutes les personnes qui m'ont permis, par de petites ou de grandes contributions, d'en être là aujourd'hui.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE 19

CHAPITRE 1 - Le mélanome cutané : généralités, voies de signalisation, traitements actuels et perspectives 25

I - Généralités sur le mélanome cutané 25

I - 1. Généralités sur la peau humaine 25

I - 2. Définition du mélanome cutané 27

I - 3. Epidémiologie 28

I - 4. Formes cliniques 30

I - 5. Diagnostic 32

I - 5.1. Diagnostic clinique 32

I - 5.2. Diagnostic histologique 32

I - 6. Classification 33

II - Physiopathologie et voies de signalisation impliquées 36

II - 1. La voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) 37

II - 2. La voie PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) 39

II - 3. La voie AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique) 40

II - 4. Les autres voies potentiellement impliquées 41

II – 4-1. La voie Wnt (Wingless-related integration site)/bêta-caténine 41

II – 4-2. La voie HGF/c-Met 42

II – 4-3. La voie cyclineD/CDK4 42

III - Traitements actuels, limites et perspectives 44

III - 1. Exérèse chirurgicale 45

III - 2. Génotypage BRAF préalable aux traitements médicamenteux 45

III - 3. Traitement médicamenteux 47

III - 3. 1. Immunothérapie 49

III - 3. 2. Thérapies ciblées 52

III - 3. 3. Chimiothérapies cytotoxiques 55

III - 3. 4. Radiothérapie 56

III - 4. Mécanismes de résistance 56

III - 4. 1. Mécanismes principaux de résistance aux traitements médicamenteux 56

III - 4. 2. Cas particuliers de la résistance aux thérapies ciblées 57

III - 5. Perspectives de traitements 59

III - 5. 1. Nouvelles associations thérapies ciblées et immunothérapie 59

III - 5. 2. Les inhibiteurs de c-Met 62
III - 5. 3. Les inhibiteurs de la voie PI3K *via* l'inhibition de mTOR 64
III - 5. 4. Les inhibiteurs de c-KIT 67
CHAPITRE 2 - Les imidazoquinoxalines de première génération 69
I - Synthèse chimique 72
I - 1. Synthèse de l'EAPB0203 72
I - 2. Synthèse de l'EAPB0503 73
I - 2.1. Formation du dimère diimidazo[1,2-*a*;1',2'-*d*]pyrazine-5,10-dione. 74
I - 2.2. Addition d'une fluoroaniline sur le dimère. 74
I - 2.3. Cyclisation intramoléculaire en milieu basique. 75
I - 2.4. Substitution de l'hydroxyle par un chlore. 76
I - 2.5. Introduction de la méthylamine. 76
I - 2.6. Bromation radicalaire de Whol-Ziegler. 77
I - 2.7. Couplage de Suzuki-Miyaura. 78
II - Activités cytotoxiques *in vitro* 79
III - Test *in vivo* des Imiqualines de première génération 81
III - 1. Pharmacocinétique et métabolisme 81
III - 2. Tests de toxicité *in vivo* de l'EAPB0203 et de l'EAPB0503 chez le rat 84
III - 3. Test d'activité *in vivo* de l'EAPB0203 sur souris xenogreffées par cellules cancéreuses M4Be.. 84
IV - Mécanisme d'action des Imiqualines de première génération 87
IV - 1. Induction de l'apoptose 87
IV – 2. Inhibition de la polymérisation de la tubuline 89
IV - 3. Action sur les protéines kinases 91
V – Partie expérimentale : étude galénique de l'EAPB0503 92
V - 1. Objectifs de l'étude 92
V - 2. Résultats 94
V – 3. Discussion 94
VI. Article 1 : "Lipid nanocapsules formulation and cellular activities evaluation of a promising anticancer agent: EAPB0503." 95
CHAPITRE 3 - Les imidazoquinoxalines de deuxième génération 106
I - Synthèse chimique 107
I - 1. Synthèse développée au laboratoire 107
I - 1.1. Le composé EAPB02303 107
I – 1.2. Le composé EAPB02302 108

I – 2. Etape limitante et optimisation des conditions opératoires 109

II - Activité antitumorale *in vitro* 112

III - Mécanisme d'action 113

III - 1. Absence de liaison à la tubuline de l'EAPB02303 113

III - 2. Analyse transcriptomique 115

III - 3. Recherche de la cible d'action par chromatographie d'affinité 117

III – 3.1 Objectif et principe de l'étude 117

III – 3.1 Travaux réalisés et premiers résultats 119

IV – Modulation chimique des Imiqualines de deuxième génération en position 4 123

IV - 1. Objectifs de l'étude 123

IV - 2. Tavaux réalisés et résultats 124

IV - 2.1. Stratégie 124

IV - 2.2. Acides aminés utilisés 125

IV – 2.3. Résultats 126

IV – 3. Discussion 126

V. Article 2: "Development of new imidazo[1,2-*a*]quinoxalines derivatives against melanoma: grafting with amino acids to enhance water solubility." 128

CHAPITRE 4 : Mise au point et validation d'une méthode de dosage en milieu biologique de l'EAPB02303 et de l'EAPB02302 par LC-MS/MS. 161

I – Introduction et objectif de l'étude 161

II - Matériels et méthodes 162

II - 1. Spectrométrie de masse (SM) 162

II - 2. La source d'ionisation électrospray (ESI) 163

II - 3. Principe de l'analyseur quadripolaire 165

II – 4. L'analyseur triple quadripolaire (QqQ) et la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) 167

II - 5. Couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse 168

II - 6. Méthodologie 169

II - 6. 1. Molécules étudiées 169

II - 6. 2. Prétraitement des échantillons biologiques 170

III – Critères de validation, résultats et discussion 171

III - 1. Critères de validation 171

III - 1. 1. Spécificité 171

III - 1. 2. Linéarité 171

III - 1. 3. Exactitude 171

III - 1. 4. Fidélité 171

III - 1. 5. Intervalle de validité 172

III - 1. 5. Limite de détection et limite de quantification 172

III - 1. 6. Stabilité 172

III - 1. 7. Robustesse 172

III - 2. Résultats 172

III - 3. Discussion 173

IV - Article 3: “Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for quantitative estimation of new imiqualine leads with potent anticancer activities in rat and mouse plasma. Application to a pharmacokinetic study in mice.” 174

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 195

BIBLIOGRAPHIE 202

LISTE DES ABBREVIATIONS

α-MSH : *α-Melanocyte Stimulating Hormone*
AA : Acide Aminé
AC : Adénylyl Cyclase
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique
ATL : Leucémie-lymphome à cellules T de l'adulte
ATP : Adénosine Triphosphate
AWI : *Approved Work Item*
BBr_3 : Tribromure de bore
BF_3-SMe_2 : Complexe trifluorure de bore-diméthyl sulfide
c-Met : *tyrosine-protein kinase Met*
$CHCl_3$: Chloroforme
CI_{50} : Concentration inhibitrice 50 %
CDK4 : *Cyclin-Dependent Kinase 4*
CDKN2A : *Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A*
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
CML : Leucémie Myéloïde Chronique
CQ : Contrôle Qualité
CREB : *Responsive Element Binding protein*
CTLA4 : *Cytotoxic T-Lymphocyte–associated Antigen 4*
DCM : Dichlorométhane
DCP : Des-γ-carboxy-prothrombine
DL_{50} : Dose Létale 50 %
DMA : Diméthylacétamide
DME : Diméthyléther
DMF : Diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxide
EAPB : Equipe d'Accueil Pharmacochimie et Biomolécules
EMA : *European Medicines Agency*
ERK: *Extracellular signal-Regulated Kinase*
ESI : Ionisation par électrospray
Et_3N : Triéthylamine
EtOH : Ethanol
FC : Facteurs de Croissance
FPLC : *Fast Protein Liquid Chromatography*
GDP : Guanosine Diphosphate
GP : Groupement Protecteur
GTP : Guanosine Triphosphate
HAS : Haute Autorité de Santé

HGF : H*epatocyte Growth Factor*
HRMS : *High Resolution Mass Spectrometry*
HTLV-I : virus T-lymphotropique humain
ICH : *International Conference on Harmonisation*
IEC : *International Electrotechnical Commission*
INCa : Institut National du Cancer
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ISO : *International Organization for Standardization*
LC/ESI-MS : Chromatographie en phase liquide couplée avec la spectrométrie de masse à source d'ionisation par électrospray
LC-MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LDH : Lactate Déshydrogénase
$LiAlH_4$: Aluminohydrure de Lithium
Log P : Coefficient de partage octanol/eau
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinases*
MC1R : *Melanocortin 1 Receptor*
MeOH : Méthanol
MITF : *Microphtalmia-associated Transcription Factor*
MRM : *Multiple Reaction Monitoring*
mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*
MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
MW : Microondes
Na_2CO_3 : Carbonate de sodium
NaH : Hydrure de sodium
NaHMDS : Bis(triméthylsilyl)amidure de sodium
$NaHSO_3$: Bisulfite de sodium
Na_2SO_4 : Sulfate de sodium
NBS : N-Bromosuccinimide
NCI : *National Cancer Institute*
NF-κB : *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NH_4Cl : Chlorure d'ammonium
NP : Non purifié
PBS : Tampon phosphate salin
PD1 : *Programmed cell Death 1*
PDL1 : *Programmed Death-Ligand 1*
PDL2 : *Programmed Death-Ligand 2*
$Pd(PPh_3)_4$: *Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)*
PEG : Polyéthylèneglycol
PH : *Pleckstrin Homology*

PI_3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP_2 : Phosphatidylinositol 4,5 Phosphate
PIP_3 : Phosphatidylinositol 3,4,5 Phosphate
PKA : Protéine Kinase A
$POCl_3$: Trichlorure de phosphoryle
PTEN : *Phosphatase and Tensin homolog located on chromosome 10*
RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
Rdt : Rendement
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RSA : Relation Structure-Activité
SATT : Société d'Accélération du Transfert de Technologies
SDS-PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide avec dodécylsulfate de sodium
SIM : *Single Ion Monitoring*
SRM : *Single Reaction Monitoring*
$SOCl_2$: Chlorure de thionyle
TEA : Triéthylamine
TFA : Acide trifluoroacétique
THF : Tétrahydrofurane
TLR : *Toll like receptors*
UHPLC : Chromatographie liquide ultra haute performance
Wnt: *Wingless-related integration site*

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Schéma général du développement du processus cancéreux.....p 20

Figure 2. Arsenal médicamenteux disponible pour traiter le cancer. Classement selon la cible considérée [5].....p 21

Figure 3. Structure schématique de la peau : couches épidermique, dermique et hypodermique avec zoom sur l'épiderme [8].....p 26

Figure 4. Évolution du nombre de nouveaux cas et de décès (histogramme) et des taux standardisés monde correspondants (courbes à l'échelle logarithmique) chez l'homme et chez la femme de 1997 à 2017 en France métropolitaine (observation de 1997 à 2013 et estimation de 2014 à 2017) [24].....p 29

Figure 5. Exemples de lésions caractéristiques des différentes formes anatomo-cliniques du mélanome : a) mélanome à extension superficielle. b) mélanome nodulaire. c) mélanome de Dubreuilh. d) mélanome acral-lentigineux. Adapté de Menzies et al. 2017 [29].....p 31

Figure 6. Exemple d'application de la règle ABCDE sur des lésions bégnines et malignes [35]. .....p 32

Figure 7. Les différents stades du mélanome selon la profondeur de la lésion. Adapté de *dyersburg skin and allergy clinic* [37].....p 35

Figure 8. Principales voies de signalisation impliquées dans le développement du mélanome cutané [39].....p 36

Figure 9. La voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) et la voie de PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) impliquées dans l'apparition du mélanome cutané [38,57].....p 38

Figure 10. La voie de l'AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique) impliquée dans l'apparition du mélanome [38,57].....p 41

Figure 11. Evolution de l'activité de génétique somatique dans la prise en charge du mélanome cutané depuis 2010, d'après l'INCa (lesdonnees.e-cancer.fr) [100].....p 46

Figure 12. Arbre décisionnel des traitements systémiques de 1ère ligne, de 2ème ligne et de 3ème ligne des formes non résécables du mélanome cutané selon l'INCa [73,74].....p 48

Figure 13. Mécanismes d'action des anticorps anti-CTLA4, des anti-PD1 et des anti-PDL1 [107].....p 49

Figure 14. Mécanismes d'action des anti-BRAF et des anti-MEK dans la voie des MAPK impliquées dans l'apparition du mélanome.....p 52

Figure 15. Structures chimiques des anti-BRAF et des anti-MEK indiqués dans les formes avancées de mélanome cutané.....p 53

Figure 16. Structures chimiques de la dacarbazine et du témozolomide utilisés en monothérapies dans les formes métastasiques du mélanome cutané.....p 55

Figure 17. Exemples de mécanismes de résistance de la voie MAPK dans le mélanome cutané : 1) amplification de la cible 2) expression de protéines kinases alternatives 3) mutations sur la protéine MEK [140].....p 58

Figure 18. La combinaison association bithérapies ciblées et bi-immunothérapies comme perspectives de prises en charge du mélanome cutané [141].....p 60

Figure 19. Structure de la rapamycine avec sa lactone macrocyclique.....p 65

Figure 20. La voie mTOR en tant que cible thérapeutique. Plusieurs nouveaux agents de ciblage mTOR directs ou indirects ont été développés et évalués dans des essais cliniques [182].....p 66

Figure 21. Structure générale des imidazo[1,2-*a*]quinoxaline.....p 69

Figure 22. Structure chimique de l'Imiquimod et des Imiqualines de première génération (**EAPB0203** et **EAPB0503**).....p 71

Figure 23. Concentrations plasmatiques en **EAPB0203** et ses métabolites après administration unique de 2,5 mg/kg par voie intraveineuse (●) et par voie intraveineuse (■) (A) et en **EAPB0503** et ses métabolites après administration unique de 5 mg/kg par voie intraveineuse (●) (B) et après administration intrapéritonéale (●) (C) [210,211].....p 81

Figure 24. Structures chimiques de l'**EAPB0203** (A) et de l'**EAPB0503** (B) et les voies de métabolisme proposées [210].....p 83

Figure 25. Evolution de la taille de la tumeur en fonction du jour. Activité *in vivo* de l'**EAPB0203** à deux posologies différentes : 5 mg/kg (▲) et 20 mg/kg (■) chez la souris nude SWISS xénogreffée par la lignée de mélanome humain M4Be [211].....p 85

Figure 26. Evolution de la taille de la tumeur en fonction du jour. Activité *in vivo* de l'**EAPB0203** (20 mg/kg : ■) chez la souris nude SWISS xénogreffée par la lignée de mélanome humain M4Be comparé à la fotémustine (20 mg/kg : ●) et au groupe témoin non traité (▲) [204,211].....p 86

Figure 27. Courbes de survie. Activité *in vivo* de l'**EAPB0203** (20 mg/kg : ■) chez la souris nude SWISS xénogreffée par la lignée de mélanome humain M4Be comparé à la fotémustine (20 mg/kg : ●) et au groupe témoin non traité (▲) [204,211].....p 86

Figure 28. Inhibition de croissance des lignées cellulaires d'ATL à HTLV-I positifs (lignées HuT-102, MT-2 et C91-PL) ou négatifs (lignées CEM, Molt-4, Jurkat et HuT-78) par l'**EAPB0203** [215]……..p 88

Figure 29. Mise en évidence du mode d'action de l'**EAPB0503** sur des cellules de lignées CML. (A) augmentation de la population Pré-G0. (B) augmentation du pourcentage d'ADN fragmenté [216]……..p 89

Figure 30. Inhibition de la polymérisation de tubulines purifiées par l'**EAPB0203** et l'**EAPB0503** comparé à l'Imiquimod et à la colchicine pour des concentrations de 5 et 10µM. ……..p 90

Figure 31. Immunofluorescence sur les cellules A375 à l'aide des anticorps anti-tubuline. (A) Control (B) **EAPB0203** (3.14 µM) (C) **EAPB0503** (0.20µM) (D) Colchicine 1µM……..p 90

Figure 32. Profil d'inhibition de l'**EAPB0203** et de l'**EAPB0503** sur un panel de 196 protéines kinases (Screening CEREP)……..p 91

Figure 33. Structure d'une nanocapsule obtenue avec le procédé basé sur l'inversion de phase [223]……..p 93

Figure 34. Structure chimique des Imiqualines leaders de deuxième génération……..p 106

Figure 35. Mise en évidence de l'absence de liaison significative de l'**EAPB02303** sur la tubuline purifiée……..p 114

Figure 36. Modélisation de l'interaction avec la tubuline sur le site d'action de la colchicine. Présence d'une interaction pour l'**EAPB0503** mais pas pour l'**EAPB02303**……..p 115

Figure 37. Analyse transcriptomique comparative par « dendrogrammes synthétiques » entre les Imiqualines et les anticancéreux classiques……..p 116

Figure 38. Principes généraux de la chromatographie d'affinité [231]……..p 118

Figure 39. Exemple de groupes fonctionnels réactifs utilisables en chromatographie d'affinité……..p 119

Figure 40. Détermination des cibles d'**EAPB02303** par chromatographie d'affinité. Les détecteurs UV en sortie de colonne renseignent la composition des solutions éluées. En bleu : la fluorescence à 280 nm informe sur la quantité de protéine dans le milieu. En marron : la conductivité du milieu nous informe sur la composition de la solution en sortie de colonne. Les éluâts de la colonne sont récupérés par fraction de 500µl……..p 121

Figure 41. Figure 41. Résultats préliminaires de l'étude par chromatographie d'affinité. En vert : l'analogue de l'**EAPB02303** greffé sur la matrice d'agarose (AFF-F3). En bleu : le linker

seul greffé sur la matrice (CL-F2). En rose : contrôle négatif en l'absence de greffage sur la matrice (CC-F1)……..p 122

Figure 42. Objectifs de la modulation chimique des imidazoquinoxalines de deuxième génération en position 4……...p 124

Figure 43. Nomenclature des groupements protecteurs sur les acides aminés.....p 125

Figure 44. Perspectives d'étude des nouveaux composés synthétisés présentant un acide aminé greffé en position 4 : étude du clivage de cette fonction et dosage par LC-ESI-MS/MS du composé obtenu après clivage……..p 127

Figure 45. Représentation schématique d'un spectromètre de masse……...p 163

Figure 46. Mécanisme d'ionisation par électrospray d'un flux continu de solution d'échantillon passé à travers un capillaire en « mode positif », d'après Ho CS et al. [259]……p 164

Figure 47. Principe de fonctionnement d'un analyseur quadripolaire.....p 165

Figure 48. Structure et principe de fonctionnement d'un analyseur triple quadripolaire..p 167

Figure 49. Préparation des gammes d'étalonnage et des échantillons contrôle qualité (CQ)……p 169

Figure 50. Structure générale des Imiqualines. Structures chimiques des composés leaders de première et deuxième générations……p 195

TABLE DES SCHEMAS

Schéma 1. Synthèse du 1-amino-4-phénylbutan-2-ol à partir du 3-phénylpropionaldéhyde [207].....p 72

Schéma 2. Synthèse de l'**EAPB0203** à partir du 1-amino-4-phénylbutan-2-ol et de la 2,3-dichloroquinoxaline [207].....p 72

Schéma 3. Schéma général de synthèse de l'**EAPB0503**.....p 73

Schéma 4. Etape de formation du dimère diimidazo[1,2-a;1',2'-d]pyrazine-5,10-dione.....p 74

Schéma 5. Etape de formation de l'ortho-fluoroamidure.....p 74

Schéma 6. Etape d'addition de l'ortho-fluoroamidure sur le dimère puis étape de protonation à l'aide du bis(trimethylsilyl)amine.....p 75

Schéma 7. Etape de cyclisation intramoléculaire en milieu basique.....p 75

Schéma 8. Etape de substitution de l'hydroxyle par un chlore.....p 76

Schéma 9. Etape d'introduction de la méthylamine en position 4.....p 77

Schéma 10. Etape d'initiation radicalaire de la bromation par le *N*-bromosuccinimide.....p 77

Schéma 11. Etape de propagation radicalaire de la bromation par le *N*-bromosuccinimide.....p 78

Schéma 12. Etape de formation du succinimide et du dibrome lors de la bromation par le *N*-bromosuccinimide.....p 78

Schéma 13. Réaction d'addition radicalaire du brome lors de l'étape de bromation par le *N*-bromosuccinimide.....p 78

Schéma 14. Mécanisme réactionnel de la réaction de couplage de Suzuki-Miyaura.....p 79

Schéma 15. Synthèse du composé **EAPB02303**.....p 108

Schéma 16. Synthèse du composé **EAPB02302**.....p 109

Schéma 17. Conditions optimisées pour l'étape de déméthylation finale.....p 111

Schéma 18. Etape de déprotection de l'acide boronique.....p 111

Schéma 19. Couplage de Suzuki-Miyaura avec un acide boronique préalablement déprotégé .....p 111

Schéma 20. Greffage d'un dérivé du composé **EAPB02303** par un linker fixé sur une colonne d'agarose.....p 120

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification TNM du mélanome (adaptée de la 7éme édition du «TNM classification» par l'UICC et l'AJCC, 2009) [8].....p 33

Tableau 2. Stadification TNM du mélanome (adaptée de la 7éme édition du «TNM classification» par l'UICC et l'AJCC, 2009) [36].....p 34

Tableau 3. Altérations génétiques retrouvées dans le mélanome cutané [54].....p 37

Tableau 4. Activité détaillée des plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers dans le mélanome cutané en 2016, d'après l'INCa [100].....p 46

Tableau 5. Récapitulatif des traitements médicamenteux d'immunothérapies autorisés par la FDA [116] et l'EMA [117] avec indications mélanome.....p 51

Tableau 6. Récapitulatif des traitements médicamenteux issus des thérapies ciblées autorisés par la FDA [116] et l'EMA [117] avec indications mélanome.....p 54

Tableau 7. Essais cliniques sur le mélanome explorant les combinaisons immunothérapie et thérapies ciblées. Adapté de Marconcini et al. [107].....p 61

Tableau 8. Liste des inhibiteurs de c-Met interagissant avec la voie de signalisation c-Met/HGF et susceptibles d'être utilisés dans le traitement du mélanome métastasé, adapté de Demkova et al. [88].....p 62

Tableau 9. : Concentration inhibitrice 50 % (CI_{50}) en µmol/L des Imiqualines de première génération **EAPB0203** et **EAPB0503** et des molécules de référence sur différentes lignées cellulaires de mélanome, de cancer du côlon, de cancer du sein et de leucémie [204,205].....p 80

Tableau 10. : Paramètres pharmacocinétiques de l'**EAPB0203** et de l'**EAPB0503** calculés à l'aide du logiciel Pk-fit software® après administration par voie intraveineuse (IV) et par voie intrapéritonéale (IP) de 2,5 mg/kg et de 5 mg/kg, respectivement [213].....p 82

Tableau 11. : Formulations utilisées pour les études *in vivo* des Imiqualines de première génération.....p 92

Tableau 12. CI_{50} (nM) de l'**EAPB02302**, de l'**EAPB02303** ainsi que l'**EAPB0503** sur différentes lignées cancéreuses.....p 112

Tableau 13. Log P et solubilité théorique en milieu aqueux à pH 7,4 des Imiqualines leaders calculés par le logiciel ChemDraw®.....p 123

Tableau 14. Acides aminés utilisés : protections, masses exactes et équivalences utilisées.....p 125

Tableau 15. Groupements protecteurs utilisés : forme chimique et masse exacte.....p 125

INTRODUCTION GENERALE

Le terme général « cancer » regroupe un nombre important de maladies pouvant toucher tous les organes. On distingue deux types particuliers : les cancers dits « solides » qui touchent des organes fonctionnels (poumon, pancréas, peau…) et les cancers dits « liquides » qui correspondent à des hémopathies des composants du sang (érythrocytes, leucocytes, thrombocytes…).

Il s'agit d'une pathologie multifactorielle impliquant des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux. Des études épidémiologiques ont montré que le tabagisme, l'abus d'alcool, l'imprégnation hormonale, le contact avec certaines substances chimiques, l'exposition excessive aux rayonnements solaires constituent notamment des facteurs de risque menant au développement de cette maladie [1,2]. L'association de facteurs de risques et l'importance de l'exposition (en temps et en quantité) semblent être des facteurs déterminants.

Les cellules cancéreuses présentent des caractéristiques particulières dues à une ou plusieurs mutations somatiques soit de façon spontanée, soit par contact avec des agents mutagènes. Les voies de signalisation cellulaire vont ainsi être perturbées. Les cellules cancéreuses se multiplient plus rapidement que les cellules normales avec perte de sensibilité aux mécanismes d'apoptose notamment ; ce qui les rend «immortelles». Les mitoses ne sont pas plus rapides mais le nombre des cellules en division est plus élevé. Cette perturbation de la régulation du cycle cellulaire provoque une prolifération anarchique et un envahissement du tissu voisin à l'origine de la formation de tumeurs. D'un point de vue anatomique, les cellules cancéreuses sont indifférenciées. La promotion de l'angiogenèse va permettre l'apport énergétique des tumeurs. Celui-ci correspond à la création de nouveaux vaisseaux depuis la tumeur jusqu'à la circulation générale grâce à la sécrétion de facteurs de croissance. Ces cellules cancéreuses sont également capables de se disséminer dans tout l'organisme par voie lymphatique ou par voie sanguine pour former des métastases (Figure 1).

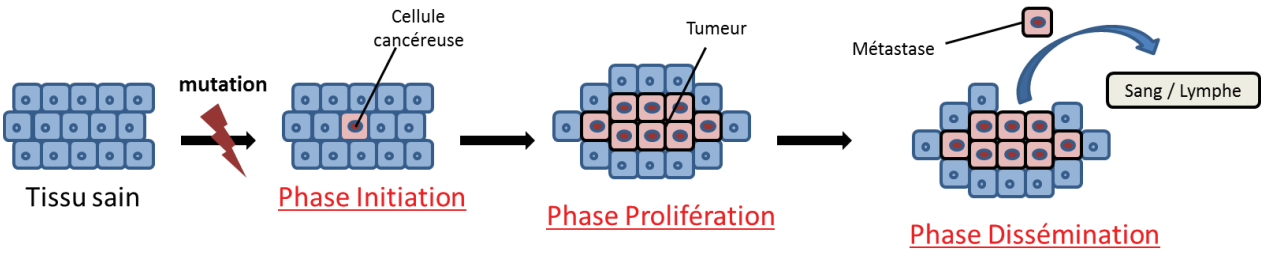


Figure 1. Schéma général du développement du processus cancéreux.

Années après années, les données sur le cancer évoluent et se complètent. Des tendances s'affinent et se confirment comme la diminution de la mortalité par cancer et les gains croissants sur l'espérance de vie après un cancer, malgré une incidence toujours en hausse. Le vieillissement de la population, ainsi que l'amélioration du dépistage et des traitements anticancéreux ont tendance à augmenter ce taux d'incidence ces dernières années. En France, le nombre de nouveaux cas de cancer est estimé à 399 626 nouveaux cas et la mortalité à 150 303 décès pour l'année 2017 [3]. Une disparité entre les sexes est à noter puisqu'on estime à près de 214 021 nouveaux cas chez les hommes contre 185 605 chez les femmes. Chez les hommes, les trois cancers les plus fréquents sont ceux de la prostate, du poumon et du côlon-rectum. Chez les femmes, ce sont les cancers du sein, du côlon-rectum et, désormais, du poumon. Depuis une trentaine d'années, l'incidence et la mortalité de certains cancers ont augmenté : mélanomes cutanés, les cancers du système nerveux central, du poumon, de l'estomac, de l'œsophage, des voies aérodigestives supérieures et du col de l'utérus. Pour d'autres cancers, l'incidence a augmenté et la mortalité a baissé : cancers du sein chez la femme et de la prostate chez l'homme.

Le traitement des cancers repose sur 3 axes thérapeutiques distincts mais complémentaires : la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicaux (chimiothérapie, thérapies ciblées, immunothérapie). Pour l'année 2015, près de 1,7 milliard d'euros de dépenses relatives aux molécules anticancéreuses ont été facturés par le système de santé français. Cela représente plus de 25 % des dépenses de soin consacrés à la lutte contre le cancer en France [4].

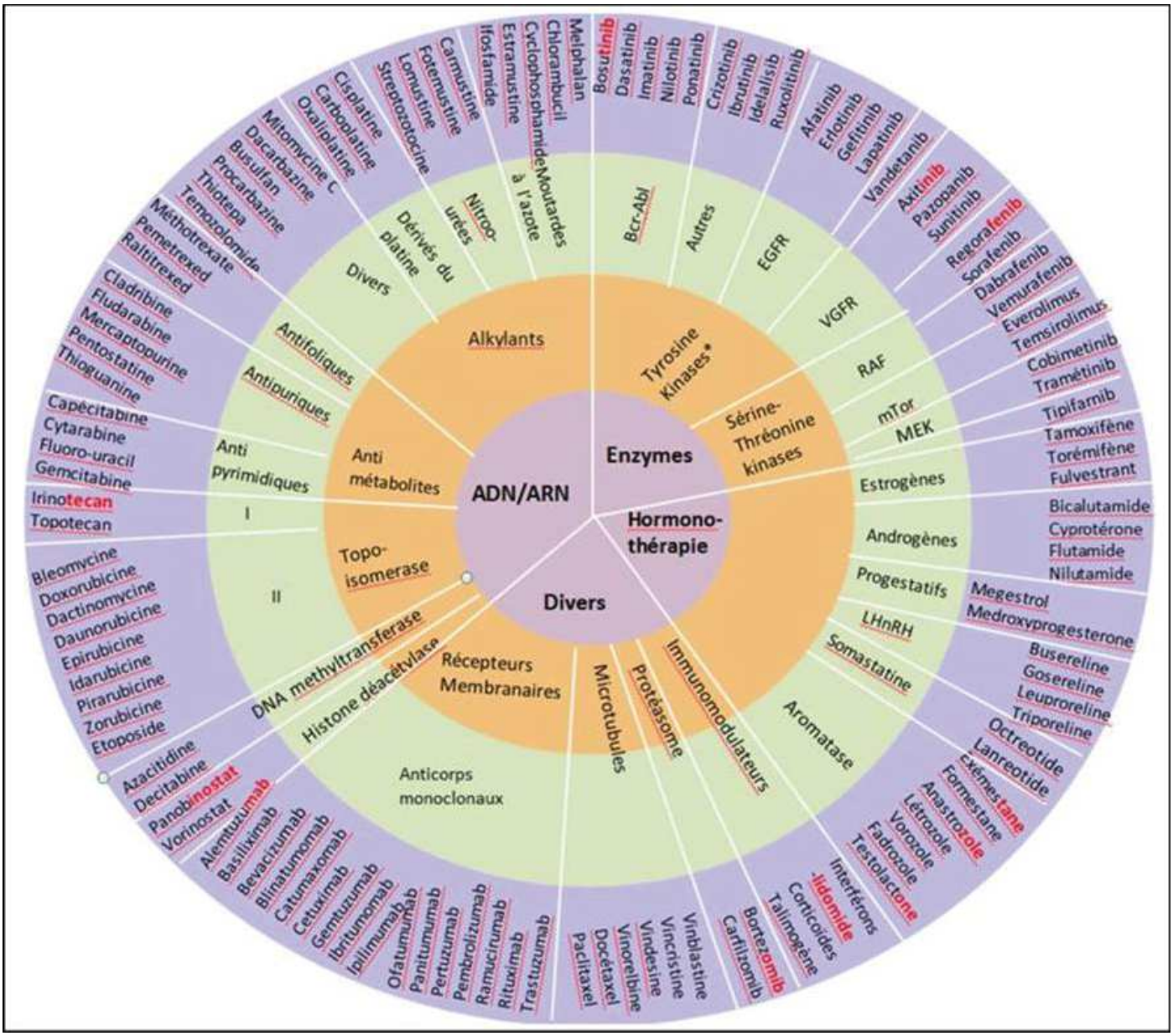


Figure 2. Arsenal médicamenteux disponible pour traiter le cancer. Classement selon la cible considérée [5].

L'arsenal thérapeutique disponible pour traiter le cancer est important (Figure 2). De nombreuses molécules sont disponibles sur le marché. Elles agissent sur de nombreuses voies de signalisation différentes et sur des cibles moléculaires variées. Cependant, ces traitements présentent de nombreux effets indésirables et parfois des efficacités mitigées de part notamment le développement de mécanismes de résistance. Par conséquent, le développement de nouveaux composés aux mécanismes d'action innovants reste une priorité pour la recherche pharmaceutique. C'est dans ce cadre-là que s'inscrit le projet Imiqualines dans lequel mon travail de thèse est intégré.

Depuis quelques années, les Imiqualines (ou dérivés imidazo[1,2-*a*]quinoxaliniques) représentent une des thématiques de l'équipe « Oncopharmacochimie et pharmacotoxicologie cutanée » de l'IBMM. Ce sont des molécules hétérocycliques de faible poids moléculaire et présentant des activités cytotoxiques comparables à celles des meilleurs anticancéreux actuellement sur le marché ou en développement. Ces molécules sont originales, protégées par un brevet international [6] et un brevet de sélection déposé en décembre 2014 [7]. Leur synthèse est maîtrisée et l'exemplification de la diversité moléculaire est bien avancée. Les études d'activité, de toxicité et de recherche du mécanisme d'action de ces molécules sont en cours. Grâce aux premiers résultats très encourageants, ce projet a reçu le soutien de de la SATT AxLR (Société d'Accélération du Transfert de Technologies). Ce soutien a permis un bon en avant avec le passage du projet en phase de maturation et la collaboration avec un industriel pharmaceutique.

Ma thèse s'inscrit entièrement dans ce projet de développement de nouvelles molécules hétérocycliques à activités anticancéreuses. Mes travaux ont pour but de répondre à plusieurs problématiques dans un projet global de développement de molécules actives, notamment sur le mélanome :

- Améliorer les problèmes de solubilité des molécules déjà identifiées comme leaders en développant une formulation galénique permettant leur administration *in vivo* en concentration suffisante.
- Moduler chimiquement les molécules identifiées comme leader pour permettre de conserver, voire d'améliorer, leur activité anticancéreuse tout en optimisant leurs propriétés physicochimiques.
- Valider une méthode de dosage en milieu biologique des molécules leaders afin de permettre d'évaluer les propriétés pharmacocinétiques des molécules étudiées.

Ces travaux, qui m'ont conduit à explorer différents domaines de recherche, sont exposés dans le manuscrit selon le plan suivant.

Le premier chapitre exposera les données bibliographiques concernant le mélanome cutané. Les généralités concernant cette maladie seront présentées ainsi que les voies de signalisations impliquées dans la physio-pathologie. Les traitements actuels et les perspectives de traitement contre le mélanome cutané seront ensuite évoqués.

Le deuxième chapitre sera consacré aux Imiqualines de première génération. Après avoir présenté les données bibliographiques de cette famille chimique, l'étude galénique réalisée sur l'un des composés les plus actifs *in vitro* : l'**EAPB0503**, sera exposée.

Ensuite, le troisième chapitre mettra en lumière les données connues sur les molécules de deuxième génération de cette même famille chimique. L'étude de modulation chimique et d'évaluation biologique de nouveaux composés chimiques issus de cette deuxième génération sera présentée.

Un quatrième chapitre concernera la mise au point et la validation d'une méthode de dosage en milieu biologique des composés « chefs de file » des molécules de deuxième génération (l'**EAPB02303** et l'**EAPB02302**). Un rappel théorique du couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse sera préalablement développé.

Dans la conclusion générale, les principaux résultats de l'ensemble des travaux seront résumés et les perspectives que ceux-ci permettent d'envisager à l'avenir seront exposées.

CHAPITRE 1

Le mélanome cutané : généralités, voies de signalisation, traitements actuels et perspectives

CHAPITRE 1 - Le mélanome cutané : généralités, voies de signalisation, traitements actuels et perspectives

I - Généralités sur le mélanome cutané

Le mélanome cutané est un cancer relativement peu fréquent parmi les cancers cutanés. Il représente moins de 5 % de l'ensemble de ces cancers. Cependant, il représente plus de 90 % des cas mortels de cancers cutanés. Parmi les autres cancers de la peau, on retrouve les carcinomes avec deux formes principales : les carcinomes basocellulaires (les plus fréquents et les moins graves car n'évoluent pas vers des métastases) et les carcinomes épidermoïdes (plus rares et plus dangereux sauf s'ils sont pris à temps). Les carcinomes ont pour origine une dégénérescence des kératinocytes alors que les mélanomes tirent leur origine d'une autre cellule constitutive de la peau : les mélanocytes. Le mélanome est caractérisé par sa facilité et sa rapidité à se transformer en forme métastasique à l'origine de sa très forte mortalité.

I - 1. Généralités sur la peau humaine

La peau constitue l'organe le plus lourd et le plus étendu de l'organisme, elle peut atteindre une surface supérieure à 2 m^2 avec une épaisseur variant entre 0,5 et 4 mm. Ces fonctions sont multiples. Tous d'abord, elle constitue de par sa grande surface une importante zone d'échange avec le milieu extérieur. Son rôle le plus vital pour l'organisme est celui de barrière vis-à-vis de l'environnement extérieur. Elle va notamment permettre de bloquer les rayonnements ultraviolets du soleil, les micro-organismes potentiellement pathogènes, les agressions chimiques… Elle participe à l'homéostasie thermique de l'organisme par le mécanisme de transpiration en cas de production de chaleur excessive par l'organisme ou bien par protection physique vis-à-vis du froid extérieur. Elle est également le support de synthèse de certains constituants vitaux pour l'organisme tel que la vitamine D à partir d'un dérivé du cholestérol sous l'action des rayonnements UV.

La peau est constituée de 3 couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 3). Chacune de ces couches possède des caractéristiques et des composants différents.

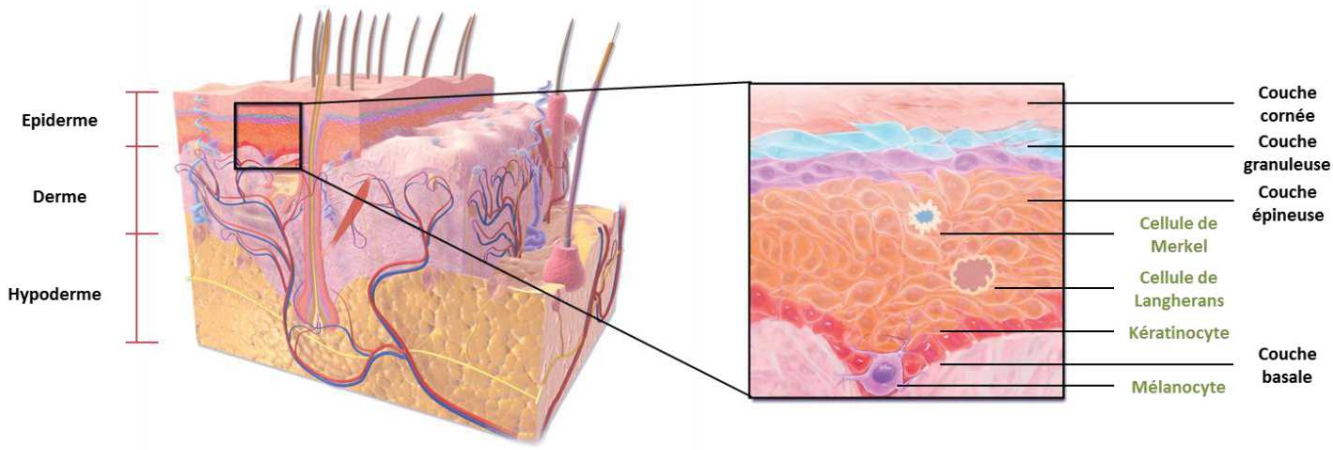


Figure 3. Structure schématique de la peau : couches épidermique, dermique et hypodermique avec zoom sur l'épiderme [8].

- L'épiderme : il constitue la couche la plus externe de la peau. L'épiderme est constitué principalement de kératinocytes ; ce sont les cellules constituant la barrière physique de l'épiderme. On distingue 3 autres types de cellules numériquement moins répandus : les mélanocytes, les cellules de Langherans et les cellules de Merkel. L'épiderme est formé de 4 couches distinctes : la couche cornée, la couche granuleuse, la couche épineuse et la couche basale.

- Le derme : il est composé principalement des fibroblastes qui sont les cellules à l'origine de la synthèse des fibres de collagène permettant l'élasticité de la peau. Contrairement à l'épiderme, il possède un réseau sanguin, lymphatique et nerveux. De ce fait, il va assurer son hydratation et son apport nutritionnel.

- L'hypoderme : il est composé essentiellement de cellules graisseuses appelées adipocytes permettant une isolation thermique de l'organisme ainsi qu'une réserve d'énergie.

La jonction dermoépidermique est formée par les cellules souches situées au niveau de la couche basale de l'épiderme. Elle constitue une source de kératinocytes qui se différencient et meurent au cours de leur migration vers la surface de l'épiderme [9]. Malgré le renouvellement continu de l'épiderme, il succombe au vieillissement car le taux de

renouvellement des kératinocytes ralentit considérablement avec l'âge. Le vieillissement est caractérisé par une diminution de la fonction de barrière associée à l'amincissement de l'épiderme, l'élastose cutanée et la diminution du nombre de mélanocytes [10].

Les mélanocytes sont les cellules à l'origine de la production de mélanine dans la couche basale de l'épiderme [10]. Les mélanocytes sont présents dans l'épiderme et le derme mais pas uniquement. On les retrouve également dans l'oreille interne, l'œil, les muqueuses et le système nerveux central où ils jouent un rôle important dans le développement et le maintien des organes [11]. Ils produisent des mélanosomes (granules de mélanine) dont la fonction principale est de protéger contre les rayonnements ultraviolets. La mélanine intervient donc dans la photoprotection contre les dommages causés par les rayons ultraviolets mais également dans la thermorégulation [12]. Le degré de production de mélanine se manifeste par un phototype de la peau (couleur de la peau) et est un facteur prédictif du risque de cancer de la peau [13,14].

I - 2. Définition du mélanome cutané

Le mélanome est défini comme une prolifération maligne de mélanocytes. Il peut se développer à partir de toutes les régions de l'organisme contenant des mélanocytes ; la localisation cutanée restant la plus fréquente. Dans ce chapitre, nous parlerons exclusivement du mélanome cutané.

De nombreux facteurs de risque ont été référencés ; tels que les caractéristiques physiques (peau, yeux et cheveux clairs, nombres importants d'éphélides et de nævi), les facteurs environnementaux et comportementaux liés aux contacts avec les ultraviolets (par exposition solaire ou par exposition artificielle), les antécédents familiaux ou personnels de cancers cutanés ainsi qu'une immunodépression [15–17]. Il s'agit d'un cancer relativement peu fréquent parmi les cancers cutanés (environ 5 %) [4]. Cependant, de par sa grande capacité à métastaser, le mélanome possède une plus grande mortalité que l'ensemble des autres cancers cutanés.

Le mélanome apparaît principalement *de novo*, c'est-à-dire sur une peau saine ne présentant ni tâche ni lésion au préalable. Selon la Haute Autorité de Santé (HAS) [18], dans

20 à 30 % des cas, l'apparition de la lésion se fait sur un nævus (ou « grain de beauté ») préexistant [19]. Cette transformation d'un nævus bénin en nævus dysplasique est accompagnée d'altérations génétiques à l'origine de dysfonctionnements du cycle cellulaire [20]. L'un des axes prioritaires de la prévention du mélanome consiste donc en l'observation régulière de toute nouvelle lésion ou évolution de nævus. Celle-ci peut être faite par un professionnel de santé (médecin généraliste ou dermatologue) ou par le patient lui-même. Les éphélides (ou « taches de rousseur ») ne sont jamais à l'origine de l'apparition d'un mélanome.

I - 3. Epidémiologie

L'incidence du mélanome est en nette hausse depuis le début des années 2000 [21]. Cette augmentation est principalement due à un meilleur dépistage. Le diagnostic précoce du mélanome permet de sauver beaucoup de patients, mais le pourcentage de tumeurs potentiellement mortelles du mélanome est resté stable [22]. En 2012, le nombre de nouveaux cas de mélanome en France était estimé à 11 176 (5 429 chez les hommes et 5 747 chez les femmes), pour une estimation totale de 355 354 nouveaux cas de cancer (à l'exclusion du cancer de la peau bénin) [23]. La mortalité due au mélanome était alors estimée à 1 672 cas (954 chez les hommes et 718 chez les femmes). Les taux d'incidence standardisés monde chez l'homme et chez la femme étaient respectivement de 10,8 et 11,0 pour 100 000 personnes-années (taux standardisés sur la structure d'âge de la population mondiale). Les taux de mortalité standardisés monde étaient alors de 1,7 chez l'homme et de 1,0 chez la femme pour 100 000 personnes-années.

L'Institut National du Cancer a publié en février 2018 les résultats d'une étude prévisionnelle d'incidence et de mortalité par cancer en France métropolitaine pour les 19 localisations cancéreuses les plus fréquentes [24]. Pour l'année 2017, l'incidence totale du cancer est estimée à 399 626 nouveaux cas pour une mortalité de 150 303 patients. Le nombre de nouveaux cas de mélanome est estimé à 15 404 (8 061 chez l'homme et à 7 343 chez la femme) pour des taux d'incidence standardisés monde de 14,9 et 13,6 pour 100 000 personnes-années ; chez l'homme et la femme respectivement. Pour cette même année, le nombre de décès par mélanome est estimé à 1 783 (1 036 hommes et 747 femmes). Ces

estimations témoignent de la tendance actuelle du mélanome : le nombre de nouveaux cas est en nette augmentation alors que la mortalité se stabilise (Figure 4).

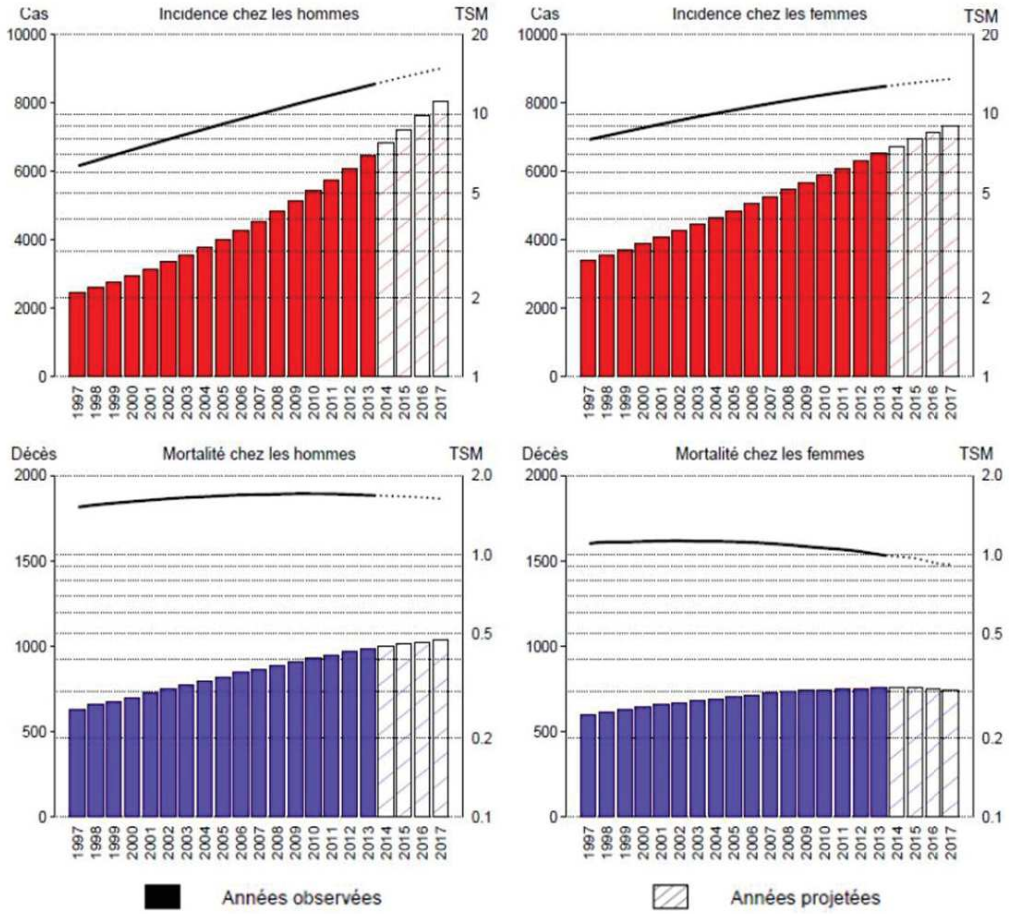


Figure 4. Évolution du nombre de nouveaux cas et de décès (histogramme) et des taux standardisés monde correspondants (courbes à l'échelle logarithmique) chez l'homme et chez la femme de 1997 à 2017 en France métropolitaine (observation de 1997 à 2013 et estimation de 2014 à 2017) [24].

Sur la période 2005-2010, la survie nette à 5 ans était, en France métropolitaine, de 93 % chez les femmes et de 88 % chez les hommes [25]. La survie nette à 10 ans était alors de 84 % (85 % chez la femme et 81 % chez l'homme).

Ces chiffres sont toutefois à pondérer selon 3 types de disparité :

- Disparité selon le grade : d'après les données du programme SEER (*The Surveillance, Epidemiology, and End Results*) du National Cancer Institute aux USA, la survie relative à 5 ans pour l'année 2012 était très variable selon le stade clinique considéré.

Elle serait de 98 % au stade localisé, 63 % au stade locorégional et seulement de 16 % au stade métastatique [26].

- Disparité ethnique : aux USA, le mélanome est plus fréquemment diagnostiqué chez les individus blancs non hispaniques que chez les individus hispaniques et noirs (taux d'incidence annuel respectifs de 26,4 et 1 pour 100 000) [27].

- Disparité selon l'âge et le sexe : les taux d'incidence sont plus élevés chez les femmes que chez les hommes avant l'âge de 50 ans. Cependant, après 65 ans, le taux chez les hommes est deux fois supérieur à celui des femmes. Au-delà de 80 ans, il est alors le triple [27].

Pour l'année 2018, l'*American Cancer Society* estime qu'aux USA l'incidence du mélanome sera de plus de 91 000 nouveaux cas pour une mortalité de plus de 9 300 décès [28]. Ces estimations feraient du mélanome le cancer ayant la 5^{éme} incidence chez les hommes et la 6^{éme} incidence chez les femmes, tous cancers confondus.

I - 4. Formes cliniques

Il existe quatre formes anatomo-cliniques principales décrites (Figure 5) :

- le mélanome à extension superficielle : il se caractérise par une première phase de croissance horizontale à l'intérieur de l'épiderme (on parle alors de mélanome *in situ*) puis une phase de croissance verticale après plusieurs mois ou année d'évolution [29]. Les cellules cancéreuses vont alors franchir la jonction dermo-épidermique et sont alors susceptibles d'atteindre la circulation générale.

- le mélanome nodulaire : il est défini par la présence d'un nodule palpable de couleur noire parfois ulcérant ou suintant [29]. Sa croissance est rapide (quelques semaines à quelques mois). D'un point de vue anatomopathologique, l'atteinte de l'épiderme se fait uniquement verticalement. Il est susceptible de se disséminer très rapidement. Il n'y a pas d'atteinte latérale de l'épiderme.

- le mélanome de Dubreuilh : il est caractérisé par une atteinte des zones exposées au soleil sur le visage sous la forme d'une tache de coloration hétérogène allant du noir au marron [30]. La première phase de croissance est horizontale au sein de l'épiderme pendant plusieurs années. Ensuite, une phase de propagation verticale va permettre aux cellules cancéreuses d'atteindre la jonction dermo-épidermique avec évolution possible vers une forme invasive.

- le mélanome acral-lentigineux : comme son nom l'indique, cette forme concerne des lésions de forme arrondie localisées sur les mains, les coudes, les genoux et les pieds. L'extension de la lésion se produit en plusieurs mois ou années [31].

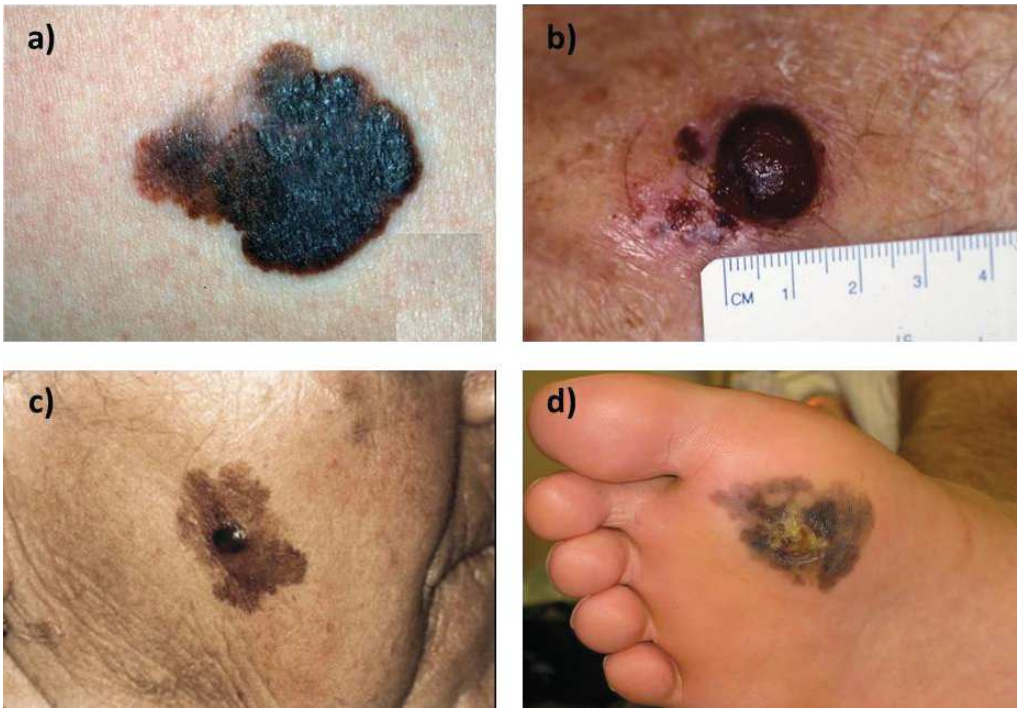


Figure 5. Exemples de lésions caractéristiques des différentes formes anatomo-cliniques du mélanome : a) mélanome à extension superficielle. b) mélanome nodulaire. c) mélanome de Dubreuilh. d) mélanome acral-lentigineux. Adapté de Menzies et al. 2017 [29].

La forme nodulaire est la forme la plus rapidement invasive. Elle représente 4 à 18 % des mélanomes identifiés [32]. Le mélanome à extension superficielle est la forme la plus fréquemment retrouvée (60 à 70 % des cas) [33].

I - 5. Diagnostic

I - 5.1. Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique d'un mélanome cutané repose sur l'analyse sémiologique d'une lésion pigmentée à l'aide de la règle **ABCDE** [34]. Celle-ci se définit par 5 critères relatifs à la lésion (Figure 6) :

- Une forme **A**symétrique.
- La présence de **B**ordures irrégulières, encochées ou polycycliques.
- Une hétérogénéité de **C**oloration.
- Un **D**iamètre supérieur à 6 mm.
- Une **E**volution de la lésion, que ce soit en termes de taille, de coloration, d'épaisseur et/ou d'aspect.

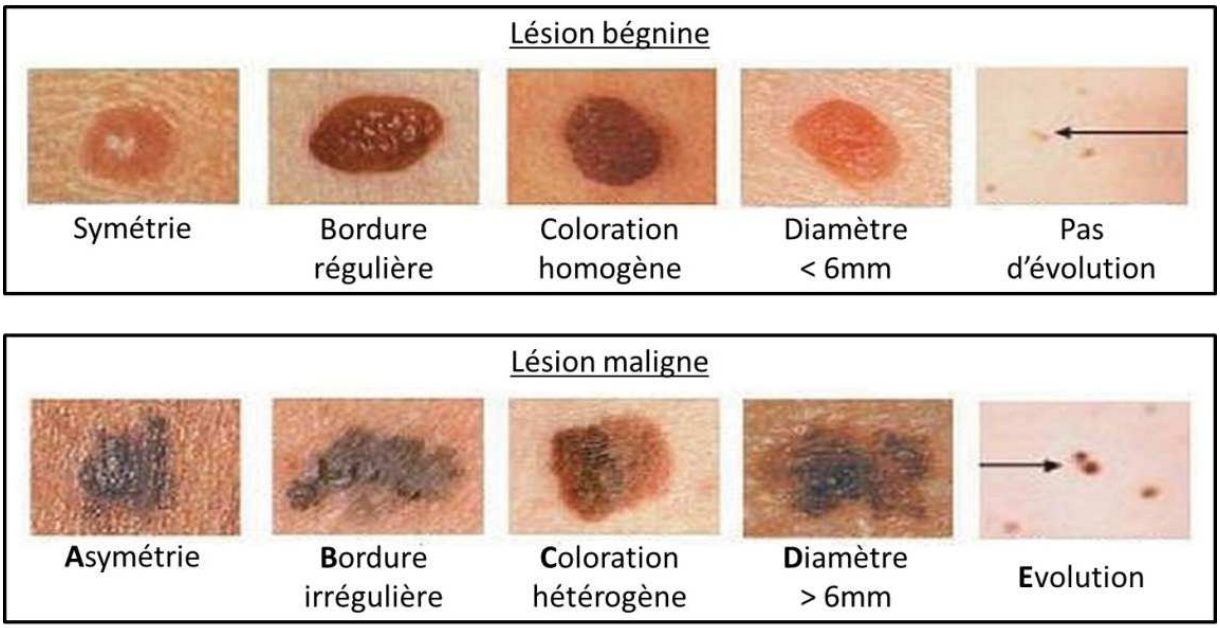


Figure 6. Exemple d'application de la règle ABCDE sur des lésions bégnines et malignes [35].

I - 5.2. Diagnostic histologique

La confirmation du diagnostic clinique doit toujours être réalisée par un examen anatomopathologique sur une pièce d'exérèse complète de la lésion incriminée ; et non pas sur une biopsie, ce qui peut entraîner des erreurs diagnostiques [18].

L'anatomopathologiste va définir la tumeur primitive selon plusieurs critères qui sont des facteurs pronostiques :

- L'épaisseur de la lésion (indice de Breslow).
- La présence d'ulcération sur la lésion.
- Le nombre de mitoses au mm².

Le pronostic va également dépendre du nombre de ganglions lymphatiques atteints, de la présence de métastases cutanées en transit, de métastases sous-cutanées à distance et de métastases viscérales. Le dosage du Lactate Déshydrogénase (LDH) peut également être utile.

I - 6. Classification

L'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) et l'*Union for International Cancer Control* (UICC) sont à l'origine d'une classification basée sur les caractéristiques de la tumeur primitive, des adénopathies régionales et des métastases. Cette classification est très utilisée en routine par les praticiens pour l'application des recommandations d'examens et de traitements. La version de 2009 (la 7éme version) est détaillée dans le Tableau 1.

T- Tumeur primitive.		
Classification	**Epaisseur (mm)**	**Ulcérations (index mitotique)**
Tis	*Non applicable*	*Non applicable*
T1	≤ 1,00	a : sans (< 1/mm^2) b : avec (≥ 1/mm^2)
T2	1,01 - 2,00	a : sans b : avec
T3	2,01 - 4,00	a : sans b : avec
T4	> 4,00	a : sans b : avec

N- Adénopathies régionales		
Classification	**Nombres de ganglions envahis**	**Invasion métastatique**
N0	0	*Non applicable*
N1	1	a : micrométastases b : macrométastases
N2	2-3	a : micrométastases b : macrométastases
N3	≥ 4 ou métastases cutanées en transit avec ganglions atteints	a : micrométastases b : macrométastases c : métastases cutanées en transit sans ganglions atteints

M- Métastases		
Classification	**Site des métastases**	**LDH (Lactate Déshydrogénase) sérique**
M0	Pas de métastases à distance	*Non applicable*
M1a	Métastases cutanées / sous-cutanées à distance / ganglions à distance	Normal
M1b	Métastases pulmonaires	Normal
M1c	Autres localisations viscérales Toutes localisations	Normal Élevé

Tableau 1. Classification TNM du mélanome (adaptée de la 7éme édition du «TNM classification» par l'UICC et l'AJCC, 2009) [36].

A partir de cette classification de l'UICC et de l'AJCC, une stadification (ou classification du stade) de l'extension du mélanome a été définie utilisant ces mêmes paramètres. Celle-ci est présentée dans le Tableau 2.

	Tumeur primitive	Adénopathies régionales	Métastases
		Stade I	
Stade I A	T1a	N0	M0
Stade I B	T1b ou T2a	N0	M0
		Stade II	
Stade II A	T2b ou T3a	N0	M0
Stade II B	T3b ou T4a	N0	M0
Stade II C	T4b	N0	M0
		Stade III	
Stade III A	T1 à T4a	N1a ou N2a	M0
Stade III B	T1 à T4b	N1a ou N2a	M0
	T1 à T4a	N1b ou N2b	M0
	T1 à T4a ou T4b	N2c	M0
Stade III C	T1 à T4b	N1b ou N2b	M0
	Tout T	N3	M0
		Stade IV	
Stade IV	Tout T	Tout N	M1

Tableau 2. Stadification TNM du mélanome (adaptée de la 7éme édition du «TNM classification» par l'UICC et l'AJCC, 2009) [36].

Selon la Haute Autorité de Santé (HAS), la classification en stades peut être simplifiée comme cela [18] (Figure 7):

- Stades I et II : mélanomes localisés ; avec ou sans ulcération. Il n'y a ni ganglions lymphatiques atteints, ni métastase en transit, ni métastase à distance.

- Stade III : mélanomes avec métastases locorégionales cutanées ou ganglionnaires ; avec ou sans ulcération.
- Stade IV : mélanomes avec métastases à distance.

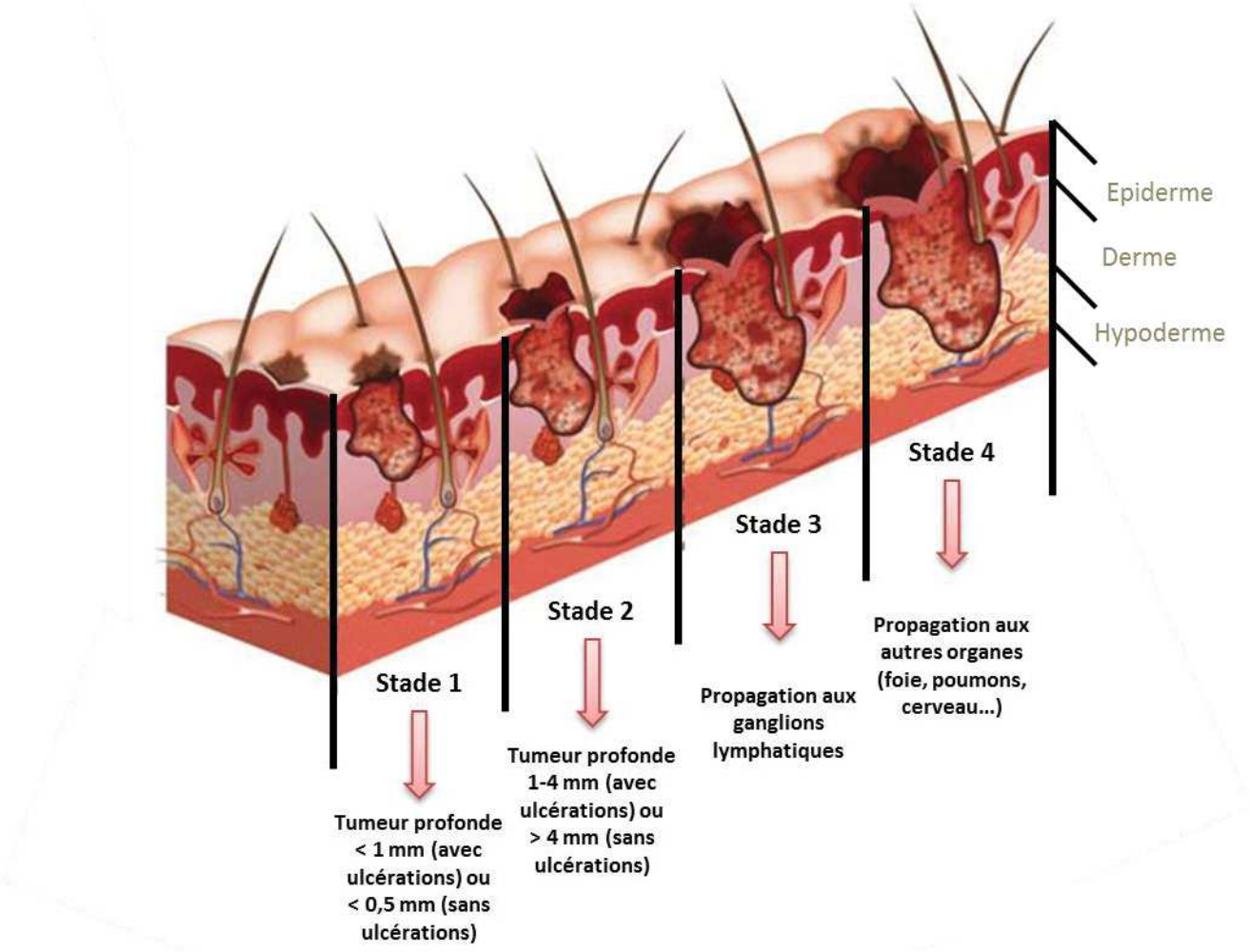


Figure 7. Les différents stades du mélanome selon la profondeur de la lésion. Adapté de *dyersburg skin and allergy clinic* [37].

II - Physiopathologie et voies de signalisation impliquées

Le domaine de la génétique du mélanome évolue au rythme des progrès technologiques, tels que le criblage génomique, le séquençage du génome entier de l'ADN tumoral et les méthodes d'étude de l'expression génomique. Ces avancées apporteront de nouvelles perspectives sur les moteurs moléculaires et les nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Actuellement, on distingue 3 voies de signalisation particulièrement impliquées dans l'apparition du mélanome : la voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), la voie de la PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) et la voie de l'AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique) (Figure 8) [38,39]. D'autres voies secondaires semblent également être impliquées. De par leurs rôles protecteurs vis-à-vis des agressions du milieu extérieur, les mélanocytes se montrent relativement insensibles à l'apoptose. De ce fait, le mélanome cutané possède intrinsèquement une résistance à la chimiothérapie [40]. Cela se matérialise par une surexpression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-XL, MITF et MCL-1 [41] et une sous-expression de protéines pro-apoptotiques telles que BAX et BAK (Figure 8.) [42,43].

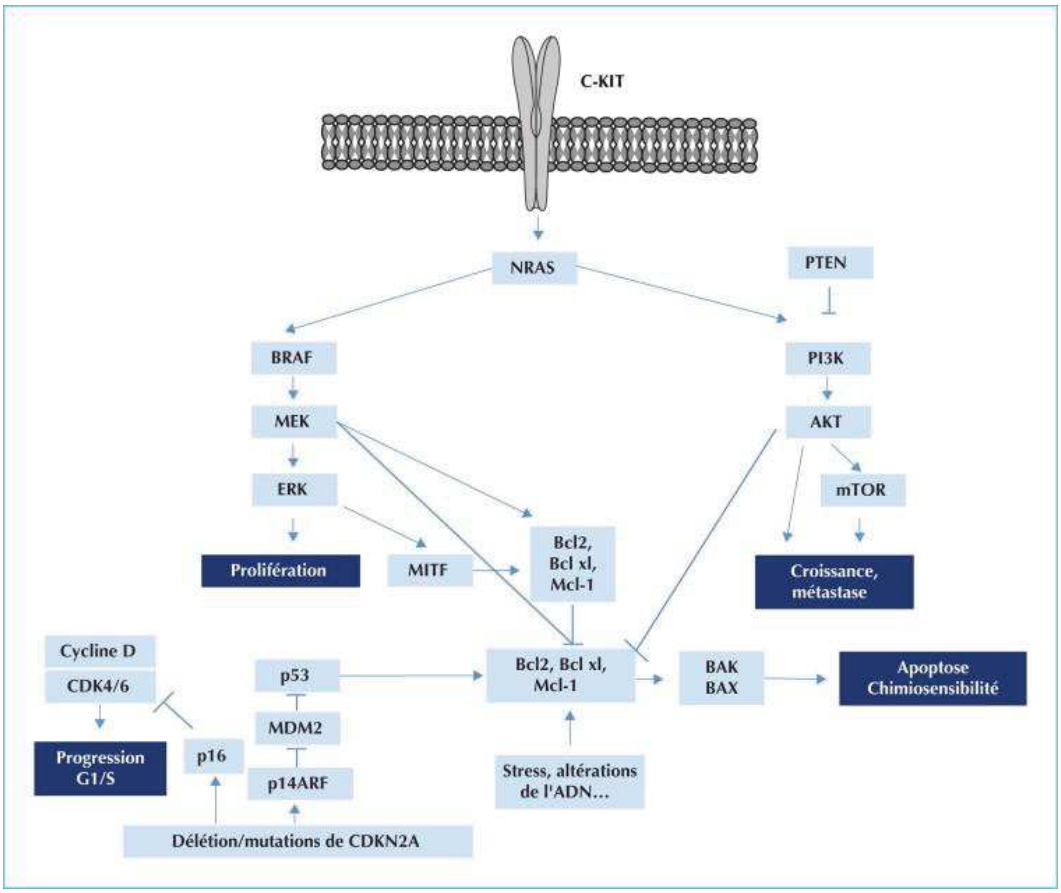


Figure 8. Principales voies de signalisation impliquées dans le développement du mélanome cutané [39].

Des altérations génétiques liées à ces différentes voies de signalisation ont également été mises en évidence. Les plus fréquentes sont répertoriées dans le Tableau 3.

Type de gènes et altérations	Gène	Fréquence de mutation dans le mélanome cutané
Amplification de proto-oncogènes	**c-KIT**	28-39 % [44]
	NRAS	15-30 % [45]
	BRAF	50-66 % [46]
	AKT3	43-60 % [47]
	MITF	10-16 % [48]
	Cyclin D1	6-44 % [49]
Inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs	**PTEN**	38-58 % [50]
	CDKN2A	30-70 % [51]
	P53	~10 % [52]
	APAF-1	~40 % [53]

Tableau 3. Altérations génétiques retrouvées dans le mélanome cutané [54].

II - 1. La voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

La voie des MAPK joue un rôle important dans la régulation de plusieurs mécanismes physiologiques comme la croissance, la survie et la différenciation cellulaire des mélanocytes (Figure 9) [55]. Lorsque celle-ci est perturbée, elle peut être à l'origine de processus de cancérisation par perturbation de sa régulation [56]. En effet, une activation constitutive de cette voie due à une mutation dans l'une des protéines en aval est fréquemment associée à l'apparition d'un mélanome [57].

L'activation de la voie des MAPK est initiée par la fixation de ligands particuliers appelés facteurs de croissance (FC) sur des récepteurs membranaires tyrosine kinase (RTKs) présents à la surface de la membrane cytoplasmique. Ces récepteurs possèdent une partie extracellulaire composée d'un domaine amino-terminal capable de fixer le ligand et un domaine carboxy-terminal à l'origine de l'activité enzymatique de phosphorylation des résidus tyrosine. Parmi les RTKs, on retrouve plus fréquemment c-KIT, l'EGFR (*Epidermal*

Growth Factor Receptor) et le VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) [58]. Des mutations oncogéniques de c-KIT ont été mises en évidence dans certains types de mélanome [44]. Lorsque le ligand se fixe sur le récepteur celui-ci passe sous la forme activée. Cela va correspondre à l'autophosphorylation de résidus tyrosine au sein de son domaine intracellulaire qui vont servir de site de liaison pour des protéines adaptatrices à l'origine de différentes voies de signalisation telles que les voies MAPK et PI3K [59].

L'activation du récepteur va provoquer la fixation d'un complexe protéique Shc/Grb2/SOS sur une protéine GTPase appelée RAS. Cette protéine va alors fixer le GTP (Guanine Triphosphate) à la place du GDP (Guanine Diphosphate) et être ainsi sous sa forme activée [60]. Il existe 3 protéines RAS : NRAS, HRAS et KRAS. Elles sont capables de lier différentes protéines effectrices comme RAF, PI3K et Phospholipase Cε [61]. Des mutations sur le gène RAS sont retrouvées dans 15-30 % des mélanomes (principalement sur le codon 61 de NRAS) à l'origine d'une activation constitutive de la voie MAPK par liaison permanente de RAS au GTP [45].

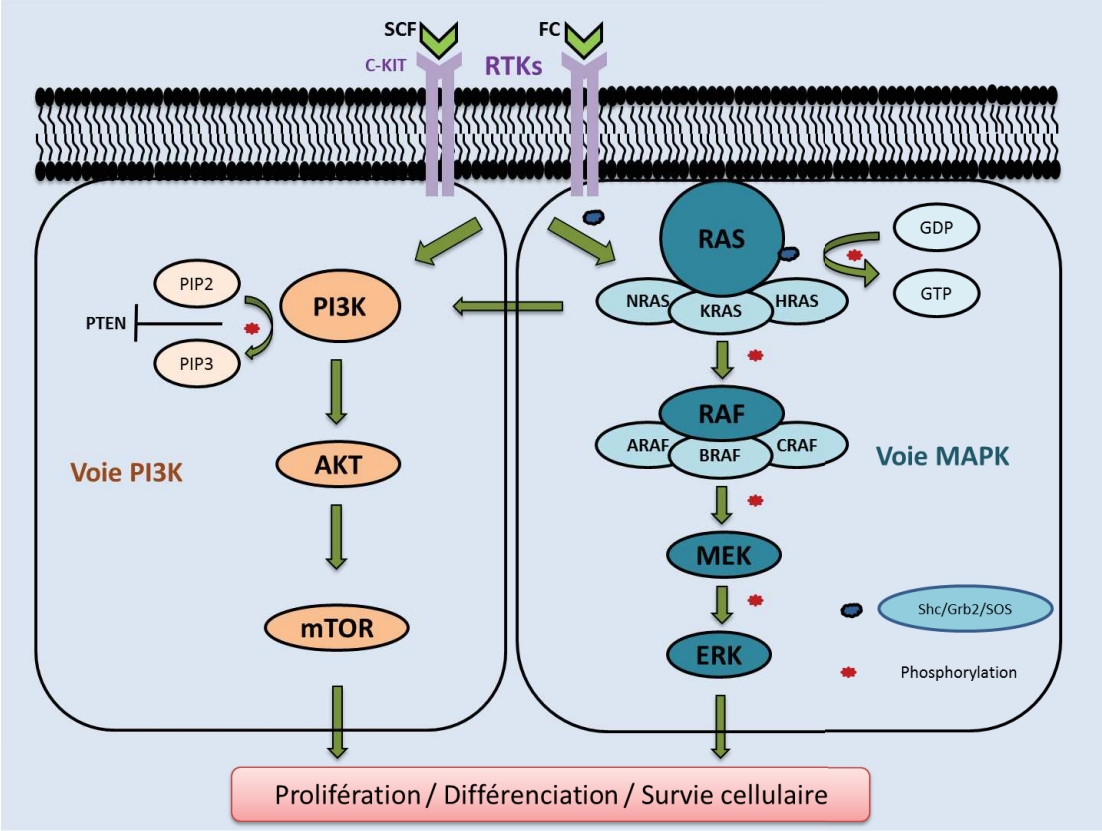


Figure 9. La voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) et la voie de PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) impliquées dans l'apparition du mélanome cutané [38,57].

Les protéines RAS actives vont permettre le recrutement au niveau de la membrane plasmique de protéines effectrices appartenant à la famille des protéines RAF. Il s'agit de sérine/thréonine kinases dont il existe 3 sous-types : ARAF, BRAF et CRAF. Les protéines RAF activées par RAS vont également phosphoryler (et donc activer) une autre protéine appelée MEK (MAPK/ERK Kinase) en aval de cette voie de signalisation [62]. MEK va à son tour être capable de phosphoryler une autre kinase dénommée ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) qui sera susceptible de réguler l'expression de certains gènes après translocation dans le noyau. Cette régulation se fait *via* la phosphorylation des facteurs de transcription impliqués dans divers mécanismes physiologiques tels que la prolifération, la différenciation ou la survie cellulaire [63].

Des mutations du gène BRAF sont retrouvées dans 50 à 66 % des mélanomes malins [46]. Dans près de 80 % des cas, il s'agit de la substitution de la valine du codon 600 par un glutamate (mutation V600E) provoquant l'activation constitutive de la voie MAPK [64]. Cette activation est à l'origine de la stimulation de la survie cellulaire (et donc de la prolifération cellulaire) qui permet la croissance de la tumeur [65,66]. Par ailleurs, la mutation V600E (anciennement désignée comme V599E [67]) est également à l'origine d'une sécrétion autocrine de VEGF favorisant l'angiogenèse [68]. Il existe d'autres mutations moins fréquentes ; comme par exemple, la substitution du codon 600 par une lysine (V600K) ou par une arginine (V600R).

Des mutations des gènes BRAF (notamment V600E) et NRAS ont été observées dans des nævus bénins [69,70]. Par conséquent, les mutations de la voie des MAPK ne permettent pas d'expliquer à elles seules la transformation des mélanocytes en cellules cancéreuses. L'association de plusieurs mutations génétiques impliquant différentes voies de signalisation semblent plus cohérentes [71,72].

II - 2. La voie PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase)

La protéine PI3K est une kinase qui permet la phosphorylation du PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5 Phosphate) en PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5 Phosphate). Cette activation peut être due à une action directe de FC sur les RTKs ou indirecte par l'intermédiaire de la voie des MAPK (Figure 9). Il existe donc une interconnexion entre cette voie et la voie des MAPK par l'intermédiaire de la protéine RAS [73]. Le PI3P ainsi formé va fixer les domaines PH

(*Pleckstrin Homology*) de certaines protéines afin de réguler leurs activités et leurs localisations [74]. Les protéines effectrices de PI3K les plus fréquemment rencontrées sont les protéines kinases B (appelées PKB ou AKT). Les protéines AKT sont impliquées dans différents mécanismes physiologiques tels que la survie cellulaire, la croissance, la prolifération, l'angiogenèse, le métabolisme et la migration [75]. Les protéines AKT vont agir sur mTOR [76] (*mammalian Target Of Rapamycin*) qui est impliqué dans la traduction de certains ARNm afin de contrôler la croissance cellulaire, la prolifération et la survie [77]. La dérégulation de plusieurs éléments de la voie de signalisation au niveau de mTOR a été rapportée dans de nombreux types de cancers, en particulier dans le mélanome [78]. L'activation de la voie PI3K permet une protection vis-à-vis de l'apoptose et donc favorise la propagation des cellules tumorales. Dans 43 à 60 % des cas de mélanomes, l'activation constitutive de AKT3 (une des 3 isoformes de la protéine AKT) a été mise en évidence [47]. La protéine lipide phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog located on chromosome 10*) est capable de déphosphoryler le PIP3 en PIP2 permettant ainsi une régulation négative de la voie PI3K [79]. Dans 38 à 58 % de tumeurs primitives de mélanomes, une ou plusieurs mutations du gène PTEN ont été mises en évidence [50].

II - 3. La voie AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique)

Le récepteur de la mélanocortine 1 (MC1-R) qui appartient aux récepteurs couplés aux protéines G joue un rôle crucial dans le développement, la prolifération et la différenciation des mélanocytes [80]. L'activation du MC1-R par l'α-MSH (*α-mélanocyte stimulating hormone*) conduit à l'activation de la voie de signalisation de l'AMPc, principalement associée à la différenciation et à la production de pigments [81] (Figure 10). L'Adénylyl Cyclase (AC) permet la transformation d'ATP (Adénosine Triphosphate) en AMPc. L'AMPc ainsi produit va activer la Protéine Kinase A (PKA) qui activera alors le facteur de transcription CREB (*cAMP Responsive Element Binding Protein*) à l'origine de la synthèse de la protéine MITF (*MIcrophtalmia-associated Transcription Factor*) [82].

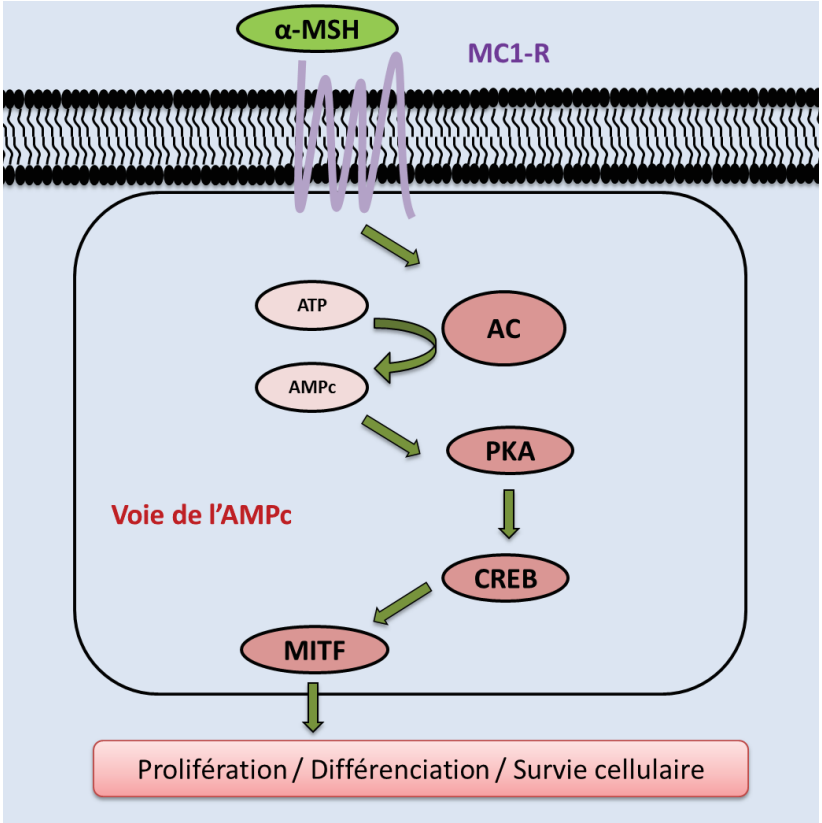


Figure 10. La voie de l'AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique) impliquée dans l'apparition du mélanome [38,57].

MITF agit en tant que régulateur du développement, de la fonction et de la survie des mélanocytes en modulant divers gènes de différenciation et de progression du cycle cellulaire [10,83]. Il a été démontré que le MITF est un oncogène amplifié dans certains cas de mélanomes (21 % dans les métastases et 10 % dans les tumeurs primaires) alors qu'il ne l'est pas dans les nævus [48]. Certains polymorphismes MC1R produisent une altération de la signalisation de l'AMPc et des phénotypes pigmentaires qui sont habituellement associés à un risque plus élevé de développement du mélanome [84]. Malgré son importance dans la biologie des mélanocytes, le rôle de la signalisation de l'AMPc dans le mélanome cutané n'est pas encore totalement élucidé.

II - 4. Les autres voies potentiellement impliquées

II – 4-1. La voie Wnt (*Wingless-related integration site*)/bêta-caténine

La voie Wnt/β-caténine est impliquée dans diverses activités cellulaires (comme la détermination, la prolifération, la migration et la différenciation) lors du développement

embryonnaire et de l'homéostasie [85]. Cependant, la contribution effective de la voie Wnt/β-caténine dans la mélanogenèse des mélanocytes humains adultes n'a pas été entièrement élucidée. Il semble exister d'étroits liens entre les voies AMPc et Wnt/β-caténine dans les mélanocytes, suggérant que la β-caténine pourrait jouer un rôle clé dans la régulation physiologique de la mélanogenèse épidermique [86]. En effet, la stimulation de la mélanogenèse par l'α-MSH induit la phosphorylation et la stabilisation de la β-caténine. L'activation de la PKA par l'α-MSH atténue la glycogène synthase kinase-3β, qui régule la dégradation de la β-caténine, suggérant un mécanisme coordonné de stimulation de l'activité de la β-caténine. L'élévation de l'AMPc facilite la transactivation dépendante de la β-caténine de nombreux gènes cibles. La dérégulation de cette voie, avec accumulation intranucléaire de β-caténine, semble impliquée dans le processus de cancérisation des mélanocytes [87].

II – 4-2. La voie HGF/c-Met

Le c-Met (*tyrosine-protein kinase Met*) et son ligand HGF (*hepatocyte growth factor*) ont été associés à la formation de tumeurs et à la progression vers les métastases, le gène MET étant souvent surexprimé ou muté [88]. Ainsi, le c-Met est devenu une cible majeure pour le traitement du cancer et son inhibition est actuellement testée dans des essais cliniques [89]. La voie de signalisation HGF/c-Met avec ses composantes effectrices en aval (MAPK, PI3K-AKT et NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)) augmente la survie, la motilité et la prolifération cellulaire [88]. La dérégulation ou l'activation constitutive de cette voie est suspectée être à l'origine de la formation de nombreux cancers. En plus de son rôle en tant que moteur oncogène, les preuves croissantes impliquent MET comme un mécanisme commun de résistance aux thérapies ciblées [90].

II – 4-3. La voie cyclineD/CDK4

La voie cyclineD/CDK4 (*cyclin-dependent kinase*) est dérégulée dans 30-70 % des mélanomes cutanés et constitue donc une cible thérapeutique potentielle pour cette maladie [51]. L'inactivation du locus INK4a/ARF (ou CDKN2A pour *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) est un événement génétique commun et critique dans le développement du mélanome humain. Ce locus engage les voies suppresseurs de tumeurs Rb et p53 grâce à sa capacité à coder pour deux produits géniques distincts : p16INK4a et p14ARF [51]. L'activation par

phosphorylation de CDK4 a pour conséquence l'inhibition de la protéine du rétinoblastome menant à la transition du cycle cellulaire G1-S [91]. Ainsi, lorsque CDK4 est muté, p16INK4A ne peut pas inhiber l'activité de la kinase CDK4 entraînant la progression du cycle cellulaire [92]. CDK4 peut également phosphoryler directement d'autres protéines qui favorisent la progression du cycle cellulaire et inhibent à la fois la sénescence cellulaire et l'apoptose.

III - Traitements actuels, limites et perspectives

Le choix du traitement va dépendre de la localisation, du stade et du degré d'agressivité du mélanome. Pour les mélanomes localisés, le traitement de référence consiste en une exérèse chirurgicale [93]. Dans certains cas, une radiothérapie peut être mise en place. Dans les formes disséminées, l'exérèse chirurgicale des métastases est susceptible d'être proposée lorsqu'elles sont peu nombreuses. La chirurgie sera alors associée à une prise en charge médicamenteuse.

Depuis quelques années, les options médicamenteuses ont énormément évolué du fait du développement de nouveaux composés actifs sur le mélanome. Les options médicamenteuses seront envisagées pour les formes non résécables ou métastatiques. En plus des traitements issus de l'immunothérapie, de nouvelles thérapies ciblées ont émergé et ont reçu l'approbation des autorités de santé. La prise en charge a considérablement été modifiée en ce qui concerne certains populations de patients présentant des mutations caractéristiques ; notamment les patients dits « BRAF V600E » positif qui bénéficient de traitements spécifiques avec les anti-BRAF et les anti-MEK.

L'apparition de mécanisme de résistance laisse à penser que la prise en charge doit s'orienter nécessairement vers l'association de médicaments ayant des mécanismes d'actions différents et complémentaires. L'immunothérapie possède également de nouvelles options thérapeutiques avec la commercialisation de nouveaux anticorps récemment autorisés ; en particulier pour les patients ne présentant pas de mutations BRAF (dits BRAF sauvages ou BRAF « wild-type »). La chimiothérapie fait encore partie de l'arsenal thérapeutique en cas d'échec de l'immunothérapie ou des thérapies ciblées. Par ailleurs, il est à noter que les essais cliniques en cancérologie se répandent de plus en plus ; signe que les innovations thérapeutiques se multiplient. En 2015, parmi l'ensemble des patients atteints de cancer, près de 48 000 patients ont été inclus dans des essais cliniques en France ; ce qui correspond à une augmentation de 122 % par rapport à 2008.

III - 1. Exérèse chirurgicale

La chirurgie constitue la première étape de traitement pour la majorité des mélanomes. Elle a pour objectif l'exérèse totale de la tumeur primaire. Pour cela, le chirurgien retire l'ensemble de la tumeur ainsi qu'une zone environnante composée de tissu sain [93]. L'excision large est la procédure chirurgicale standard de première intention pour tous les stades du mélanome [18].

Les marges d'exérèse recommandées sont [94] :

- Pour une lésion *in situ* : 0,5 cm.
- Pour une lésion de 1 mm ou moins : 1 cm.
- Pour une lésion de 1 à 2 mm : 1 à 2 cm.
- Pour une lésion de 2 à 4 mm : 2 cm.
- Pour une lésion de plus de 4 mm : 2 à 3 cm.

Une marge d'exérèse supérieure à 3 cm n'a pas démontré d'intérêt thérapeutique [94]. L'examen anatomopathologique permettant le diagnostic sera alors réalisé sur la pièce opératoire [93]. Une biopsie du ganglion lymphatique sentinelle peut également être réalisée en même temps [95]. Les effets secondaires sont relativement rares ; la présence d'une cicatrice chéloïdienne étant la plus fréquente. Lorsque la quantité de tissu enlevée est trop importante, une greffe de peau peut être envisagée. Selon l'indice de Breslow de la lésion, une seconde opération (appelée reprise d'exérèse) est réalisée dans le but de s'assurer que l'ensemble des cellules cancéreuses a bien été éliminée et ainsi limiter le risque de récidive.

III - 2. Génotypage BRAF préalable aux traitements médicamenteux

Préalablement à la mise en place d'un traitement médicamenteux, un génotypage est systématiquement réalisé afin de rechercher une mutation de BRAF V600 [96]. Celui-ci peut être réalisé sur les tumeurs primitives, les ganglions de curage ou sur les métastases accessibles. Pour cela, les plateformes de génétique moléculaire se basent sur le programme d'assurance qualité mis en place par l'Institut National du Cancer [97]. Ce programme permet de garantir la qualité de réalisation des analyses de biologie moléculaire et d'optimiser la sélectivité et la spécificité de ces analyses [98,99]. Dans le cadre de l'accréditation COFRAC selon la norme ISO 15189 des laboratoires de biologie médicale, la

mise en place de ce programme sera obligatoire au 1er novembre 2020. Pour l'année 2016, les plateformes de génétique moléculaire ont réalisé plus de 120 000 analyses afin de guider les praticiens vers une prise en charge ciblée de plus de 74 000 patients en France, tous cancers confondus. Dans le cadre de la prise en charge du mélanome cutané, 5 583 recherches de mutations BRAF ont été recensées cette même année pour un pourcentage total d'altérations moléculaires de 37,2 % (Tableau 4). Les mutations NRAS et c-KIT ont été explorées chez 4 807 et 3 026 patients pour des résultats positifs dans respectivement 27,4 % et 3,7 % des cas.

Mutation recherchée	Nombre de patients	Pourcentage d'altérations moléculaires
BRAF	5583	37,2
NRAS	4807	27,4
c-KIT	3026	3,7

Tableau 4. Activité détaillée des plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers dans le mélanome cutané en 2016, d'après l'INCa [100].

Depuis la mise en place de ces génotypages en 2010, les activités des plateformes de génétique moléculaire sont en constante augmentation dans la prise en charge du mélanome cutané (Figure 11).

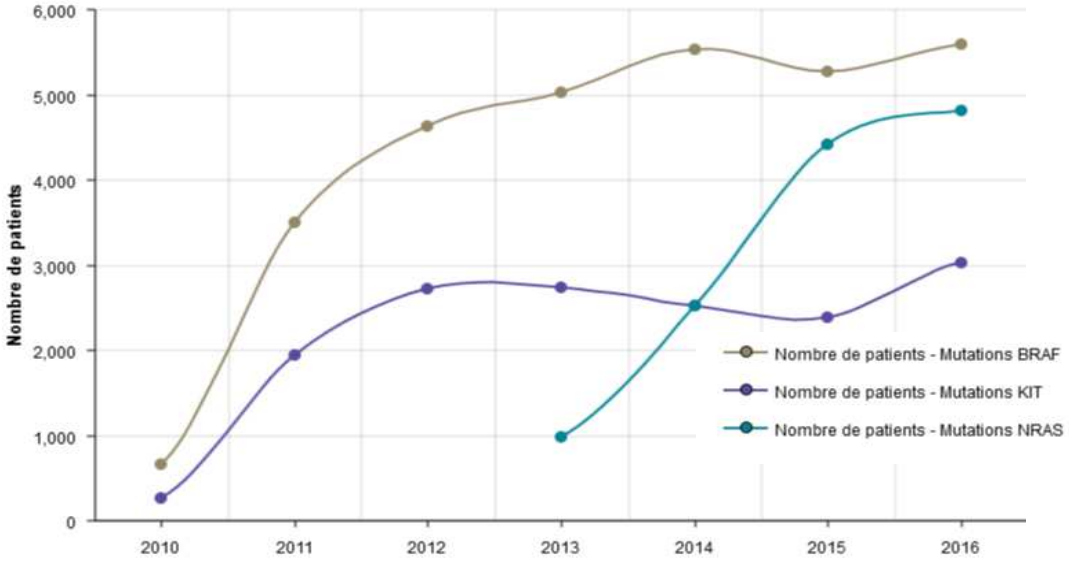


Figure 11. Evolution de l'activité de génétique somatique dans la prise en charge du mélanome cutané depuis 2010, d'après l'INCa (lesdonnees.e-cancer.fr) [100].

III - 3. Traitement médicamenteux

Le statut BRAF du patient va orienter la prise en charge médicamenteuse. Pour les patients BRAF muté, les thérapeutiques ciblées anti-BRAF et anti-MEK seront utilisées en première intention [101,102]. Dans le cas de patients BRAF sauvages, l'immunothérapie sera utilisée en première ligne. Pour ces patients ne présentant pas de mutation sur BRAF, la recherche d'autres anomalies moléculaires (mutations sur NRAS [103], c-KIT [104] ou autres) pourra être réalisée afin de favoriser l'inclusion dans des essais thérapeutiques.

L'arsenal thérapeutique disponible est constitué de :

- Immunothérapie
- Thérapies ciblées : anti-BRAF et anti-MEK
- Chimiothérapies cytotoxiques

L'INCa a publié en septembre 2017 un arbre décisionnel (Figure 12) afin d'aider les professionnels de santé à uniformiser la prise en charge des patients présentant une forme non résécable ou métastatique du mélanome.

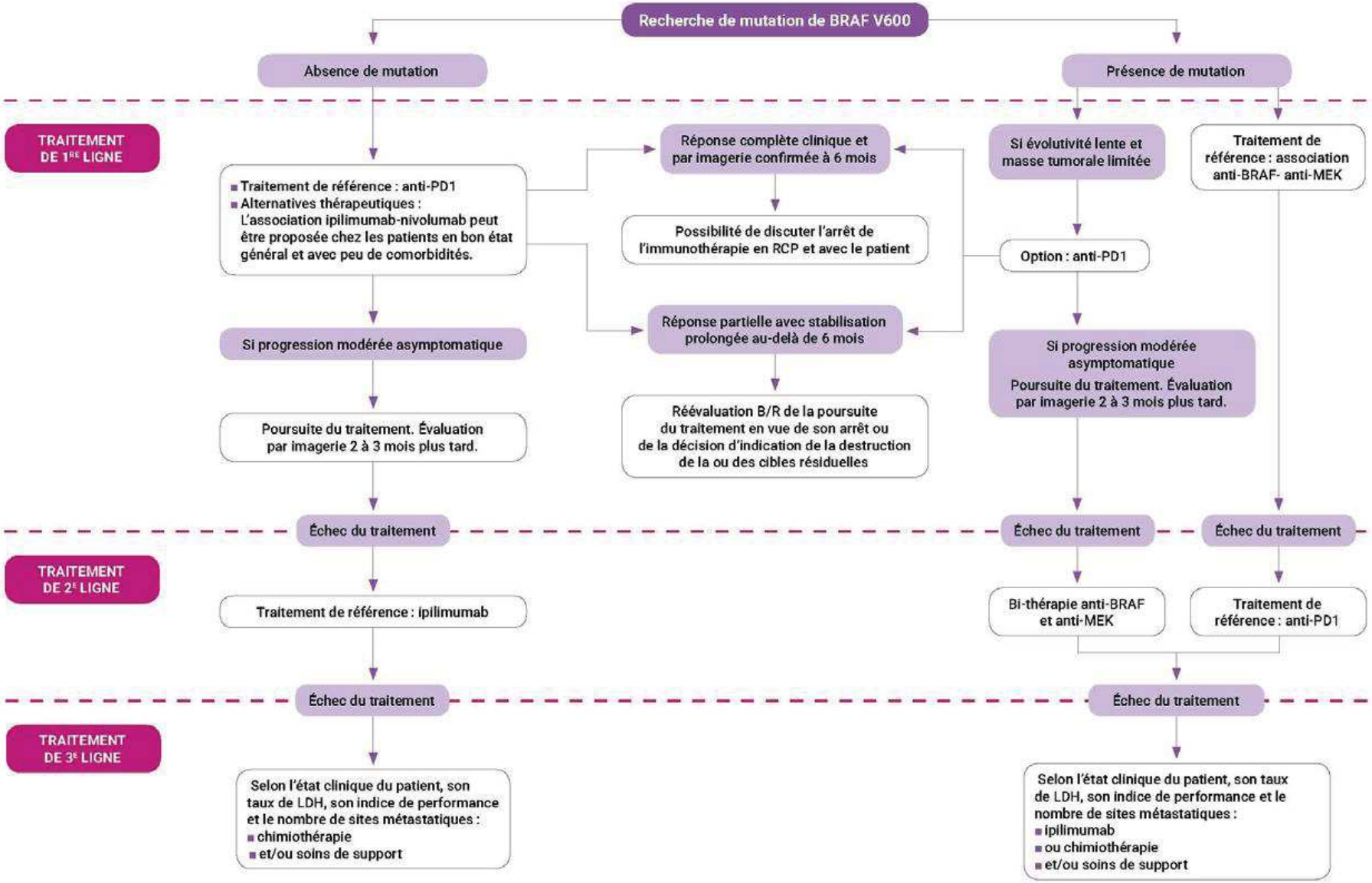


Figure 12. Arbre décisionnel des traitements systémiques de 1ère ligne, de 2ème ligne et de 3ème ligne des formes non résécables du mélanome cutané selon l'INCa [73,74].

III - 3. 1. Immunothérapie

Actuellement, trois anticorps monoclonaux sont disponibles pour traiter les formes non résécables ou métastatiques de mélanome cutané. Il s'agit d'un anticorps anti CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) dénommé ipilimumab et deux anticorps anti-PD1 (*Programmed cell death protein 1*) appelés pembrolizumab et nivolumab.

L'ipilimumab agit sur les lymphocytes T [105]. Il s'y fixe et bloque l'activité de CTLA-4, une protéine qui contrôle l'activité des cellules T. En bloquant CTLA-4, l'ipilimumab provoque l'activation et l'augmentation des cellules T, qui entrent dans les tumeurs et tuent les cellules tumorales [106] (Figure 13). Les cellules présentatrices d'antigènes interagissent avec les lymphocytes : les synapses immunologiques sont composées par des signaux d'activation (illustrés en jaune) et des signaux inhibiteurs comme CTLA4 (illustré en rouge).

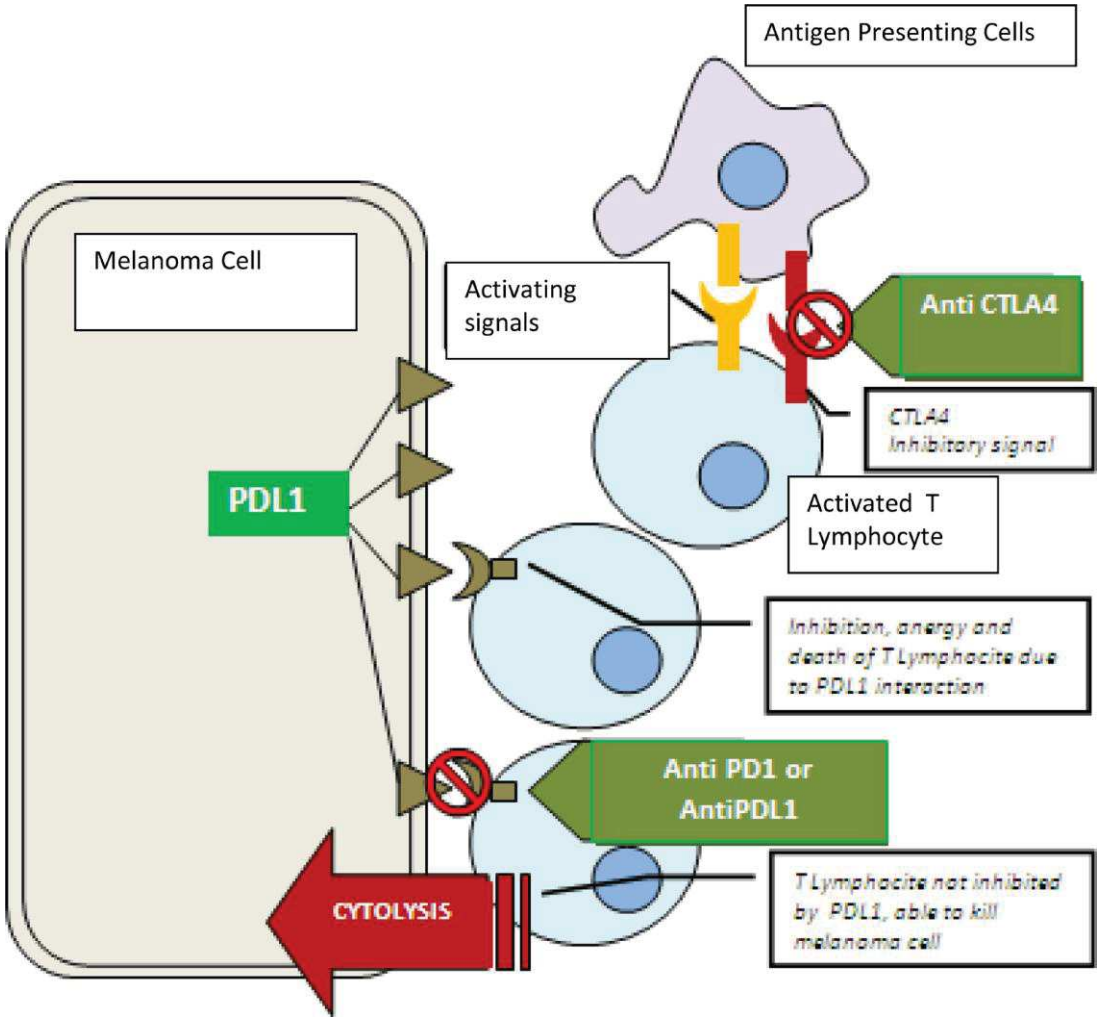


Figure 13. Mécanismes d'action des anticorps anti-CTLA4, des anti-PD1 et des anti-PDL1 [107].

Le nivolumab et le pembrolizumab s'attachent au récepteur PD1 qui se trouve sur les cellules T [108] (Figure 13). Les cellules cancéreuses peuvent produire des protéines PDL1 et PDL2 qui s'attachent à ce récepteur et désactivent l'activité des lymphocytes T ; les empêchant ainsi d'attaquer les cellules cancéreuses. En se fixant au récepteur, le nivolumab et le pembrolizumab empêchent PDL1 et PDL2 d'inactiver les cellules T, augmentant ainsi la capacité du système immunitaire à cibler les cellules cancéreuses [109]. Les lymphocytes activés migrent vers les cellules de mélanome. L'interaction entre PDL1 (exprimée par les cellules de mélanome) et PD1 (exprimée par les lymphocytes) provoque une anergie lymphocytaire. Les médicaments Anti-PD1 et Anti-PDL1 empêchent cette interaction. En 2011, l'ipilimumab a initialement reçu l'AMM pour le traitement de formes avancées de mélanome cutané ne présentant pas de mutation BRAF après échec d'une première thérapie par agent cytotoxique. En 2013, l'EMA (*European Medicines Agency*) a étendu cette AMM à l'utilisation en première ligne dans les formes avancées pour tous les statuts BRAF.

Par la suite, en 2015, le pembrolizumab et le nivolumab ont reçu l'approbation de l'EMA en monothérapie avec comme indication les formes avancées du mélanome cutané avec ou sans mutation BRAF. Les anticorps monoclonaux anti-PD1 ont présenté une nette amélioration de l'efficacité (en survie sans progression, en survie globale et en taux de réponse globale) et de la tolérance en comparaison à l'ipilimumab ou à la chimiothérapie [110–113]. L'EMA a ensuite autorisé l'association de l'ipilimumab au nivolumab du fait d'une augmentation de survie sans progression [114,115]. D'autres molécules issues de l'immunothérapie sont disponibles pour le traitement du mélanome cutané. Les noms des spécialités ainsi que les mécanismes d'action et les indications de l'ensemble de l'arsenal thérapeutique issu de l'immunothérapie sont résumés dans le Tableau 5.

Spécialité	Substance active	Mécanisme d'action	Indications
Imlygic®	**Talimogene laherparepvec**	Mécanisme d'action exact inconnu. Virus de l'herpès oncolytique vivant capable de produire une protéine immunostimulatrice appelée GM-CSF.	Traitement local des lésions cutanées, sous-cutanées et nodales non résécables, chez les patients présentant un mélanome récurrent après la chirurgie initiale.
IntronA®	**Interferon alfa-2b**	Mécanisme d'action exact inconnu. Protéine naturelle qui stimule le système immunitaire. Limite l'angiogenèse et combat directement la croissance tumorale	Stade III : en adjuvant post-chirurgie si risque élevé de récidive. Possible chez stade IIB tardif ou stade IIC (avec lésions d'épaisseur Breslow > 4mm).
Sylatron® ViraferonPeg®	**Peginterferon alfa-2b**		
Keytruda®	**Pembrolizumab**	Anticorps monoclonaux humanisés, inhibiteurs de PD1. Blocage de la liaison de PD1 aux ligands PDL1 et PDL2. Potentialisation de la réponse immunitaire anti-tumorale	Stade III non résécable ou présentant une atteinte des ganglions lymphatiques. Stade IV.
Opdivo®	**Nivolumab**		
Proleukine / IL-2	**Interleukine-2**	Forme recombinante d'interleukine-2. Activation système immunitaire (notamment cellules T et cellules tueuses naturelles)	Forme métastatique avancée
Yervoy®	**Ipilimumab**	Anticorps monoclonal humanisé anti-CTLA-4. Augmentation de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T.	Stade III. Stade IV.
Combinaison Opdivo® / Yervoy®	Combinaison **Nivolumab / Ipilimumab**	Anticorps monoclonaux humanisés, inhibiteurs de PD-1 / Anticorps monoclonal humanisé anti-CTLA-4.	Stade III non résécable. Stade IV.

Tableau 5. Récapitulatif des traitements médicamenteux d'immunothérapies autorisés par la FDA [116] et l'EMA [117] avec indications mélanome.

III - 3. 2. Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées sont utilisées en première intention en cas de présence de mutation BRAF chez des patients atteints de formes non résécables ou métastasiques de mélanome cutané. L'arsenal thérapeutique est composé de deux monothérapies anti-BRAF et de deux associations anti-BRAF et anti-MEK. Parmi les anti-BRAF, on trouve le vémurafénib et le dabrafénib. Ces molécules sont des inhibiteurs spécifiques de la protéine mutée BRAF V600E qui agissent en se fixant sur la forme mutée de la protéine impliquée dans le processus cancéreux du mélanome en permettant une division incontrôlée des cellules tumorales (Figure 14) [118,119]. Historiquement, le vémurafénib a été la première molécule autorisée par l'EMA en 2012 avec comme indication une monothérapie ciblée dans les mélanomes cutanés de formes avancées. Le dabrafénib a reçu son AMM l'année suivante. Ces monothérapies ont démontré une très grande efficacité en comparaison avec la chimiothérapie par dacarbazine; alors traitement de référence [120,121]. Le premier inhibiteur de BRAF testé en clinique était le sorafénib. Cette molécule a démontré une efficacité intéressante sur des modèles précliniques [65] mais les essais cliniques ont mis en évidence une importante toxicité due à un manque de sélectivité d'action sur les kinases impliquées dans le développement cancéreux [122,123].

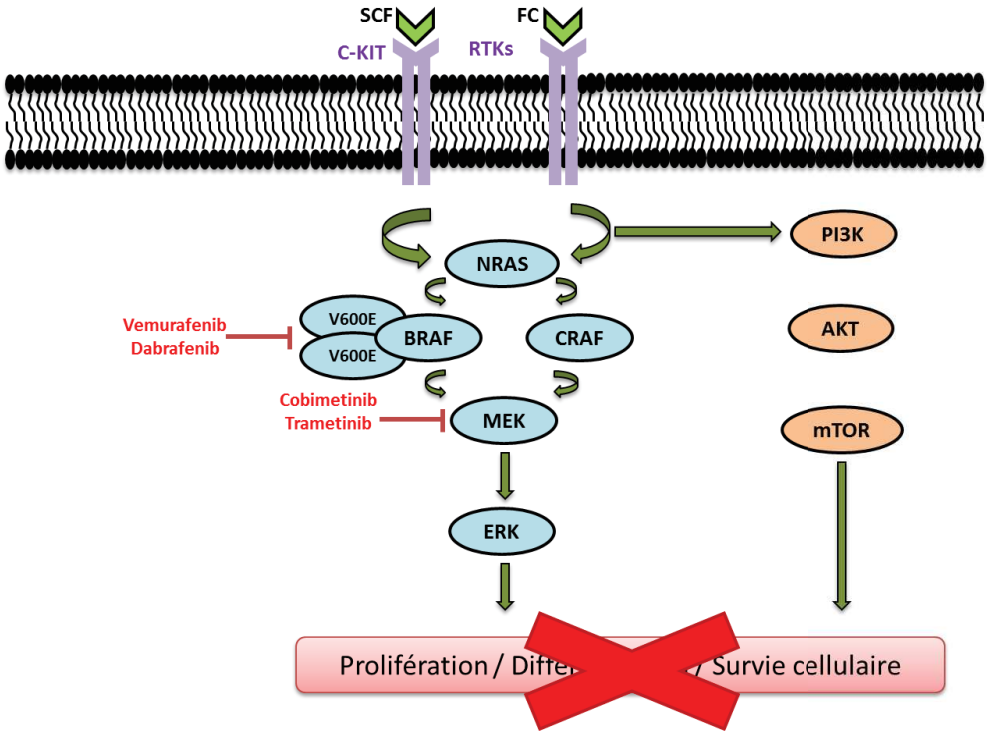


Figure 14. Mécanismes d'action des anti-BRAF et des anti-MEK dans la voie des MAPK impliquées dans l'apparition du mélanome.

Les anti-MEK agissent en bloquant directement la protéine MEK et en empêchant son activation par la forme anormale de BRAF, ralentissant ainsi la croissance et la propagation du processus cancéreux [124]. Ils appartiennent à la famille des inhibiteurs de tyrosine kinases. Les deux molécules à avoir obtenu l'AMM dans les formes avancées de mélanome cutané sont le cobimétinib et le tramétinib. Les premiers inhibiteurs de MEK n'avaient pas montré d'efficacité significative de par leurs toxicités [125]; ce qui n'est pas le cas pour le cobimétinib et le tramétinib. Actuellement, les recommandations préconisent l'utilisation de combinaison des anti-BRAF avec les anti-MEK (Figure 15). En effet, les associations vémurafénib + cobimétinib et dabrafénib + tramétinib ont montré une amélioration de la survie sans récidive et des taux de réponses plus importants par rapport à des monothérapies anti-BRAF, respectivement par vémurafénib et par dabrafénib [126–128].

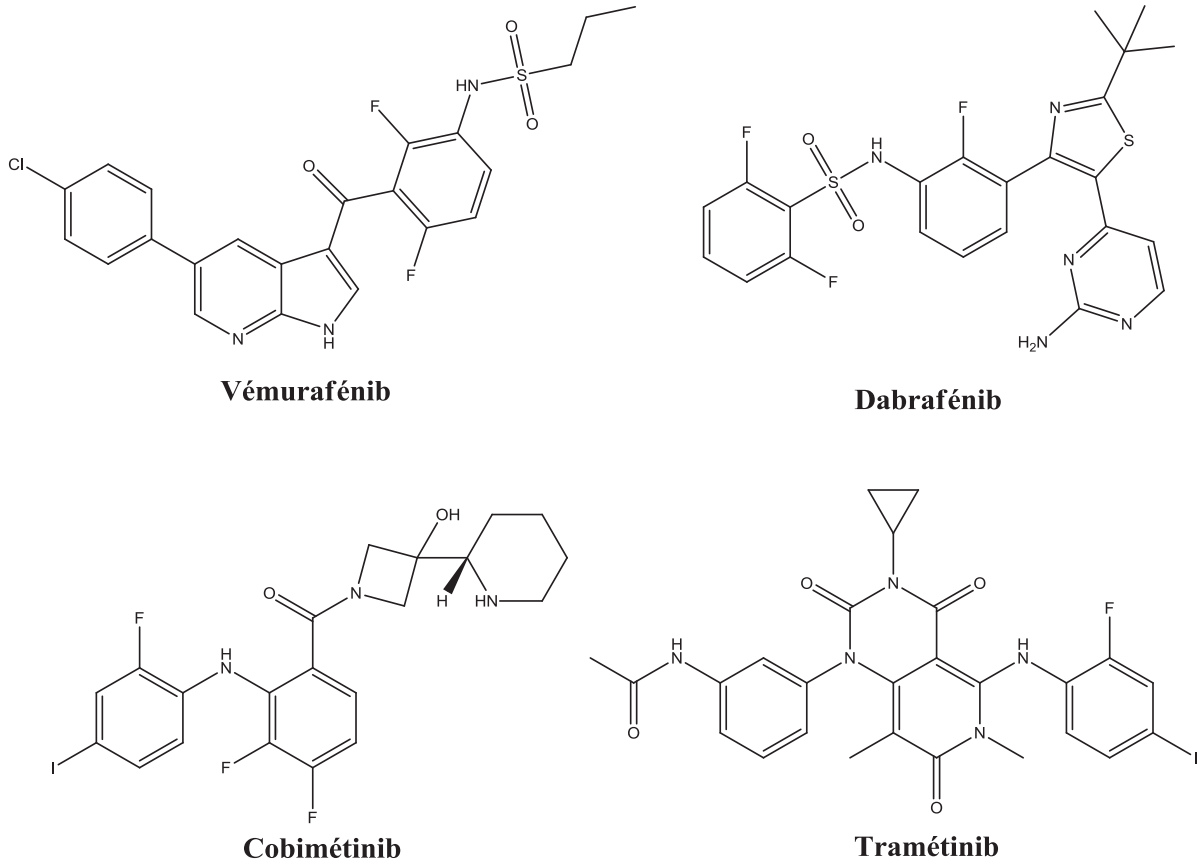


Figure 15. Structures chimiques des anti-BRAF et des anti-MEK indiqués dans les formes avancées de mélanome cutané.

Les noms des spécialités ainsi que les mécanismes d'action et les indications de l'arsenal thérapeutique issu des thérapies ciblées sont résumés dans le Tableau 6.

Spécialité	Substance active	Mécanisme d'action	Indications
Zelboraf® Tafinlar®	**Vémurafénib** **Dabrafénib**	Inhibiteur de la kinase qui bloque l'activité de la forme BRAF mutée V600E	Génotypage préalable à la recherche de la mutation V600E sur le gène BRAF. Stade III non résécable. Stade IV.
Mekinist®	**Tramétinib**	Inhibiteur de la kinase qui bloque l'activité de la forme mutée BRAF V600E ou V600K	Génotypage préalable à la recherche des mutations V600E et V600K sur le gène BRAF. Stade III non résécable. Stade IV. Non utilisable après un premier traitement par un autre inhibiteur de BRAF
Cotellic®	**Cobimétinib**	Inhibiteur qui bloque l'activité d'une enzyme appelée MEK	Génotypage préalable à la recherche des mutations V600E et V600K sur le gène BRAF. Stade III non résécable. Stade IV.
Combinaison Cotellic® + Zelboraf ®	Cobimétinib + Vémurafénib	Combinaison anti-BRAF + anti-MEK	Génotypage préalable à la recherche de la mutation V600E sur le gène BRAF. Stade III non résécable. Stade IV.
Combinaison Mekinist ® + Tafinlar®	Tramétinib + Dabrafénib		

Tableau 6. Récapitulatif des traitements médicamenteux issus des thérapies ciblées autorisés par la FDA [116] et l'EMA [117] avec indications mélanome.

III - 3. 3. Chimiothérapies cytotoxiques

Les chimiothérapies cytotoxiques ont constitué pendant longtemps les seuls traitements utilisables pour les formes avancées de mélanome cutané. Leurs faibles spécificités ne permettent pas d'obtenir une efficacité importante d'autant plus que les effets indésirables sont nombreux et difficilement supportables pour les patients [129].

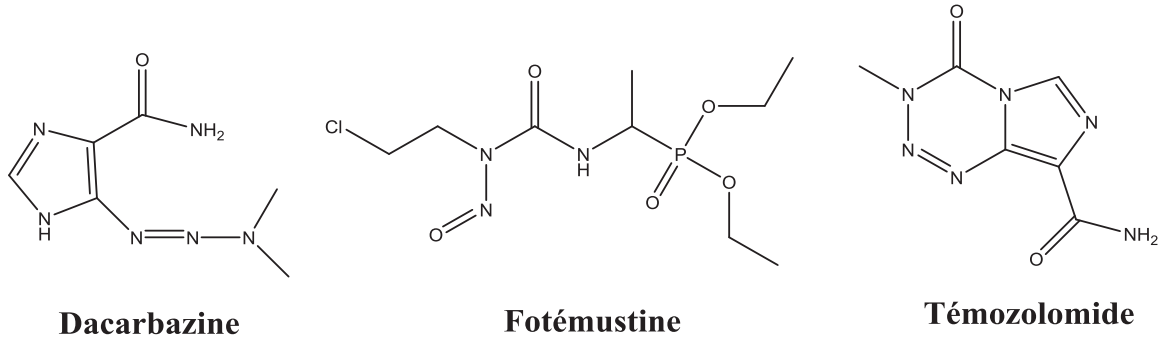


Figure 16. Structures chimiques de la dacarbazine et du témozolomide utilisés en monothérapies dans les formes métastasiques du mélanome cutané.

La dacarbazine est la molécule la plus utilisée parmi les chimiothérapies cytotoxiques. Actuellement, elle est indiquée en 2ème ou 3ème intention dans les formes métastatiques après échec des traitements ciblées et des immunothérapies. Elle agit comme agent antinéoplasique cytostatique, par analogie structurale avec le 5-amino-4-imidazolecarboxamide (Figure 16). La dacarbazine est sous forme inactive, mais après N-déméthylation par les microsomes hépatiques, elle libère l'ion méthyldiazonium (le diazométhane), lui-même agent alkylant. Ses nombreux effets indésirables limitent son utilisation à des cas restreints [130]. Pour les formes présentant des métastases cérébrales, la fotémustine ou le témozolomide peuvent être utilisés (avec une utilisation hors AMM pour le témozolomide). La fotémustine est une nitroso-urée présentant une forte lipophilie permettant le passage de la barrière hémato-encéphalique. Cette caractéristique explique son utilisation en cas d'atteinte cérébrale. D'autres dérivés nitroso-urées ont reçu l'AMM pour le mélanome cutané mais ne sont que très peu utilisés en pratique. Il s'agit de la carmustine (BICNU®) et de la lomustine (Belustine®).

Les polychimiothérapies (notamment à base de taxoïdes et de platine) sont parfois utilisées bien qu'elles n'aient pas démontré d'amélioration de l'efficacité malgré une augmentation de la toxicité [131,132].

III - 3. 4. Radiothérapie

La radiothérapie est rarement utilisée pour le mélanome cutané, malgré des recherches suggérant des avantages dans certains scénarios cliniques [133]. Mis à part dans le cadre de soins palliatifs, le rôle de la radiothérapie pour le mélanome avancé est limité. Cependant, dans le cadre d'un traitement adjuvant, le rayonnement postopératoire peut améliorer le contrôle de la maladie locorégionale. La radiochirurgie stéréotaxique joue un rôle essentiel dans le traitement des métastases cérébrales et extracrâniennes [134]. La stéréotaxie est une technique utilisée en neurochirurgie afin d'atteindre des zones cérébrales avec une grande précision. Elle se base sur l'utilisation d'imagerie médicale (IRM, tomodensitométrie, et radiographie) pour matérialiser dans l'espace le corps des patients. L'utilisation en conditions stéréotaxiques permet de contourner la résistance à la radiothérapie en condition classique et ainsi obtenir des résultats prolongés. Cependant, la radiothérapie panencéphalique présente une efficacité limitée compte tenu des risques non négligeables sur le tissu sain pouvant provoquer des atteintes des fonctions cognitives [135].

III - 4. Mécanismes de résistance

La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance du mélanome cutané aux traitements médicamenteux est un grand défi. Relever ce défi est essentiel pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces. On distingue deux types de résistances : la résistance *de novo* ou primaire qui se manifeste par l'absence de réponse dès la mise en place du traitement et la résistance acquise qui se manifeste par un échappement de la maladie après une première réponse positive au traitement

III - 4. 1. Mécanismes principaux de résistance aux traitements médicamenteux

La résistance acquise aux différents traitements médicamenteux représente la principale cause de l'échec de ces traitements anticancéreux. De nombreux mécanismes ont été référencés. Parmi les plus fréquents, on dénombre :

- la modification biologique de la cible thérapeutique visée par le médicament,

- l'augmentation de l'élimination du médicament,
- la prolifération des cellules cancéreuses *via* d'autres voies de signalisation qui contournent la cible thérapeutique visée,
- la diminution de la pénétration cellulaire du médicament,
- l'augmentation du nombre de cibles visées,
- l'altération de la sensibilité à l'apoptose des cellules cancéreuses [40],
- l'augmentation de l'efflux extra-cellulaire [136],
- la surexpression de protéines membranaires…

III - 4. 2. Cas particuliers de la résistance aux thérapies ciblées

La résistance primaire aux inhibiteurs de BRAF et de MEK est rare et survient chez moins de 10 % des patients atteints de mélanome cutané avec mutation BRAF [119]. A l'inverse, la résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF est presque universelle et la plupart des patients développe une résistance au cours de la première année de traitement [137,138]. La résistance aux inhibiteurs de MEK a également été documentée dans des essais cliniques [137]. Environ 70 % des patients atteints de mélanome cutané avec mutation BRAF ont eu une progression de la maladie dans l'année suivant le début du traitement par trametinib en monothérapie. Par ailleurs, plus de 80 % des patients pour lesquels un traitement par inhibiteur de BRAF échoue ne répondent pas aux inhibiteurs de MEK [139]; ce qui suggère l'existence de mécanismes de résistance croisée BRAF et MEK ou l'émergence rapide de mécanismes de résistance supplémentaires. Parmi les mécanismes de cette résistance, on trouve notamment l'amplification de la cible, l'expression de protéines kinases alternatives ou encore des mutations sur la protéine MEK (Figure 17).

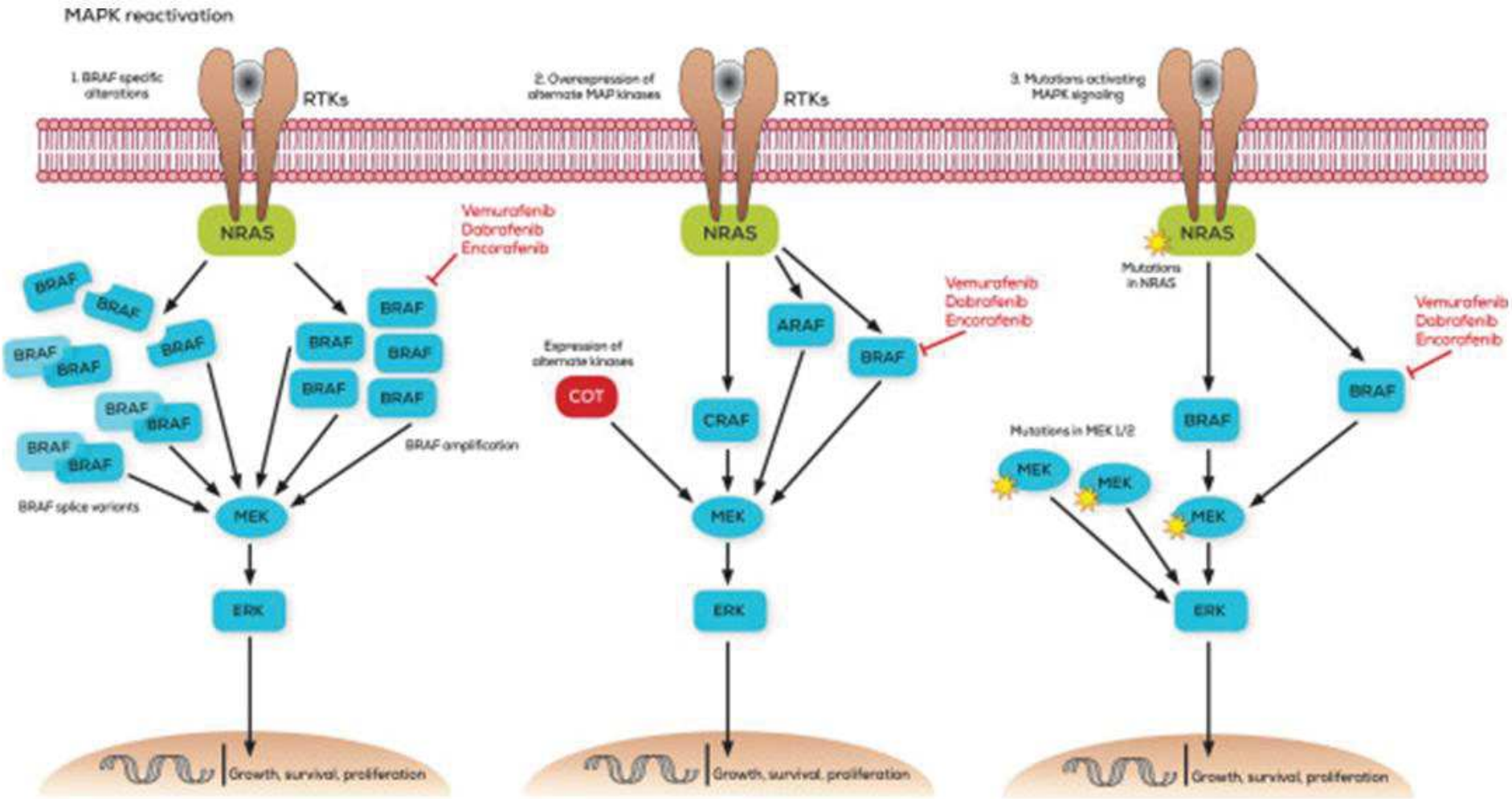


Figure 17. Exemples de mécanismes de résistance de la voie MAPK dans le mélanome cutané : 1) amplification de la cible 2) expression de protéines kinases alternatives 3) mutations sur la protéine MEK [140].

III - 5. Perspectives de traitements

Malgré la mise sur le marché de nouveaux traitements ces dernières années, les rémissions de longue durée dans le mélanome cutané restent rares. Les nombreuses résistances primaires ou acquises développées par les patients dans le cadre d'un traitement obligent l'industrie pharmaceutique à développer de nouveaux composés, de nouvelles combinaisons ou de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'interconnexion des différentes voies de signalisations impliquées dans l'apparition du mélanome cutané suggére l'utilisation de combinaisons de traitements ayant des mécanismes d'actions distincts mais complémentaires. A l'heure actuelle, la prise en charge des patients mutés BRAF V600E passe forcément par une association anti-BRAF et anti-MEK. Les résistances à cette association sont nombreuses et les solutions pour y remédier sont inexistantes. Par ailleurs, pour les patients naïfs vis-à-vis de cette mutation, il est également primordial de développer de nouvelles molécules actives. Afin d'élargir l'arsenal thérapeutique, les connaissances sur les différentes voies de signalisation impliquées doivent être élargies. Plusieurs pistes sont actuellement développées dans le cadre d'essais cliniques.

III - 5. 1. Nouvelles associations thérapies ciblées et immunothérapie

Le développement d'association entre les anti-BRAF et les anti-MEK d'un côté et l'ipilimumab et les anti-PD1 (le nivolumab notamment) d'un autre côté a permis d'augmenter significativement l'efficacité de la prise en charge. En effet, une monothérapie par anti-BRAF présente une efficacité de l'ordre de 50 % alors qu'une association anti-BRAF et anti-MEK permet une efficacité de 65-70 % [141]. De même, une monothérapie par ipilimumab ou par un anti-PD1 permet d'obtenir une efficacité de 10 et 25 à 45 %, respectivement. Une association Ipilimumab et anti-PD1 est plus efficace puisque plus de 60 % des patients sont répondeurs. Par conséquent, une association anti-BRAF, anti-MEK, Ipilimumab et anti-PD1 pourrait permettre d'augmenter encore l'efficacité de la prise en charge (Figure 18).

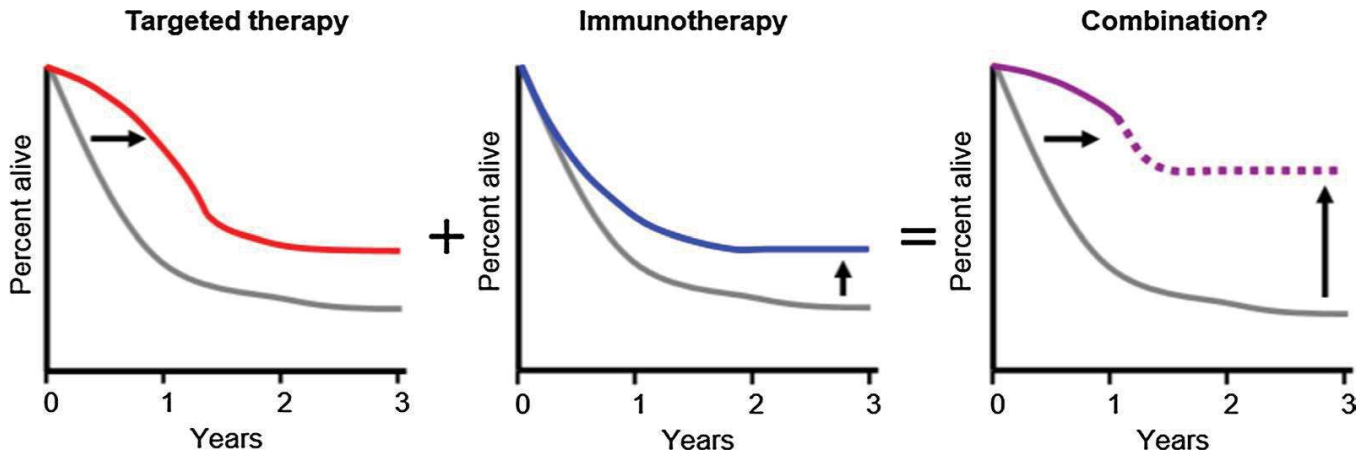


Figure 18. La combinaison association bithérapies ciblées et bi-immunothérapies comme perspectives de prises en charge du mélanome cutané [141].

Afin de mettre en évidence une synergie d'action entre les thérapies ciblées et les traitements issus de l'immunothérapie, différentes études cliniques sont prévues en 2018 et en 2019. Une première étude de phase I a été réalisée associant l'iplimumab au vémurafénib (essai clinique NCT01400451). Celle-ci a dû être arrêtée prématurément en raison d'une hépatotoxicité [142]. Une seconde étude préclinique associant l'ipilimumab, le dabrafénib et le trametinib a également été suspendue après le développement de colites avec perforation colique développées par plus d'un quart des sujets [143]. Les inhibiteurs de checkpoint PD-1 / PD-L1 sont associés à des toxicités moins sévères que les anti-CTLA-4 [144], ce qui en fait de meilleurs candidats pour explorer les associations avec des thérapies ciblées. Les études précliniques de combinaison thérapies ciblées et immunothérapie en cours ou à venir sont résumées dans le Tableau 7.

Etude	Phase	Statut	Traitement	Stratégie
NCT01400451	I	Terminée en raison des toxicités limitant la dose	Ipilimumab Vémurafénib	Anti-CTLA-4 + BRAFi
NCT01767454	I	Terminée	Ipilimumab Dabrafénib +/- Tramétinib	Anti-CTLA-4 + BRAFi +/- MEKi
NCT02027961	I	En cours	MEDI4736 Dabrafénib +/- Tramétinib	Anti-PD-L1 + BRAFi +/- MEKi
NCT01656642	Ib	En cours	Atezolizumab Vémurafénib +/- Cobimétinib	Anti-PD-L1 + BRAFi +/- MEKi
NCT02130466	II	En cours	Pembrolizumab Dabrafénib + Tramétinib	Anti-PD-1 + BRAFi +/- MEKi
NCT02908672	III	A venir	Atezolizumab Vémurafénib +/- Cobimétinib	Anti-PD-L1 + BRAFi +/- MEKi

Tableau 7. Essais cliniques sur le mélanome explorant les combinaisons immunothérapie et thérapies ciblées. Adapté de Marconcini et al. [107].

III - 5. 2. Les inhibiteurs de c-Met

Le c-Met et son ligand HGF ont été associés à la formation de tumeurs ainsi qu'à la progression vers les métastases [88]. Par conséquent, les molécules susceptibles d'interagir avec cette voie de signalisation sont considérées comme de potentiels atouts pour le traitement du mélanome métastasé. Les inhibiteurs de c-Met sont considérés comme les molécules agissant sur la voie de signalisation c-Met/HGF et pourraient être utilisées dans le traitement du mélanome métastasé. Ces molécules sont présentées dans le Tableau 8.

Molécules	Mécanisme d'action	Activités démontrées dans le traitement du mélanome
Cabozantinib [145] (XL184, BMS-907351)	Inhibiteur de tyrosine kinases (VEGF, c-Met et AXL)	*In vitro* et *In vivo* Essais Cliniques : NCT00940225 et NCT01835184
Crizotinib [146] (PF-02341066)	Inhibiteur puissant de c-Met et de l'ALK	*In vitro* et *In vivo* Essais Cliniques : NCT02223819
Forétinib [147] (EXEL-2880)	Inhibiteur compétitif de l'ATP de c-Met et du VEGFR	*In vitro* et *In vivo* (chez l'animal)
PF-04217903 [148]	Inhibiteur ATP-compétitif sélectif de c-Met	*In vitro*
PHA-665752 [149]	Inhibiteur sélectif de c-Met (région catalytique)	*In vitro*
SU11274 [150]	Inhibiteur sélectif de c-Met (région catalytique)	*In vitro* et *In vivo* (chez l'animal)
Tivantinib [151] (ARQ 197)	Inhibiteur non ATP-compétitif de la liaison à c-Met déphosphorylé	*In vitro* et *In vivo* Essais Cliniques : NCT00827177
AMG-337 [152]	Inhibiteur ATP-compétitif hautement sélectif de c-Met	En cours
AMG-458 [153]	Inhibiteur puissant des voies de signalisation c-Met, VEGFR-2 et IGF	En cours

Tableau 8. Liste des inhibiteurs de c-Met interagissant avec la voie de signalisation c-Met/HGF et susceptibles d'être utilisés dans le traitement du mélanome métastasé, adapté de Demkova *et al.* [88].

D'autres stratégies d'intervention affectant la signalisation c-Met/HGF sans inhiber c-Met sont également en cours d'évaluation : les inhibiteurs de l'activation du HGF, les anticorps

neutralisant le HGF tels que le Rilotumumab (AMG102), le Ficlatuzumab (AV-299) et le TAK701 [154] et les antagonistes de c-Met comme l'Onartuzumab [155]. Cependant le ciblage spécifique de la voie c-Met/HGF présente plusieurs inconvénients. Tout d'abord, le ciblage de la voie de signalisation c-Met/HGF présente l'inconvénient d'être à l'origine de nombreux mécanismes de résistance. Cette résistance peut être la conséquence de 3 mécanismes distincts : une modulation de c-Met par l'EGFR [156], une amplification génique de c-Met couplé avec K -RAS [157] ou une mutation dans la boucle d'activation de c-Met qui déstabilise sa conformation auto-inhibitrice [158]. Par ailleurs, une activation de c-Met indépendante de HGF peut être obtenue par la DCP (Des-γ-carboxy-prothrombine) [159]. Dans ce cas, une inhibition de l'interaction c-Met/HGF sera biologiquement inutile. De plus, il a été démontré que l'inhibition de c-Met peut déclencher une activation compensatoire de la voie des MAPK [160]. A la lumière de ce fait, l'utilisation des inhibiteurs de c-Met doit être envisagée en association à d'autres traitements ciblant spécifiquement la voie MAPK. Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs de c-Met est réputée pour être à l'origine de toxicité. Lors d'études de toxicité chez l'animal, le composé GEN-203 a provoqué une toxicité hépatique et de la moelle osseuse chez la souris [161] ainsi qu'une dégénérescence myocardique chez le rat [162]. Lors d'essais cliniques de phase Ib, le tivantinib (ARQ197) a provoqué des hématotoxicités graves par leucopénie, anémie et neutropénie [163]. Le forétinib a également été à l'origine d'asthénie, d'hypertension et des toxicités gastro-intestinales chez des patients atteints de carcinome papillaire à cellules rénales [164].

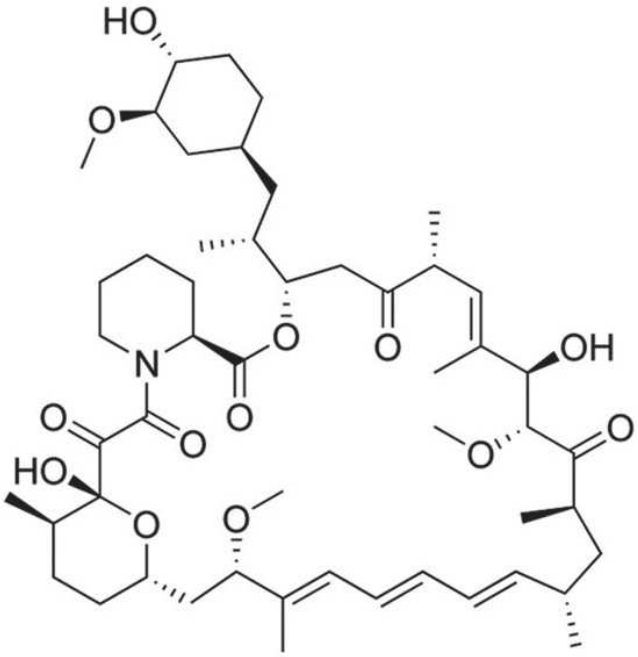
En résumé, les stratégies actuelles impliquant l'inhibition de la voie de signalisation c-Met/HGF ont déjà apporté des avantages dans le cadre clinique : dans le traitement du cancer du poumon métastatique non à petites cellules, le crizotinib a notamment permis de doubler le temps de survie des patients [165]. La perturbation de la voie de signalisation c-Met/HGF est susceptible d'interférer avec la dissémination des cellules tumorales *via* les métastases dans le mélanome. Cependant, cette approche doit être envisagée en prenant en compte les résistances et effets indésirables attendus.

III - 5. 3. Les inhibiteurs de la voie PI3K *via* l'inhibition de mTOR

La protéine mTOR est impliquée dans la régulation de la traduction des protéines, de la croissance cellulaire et du métabolisme *via* la voie de signalisation PI3K [76]. La dérégulation de plusieurs éléments de la voie de signalisation au niveau de mTOR a été rapportée dans de nombreux types de cancers et pourrait ainsi constituer une cible thérapeutique attrayante dans de nombreuses tumeurs [75,134]. On distingue deux différents complexes de mTOR : mTORC1 et mTORC2 (Figure 19). Le complexe mTORC1 est activé directement par divers stimuli (facteurs de croissance, nutriments et rapamycine) ou indirectement par des voies de signalisations telles que PI3K et MAPK [77]. Le complexe mTORC1, constitué de mTOR, de raptor et de mLST8 (GβL), active également S6K1 et 4EBP1, qui sont impliqués dans la traduction de l'ARNm [166]. Le complexe mTORC2 est constitué des composants mTOR, mLST8, Rictor, mSIN1 et Protor1/2. Contrairement au complexe mTORC1, il est largement insensible à l'activité inhibitrice de la rapamycine. Il active AKT et régule le cytosquelette d'actine. La dérégulation de la voie de signalisation mTOR (amplification/mutation PI3K, perte de fonction de PTEN, surexpression d'AKT et surexpression de S6K1 et 4EBP1) est fréquente dans le cancer et les altérations des composants de la voie mTOR jouent un rôle majeur dans la progression tumorale [47,166]. Des études récentes suggèrent que mTORC2 pourrait être une cible prometteuse du fait de son activité essentielle pour le développement d'un certain nombre de cancers [167,168].

La rapamycine, également dénommée sirolimus, constitue le premier inhibiteur de mTOR identifié [169]. Son utilisation actuelle repose sur son activité immunosuppressive dans le cadre du traitement préventif du rejet de greffe [170]. En raison de son effet inhibiteur sur mTOR, l'activité antitumorale du sirolimus a été explorée [171]. Il a été démontré qu'elle inhibait la prolifération cellulaire et qu'elle était efficace contre plusieurs types de cancer, notamment le cancer du pancréas [172], le cancer du côlon [173] et le cancer du sein [174]. Cependant, la rapamycine n'a pas été utilisée pour le traitement du cancer en raison de ses faibles propriétés pharmacocinétiques (dues à une faible solubilité [175]), mais également du fait de nombreuses boucles de rétroaction négative dépendantes de mTORC1 [176]. Les caractéristiques structurales de la rapamycine (en particulier sa lactone macrocyclique) ont

permis de construire une famille de dérivés analogues appelés « rapalogues » (Figure 19). Celle-ci comprend l'évérolimus, le temsirolimus, le ridaforolimus et le zotarolimus. Ces molécules disposent pour certaines d'AMM pour divers types de cancers (évérolimus [177,178] et temsirolimus [179]) ou ont été cliniquement évaluées pour ces indications (ridaforolimus [180] et zotarolimus [181]). Une évaluation de ces molécules dans le cadre du mélanome cutané pourrait être intéressante.



Rapamycine

Figure 19. Structure de la rapamycine avec sa lactone macrocyclique.

De nombreux composés actifs sur la voie PI3K sont actuellement à l'étude. Parmi ceux-ci, on retrouve des inhibiteurs de mTORC1/2, des inhibiteurs d'AKT, des inhibiteurs de PI3K et des inhibiteurs de PI3K et de mTOR [182] (Figure 20).

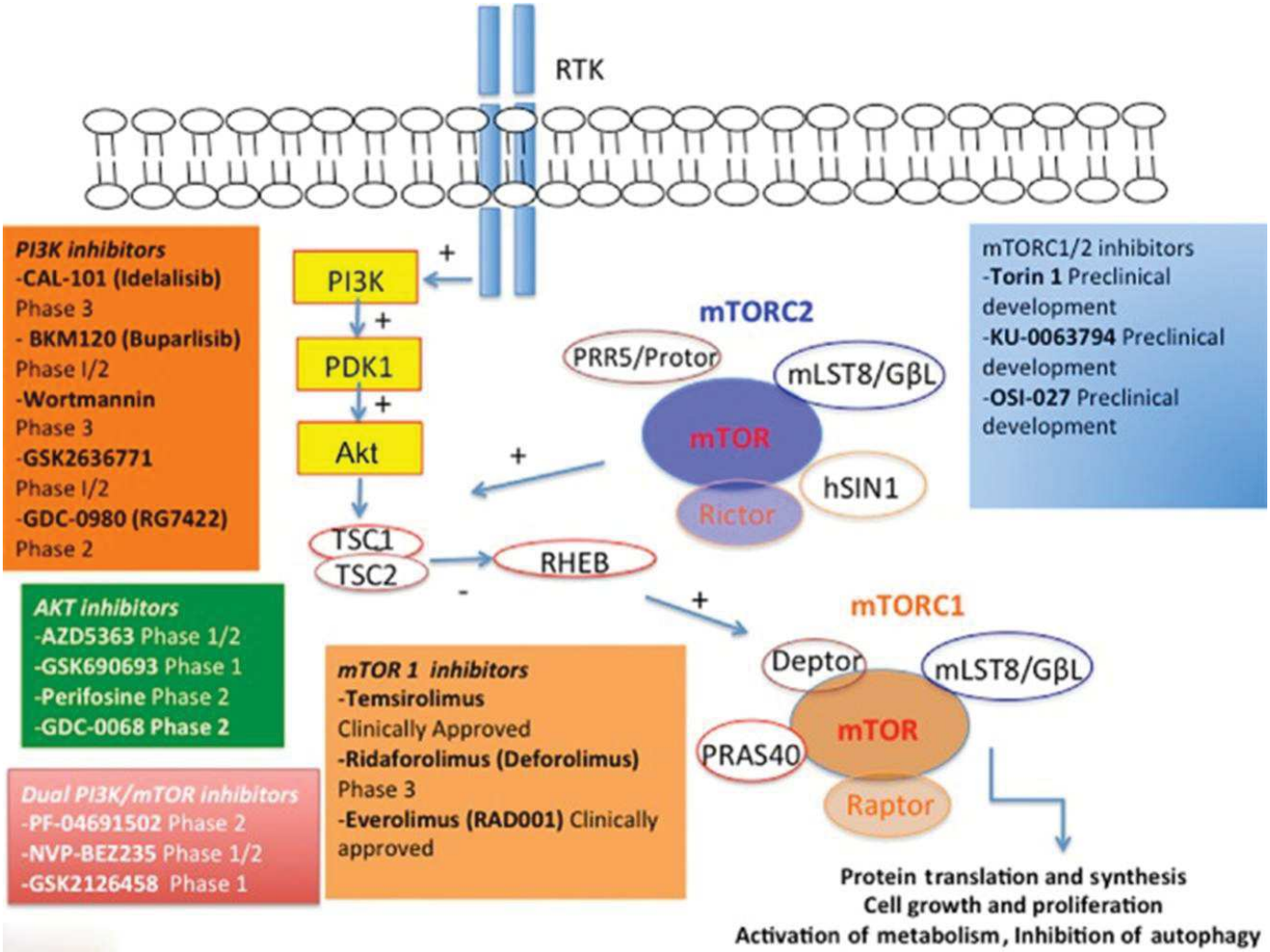


Figure 20. La voie mTOR en tant que cible thérapeutique. Plusieurs nouveaux agents de ciblage mTOR directs ou indirects ont été développés et évalués dans des essais cliniques [182].

III - 5. 4. Les inhibiteurs de c-KIT

L'activation des voies MAPK et PI3K est initiée par la fixation de facteurs de croissance sur des récepteurs membranaires tyrosine kinase présents à la surface de la membrane cytoplasmique des mélanocytes [35]. Parmi ces récepteurs, on retrouve plus fréquemment le récepteur c-KIT qui présente des mutations oncogéniques mises en évidence dans certains types de mélanome [44]. On retrouve principalement ces mutations affectant le domaine juxta-membranaire du récepteur dans les mélanomes acraux, les mélanomes muqueux et les mélanomes survenant sur peau avec élastose solaire. Actuellement, plusieurs inhibiteurs de c-KIT sont disponibles sur le marché avec des indications diverses [183]. Dans la famille des inhibiteurs de c-KIT, on trouve l'axitinib, le sorafénib et le pazopanib qui sont indiqués pour traiter les adultes atteints d'un carcinome rénal avancé, après échec thérapeutique par sunitinib ou cytokines. Le sorafenib est également indiqué pour le traitement de carcinomes hépatocellulaire et thyroïdien. Le sunitinib est utilisé pour traiter le carcinome rénal, et les tumeurs gastro-intestinales et neuroendocrines. Depuis septembre 2017, le midostaurin est approuvé par l'EMA dans le cadre de la prise en charge de la leucémie aiguë myéloïde chez l'adulte. Le dasatinib est indiqué dans les leucémies myéloïdes chroniques et les leucémies aiguës lymphoïdes. L'imatinib est indiqué dans le cadre de traitement de cancers du sang (leucémie myéloïde chronique, leucémie aigüe lymphoïde, syndrome myéloprolifératif, syndrome hyperéosinophilique) ou de cancers solides (tumeur stromale gastro-intestinale et dermatofibrosarcome protuberans). Les patients atteints de tumeurs stromales gastro-intestinales présentant une mutation de c-KIT, répondent favorablement aux inhibiteurs de c-KIT [184]. Ceci permet de suggérer que les mélanomes porteurs d'une mutation de c-KIT pourraient être traités par un tel composé. Les résultats d'essais cliniques évaluant des inhibiteurs de c-KIT, le sunitinib et l'imatinib, chez des patients présentant une mutation c-KIT ont été publiés et ont montré un taux de réponse moyen de 20 % [185,186]. D'autres inhibiteurs de c-KIT sont actuellement en cours d'évaluation clinique dans le cadre du traitement de différentes tumeurs solides dont le mélanome cutané [183].

Les perspectives de la prise en charge médicamenteuse du mélanome cutané peuvent également inclure des inhibiteurs de c-KIT, en particulier en cas de présence d'altérations moléculaires sur le récepteur c-KIT.

CHAPITRE 2

Les imidazoquinoxalines de première génération

CHAPITRE 2 - Les imidazoquinoxalines de première génération

Les systèmes hétérocycliques contenant la fraction quinoxaline sont utilisés pour des applications pratiques relativement diverses [187]. Les dérivés des quinoxalines peuvent avoir des applications comme antibiotiques [188], matériaux électroluminescents [189], semi-conducteurs organiques [190], agents liant l'ADN [191], inhibiteurs de corrosion [192]… Ces composés ont démontré diverses activités biologiques telles que : des activités antitumorales [193,194], des activités antivirales [195], des activités antibactériennes [196,197] ou encore des activités anti-inflammatoires [198].

Depuis plusieurs années, les Imiqualines (ou dérivés imidazo[1,2-*a*]quinoxaliniques) représentent une des thématiques du laboratoire de chimie organique de la Faculté de Pharmacie de Montpellier. Les Imiqualines sont des molécules tricycliques azotées (Figure 21) présentant des activités cytotoxiques comparables à celles des meilleurs anticancéreux actuellement sur le marché ou en cours de développement. Ce sont des composés originaux, protégés par un brevet international [6] ainsi qu'un brevet de sélection [7]. Leur synthèse est maîtrisée et l'exemplification de la diversité moléculaire est en cours.

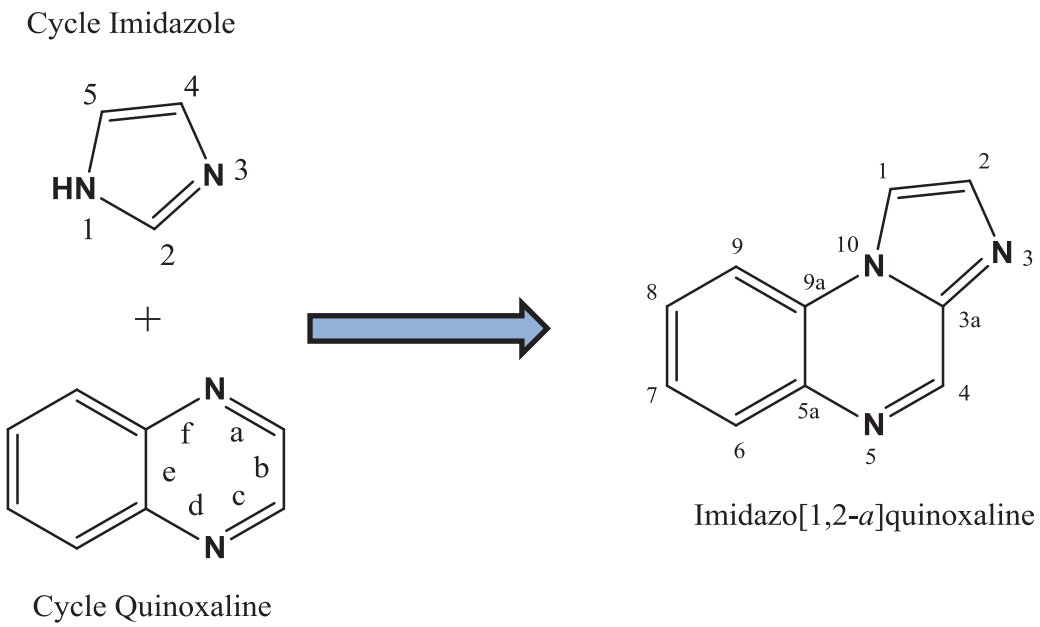
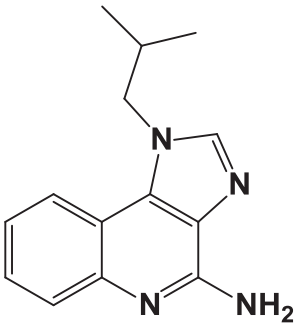


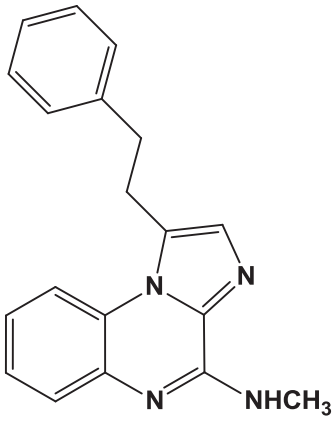
Figure 21. Structure générale des imidazo[1,2-*a*]quinoxaline.

Les Imiqualines de première génération présentent une analogie structurale avec l'imiquimod (Figure 21). Ce composé a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) par l' *European Medicines Agency* (EMA) dans le cadre des traitements chez l'adulte de verrues sur les organes génitaux, de petits carcinomes basocellulaires et de kératoses actiniques du visage et du cuir chevelu (lésions cutanées précancéreuses et anormales qui se développent après une trop longue exposition au soleil) [199]. Il est réservé à l'utilisation chez des patients dont le système immunitaire fonctionne normalement. Son mécanisme d'action indirect implique une modulation de la réponse immunitaire [200]. Lorsque l'imiquimod est appliqué sur la peau, il agit localement sur le système immunitaire pour déclencher la libération de cytokines, y compris l'interféron [201]. Un deuxième mode d'action direct a également été mis en évidence : l'imiquimod agit en induisant l'apoptose des cellules cancéreuses [202,203].

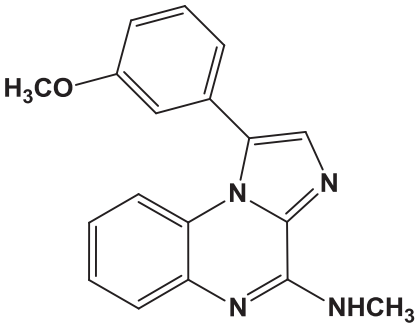
Les premières Imiqualines leaders, **EAPB0203** et **EAPB0503** (Figure 22), ont montré une activité cytotoxique très supérieure à celles de l'Imiquimod (molécule analogue structural) et de la fotémustine (traitement de première ligne dans le mélanome métastatique avant la mise sur le marché des thérapies ciblées et molécules issues de l'immunothérapie) sur une lignée de mélanome humain très résistante : A375 [204,205]. Cette activité est aussi particulièrement notable dans différents modèles cellulaires de mélanome, lymphomes et cancer du côlon ; résultats confirmés par un criblage réalisé par le NCI (National Cancer Institute) sur 60 lignées cellulaires. De plus, l'**EAPB0203** s'est révélé efficace *in vivo* pour inhiber la croissance tumorale, dans une étude préliminaire non optimisée (tumeur de mélanome humain moyennement sensible) [204]. Le mécanisme d'action semble impliquer une activité sur la tubuline par une désorganisation des microtubules associée à un blocage en phase G2/M [206]. Les études de toxicité semi-chronique réalisées chez le rat n'ont mis en évidence aucune toxicité (hémogramme, organes nobles) [204]. Avantageusement, les premières Imiqualines leaders ne présentent pas d'activité cytotoxique sur lymphocytes T normaux, ni d'activité pro-inflammatoire contrairement à d'autres molécules anticancéreuses comme l'Imiquimod.



IMIQUIMOD



EAPB0203



EAPB0503

Figure 22. Structure chimique de l'Imiquimod et des Imiqualines de première génération (**EAPB0203** et **EAPB0503**).

I - Synthèse chimique

I - 1. Synthèse de l'EAPB0203

La synthèse de l'**EAPB0203** a été initialement publiée en 2004 au sein de la revue *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [207]. Une étape préalable de synthèse du 1-amino-4-phénylbutan-2-ol (**3**) est nécessaire. La réaction du 3-phénylpropionaldéhyde (**1**) avec le cyanure de sodium conduit au 2-hydroxy-4-phénylbutanenitrile (**2**) qui, après réduction avec de l'aluminohydrure de lithium, produit le 1-amino-4-phénylbutan-2-ol avec un rendement global de 81 % (Schéma 1).

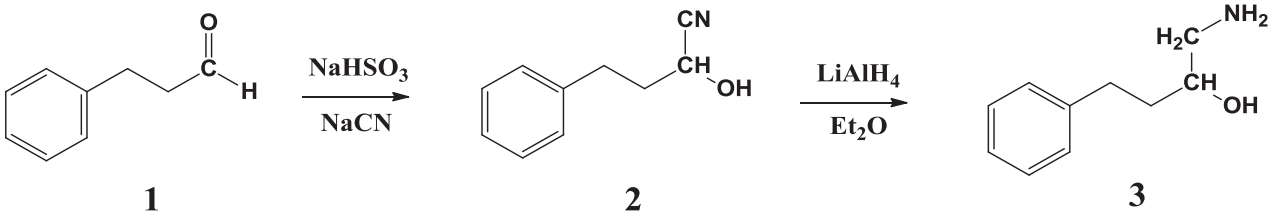


Schéma 1. Synthèse du 1-amino-4-phénylbutan-2-ol à partir du 3-phénylpropionaldéhyde [207].

Le 1-amino-4-phénylbutan-2-ol (**3**) va ensuite réagir avec la 2,3-dichloroquinoxaline (**4**) en présence de triéthylamine dans le dioxane pour donner le 1-[(3-chloroquinoxalin-2-yl)amino]-4-phénylbutan-2-ol (**5**) (Schéma 2). Cet intermédiaire va subir une oxydation de son groupement hydroxyle, en présence du complexe trioxyde de soufre triméthylamine, permettant l'obtention de la 1-[(3-chloroquinoxalin-2-yl)amino]-4-phénylbutan-2-one (**6**).

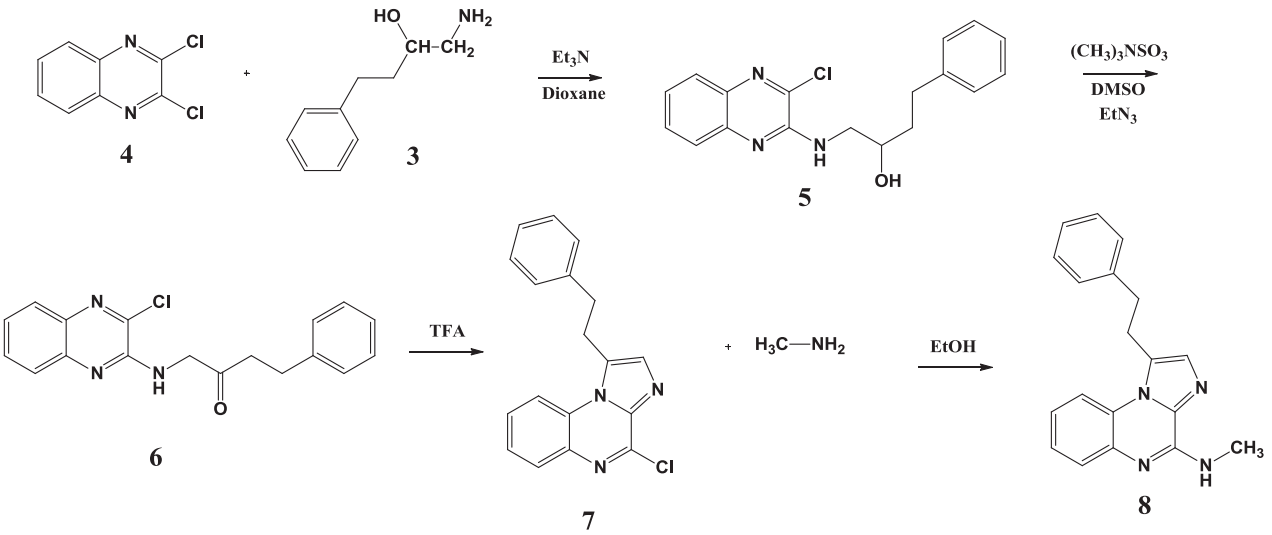


Schéma 2. Synthèse de l'**EAPB0203** à partir du 1-amino-4-phénylbutan-2-ol et de la 2,3-dichloroquinoxaline [207].

La 4-chloro-1-phénéthylimidazo[1,2-*a*]quinoxaline (**7**), composé précurseur de la série est obtenue par cyclisation intramoléculaire [208]. Cette déshydratation par l'acide trifluoroacétique est réalisée avec un rendement de 66 %. Cette réaction constitue une étape clé dans la construction squelettique des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines. Enfin, une étape de substitution nucléophile du chlore par la méthylamine a lieu en milieu basique dans l'éthanol afin d'obtenir la *N*-méthyl-1-phénéthylimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4-amine (**8**) (**EAPB0203**).

I - 2. Synthèse de l'EAPB0503

Pour permettre une diversification de la série chimique, une nouvelle méthode de synthèse a été élaborée permettant de construire le système tricyclique non substitué et d'introduire ensuite des diversités structurales en positions 1 et 4. L'utilisation des microondes a permis d'augmenter la réactivité et d'introduire de nouveaux substituants [205]. La synthèse de l'**EAPB0503** (**17**) développée au sein du laboratoire est résumée dans le schéma réactionnel suivant :

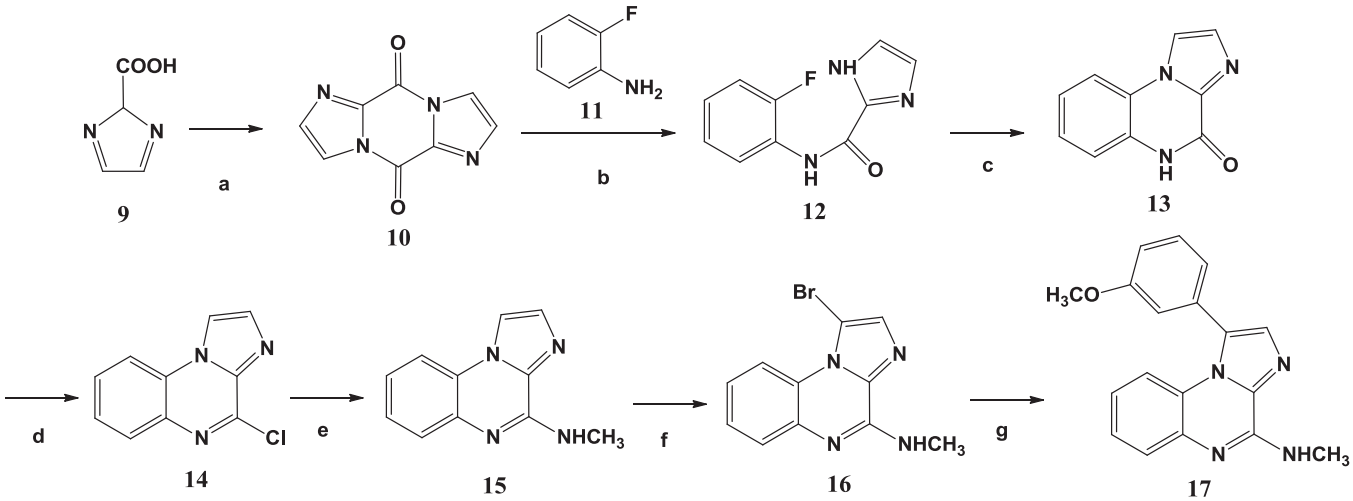


Schéma 3. Schéma général de synthèse de l'**EAPB0503**.

Les conditions opératoires pour cette synthèse sont les suivantes :

(a) $SOCl_2$, reflux, 18h; (b) NaHMDS, THF, 0°C-TA, 5h; (c) NaH, DMA, reflux, 48h; (d) $POCl_3$, MW (130°C, 2x15min); (e) NH_2CH_3, EtOH, MW (150°C, 20min); (f) NBS, $CHCl_3$, reflux, 2h; (g) acide arylboronique (R-B$(OH)_2$), $Pd(PPh_3)_4$, Na_2CO_3, DME/H_2O, MW (140°C, 20min).

I - 2.1. Formation du dimère diimidazo[1,2-*a*;1',2'-*d*]pyrazine-5,10-dione.

La synthèse débute par une condensation bimoléculaire de l'acide 2-imidazocarboxylique (**9**). Cette réaction se fait à reflux pendant 18 heures en présence de chlorure de thionyle (**18**). Elle permet de former le diimidazo[1,2-*a* ;1,2-*d*]pyrazine-5,10-dione (**10**).

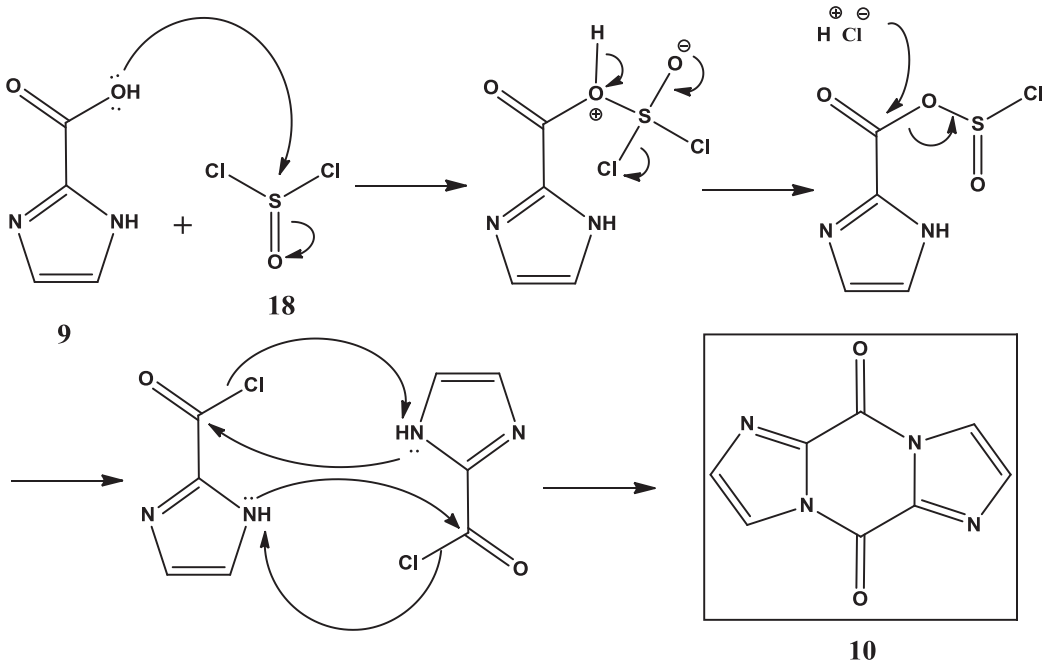


Schéma 4. Etape de formation du dimère diimidazo[1,2-*a*;1',2'-d]pyrazine-5,10-dione.

I - 2.2. Addition d'une fluoroaniline sur le dimère.

Cette addition se déroule en 2 étapes. Tout d'abord, la déprotonation de la fluoroaniline (**11**) se fait sous atmosphère inerte (flux d'azote) à 0°C en présence de bis(triméthylsilyl)amidure de sodium (NaHMDS) dans le tétrahydrofurane (Schéma 5). Puis, l'attaque nucléophile de l'amidine résultante sur le carbonyle du dimère se fait à température ambiante pendant 5 heures (Schéma 6). Une étape de protonation du dérivé formé à l'aide de la bis(triméthylsilyl)amine permet d'obtenir le *N*-(2-fluorophényl)-1*H*-imidazole-2-carboxamide (**12**).

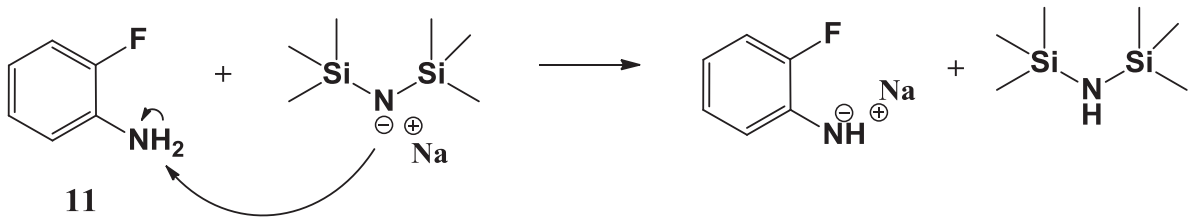


Schéma 5. Etape de formation de l'*ortho*-fluoroamidure.

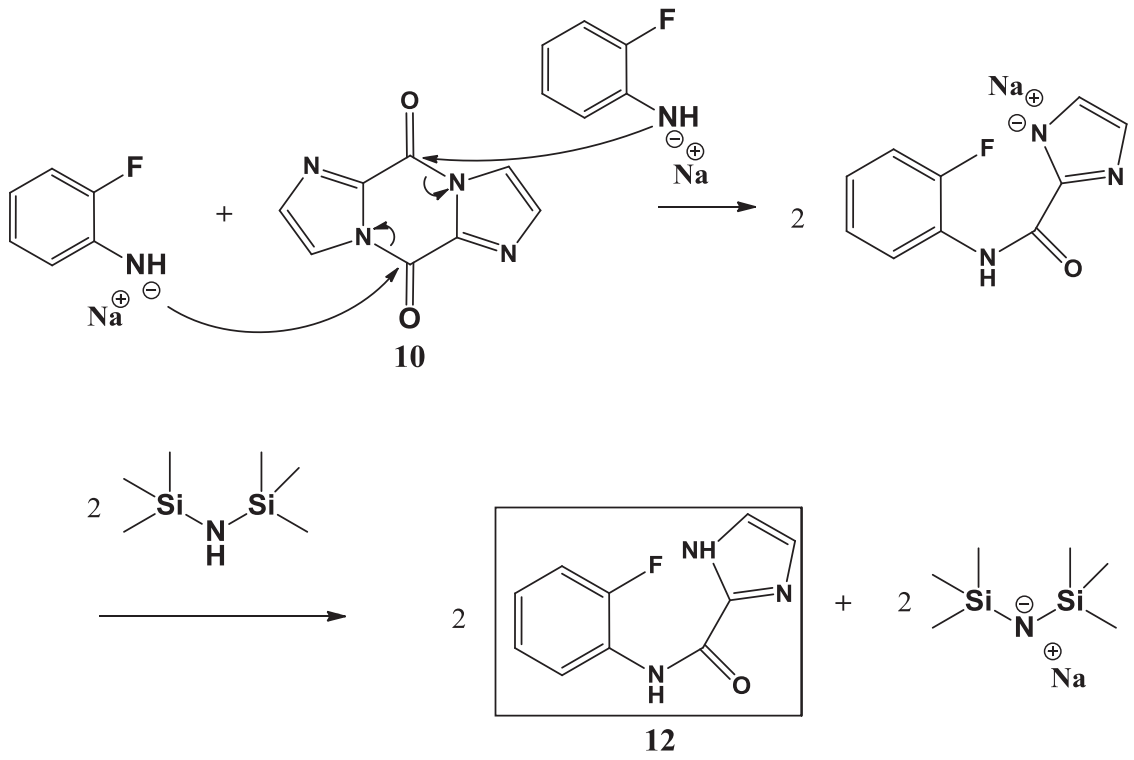


Schéma 6. Etape d'addition de l'ortho-fluoroamidure sur le dimère puis étape de protonation à l'aide de la bis(triméthylsilyl)amine.

I - 2.3. Cyclisation intramoléculaire en milieu basique.

La formation de la quinoxaline (imidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4(5*H*)-one) (**13**) se fait en présence d'hydrure de sodium en solution dans le diméthylacétamide (DMA) à reflux pendant 48 heures.

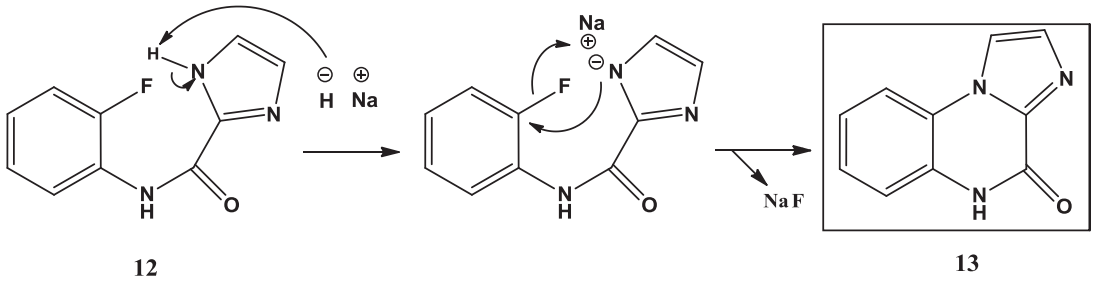


Schéma 7. Etape de cyclisation intramoléculaire en milieu basique.

I - 2.4. Substitution de l'hydroxyle par un chlore.

En milieu acide, il existe un équilibre entre les formes **a** (lactame) et **b** (lactime). C'est la forme **b** qui sera l'espèce réactive vis-à-vis du trichlorure de phosphoryle ($POCl_3$) permettant la substitution de l'hydroxyle par un chlore.

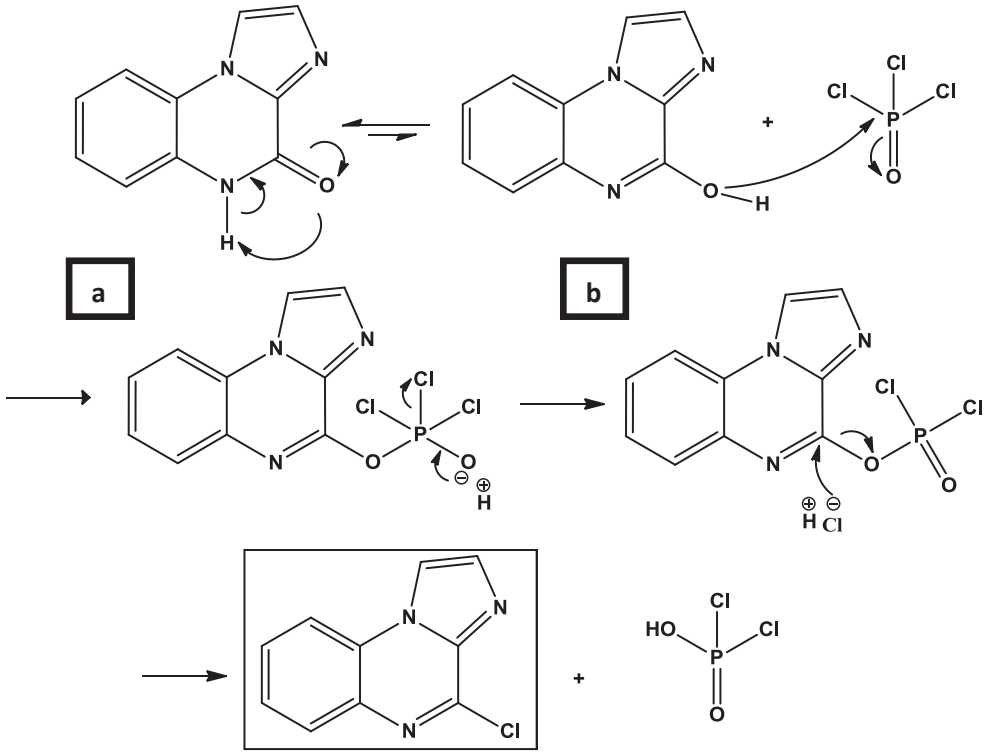


Schéma 8. Etape de substitution de l'hydroxyle par un chlore.

I - 2.5. Introduction de la méthylamine.

Cette réaction de substitution du chlore par la méthylamine a lieu en milieu basique dans l'éthanol et permet l'obtention de la *N*-méthylimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4-amine.

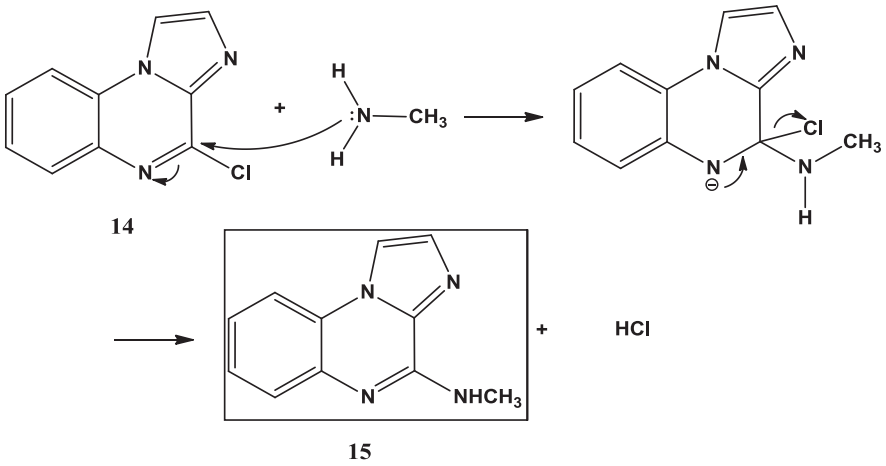


Schéma 9. Etape d'introduction de la méthylamine en position 4.

I - 2.6. Bromation radicalaire de Whol-Ziegler.

Cette étape débute par une phase d'initiation radicalaire. Le chloroforme sert d'initiateur de radicaux permettant la création d'un brome radicalaire.

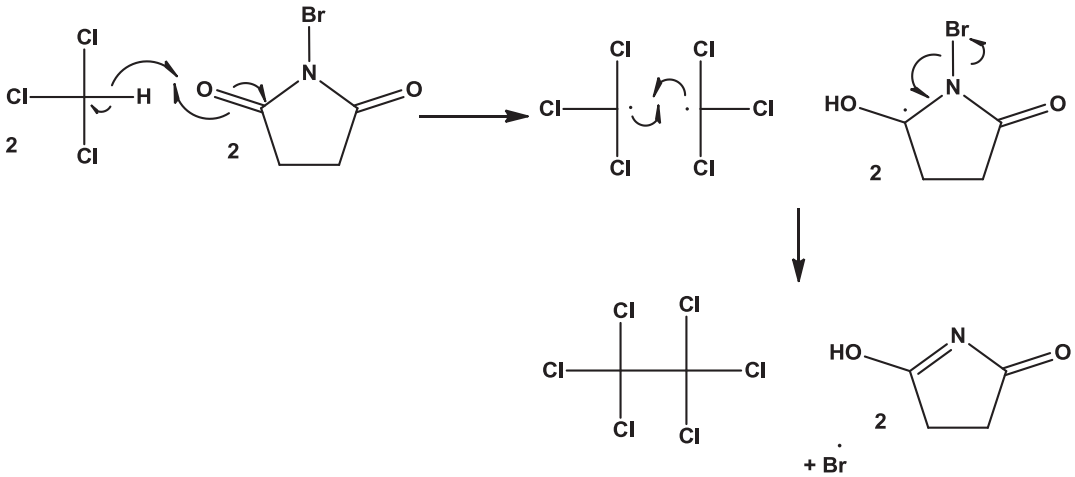


Schéma 10. Etape d'initiation radicalaire de la bromation par le *N*-bromosuccinimide.

Ensuite, des réactions de propagation en chaine vont avoir lieu. Tout d'abord, le radical brome attaque l'imidazo[1,2-*a*]quinoxaline pour former un nouveau radical et du bromure d'hydrogène.

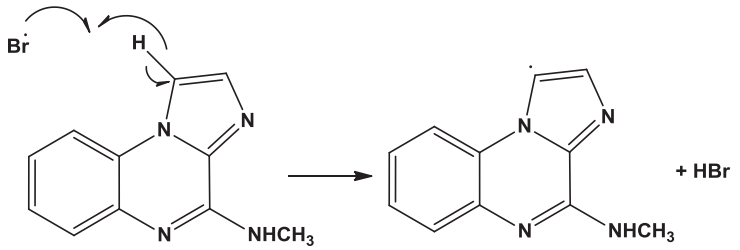


Schéma 11. Etape de propagation radicalaire de la bromation par le N-bromosuccinimide.

Puis la réaction entre le bromure d'hydrogène et le *N*-bromosuccinimide conduit à la formation du succinimide et du dibrome.

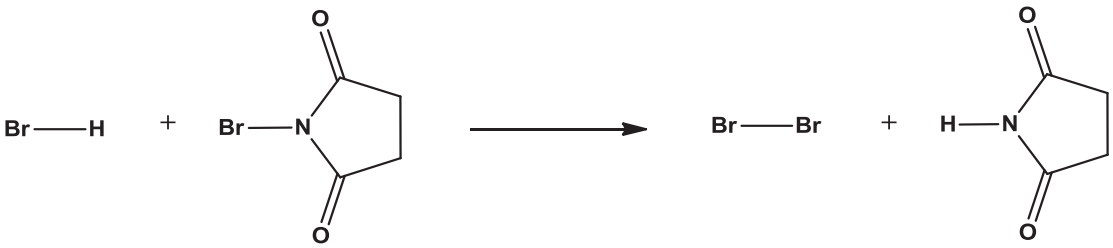


Schéma 12. Etape de formation du succinimide et du dibrome lors de la bromation par le N-bromosuccinimide.

Enfin, l'addition radicalaire du brome sur le *N*-méthylimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-1-yl-4-amine forme le produit final bromé (**16**) avec une régénération du radical permettant de poursuivre la réaction. Cette addition a lieu préférentiellement en position 1 mais des produits secondaires minoritaires avec fixation de l'atome de brome en position 2 sont possibles.

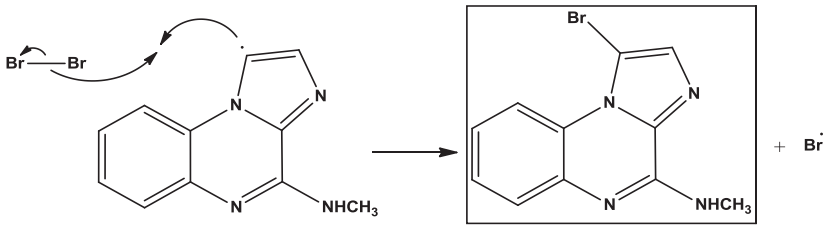


Schéma 13. Réaction d'addition radicalaire du brome lors de l'étape de bromation par le *N*-bromosuccinimide.

I - 2.7. Couplage de Suzuki-Miyaura.

Cette réaction croisée de Suzuki-Miyaura, qui utilise comme catalyseur le tétrakis (triphénylphosphine) de palladium (0), noté $Pd[P(C_6H_5)_3]_4$ ou $Pd(PPh_3)_4$, permet l'introduction de divers groupements aryles et quelques groupements alkyles. Le cycle mécanistique de la

réaction de couplage de Suzuki-Miyaura se déroule selon 3 étapes[209]. Elle débute par une addition oxydante avec l'insertion du Palladium entre le groupement aryle et l'halogène. Puis, une étape de transmétallation permet d'échanger l'halogène et le groupe R. Enfin, l'étape d'élimination réductrice nous permet d'obtenir le produit de couplage attendu et de régénérer le catalyseur.

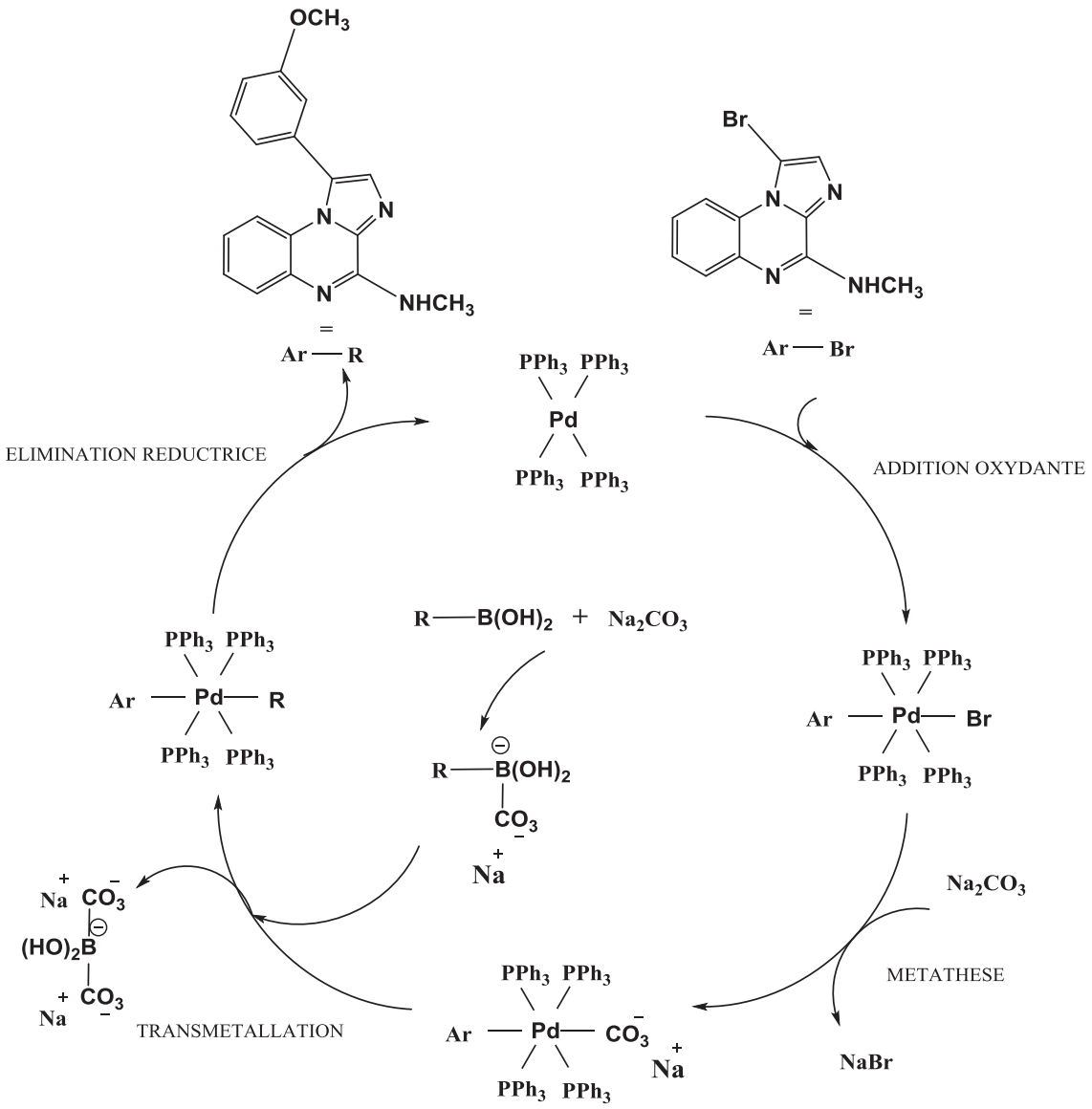


Schéma 14. Mécanisme réactionnel de la réaction de couplage de Suzuki-Miyaura.

II - Activités cytotoxiques *in vitro*

Un criblage *in vitro* de l'activité cytotoxique des composés leaders **EAPB0203** et **EAPB0503** sur différentes lignées cellulaires cancéreuses a été réalisé. Ainsi, des lignées tumorales de mélanome, de cancer du côlon, de cancer du sein et de leucémies ont été utilisées afin

d'évaluer les activités potentielles de ces composés. Les résultats du criblage *in vitro* de l'activité cytotoxique des composés leaders **EAPB0203** et **EPB0503**, des molécules de référence et de l'imiquimod sont présentés dans le Tableau 9 [204,205].

Tissu	Peau			Sein	Colon					Leucémie Chronique Myéloïde		
Composés	A375	M4Be	RPMI 7591	MCF7	LST174T	HCT116	HT29	SW480	T84	K562	LAMA	AR230
Dacarbazine	> 350	> 350	> 350									
Fotémustine	173	326	125									
Doxorubicine				10								
Irinotecan					18							
Imiquimod	70	33	53	145								
EAPB0203	1,5	2,5	4,2	1	4,1	0,8	0,3	2,6	0,3	5	3	0,5
EAPB0503	0,15			0,35	0,01	0,03	0,03	0,08	0,01	1	0,5	0,1

Tableau 9. : Concentration inhibitrice 50 % (CI_{50}) en µmol/L des Imiqualines de première génération **EAPB0203** et **EAPB0503** et des molécules de référence sur différentes lignées cellulaires de mélanome, de cancer du côlon, de cancer du sein et de leucémie [204,205].

Les composés **EAPB0203** et **EAPB0503** présentent des CI_{50} sur les lignées cellulaires de mélanome très inférieures à celles des molécules de référence au moment de la mise en place de cette étude et à celles de l'imiquimod. L'activité anticancéreuse des Imiqualines de première génération est nettement mise en évidence dans ce criblage. Par ailleurs, ces molécules semblent également très actives sur la lignée humaine de cancer du sein MCF7. En effet, la CI_{50} de l'**EAPB0203** est inférieure d'un facteur 10 à la doxorubicine ; ancienne molécule de référence [204]. De même, l'activité cytotoxique de l'**EAPB0203** sur la lignée humaine de cancer du côlon LS174T est caractérisée par une CI_{50} 4 fois inférieure à celle de l'irinotécan [204]. Sur l'ensemble des lignées cancéreuses testées, l'activité de l'**EAPB0503** est supérieure à celle de l'**EAPB0203**.

III - Test *in vivo* des Imiqualines de première génération

III - 1. Pharmacocinétique et métabolisme

Les profils pharmacocinétiques de l'**EAPB0203** et de l'**EAPB0503** ont été étudiés chez le rat Sprague-Dawley [210,211]. Les animaux ont été répartis dans quatre groupes ayant reçu une dose unique de 2,5 mg/kg d'**EAPB0203** ou une dose de 5 mg/kg d'E**APB0503** par voie intraveineuse ou par voie intrapéritonéale (Figure 23). Des prélèvements sanguins au temps 5, 10 et 30 minutes et à 1, 2, 4, 8, 12 et 24 heures après l'administration ont été réalisés.

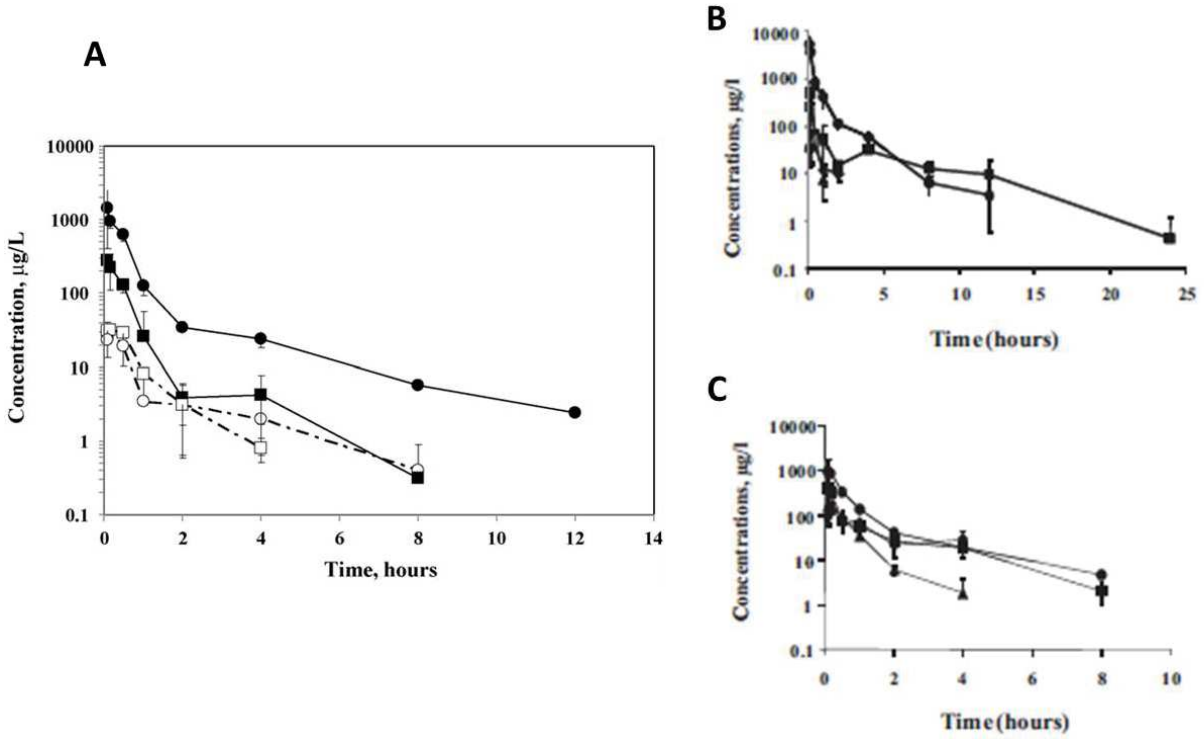


Figure 23. Concentrations plasmatiques en **EAPB0203** et ses métabolites après administration unique de 2,5 mg/kg par voie intraveineuse (●) et par voie intraveineuse (■) (A) et en **EAPB0503** et ses métabolites après administration unique de 5 mg/kg par voie intraveineuse (●) (B) et après administration intrapéritonéale (●) (C) [210,211].

Les dosages ont été effectués en utilisant deux méthodes de dosages validées au laboratoire utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) [211,212]. Des relations quadratiques entre les rapports de surface des composés à doser avec l'étalon interne ont été mises en évidence aux concentrations allant de 5 à 1000 µg/L (gamme basse : 5-300 µg/L et gamme haute : 100-1000 µg/L). Ces méthodes très spécifiques et sensibles ont été utilisées avec succès pour étudier les concentrations plasmatiques de l'**EAPB0203** et de l'**EAPB0503** afin de déterminer les paramètres pharmacocinétiques des deux composés.

Les résultats présentés dans le Tableau 10 sont calculés par modélisation de la courbe moyenne des concentrations en fonction du temps à l'aide du logiciel Pk-fit software® [213].

	EAPB0203	**EAPB0503**
Clairance totale **Cl_T**	**3,2** L/h/kg	**2,2** L/h/kg
Clairance hépatique **Cl_{hep}**	**0,92** mL/min/kg	**0,74** mL/min/kg
Clairance Intrinsèque **Cl_{Int}**	**2,37** mL/min/g	**2,7** mL/min/g
Volume Distribution **V_d**	**4,3** L/kg	**2,5** L/kg
Demi-vie **$t_{1/2}$**	**2,4** h en IV **1,5** h en IP	**2,0** h en IV **0,91** h en IP
Biodisponibilité **$F_{IP/IV}$**	**22,7** %	**35** %
Liaison Albumine plasmatique humaine (*in vitro*)	**97,6 - 99,4** %	**98,8 - 99,5** %
Cytochrome P450 *In vitro* humain/animal	CYP1A1/2 - CYP3A	CYP1A1/2 - CYP3A

Tableau 10. : Paramètres pharmacocinétiques de l'**EAPB0203** et de l'**EAPB0503** calculés à l'aide du logiciel Pk-fit software® après administration par voie intraveineuse (IV) et par voie intrapéritonéale (IP) de 2,5 mg/kg et de 5 mg/kg, respectivement [213].

Les principaux métabolites issus des voies de *N*-déméthylation, d'*O*-déméthylation et d'hydroxylation des molécules de première génération ont été mis en évidence *in vitro* en utilisant des microsomes humain, de chien, de rat et de souris [210]. Ils sont représentés dans la Figure 24.

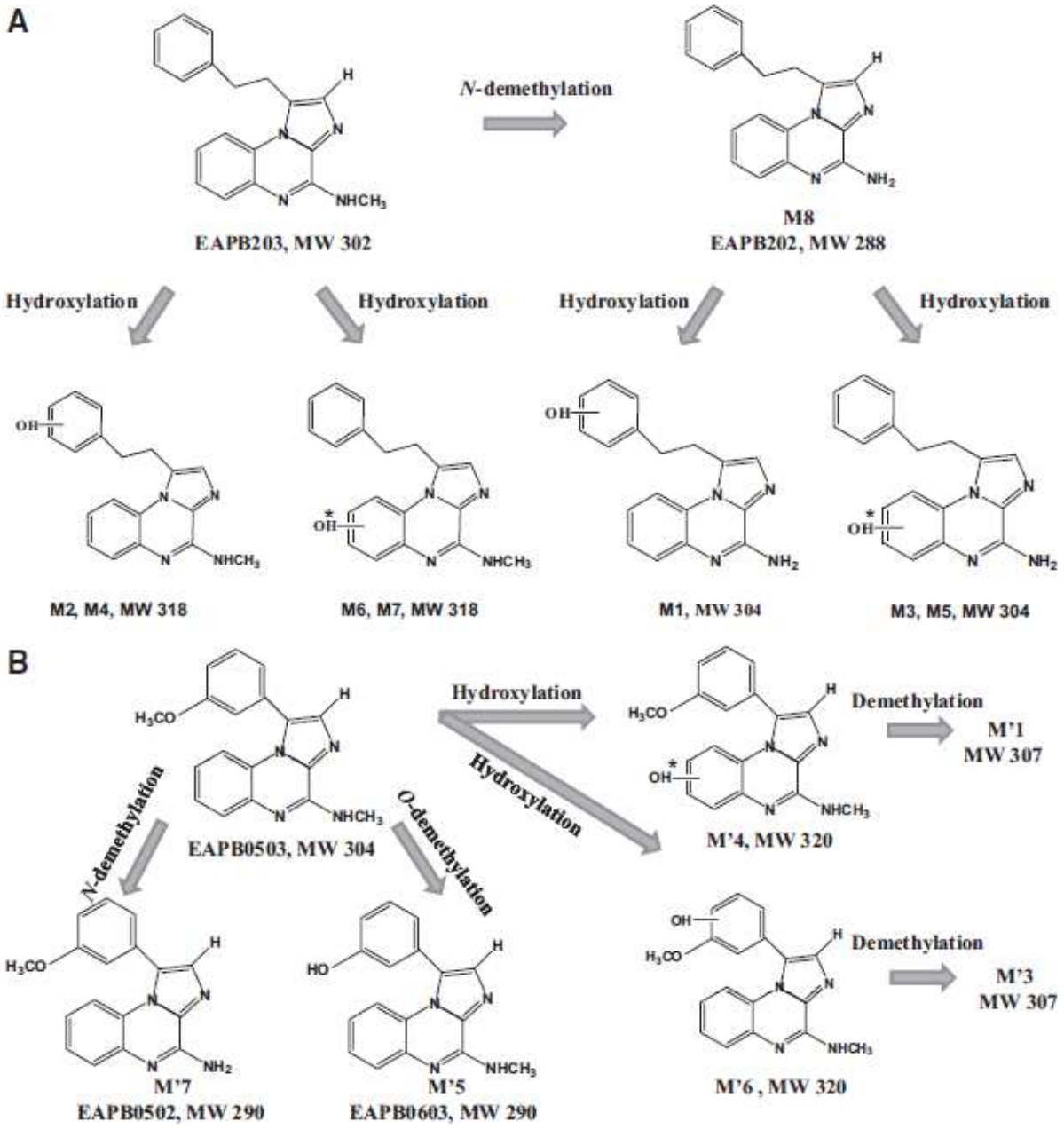


Figure 24. Structures chimiques de l'**EAPB0203** (A) et de l'**EAPB0503** (B) et les voies de métabolisme proposées [210].

III - 2. Tests de toxicité *in vivo* de l'EAPB0203 et de l'EAPB0503 chez le rat

Des essais de toxicité aiguë *in vivo* ont été réalisés chez le rat Sprague-Dawlay afin de déterminer les doses létales 50 % (DL_{50}) des Imiqualines de première génération [211]. La DL_{50} correspond à la quantité de composé administrée en une seule fois qui cause la mort de la moitié d'un groupe d'animaux. Les composés ont été administrés par voie intraveineuse en utilisant la veine du pénis chez trois rats par dose. Les DL_{50} obtenues sont de 14,7 mg/kg pour l'**EAPB0203** et 8 mg/kg pour l'**EAPB0503**.

Une étude de toxicité subaiguë a été faite chez le rat à raison d'une administration intraveineuse par jour (veine de la queue) de 5 mg/kg pour l'**EAPB0203** et de 3 mg/kg pour l'**EAPB0503** pendant 5 jours. Le traitement a été favorablement toléré pour les deux composés. En effet, les rats testés n'ont présenté ni perte de poids ni diminution de la consommation en eau ou en aliment par rapport aux rats témoins. Par ailleurs, aucun décès ni toxicités hématologiques (recherche d'anémie, de thrombopénie ou de leucopénie) n'ont été mis en évidence. L'examen anatomo-pathologique n'a pas permis de révéler d'anomalies sur les principaux organes (cœur, foie, reins et cerveau).

III - 3. Test d'activité *in vivo* de l'EAPB0203 sur souris xénogreffées par cellules cancéreuses M4Be

Une première étude préliminaire a été réalisée sur des souris nude Swiss (souris non consanguine possédant un système immunitaire peu sollicité) xénogreffées par une lignée de mélanome humain M4Be [211]. Cette étude a permis de comparer deux posologies différentes d'**EAPB0203** : 5 mg/kg et 20 mg/kg. Après deux semaines de traitement, le groupe ayant reçu l'**EAPB0203** à la plus forte dose a clairement permis de mettre en évidence une meilleure efficacité du traitement reçu (Figure 25).

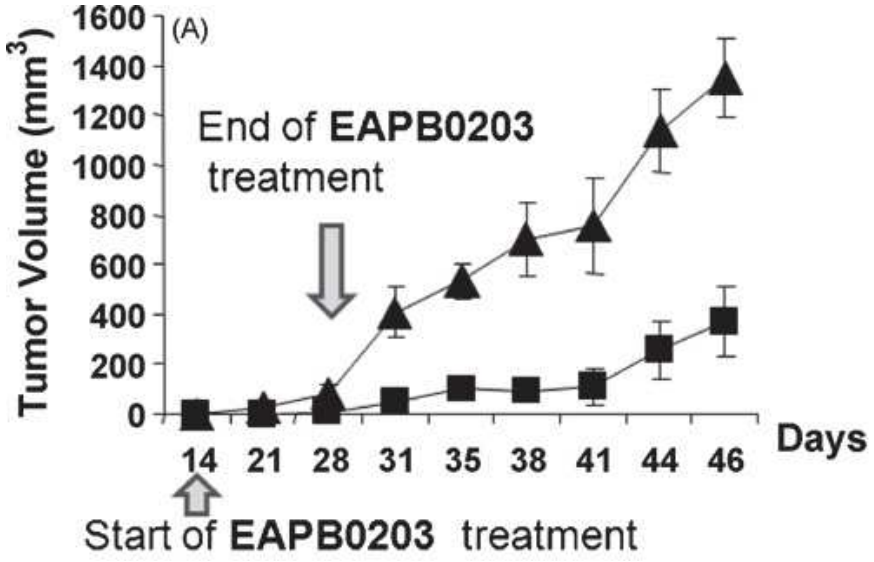


Figure 25. Evolution de la taille de la tumeur en fonction du jour. Activité *in vivo* de l'**EAPB0203** à deux posologies différentes : 5 mg/kg (▲) et 20 mg/kg (■) chez la souris nude SWISS xénogreffée par la lignée de mélanome humain M4Be [211].

Une deuxième étude préliminaire a été mise en place sur des souris nude Swiss xénogreffées par une lignée de mélanome humain M4Be afin de comparer l'efficacité de l'**EAPB0203** par rapport au traitement de référence (la fotémustine, utilisée en clinique pour le traitement des mélanomes métastasés au moment de l'étude) [204,211]. Les souris étaient réparties dans trois groupes différents : un groupe de six souris non traitées, un groupe de six souris traitées par la fotémustine par voie intrapéritonéale à 20 mg/kg en une prise hebdomadaire pendant trois semaines et un groupe de six souris traitées par l'**EAPB0203** par voie intrapéritonéale à 20 mg/kg en deux prises hebdomadaires pendant trois semaines. Les résultats sont présentés dans les figures 26-27.

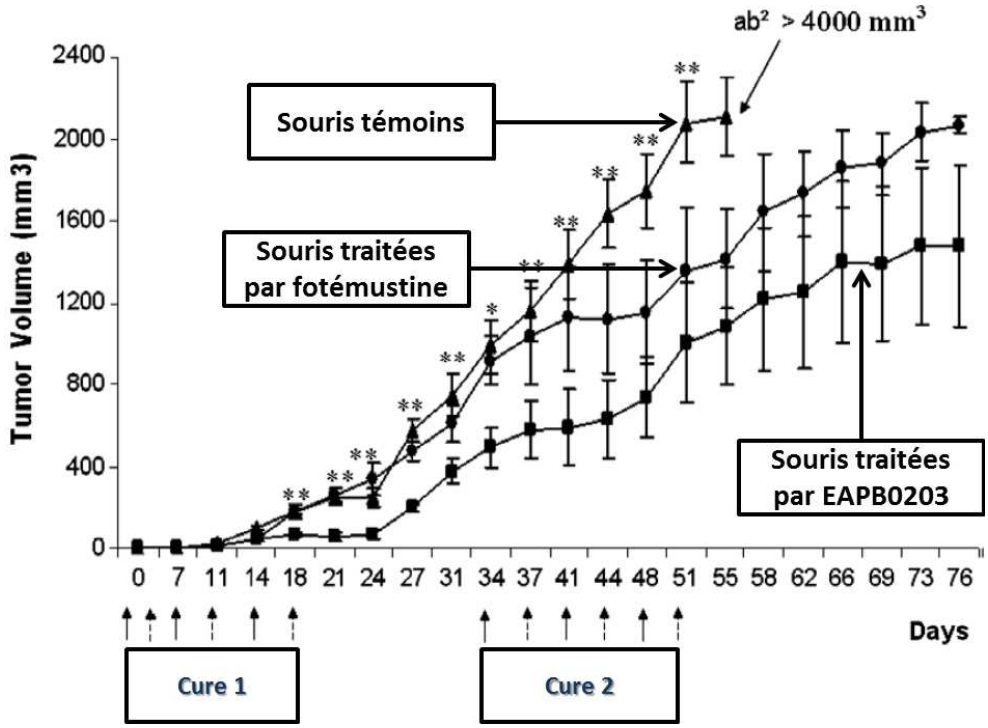


Figure 26. Evolution de la taille de la tumeur en fonction du jour. Activité *in vivo* de l'**EAPB0203** (20 mg/kg : ■) chez la souris nude SWISS xénogreffée par la lignée de mélanome humain M4Be comparé à la fotémustine (20 mg/kg : ●) et au groupe témoin non traité (▲) [204,211].

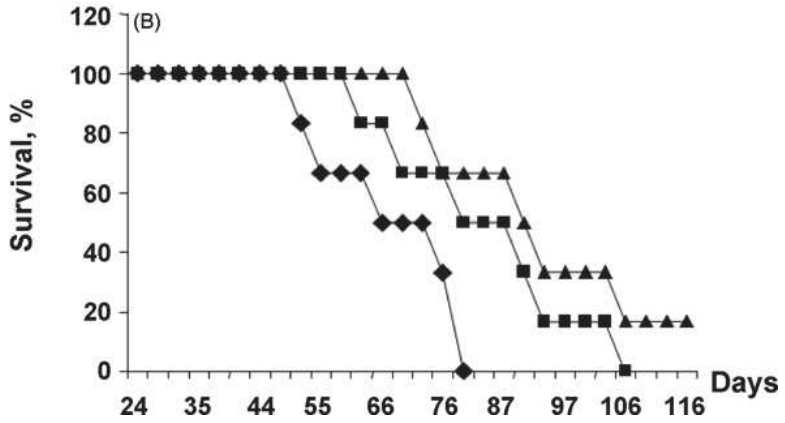


Figure 27. Courbes de survie. Activité *in vivo* de l'**EAPB0203** (20 mg/kg : ■) chez la souris nude SWISS xénogreffée par la lignée de mélanome humain M4Be comparé à la fotémustine (20 mg/kg : ●) et au groupe témoin non traité (▲) [204,211].

Au vue des figures 26-27, l'**EAPB0203** a présenté une activité antitumorale significativement supérieure à celle de la fotémustine.

IV - Mécanisme d'action des Imiqualines de première génération

Comme il a été décrit précédemment, les Imiqualines de première génération présentent une analogie structurale avec l'imiquimod (Figure 22). Le mode d'action de cette molécule est double :

- Indirect par modulation de la réponse immunitaire qui entraîne la libération de cytokines après fixation sur les récepteurs Toll 7 (TLR7) [214].
- Direct par induction de l'apoptose sur les cellules cancéreuses [202,203].

Etant donné l'analogie structurale des Imiqualines de première génération avec l'imiquimod, ce second mode d'action a particulièrement été investigué.

IV - 1. Induction de l'apoptose

Des travaux précédents réalisés au laboratoire ont permis de mettre en évidence le mode d'action de l'**EAPB0203**. Ce composé est capable d'inhiber la prolifération cellulaire par induction de l'apoptose avec arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. Ce mode d'action a été démontré sur plusieurs lignées cellulaires de leucémie-lymphome à cellules T de l'adulte (ATL) à HTLV-I (virus T-lymphotropique humain) positifs (lignées cellulaires HuT-102, MT-2 et C91-PL) ou négatifs (lignées cellulaires CEM, Molt-4, Jurkat et HuT-78) pour des concentrations d'**EAPB0203** de 5 et 10 µM (Figure 28) [215]. Par ailleurs, l'**EAPB0203** n'a pas présenté d'inhibition de la croissance sur les lymphocytes T sains au repos ou activés pour ces mêmes concentrations.

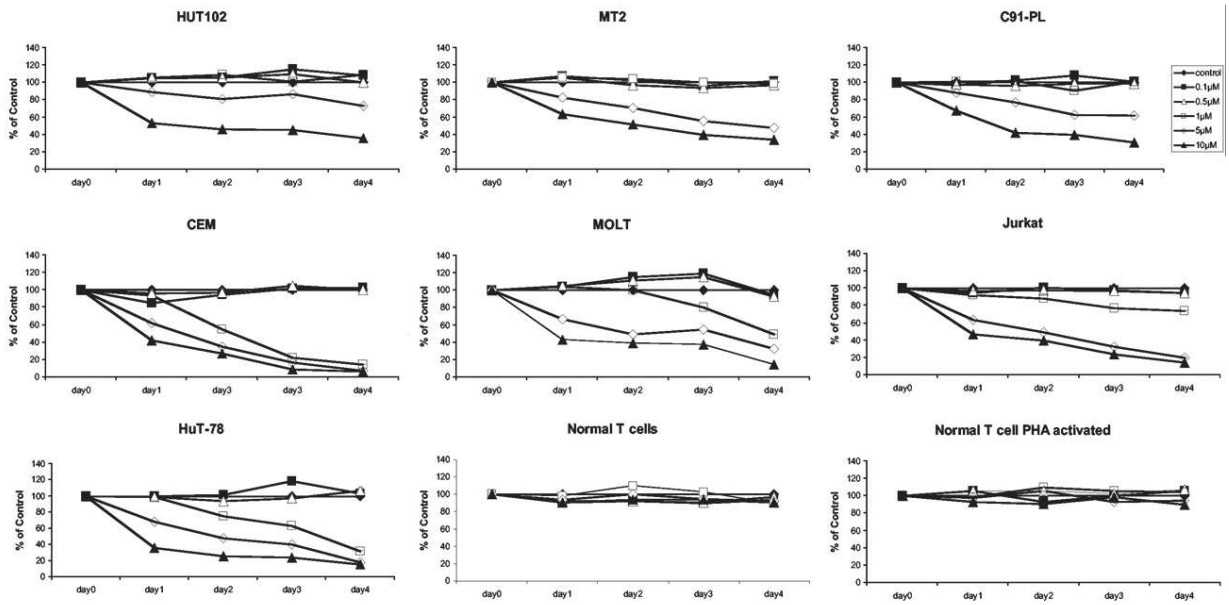


Figure 28. Inhibition de croissance des lignées cellulaires d'ATL à HTLV-I positifs (lignées HuT-102, MT-2 et C91-PL) ou négatifs (lignées CEM, Molt-4, Jurkat et HuT-78) par l'**EAPB0203** [215].

Dans toutes les lignées cellulaires testées, l'**EAPB0203** a induit une augmentation dose-dépendante significative des cellules en phase pré-G0/G1, considérée comme des cellules apoptotiques [215]. Cette augmentation a été observée à la fois dans les cellules HTLV-I négatives et positives. Le traitement par l'**EAPB0203** a également induit des changements significatifs dans la distribution du cycle cellulaire. En effet, la présence de l'**EAPB0203** à une concentration de 5 µM provoque une augmentation de 60 % à 85 % du nombre de cellules en cycle contre 40 % pour les cellules témoins. Cette augmentation était principalement le résultat de l'augmentation du pourcentage de cellules arrêtées aux phases G2/M. Ces résultats indiquent que, conjointement à l'induction de l'apoptose, le traitement par **EAPB0203** induit un arrêt du cycle cellulaire G2/M dans les lymphocytes T malins, ce qui contribue probablement aux effets inhibiteurs de la croissance. Par ailleurs, l'**EAPB0203** est capable d'inhiber la croissance des cellules ATL par diminution des protéines anti-apoptotiques c-IAP-1 et BCL-XL ; ce qui provoque la libération cytoplasmique du cytochrome c, une diminution significative du potentiel de membrane mitochondriale ainsi qu'une induction apoptotique caspase-dépendante [215].

Nous avons ensuite étudié l'effet du traitement par l'**EAPB0203** sur les régulateurs de la cellule. Le traitement des cellules dérivées d'ATL HuT-102 et MT-2 avec une concentration

de 5 µM d'**EAPB0203** a entraîné une augmentation significative des niveaux de protéine p21 et p53. En revanche, dans les cellules HTLV-I-négatives CEM et Jurkat, le traitement par l'**EAPB0203** n'a eu aucun effet sur la protéine p53, alors que p21 est resté indétectable. Ces résultats suggèrent une implication potentielle de la voie p53, dans l'inhibition de la croissance induite par l'**EAPB0203** des cellules T malignes.

Des effets similaires ont été observés avec l'**EAPB0503** sur des lignées de leucémie myéloïde chronique (CML) (Figure 29) [216]. L'**EAPB0503** conduit à une induction de l'apoptose sur les lignées CML en augmentant la population pré-G0 (Figure 29.A) et en augmentant le pourcentage d'ADN fragmenté (Figure 29.B).

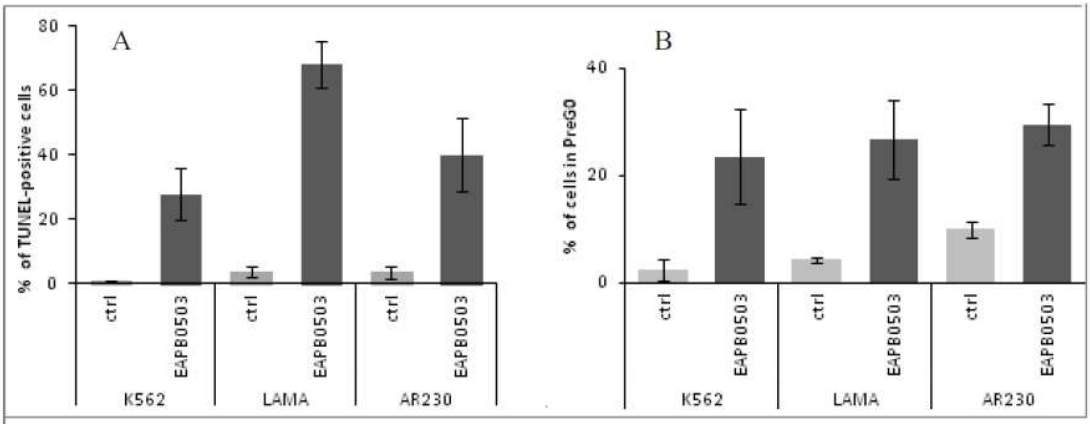


Figure 29. Mise en évidence du mode d'action de l'**EAPB0503** sur des cellules de lignées CML. (A) augmentation de la population Pré-G0. (B) augmentation du pourcentage d'ADN fragmenté [216].

IV – 2. Inhibition de la polymérisation de la tubuline

Les Imiqualines de première génération ont démontré leur capacité à inhiber la polymérisation de la tubuline par perturbation du réseau de microtubules. Cet effet a été mis en évidence en présence de tubuline purifié et de composés à des concentrations de 5 et 10 µM (Figure 30) [216]. La colchicine, un inhibiteur connu comme agent antitubuline naturel, a été utilisée comme référence.

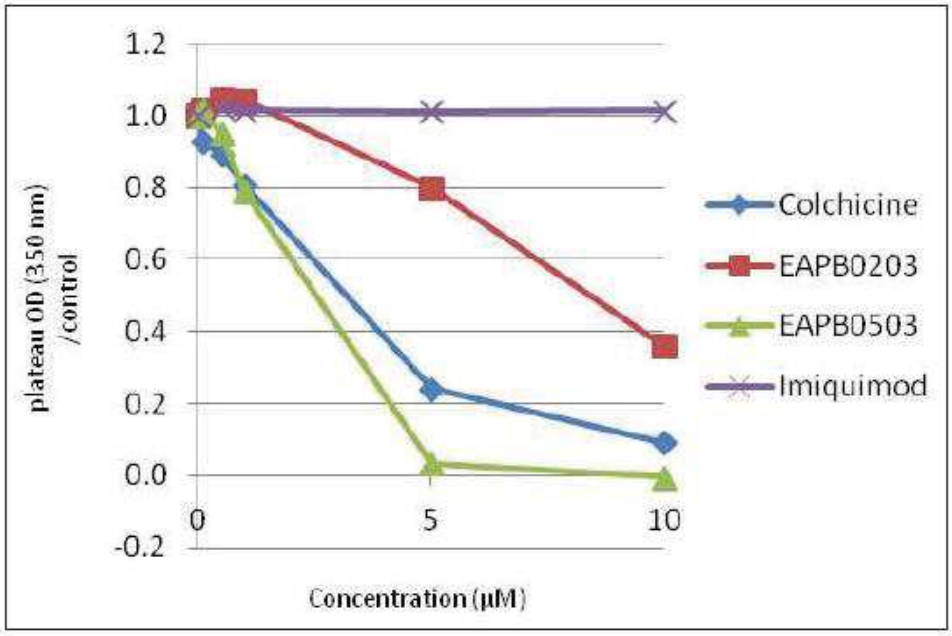


Figure 30. Inhibition de la polymérisation de tubulines purifiées par l'**EAPB0203** et l'**EAPB0503** comparé à l'Imiquimod et à la colchicine pour des concentrations de 5 et 10µM.

Les Imiqualines de première génération induisent une polymérisation différente de celle de la colchicine de la tubuline dite en « forme bouclée » (Figure 31).

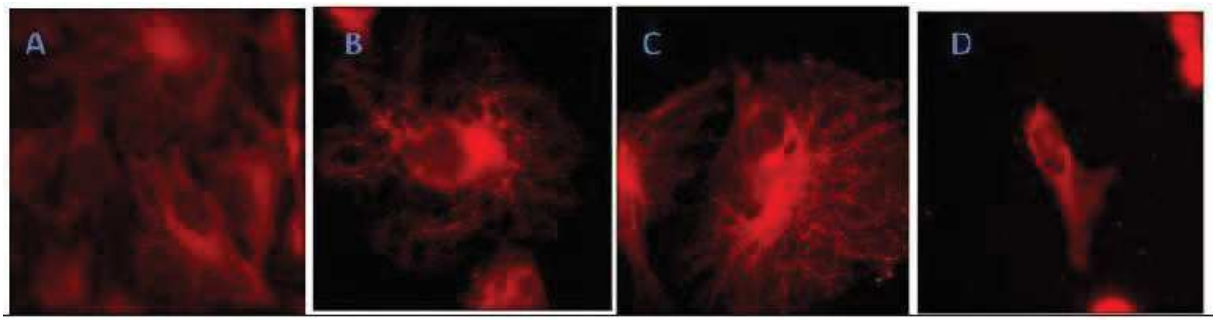


Figure 31. Immunofluorescence sur les cellules A375 à l'aide des anticorps anti-tubuline. (A) Control (B) **EAPB0203** (3.14 µM) (C) **EAPB0503** (0.20µM) (D) Colchicine 1µM.

Par ailleurs, l'**EAPB0503** concentré à 5 µM a démontré une haute efficacité pour inhiber l'assemblage de tubuline avec un pourcentage d'inhibition de 84 % ; soit une puissance d'inhibition significativement plus élevée que la colchicine qui démontrait un pourcentage d'inhibition de 52 %.

IV - 3. Action sur les protéines kinases

Un criblage sur un panel de 196 protéines kinases a été réalisé afin de mettre en évidence une interaction potentielle avec l'**EAPB0203** et l'**EAPB0503**. Celui-ci n'a pas permis de conclure à une action des Imiqualines de première génération sur une cible composée d'une protéine kinase aux concentrations testées (Figure 32).

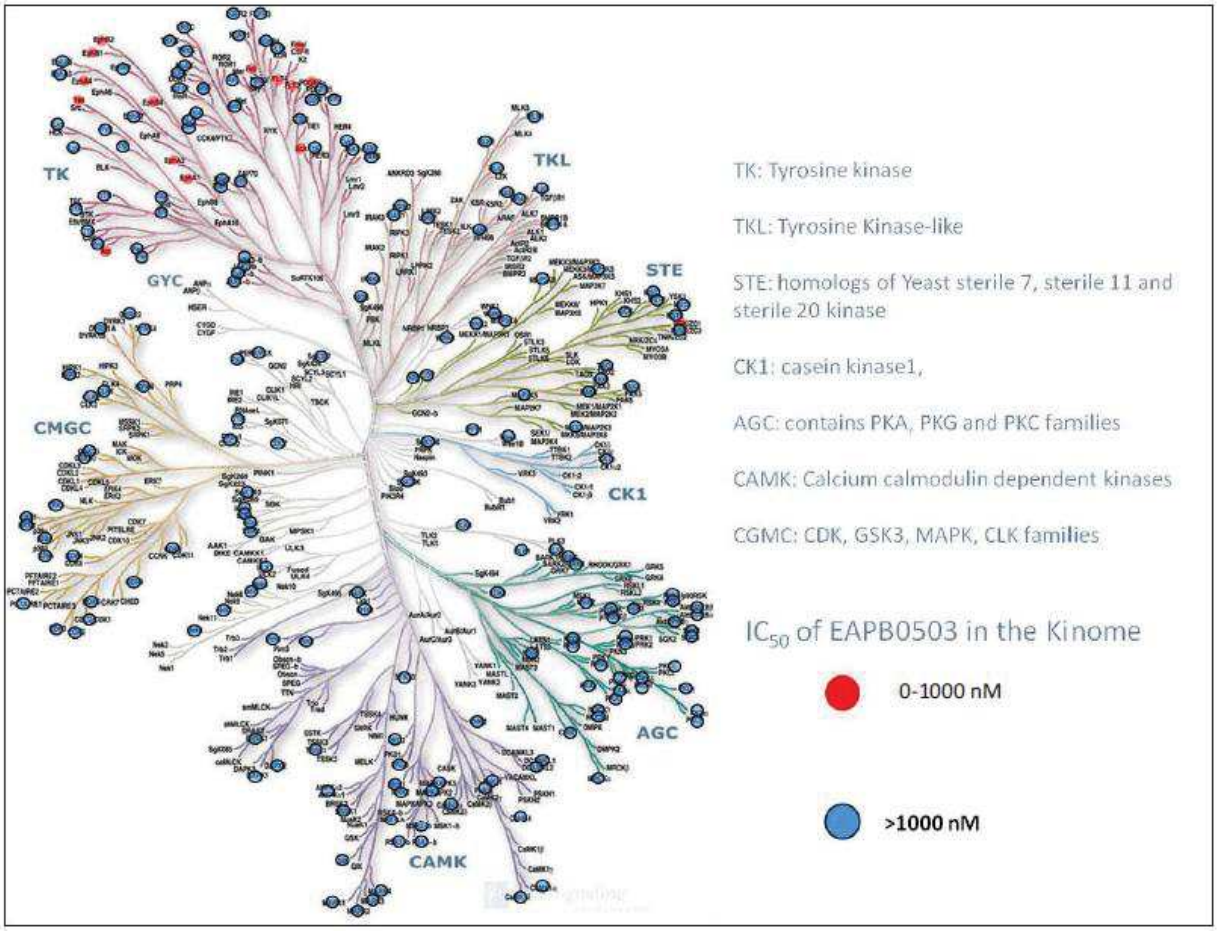


Figure 32. Profil d'inhibition de l'**EAPB0203** et de l'**EAPB0503** sur un panel de 196 protéines kinases (Screening CEREP).

Par ailleurs, notre équipe a également démontré que les Imiqualines de première génération étaient capable d'inhiber les enzymes phosphodiestérases nucléotides cycliques de type 4 [207]. Ces composés entraînent une augmentation du taux d'AMP cyclique intracellulaire ainsi qu'une activation de la voie p38 MAPK et une inhibition de la voie PI3K [217].

La recherche des cibles moléculaires, afin d'identifier le ou les mécanismes d'action exacts des Imiqualines de première génération est encore à l'heure actuelle en cours d'étude.

V – Partie expérimentale : étude galénique de l'EAPB0503

V - 1. Objectifs de l'étude

Dans le cadre d'un développement préclinique pharmaceutique, les composés synthétisés doivent posséder une bonne balance lipophilie/hydrophilie. Les Imiqualines de première génération présentent des solubilités en milieux aqueux particulièrement faibles, avec des coefficients de partage octanol/eau (log P) de 3,67 pour l'**EAPB0203** et de 2,85 pour l'**EAPB0503** (valeurs théoriques grâce aux méthodes de fragmentation disponibles sur le logiciel ACDLabs®). La lipophilie, illustrée par le log P, est une propriété physicochimique des médicaments qui affecte de nombreux mécanismes biologiques, notamment l'absorption et la distribution (absorption, liaison protéique plasmatique et pénétration membranaire) [218]. Ce paramètre peut également être corrélé à la solubilité, au métabolisme et à la toxicité [219,220]. Dans un processus de développement de médicaments, les composés doivent être suffisamment lipophiles pour permettre un passage transmembranaire et en même temps être suffisamment solubles dans l'eau pour atteindre leurs cibles. Par conséquent, une mauvaise solubilité dans l'eau est une cause fréquente de rejet au cours du développement [221]. Lors des études *in vivo* préalablement réalisées par notre équipe, les contraintes de solubilité des Imiqualines de première génération ont été contournées en utilisant des formulations contenant à la fois de l'intralipide et du DMSO afin de favoriser la solubilisation des composés (Tableau 11). Cependant, l'utilisation du DMSO est réputée depuis de nombreuses années pour générer une importante toxicité [222].

Etudes (composé testé)	**Formulation** (Voie d'administration)
Pharmacocinétique rat sprague-Dawley (**EAPB0203** et **EAPB0503**)	**DMSO pur** (IP et IV) [210,211]
Toxicité aiguë rat Sprague-Dawley (**EAPB0203**)	**DMSO pur** (IV) [204,211]
Toxicité subaiguë rat Sprague-Dawley (**EAPB0203**)	**DMSO pur** (IV) [204,211]
Activité souris femelle Swiss nude (**EAPB0203**)	**DMSO/intralipide**; 50:50, v/v (IP) [204,211]

Tableau 11. : Formulations utilisées pour les études *in vivo* des Imiqualines de première génération.

L'objectif de cette étude de formulation galénique de l'**EAPB0503** a été de développer une formulation permettant d'augmenter sa solubilité dans les milieux aqueux et qui soit mieux tolérée par les animaux en utilisant uniquement des excipients non toxiques. Cette formulation devait également permettre de préserver les capacités antitumorales de notre composé et ainsi permettre de réaliser ensuite une étude d'efficacité *in vivo* de l'**EAPB0503** dans de meilleures conditions. Pour cela, nous avons étudié plusieurs formulations galéniques possibles. Parmi celles-ci, nous avons retenu la formulation sous forme de nanocapsules lipidiques. Cette forme galénique présente de nombreux avantages : une stabilité sur plusieurs mois (18 mois 4°C, plus d'un mois à 37°C), une dispersion de taille homogène, une absence de solvant, une proportion faible de tensio-actifs, plusieurs voies d'administration possibles (voies orales, intraveineuses, intrapéritonéale…) ainsi qu'une accumulation tumorale due à la présence de polyéthylèneglycol (PEG) [223]. Ce type de vectorisation comporte plusieurs intérêts : l'augmentation de l'efficacité au site d'action, l'augmentation de l'index thérapeutique et également la diminution des effets secondaires.

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire des Matériaux Avancés pour la Catalyse et la Santé (MACS) de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier (ICGM) sous l'encadrement du Docteur Anne Aubert–Pouëssel et du Docteur Sylvie Bégu. Pour réaliser notre étude, nous nous sommes basés sur des travaux réalisés par l'équipe du professeur Benoit de l'université d'Angers. Le procédé de fabrication développé repose sur le principe d'inversion de phase [223]. Les nanocapsules lipidiques sont constitués d'un cœur lipophile composé de Labrafac® WL 139 (Gattefossé) dans lequel l'**EAPB0503** est préalablement dissous (Figure 33). Autour de ce cœur huileux, un mélange de surfactants permet d'obtenir une couronne de PEG à l'interface phase aqueuse/phase huileuse.

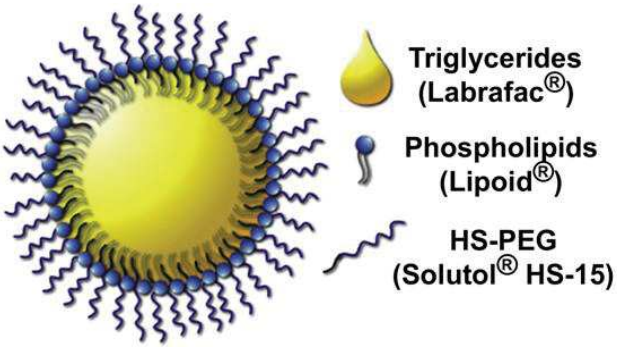


Figure 33. Structure d'une nanocapsule obtenue avec le procédé basé sur l'inversion de phase [223].

V - 2. Résultats

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article 1 "*Lipid nanocapsules formulation and cellular activities evaluation of a promising anticancer agent:* ***EAPB0503***" publié par la revue *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, le 11 Décembre 2017.

V – 3. Discussion

Cette étude nous a permis de mettre au point deux formulations de l'**EAPB0503** sous forme de nanocapsules lipidiques. Ces formulations présentent des tailles homogènes de 111,7 ± 0,9 nm et de 116,5 nm avec des index de polydispersité inférieurs à 0,1 pour les formulations chargées à 1,7 ± 0,1 mg/mL (formulation basse) et 8,2 mg/mL (formulation haute) respectivement. La stabilité de la formulation basse a été testée sur une période de quatre semaines dans trois conditions de températures différentes (4°C, 20°C et 37°C). Sur cette période testée, la formulation est stable avec des particules de tailles qui ne varient pas par rapport à la composition initiale. La mise au point de cette formulation est réalisée avec un procédé simple et des composants reconnus pour leur absence de toxicité. Cette formulation a également été évaluée en termes de conservation de l'activité cytotoxique sur trois lignées cellulaires cancéreuses humaines (A375, MCF7 et LS174T ; lignées cellulaires de mélanome, de cancer du sein et de cancer du côlon respectivement). L'activité cytotoxique de l'**EAPB0503** n'est pas perturbée du fait de la formulation sous forme de nanocapsules lipidiques (comparaison par rapport à des solutions d'**EAPB0503** dans du DMSO). Ces résultats encourageants nous permettent d'améliorer sensiblement la solubilité apparente de l'**EAPB0503** et donc d'envisager de meilleurs résultats d'efficacité lors d'études *in vivo* à venir.

VI. Article 1 : “Lipid nanocapsules formulation and cellular activities evaluation of a promising anticancer agent: EAPB0503.”

Publication acceptée par la revue *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, le 11 Décembre 2017.

[Downloaded free from http://www.jpionline.org on Friday, April 6, 2018, IP: 206.167.239.2]

Original Research Article

Lipid nanocapsules formulation and cellular activities evaluation of a promising anticancer agent: EAPB0503

Adrien Chouchou, Anne Aubert-Pouëssel[1], Christophe Dorandeu[1], Zahraa Zghaib, Pierre Cuq, Jean-Marie Devoisselle[1], Pierre-Antoine Bonnet, Sylvie Bégu[1], Carine Deleuze-Masquefa

CNRS, ENSCM, IBMM, University of Montpellier, [1]UMR 5253, CNRS, ENSCM, University of Montpellier, Institut Charles Gerhardt Montpellier, Montpellier, France

Abstract

Objective: EAPB0503, lead compound of imiqualines, presented high antitumor activities but also a very low water solubility which was critical for further preclinical studies. To apply to EAPB0503, a robust and safe lipid formulation already used for poor soluble anticancer agents for injectable administration at a concentration higher than 1 mg/mL.

Materials and Methods: Physicochemical properties of EAPB0503 were determined to consider an adapted formulation. In a second time, lipid nanocapsules (LNC) formulations based on the phase-inversion process were developed for EAPB0503 encapsulation. Then, EAPB0503 loaded-LNC were tested *in vitro* on different cell lines and compared to standard EAPB0503 solutions.

Results: Optimized EAPB0503 LNC displayed an average size of 111.7 ± 0.9 nm and a low polydispersity index of 0.059 ± 0.002. The obtained loading efficiency was higher than 96% with a drug loading of 1.7 mg/mL. A stability study showed stability during 4 weeks stored at 25°C. *In vitro* results highlighted similar efficiencies between LNC and standard EAPB0503 solutions prepared in dimethyl sulfoxide.

Conclusion: In view of results obtained for loading efficiency and drug loading, the use of a LNC formulation is very interesting to permit the solubilization of a lipophilic drug and to improve its bioavailability. Preliminary tested pharmaceutical formulation applied to EAPB0503 significantly improved its water solubility and will be soon considered for future preclinical *in vivo* studies.

Keywords: Cancer chemotherapy, encapsulation, formulation, imiqualines, nanocapsules, solubility

Address for correspondence: Prof. Carine Deleuze-Masquefa, UFR Pharmacie, 15 Avenue Charles Flahault, 34 000 Montpellier, France.
E-mail: carine.masquefa@umontpellier.fr

INTRODUCTION

According to estimates from the International Agency for Research on Cancer, in 2012, there were 14.1 million new cancer cases and 8.2 million cancer deaths worldwide.[1] The occurrence of cancer is increasing because of the growth and aging of the population, as well as an increasing prevalence of established risk factors such as smoking, overweight, and physical inactivity. The most commonly diagnosed cancers were lung (1.82 million), breast (1.67 million), and colorectal (1.36 million); the most common causes of cancer death were lung cancer (1.6 million deaths), liver cancer (745,000 deaths), and stomach cancer (723,000 deaths).[2] A therapeutic arsenal is available for clinicians with alkylating agents, antimetabolites, antimicrotubule agents, topoisomerase inhibitors, or cytotoxic

Access this article online	
Quick Response Code:	Website: www.jpionline.org
	DOI: 10.4103/jphi.JPHI_53_17

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as the author is credited and the new creations are licensed under the identical terms.

For reprints contact: reprints@medknow.com

How to cite this article: Chouchou A, Aubert-Pouëssel A, Dorandeu C, Zghaib Z, Cuq P, Devoisselle JM, *et al*. Lipid nanocapsules formulation and cellular activities evaluation of a promising anticancer agent: EAPB0503. Int J Pharma Investig 2017;7:155-63.

[Downloaded free from http://www.jpionline.org on Friday, April 6, 2018, IP: 206.167.239.2]

antibiotics, but it presents some limitations with the failure of cure because of delivery problems (blood brain barrier) or of resistance. Then, the development of new drugs is required. We studied imidazo [1,2-*a*] quinoxaline compounds, also called imiqualines (protected by a patent since 2008 and granted in the USA in February 2013).[1,4] Heterocyclic systems containing the quinoxaline moiety exhibit high biological activities such as antitumor, antiviral, antibacterial, or anti-inflammatory.[5] Among the derivatives annulated at bond A, imidazoquinoxalines hold a special place since many active compounds have been developed[6] and among them, EAPB0203 and EAPB0503 derivatives have been identified as lead compounds thanks to their *in vitro* activities against human melanoma cancer cell lines (A375, M4Be).[7] These two compounds are characterized by a phenylethyl moiety for EAPB0203 and a methoxyphenyl moiety for EAPB0503 in position 1 of the heterocycle structure [Figure 1]. EAPB0503 has shown potent inhibition of the tubulin polymerization which is correlated to its antiproliferative activity.[8] EAPB0503 is considered as a promising anticancer agent as it presents a 9-fold increase activity compared to EAPB0203, but it presents very high lipophilicity (logP = 4.48) which is critical for further preclinical studies.

For many years, the industrial development of new anticancer molecules often stopped because of (i) their poor selectivity responsible for major adverse effects and (ii) their poor water-solubility decreasing their bioavailability.[9,10] To overcome these mains hurdles, nanomedicine was increasingly developed to improve the drug solubility and the targeting of cancer cells. In this context, liposome formulations are being marketed in several types of cancers with specialties such as Myocet® and Doxil® (doxorubicin) or Daunoxome® (daunorubicin).[11,12] However, liposomes have significant drawbacks: Their manufacturing processes may require the use of solvents, their encapsulation rates are not optimal and their stability in biological fluids is insufficient.[13] During the last 20 years, new drug carriers and called lipid nanoparticles (LNC) have been designed to overcome these drawbacks.[14]

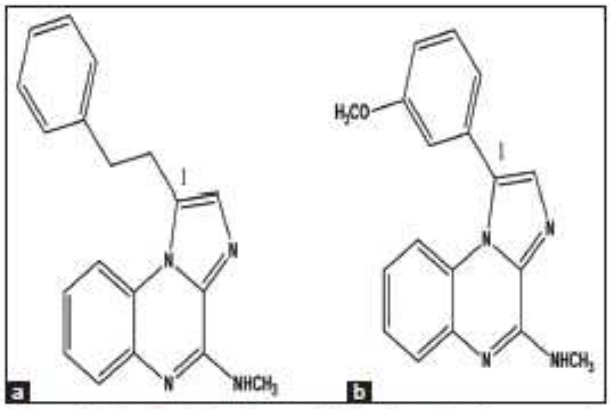


Figure 1: Chemical structures of imiqualines lead compounds: (a) EAPB0203 and (b) EAPB0503

Among them, LNC nanocarriers were developed by Heurtault *et al.*[15] They are based on the phase-inversion process and are organized with an oily core surrounded by a membrane composed of mixture of lecithin and pegylated surfactant.[16] LNC formulation is interesting for multiple benefits: The use of pharmaceutical excipients approved for *in vivo* administration,[17] the simplicity of the method which requires no organic solvents and provides high encapsulation efficiencies.[14] Moreover, LNC represent the best compromise between stability in biological fluids, ability to encapsulate efficiently lipophilic drugs, and specific targeting of cancer cells. LNC present *in vitro* release profiles following zero-order kinetics with an almost complete release after 24 h at 37°C.[18] This release profile associated with tumor accumulation due to the Enhanced Permeation and Retention (EPR) effect allow a significantly increase of the effectiveness of the encapsulated drugs while reducing side effects.[16] Moreover, LNC are interesting nanocarriers also for their versatility; it would be possible to modify their surface with antibodies to improve targeting and then therapeutic efficiency.[19] Moreover, such LNC showed reverse resistance against the P-glycoprotein, which is an important and the best-known membrane transporter involved in multidrug resistance.[20] LNC have already been used to formulate anticancer agents with high lipophilicity, such as paclitaxel (logP = 3.2) and etoposide (logP = 0.73) to increase bioavailability for paclitaxel[21] or increase *in vitro* activity for etoposide.[22] Hence, LNC appeared as a promising tool for EAPB0503 encapsulation both to dispose of an injectable formulation, to reach higher EAPB0503 intratumoral concentrations and to take advantages of EPR effect.[23]

In this article, physicochemical properties of EAPB0503 were first determined to consider an adapted formulation. In a second time, LNC formulations loaded with EAPB0503 were developed. Obtained LNC presented satisfying loading efficiencies and size distribution. Then, EAPB0503 loaded-LNC were tested *in vitro* on different cell lines and showed improved activities compared to standard EAPB0503 solutions in dimethyl sulfoxide (DMSO), highlighting their potential as candidates for anticancer therapies.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

EAPB0503 (1-[3-methoxyphenyl]-*N*-methylimidazo [1,2-*a*] quinoxalin-4-amine; molecular weight, 304 g/mol) was

synthesized by the Pharmacochemistry and Biomolecules laboratory (IBMM Montpellier, France).[7] This compound was stored at 20°C protected from light. Lipoïd® S75-3 (soybean lecithin at 70% of phosphatidylcholine and 10% phosphatidylethanolamine) was obtained from Lipoïd Gmbh (Ludwigshafen, Germany). Kolliphor® HS 15 (mixture of free polyethylene glycol [PEG] 660 and PEG 660 hydrostearate) was a gift from BASF® (Ludwigshafen, Germany). Labrafac® WL 139 was obtained from Gattefossé (Saint-Priest, France). Purified water was obtained from a MilliQ® System (Millipore, Paris, France). Vegetable oils were obtained from Cooper (Melun, France) and were approved for pharmaceutical use. Salts and solvents high-performance liquid chromatography (HPLC) grade were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA). Neutral red, isopropyl alcohol, and hydrochloric acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

LogP

The logP values of n-octanol/water were calculated by the commercially available computer programs ACDlabs software (ACD/Structure Elucidator, version 12.01, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2012).

Physicochemical characterization of EAPB0503

In addition to the analyses previously described (NMR, HR-MS, and elemental analysis),[7] we conducted complementary analyses to accurately characterize the drug.

Thermal analysis

Differential scanning calorimetry (DSC) measurements and thermogravimetric analysis (TGA) were performed using a DSC 4000 standard single-furnace equipped with an intracooler and a STA6000 (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA). DSC and TGA experiments were carried out under an inert atmosphere, with 2 bars nitrogen pressure. Samples were weighed (5.0 ± 0.5 mg) in standard 50 µL aluminum sealed pan for DSC and in ceramic pan for TGA. To determine melting or crystallization temperatures of EAPB0503, DSC experiment was carried out from 0°C to 350°C and from 350°C to 0°C at a rate of 10°C/min. To determine the degradation temperature of EAPB0503, TGA was performed from 20°C to 350°C at a rate of 10°C/min.

Solubility of EAPB0503 in oils and solvents

First, a screening study was performed to select oils (pharmaceutical grade) able to solubilize EAPB0503. Labrafac® WL 139, castor, olive, soybean, and sesame oils were tested. 5 mg of EAPB0503 was added in 1 g of oil, the samples were mixed with magnetic stirring during 24 h at 20°C. Then, samples were observed to evaluate the solubility of EAPB0503. Second, the saturation solubility of EAPB0503 in solvents was determined by HPLC.[24,25] Solvents were saturated with EAPB0503 and then centrifuged at 5000 g for 5 min using a Sigma 2k 25 ultracentrifuge (Sigma Zentrifugen, GmbH, Germany). The supernatant was assayed by HPLC with a LC62010HT (Shimadzu, Kyoto, Japan) using a C8 Zorbax® eclipse XDB (Extra-Dense Bonding) analytical column (150 mm × 4.6 mm, 5 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Chromatographic conditions were optimized to improve sharp peak shape with adequate response. This included composition of the mobile phase, pH of buffer solution, flow rate, and also column type (C8, C18, or Shield RP18). Using the C18 or Shield RP18 column, analytes were too retained due to hydrophobic interactions. Best separations of the analytes and relative short analysis time were obtained on a C8 Zorbax eclipse XDB using a mobile phase consisting of acetonitrile and 2 mM ammonium formate buffer pH = 3 (0.6 mL/min during a run time of 12 min). The column was maintained at 20°C and the autosampler temperature was 4°C. The detection was carried by a UV lamp (UV–VIS detector, Shimadzu, Kyoto, Japan). The data acquisition was under the control of Analyst 1.5.2 Software. Standard EAPB0503 solutions prepared in DMSO within a range 50–1000 µg/mL were used for a calibration curve (calibration curve: $r^2 = 0.998$ and % RSD is 2.5).

Formulation of lipid nanocapsules

100 nm LNC suspensions were prepared according to Heurtault *et al.* process[19] without EAPB0503 (called blank LNC) and loaded with EAPB0503 at low concentration (called LNC low) or at high concentration (called LNC high) [Table 1]. The proportions of each excipient (Labrafac® WL 139 as oil phase, Kolliphor® HS 15 and Lipoïd® S75-3 as surfactants) were chosen according to the tertiary diagrams published by Heurtault *et al.*[16] and are approved by the FDA for parenteral administration. This formulation phase-inversion process is based on two steps. First, magnetic stirring

Table 1: Composition of lipid nanocapsules suspensions loaded (lipid nanocapsules low and lipid nanocapsules high) or not (blank lipid nanocapsules) in EAPB0503

Formulation	Blank LNC	LNC low	LNC high
Kolliphor® HS 15	0.484 g	"	"
Lipoïd® S75-3	0.075 g	"	"
Labrafac® WL 139	1.209 g	"	"
NaCl	0.089 g	"	"
Purified water	3.143 g	"	"
Purified water 4°C	7 g	"	"
EAPB0503	-	0.014 g	0.090 g

LNC: Lipid nanocapsules

[Downloaded free from http://www.jpionline.org on Friday, April 6, 2018, IP: 206.167.239.2]

at 300 rpm of all components was realized during four heating-cooling cycles (from 60°C to 90°C then a cooling from 90°C to 60°C at a rate of 4°C/min) using a hotplate digital stirrer. Magnetic agitation was kept at 300 rpm during the whole process. The second step consisted on an irreversible shock induced by dilution with 7 g of purified cold water (4°C) to the mixture at the transition phase. Finally, a slow magnetic stirring (150 rpm) was applied to the suspension for 5 min at room temperature. In a final step, LNC suspensions were filtered using Minisart® syringe filters 0.2 µm (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany).

The phase inversion method reported by Heurtault *et al.*[16] was modified for the preparation of LNC high suspension with the addition of chloroform (5 g) to increase EAPB0503 solubility. LNC high formulation enabled us to determine the maximum encapsulation capacity of nanocapsules. The chloroform was preferred to solubilize EAPB0503 because the heating cycles permitted its evaporation. Due to the possible presence of residual organic solvent, this formulation was not intended for pharmaceutical application and this reason was not be evaluated on cell lines.

Characterization of lipid nanocapsules

Size measurement and stability study

Size distribution, polydispersity index (PDI), and zeta potential measurements of LNC suspensions were determined by photon-correlation spectroscopy using a Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instruments, Northampton, UK). 20 µL of LNC suspension was diluted to 1000 µL of purified water and added in disposable capillary cells (Malvern Instruments, Northampton, UK). Measurements were conducted in triplicate at 25°C. The helium-neon laser operates at 663 nm with the scatter angle fixed at 173°. The autocorrelation function was modeled using the NonNegative Least Squares algorithm.

For the stability study, LNC low and blank LNC were divided into three groups immediately after preparation and stored at 4°C, 25°C, and 37°C. Samples were tested at day 0, 7, 14, and 28 for size distribution and PDI measurements as described above.

Determination of EAPB0503 loading and loading efficiency

The EAPB0503 loading was carried out by HPLC (conditions previously described). In a first step, LNC were diluted in DMSO (by a factor 10) to solubilize all components, and then centrifuged at 5000 g for 5 min using a Sigma 2k 25 ultracentrifuge (Sigma Zentrifugen, GmbH, Germany). The supernatant containing EAPB0503 solubilized in DMSO was then assayed by HPLC. The loading efficiency was determined by dividing the experimental drug loading by the theoretical drug loading.

Morphology by transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) analysis was performed with a TEM Jeol 1200EXII (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) with an accelerating voltage of 100 kV and equipped with Quemesa Camera (Olympus, Japan). LNC suspensions were deposited on Formvar® copper TEM grids (Agar Scientific, Stansted, UK) and dried for 30 min at 25°C.

In vitro cytotoxic activity

Cell lines and culture techniques

Human cancer cell lines (A375, MCF-7 and LS174T) were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). A375 is a malignant melanoma cell line, MCF-7 is a metastatic breast cancer cell line, and LS174T is a malignant colon adenocarcinoma cell line. Cells were cultured in DMEM (Dulbecco's modified eagle media) medium supplemented with 10% heat-inactivated (56°C) fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin G sodium, and 100 µg/mL streptomycin sulfate (Gibco, Invitrogen, UK). Cells were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air at 37°C.

Cytotoxicity assay

The neutral red viability test was carried out in optimized conditions (number of cells by well and the neutral red concentration). In all experiments, A375 MCF-7 and SL174T cells were seeded at a final concentration of 2500 cells/well in 96-well microliter plates and adhered overnight. At day 1, cells were exposed to negative vehicle controls (1% DMSO/culture medium and culture medium alone), to positive control (EAPB0503 solution at 10^{-2} M in DMSO used from 2.5 to 5000 nM), and LNC low suspensions (3.5–7000 nM). After 96 h of incubation, 100 µL of neutral red solution in PBS (15 µL/mL, phosphate-buffer saline pH 7.3) was added to each well, and the wells were incubated at 37°C for 3 h. Then, the supernatant was carefully aspirated, and 100 µL of a mixture of isopropyl alcohol and 1 M hydrochloric acid (96/4, v/v) were added to each well. After 10 min of incubation and shaking, the optical density was measured at 570 nm in a microculture plate reader Dynatech MR 5000 (Dynex, Paris, France). For each assay, six experimental replications were performed in triplicate.

The individual cell line growth curves confirmed that all tumor lines in control medium remained in the log phase of cell growth 96 h after plating. Cell survival was expressed as percent of vehicle control. The IC_{50}

[Downloaded free from http://www.jpionline.org on Friday, April 6, 2018, IP: 206.167.239.2]

values defined as the concentration of drug which produced 50% cell growth inhibition. About 50% reduction of absorbance was estimated from the sigmoid dose-response curves.

Statistics

Results were expressed as mean values ± standard deviation a Student's *t*-test was used for statistical comparison or analysis. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Physicochemical characterization of EAPB0503

TGA analysis showed a degradation temperature of EAPB0503 at 347°C (onset 210°C) and the presence of linked water (4% weight loss 150°C) (data not shown). Two endothermal melting peaks were observed in DSC at 147.27°C ± 0.47 and at 166.43°C ± 0.40 with a heat of fusion around 90 and 45 J/g, respectively. This reflected the presence of a mixture of two species, nevertheless, their proportion remains identical with reproducible thermograms whatever the sample (data not shown). It could be due to a hydrated form, confirmed by the presence of water in TGA. No crystallization peak was observed, despite an X-ray diffractogram showing numerous peaks (data not shown) meaning a crystalline solid. Therefore, EAPB0503 synthesis leads to reproducible batches and their thermal stability permits to ensure that EAPB0503 will not be degraded during LNC formulation process.

The solubility of EAPB0503 was determined in different oils at room temperature for a 5 mg/mL concentration as a biological efficient concentration. In vegetable oils (castor, olive, soybean, and sesame), the solubilization of the EAPB0503 was not complete; only the semi-synthetic oil Labrafac® WL 1349 allowed us to reach a 5 mg/mL concentration and even more (12 mg/mL). Then, the maximum concentration of EAPB0503 in the various studied solvents was determined by HPLC [Table 2], with an EAPB0503 retention time of 5.3 min. The maximum concentration of EAPB0503 was observed in dimethylacetamide (DMA) (24.8 mg/mL) and in DMSO (16.6 mg/mL). DMSO is less viscous than DMA. Hence, DMSO was used for the determination of the drug loading and loading efficiency. The low water solubility of EAPB0503 was also confirmed with a maximum concentration of EAPB0503 in purified water <0.1 mg/mL.

Characterization of lipid nanocapsules

Size distribution and stability studies

Results presented in Table 3 showed blank LNC sizes centered around 100 nm (102.4 ± 0.3, $n = 3$) with a narrow distribution (PDI lower than 0.05). Loaded-LNC presented a slightly increased size at 111.7 ± 0.9 ($n = 3$) and 116.5 nm ($n = 1$) for low and high LNC, respectively. As a single peak was observed for loaded LNC samples, EAPB0503 was then localized into the nanocapsules. Due to the low water solubility, the amount of unencapsulated EAPB0503 has been eliminated during final filtration step. A stability study analyzing size measurements and PDI of blank LNC and LNC low was performed over a period of 28 days at 4°C, 25°C, and 37°C. The results of this study presented in Figure 2 highlighted the stability of the blank and loaded LNC with no modification neither of their size nor their PDI. LNC low were stable over the three temperatures for the tested period as particle size was 112.9 ± 1.8 nm at day 28 (37°C) compared to 111.7 ± 0.92 nm at day 0 ($n = 3$). PDI remained inferior to 0.1 during the whole period, whatever the temperature. Moreover, for all formulations, the zeta potentials were around-5 mV (data not shown) as expected as LNC possess a neutral surface charge due to their PEG shell.[26] The pH values were around 6 allowing us to consider intravenous or intraperitoneal routes of administration for *in vivo* studies (data not shown).

Table 2: Solubility (mg/mL) of EAPB0503 in different solvents performed by high-performance liquid chromatography (retention time 5.3 min)

Solvent	Maximum concentration (mg/mL)
Dimethylacetamide	24.8
Dimethyl sulfoxide	16.6
Chloroform	5.8
Methanol	0.7
Absolute ethanol	0.5
Phosphate buffered saline	<0.1
Purified water	<0.1

Table 3: Lipid nanocapsules suspension characterizations: Size distribution (nm), polydispersity index, EAPB0503 loading (mg/mL), and loading efficiency (%) of EAPB0503

LNC suspension characterizations	Blank LNC (n=3)	LNC low (n=3)	LNC high (n= 1)
Size (nm)	102.4±0.3	111.7±0.9	116.5
Polydispersity index	0.044±0.003	0.059±0.002	0.048
EAPB0503 loading (mg/mL)	-	1.7±0.1	8.2
EAPB0503 loading efficiency (%)	-	96.7±2.1	72.7

LNC: Lipid nanocapsules

Determination of loading efficiency and drug loading

To achieve the drug loading and loading efficiency dosage of EAPB0503-loaded LNC, DMSO was used for its solubilizing properties. The loading efficiency of LNC low was satisfactory with around 97% of EAPB0503 entrapped into nanocapsules. For LNC high, the efficiency was lower around 73%, but undeniably, LNC formulations allowed us to improve EAPB0503 solubility in aqueous system by a factor 17–82. Indeed, solubility values have risen

[Downloaded free from http://www.jpionline.org on Friday, April 6, 2018, IP: 206.167.239.2]

from <0.1 to 1.7 mg/mL and 8.2 mg/mL for LNC low and LNC high, respectively.

Morphology by transmission electron microscopy

TEM showed LNC presenting rounded shapes with a size distribution in accordance with the size measurements obtained by photon-correlation spectroscopy [Figure 3]. LNC were homogeneously dispersed without aggregate thanks to their shell of PEG chains.

In vitro cytotoxic activity

The neutral red viability test was used to determine *in vitro* cytotoxicity after exposure of LNC suspensions (loaded or not with EAPB0503). Results of *in vitro* tests on A375, MCF-7, and LS174T cancer cell lines showed similar efficiencies between LNC low and standard EAPB0503 solutions in DMSO. The cell survival profiles of the A375 cells, the MCF-7 cells, and the LS174T cells exposed on blank-LNC, LNC low and standard EAPB0503 solution were illustrated in Figure 4. IC_{50} values were, for LNC low and standard EAPB0503 solutions respectively, 192 nM and 230 nM on A375 cell lines, 305 nM and 217 nM on MCF-7 cell lines and 931 nM and 868 nM on LS174T cell lines [Table 4]. Therefore, the cytotoxic activity of EAPB0503 was not modified by its encapsulation in LNC. A saline solution was tested with salt concentration equivalent to the LNC suspension, and no cytotoxic activity was found on tested cell lines. Similarly, blank LNC did not present cytotoxic activities on all tested cell lines (IC_{50} >10 μmol/L). Therefore, the cytotoxic activity found for LNC low formulation is due to compound EAPB0503 and not to the formulation or vehicle.

DISCUSSION

This study allowed us to formulate a poor soluble imiqualine in LNC for future intravenous administration. The potential of imiqualines as anticancer agent was already demonstrated *in vitro* with EAPB0203 compound. It can induce inhibition of cell proliferation, G2/M cell cycle arrest, and to initiate the apoptotic process via the intrinsic cell death pathway converging at the mitochondria.[27] Its effect on resistant T lymphocytes was also highlighted. In the same way, we proved that EAPB0503 possessed more potent and induced a specific cell cycle arrest in mitosis in chronic myeloid leukemia cells and direct activation of apoptosis.[28] Both compounds were able to impair A375 cell line growth, block cells in G2 and M phases, and induce cell death and apoptosis, with IC_{50} values of 0.2 μM for EAPB0503 and 1.57 μM for EAPB0203.[7] This confirmed that EAPB0503 was more potent than EAPB0203, and it reinforced our will to promote this anticancer agent.

Concerning the therapeutic scheme, we previously showed that EAPB0203 (20 mg/kg i.p., twice a week for 3 weeks followed by a second cycle after a wash-out of 15 days) had significant higher anti-tumor activity in

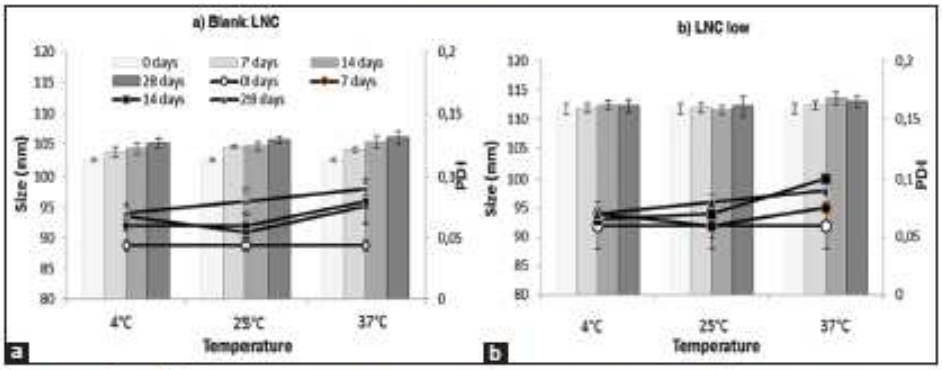


Figure 2: Stability study results of (a) lipid nanocapsules not loaded (blank lipid nanocapsules) and (b) lipid nanocapsules loaded in EAPB0503 (lipid nanocapsules low) over 4 weeks stored at 4°C, 25°C and 37°C ($n = 3$). Stability is monitored with average particle size (columns) and Polydispersity Index (○, ●, ■ and ▲) changes upon storage

Table 4: Concentrations of drugs which produced 50% cell growth inhibition (IC50) on A375, MCF-7 and LS174T cancer cell lines of EAPB0503 solution in dimethyl sulfoxide, lipid nanocapsules suspensions loaded (lipid nanocapsules low) or not (blank lipid nanocapsules) in EAPB0503 and saline solution. For each assay, six experimental replications were performed in triplicate

Cell lines	EAPB0503 (nM)	LNC low (nM)	Blank LNC (μM)	Saline solution (μM)
A375	230±98.3	192±19.3	>10	>10
MCF-7	217±20.0	305±25.1	>10	>10
LS174T	868±323	931±334	>10	>10

LNC: Lipid nanocapsules

[Downloaded free from http://www.jpionline.org on Friday, April 6, 2018, IP: 206.167.239.2]

human melanoma (M4Be) xenografted nude mice than fotemustine (weekly intraperitoneal administration of 20 mg/kg for 3 weeks followed by a second cycle after a wash-out of 15 days).[29] To achieve this experiment, EAPB0203, poorly soluble in water, was dissolved in a mixture intralipid/DMSO (50:50, v/v) at the concentration of 1 mg/mL. This formulation allowed us to determine the minimal concentration to obtain the first results of *in vivo* activities. However, such a mixture of intralipid/DMSO presented drawbacks mainly because of the toxicity of DMSO, and an alternative formulation has to be developed with a required minimal concentration of 1 mg/L.[30] Finally, the administration route had to be determined. Pharmacokinetics parameters investigated in rats, especially the bioavailability after intraperitoneal administration, which showed values of 22.7% for EAPB0203 and 35% for EAPB0503.[31] Consequently, to increase the *in vivo* activities of compounds, intravenous administration has to be considered.

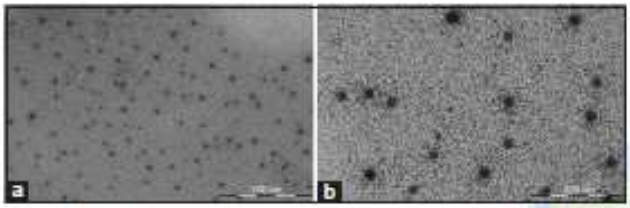


Figure 3: Transmission electron microscopy performed on lipid nanocapsules low suspensions left to dry for 30 min at 25°C after being deposited on Formvar® copper transmission electron microscopy grids

The global results obtained on EAPB0203 and EAPB0503 permitted to identify EAPB0503 as a new lead compound of imiqualines derivatives. The evolution of chemical structure between EAPB0203 and EAPB0503 did not allow to decrease the lipophilic property (logP: 4.60 and 4.48, respectively). Consequently, the water solubility was not sufficient to use a classical formulation for intravenous administration.

The preliminary formulation tests considered the EAPB0503 solubility in oils. In various vegetable oils (castor, olive, soybean, and sesame oils), solubilities were not sufficient to obtain solutions with concentrations higher than 1 mg/mL. On the other side, EAPB0503 showed a satisfactory solubility in Labrafac® WL 139 (higher than 12 mg/g). Emulsion-based formulations were tested, but obtaining stable and micrometric sized emulsions required high energy processes and high levels of surfactants with potential toxicity.[32] Thus, we considered a nanoencapsulation strategy and the formulation of EAPB0503-loaded LNC as injectable delivery systems. Different hydrophobic anticancer drugs have been encapsulated by this process. For example, etoposide, which water solubility is 0.978 mg/mL, was formulated in

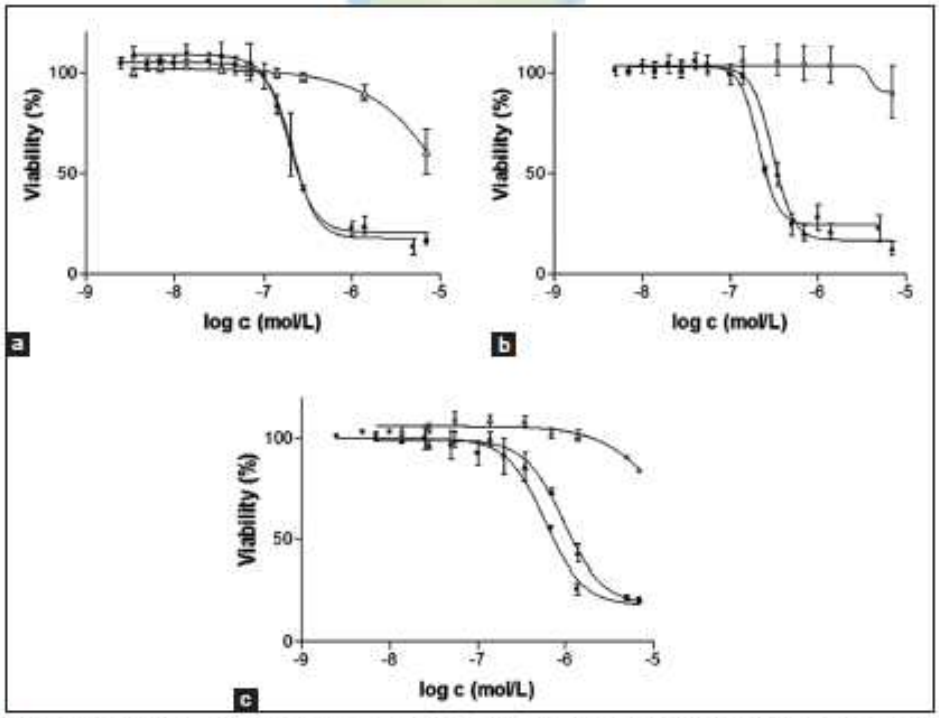


Figure 4: Cell viability assay on A375 (a), MCF-7 (b) and LS174T (c) cell lines after 72h relatively to the concentration of EAPB0503 loaded (lipid nanocapsules low: ▲) or not (blanck lipid nanocapsules: △) in lipid nanocapsules or in standard EAPB0503 solution in dimethyl sulfoxide (■). For each assay, six experimental replications were performed in triplicate

[Downloaded free from http://www.jpionline.org on Friday, April 6, 2018, IP: 206.167.239.2]

LNC with a drug loading of 6.5 ± 3.0 mg/g and a drug efficiency of 56.7 ± 21.3%.[19] More hydrophobic drugs such as docetaxel and paclitaxel (with a water solubility of 0.0127 mg/mL and 0.00556 mg/mL, respectively) were also encapsulated with drug efficiency around 67%–90% and 95%–96%[18,33] leading to drug loadings of 2 mg/mL and 4 mg/mL, respectively. In addition to their solubilizing properties, LNC offer the size control via their composition.[34] We chose the optimal formulation to obtain EAPB0503-loaded LNC with an average size of 100 nm and a PDI lower than 0.1 compatible with an injectable administration. Hence, homogeneous and stable 111.7 ± 0.9 nm LNC were obtained. On further optimization with drug loading, formulation with EAPB0503 at high concentration was developed. The drug loading was hence increased by >4 (from 1.7 to 8.2 mg/mL) in comparison to LNC low. However, the drawback of this formulation is the use of chloroform, which is non-generally recognized as safe component and class 2 solvent[35] to solubilize the drug. So for this reason, the second formulation has not been used in the cytotoxic assays but permitted us to know the loading capacity of the LNC.

The determination of *in vitro* cytotoxicity on three different cancer cell lines (A375, MCF-7, and LS174T) showed similar efficiencies for LNC low and standard EAPB0503 solutions in DMSO. Moreover, blank LNC did not show cytotoxic activities on all tested cell lines. These results, retention of activity for LNC low and nontoxicity for blank LNC, validate the use of LNC formulation to evaluate the activity of the drug. Therefore, encapsulation of EAPB0503 in LNC has not modified its cytotoxic activity.

Considering these results, the use of LNC for the formulation of the anticancer agent lipophilic EAPB0503 was relevant for its future development.

CONCLUSION

Results of this study led us to identify a pharmaceutical formulation to improve water solubility of EAPB0503: Lipid nanocapsules prepared with a simple process with safe components. This EAPB0503 formulation will be soon considered for future preclinical *in vivo* studies.

Financial support and sponsorship

Nil.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A, *et al.* Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2015;65:87-108.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer 2015;136:E359-86.
3. Deleuze-Masquefa C, Moarbess G, Bonnet PA, Pinguet F, Bazarbachi A, Bressolle F. Imidazo[1,2-a]quinoxalines and derivatives for the treatment of cancers, Patent WO2009043934 A1; 2009.
4. Deleuze-Masquefa C, Moarbess G, Bonnet PA, Pinguet F, Bazarbachi A, Bressolle F. Imidazo[1,2-a]quinoxalines and derivatives for the treatment of cancers. Patent US 20138378098 B2; 2013.
5. Pereira JA, Pessoa AM, Cordeiro MN, Fernandes R, Prudêncio C, Noronha JP, *et al.* Quinoxaline, its derivatives and applications: A state of the art review. Eur J Med Chem 2015;97:664-72.
6. Mamedov VA, Kalinin AA. Advances in the synthesis of imidazo[1,5-*a*]- and imidazo[1,2-*a*] quinoxalines. Russ Chem Rev 2014;83:820.
7. Deleuze-Masquefa C, Moarbess G, Khier S, David N, Gayraud-Paniagua S, Bressolle F, *et al.* New imidazo[1,2-a] quinoxaline derivatives: Synthesis and *in vitro* activity against human melanoma. Eur J Med Chem 2009;44:3406-11.
8. Zghaib Z, Guichou JF, Vappiani J, Bec N, Hadj-Kaddour K, Vincent LA, *et al.* New imidazoquinoxaline derivatives: Synthesis, biological evaluation on melanoma, effect on tubulin polymerization and structure-activity relationships. Bioorg Med Chem 2016;24:2433-40.
9. Tafuri G, Stolk P, Trotta F, Putzeist M, Leufkens HG, Laing RO, *et al.* How do the EMA and FDA decide which anticancer drugs make it to the market? A comparative qualitative study on decision makers' views. Ann Oncol 2014;25:265-9.
10. Marchal S, El Hor A, Millard M, Gillon V, Bezdetnaya L. Anticancer drug delivery: An update on clinically applied nanotherapeutics. Drugs 2015;75:1601-11.
11. Szebeni J, Fülöp T, Dézsi L, Metselaar B, Storm G. Liposomal doxorubicin: The good, the bad and the not-so-ugly. J Drug Target 2016;24:765-7.
12. Latagliata R, Breccia M, Fazi P, Iacobelli S, Martinelli G, Di Raimondo F, *et al.* Liposomal daunorubicin versus standard daunorubicin: Long term follow-up of the GIMEMA GSI 103 AMLE randomized trial in patients older than 60 years with acute myelogenous leukaemia. Br J Haematol 2008;143:681-9.
13. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, *et al.* Liposome: Classification, preparation, and applications. Nanoscale Res Lett 2013;8:102.
14. Battaglia L, Gallarate M. Lipid nanoparticles: State of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. Expert Opin Drug Deliv 2012;9:497-508.
15. Heurtault B, Saulnier P, Benoit JP, Proust JE, Pech B, Richard J. Lipid Nanocapsules, Preparation Method and Use as Medicine, WO2001064328 A1; 2001.
16. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. Pharm Res 2002;19:875-80.
17. Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. Pharm Res 2004;21:201-30.
18. Abdel-Mottaleb MM, Neumann D, Lamprecht A. *In vitro* drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC). Int J Pharm 2010;390:208-13.
19. Bédueau A, Saulnier P, Hindré F, Clavreul A, Leroux JC, Benoit JP, *et al.* Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody fab' fragments. Biomaterials 2007;28:4978-90.
20. Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B, *et al.* A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor

[Downloaded free from http://www.jpionline.org on Friday, April 6, 2018, IP: 206.167.239.2]

progression in rats. Mol Cancer Ther 2006;5:1710-22.

21. Groo AC, Bossiere M, Trichard L, Legras P, Benoit JP, Lagarce F, *et al.* *In vivo* evaluation of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after intravenous and oral administration on resistant tumor. Nanomedicine (Lond) 2015;10:589-601.
22. Salou B, Thomas O, Lautram N, Clavreul A, Hureaux J, Urban T, *et al.* Development and *in vitro* evaluation of a novel lipid nanocapsule formulation of etoposide. Eur J Pharm Sci 2013;50:172-80.
23. Huynh NT, Roger E, Lautram N, Benoit JP, Passirani C. The rise and rise of stealth nanocarriers for cancer therapy: Passive versus active targeting. Nanomedicine (Lond) 2010;5:1415-33.
24. Khier S, Moarbess G, Deleuze-Masquefa C, Solassol I, Margout D, Pinguet F, *et al.* Quantitation of imidazo[1,2-a] quinoxaline derivatives in human and rat plasma using LC/ESI-MS. J Sep Sci 2009;32:1363-73.
25. Lafaille F, Solassol I, Enjalbal C, Bertrand B, Doulain PE, Vappiani J, *et al.* Structural characterization of *in vitro* metabolites of the new anticancer agent EAPB0503 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal 2014;88:429-40.
26. Vonarbourg A, Saulnier P, Passirani C, Benoit JP. Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: Influence of the dipolar distribution at the interface. Electrophoresis 2005;26:2066-75.
27. Moarbess G, El-Hajj H, Kfoury Y, El-Sabban ME, Lepelletier Y, Hermine O, *et al.* EAPB0203, a member of the imidazoquinoxaline family, inhibits growth and induces caspase-dependent apoptosis in T-cell lymphomas and HTLV-I-associated adult T-cell leukemia/lymphoma. Blood 2008;111:3770-7.
28. Saliba J, Deleuze-Masquéfa C, Iskandarani A, El Eit R, Hmadi R, Mahon FX, *et al.* EAPB0503, a novel imidazoquinoxaline derivative, inhibits growth and induces apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. Anticancer Drugs 2014;25:624-32.
29. Moarbess G, Deleuze-Masquefa C, Bonnard V, Gayraud-Paniagua S, Vidal JR, Bressolle F, *et al.* *In vitro* and *in vivo* anti-tumoral activities of imidazo[1,2-a] quinoxaline, imidazo[1,5-a] quinoxaline, and pyrazolo[1,5-a] quinoxaline derivatives. Bioorg Med Chem 2008;16:6601-10.
30. Wood DC, Weber FS, Palmquist MA. Continued studies in the toxicology of dimethyl sulfoxide (DMSO). J Pharmacol Exp Ther 1971;177:520-7.
31. Khier S, Gattacceca F, El Messaoudi S, Lafaille F, Deleuze-Masquéfa C, Bompart J, *et al.* Metabolism and pharmacokinetics of EAPB0203 and EAPB0503, two imidazoquinoxaline compounds previously shown to have antitumoral activity on melanoma and T-lymphomas. Drug Metab Dispos 2010;38:1836-47.
32. He S, Cui Z, Wang X, Zhang H, Dai W, Zhang Q, *et al.* Cremophor-free intravenous self-microemulsions for teniposide: Safety, antitumor activity *in vitro* and *in vivo*. Int J Pharm 2015;495:144-53.
33. Lollo G, Rivera-Rodriguez GR, Bejaud J, Montier T, Passirani C, Benoit JP, *et al.* Polyglutamic acid-PEG nanocapsules as long circulating carriers for the delivery of docetaxel. Eur J Pharm Biopharm 2014;87:47-54.
34. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Venier-Julienne MC, Proust JE, Phan-Tan-Luu R, *et al.* The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. Eur J Pharm Sci 2003;18:55-61.
35. Q3C (R6) Step 5 – Impurities: Guideline for Residual Solvents. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/03/WC500104258.pdf. [Last accessed on 2017 May 15].

CHAPITRE 3

Les imidazoquinoxalines de deuxième génération

CHAPITRE 3 - Les imidazoquinoxalines de deuxième génération

Les Imiqualines de deuxième génération vont être présentées dans ce chapitre. Nous verrons dans une première partie la synthèse spécifique de chacun des composés leaders ; à savoir l'**EAPB02303** et l'**EAPB02302**. La structure de ces composés diffère sur la position 4 : pour l'**EAPB02303**, on retrouve un groupement *N*-méthyl (déjà présent sur les leaders de première génération) et pour l'**EAPB02302**, on trouve une fonction amine primaire (Figure 34). Nous développerons ensuite les activités *in vitro* et la recherche des cibles moléculaires de ces composés dans un second temps. L'activité cytotoxique de ces composés a été évaluée sur un panel de lignées cellulaires cancéreuses humaines de différentes origines : mélanome, cancers du pancréas, du côlon, du poumon, de la prostate, du sein, du foie et sur lignée lymphoïde. Les composés de seconde génération présentent une activité cytotoxique *in vitro* de l'ordre de la dizaine de nanomolaire sur plusieurs lignées cellulaires et en particulier sur la lignée cellulaire humaine de mélanome A375. Cette étude confirme le fort potentiel de cette famille chimique en tant qu'agent anticancéreux sur des cancers d'organes variés. De façon particulièrement intéressante, le composé **EAPB02303** montre une activité apparemment sélective sur plusieurs lignées de cellules de cancer du pancréas. Dans une troisième partie, nous évoquerons les pistes en cours d'étude afin de déterminer le mécanisme d'action de ces nouveaux composés. Enfin dans une quatrième partie, nous présenterons les travaux de modulation chimique que nous avons réalisée sur les Imiqualines de seconde génération.

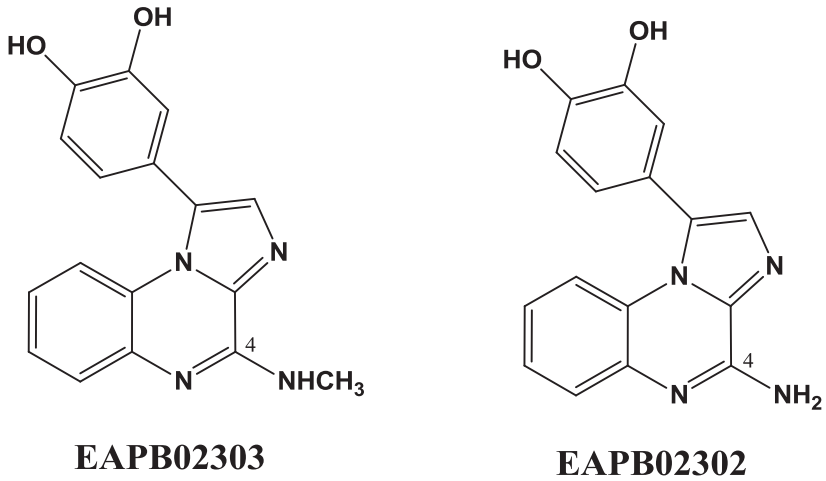


Figure 34. Structure chimique des Imiqualines leaders de deuxième génération.

I - Synthèse chimique

I - 1. Synthèse développée au laboratoire

I - 1.1. Le composé EAPB02303

Le composé **EAPB02303** a été préparé selon la stratégie décrite au laboratoire (Schéma 15). L'acide 2-imidazole carboxylique (composé **18**) en présence de chlorure de thionyle se condense sur lui-même pour former le dimère diimidazo[1,2-*a* ;1,2-*d*]pyrazine-5,10-dione **19**. L'*ortho*-fluoroaniline réagit avec ce dernier en présence de bis(triméthylsilyl)amidure de sodium (NaHMDS) dans le tétrahydrofurane (THF) pour obtenir le *N*-(2-fluorophényl)-1*H*-imidazole-2-carboxamide **20**. La cyclisation intramoléculaire de cet intermédiaire fluoré se fait en présence d'hydrure de sodium dans le diméthylacétamide. La position 4 du composé cyclisé imidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4(5H)-one **21** est ensuite chlorée à l'aide de trichlorure de phosphoryle dans la *N*,*N*-diméthylaniline sous l'action des micro-ondes. La méthylamine substitue le chlore de l'intermédiaire 4-chloroimidazo[1,2-*a*]quinoxaline **22** pour donner le composé *N*-méthylimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4-amine **23**. Cet intermédiaire est ensuite bromé sur la position 1 par le *N*-bromosuccinimide dans le chloroforme. Le composé 1-bromo-*N*-méthylimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4-amine **24** ainsi formé est couplé à l'acide 3,4-diméthoxyphénylboronique *via* une réaction de Suzuki en présence de tetrakis (triphénylphosphine) de palladium (0), de carbonate de sodium dans un mélange eau/éthylène glycol diméthyléther (1/2). La dernière étape consiste en la déprotection des alcools de l'intermédiaire 1-(3,4-diméthoxyphényl)-*N*-méthylimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4-amine **25** pour donner le composé final **EAPB02303** (4-(4-(méthylamino)imidazo[1,2-*a*]quinoxalin-1-yl)benzène-1,2-diol) **26**. Les conditions utilisées au laboratoire pour réaliser cette étape de déprotection étaient initialement l'utilisation d'iodocyclohexane dans du diméthylformamide (DMF) anhydre aux microondes à 200°C pendant 1h20. Durant mes travaux de thèse, cette dernière étape a été sujette à modification compte tenu du danger présenté par l'utilisation d'iodocyclohexane aux micro-ondes (risque d'explosion). L'optimisation de cette étape sera détaillée dans ce chapitre.

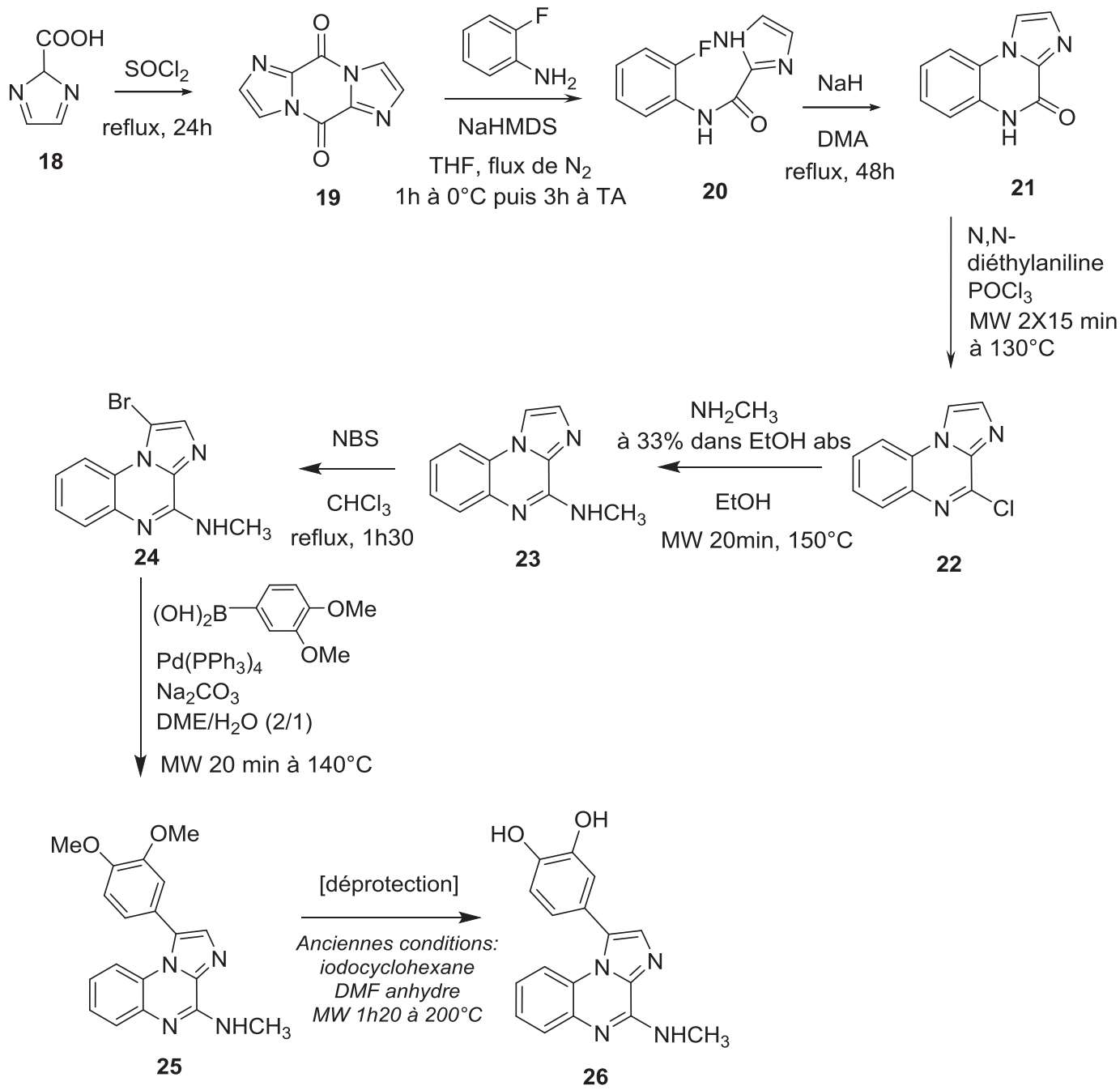


Schéma 15. Synthèse du composé **EAPB02303.**

I – 1.2. Le composé EAPB02302

Le composé **EAPB02302** (composé **30**) a été préparé selon la synthèse décrite dans le schéma 16. Le chlore du composé **22** est substitué par l'ammoniac aqueux dans l'acétonitrile sous l'action des micro-ondes pour donner le composé **27**. L'intermédiaire **27** est ensuite

bromé sur la position 1 par le *N*-bromosuccinimide dans le chloroforme. Le composé **28** et l'acide 3,4-diméthoxyphénylboronique sont couplés via une réaction de Suzuki en présence de tetrakis (triphénylphosphine) de palladium (0), de carbonate de sodium dans un mélange eau/éthylène glycol diméthyléther (1/2). La dernière étape consiste en la déprotection des alcools de l'intermédiaire **29** pour donner le composé final **EAPB02302** 4-(4-aminoimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-1-yl)benzène-1,2-diol (**30**). Comme pour la synthèse de l'**EAPB02303**, cette étape a été sujette à modification. La balance hydrophile/hydrophobe de l'**EAPB02302** étant particulière, le traitement et la purification ne sont pas aisés. Le produit attendu est à la fois miscible en phase aqueuse et en phase organique, et est assez polaire pour être retenu sur silice lors des purifications flash. Pour essayer de limiter les problèmes rencontrés lors de cette synthèse à grande échelle, un autre système de purification et une autre technique de préparation de ce produit final devront être envisagés.

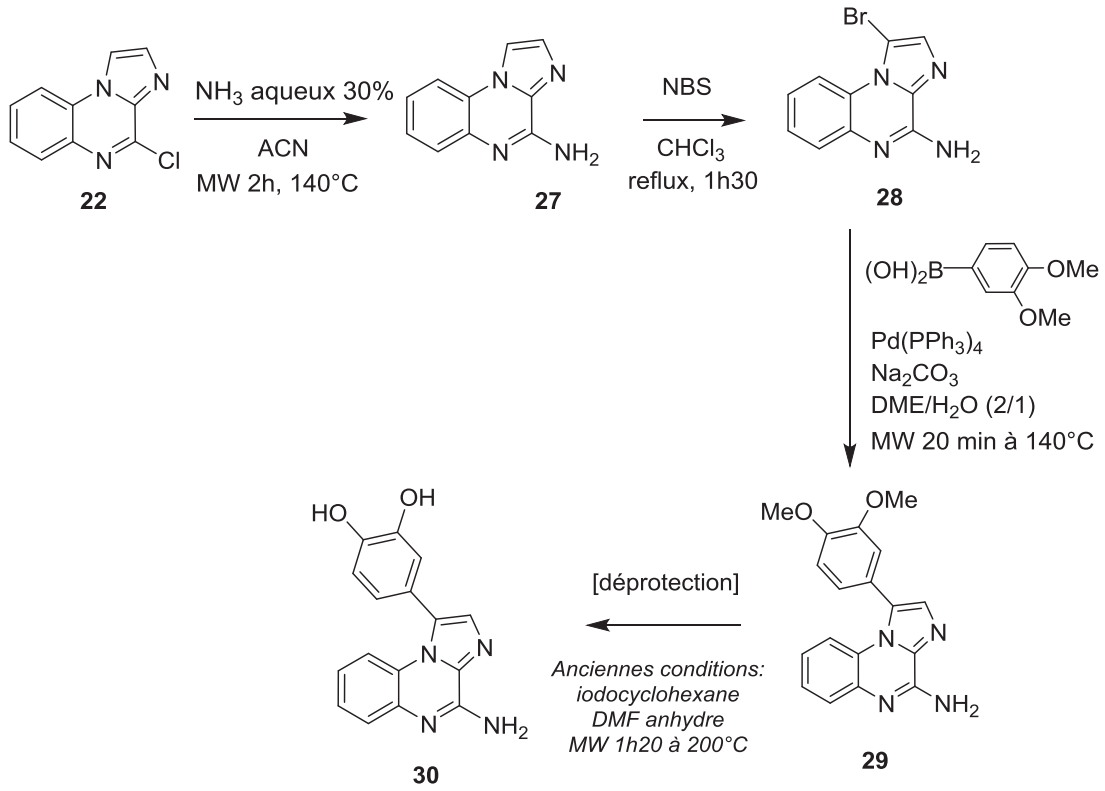


Schéma 16. Synthèse du composé **EAPB02302.**

I – 2. Etape limitante et optimisation des conditions opératoires

Les conditions initialement utilisées pour l'étape finale de déméthylation posent des problèmes de surpression dans les réacteurs microonde. De plus, le rendement de cette

étape n'est pas très élevé (moins de 20 %). Nous avons travaillé à optimiser cette étape afin d'augmenter le rendement global de la synthèse des composés de deuxième génération. Une étude bibliographique a été effectuée dans le but de trouver des conditions moins problématiques, plus douces et permettant de garder la sélectivité au niveau des alcools. Greene *et al.* décrivent plusieurs méthodes de clivage des alcools méthyliques [224]. Les conditions les plus communes emploient des dérivés du bore comme agent déméthylant. Spadoni, G. *et al*. utilisent par exemple le tribromure de bore (BBr_3) dans le dichlorométhane [225,226]. Ces conditions sont les plus récurrentes dans la littérature car elles donnent généralement de bons rendements et sont compatibles avec une grande variété de structures et fonctions chimiques. Perspicace, E. *et al.* utilisent le complexe trifluorure de bore-diméthyl sulfide (BF_3-SMe_2) en présence [227] ou non [228] de triéthylamine (TEA) dans le dichlorométhane. Ainsi, des essais de déméthylation sur 100 mg de composé **25** ont été tentés en se basant sur ces données bibliographiques :

1. BBr_3 (2 équivalents par groupement *O*-méthyl), dans le dichlorométhane.
2. BF_3-SMe_2 (6 équivalents par groupement *O*-méthyl), dans le dichlorométhane.
3. BBr_3 2 équivalents par groupement *O*-méthyl), TEA (6 équivalents par groupement *O*-méthyl), dans le dichlorométhane.
4. BF_3-SMe_2 (6 équivalents par groupement *O*-méthyl), TEA (6 équivalents par groupement *O*-méthyl), dans le dichlorométhane.

Après 2 heures d'agitation à température ambiante, on constate que les conditions 1 permettent d'obtenir le produit attendu de façon majoritaire. Après lavages basiques et purification par colonne de silice, le produit **26** est obtenu avec un rendement de 56 %. Les autres produits obtenus correspondent à une déprotection partielle des groupements *O*-méthyles portés par le cycle phényle.

Les conditions 2 permettent d'obtenir le produit souhaité, mais la réaction semble être plus lente, des intermédiaires sont observés et il reste du réactif de départ. Les conditions 3 permettent d'obtenir le produit attendu mais de façon minoritaire. Une dégradation du réactif et/ou des produits formés semble être à l'origine du faible rendement. Aucune réaction n'a lieu avec les conditions 4, seul le produit de départ **25** est observé. Après 24 heures d'agitation à température ambiante, les résultats restent inchangés. Ainsi les

conditions de déméthylation retenues correspondent à l'utilisation de BBr_3 (2 équivalents par groupement *O*-méthyl) dans le dichlorométhane à température ambiante pendant 2 heures (Schéma 17).

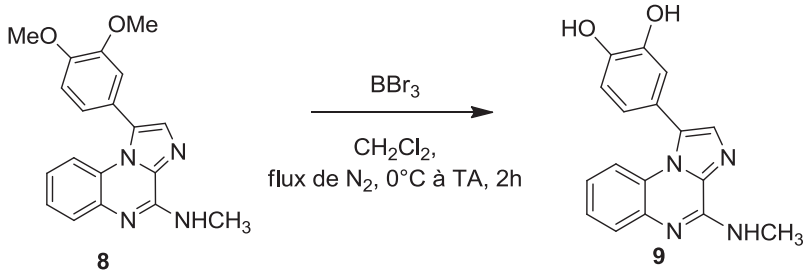


Schéma 17. Conditions optimisées pour l'étape de déméthylation finale.

Afin d'optimiser plus encore cette étape de déprotection, nous avons testé la déméthylation de l'acide boronique préalablement à la réaction de couplage de Suzuki-Miyaura. Pour ce faire, l'acide 3,4-diméthoxyphénylboronique réagit avec 2 équivalents par groupement *O*-méthyl dans le dichlorométhane. Cette réaction permet d'obtenir l'acide 3,4-dihydroxyphénylboronique avec un rendement de 84 % (Schéma 18).

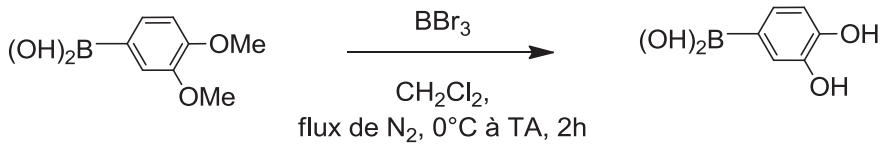


Schéma 18. Etape de déprotection de l'acide boronique.

Ensuite, le couplage du dérivé bromé avec l'acide 3,4-dihydroxyphénylboronique *via* une réaction de couplage de Suzuki-Miyaura en présence de tetrakis (triphénylphosphine) de palladium (0), de carbonate de sodium dans un mélange eau/éthylène glycol diméthyléther (1/2) est réalisé (Schéma 19) avec un rendement supérieur à 30 %.

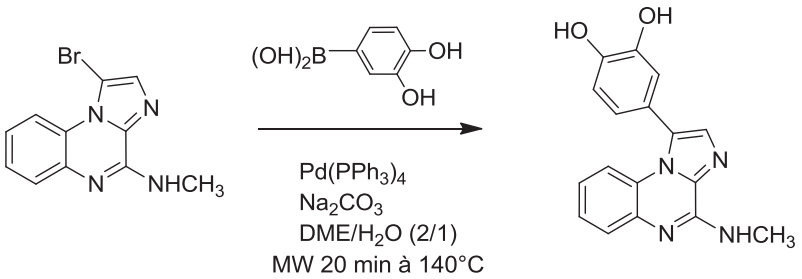


Schéma 19. Couplage de Suzuki-Miyaura avec un acide boronique préalablement déprotégé.

II - Activité antitumorale *in vitro*

L'activité cytotoxique de ces composés a été évaluée sur un panel de lignées cellulaires cancéreuses humaines de différentes origines (Tableau 12). Les composés de seconde génération présentent une activité cytotoxique *in vitro* de l'ordre de la dizaine de nanomolaire sur plusieurs lignées cellulaires et en en particulier sur la lignée cellulaire humaine de mélanome A375.

Cette étude confirme le fort potentiel des composés en tant qu'anticancéreux sur des cancers d'organes variés. Les composés de seconde génération ont une activité de six (**EAPB02302**) à quarante fois (**EAPB02303**) supérieure à celle du meilleur composé de première génération (**EAPB0503**) sur la lignée de mélanome A375. De façon particulièrement intéressante, les composés montrent une activité apparemment sélective sur plusieurs lignées cellulaires de cancers du pancréas (Tableau 12). En outre, de telles données *in vitro* sont particulièrement précieuses dans le cadre de l'approche du mécanisme d'action. En effet, une sélectivité d'activité (IC_{50} de 12 nM contre 957 nM sur 2 lignées différentes : CFPAC-1 et AsPC-1 pour l'**EAPB02303**) est un indicateur particulièrement prometteur pour l'identification de marqueurs de voies de signalisation cellulaire impactées par les composés.

	CI_{50} (nM)							
	Mélanome A375	Pancréas CFPAC-1	Pancréas AsPC-1	Colon COLO-205	Poumon Calu-1	Prostate PC-3	Sein T-47D	Lymphome PF382
EAPB0503	383	598	2799	201	196	537	198	205
EAPB02302	60	67	1818	44	14	56	78	29
EAPB02303	10	12	957	38	4	12	13	7

Tableau 12. CI_{50} (nM) de l'**EAPB02302**, de l'**EAPB02303** ainsi que l'**EAPB0503** sur différentes lignées cancéreuses.

III - Mécanisme d'action

Plusieurs études sont menées au laboratoire pour définir le mécanisme d'action des Imiqualines de deuxième génération, les voies de signalisation impactées par ces molécules ainsi que leur(s) cible(s) biologique(s). Les pistes étudiées sont, entre autres, l'analyse transcriptomique de cellules traitées par les composés leaders, l'angiogénèse, le profil kinases, l'activité apoptotique... Les études menées pour définir le profil d'activité permettent d'identifier des caractéristiques tout à fait originales, qui ne ressemblent pas à celles d'un anticancéreux connu. Quelques résultats vont être présentés dans ce chapitre mais d'autres sont pour l'instant soumis à confidentialité.

Le mécanisme exact des molécules développées est encore en cours d'étude et permettra de définir s'il s'agit d'un mode d'action unique ou multiple.

III - 1. Absence de liaison à la tubuline de l'EAPB02303

Une étude de l'effet de l'**EAPB02303** sur la polymérisation de tubuline purifiée a été réalisée [7]. Pour cela, des préparations de tubuline purifiée à partir de cerveaux de porc ont été préparées selon le procédé de purification décrit par Williams et Lee en 1982 [229]. La polymérisation de la tubuline a été suivie par turbidimétrie avec un spectrophotomètre à 350 nm équipé d'un porte cuve à chemise thermique. Les résultats de cette étude permettant la comparaison entre l'**EAPB02303**, l'**EAPB0503** et le BMS-345541 (analogue structural n'ayant pas d'activité d'inhibition de la polymérisation de la tubuline [230]) sont présentés dans la figure 35.

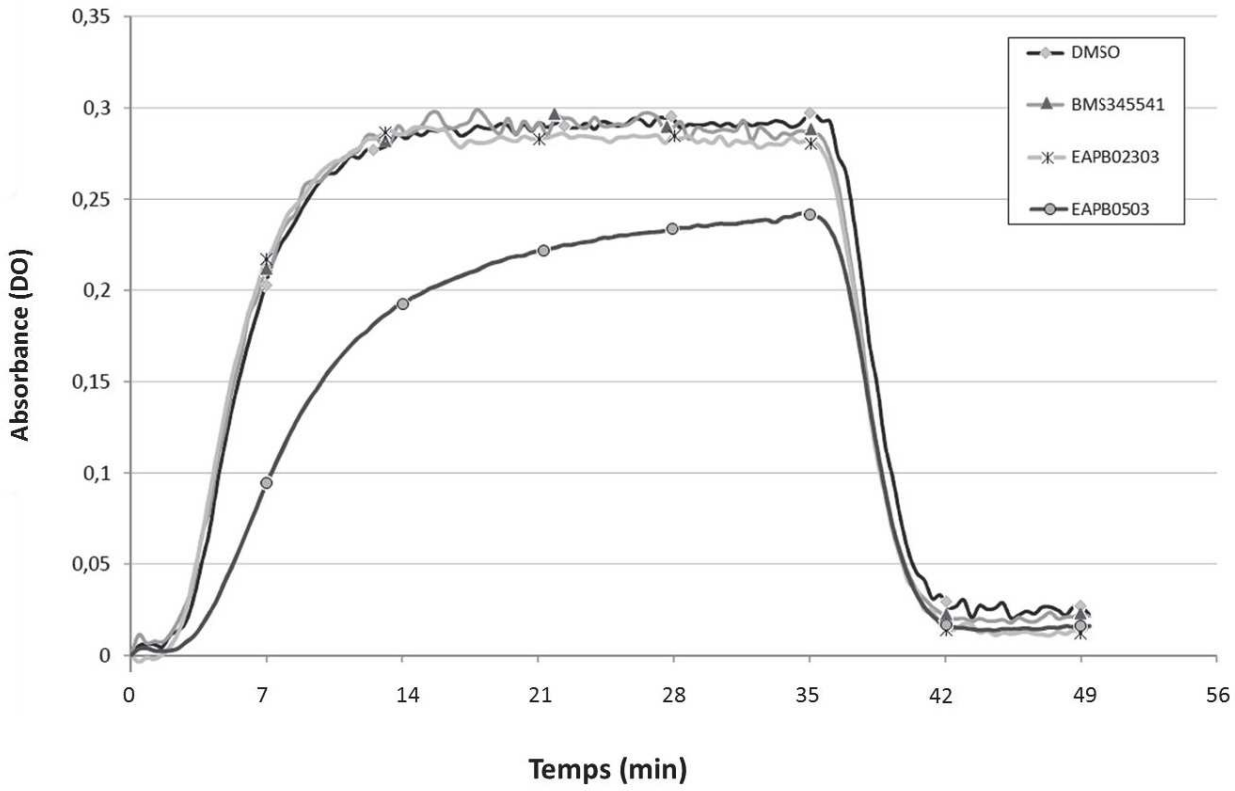


Figure 35. Mise en évidence de l'absence de liaison significative de l'**EAPB02303** sur la tubuline purifiée.

Au vu des résultats de cette étude, l'augmentation de la puissance de l'**EAPB02303** par rapport à l'**EAPB0503** n'est pas due à une activité par inhibition de la polymérisation de la tubuline.

Par ailleurs, une étude de modélisation a permis de mettre en avant l'absence d'interaction entre l'**EAPB02303** et la tubuline au niveau du site d'action de la colchicine ; contrairement à l'**EAPB0503** (Figure 36).

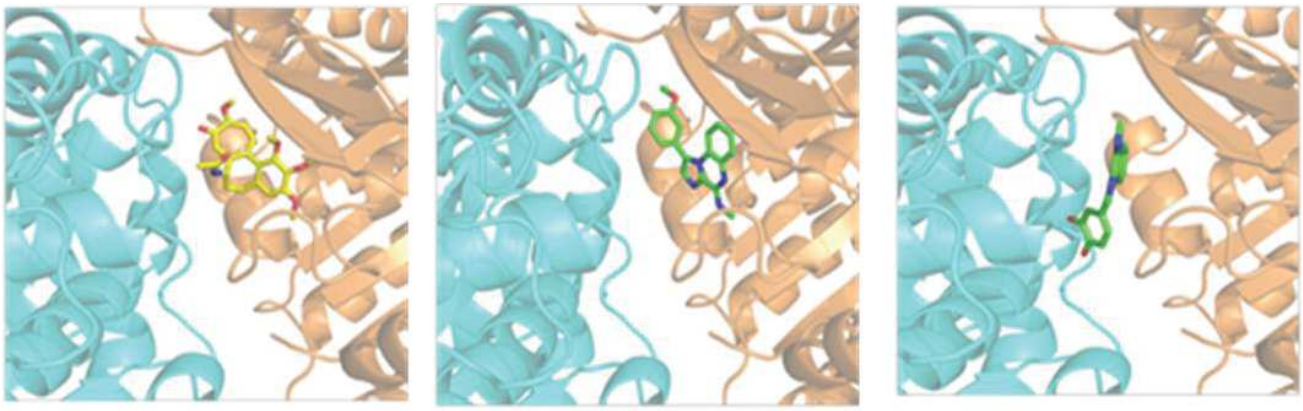


Figure 36. Modélisation de l'interaction avec la tubuline sur le site d'action de la colchicine. Présence d'une interaction pour l'**EAPB0503** mais pas pour l'**EAPB02303.**

III - 2. Analyse transcriptomique

L'analyse transcriptomique permet de calculer les différences entre les composés analysés pris deux à deux et à convertir ces distances en « dendrogrammes synthétiques » représentés sous la forme d'un arbre. Ainsi, les dendrogrammes obtenu sur des cellules de mélanome humain A375 après traitement par les Imiqualines et des anticancéreux classiques permettent de mettre en évidence les relations entre les profils d'expression et donc de définir trois différents groupes de composés dans cette étude (Figure 37) :

- un premier groupe de composés ne présentant pas d'effet. Ceci peut être dû à une concentration trop faible ou à un effet tardif non détecté après les six heures d'étude. On retrouve la dacarbazine, la fluorouracile, la fotémustine, le méthotrexate, l'imiquimod et le paclitaxel.

- un second groupe de composés actifs sur la tubuline : la colchicine, la vinorelbine, la maytansine et les Imiqualines de première génération (dont l'**EAPB0203** et l'**EAPB0503**).

- un troisième groupe que l'on considérera comme atypique ayant des effets contrastés au niveau du transcriptome. On retrouve le vémurafénib, le BMS-345541, la doxorubicine, le SN38 et l'**EAPB02303**.

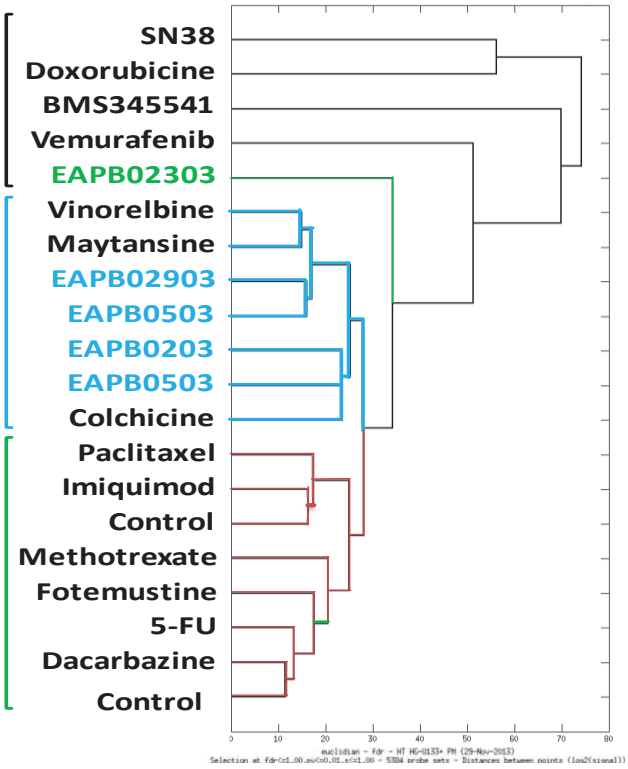


Figure 37. Analyse transcriptomique comparative par « dendrogrammes synthétiques » entre les Imiqualines et les anticancéreux classiques.

Cette étude transcriptomique réalisée sur des cellules de mélanome humain A375 traitées par les Imiqualines et des anticancéreux classiques montre que l'**EAPB02303** présente un mécanisme d'action original différent des autres anticancéreux testés.

Ces données suggèrent fortement la présence d'un mécanisme d'action innovant pour l'**EAPB02303**.

III - 3. Recherche de la cible d'action par chromatographie d'affinité

III – 3.1 Objectif et principe de l'étude

Au cours du développement préclinique de certains composés, lorsque les cibles moléculaires directes de composés biologiquement actifs sont inconnues, une méthode d'approche possible consiste à utiliser la chromatographie d'affinité. La capacité des protéines à se fixer spécifiquement à d'autres molécules sans faire intervenir de liaisons covalentes est le fondement de cette technique. Les ligands (molécule analogue à l'**EAPB02303** dans notre étude) sont greffés par liaisons covalentes à la résine de la colonne. Une colonne d'affinité retient uniquement la ou les protéines qui se fixent au ligand. Les autres protéines, quelle que soit leur masse ou leur taille, traversent la colonne sans s'y fixer lors des cycles de lavage. Les complexes ligand-protéine sont ensuite élués par l'utilisation d'une solution saline tamponnée.

Ainsi, en pratique, une chromatographie d'affinité comporte généralement plusieurs étapes : le couplage covalent du ligand sur la résine, l'adsorption de la ou des protéines d'intérêt par liaison non covalente avec le ligand, l'élimination des protéines contaminantes (non liées au ligand), et finalement la désorption des protéines d'intérêt (Figure 38). Les protéines ainsi obtenues seront analysées par spectrométrie de masse *via* le séquençage de séquences peptidiques dans l'objectif d'identifier la ou les protéines entières.

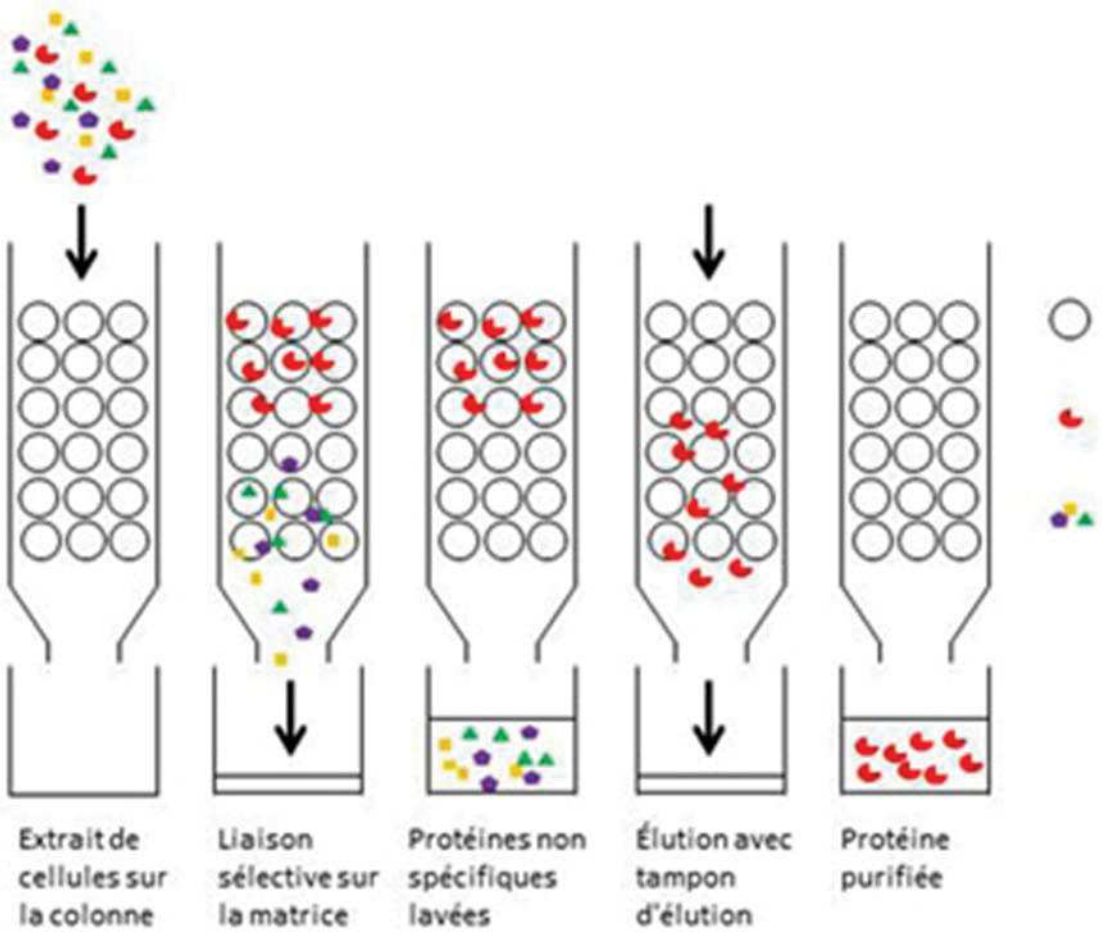


Figure 38. Principes généraux de la chromatographie d'affinité [231].

Dans le cas de notre étude, nous n'avons aucune connaissance du motif minimal du ligand potentiellement reconnaissable par la ou les cibles protéiques. Après une étude de Relation Structure-Activité (RSA), nous avons pu déterminer que le greffage de l'**EAPB02303** sur le linker de la résine d'agarose était possible (Figure 39) sans perdre l'activité cytotoxique (données en cours de publication) donc sans perdre l'interaction avec la ou les cible(s) protéique(s). La résine est composée d'agarose réticulée et perlée (polymère polysaccharidique extrait d'algues). La nature de la fonction présente sur le linker de la résine déterminera le groupement chimique à introduire sur le composé analogue à l'**EAPB02303**. Ce groupement permettra la liaison covalente ente la résine et la molécule *via* le linker.

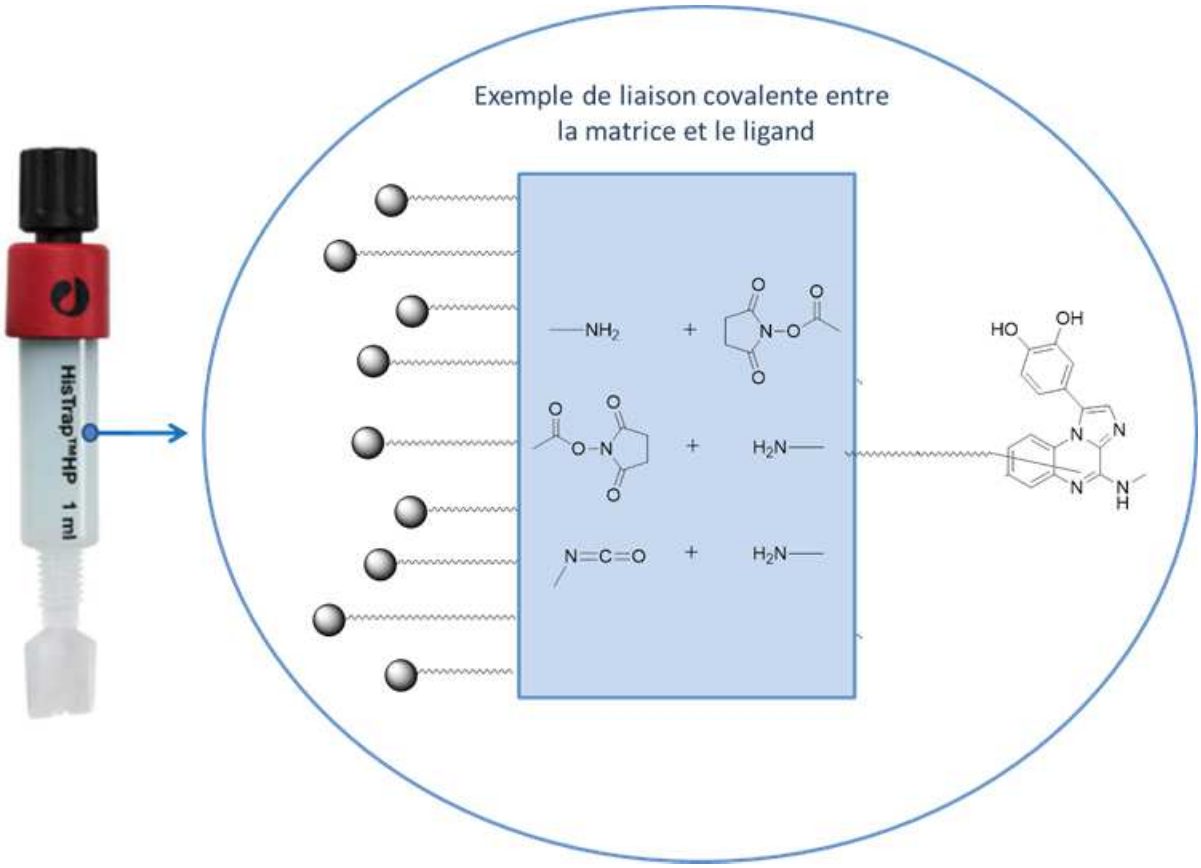


Figure 39. Exemple de groupes fonctionnels réactifs utilisables en chromatographie d'affinité.

III – 3.1 Travaux réalisés et premiers résultats

La détermination de la cible d'**EAPB02303** est en cours de réalisation *via* une approche d'interactions protéiques utilisant la technique de chromatographie d'affinité. Nous avons greffé un dérivé du composé **EAPB02303** par un bras espaceur (*linker*) fixé sur une colonne d'agarose (Schéma 20). Les résultats de cette étude n'étant pas encore publiés, nous ne préciserons pas la position de fixation du linker sur l'**EAPB02303**. La matrice utilisée est composé de billes d'agarose fortement réticulées avec un bras espaceur contenant 10 atomes attachés à la matrice par l'épichlorhydrine et activés par le *N*-hydroxysuccinimide. Une colonne de sépharose NHS greffée avec le linker et une colonne non greffée sont utilisées en contrôle.

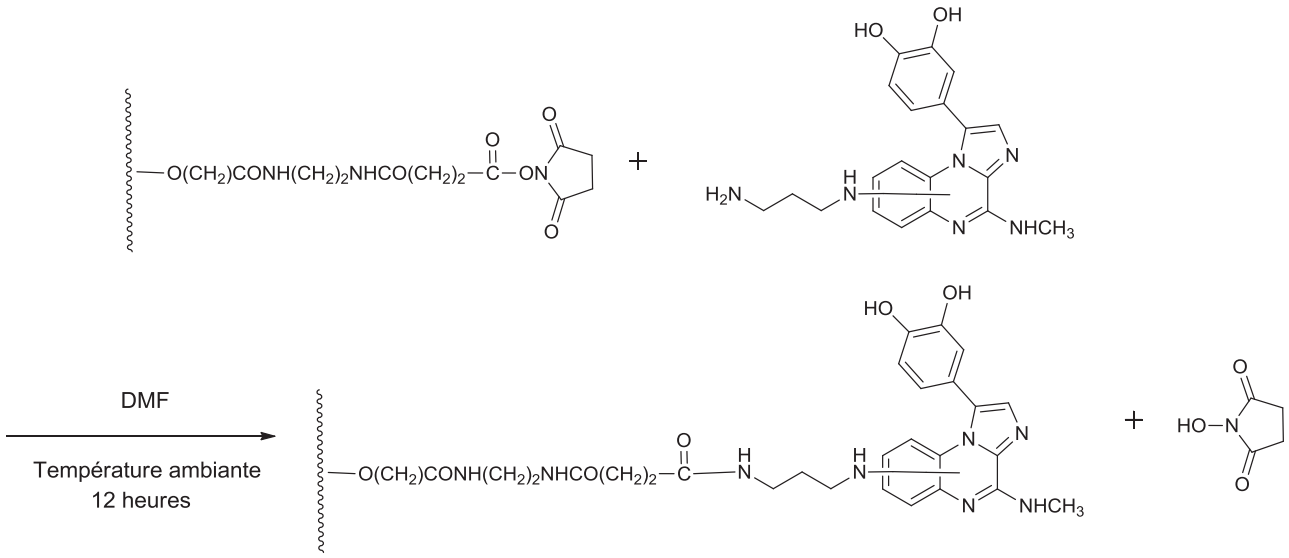


Schéma 20. Greffage d'un dérivé du composé **EAPB02303** par un linker fixé sur une colonne d'agarose.

Une solution de protéine totale, issue d'une culture de la lignée cellulaire de mélanome malin A375, a été réalisée par lyse cellulaire grâce à des inhibiteurs de protéases. Cette solution protéique, dialysée contre du tampon phosphate salin (PBS), nous a permis de réaliser des chromatographies d'affinité par *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) (Figure 40). Après lavage des colonnes, les protéines fixées sur les colonnes sont éluées par du PBS contenant 1 % de détergent (laurylsulfate de sodium).

Après concentration et vérification par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE), les fractions d'élutions sont envoyées à la plateforme de spectrométrie (*Functional Proteomics Platform*, IGF, UMR 5203 CNRS - INSERM U1191 - Université de Montpellier) pour analyse en chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

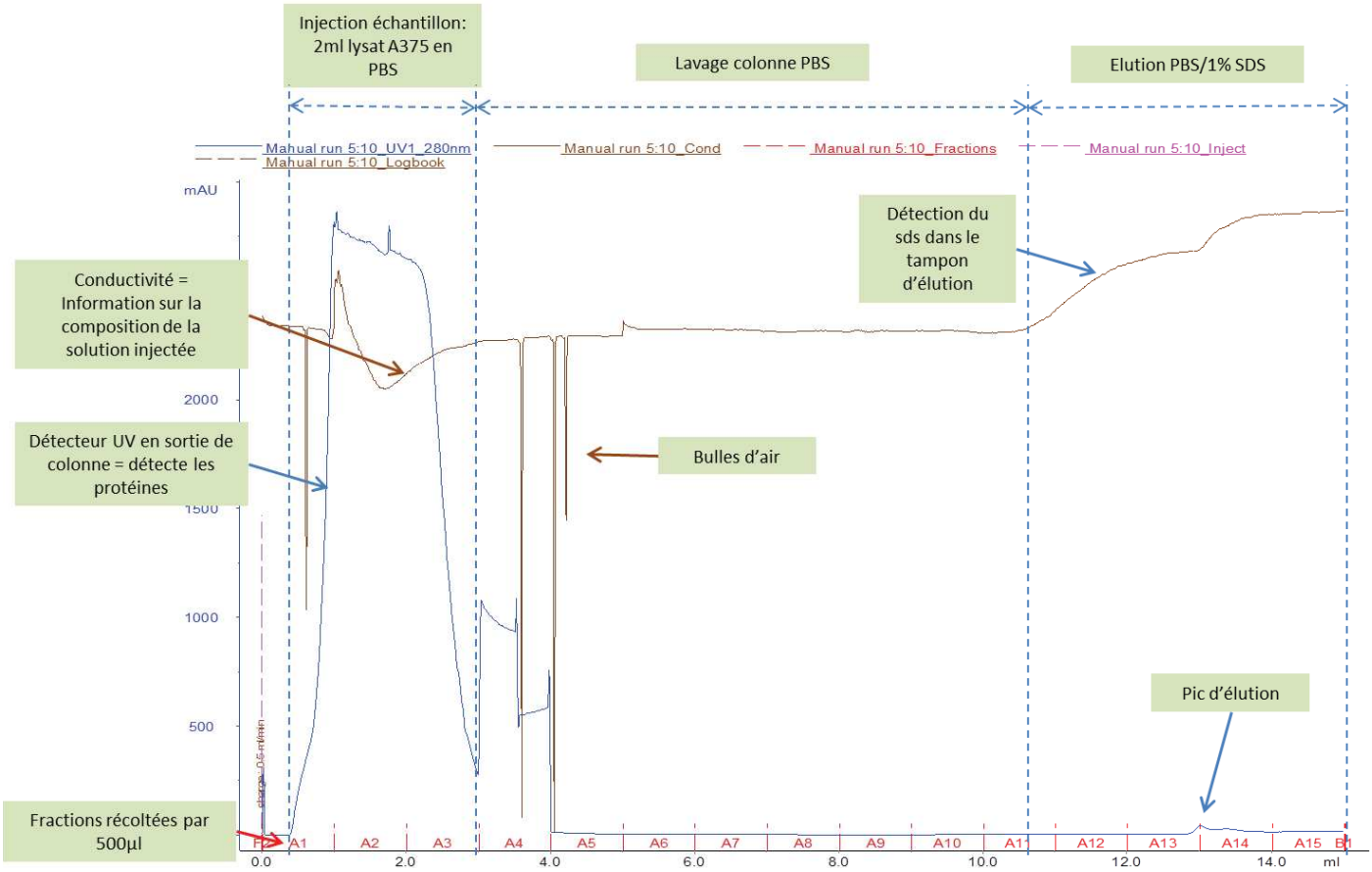


Figure 40. Détermination des cibles d'**EAPB02303** par chromatographie d'affinité. Les détecteurs UV en sortie de colonne renseignent la composition des solutions éluées. En bleu : la fluorescence à 280 nm informe sur la quantité de protéine dans le milieu. En marron : la conductivité du milieu nous informe sur la composition de la solution en sortie de colonne. Les éluâts de la colonne sont récupérés par fraction de 500µl.

Les résultats fournis, en cours d'analyse, nous montre que 1 148 protéines se fixent sur la colonne portant l'analogue de l'**EAPB02303**. On remarque également que 1 063 protéines se fixent sur la colonne portant uniquement le linker alors que 413 protéines se fixent sur la colonne n'ayant pas subi de greffage (Figure 41). Des analyses statistiques vont nous permettre de connaitre le nombre de protéines se fixant de manière spécifique à l'analogue de l'**EAPB02303**.

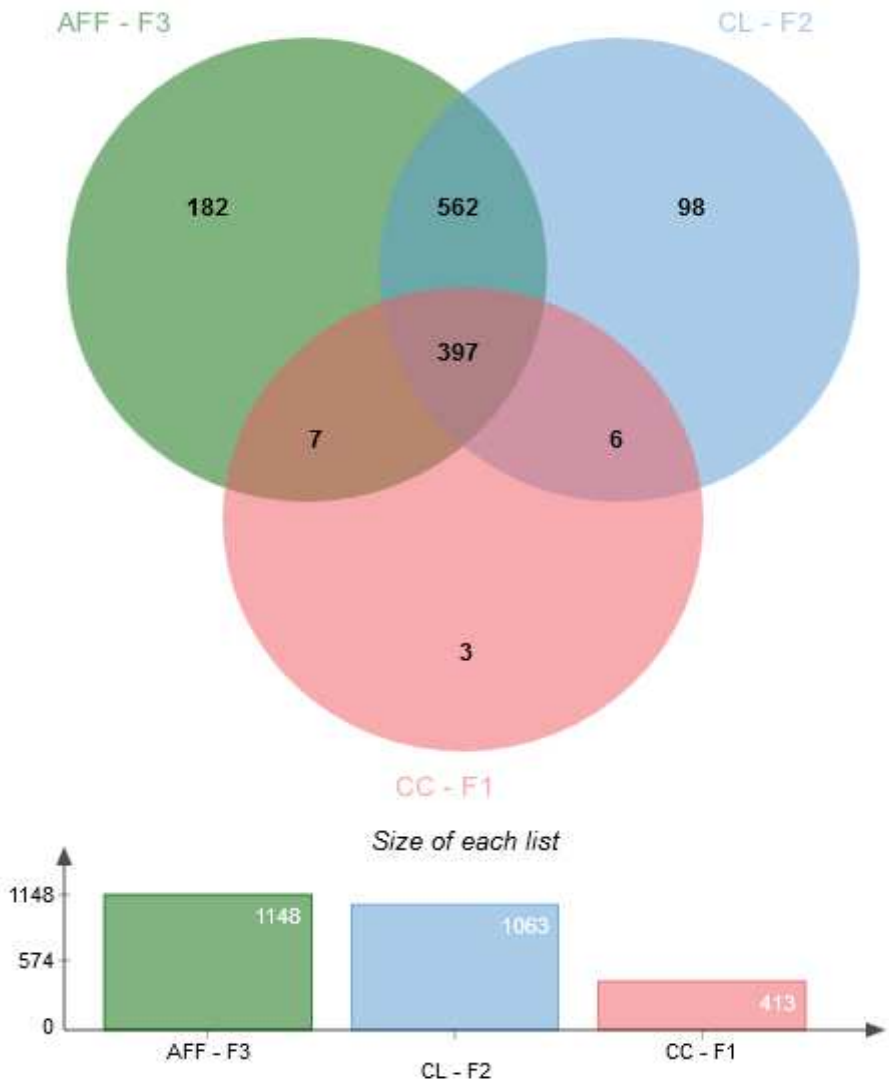


Figure 41. Résultats préliminaires de l'étude par chromatographie d'affinité. En vert : l'analogue de l'**EAPB02303** greffé sur la matrice d'agarose (AFF-F3). En bleu : le linker seul greffé sur la matrice (CL-F2). En rose : contrôle négatif en l'absence de greffage sur la matrice (CC-F1).

L'analyse plus poussée des données et résultats obtenus lors de cet essai préliminaire permettra d'établir un protocole de chromatographie d'affinité optimisé afin d'affiner la détermination des cibles protéiques. Ce protocole va être mis en œuvre très prochainement.

IV – Modulation chimique des Imiqualines de deuxième génération en position 4

IV - 1. Objectifs de l'étude

La modulation chimique des imidazoquinoxalines de deuxième génération a été réalisée par l'introduction d'un résidu acide aminé en position 4. Celle-ci répond à plusieurs problématiques soulevées par le développement des Imiqualines : l'exemplification du brevet de sélection [7], la mise en évidence de l'importance du substituant en position 4 mais également l'amélioration de l'hydrosolubilité des composés. Comme nous l'avions décrit dans le chapitre 2 à propos des Imiqualines de première génération ; une mauvaise solubilité dans l'eau peut être une cause de rejet au cours du développement pharmaceutique. Les Imiqualines de deuxième génération présentent des solubilités dans l'eau plus grande que les molécules de première génération. La présence d'un groupement catéchol en position 1 (deux groupements hydroxyles en *ortho* porté par un cycle aromatique) permet une amélioration de la solubilité en milieu aqueux des composés de deuxième génération par rapport aux composés de première génération. En effet, nous avons estimé les propriétés de lipophilie et d'hydrophilicité de tous les composés en prédisant leur log P et leurs valeurs théoriques de solubilité dans l'eau grâce aux méthodes de fragmentation disponibles sur le logiciel ACDLabs® (Tableau 13). Ces valeurs calculées sont purement théoriques mais donnent une bonne estimation de ce que pourrait être la solubilité des composés dans la circulation sanguine (pH 7,4).

Composé	EAPB0203	EAPB0503	EAPB02303	EAPB02302
Log P	3,67	2,85	2,2	1,9
Solubilité théorique en mg/mL (pH=7,4)	$3,46.10^{-3}$	$2,60.10^{-3}$	$4,28.10^{-2}$	$1,74.10^{-2}$

Tableau 13. Log P et solubilité théorique en milieu aqueux à pH 7,4 des Imiqualines leaders calculés par le logiciel ChemDraw®.

Cette approche est utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour le criblage de nouveaux composés [232]. Nous constatons en effet une amélioration des solubilités des nouveaux composés. Cependant, cette amélioration n'est pas encore suffisante. Afin d'optimiser plus encore cette hausse de la solubilité en milieu aqueux, nous avons décidé d'entreprendre une étude de modulation chimique des Imiqualines de deuxième génération en position 4 par le greffage d'acides aminés.

IV - 2. Tavaux réalisés et résultats

IV - 2.1. Stratégie

L'impact de l'introduction de divers acides aminés sur la position 4 de l'hétérocycle a été étudié à la fois sur l'activité biologique et sur les propriétés physico-chimiques (Figure 42). Une telle approche pour augmenter la solubilité, qui reste un facteur clé pour le développement pharmaceutique potentiel, a déjà été décrite dans la littérature [233]. Nous présentons ici la synthèse de nouveaux composés imidazo[1,2-*a*]quinoxaliniques décorés d'un panel d'acides aminés et leur évaluation *in vitro* sur la lignée cellulaire de mélanome humain A375.

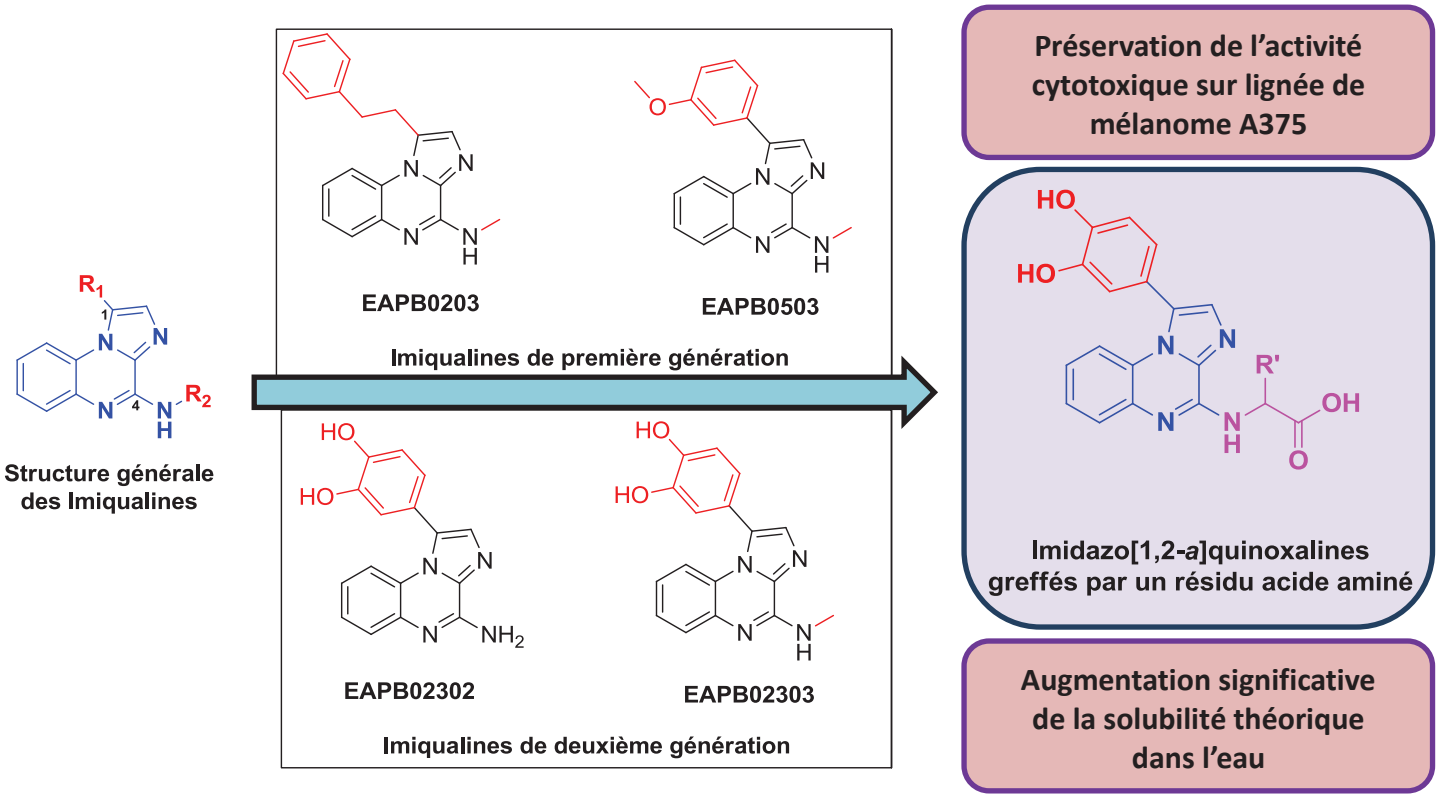
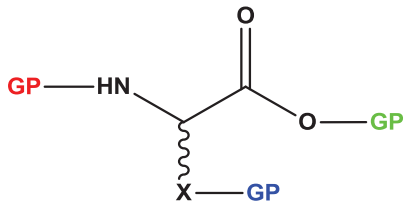


Figure 42. Objectifs de la modulation chimique des imidazoquinoxalines de deuxième génération en position 4.

Les acides aminés possèdent deux groupes fonctionnels : l'amine nucléophile, qui est capable de s'additionner sur l'intermédiaire chloré par substitution nucléophile du chlore, et l'acide carboxylique, qui permettra d'améliorer l'hydrophilie générale du composé résultant. L'addition sur l'intermédiaire chloré pourra également se faire par une amine issue de la chaine latérale de l'acide aminé.

IV - 2.2. Acides aminés utilisés

Pour obtenir une quantité suffisante de composé final, chaque synthèse débute en utilisant 500 mg de dérivé chloré. Les acides aminés (AA) que nous avons utilisés sont résumés dans le tableau 14. Des groupements protecteurs (GP) sont utilisés pour les fonctions réactives que nous souhaitons bloquer. La nomenclature des groupements protecteurs sur les acides aminés est décrite dans la figure 43.



GPAA(GP)GP

Figure 43. Nomenclature des groupements protecteurs sur les acides aminés.

Acide aminé	Masse exacte	Equivalents utilisés
H**Glycine**OtBu HCl	167,64	2
H**Alanine**OtBu HCl	181,66	3
H**Valine**OtBu HCl	209,72	4
H**Leucine**OtBu HCl	223,74	4
H**Lysine**(BOC)OtBu HCl	238,88	3
BOC-**Ornithine**OtBu HCl	324,85	3
H**Arginine**(Pbf)OtBu HCl	477,03	3
H**Ornithine**(Z)OtBu HCl	358,87	3

Tableau 14. Acides aminés utilisés : protections, masses exactes et équivalences utilisées.

Les groupements protecteurs utilisés sont présentés dans le tableau 15 :

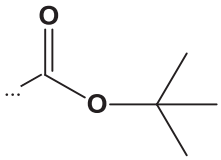
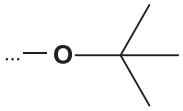
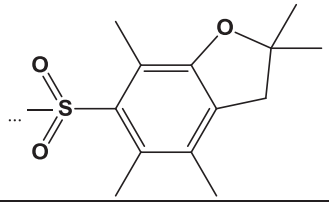
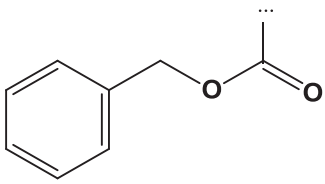
BOC: tert-ButOxyCarbonyle 	**OtBu**: O-tertButyle 
Pbf: 2,2,4,6,7-pentaméthyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl 	**Z** (CBZ) : Carboxybenzyle 

Tableau 15. Groupements protecteurs utilisés : forme chimique et masse exacte.

IV – 2.3. Résultats

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article 2 "*Development of new imidazo[1,2-a]quinoxalines derivatives against melanoma: grafting with amino acids to enhance water solubility*" soumise à la revue *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, le 20 Juin 2018.

IV – 3. Discussion

Cette étude de modulation des Imiqualines de deuxième génération nous a permis de synthétiser une collection de nouveaux composés greffés par un résidu acide aminé en position 4. Parmi ces composés, certains présentent des activités cytotoxiques du même ordre de grandeur que celles des Imiqualines de première génération. Pour l'ensemble de ces composés, les solubilités théoriques en milieu aqueux obtenues sont nettement supérieures à celles des Imiqualines leaders.

Par ailleurs, cette étude met en évidence l'importance du substituant en position 1. En effet, un groupement pyrocatéchol en position 1 semble primordial pour maintenir l'activité cytotoxique des composés sur la lignée cellulaire de mélanome testée. Sur la position 4, la nature du substituant n'influe que très peu l'activité biologique. De grandes modifications entre l'**EAPB02302**, qui n'a qu'une amine primaire en position 4, et les nouveaux composés portant un résidu d'acide aminé complet, ne modifient pas significativement l'activité, qui reste similaire aux composés de première génération. Cependant, ces modulations permettent d'augmenter significativement la solubilité théorique dans l'eau.

Ces résultats encourageants obtenus sur la lignée cellulaire représentative du mélanome A375 nous incitent à poursuivre l'étude *in vivo* sur des souris xénogreffées. Avant cela, une étude de métabolisme des nouveaux composés les plus actifs va être mise en place. Celle-ci aura pour objectif de déterminer le comportement *in vitro* des composés en présence d'enzymes du métabolisme (utilisation pour cela de lysats de microsomes hépatiques). Le clivage de l'acide aminé greffé pourrait permettre la libération de métabolites selon la réaction proposée dans la figure 44. Cette réaction pourrait permettre de libérer l'**EAPB02302** suite à une réaction de clivage par certaines enzymes telles que les peptidases. Cela pourrait permettre d'administrer, dans des études *in vivo* à prévoir, l'**EAPB02302** sous forme de prodrogue et ainsi s'affranchir de problème de faible solubilité de ce composé.

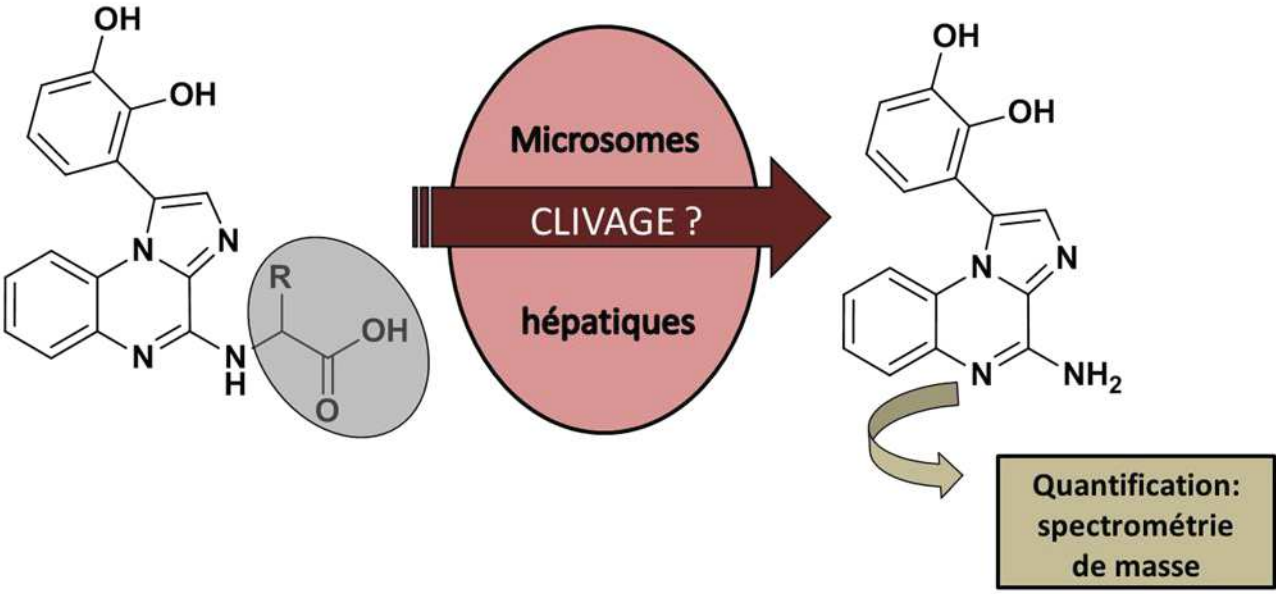


Figure 44. Perspectives d'étude des nouveaux composés synthétisés présentant un acide aminé greffé en position 4 : étude du clivage de cette fonction et dosage par LC-ESI-MS/MS du composé obtenu après clivage.

V. Article 2: "Development of new imidazo[1,2-*a*]quinoxalines derivatives against melanoma: grafting with amino acids to enhance water solubility."

Publication soumise à la revue *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, le 20 Juin 2018.

Development of new imidazo[1,2-*a*]quinoxalines derivatives against melanoma: grafting with amino acids to enhance water solubility

Adrien Chouchou[1,*], Cindy Patinote[1,2,*], Pierre Cuq[1],
Pierre-Antoine Bonnet[1], Carine Deleuze-Masquéfa[1,a]

1. IBMM, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France
2. Société d'Accélération du Transfert de Technologies (SATT AxLR), CSU, 950 rue Saint Priest, 34090 Montpellier, France
*These authors contribute equally to this work.
a. Corresponding author: carine.masquefa@umontpellier.fr

Keywords : Imidazo[1,2-*a*]quinoxaline, melanoma, Imiqualine, A375, structure–activity relationship.

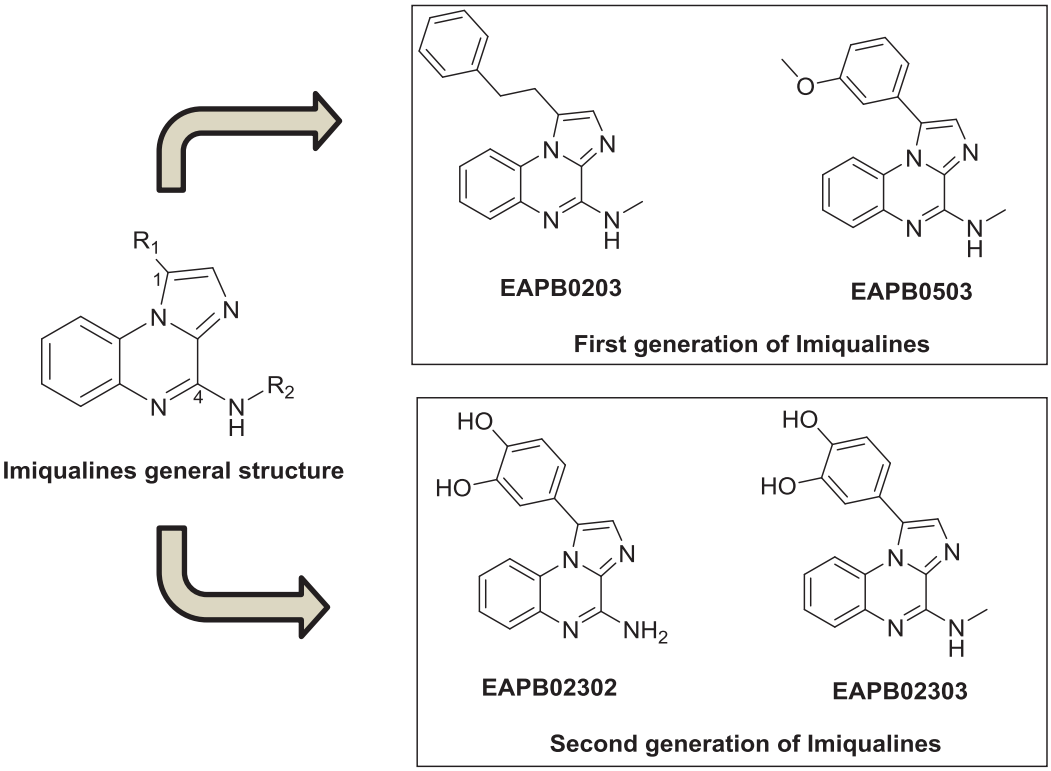
Abstract

In the context of current anti-cancer studies of Imiqualine derivatives, a novel series of imidazo[1,2-*a*]quinoxalines substituted on position 4 by amino-acids was efficiently synthesized with short reaction times by using microwave assistance and tested for their activities on human melanoma cell lines A375. The presence of an amino acid did not improve the cytotoxic activity compared to the second generation of Imiqualine compounds. However, the cytotoxic activities of compounds **11a**, **9d** and **11b** are relatively close to the ones of the first generation with a notable improvement of their water solubilities. The presence of dihydroxy groups on the phenyl on the position 1 is important both in terms of theoretical water solubility and high cytotoxic efficiency.

1. Introduction

Cutaneous melanoma is a malignant tumour of melanocytes located in the basal epidermis. This is the most aggressive and lethal skin cancer because of its fast metastatic development.[234,235] Its incidence is increasing worldwide for several decades. While early stages can achieve remarkable outcomes with surgery alone, metastatic melanoma requires therapeutic treatment intervention. Thanks to genomic researches, knowledge regarding the molecular biology of melanomas has improved, leading to recent FDA-approved therapies.[236–238] However, all the subtypes of the disease are not equally treated[238] and marked resistance mostly against kinase inhibitors rapidly occurs.[239,240] As the incidence among the worldwide fair-skinned population is increasing, this public health concern remains challenging.

Our group works on the development of imidazo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives presented on scheme 1, also called Imiqualines, as potential antitumoral agents, particularly for the treatment of melanoma.[241,242] The first generation of imiqualines was essentially substituted on position 1 by multiple aromatic moieties directly grafted to the main structure or via an alkyl linker. The second generation is characterized by the presence of the 3,4-dihydroxyphenyl moiety on position 1 since the presence of such catechol residue enhances global hydrophily. The chemical modulations of the first hits, **EAPB0203** and **EAPB0503**, afforded new leads **EAPB02303** and its N-demethylated derivative **EAPB02302**, with utmost impressive *in vitro* activities on A375 human melanoma cancer cell line in the nanomolar range.[6,7]



Scheme 1. General and lead compounds structures of Imiqualines

EAPB02302 and **EAPB02303** are considered as promising anticancer agents but exhibit high lipophilicity (log P values estimated at 2.68 and 3.55, respectively), which might be critical for future preclinical *in vivo* studies. Indeed, their low solubility in water might be a major drawback for development, especially in the case of intravenous use. In a preliminary study[243], pharmacokinetic parameters of **EAPB02303** were determined in mice after a single intraperitoneal administration. For this, the compound was solubilized in a mixture of DMSO, Tween 80 and sodium chloride solution 0.9% (10/10/80, v/v/v). The use of DMSO is recognized as toxic[244], in particular when used repeatedly as would be the case in an efficacy study. In order to optimize the results of efficacy studies, we chose to chemically modulate our lead compounds to obtain more soluble compounds with a moderate impact on the cytotoxic activity. The input of the introduction of various amino acids on position 4 of the heterocycle was studied both on physicochemical properties and biological activity. Such approach to increase solubility, which remains a key factor for potential pharmaceutical development, has already been described in the literature.[245,246] We present herein the synthesis of new imidazo[1,2-*a*]quinoxalines decorated with a panel of amino acids and their *in vitro* preliminary evaluation on A375 cell line.

2. Results and discussion

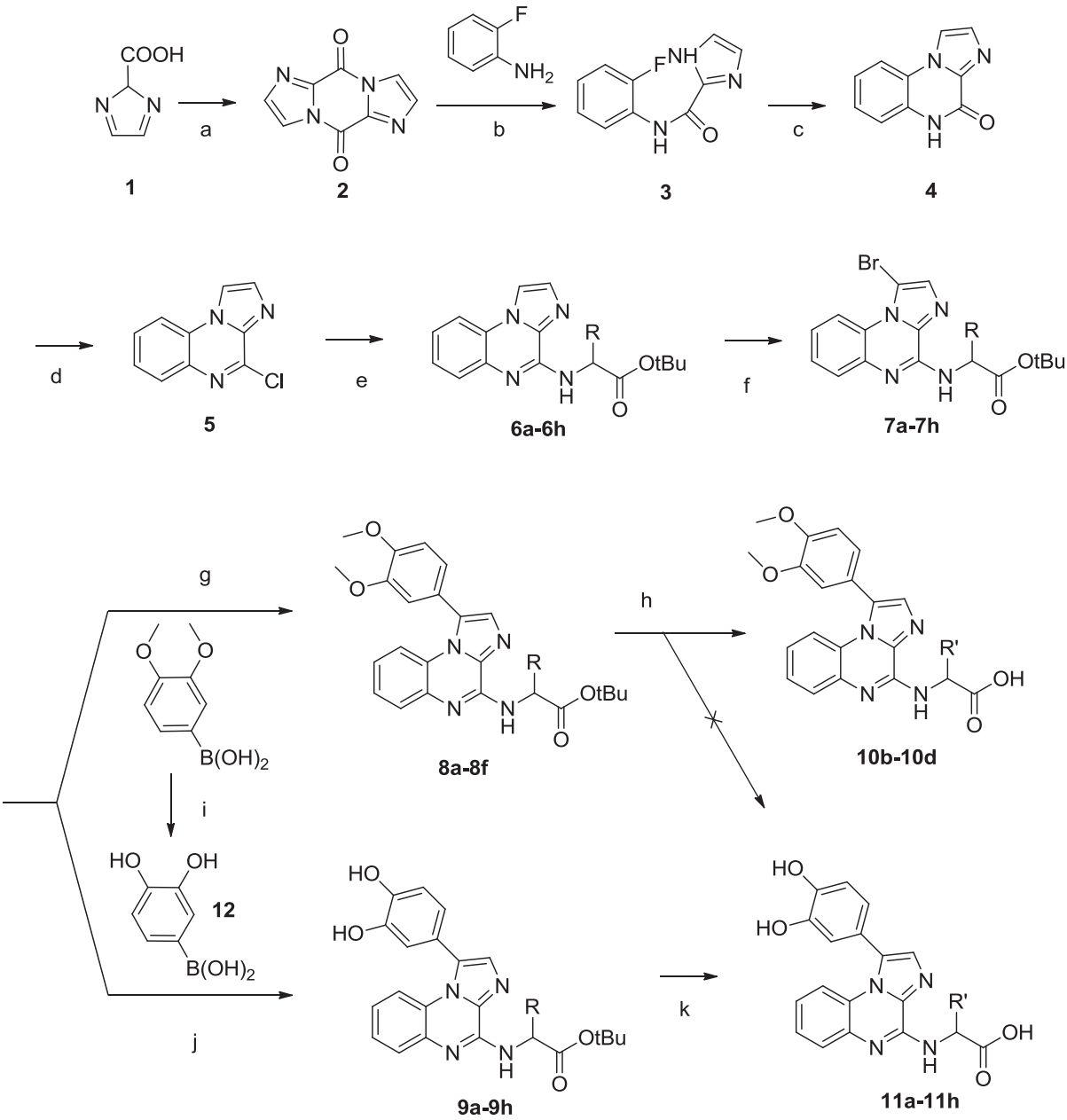
2.1. Synthesis of imidazo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives

The synthetic pathways and the structures of imidazo[1,2-*a*]quinoxalines used in this study are given in schemes 2 and 3. Intermediates **1** to **5** were synthetized thanks to a route we previously described.[247,248] Briefly, the carbonylimidazole dimer **2** results from the condensation of the 2-imidazole carboxylic acid **1** in presence of thionyl chloride. Addition of the *o*-fluoroaniline on the dimer **2** gives the intermediate **3**. Cyclisation is allowed by using sodium hydride in

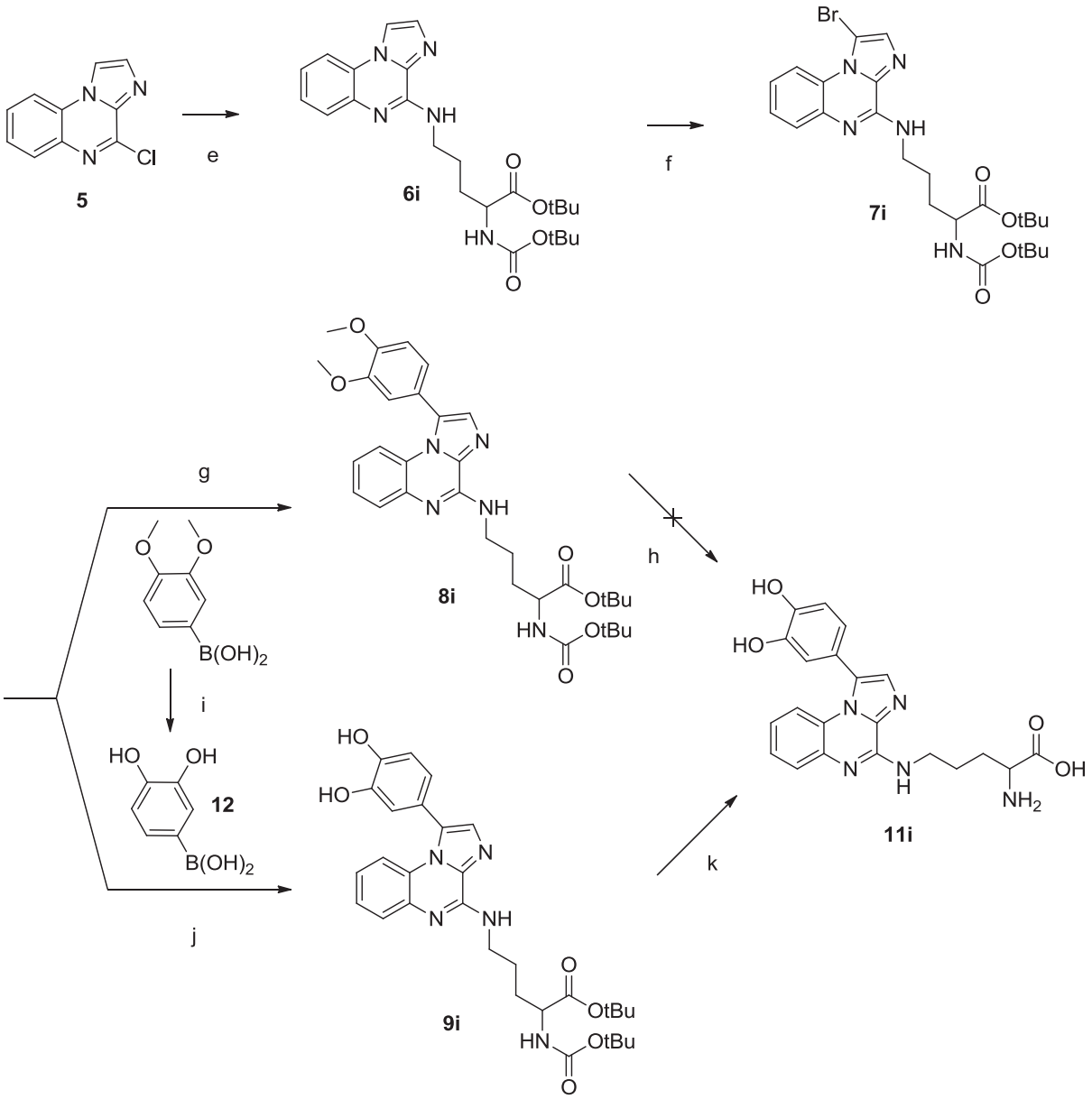
dimethylacetamide. Treatment of compound **4** with phosphorus oxychloride and *N,N*-diethylaniline gives the chlorinated key intermediate **5**.

The chlorine of **5** can be substituted by an amino group in presence of diisopropylethylamine in DMF under microwave assistance. The amino group could be either the α-amine of an amino acid or the amine of the side chain for the ornithine residue. The introduction of HGlyOtBu, HAlaOtBu, HValOtBu, HLeuOtBu, HLysOtBu, HOrnOtbu, HPheOtBu, HTyrOtBu is described on scheme 2 and the grafting of BocOrnOtBu is depicted on scheme 3. The bromination of the intermediates **6** by *N*-bromosuccinimide leads to compounds **7**. The 3,4-dimethoxyphenyl group is introduced in position 1 *via* a Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction to furnish compounds **8a-8f** and **8i**. Boron tribromide did not allow the cleavage of all the protections to give the targeted compounds **11a-11i,** even if supplementary equivalents of BBr_3 were added at the beginning or during the reaction, or if the reaction time was extended. Such approach allows the obtention of compounds **10b-10d** as the main products. These compounds present remaining methoxy groups on the phenyl on position 1 without the protecting groups on the amino acid. The by-products correspond to one methoxy-remaining group on the phenyl either on position 3' or 4', but unfortunately, they could not be recovered separately.

As targeted compounds **11a-11f** could not be obtained by this way, we decided to deprotect first the 3,4-dimethoxyphenylboronic acid by boron tribromide in order to obtain the 3,4-dihydroxyphenylboronic acid **12**. This boronic acid readily reacts with intermediates **7** under microwave irradiation to furnish the hydroxylated derivatives **9a-9i**. A final step of deprotection of the amino acid moiety using TFA in CH_2Cl_2 was used to obtain the final compounds **11a-11i**.



Scheme 2. Synthesis of imidazo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives grafted by the α-amine of the amino acid. (a) $SOCl_2$, reflux, 18h; (b) NaHMDS, THF, 0°C to RT, 5h; (c) NaH, DMA, reflux, 48h; (d) DEA, $POCl_3$, MW (130°C, 15 min); (e) H-amino acid (PG)-OtBu, DIEA, DMF, MW (150°C, 30-60 min); (f) NBS, $CHCl_3$, reflux, 2h; (g) 3,4-dimethoxyphenylboronic acid, $Pd(PPh_3)_4$, Na_2CO_3, DME, MW (140°C, 20 min); (h) BBr_3, CH_2Cl_2, RT, 1h-3h, (i) BBr_3, CH_2Cl_2, RT, 1h; (j) 3,4-dihydroxyphenylboronic acid **12**, $Pd(PPh_3)_4$, Na_2CO_3, DME, MW (140°C, 20 min); (k) TFA/ CH_2Cl_2 (1/1, v/v), RT, 1-2h.



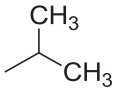
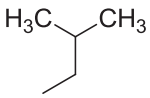
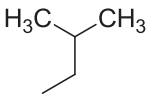
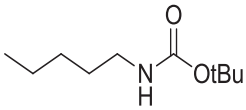
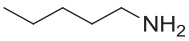
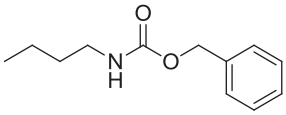
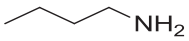
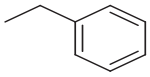
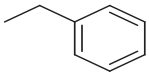
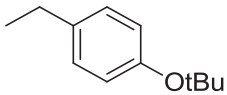
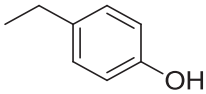
Scheme 3. Synthesis of the ornithine-containing imidazo[1,2-*a*]quinoxaline derivative grafted by the side chain. (e) Boc-Orn-OtBu,HCl, DIEA, DMF, MW (150°C, 30-60 min); (f) NBS, $CHCl_3$, reflux, 2h; (g) 3,4-dimethoxyphenylboronic acid, $Pd(PPh_3)_4$, Na_2CO_3, DME, MW (140°C, 20 min); (h) BBr_3, CH_2Cl_2, RT, 1h-3h, (i) BBr_3, CH_2Cl_2, RT, 1h; (j) 3,4-dihydroxyphenylboronic acid **12**, $Pd(PPh_3)_4$, Na_2CO_3, DME, MW (140°C, 20 min); (k) TFA/ CH_2Cl_2 (1/1, v/v), RT, 1-2h.

2.2. In vitro cytotoxic activity on A375 cell lines and calculated log P

All new imidazo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives **8b**-**d**, **8f**, **9a**-**9i**, **10b**-**d** and **11a**-**11i** were tested for their *in vitro* antiproliferative activities on the human melanoma cell line A375. Theirs IC_{50} values (concentration of the compound (nM) producing 50% cell growth inhibition after 96 h of drug exposure) were determined using *in vitro* cytotoxicity assay and are displayed in Tables 1 and 2.

Table 1

Synthesis of imidazo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives grafted by the α-amine of the amino acid as described in scheme 2: Log P, theoretical water solubility (mg/mL) at pH 7.4 calculated values and IC_{50} values against A375 (human melanoma cell line).

Amino acids	–R	–R'	Compounds	Log P [a]	Theoretical water solubility (mg/mL) at pH 7.4 [b]	IC_{50} values [c] (nM)
Gly	—H	—H	**8a**	5.25	$5.88.10^{-4}$	ND[d]
			9a	4.99	$1.79.10^{-3}$	1 932
			11a	2.59	47.18	403
Ala	$—CH_3$	$—CH_3$	**8b**	5.61	$3.80.10^{-4}$	> 10 000
			9b	5.34	$1.15.10^{-3}$	6 103
			10b	3.21	6.01	5 947
			11b	2.94	19.92	584
Val			**8c**	6.47	$1.35.10^{-4}$	> 10 000
			9c	6.21	$4.07.10^{-4}$	7 180
			10c	4.07	1.91	> 10 000
			11c	3.81	6.5	7 166
Leu			**8d**	6.98	$7.43.10^{-5}$	> 10 000
			9d	6.72	$2.23.10^{-4}$	128
			10d	4.58	0.89	> 10 000
			11d	4.32	3.08	838
Lys			**8e**	7.05	$5.70.10^{-5}$	ND[d]
			9e	6.79	$1.56.10^{-4}$	4 575
			11e	2.78	$4.34.10^{-3}$	673
Orn			**8f**	7.01	$3.43.10^{-5}$	> 10 000
			9f	6.75	$9.07.10^{-5}$	1 111
			11f	2.57	$5.82.10^{-3}$	3 404
Phe			**9g**	6.82	$1.06.10^{-4}$	1 999
			11g	3.71	6.47	951
Tyr			**9h**	7.99	$3.31.10^{-5}$	4 117
			11h	3.05	10.17	2 174

[a,b] Log P and theoretical water solubility (mg/mL) at pH 7.4 values are calculated using the ACDLabs® software.
[c] IC_{50} values, concentration of the compound (nM) producing 50% cell growth inhibition after 96 h of drug exposure, as determined by the MTT assay. Each experiment was triplicated, and the results are presented as average values. Coefficients of variation were less than 10%.
[d] ND: Not determined.

Table 2

Synthesis of imidazo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives grafted by the side chain amine of the ornithine as described in scheme 3: log P, theoretical water solubility (mg/mL) at pH 7.4 calculated values and IC_{50} values against A375 (human melanoma cell line).

Amino acid	Compounds	Log P [a]	Theoretical water solubility (mg/mL) at pH 7.4 [b]	IC_{50} values [c] (nM)
Orn	**8i**	6.12	$1.62.10^{-4}$	> 10 000
	9i	5.86	$4.50.10^{-4}$	> 10 000
	11i	2.99	$3.05.10^{-3}$	5 168

[a,b] Log P and theoretical water solubility (mg/mL) at pH 7.4 values are calculated using the ACDLabs® software.
[c] IC_{50} values, concentration of the compound (nM) producing 50% cell growth inhibition after 96 h of drug exposure, as determined by the MTT assay. Each experiment was triplicated, and the results are presented as average values. Coefficients of variation were less than 10%.

Lipophilicity, expressed as the logarithm of a compound's octanol/water partition coefficient (log P), is a physicochemical property of drugs that affects many biological mechanisms, especially drug absorption and distribution (absorption, plasma protein binding and membrane permeation).[249] This parameter can also be correlated to solubility, metabolism and toxicity.[250,251] In a drug discovery process, compounds must be sufficiently lipophilic to cross the membrane barriers and at the same time be sufficiently water soluble to reach their targets. Therefore, a poor water solubility is a common cause of rejection during development.[252] This is why we also estimated the lipophilicity and hydrophilicity properties of all new compounds by predicting their log P and theoretical water solubility values thanks to fragmentation methods available on the ACDLabs® software. These calculated values are purely theoretical but give a good estimate of what might be the solubility of the compounds in blood circulation (pH 7.4). This approach is used in pharmaceutical industry for the screening of new compounds.[253,254] Results of our new imidazo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives were compared each other as well as with Imiqualine leads of first and second generations as shown in Table 3.

Table 3

First and second generations Imiqualines leads: Log P, theoretical water solubility (mg/mL) at pH 7.4 calculated values and IC_{50} values against A375 (human melanoma cell line).

Compounds	Log P[a]	Theoretical water solubility (mg/mL) at pH 7.4[b]	IC_{50} values[c] (nM)
EAPB0203	4.6	$3.46.10^{-3}$	1 570
EAPB0503	4.48	$2.60.10^{-3}$	200
EAPB02302	2.68	$4.28.10^{-2}$	60
EAPB02303	3.55	$1.74.10^{-2}$	10

[a,b] Log P and theoretical water solubility (mg/mL) at pH 7.4 values are calculated using the ACDLabs® software.
[c] IC_{50} values, concentration of the compound (nM) producing 50% cell growth inhibition after 96 h of drug exposure, as determined by the MTT assay. Each experiment was triplicated, and the results are presented as average values. Coefficients of variation were less than 10%.

Compounds **8b**, **8c**, **8d** and **8f** are fully protected on amino acid residues (side chain and carboxylic function) with 3,4-dimethoxy substitution on the phenyl ring in position 1. They exhibit weak IC_{50} values higher than 10 000 nM. Compounds belonging to this chemical series are very lipophilic with

estimated log P values higher than 5 (5.25, 5.61, 6.47, 6.98, 7.05 and 7.01 for compounds **8a**, **8b**, **8c**, **8d**, **8e** and **8f**, respectively). The theoretical water solubility of compounds **8** at pH 7.4 is very low since the order varies from $5.88.10^{-4}$ to $3.43.10^{-5}$ mg/mL for compounds **8a** and **8f,** respectively. Therefore, the presence of protective groups on the amino acids and the dimethoxy groups on the phenyl appears not to be valuable, both in terms of water solubility and cytotoxic efficiency.

Compounds **9a**-**9i** are only protected on the amino acids moieties. These compounds exhibit various cytotoxic activities with IC_{50} values ranging from 128 to 7 180 nM, for **9d** and **9c**, respectively. These compounds show high lipophilicity since their log P values range from 4.99 to 7.99 for **9a** and **9h** respectively. Similarly, the theoretical values of water solubility are between $3.31.10^{-5}$ and $1.79.10^{-3}$ mg/mL for **9h** and **9a**, respectively. By comparing compounds **8** and **9**, we note that the replacement of the methoxy groups by the hydroxy groups induces, for some residues, an important increase of the biological activities. Nevertheless, such modification, with conservation of the amino acid protection, does not improve the theoretical water solubility of the new synthesized compounds.

Compounds **10b**-**10d** are deprotected on the amino acid residues but still present dimethoxy groups on the phenyl substitution at position 1. These compounds exhibit IC_{50} values higher than 5 000 nM (IC_{50} values at 5 947 nM for **10b** and higher than 10 000 nM for **10c** and **10d**). However, log P values are below 5 and theoretical water solubilities are higher than 0.8 mg/mL. The transition from compounds **8** to compounds **10** provides a significant decrease of lipophilicity as well as an improvement of theoretical water solubility. The comparison of the compounds according to the grafted residue permits to highlight this improvement. Actually, log P values decrease from 5.61 to 3.21, from 6.47 to 4.07 and from 6.98 to 4.58 for compounds **8b** to **10b**, **8c** to **10c** and **8d** to **10d**, respectively. Even more impressive, the theoretical water solubility values increase from $3.8.10^{-4}$ to 6.01, $1.35.10^{-4}$ to 1.91 and $7.43.10^{-5}$ to 0.89 mg/mL for compounds **8b** to **10b**, **8c** to **10c** and **8d** to **10d**, respectively. The deprotection of the amino acid residues does not improve the cytotoxic activity but clearly improve the theoretical water solubility. The presence of dihydroxy groups on the phenyl substitution at position 1 appears to be necessary for the conservation of the cytotoxic activity.

Compounds **11a**-**11i** are fully deprotected on the amino acid residues as well as on the catechol group at the position 1. Among these compounds, five have attractive IC_{50} values below 1 000 nM: 403, 584, 673, 838 and 951 for **11a**, **11b**, **11e**, **11d** and **11g**, respectively. These compounds show log P values ranged from 2.57 to 4.32 for **11f** and **11d**. Several compounds present very interesting theoretical water solubility: compounds **11a**, **11b**, **11c**, **11d**, **11g** and **11h** exhibit values higher than 3 mg/mL. Very high values are obtained for compounds **11a** and **11b** at 47.18 and 19.92 mg/mL, respectively. The presence of an alkyl or aryl moiety on the side chain of the amino acid residue does not decrease water solubility for these compounds. Nevertheless, it appears not to be the same tendency for compounds **11e**, **11f** and **11i** with theoretical water solubility values less than 1.10^{-2} mg/mL. These compounds possess ornithine (grafted by the α-amine or by the amine of the side chain of the amino acid) or lysine residues. These two residues are therefore not valuable for increasing the water solubility of the compounds at pH 7.4.

Compounds **11a**, **11b**, **11c** and **11d** present an alkyl chain at position 4 while compounds **11g** and **11h** display an aryl chain on this same position. Saturated alkyl groups appear to be most interesting for

our compounds. A trend seems to stand out thanks to these four compounds: when the carbon number of the alkyl chain increases, the biological activity and the theoretical solubility decrease (except for **11c** which activity does not follow this tendency). Moreover, the presence of a phenyl group causes an increase in lipophilicity and a decrease in biological activities, in particular with the presence of a phenol (compound **11h**) on the side chain of the amino acid moiety. The compounds with lysine or ornithine residues did not show favorable results neither for biological activities or water solubility.

The transition of compounds **9** to compounds **11** is carried out by the cleavage of all the protecting groups of the amino acid moieties. Such deprotection step forms less lipophilic compounds (lower log P) with similar or higher activity for all the amino acids tested, except for compounds **11d** and **11f** with the leucine and ornithine residues grafted by the amine in alpha, respectivelyIt should be noted that the presence of an ornithine amino acid residue grafted by the α-amine or the amine of the side chain of the amino acid does not bring any significant differences to the biological activity (IC_{50} values at 3 404 nM for **11f** and 5 168 nM for **11i**) or to the solubility (theoretical water solubility values at $5.82.10^{-3}$ and $3.05.10^{-3}$ mg/mL for **11f** and **11i**, respectively). Surprisingly, compound **11e** which present a butan-1-amine substitution on the lateral chain of the amino acid show an higher biological activity than compound **11f** with a propan-1-amine substitution on its lateral chain (IC_{50} values at 673 nM for **11e** and 3 404 nM for **11f**) with equivalent theoretical water solubilities (values of $4.34.10^{-3}$ and $5.82.10^{-3}$ mg/mL for **11e** and **11f**, respectively).

Consequently, compounds **11a**, **11b**, **11d** and **11g** particularly hold our attention, both in terms of improvement of the solubility and in terms of conservation of the biological activity. The activities of these compounds are in the same potency order as the leads of the first generation of Imiqualines (IC_{50} values at 200 and 1 570 nM for **EAPB0503** and **EAPB0203**, respectively), presented in Table 3. Moreover, these new compounds show highly improved water solubility. Indeed, the values for the first generation compounds were only $2.60.10^{-3}$ and $3.46.10^{-3}$ mg/mL for **EAPB0203** and **EAPB0503**, respectively. On the other hand, second generation compounds of Imiqualines exhibit higher activities than the new compounds, with IC_{50} values at 10 and 60 nM for **EAPB02303** and **EAPB02302** respectively. However, the solubility values of these compounds are low, with values of $1.74.10^{-2}$ mg/mL for **EAPB02303** and $4.28.10^{-2}$ mg/mL for **EAPB02302**.

All of these data and results allow us to put forward a preferential amino acid with a small alkyl side chain in order to get a good compromise between maintaining the activity and increasing water solubility. From the close analysis of Tables 1 and 2, it can be observed that compounds **11a**, **11b**, **9d**, **11d**, **11e** and **11g** are the most active members of this series against the tested melanoma A375 cell line (IC_{50} values less than 1 000 nM). Surprisingly, compound **9d** shows the lowest IC_{50} value among these new synthesized compounds. Among these 6 attractive compounds, only **11a**, **11b**, **11d**, **11e** and **11g** show a marked and considerable improvement of the theoretical water solubility.

3. Conclusion

The synthesis and study of the amino acid groups grafted on position 4 within the Imiqualine series highlight the fact that the nature of the substituent on position 4 is not essential for the biological activity. Indeed, large modifications between **EAPB02302**, which only has a primary amine, and the

new compounds with a complete amino acid residue do not significantly modify the activity, which remains similar to our first Imiqualines generation. However, these modulations allow to significantly increase the theoretical water solubility. The presence of dihydroxy groups on the phenyl appears to be necessary for the conservation of the cytotoxic activity on the melanoma cell line tested. These encouraging results obtained on the representative A375 melanoma cell line will prompt us to study further *in vivo* evaluation on xenografted mice.

4. Experimental

4.1. Chemistry

4.1.1. General

All solvents and reagents were obtained from Sigma Aldrich Chemical Co., Iris Biotech GmbH, Alfa Aesar Co, VWR and FluoroChem UK and used without further purification unless indicated otherwise. Silica gel chromatography was conducted with 230-400 mesh 60 Å silica gel (Sigma Aldrich Chemical Co.). The progress of reaction was monitored by TLC exposure to UV light (254 nm and 366 nm). Thin layer chromatography plates (Kieselgel 60 F254) were purchased from Merck. Microwave assisted organic syntheses were performed on the Biotage Initiator 2.0 Microwave. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were obtained on Brüker AC-400 spectrometer. Chemical shifts are given as parts per million (ppm) using residual dimethylsulfoxide signal for protons (δ_{DMSO} = 2.46 ppm) and carbons (δ_{DMSO} = 40.00 ppm). Coupling constants are reported in Hertz (Hz). Spectral splitting partners are designed as follow: singlet (s); doublet (d); triplet (t); quartet (q); multiplet (m). Mass spectral data were obtained on a Micromass Q-Tof (Waters) spectrometer equipped with ESI source (Laboratoires de Mesures Physiques, Plateau technique de l'Institut des Biomolecules Max Mousseron, Université de Montpellier, Montpellier, France). Mass spectra were recorded in positive mode between 50 and 1500 Da, capillary and cone tension were 3000 and 20 V, respectively. The High Resolution Mass Spectroscopy (HRMS) analyses are carried out by direct introduction on a Synapt G2-S mass spectrometer (Waters, SN: UEB205) equipped with ESI source. The mass spectra were recorded in positive mode, between 100 and 1500 Da. The capillary tension is 1 000 V and the cone tension is 30 V. The source and desolvation temperature are 120°C and 250°C, respectively.

4.1.2. Amino acids grafted on 4-chloroimidazo[1,2-*a*]quinoxaline

4.1.2.1. *tert-butyl 2-(imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-ylamino)acetate (**6a**)*

Glycine tert-butyl ester hydrochloride (0.824 g, 4.9 mmol), N,N-diisopropylethylamine (1.6 mL, 9.8 mmol) and 4-chloroimidazo[1,2-*a*]quinoxaline **5** (0.5 g, 2.5 mmol) were dissolved in dimethylformamide (10 mL) in a microwave adapted vial and sealed. The reaction was irradiated at 150°C for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was dissolved in ethyl acetate (100 mL) and successively washed with saturated aqueous ammonium chloride, distilled water and finally brine. The organic phase was dried on sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a beige solid (42% yield). $C_{16}H_{18}N_4O_2$. M_W: 298.34 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.42 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 4.13 (d, 2H, *J* = 8 Hz, CH_2 α), 7.33 (m, 1H, CH 7), 7.42 (m, 1H, CH 8), 7.56 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.66 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 2), 7.96 (t, 1H, *J* = 8 Hz, NH), 8.13 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 8.64 (d, 1H, *J* = 4

Hz, CH 1). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 28.23 (CH_3 tBu), 43.30 (CH_2 α), 80.85 (Cq tBu), 115.14 (CH 1), 115.91 (CH 6), 123.57 (CH 7), 124.93 (Cq 5a), 126.74 (CH 9), 126.88 (CH 8), 132.52 (CH 2), 132.71 (Cq 3a), 136.81 (Cq 9a), 147.49 (Cq 4), 169.79 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 299.0 $[M+H]^+$.

4.1.2.2. *tert-butyl 2-(imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-ylamino)propanoate (**6b**)*

Same procedure used for the synthesis of **6a** (see 4.1.2.1). L-alanine tert-butyl ester hydrochloride (1.339 g, 7.4 mmol), N,N-diisopropylethylamine (2.4 mL, 14.7 mmol) and 4-chloroimidazo[1,2-*a*]quinoxaline **5** (0.5 g, 2.5 mmol) in dimethylformamide (10 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a beige solid (48% yield). $C_{17}H_{20}N_4O_2$. M_W: 312.37 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.41 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.51 (d, 3H, *J* = 8 Hz, CH_3 β), 4.59 (m, 1H, CH α), 7.35 (m, 1H, CH 7), 7.42 (m, 1H, CH 8), 7.56 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.66 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 2), 7.75 (d, 1H, *J* = 4 Hz, NH), 8.13 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 8.64 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 1). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 17.46 (CH_3 β), 28.14 (CH_3 tBu), 50.22 (CH α), 80.59 (Cq tBu), 115.18 (CH 1), 115.91 (CH 6), 123.64 (CH 7), 124.93 (Cq 5a), 126.73 (CH 9), 126.88 (CH 8), 132.42 (CH 2), 132.58 (Cq 3a), 136.72 (Cq 9a), 147.03 (Cq 4), 172.84 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 313.2 $[M+H]^+$.

4.1.2.3. *tert-butyl 2-(imidazo[1,2-a]quinoxalin-10-ylamino)-3-methylbutanoate (**6c**)*

Same procedure used for the synthesis of **6a** (see 4.1.2.1) . L-valine t-butyl ester hydrochloride (2.060 g, 9.8 mmol), N,N-diisopropylethylamine (2.4 mL, 14.7 mmol) and 4-chloroimidazo[1,2-*a*]quinoxaline **5** (0.5 g, 2.5 mmol) in dimethylformamide (10 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a beige solid (51% yield). $C_{19}H_{24}N_4O_2$. M_W: 340.42 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.03 (d, 3H, *J* = 8 Hz, CH_3 γ), 1.06 (d, 3H, *J* = 8 Hz, CH_3 γ'), 1.43 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 2.33 (m, 1H, CH β), 4.52 (t, 1H, *J* = 16 Hz, CH α), 7.15 (d, 1H, *J* = 8 Hz, NH), 7.35 (m, 1H, CH 7), 7.43 (m, 1H, CH 8), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.68 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 2), 8.14 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 8.66 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 1). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 19.42 (CH_3 γ, CH_3 γ'), 28.17 (CH_3 tBu), 30.41 (CH β), 59.76 (CH α), 81.15 (Cq tBu), 115.37 (CH 1), 115.95 (CH 6), 123.88 (CH 7), 125.00 (Cq 5a), 126.84 (CH 9), 126.95 (CH 8), 132.48 (CH 2), 132.58 (Cq 3a), 136.59 (Cq 9a), 147.29 (Cq 4), 171.59 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 341.0 $[M+H]^+$.

4.1.2.4. *tert-butyl 2-(imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-ylamino)-4-methylpentanoate (**6d**)*

Same procedure used for the synthesis of **6a** (see 4.1.2.1). L-leucine t-butyl ester hydrochloride (2.198 g, 9.8 mmol), N,N-diisopropylethylamine (2.4 mL, 14.7 mmol) and 4-chloroimidazo[1,2-*a*]quinoxaline **5** (0.5 g, 2.5 mmol) in dimethylformamide (10 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a beige solid (60% yield). $C_{20}H_{26}N_4O_2$. M_W: 354.45 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 0.93 (d, 3H, *J* = 8 Hz, CH_3 δ), 0.96 (d, 3H, *J* = 8 Hz, CH_3 δ'), 1.40 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.64 (m, 1H, CH_2 β), 1.79 (m, 1H, CH γ), 1.94 (m, 1H, CH_2 β), 4.63 (t, 1H, *J* = 4 Hz, CH α), 7.33 (m, 1H, CH 7), 7.42 (m, 1H, CH 8), 7.57 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.64 (d, 1H, *J* = 4 Hz, NH), 7.66 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 2), 8.13 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 8.64 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 1). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 22.06 (CH_3 δ), 23.31 (CH_3 δ'), 25.14 (CH γ), 28.15 (CH_3 tBu), 40.01 (CH_2 β), 52.93 (CH α), 80.67 (Cq tBu), 115.21 (CH 1), 115.90 (CH 6), 123.64 (CH 7), 124.93 (Cq 5a), 126.76 (CH 8), 126.89 (CH 9), 132.41 (CH 2), 132.58 (Cq 3a), 136.74 (Cq 9a), 147.40 (Cq 4), 172.75 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 355.0 $[M+H]^+$.

4.1.2.5. *tert-butyl 6-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-ylamino)hexanoate (**6e**)*

Same procedure used for the synthesis of **6a** (see 4.1.2.1). N-epsilon-t-butyloxycarbonyl-L-lysine t-butyl ester hydrochloride (2.565 g, 7.6 mmol), N,N-diisopropylethylamine (2.4 mL, 14.7 mmol) and 4-chloroimidazo[1,2-*a*]quinoxaline **5** (0.5 g, 2.5 mmol) in dimethylformamide (10 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a beige solid (32% yield). $C_{25}H_{35}N_5O_4$. M_W: 469.58 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.35 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.41 (s, 9H , 3xCH_3 OtBu), 1.43 (m, 2H, CH_2 γ), 1.45 (m, 2H, CH_2 δ), 1.91 (m, 2H, CH_2 β), 2.93 (m, 2H, CH_2 ε), 4.54 (m, 1H, CH α), 6.79 (t, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH_2 ε), 7.32 (m, 1H, CH 7), 7.40 (m, 1H, CH 8), 7.52 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.64 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH α), 7.66 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 2), 8.12 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 8.64 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 1). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 23.52 (CH_2 γ), 28.19 (CH_3 tBu), 28.74 (CH_3 tBu), 29.67 (CH_2 δ), 30.92 (CH_2 β), 40.35 (CH_2 ε), 54.64 (CH α), 79.68 (Cq tBu), 80.80 (Cq tBu), 115.25 (CH 1), 115.93 (CH 6), 123.70 (CH 7), 124.98 (Cq 5a), 126.81 (CH 9), 126.92 (CH 8), 132.44 (CH 2), 132.60 (Cq 3a), 136.75 (Cq 9a), 147.35 (Cq 4), 172.41 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 470.0 $[M+H]^+$.

4.1.2.6. *tert-butyl 5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-(imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-ylamino)pentanoate (**6f**)*

Same procedure used for the synthesis of **6a** (see 4.1.2.1). N-delta-carbobenzoxy-L-ornithine alpha-t-butyl ester hydrochloride (3.702 g, 10.3 mmol), N,N-diisopropylethylamine (2.4 mL, 14.7 mmol) and 4-chloroimidazo[1,2-*a*]quinoxaline **5** (0.5 g, 2.5 mmol) in dimethylformamide (10 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a beige solid (38% yield). $C_{27}H_{31}N_5O_4$. M_W: 489.57 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.29 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.46 (m, 2H, CH_2 γ), 1.80 (m, 2H, CH_2 β), 2.97 (m, 2H, CH_2 δ), 4.45 (m, 1H, CH α), 4.90 (s, 2H, C<u>H</u>$_2$-Phenyl), 7.19 (m, 1H, CH 7), 7.21 (s, 1H, N<u>H</u>-CH_2 δ), 7.23 (m, 5H, CH Phenyl), 7.31 (m, 1H, CH 8), 7.46 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 9), 7.52 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH α), 7.56 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 2), 8.02 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 8.53 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 1). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 26.63 (CH_2 γ), 28.13 (CH_3 tBu), 28.66 (CH_2 β), 40.71 (CH_2 δ), 54.50 (CH α), 65.67 (<u>C</u>H$_2$-Phenyl), 80.91 (Cq tBu), 115.30 (CH 1), 115.99 (CH 6), 123.77 (CH 7), 125.03 (Cq 5a), 126.84 (CH 9), 126.97 (CH 8), 128.86 (CH Phenyl), 132.50 (CH 2), 132.65 (Cq 3a), 136.77 (Cq 9a), 147.36 (Cq 4), 156.65 (Cq Phenyl), 172.28 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 490.0 $[M+H]^+$.

4.1.2.7. *tert-butyl 2-(imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-ylamino)-3-phenylpropanoate (**6g**)*

Same procedure used for the synthesis of **6a** (see 4.1.2.1). L-Phenylalanine t-butyl ester hydrochloride (1.9 g, 7.4 mmol), N,N-diisopropylethylamine (2.4 mL, 14.7 mmol) and 4-chloroimidazo[1,2-*a*]quinoxaline **5** (0.5 g, 2.5 mmol) in dimethylformamide (10 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a beige solid (37% yield). $C_{23}H_{24}N_4O_2$. M_W: 388.46 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.33 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 3.21 (m, 1H, CH_2 β), 3.34 (m, 1H, CH_2 β), 4.83 (m, 1H, CH α), 7.21 (t, 1H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 7.29 (t, 2H, *J* = 8 Hz, 2xCH Phenyl), 7.33 (m, 3H, CH 7, 2xCH Phenyl), 7.42 (m, 1H, CH 8), 7.57 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.61 (d, 1H, *J* = 8 Hz, NH), 7.66 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 2), 8.13 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 8.64 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 1). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 26.97 (CH_3 tBu), 35.91 (CH_2 β), 54.93 (CH α), 79.88 (Cq tBu), 114.18 (CH 1), 114.85 (CH 6),

122.74 (CH 7), 123.89 (Cq 5a), 125.74 (CH 9), 125.84 (CH Phenyl), 125.86 (CH 8), 127.59 (CH Phenyl), 128.69 (CH Phenyl), 131.41 (CH 2), 135.54 (Cq 3a), 137.05 (Cq 9a), 146.02 (Cq 4), 170.53 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 389.0 $[M+H]^+$.

4.1.2.8. *tert-butyl 3-(4-(tert-butoxy)phenyl)-2-(imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-ylamino)propanoate (**6h**)*

Same procedure used for the synthesis of **6a** (see 4.1.2.1). O-t-Butyl-L-tyrosine t-butyl ester hydrochloride (1.6 g, 4.9 mmol), N,N-diisopropylethylamine (2.4 mL, 14.7 mmol) and 4-chloroimidazo[1,2-*a*]quinoxaline **5** (0.5 g, 2.5 mmol) in dimethylformamide (10 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a beige solid (26% yield). $C_{27}H_{32}N_4O_3$. M_W: 460.57 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.23 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.31 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 3.13 (m, 1H, CH_2 β), 3.27 (m, 1H, CH_2 β), 4.81 (m, 1H, CH α), 6.86 (dd, 2H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 7.22 (dd, 2H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 7.34 (m, 1H, CH 7), 7.44 (m, 1H, CH 8), 7.57 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.61 (d, 1H, *J* = 4 Hz, NH), 7.66 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 2), 8.13 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 8.64 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 1). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 28.02 (CH_3 tBu), 28.93 (CH_3 tBu), 36.63 (CH_2 β), 56.09 (CH α), 78.11 (Cq tBu), 80.87 (Cq tBu), 115.22 (CH 1), 115.90 (CH 6), 123.80 (CH 7), 123.98 (2xCH Phenyl), 124.96 (Cq 5a), 126.79 (CH 9), 126.90 (CH 8), 130.31 (2xCH Phenyl), 132.47 (CH 2), 132.61 (Cq 3a), 136.60 (Cq 9a), 147.04 (Cq 4), 154.03 (2xCq Phenyl), 171.72 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 461.2 $[M+H]^+$.

4.1.2.9. *tert-butyl 6-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-ylamino)hexanoate (**6i**)*

Same procedure used for the synthesis of **6a** (see 4.1.2.1). N-alpha-t-butyloxycarbonyl-L-ornithine t-butyl ester hydrochloride (1.596 g, 4.9 mmol), N,N-diisopropylethylamine (1.6 mL, 9.8 mmol) and 4-chloroimidazo[1,2-*a*]quinoxaline **5** (0.5 g, 2.5 mmol) in dimethylformamide (10 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a beige solid (48% yield). $C_{24}H_{33}N_5O_4$. M_W: 455.56 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.32 (s, 9H, CH-COO<u>tBu</u>), 1.38 (s, 9H, NH-COO<u>tBu</u>), 1.67 (m, 2H, CH_2 β), 1.72 (m, 2H, CH_2 γ), 3.55 (m, 2H, CH_2 δ), 3.90 (m, 1H, CH α), 7.14 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH α), 7.29 (m, 1H, CH 7), 7.39 (m, 1H, CH 8), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.63 (s, 1H, CH 2), 7.73 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH_2 δ), 8.08 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 8.59 (d, 1H, CH 1). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 25.87 (CH_2 β), 28.04 (CH_3 tBu), 28.67 (CH_3 tBu), 28.43 (CH_2 γ), 39.79 (CH_2 δ), 54.75 (CH α), 78.45 (Cq tBu), 80.53 (Cq tBu), 115.02 (CH 1), 115.79 (CH 6), 122.99 (CH 7), 124.65 (Cq 5a), 126.50 (CH 9), 126.73 (CH 8), 132.20 (CH 2), 132.87 (Cq 3a), 147.78 (Cq 4), 156.00 (Cq 9a), 172.33 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 456.0.1 $[M+H]^+$.

4.1.3. Bromination

4.1.3.1. *tert-butyl 2-((1-bromoimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)acetate (**7a**)*

A solution of **6a** (0.26 g, 0.87 mmol) and N-bromosuccinimide (0.19 g, 1.0 mmol) in $CHCl_3$ (50 mL) was heated under reflux for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was dissolved in ethyl acetate (50 mL) and successively washed with saturated aqueous ammonium chloride, saturated aqueous sodium bicarbonate, distilled water and finally brine (50 mL). The organic phase was dried on sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The compound was obtained as a beige oil (97% yield) and used without purification. $C_{16}H_{17}BrN_4O_2$. M_W:

377.24 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.42 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 4.12 (d, 2H, J = 8 Hz, CH_2 α), 7.33 (m, 1H, CH 7), 7.47 (m, 1H, CH 8), 7.59 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 9), 7.76 (s, 1H, CH 2), 8.02 (t, 1H, J = 8 Hz, NH), 8.96 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 6). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 28.22 (CH_3 tBu), 43.26 (CH_2 α), 80.93 (Cq tBu), 99.61 (Cq 1), 115.12 (CH 6), 123.08 (CH 7), 126.08 (Cq 5a), 127.35 (CH 9), 127.78 (CH 8), 134.01 (Cq 3a), 134.79 (CH 2), 137.63 (Cq 9a), 147.05 (Cq 4), 169.64 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 377.0 $[M+H]^+$.

4.1.3.2. *tert-butyl 2-((1-bromoimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)propanoate (**7b**)*

A solution of **6b** (0.3 g, 0.96 mmol) and N-bromosuccinimide (0.2 g, 1.1 mmol) in $CHCl_3$ (50 mL) was heated under reflux for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was dissolved in ethyl acetate (50 mL) and successively washed with saturated aqueous ammonium chloride, saturated aqueous sodium bicarbonate, distilled water and finally brine. The organic phase was dried on sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The compound was obtained as a beige oil (98% yield) and used without purification. $C_{17}H_{19}BrN_4O_2$. M_W: 391.26 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.41 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.51 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 β), 4.57 (m, 1H, CH α), 7.36 (m, 1H, CH 7), 7.46 (m, 1H, CH 8), 7.60 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 9), 7.76 (s, 1H, CH 2), 7.82 (d, 1H, J = 4 Hz, NH), 8.97 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 6). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 17.40 (CH_3 β), 28.03 (CH_3 tBu), 50.24 (CH α), 80.70 (Cq tBu), 99.68 (CH 1), 115.06 (CH 6), 123.17 (CH 7), 126.06 (Cq 5a), 127.30 (CH 9), 127.45 (CH 8), 133.87 (Cq 3a), 134.73 (CH 2), 137.47 (Cq 9a), 146.58 (Cq 4), 172.66 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 391.1 $[M+H]^+$.

4.1.3.3. *tert-butyl 2-((1-bromoimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-3-methylbutanoate (**7c**)*

A solution of **6c** (0.38 g, 1.1 mmol) and N-bromosuccinimide (0.24 g, 1.4 mmol) in $CHCl_3$ (50 mL) was heated under reflux for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was dissolved in ethyl acetate (50 mL) and successively washed with saturated aqueous ammonium chloride, saturated aqueous sodium bicarbonate, distilled water and finally brine. The organic phase was dried on sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The compound was obtained as a beige oil (96% yield) and used without purification. $C_{19}H_{23}BrN_4O_2$. M_W: 419.31 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.02 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 γ), 1.05 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 γ'), 1.43 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 2.33 (m, 1H, CH β), 4.49 (t, 1H, J = 16 Hz, CH α), 7.20 (d, 1H, J = 8 Hz, NH), 7.37 (m, 1H, CH 7), 7.48 (m, 1H, CH 8), 7.62 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 9), 7.76 (s, 1H, CH 2), 8.97 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 6). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 19.42 (CH_3 γ, CH_3 γ'), 28.17 (CH_3 tBu), 30.40 (CH β), 59.76 (CH α), 81.25 (Cq tBu), 99.86 (Cq 1), 115.08 (CH 6), 123.38 (CH 7), 126.16 (Cq 5a), 127.44 (CH 9), 127.47 (CH 8), 133.81 (Cq 3a), 134.74 (CH 2), 137.40 (Cq 9a), 146.84 (Cq 4), 171.44 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 419.1 $[M+H]^+$.

4.1.3.4. *tert-butyl 2-((1-bromoimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-4-methylpentanoate (**7d**)*

A solution of **6d** (0.35 g, 1.0 mmol) and N-bromosuccinimide (0.2 g, 1.2 mmol) in $CHCl_3$ (50 mL) was heated under reflux for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was dissolved in ethyl acetate (50 mL) and successively washed with saturated aqueous ammonium chloride, saturated aqueous sodium bicarbonate, distilled water and finally brine. The organic phase was dried on sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The compound was obtained as a beige oil (95% yield) and used without purification. $C_{20}H_{25}BrN_4O_2$. M_W: 433.34 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 0.91 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 δ), 0.95 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 δ'), 1.40 (s,

9H, 3xCH_3 OtBu), 1.61 (m, 1H, CH_2 β), 1.78 (m, 1H, CH γ), 1.94 (m, 1H, CH_2 β), 4.60 (t, 1H, *J* = 4 Hz, CH α), 7.36 (m, 1H, CH 7), 7.48 (m, 1H, CH 8), 7.60 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.71 (d, 1H, *J* = 4 Hz, NH), 7.76 (s, 1H, CH 2), 8.97 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 22.03 (CH_3 δ), 23.31 (CH_3 δ'), 25.12 (CH γ), 28.14 (CH_3 tBu), 40.10 (CH_2 β), 52.95 (CH α), 80.76 (Cq tBu), 99.21 (Cq 1), 115.07 (CH 6), 123.17 (CH 7), 126.08 (Cq 5a), 127.37 (CH 9), 127.46 (CH 8), 133.88 (Cq 3a), 134.71 (CH 2), 137.55 (Cq 9a), 146.97 (Cq 4), 172.59 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 433.1 $[M+H]^+$.

4.1.3.5. *tert-butyl 2-((1-bromoimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-6-((tert-butoxycarbonyl)amino)hexanoate (**7e**)*

A solution of **6e** (1.2 g, 2.5 mmol) and N-bromosuccinimide (0.54 g, 3.1 mmol) in $CHCl_3$ (50 mL) was heated under reflux for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was dissolved in ethyl acetate (50 mL) and successively washed with saturated aqueous ammonium chloride, saturated aqueous sodium bicarbonate, distilled water and finally brine. The organic phase was dried on sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The compound was obtained as a beige oil (78% yield) and used without purification. $C_{25}H_{34}BrN_5O_4$. M_W: 548.47 g/mol. ^{1}H NMR *δ* (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.23 (m, 2H, CH_2 γ), 1.34 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.40 (s, 9H , 3xCH_3 OtBu), 1.55 (m, 2H, CH_2 β), 1.90 (m, 2H, CH_2 δ), 2.86 (m, 2H, CH_2 ε), 4.16 (m, 1H, CH α), 6.78 (t, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH_2 ε), 7.34 (m, 1H, CH 7), 7.47 (m, 1H, CH 8), 7.65 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 8.03 (s, 1H, CH 2), 8.34 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH α), 8.97 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 22.90 (CH_2 γ), 28.15 (CH_3 tBu), 28.73 (CH_3 tBu), 29.46 (CH_2 δ), 31.34 (CH_2 β), 39.36 (CH_2 ε), 54.61 (CH α), 80.85 (Cq tBu), 81.14 (Cq tBu), 99.70 (Cq 1), 115.06 (CH 6), 123.19 (CH 7), 126.09 (Cq 5a), 127.39 (CH 9), 127.46 (CH 8), 133.87 (CH 2), 134.70 (Cq 3a), 137.54 (Cq 9a), 146.88 (Cq 4), 171.39 (C=O), 172.21 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 548.1 $[M+H]^+$.

4.1.3.6. *tert-butyl 5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-((1-bromoimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)pentanoate (**7f**)*

A solution of **6f** (0.45 g, 0.9 mmol) and N-bromosuccinimide (0.20 g, 1.1 mmol) in $CHCl_3$ (50 mL) was heated under reflux for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was dissolved in ethyl acetate (50 mL) and successively washed with saturated aqueous ammonium chloride, saturated aqueous sodium bicarbonate, distilled water and finally brine. The organic phase was dried on sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The compound was obtained as a beige oil (94% yield) and used without purification. $C_{27}H_{30}BrN_5O_4$. M_W: 568.46 g/mol. ^{1}H NMR *δ* (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.40 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.55 (m, 2H, CH_2 γ), 1.91 (m, 2H, CH_2 β), 3.03 (m, 2H, CH_2 δ), 4.52 (m, 1H, CH α), 5.00 (s, 2H, C<u>H$_2$</u>-Phenyl), 7.26 (s, 1H, N<u>H</u>-CH_2 δ), 7.33 (m, 5H, CH Phenyl), 7.38 (m, 1H, CH 7), 7.48 (m, 1H, CH 8), 7.59 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 9), 7.67 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH α), 7.76 (s, 1H, CH 2), 8.99 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 26.53 (CH_2 γ), 28.13 (CH_3 tBu), 28.50 (CH_2 β), 40.42 (CH_2 δ), 54.43 (CH α), 65.59 (<u>C</u>H$_2$-Phenyl), 80.92 (Cq tBu), 99.69 (Cq 1), 115.07 (CH 6), 123.20 (CH 7), 126.10 (Cq 5a), 127.39 (CH 9), 127.45 (CH 8), 128.18 (CH Phenyl), 128.78 (CH Phenyl), 133.87 (Cq 3a), 134.70 (CH 2), 137.72 (Cq 9a), 146.85 (Cq 4), 156.56 (Cq Phenyl), 172.05 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 568.3 $[M+H]^+$.

4.1.3.7. *tert-butyl 2-((1-bromoimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-3-phenylpropanoate (**7g**)*

A solution of **6g** (0.34 g, 0.9 mmol) and N-bromosuccinimide (0.18 g, 1.1 mmol) in $CHCl_3$ (50 mL) was heated under reflux for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture

was dissolved in ethyl acetate (50 mL) and successively washed with saturated aqueous ammonium chloride, saturated aqueous sodium bicarbonate, distilled water and finally brine. The organic phase was dried on sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The compound was obtained as a beige oil (83% yield) and used without purification. $C_{23}H_{23}BrN_4O_2$. M_W: 467.36 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.33 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 3.21 (m, 1H, CH_2 β), 3.31 (m, 1H, CH_2 β), 4.80 (m, 1H, CH α), 7.21 (t, 1H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 7.29 (m, 2H, 2xCH Phenyl), 7.32 (m, 2H, 2xCH Phenyl), 7.36 (m, 1H, CH 7), 7.48 (m, 1H, CH 8), 7.60 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.65 (d, 1H, *J* = 8 Hz, NH), 7.75 (s, 1H, CH 2), 8.97 (dd, 1H, *J* = 8, 2 Hz, CH 6). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 28.04 (CH_3 tBu), 36.91 (CH_2 β), 56.01 (CH α), 81.06 (Cq tBu), 99.76 (Cq 1), 115.07 (CH 6), 123.33 (CH 7), 126.13 (Cq 5a), 126.96 (CH Phenyl), 127.45 (CH 9), 127.47 (CH 8), 128.68 (CH Phenyl), 129.77 (CH Phenyl), 133.80 (Cq Phenyl), 134.76 (CH 2), 137.45 (Cq 3a), 138.05 (Cq 9a), 146.66 (Cq 4), 171.45 (C=O). MS (ESI +, QTof, m/z): 467.1 $[M+H]^+$.

4.1.3.8. *tert-butyl 2-((1-bromoimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-3-(4-(tert-butoxy)phenyl)propanoate (**7h**)*

A solution of **6h** (0.34 g, 0.9 mmol) and N-bromosuccinimide (0.18 g, 1.1 mmol) in $CHCl_3$ (50 mL) was heated under reflux for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was dissolved in ethyl acetate (50 mL) and successively washed with saturated aqueous ammonium chloride, saturated aqueous sodium bicarbonate, distilled water and finally brine. The organic phase was dried on sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The compound was obtained as a beige oil (91% yield) and used without purification. $C_{23}H_{23}BrN_4O_2$. M_W: 467.36 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.22 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.31 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 3.11 (m, 1H, CH_2 β), 3.24 (m, 1H, CH_2 β), 4.76 (m, 1H, CH α), 6.85 (dd, 2H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 7.20 (dd, 2H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 7.34 (m, 1H, CH 7), 7.46 (m, 1H, CH 8), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.65 (d, 1H, *J* = 8 Hz, NH), 7.75 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 2), 8.98 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 28.04 (CH_3 tBu), 28.93 (CH_3 tBu), 36.61 (CH_2 β), 56.03 (CH α), 78.10 (Cq tBu), 81.01 (Cq tBu), 99.71 (Cq 1), 115.08 (CH 6), 123.32 (CH 7), 123.96 (2xCH Phenyl), 126.13 (Cq 5a), 127.42 (CH 9), 127.47 (CH 8), 130.33 (2xCH Phenyl), 132.54 (Cq 3a), 134.78 (CH 2), 137.43 (Cq 9a), 146.61 (Cq 4), 154.06 (2xCq Phenyl), 171.53 (C=O). MS (ESI +, QTof, m/z): 467.1 $[M+H]^+$.

4.1.3.9. *tert-butyl 5-((1-bromoimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)pentanoate (**7i**)*

A solution of **6i** (0.49 g, 1.1 mmol) and N-bromosuccinimide (0.23 g, 1.3 mmol) in $CHCl_3$ (50 mL) was heated under reflux for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was dissolved in ethyl acetate (50 mL) and successively washed with saturated aqueous ammonium chloride, saturated aqueous sodium bicarbonate, distilled water and finally brine. The organic phase was dried on sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The compound was obtained as a beige oil (92% yield) and used without purification. $C_{24}H_{32}BrN_5O_4$. M_W: 534.45 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.44 (s, 9H, CH-COO<u>tBu</u>), 1.46 (s, 9H, NH-COO<u>tBu</u>), 1.81 (m, 2H, CH_2 β), 1.93 (m, 2H, CH_2 γ), 3.73 (m, 2H, CH_2 δ), 4.27 (m, 1H, CH α), 5.39 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH α), 6.33 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH_2 δ), 7.27 (m, 1H, CH 7), 7.43 (m, 1H, CH 8), 7.48 (s, 1H, CH 2), 7.81 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 8.98 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 25.74 (CH_2 β), 28.07 (CH_3 tBu), 28.45 (CH_3 tBu), 30.17 (CH_2 γ), 40.42 (CH_2 δ), 54.00 (CH α), 79.75 (Cq tBu), 81.98 (Cq tBu), 99.05 (Cq 1), 115.02 (CH 6), 122.77 (CH 7), 124.54 (Cq 5a), 127.12 (CH 8), 127.98 (CH

9), 134.22 (CH 2), 135.98 (Cq 3a), 146.86 (Cq 4), 155.59 (Cq 9a), 171.92 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 534.1 $[M+H]^+$.

4.1.4. Suzuki-Miyaura cross-coupling Reactions

4.1.4.1. *tert-butyl 2-((1-(3,4-dimethoxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)acetate (**8a**)*

To a mixture of **7a** (0.270 g, 0.71 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added 3,4-dimethoxyphenylboronic acid (0.143 g, 0.79 mmol), tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0.042 g, 0.036 mmol) and sodium carbonate (0.152 g, 1.43 mmol) in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 20 min at 150°C and then filtered on a celite pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and successively washed with saturated aqueous ammonium chloride, saturated aqueous sodium bicarbonate, distilled water and finally brine. The organic phase was dried on sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (19% yield). $C_{24}H_{26}N_4O_4$. MW: 434.49 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.44 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 3.74 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 3.87 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 4.14 (d, 2H, *J* = 8 Hz, CH_2 α), 7.03 (m, 1H, CH 7), 7.11 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 7.14 (s, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 7.18 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 7.31 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.34 (m, 1H, CH 8), 7.54 (s, 1H, CH 2), 7.56 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.96 (t, *J* = 8 Hz 1H, NH). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 28.26 (CH_3 tBu), 43.33 (CH_2 α), 80.86 (Cq tBu), 112.31 (CH Phenyl), 114.25 (CH Phenyl), 115.93 (CH 6), 122.75 (CH 7), 123.30 (CH Phenyl), 126.03 (Cq 5a), 126.58 (CH 8), 127.20 (CH 9), 132.66 (CH 2), 133.141 (Cq 3a), 130.93 (Cq 1), 137.71 (Cq 9a), 149.27 (Cq Phenyl), 150.14 (Cq Phenyl), 147.74 (Cq 4), 169.85 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 435.1 $[M+H]^+$.

4.1.4.2. *tert-butyl 2-((1-(3,4-dimethoxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)propanoate (**8b**)*

Same procedure used for the synthesis of **8a** (see 4.1.4.1.). To a mixture of **7b** (0.440 g, 1.12 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added 3,4-dimethoxyphenylboronic acid (0.225 g, 1.24 mmol), tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0.065 g, 0.056 mmol) and sodium carbonate (0.237 g, 2.24 mmol) in a microwave-adapted vial. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (42% yield). $C_{25}H_{28}N_4O_4$. MW: 448.51 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.32 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.42 (d, 3H, *J* = 8 Hz, CH_3 β), 3.64 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 3.76 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 4.57 (m, 1H, CH α), 6.92 (m, 1H, CH 7), 7.01 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 7.03 (s, 1H, CH Phenyl), 7.08 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 7.20 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.22 (m, 1H, CH 8), 7.42 (s, 1H, CH 2), 7.46 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.82 (d, 1H, *J* = 4 Hz, NH). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 17.59 (CH_3 β), 28.25 (CH_3 tBu), 50.30 (CH α), 80.72 (Cq tBu), 112.40 (CH Phenyl), 114.33 (CH Phenyl), 116.00 (CH 6), 122.77 (CH 7), 122.90 (Cq 1), 123.37 (CH Phenyl), 126.10 (CH 8), 126.65 (Cq 5a), 127.28 (CH 9), 131.05 (Cq 3a), 132.63 (CH 2), 137.68 (Cq 9a), 147.33 (Cq 4), 149.36 (Cq Phenyl), 150.22 (Cq Phenyl), 172.96 (C=O). MS (ESI +, QTof, m/z): 449.2 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{25}H_{29}N_4O_4$ 449.2189, found 449.2186.

4.1.4.3. *tert-butyl 2-((1-(3,4-dimethoxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-3-methylbutanoate (**8c**)*

Same procedure used for the synthesis of **8a** (see 4.1.4.1.). To a mixture of **7c** (0.370 g, 0.88 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added 3,4-dimethoxyphenylboronic acid (0.176 g, 0.97 mmol), tetrakis

(triphenylphosphine) palladium (0.051 g, 0.044 mmol) and sodium carbonate (0.186 g, 1.76 mmol) in a microwave-adapted vial. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (69% yield). $C_{27}H_{32}N_4O_4$. MW: 476.57 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 0.95 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 γ), 0.98 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 γ'), 1.34 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 2.23 (m, 1H, CH β), 3.63 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 3.77 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 4.44 (t, 1H, J = 16 Hz, CH α), 6.93 (m, 1H, CH 7), 7.00 (s, 1H, CH Phenyl), 7.02 (d, 1H, J = 4 Hz, NH), 7.06 (d, 1H, J = 4 Hz, CH Phenyl), 7.08 (d, 1H, J = 4 Hz, CH Phenyl), 7.22 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 6), 7.26 (m, 1H, CH 8), 7.42 (s, 1H, CH 2), 7.49 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 9). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 19.43 (CH_3 γ'), 19.56 (CH_3 γ), 28.28 (CH_3 tBu), 30.57 (CH β), 56.15 (OCH_3 Phenyl), 56.24 (OCH_3 Phenyl), 59.73 (CH α), 81.31 (Cq tBu), 112.41 (CH Phenyl), 114.35 (CH Phenyl), 116.02 (CH 6), 122.67 (Cq 1), 123.14 (CH 7), 123.39 (CH Phenyl), 126.19 (Cq 5a), 126.71 (CH 8), 127.39 (CH 9), 131.25 (Cq Phenyl), 132.68 (CH 2), 133.00 (Cq 3a), 137.55 (Cq 9a), 147.56 (Cq 4), 149.36 (Cq Phenyl), 150.26 (Cq Phenyl), 171.70 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 477.1 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{27}H_{33}N_4O_4$ 477.2502, found 477.2505.

4.1.4.4. *tert-butyl 2-((1-(3,4-dimethoxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-4-methylpentanoate (**8d**)*

Same procedure used for the synthesis of **8a** (see 4.1.4.1.). To a mixture of **7d** (0.360 g, 0.83 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added 3,4-dimethoxyphenylboronic acid (0.166 g, 0.91 mmol), tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0.048 g, 0.041 mmol) and sodium carbonate (0.176 g, 1.66 mmol) in a microwave-adapted vial. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (61% yield). $C_{28}H_{34}N_4O_4$. MW: 490.59 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 0.83 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 δ), 0.86 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 δ'), 1.31 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.55 (m, 1H, CH_2 β), 1.70 (m, 1H, CH γ), 1.86 (m, 1H, CH_2 β), 3.63 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 3.76 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 4.55 (t, 1H, J = 4 Hz, CH α), 7.01 (d, 1H, J = 4 Hz, CH Phenyl), 7.05 (s, 1H, CH Phenyl), 7.08 (d, 1H, J = 4 Hz, CH Phenyl), 7.12 (m, 1H, CH 7), 7.20 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 6), 7.24 (m, 1H, CH 8), 7.41 (s, 1H, CH 2), 7.45 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 9), 7.50 (d, 1H, J = 4 Hz, NH). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 22.14 (CH_3 δ), 23.41 (CH_3 δ'), 25.25 (CH γ), 28.25 (CH_3 tBu), 40.29 (CH_2 β), 52.96 (CH α), 56.14 (OCH_3 Phenyl), 56.23 (OCH_3 Phenyl), 80.79 (Cq tBu), 112.40 (CH Phenyl), 114.34 (CH Phenyl), 115.99 (CH 6), 122.78 (Cq 1), 122.88 (CH 7), 123.36 (CH Phenyl), 126.11 (Cq 5a), 126.69 (CH 8), 127.29 (CH 9), 131.09 (Cq 3a), 132.61 (CH 2), 137.70 (Cq 9a), 147.66 (Cq 4), 149.36 (Cq Phenyl), 150.23 (Cq Phenyl), 172.86 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 491.0 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{28}H_{35}N_4O_4$ 491.2658, found 491.2654.

4.1.4.5. *tert-butyl 6-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-((1-(3,4-dimethoxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)hexanoate (**8e**)*

Same procedure used for the synthesis of **8a** (see 4.1.4.1.). To a mixture of **7e** (1.090 g, 1.99 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added 3,4-dimethoxyphenylboronic acid (0.397 g, 2.18 mmol), tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0.114 g, 0.099 mmol) and sodium carbonate (0.421 g, 3.97 mmol) in a microwave-adapted vial. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (7% yield). $C_{33}H_{43}N_5O_6$. MW: 605.72 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.36 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.41 (m, 2H, CH_2 γ), 1.43 (s, 9H , 3xCH_3 OtBu), 1.46 (m, 2H, CH_2 δ), 1.91 (m, 2H, CH_2 β), 2.94 (m, 2H, CH_2 ε), 3.73 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 3.87 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 4.57 (m, 1H, CH α), 6.80 (t, 1H, J = 4 Hz, N<u>H</u>-CH_2

ε), 7.03 (m, 1H, CH 7), 7.11 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 7.15 (s, 1H, CH Phenyl), 7.18 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 7.31 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.35 (m, 1H, CH 8), 7.52 (s, 1H, CH 2), 7.55 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.59 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH α). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 23.49 (CH_2 γ), 28.18 (CH_3 tBu), 28.72 (CH_3 tBu), 29.64 (CH_2 δ), 30.94 (CH_2 β), 40.40 (CH_2 ε), 54.56 (CH α), 56.05 (OCH_3 Phenyl), 56.14 (OCH_3 Phenyl), 77.78 (Cq tBu), 80.80 (Cq tBu), 112.30 (CH Phenyl), 114.22 (CH Phenyl), 115.91 (CH 6), 122.67 (CH 7), 123.28 (CH Phenyl), 126.03 (Cq 5a), 126.56 (CH 8), 127.23 (CH 9), 131.01 (Cq 1), 132.53 (CH 2), 132.98 (Cq 3a), 137.61 (Cq 9a), 147.51 (Cq 4), 149.27 (Cq Phenyl), 150.14 (Cq Phenyl), 156.04 (Cq Phenyl), 172.41 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 606.2 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{33}H_{44}N_5O_6$ 606.3292, found 606.3291.

4.1.4.6. *tert-butyl 5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-((1-(3,4-dimethoxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)pentanoate (**8f**)*

Same procedure used for the synthesis of **8a** (see 4.1.4.1.). To a mixture of **7f** (0.470 g, 0.89 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added 3,4-dimethoxyphenylboronic acid (0.165 g, 0.91 mmol), tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0.048 g, 0.041 mmol) and sodium carbonate (0.175 g, 1.65 mmol) in a microwave-adapted vial. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (42% yield). $C_{35}H_{39}N_5O_6$. MW: 625.71 g/mol. ^{1}H NMR *δ* (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): ^{1}H NMR *δ* (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.52 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.79 (m, 2H, CH_2 γ), 1.99 (m, 1H, CH_2 δ), 2.10 (m, 1H, CH_2 δ), 3.36 (m, 2H, CH_2 β), 3.88 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 4.02 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 5.12 (m, 1H, CH α), 5.38 (s, 2H, C<u>H</u>$_2$-Phenyl), 6.99 (d, 2H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 7.03 (s, 1H, CH Phenyl), 7.10 (m, 1H, CH 7), 7.28 (s, 1H, N<u>H</u>-CH_2 δ), 7.33 (m, 5H, CH Phenyl), 7.36 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.47 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH α), 7.52 (m, 1H, CH 8), 7.56 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH 2), 7.66 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 9). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 25.62 (CH_2 γ), 28.09 (CH_3 tBu), 30.04 (CH_2 β), 40.61 (CH_2 δ), 54.42 (CH α), 66.58 (<u>C</u>H$_2$-Phenyl), 82.42 (Cq tBu), 111.30 (CH Phenyl), 113.24 (CH Phenyl), 114.69 (Cq 1), 115.99 (CH 6), 123.16 (CH 7), 126.40 (Cq 5a), 126.82 (CH 9), 126.87 (CH 8), 128.01 (CH Phenyl), 128.08 (CH Phenyl), 129.49 (CH Phenyl), 131.85 (CH 2), 132.87 (Cq 3a), 136.68 (Cq 9a), 149.16 (Cq 4), 150.12 (Cq Phenyl), 152.37 (Cq Phenyl), 156.51 (Cq Phenyl), 171.59 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 626.0 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{35}H_{40}N_5O_6$ 626.2979, found 626.2982.

4.1.4.7. *tert-butyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-((1-(3,4-dimethoxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)pentanoate (**8i**)*

Same procedure used for the synthesis of **8a** (see 4.1.4.1.). To a mixture of **7i** (0.515 g, 0.96 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added 3,4-dimethoxyphenylboronic acid (0.193 g, 1.06 mmol), tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0.056 g, 0.048 mmol) and sodium carbonate (0.204 g, 1.93 mmol) in a microwave-adapted vial. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (45% yield). $C_{32}H_{41}N_5O_6$. MW: 591.70 g/mol. ^{1}H NMR *δ* (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.34 (s, 9H, CH-COO<u>tBu</u>), 1.39 (s, 9H, NH-COO<u>tBu</u>), 1.73 (m, 2H, CH_2 β), 1.77 (m, 2H, CH_2 γ), 3.57 (m, 2H, CH_2 δ), 3.74 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 3.87 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 3.90 (m, 1H, CH α), 6.95 (m, 1H, CH 7), 7.09 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 7.14 (s, 1H, CH Phenyl), 7.15 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 7.19 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH α), 7.28 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.31 (m, 1H, CH 8), 7.47 (s, 1H, CH 2), 7.58 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.72 (t, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH_2 δ). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 25.97 (CH_2 β), 28.06 (CH_3 tBu), 28.25 (CH_3 tBu), 28.67 (CH_2 γ), 39.79 (CH_2 δ), 54.77 (CH α), 56.05 (OCH_3 Phenyl), 56.15 (OCH_3 Phenyl),

78.46 (Cq tBu), 80.54 (Cq tBu), 112.32 (CH Phenyl), 114.22 (CH Phenyl), 115.83 (CH 6), 122.12 (CH 7), 122.82 (CH Phenyl), 123.26 (Cq 1), 125.75 (Cq 5a), 126.41 (CH 8), 127.07 (CH 9), 132.32 (CH 2), 138.24 (Cq 3a), 148.04 (Cq 4), 149.26 (Cq Phenyl), 150.10 (Cq Phenyl), 156.01 (Cq 9a), 172.36 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 592.1 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{32}H_{42}N_5O_6$ 592.3135, found 592.3137.

4.1.4.8. *tert-butyl 2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)acetate (**9a**)*

To a mixture of **7a** (0.320 g, 0.85 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added compound **12** (0.392 g, 2.54 mmol), tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0.049 g, 0.040 mmol) and sodium carbonate (0.179 g, 1.70 mmol) in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 20 min at 150°C and then filtered on a celite pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and successively washed with saturated aqueous ammonium chloride, saturated aqueous sodium bicarbonate, distilled water and finally brine. The organic phase was dried on sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (16% yield). $C_{22}H_{22}N_4O_4$. MW: 406.43 g/mol. 1H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d6): ^{1}H NMR *δ* (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.42 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 4.15 (d, 2H, *J* = 8 Hz, CH_2 α), 6.82 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 6.89 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 6.93 (s, 1H, CH Phenyl), 7.04 (m, 1H, CH 7), 7.33 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.37 (m, 1H, CH 8), 7.46 (s, 1H, CH 2), 7.54 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.98 (m, 1H, NH), 9.32 (s, 1H, C-OH Phenyl), 9.41 (s, 1H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 28.23 (CH_3 tBu), 43.30 (CH_2 α), 80.85 (Cq tBu), 115.37 (Cq 1), 115.92 (CH 6), 116.48 (CH 7), 117.89 (CH Phenyl), 121.13 (CH Phenyl), 122.06 (CH 8), 122.81 (CH Phenyl), 125.98 (Cq 5a), 126.54 (CH 9), 127.77 (Cq Phenyl), 131.43 (Cq 3a), 132.36 (CH 2), 132.89 (Cq 9a), 146.04 (Cq Phenyl), 147.13 (Cq Phenyl), 147.65 (Cq 4), 169.76 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 407.2 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{22}H_{23}N_4O_4$ 407.1706, found 407.1710.

4.1.4.9. *tert-butyl 2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)propanoate (**9b**)*

Same procedure used for the synthesis of **9a** (see 4.1.4.8.). To a mixture of **7b** (0.290 g, 0.74 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added compound **12** (0.342 g, 2.22 mmol), tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0.043 g, 0.037 mmol) and sodium carbonate (0.157 g, 1.48 mmol) in a microwave-adapted vial. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (6% yield). $C_{23}H_{24}N_4O_4$. MW: 420.46 g/mol. ^{1}H NMR *δ* (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.42 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.51 (d, 3H, *J* = 8 Hz, CH_3 β), 4.61 (m, 1H, CH α), 6.81 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 6.90 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 6.93 (s, 1H, CH Phenyl), 7.05 (m, 1H, CH 7), 7.30 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.37 (m, 1H, CH 8), 7.45 (s, 1H, CH 2), 7.53 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.66 (d, 1H, *J* = 4 Hz, NH), 9.36 (s, 2H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 17.57 (CH_3 β), 28.16 (CH_3 tBu), 50.17 (CH α), 80.66 (Cq tBu), 115.87 (CH 8), 116.47 (CH Phenyl), 117.88 (CH Phenyl), 121.16 (Cq 1), 122.05 (CH Phenyl), 122.78 (CH 7), 126.02 (Cq 5a), 127.16 (CH 9), 131.35 (Cq 3a), 132.19 (CH 2), 132.80 (Cq 9a), 137.57 (Cq 4), 146.03 (Cq Phenyl), 147.10 (Cq Phenyl), 147.23 (Cq Phenyl), 172.87 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 421.2 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{23}H_{25}N_4O_4$ 421.1876, found 421.1875.

4.1.4.10. *tert-butyl 2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-3-methylbutanoate (**9c**)*

Same procedure used for the synthesis of **9a** (see 4.1.4.8.). To a mixture of **7c** (0.380 g, 0.91 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added compound **12** (0.340 g, 2.72 mmol), tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0.052 g, 0.045 mmol) and sodium carbonate (0.192 g, 1.81 mmol) in a microwave-adapted vial. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (32% yield). $C_{25}H_{28}N_4O_4$. MW: 448.51 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.03 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 γ), 1.06 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 γ'), 1.44 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 2.32 (m, 1H, CH β), 4.53 (t, 1H, J = 8 Hz, CH α), 6.81 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 6.90 (d, 1H, J = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 6.93 (d, 1H, J = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 7.03 (m, 1H, CH 7), 7.07 (d, 1H, J = 4 Hz, NH), 7.32 (m, 1H, CH 8), 7.37 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 6), 7.46 (s, 1H, CH 2), 7.56 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 9), 9.32 (s, 1H, C-OH Phenyl), 9.41 (s, 1H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 19.30 (CH_3 γ'), 19.47 (CH_3 γ), 28.19 (CH_3 tBu), 30.54 (CH β), 59.60 (CH α), 81.25 (Cq tBu), 115.90 (CH 6), 116.47 (CH Phenyl), 117.89 (CH Phenyl), 121.05 (Cq 1), 122.07 (CH Phenyl), 123.07 (CH 7), 126.11 (Cq 5a), 126.56 (CH 8), 127.28 (CH 9), 131.55 (Cq Phenyl), 132.24 (CH 2), 132.72 (Cq 3a), 137.43 (Cq 9a), 146.03 (Cq 4), 147.14 (Cq Phenyl), 147.47 (Cq Phenyl), 171.62 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 449.3 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{25}H_{29}N_4O_4$ 449.2189, found 449.2188.

4.1.4.11. *tert-butyl 2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-4-methylpentanoate (**9d**)*

Same procedure used for the synthesis of **9a** (see 4.1.4.8.). To a mixture of **7d** (0.460 g, 1.06 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added compound **12** (0.400 g, 2.6 mmol), tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0.062 g, 0.053 mmol) and sodium carbonate (0.224 g, 2.11 mmol) in a microwave-adapted vial. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (16% yield). $C_{26}H_{30}N_4O_4$. MW: 462.54 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 0.93 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 δ), 0.97 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 δ'), 1.42 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.58 (m, 1H, CH_2 β), 1.81 (m, 1H, CH γ), 1.95 (m, 1H, CH_2 β), 4.65 (t, 1H, J = 4 Hz, CH α), 6.81 (d, 1H, J = 4 Hz, CH Phenyl), 6.86 (s, 1H, CH Phenyl), 6.90 (d, 1H, J = 4 Hz, CH Phenyl), 7.01 (m, 1H, CH 7), 7.28 (m, 1H, CH 8), 7.34 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 6), 7.46 (s, 1H, CH 2), 7.55 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 9), 7.59 (d, 1H, J = 4 Hz, NH), 9.38 (s, 2H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 22.09 (CH_3 δ), 23.32 (CH_3 δ'), 25.17 (CH γ), 28.18 (CH_3 tBu), 39.60 (CH_2 β), 52.88 (CH α), 80.76 (Cq tBu), 115.87 (CH 6), 116.48 (CH Phenyl), 117.90 (CH Phenyl), 121.15 (Cq 1), 122.18 (CH Phenyl), 122.79 (CH 7), 126.11 (Cq 5a), 125.80 (CH 8), 126.04 (CH 9), 131.42 (Cq 3a), 132.18 (CH 2), 137.58 (Cq 9a), 146.06 (Cq 4), 147.14 (Cq Phenyl), 147.57 (Cq Phenyl), 172.77 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 463.2 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{26}H_{31}N_4O_4$ 463.2345, found 463.2343.

4.1.4.12. *tert-butyl 6-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)hexanoate (**9e**)*

Same procedure used for the synthesis of **9a** (see 4.1.4.8.). To a mixture of **7e** (0.242 g, 0.44 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added compound **12** (0.170 g, 1.10 mmol), tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0.025 g, 0.022 mmol) and sodium carbonate (0.093 g, 0.88 mmol) in a microwave-adapted vial. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (40% yield). $C_{31}H_{39}N_5O_6$. MW: 577.67 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.35 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.41 (m, 2H, CH_2 γ), 1.43 (s, 9H , 3xCH_3 OtBu), 1.46 (m, 2H, CH_2 δ), 1.89 (m, 2H, CH_2 β), 2.93 (m, 2H, CH_2 ε), 4.56 (m, 1H, CH α), 6.79 (t, 1H, J = 4 Hz, N<u>H</u>-CH_2 ε), 6.83 (d, 1H, J = 4 Hz, CH Phenyl), 6.89 (s, 1H, CH Phenyl), 6.93 (d, 1H, J = 4 Hz, CH

Phenyl), 7.05 (m, 1H, CH 7), 7.32 (m, 1H, CH 8), 7.36 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.45 (s, 1H, CH 2), 7.54 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.57 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH α), 9.33 (s, 1H, C-OH Phenyl), 9.41 (s, 1H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 22.40 (CH_2 γ), 27.11 (CH_3 tBu), 27.65 (CH_3 tBu), 28.56 (CH_2 δ), 29.91 (CH_2 β), 39.25 (CH_2 ε), 53.44 (CH α), 76.70 (Cq tBu), 79.75 (Cq tBu), 114.79 (CH 6), 115.40 (CH Phenyl), 116.80 (CH Phenyl), 120.07 (CH Phenyl), 121.73 (CH 7), 124.97 (Cq 5a), 125.42 (CH 8), 126.12 (CH 9), 130.32 (Cq 1), 131.09 (CH 2), 131.70 (Cq 3a), 136.49 (Cq 9a), 144.96 (Cq 4), 146.04 (Cq Phenyl), 146.43 (Cq Phenyl), 154.96 (Cq Phenyl), 172.41 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 578.3 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{31}H_{40}N_5O_6$ 578.2979, found 578.2980.

4.1.4.13. *tert-butyl 5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)pentanoate (**9f**)*

Same procedure used for the synthesis of **9a** (see 4.1.4.8.). To a mixture of **7f** (0.260 g, 0.46 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added compound **12** (0.211 g, 1.37 mmol), tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0.026 g, 0.023 mmol) and sodium carbonate (0.097 g, 0.91 mmol) in a microwave-adapted vial. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (26% yield). $C_{33}H_{35}N_5O_6$. MW: 597.66 g/mol. ^{1}H NMR *δ* (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): ^{1}H NMR *δ* (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.40 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.58 (m, 2H, CH_2 γ), 1.92 (m, 2H, CH_2 β), 3.05 (m, 2H, CH_2 δ), 4.56 (m, 1H, CH α), 5.01 (s, 2H, C<u>H$_2$</u>-Phenyl), 6.81 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 6.89 (s, 1H, CH Phenyl), 6.93 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 7.01 (m, 1H, CH 7), 7.27 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH_2 δ), 7.32 (m, 5H, CH Phenyl), 7.37 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.45 (s, 1H, CH 2), 7.54 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH α), 7.57 (m, 1H, CH 8), 7.63 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 9). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 26.54 (CH_2 γ), 28.09 (CH_2 β), 28.17 (CH_3 tBu), 40.45 (CH_2 δ), 54.34 (CH α), 65.60 (<u>C</u>H$_2$-Phenyl), 80.92 (Cq tBu), 115.88 (CH 6), 116.48 (CH Phenyl), 117.90 (CH Phenyl), 121.16 (Cq 1), 122.84 (CH 7), 126.06 (Cq 5a), 126.50 (CH 9), 127.20 (CH 8), 128.18 (CH Phenyl), 128.79 (CH Phenyl), 129.16 (CH Phenyl), 131.90 (CH 2), 132.79 (Cq 3a), 137.55 (Cq 9a), 146.04 (Cq 4), 147.12 (Cq Phenyl), 147.47 (Cq Phenyl), 156.59 (Cq Phenyl), 172.23 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 598.3 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{33}H_{36}N_5O_6$ 598.2666, found 598.2670.

4.1.4.14. *tert-butyl 2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-3-phenylpropanoate (**9g**)*

Same procedure used for the synthesis of **9a** (see 4.1.4.8.). To a mixture of **7g** (0.360 g, 0.77 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added compound **12** (0.356 g, 2.31 mmol), tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0.044 g, 0.038 mmol) and sodium carbonate (0.163 g, 1.54 mmol) in a microwave-adapted vial. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (16% yield). $C_{29}H_{28}N_4O_4$. MW: 496.56 g/mol. ^{1}H NMR *δ* (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.36 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 3.24 (m, 1H, CH_2 β), 3.36 (m, 1H, CH_2 β), 4.92 (m, 1H, CH α), 6.81 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 6.89 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 6.92 (d, 1H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 7.08 (t, 1H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 7.20 (t, 1H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 7.29 (t, 2H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 7.34 (d, 2H, *J* = 8 Hz, CH 6, CH Phenyl), 7.36 (m, 1H, CH 7), 7.39 (m, 1H, CH 8), 7.52 (s, 1H, CH 2), 7.60 (d, 1H, *J* = 8 Hz, CH 9), 7.93 (m, 1H, NH), 9.38 (s, 2H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 26.98 (CH_3 tBu), 35.93 (CH_2 β), 55.04 (CH α), 80.23 (Cq tBu), 114.96 (CH 6), 115.42 (CH Phenyl), 116.75 (CH Phenyl), 119.67 (Cq 1), 120.96 (CH Phenyl), 122.32 (CH 7), 124.69 (Cq 5a), 125.73 (CH Phenyl, CH 9), 125.94 (CH Phenyl), 127.90 (CH Phenyl), 128.71 (CH 8), 130.76 (Cq Phenyl), 131.11 (CH 2), 131.21 (Cq Phenyl), 136.87 (Cq 3a), 138.12 (Cq 9a), 146.17 (Cq 4), 170.13

(C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 497.1 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{29}H_{29}N_4O_4$ 497.2189, found 497.2198.

4.1.4.15. *tert-butyl 3-(4-(tert-butoxy)phenyl)-2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)propanoate (**9h**)*

Same procedure used for the synthesis of **9a** (see 4.1.4.8.). To a mixture of **7h** (0.260 g, 0.57 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added compound **12** (0.170 g, 1.72 mmol), tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0.028 g, 0.028 mmol) and sodium carbonate (0.101 g, 1.15 mmol) in a microwave-adapted vial. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (22% yield). $C_{33}H_{36}N_4O_5$. MW: 568.66 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.24 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 1.33 (s, 9H, 3xCH_3 OtBu), 3.12 (m, 1H, CH_2 β), 3.26 (m, 1H, CH_2 β), 4.81 (m, 1H, CH α), 6.80 (d, 1H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 6.88 (s, 1H, CH Phenyl), 6.90 (dd, 2H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 6.92 (d, 1H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 7.01 (m, 1H, CH 7), 7.25 (d, 2H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 7.30 (m, 1H, CH 8), 7.34 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.45 (s, 1H, CH 2), 7.54 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.57 (d, 1H, *J* = 8 Hz, NH), 9.31 (s, 1H, C-OH Phenyl), 9.40 (s, 1H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 28.05 (CH_3 tBu), 28.95 (CH_3 tBu), 36.64 (CH_2 β), 55.87 (CH α), 78.12 (Cq tBu), 80.91 (Cq tBu), 115.90 (CH 6), 116.46 (CH Phenyl), 117.87 (CH Phenyl), 121.08 (Cq 1), 122.05 (CH Phenyl), 122.91 (CH 7), 124.00 (2xCH Phenyl), 126.07 (Cq 5a), 126.49 (CH 8), 127.21 (CH 9), 130.33 (2xCH Phenyl), 132.26 (CH 2), 132.62 (Cq 3a), 137.46 (Cq 9a), 146.02 (Cq 4), 147.11 (Cq Phenyl), 147.22 (Cq Phenyl), 154.05 (2xCq Phenyl), 171.75 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 569.3 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{33}H_{37}N_4O_5$ 569.2764, found 569.2773.

4.1.4.16. *tert-butyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)pentanoate (**9i**)*

Same procedure used for the synthesis of **9a** (see 4.1.4.8.). To a mixture of **7i** (0.460 g, 0.86 mmol) in DME/H_2O (2/1, 15 mL) were added compound **12** (0.330 g, 2.15 mmol), tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0.050 g, 0.043 mmol) and sodium carbonate (0.182 g, 1.72 mmol) in a microwave-adapted vial. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (30% yield). $C_{30}H_{37}N_5O_6$. MW: 563.64 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.33 (s, 9H, CH-COO<u>tBu</u>), 1.39 (s, 9H, NH-COO<u>tBu</u>), 1.66 (m, 2H, CH_2 β), 1.72 (m, 2H, CH_2 γ), 3.56 (m, 2H, CH_2 δ), 3.90 (m, 1H, CH α), 6.79 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 6.87 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 6.90 (d, 1H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 6.95 (m, 1H, CH 7), 7.17 (d, 1H, *J* = 8 Hz, N<u>H</u>-CH α), 7.27 (m, 1H, CH 8), 7.31 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.40 (s, 1H, CH 2), 7.56 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.69 (t, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH_2 δ), 9.35 (s, 2H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 26.80 (CH_2 β), 28.04 (CH_3 tBu), 28.67 (CH_3 tBu), 30.42 (CH_2 γ), 39.79 (CH_2 δ), 54.78 (CH α), 78.46 (Cq tBu), 80.53 (Cq tBu), 115.79 (CH 6), 116.45 (CH Phenyl), 117.86 (CH Phenyl), 121.29 (Cq 1), 122.01 (CH Phenyl), 122.06 (CH 7), 125.76 (Cq 5a), 126.29 (CH 8), 127.03 (CH 9), 131.91 (CH 2), 138.20 (Cq 3a), 146.02 (Cq 4), 147.05 (Cq Phenyl), 148.03 (Cq Phenyl), 156.02 (Cq 9a), 172.34 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 564.3 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{30}H_{38}N_5O_6$ 564.2822, found 564.2827.

4.1.5. Cleavage of the protective groups

4.1.5.1. *2-((1-(3,4-dimethoxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)propanoic acid (**10b**)*

To a cooled (0°C) solution of **8b** (0.170 g, 0.36 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL) was added boron tribromide (2.1 mL, 2.1 mmol). The resulting solution was allowed to warm to room temperature and stirred until complete consumption of the starting material (1–3h, monitored by TLC). The solution was neutralized by addition of saturated aqueous sodium bicarbonate (20 mL). The crude mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). The organic phase was dried on sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 90/20 to 40/50. The compound is obtained as a white solid (71% yield). $C_{21}H_{20}N_4O_4$. MW: 392.41 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.24 (s, 1H, COOH), 1.53 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 β), 3.75 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 3.87 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 4.62 (m, 1H, CH α), 7.02 (m, 1H, CH 7), 7.11 (d, 1H, J = 4 Hz, CH Phenyl), 7.13 (s, 1H, CH Phenyl), 7.17 (d, 1H, J = 4 Hz, CH Phenyl), 7.31 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 6), 7.34 (m, 1H, CH 8), 7.50 (s, 1H, CH 2), 7.52 (d, 1H, J = 4 Hz, NH), 7.60 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 9). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 18.71 (CH_3 β), 50.30 (CH α), 56.07 (OCH_3 Phenyl), 56.16 (OCH_3 Phenyl), 112.31 (CH Phenyl), 114.22 (CH Phenyl), 115.92 (CH 6), 122.54 (CH 7), 122.70 (Cq 1), 123.28 (CH Phenyl), 126.54 (CH 8), 125.90 (Cq 5a), 127.21 (CH 9), 130.95 (Cq 3a), 132.63 (CH 2), 137.99 (Cq 9a), 147.05 (Cq 4), 149.26 (Cq Phenyl), 150.132 (Cq Phenyl), 172.96 (C=O). MS (ESI +, QTof, m/z): 393.0 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{21}H_{21}N_4O_4$ 393.1563, found 393.1558.

4.1.5.2. *2-((1-(3,4-dimethoxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-3-methylbutanoic acid (**10c**)*

Same procedure used for the synthesis of **10b** (see 4.1.5.1.). To a cooled solution of **8c** (0.290 g, 0.61 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL) was added boron tribromide (3.6 mL, 3.6 mmol). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 90/20 to 40/50. The compound is obtained as a white solid (80% yield). $C_{23}H_{24}N_4O_4$. MW: 420.46 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 0.99 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 γ), 1.01 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 γ'), 1.23 (s, 1H, COOH), 2.38 (m, 1H, CH β), 3.74 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 3.87 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 4.55 (t, 1H, J = 16 Hz, CH α), 6.97 (m, 1H, CH 7), 7.10 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 7.14 (s, 1H, CH Phenyl), 7.16 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 7.19 (d, 1H, N<u>H</u>-CH α), 7.28 (d, 1H, J = 4 Hz, CH 6), 7.30 (m, 1H, CH 8), 7.48 (s, 1H, CH 2), 7.54 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 9). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 19.02 (CH_3 γ'), 19.96 (CH_3 γ), 31.19 (CH β), 56.06 (OCH_3 Phenyl), 56.16 (OCH_3 Phenyl), 59.54 (CH α), 112.31 (CH Phenyl), 114.26 (CH Phenyl), 115.87 (CH 6), 122.35 (CH 7), 122.75 (Cq 1), 123.29 (CH Phenyl), 125.89 (Cq 5a), 126.49 (CH 8), 127.18 (CH 9), 130.95 (Cq Phenyl), 132.44 (CH 2), 133.40 (Cq 3a), 138.10 (Cq 9a), 147.60 (Cq 4), 149.25 (Cq Phenyl), 150.12 (Cq Phenyl), 170.00 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 420.9 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{23}H_{25}N_4O_4$ 421.1876, found 421.1873.

4.1.5.3. *2-((1-(3,4-dimethoxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-4-methylpentanoic acid (**10d**)*

Same procedure used for the synthesis of **10b** (see 4.1.5.1.). To a cooled solution of **8d** (0.210 g, 0.43 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL) was added boron tribromide (2.5 mL, 2.53.6 mmol). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 90/20 to 40/50. The compound is obtained as a white solid (76% yield). $C_{24}H_{26}N_4O_4$. MW: 434.49 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 0.95 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 δ), 0.98 (d, 3H, J = 8 Hz, CH_3 δ'), 1.24 (s, 1H, COOH), 1.76 (m, 2H, CH_2 β), 1.80 (m, 1H, CH γ), 3.74 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 3.87 (s, 3H, OCH_3 Phenyl), 4.66 (t, 1H, J = 4 Hz, CH α), 6.98 (m, 1H, CH 7), 7.11 (d, 1H, J = 4 Hz, CH Phenyl), 7.13 (s, 1H, CH Phenyl), 7.17

(d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 7.29 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.33 (m, 1H, CH 8), 7.44 (d, 1H, *J* = 4 Hz, NH), 7.49 (s, 1H, CH 2), 7.56 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 22.68 (CH_3 δ), 23.69 (CH_3 δ'), 25.24 (CH γ), 40.42 (CH_2 β), 53.00 (CH α), 56.05 (OCH_3 Phenyl), 56.15 (OCH_3 Phenyl), 112.30 (CH Phenyl), 114.24 (CH Phenyl), 115.88 (CH 6), 122.29 (CH 7), 122.77 (Cq 1), 123.27 (CH Phenyl), 125.86 (Cq 5a), 126.49 (CH 8), 127.13 (CH 9), 130.90 (Cq 3a), 132.42 (CH 2), 138.12 (Cq 9a), 147.44 (Cq 4), 149.25 (Cq Phenyl), 150.10 (Cq Phenyl), 172.31 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 434.9 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{24}H_{27}N_4O_4$ 435.2032, found 435.2032.

*4.1.5.4. 2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)acetic acid (**11a**)*

To a cooled (0°C) solution of **9a** (0.055, 0.14 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) was added TFA (5 mL). The resulting solution was allowed to warm to room temperature and stirred until complete consumption of the starting material (1–2h, monitored by TLC). The solvent was removed under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 90/20 to 40/50. The compound is obtained as a white solid (92% yield). $C_{18}H_{14}N_4O_4$. MW: 350.33 g/mol. ^{1}H NMR *δ* (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.23 (s, 1H, COOH), 4.24 (d, 2H, *J* = 8 Hz, CH_2 α), 6.82 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 6.90 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 6.93 (s, 1H, CH Phenyl), 7.03 (m, 1H, CH 7), 7.31 (m, 1H, CH 8), 7.35 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.48 (s, 1H, CH 2), 7.58 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 8.03 (m, 1H, NH), 9.42 (m, 2H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 42.37 (CH_2 α), 115.97 (CH 6), 116.49 (CH Phenyl), 117.86 (CH Phenyl), 120.69 (Cq 1), 122.06 (CH Phenyl), 122.96 (CH 7), 126.13 (Cq 5a), 126.51 (CH 8), 126.62 (CH 9), 132.36 (CH 2), 146.01 (Cq 3a), 147.17 (Cq 9a), 147.56 (Cq 4), 152.74 (Cq Phenyl), 172.09 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 351.2 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{18}H_{15}N_4O_4$ 351.1093, found 351.1093.

4.1.5.5. *2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)propanoic acid (**11b**)*

Same procedure for the synthesis of **11a** (see 4.1.5.4). To a cooled (0°C) solution of **9b** (0.040, 0.09 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) was added TFA (5 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 90/20 to 40/50. The compound is obtained as a white solid (88% yield). $C_{19}H_{16}N_4O_4$. MW: 364.35 g/mol. ^{1}H NMR *δ* (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.23 (s, 1H, COOH), 1.56 (d, 3H, *J* = 8 Hz, CH_3 β), 4.83 (m, 1H, CH α), 6.82 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 6.90 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 6.93 (s, 1H, CH Phenyl), 7.07 (m, 1H, CH 7), 7.33 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.37 (m, 1H, CH 8), 7.50 (s, 1H, CH 2), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.95 (d, 1H, *J* = 4 Hz, NH), 9.37 (s, 2H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 17.79 (CH_3 β), 49.27 (CH α), 116.01 (CH 6), 116.51 (CH Phenyl), 117.87 (CH Phenyl), 120.42 (Cq 1), 120.95 (Cq 5a), 122.06 (CH Phenyl), 123.17 (CH 7), 125.80 (CH 9), 126.69 (CH 8), 131.82 (Cq 3a), 132.42 (CH 2), 132.64 (Cq 9a), 137.42 (Cq 4), 146.06 (Cq Phenyl), 146.95 (Cq Phenyl), 147.22 (Cq Phenyl), 174.64 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 365.1 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{19}H_{17}N_4O_4$ 365.1250, found 365.1240.

4.1.5.6. *2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-3-methylbutanoic acid (**11c**)*

Same procedure for the synthesis of **11a** (see 4.1.5.4). To a cooled (0°C) solution of **9c** (0.035, 0.08 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) was added TFA (5 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 90/20 to 40/50. The compound is obtained as a white solid (91% yield). $C_{21}H_{20}N_4O_4$. MW: 392.41 g/mol. ^{1}H NMR *δ* (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.04 (d, 3H, *J* = 8 Hz, CH_3 γ), 1.07 (d, 3H, *J* = 8 Hz, CH_3 γ'), 1.18 (s, 1H, COOH), 2.36 (m, 1H, CH β), 4.75 (m, 1H, CH α), 6.82 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 6.90 (d, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 6.94 (d, 1H, *J* =

8, 4 Hz, CH Phenyl), 7.06 (m, 1H, CH 7), 7.17 (d, 1H, *J* = 4 Hz, NH), 7.33 (m, 1H, CH 8), 7.38 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.51 (s, 1H, CH 2), 7.60 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 9.40 (s, 2H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 18.86 (CH_3 γ'), 19.63 (CH_3 γ), 30.50 (CH β), 58.70 (CH α), 115.98 (CH 6), 116.49 (CH Phenyl), 117.86 (CH Phenyl), 120.83 (Cq 1), 122.07 (CH Phenyl), 123.29 (CH 7), 126.05 (Cq 5a), 126.72 (CH 8), 126.94 (CH 9), 132.12 (CH 2), 132.52 (Cq Phenyl), 132.82 (Cq 3a), 137.42 (Cq 9a), 146.06 (Cq 4), 147.23 (Cq Phenyl), 147.47 (Cq Phenyl), 171.62 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 393.2 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{21}H_{21}N_4O_4$ 393.1563, found 393.1561.

4.1.5.7. *2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-4-methylpentanoic acid (**11d**)*

Same procedure for the synthesis of **11a** (see 4.1.5.4). To a cooled (0°C) solution of **9d** (0.050, 0.11 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) was added TFA (5 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 90/20 to 40/50. The compound is obtained as a white solid (78% yield). $C_{22}H_{22}N_4O_4$. MW: 406.43 g/mol. ^{1}H NMR *δ* (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 0.93 (d, 3H, *J* = 8 Hz, CH_3 δ), 0.98 (d, 3H, *J* = 8 Hz, CH_3 δ'), 1.42 (s, 1H, COOH), 1.69 (m, 1H, CH_2 β), 1.78 (m, 1H, CH γ), 2.02 (m, 1H, CH_2 β), 4.85 (t, 1H, *J* = 4 Hz, CH α), 6.82 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 6.90 (s, 1H, CH Phenyl), 6.93 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 7.07 (m, 1H, CH 7), 7.33 (m, 1H, CH 8), 7.36 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.50 (s, 1H, CH 2), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.90 (d, 1H, *J* = 4 Hz, NH), 9.38 (s, 2H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 20.74 (CH_3 δ), 22.28 (CH_3 δ'), 24.07 (CH γ), 39.08 (CH_2 β), 50.92 (CH α), 114.92 (CH 6), 115.42 (CH Phenyl), 116.77 (CH Phenyl), 119.82 (Cq 1), 120.98 (CH Phenyl), 122.10 (CH 7), 124.67 (Cq 5a), 125.64 (CH 8), 125.72 (CH 9), 130.79 (Cq 3a), 131.28 (CH 2), 144.99 (Cq 9a), 146.14 (Cq 4), 146.28 (Cq Phenyl), 157.42 (Cq Phenyl), 173.51 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 407.1 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{22}H_{23}N_4O_4$ 407.1719, found 407.1712.

4.1.5.8. *6-amino-2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)hexanoic acid (**11e**)*

Same procedure for the synthesis of **11a** (see 4.1.5.4). To a cooled (0°C) solution of **9e** (0.035, 0.06 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) was added TFA (5 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 90/20 to 40/50. The compound is obtained as a white solid (84% yield). $C_{22}H_{23}N_5O_4$. MW: 421.45 g/mol. ^{1}H NMR *δ* (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.23 (s, 1H, COOH), 1.49 (m, 2H, CH_2 γ), 1.60 (m, 2H, CH_2 δ), 2.01 (m, 2H, CH_2 β), 2.83 (m, 2H, CH_2 ε), 4.77 (m, 1H, CH α), 6.81 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 6.90 (s, 1H, CH Phenyl), 6.93 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 7.06 (m, 1H, CH 7), 7.33 (m, 1H, CH 8), 7.37 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.47 (s, 1H, CH 2), 7.58 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.64 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH α), 7.69 (m, 2H, NH_2), 9.44 (m, 2H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR *δ* (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 22.04 (CH_2 γ), 26.08 (CH_2 δ), 29.65 (CH_2 β), 38.04 (CH_2 ε), 52.17 (CH α), 114.84 (CH 6), 115.40 (CH Phenyl), 116.79 (CH Phenyl), 120.96 (CH Phenyl), 121.87 (CH 7), 124.88 (Cq 5a), 125.49 (CH 8), 126.01 (CH 9), 130.49 (Cq 1), 131.14 (CH 2), 131.69 (Cq 3a), 136.24 (Cq 9a), 145.00 (Cq 4), 146.10 (Cq Phenyl), 146.51 (Cq Phenyl), 157.59 (Cq Phenyl), 173.29 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 422.1 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{22}H_{24}N_5O_4$ 422.1828, found 422.1834.

4.1.5.9. *5-amino-2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)pentanoic acid (**11f**)*

Same procedure for the synthesis of **11a** (see 4.1.5.4). To a cooled (0°C) solution of **9f** (0.055, 0.09 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) was added TFA (5 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 90/20 to 40/50. The compound is obtained

as a white solid (10% yield). $C_{21}H_{21}N_5O_4$. MW: 407.42 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.72 (m, 2H, CH_2 γ), 1.91 (m, 1H, CH_2 β), 2.09 (m, 1H, CH_2 β), 2.68 (m, 1H, CH_2 δ), 2.80 (m, 1H, CH_2 δ), 4.32 (m, 1H, CH α), 6.69 (d, 1H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 6.80 (d, 1H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 6.89 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 6.97 (m, 1H, CH 7), 7.29 (m, 1H, CH 8), 7.36 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.40 (s, 1H, *J* = 4 Hz, CH 2), 7.46 (d, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH α), 7.57 (dd, 1H, J = 8, 4 Hz, CH 9), 8.69 (s, 2H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 23.61 (CH_2 γ), 29.41 (CH_2 β), 40.41 (CH_2 δ), 54.57 (CH α), 115.88 (CH 6), 116.50 (CH Phenyl), 117.95 (CH Phenyl), 121.23 (Cq 1), 122.04 (CH 7), 122.18 (CH Phenyl), 125.85 (Cq 5a), 126.39 (CH 8), 127.17 (CH 9), 132.08 (CH 2), 133.25 (Cq 3a), 138.31 (Cq 9a), 146.07 (Cq 4), 146.84 (Cq Phenyl), 147.12 (Cq Phenyl), 174.19 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 408.2 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{21}H_{22}N_5O_4$ 408.1672, found 408.1668.

4.1.5.10. *2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-3-phenylpropanoic acid (**11g**)*

Same procedure for the synthesis of **11a** (see 4.1.5.4). To a cooled (0°C) solution of **9g** (0.045, 0.09 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) was added TFA (5 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 90/20 to 40/50. The compound is obtained as a white solid (87% yield). $C_{25}H_{20}N_4O_4$. MW: 440.45 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.23 (s, 1H, COOH), 3.36 (m, 2H, CH_2 β), 5.05 (m, 1H, CH α), 6.81 (d, 1H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 6.89 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 6.91 (d, 1H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 7.05 (m, 1H, CH 7), 7.17 (t, 1H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 7.26 (t, 2H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 7.32 (m, 1H, CH 8), 7.34 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.36 (m, 2H, CH Phenyl), 7.48 (s, 1H, CH 2), 7.61 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.77 (m, 1H, NH), 9.39 (s, 2H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 35.61 (CH_2 β), 5.31 (CH α), 114.91 (CH 6), 115.40 (CH Phenyl), 116.75 (CH Phenyl), 119.75 (Cq 1), 120.96 (CH Phenyl), 122.23 (CH 7), 124.71 (Cq 5a), 125.64 (CH 9), 125.88 (CH 8), 127.67 (CH Phenyl), 128.58 (CH Phenyl), 130.78 (Cq Phenyl), 131.35 (CH 2), 137.26 (Cq 3a), 138.42 (Cq 9a), 144.98 (Cq Phenyl), 146.14 (Cq 4), 157.48 (Cq Phenyl), 157.77 (Cq Phenyl), 172.35 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 441.2 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{25}H_{21}N_4O_4$ 441.1563, found 441.1569.

4.1.5.11. *2-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)-3-(4-hydroxyphenyl)propanoic acid (**11h**)*

Same procedure for the synthesis of **11a** (see 4.1.5.4). To a cooled (0°C) solution of **9h** (0.030, 0.06 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) was added TFA (5 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 90/20 to 40/50. The compound is obtained as a white solid (89% yield). $C_{25}H_{20}N_4O_5$. MW: 456.45 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.29 (s, 1H, COOH), 3.23 (m, 2H, CH_2 β), 5.02 (m, 1H, CH α), 6.71 (d, 2H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 6.86 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 6.94 (d, 1H, CH Phenyl), 6.98 (d, 1H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 7.12 (m, 1H, CH 7), 7.17 (d, 2H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 7.38 (m, 1H, CH 8), 7.41 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.53 (s, 1H, CH 2), 7.61 (m, 1H, NH), 7.64 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 9.38 (m, 2H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 36.01 (CH_2 β), 55.24 (CH α), 115.56 (2xCH Phenyl), 115.96 (CH 6), 116.47 (CH Phenyl), 117.82 (CH Phenyl), 120.86 (Cq 1), 122.05 (CH Phenyl), 123.19 (CH 7), 125.81 (Cq 5a), 126.68 (CH 9), 126.70 (CH 8), 130.59 (2xCH Phenyl), 132.35 (Cq 3a), 132.48 (CH 2), 137.32 (Cq 9a), 146.03 (Cq 4), 147.05 (Cq Phenyl), 147.19 (Cq Phenyl), 156.44 (Cq Phenyl), 173.55 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 457.1 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{25}H_{21}N_4O_5$ 457.1512, found 457.1514.

4.1.5.12. *2-amino-5-((1-(3,4-dihydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino)pentanoic acid (**11i**)*

Same procedure for the synthesis of **11a** (see 4.1.5.4). To a cooled (0°C) solution of **9i** in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) was added TFA (5 mL). The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 90/20 to 40/50. The compound is obtained as a white solid (79% yield). $C_{21}H_{21}N_5O_4$. MW: 407.42 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 1.23 (s, 1H, COOH), 1.85 (m, 2H, CH_2 γ), 1.88 (m, 2H, CH_2 β), 3.65 (m, 2H, CH_2 δ), 4.00 (m, 1H, CH α), 6.80 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH Phenyl), 6.89 (d, 1H, *J* = 4 Hz, CH Phenyl), 6.92 (d, 1H, *J* = 8 Hz, CH Phenyl), 7.11 (m, 1H, CH 7), 7.35 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 6), 7.39 (m, 1H, CH 8), 7.51 (s, 1H, CH 2), 7.55 (dd, 1H, *J* = 8, 4 Hz, CH 9), 7.66 (t, 1H, *J* = 4 Hz, N<u>H</u>-CH_2 δ), 8.24 (s, 2H, NH_2), 9.40 (s, 2H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 24.80 (CH_2 γ), 28.04 (CH_2 β), 39.99 (CH_2 δ), 52.30 (CH α), 116.12 (CH 6), 116.51 (CH Phenyl), 117.77 (CH Phenyl), 120.74 (Cq 1), 121.96 (CH Phenyl), 123.27 (CH 7), 125.76 (Cq 5a), 126.83 (CH 8), 129.28 (CH 9), 132.68 (CH 2), 138.42 (Cq 3a), 146.12 (Cq 4), 147.29 (Cq Phenyl), 158.41 (Cq Phenyl), 158.75 (Cq 9a), 171.54 (C=O). MS (ESI +, QTof, *m/z*): 408.2 $[M+H]^+$. HRMS calculated for $C_{21}H_{22}N_5O_4$ 408.1672, found 408.1668.

4.1.6. *3,4-dihydroxyphenylboronic acid (**12**)*

To a cooled (0°C) solution of 3,4-dimethoxyphenylboronic acid (0.800 g, 4.39 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (50 mL) was added boron tribromide (10 mL, 10 mmol). The resulting solution was allowed to warm to room temperature and stirred until complete consumption of the starting material (1–2h, monitored by TLC). The solution was neutralized by addition of methanol (50 mL). The crude mixture was concentrated under reduced pressure. The compound was obtained as a white solid (84% yield) and used without purification. $C_6H_7BO_4$. MW: 153.93 g/mol. ^{1}H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d_6): 2.08 (s, 2H, B-OH), 6.47 (s, 1H, CH Phenyl), 6.60 (s, 1H, CH Phenyl), 6.71(s, 1H, CH Phenyl), 8.00 (s, 2H, C-OH Phenyl). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d_6): 108.10 (CH Phenyl), 116.14 (CH Phenyl), 119.73(CH Phenyl), 145.73 (C-OH). MS (ESI +, QTof, m/z): 153.2 $[M-H]^-$. HRMS calculated for $C_6H_6O_4B$ 153.0359, found 153.0358.

4.2. Cell lines and culture techniques

Melanoma (A375) human cancer cell line is obtained from American Type Culture Collection (Rockville, Md., USA). Cells were cultured in RPMI medium containing RPMI-1640 (Gibco Laboratories, France), 10% heat-inactived (56°C) foetal bovine serum (FBS) (Polylabo, Paris, France), 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin G sodium, 100 mg/mL streptomycin sulfate, and 0.25 mg/mL amphotericin B. Cells were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air at 37°C.

4.3. *In vitro* cytotoxicity assay

Previously to the experiments, the number of cells by well, the doubling time and the MTT concentration have been optimized. In all the experiments, A375 cells were seeded at a final concentration of 5000 cells/well in 96-well microtiter plates and allowed to attach overnight. After 24 h incubation, the medium (phosphate-buffer saline pH 7.3) was aspirated carefully from the plates using a sterile Pasteur pipette, and cells were exposed (i) to vehicle controls (0.15% DMSO/culture medium (v/v) and culture medium alone), (ii) to **EAPB02303**, **EAPB02302** and the synthesized compounds at concentrations of 10^{-5}–$3.2.10^{-9}$ M dissolved in a mixture 0.15% DMSO/culture medium

(v/v). After 96 h of incubation, cell supernatant was removed and 100 µL of a MTT (3-[4.5-dimethylthiazol-2-yl]-2.5-diphenyltetrazolium bromide) solution in fresh medium was added per well (MTT final concentration of 0.5 mg/ml) and incubated for 4 h at 37°C. This colorimetric assay is based on the ability of live and metabolically unimpaired tumor-cell targets to reduce MTT to a blue formazan product. At the end of the incubation period, the supernatant was carefully aspirated, then, 100 µL of a mixture of isopropyl alcohol and 1 M hydrochloric acid (96/4, v/v) was added to each well. After 10 min of incubation and vigorous shaking to solubilize formazan crystals, the optical density was measured at 570 nm in a microculture plate reader (Dynatech MR 5000, France). For each assay, at least three experiments were performed in triplicate. The individual cell line growth curves confirmed that all A375 lines in control medium remained in the log phase of cell growth 96 h after plating. Cell survival was expressed as percent of vehicle control. The IC_{50} values defined as the concentrations of drugs which produced 50% cell growth inhibition; 50% reduction of absorbance, were estimated from the sigmoidal dose–response curves.

Acknowledgements

Authors thank the Société d'Accélération du Transfert de Technologies (SATT AxLr) for financial support to Cindy Patinote, Stephanie Paniagua and Amandinde Dejean for their technical help, AGV Discovery for the biological study, and the French department of Biotage for lending us a HPFC system.

References

1. Eggermont AMM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. Lancet Lond Engl. 2014;383(9919):816-827. doi:10.1016/S0140-6736(13)60802-8

2. Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 2015;51(14):1989-2007. doi:10.1016/j.ejca.2015.06.110

3. Kwong A, Sanlorenzo M, Rappersberger K, Vujic I. Update on advanced melanoma treatments: small molecule targeted therapy, immunotherapy, and future combination therapies. Wien Med Wochenschr 1946. January 2017. doi:10.1007/s10354-016-0535-1

4. Drugs Approved for Melanoma. National Cancer Institute. https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/melanoma. Accessed December 11, 2017.

5. Glitza IC, Kim DW, Chae YK, Kim KB. Targeted Therapy in Melanoma. In: Genetics of Melanoma. Cancer Genetics. Springer, New York, NY; 2016:237-265. doi:10.1007/978-1-4939-3554-3_11

6. Keller HR, Zhang X, Li L, Schaider H, Wells JW. Overcoming resistance to targeted therapy with immunotherapy and combination therapy for metastatic melanoma. Oncotarget. 2017;8(43):75675-75686. doi:10.18632/oncotarget.18523

7. Basken J, Stuart SA, Kavran AJ, et al. Specificity of phosphorylation responses to MAP kinase pathway inhibitors in melanoma cells. Mol Cell Proteomics MCP. December 2017. doi:10.1074/mcp.RA117.000335

8. Moarbess G, Deleuze-Masquefa C, Bonnard V, et al. In vitro and in vivo anti-tumoral activities of imidazo[1,2-a]quinoxaline, imidazo[1,5-a]quinoxaline, and pyrazolo[1,5-a]quinoxaline derivatives. Bioorg Med Chem. 2008;16(13):6601-6610. doi:10.1016/j.bmc.2008.05.022

9. Deleuze-Masquefa C, Moarbess G, Khier S, et al. New imidazo[1,2-a]quinoxaline derivatives: synthesis and in vitro activity against human melanoma. Eur J Med Chem. 2009;44(9):3406-3411. doi:10.1016/j.ejmech.2009.02.007

10. Deleuze-Masquefa C, Moarbess G, Bonnet P-A, Pinguet F, Bazarbachi A, Bressolle F. Imidazo[1,2-a]quinoxalines and derivatives for the treatment of cancers. Patent WO2009043934 A1. 2009.

11. Cuq P, Deleuze-Masquefa C, Bonnet P-A, Patinote C. New imidazo[1,2-a]quinoxalines and derivatives for the treatment of cancers. Patent WO2016107895 A1. 2016.

12. Chouchou A, Marion B, Enjalbal C, et al. Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for quantitative estimation of new imiqualine leads with potent anticancer activities in rat and mouse plasma. Application to a pharmacokinetic study in mice. J Pharm Biomed Anal. 2018;148:369-379. doi:10.1016/j.jpba.2017.10.025

13. Wood DC, Weber FS, Palmquist MA. Continued studies in the toxicology of dimethyl sulfoxide (DMSO). J Pharmacol Exp Ther. 1971;177(3):520-527.

14. Abet V, Filace F, Recio J, Alvarez-Builla J, Burgos C. Prodrug approach: An overview of recent cases. Eur J Med Chem. 2017;127(Supplement C):810-827. doi:10.1016/j.ejmech.2016.10.061

15. Jornada DH, dos Santos Fernandes GF, Chiba DE, de Melo TRF, dos Santos JL, Chung MC. The Prodrug Approach: A Successful Tool for Improving Drug Solubility. Molecules. 2015;21(1):42. doi:10.3390/molecules21010042

16. Deleuze-Masquefa C, Moarbess G, Khier S, et al. New imidazo[1,2-a]quinoxaline derivatives: synthesis and in vitro activity against human melanoma. Eur J Med Chem. 2009;44(9):3406-3411. doi:10.1016/j.ejmech.2009.02.007

17. Zghaib Z, Guichou J-F, Vappiani J, et al. New imidazoquinoxaline derivatives: Synthesis, biological evaluation on melanoma, effect on tubulin polymerization and structure-activity relationships. Bioorg Med Chem. 2016;24(11):2433-2440. doi:10.1016/j.bmc.2016.04.004

18. Testa B, Crivori P, Reist M, Carrupt P-A. The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples. Perspect Drug Discov Des. 2000;19(1):179-211. doi:10.1023/A:1008741731244

19. Henchoz Y, Bard B, Guillarme D, Carrupt P-A, Veuthey J-L, Martel S. Analytical tools for the physicochemical profiling of drug candidates to predict absorption/distribution. Anal Bioanal Chem. 2009;394(3):707-729. doi:10.1007/s00216-009-2634-y

20. Box KJ, Comer JEA. Using measured pKa, LogP and solubility to investigate supersaturation and predict BCS class. Curr Drug Metab. 2008;9(9):869-878.

21. Avdeef A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). Curr Top Med Chem. 2001;1(4):277-351.

22. Remko M, Remková A, Broer R. A Comparative Study of Molecular Structure, pKa, Lipophilicity, Solubility, Absorption and Polar Surface Area of Some Antiplatelet Drugs. Int J Mol Sci. 2016;17(3):388. doi:10.3390/ijms17030388

23. Fridgeirsdottir GA, Harris R, Fischer PM, Roberts CJ. Support Tools in Formulation Development for Poorly Soluble Drugs. J Pharm Sci. 2016;105(8):2260-2269. doi:10.1016/j.xphs.2016.05.024

CHAPITRE 4

Mise au point et validation d'une méthode de dosage en milieu biologique de l'**EAPB02303** et de l'**EAPB02302** par LC-MS/MS

CHAPITRE 4 : Mise au point et validation d'une méthode de dosage en milieu biologique de l'EAPB02303 et de l'EAPB02302 par LC-MS/MS.

I – Introduction et objectif de l'étude

Lors du développement préclinique d'un médicament, l'utilisation d'une méthode analytique validée est nécessaire au bon déroulement des études *in vivo*, que ce soit pour les études de pharmacocinétique, d'efficacité ou encore de pharmacotoxicité. La validation de cette méthode de dosage est un prérequis indispensable afin d'obtenir des données biologiques fiables, interprétables et reproductibles. Cette étape de validation consiste à évaluer les performances du processus analytique, à les quantifier en suivant un protocole opératoire standardisé puis à les évaluer par rapport à des critères définis. La norme ISO/IEC 17025:2017 définit la validation ainsi : « La validation est la confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » [255]. Pour mettre en place la validation d'une méthode de dosage, plusieurs critères doivent être évalués : la spécificité, l'exactitude, la fidélité, la répétabilité, les limites de détection et de quantification, la robustesse et la stabilité. Pour cette méthode dosage, nous avons choisi d'utiliser comme technique d'analyse un couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

L'analyse de composés chimiques en milieu biologique diffère quelque peu de l'analyse chimique classique et doit nécessiter la prise en compte de particularités liées au milieu biologique. Afin de pallier cet inconvénient, il convient de mettre en place une étape préalable de préparation des échantillons biologiques. En effet, la quantification de composés dans les matrices biologiques peut être à l'origine d'interférences avec le système d'analyse de par la complexité de ces matrices. L'effet matrice constitue le phénomène le plus récurrent. Il correspond à une diminution ou une augmentation du signal de l'analyte due à un ou des constituants de la matrice biologique à l'origine d'interférences avec le système d'analyse. Il est important de s'assurer que la méthode d'extraction utilisée permet de s'en affranchir. Cette étape de préparation va permettre à la fois de purifier l'échantillon biologique des constituants interférant mais également de l'enrichir ce qui permettra d'abaisser les limites de détection et de quantification. Après avoir optimisé les conditions

de prétraitement des échantillons, une étape d'optimisation des conditions chromatographiques est nécessaire. Ensuite, la validation de la méthode de dosage peut être réalisée.

L'objectif de cette étude est de mettre au point et de valider une méthode de dosage permettant de quantifier l'**EAPB02302** et l'**EAPB02303** chez le rat puis de réaliser une mini-validation dans les mêmes conditions chez la souris. La souris constitue l'espèce animale sur laquelle les premières études *in vivo* de pharmacocinétique puis d'efficacité seront réalisées.

II - Matériels et méthodes

II - 1. Spectrométrie de masse (SM)

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui permet d'obtenir des informations structurelles qualitatives ainsi que des informations quantitatives. Au cours des dernières années, la SM a pris une grande importance dans les laboratoires de bioanalyse. Cette technique repose sur le principe de mesure des rapports masse/charge (m/z) de molécules individuelles et ionisées.

Un spectromètre de masse est composé de quatre unités distinctes. Tout d'abord, on trouve une source d'ionisation qui va permettre la production d'ions gazeux négatifs ou positifs (selon le mode d'acquisition choisi) à partir de l'échantillon à analyser (Figure 45). Les ions ainsi formés vont être extraits de la source vers l'analyseur où ils seront triés selon leurs rapports m/z. Les signaux sous forme de courant ionique vont ensuite être transmis au détecteur afin d'être convertis en courant électrique amplifié. Un système informatique permet ensuite de transformer ces signaux sous forme de « spectres de masse » présentant l'abondance relative des signaux en fonction de leur rapport m/z. La sensibilité et la spécificité de cette technique analytique et le large choix en matière de source d'ionisation et d'analyseur adaptables selon les composés à analyser, font de cette technique un outil incontournable pour la recherche clinique.

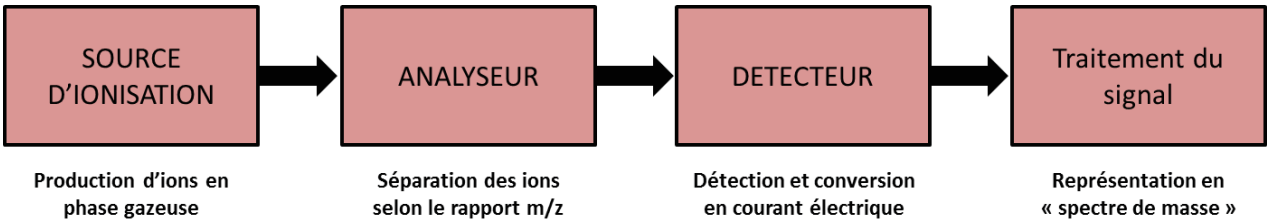


Figure 45. Représentation schématique d'un spectromètre de masse

L'analyse en SM s'adresse à des composés purs. Pour analyser des mélanges complexes, il sera nécessaire de réaliser une séparation préalable des constituants. L'introduction dans la source des composés à analyser peut se faire de manière statique pour les composés purs (par une boucle d'injection) ou dynamique pour les composés en mélanges (par le couplage avec une technique séparative).

II - 2. La source d'ionisation électrospray (ESI)

La source d'ionisation électrospray est une technique d'ionisation douce mise au point en 1984 par Fenn et Yamashita [256,257]. Cette technique basée sur le principe de nébulisation permet la détection de composés intacts du fait de la très faible fragmentation en source. Initialement, l'électrospray a été considéré comme une technique d'ionisation réservée à l'analyse de macromolécules biologiques [258]; mais rapidement son utilisation a été étendue à l'analyse de petites molécules. L'électrospray s'avère être une technique de choix pour un couplage avec la chromatographie liquide.

L'électrospray utilise l'énergie électrique pour faciliter le transfert des ions de la solution vers la phase gazeuse avant l'analyse ce qui permet d'augmenter la sensibilité. Les composés neutres peuvent également être convertis en forme ionique par anionisation ou cationisation (selon le mode choisi), et être ainsi détectés en sortie de source. Le principe repose sur l'application, à pression atmosphérique, d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit. Le transfert des espèces ioniques de la solution vers la phase gazeuse par ESI se fait selon trois étapes : tout d'abord la dispersion d'un fin spray de gouttelettes chargées, suivie de l'évaporation du solvant et enfin l'éjection des ions des gouttelettes fortement chargées vers l'analyseur (Figure 46).

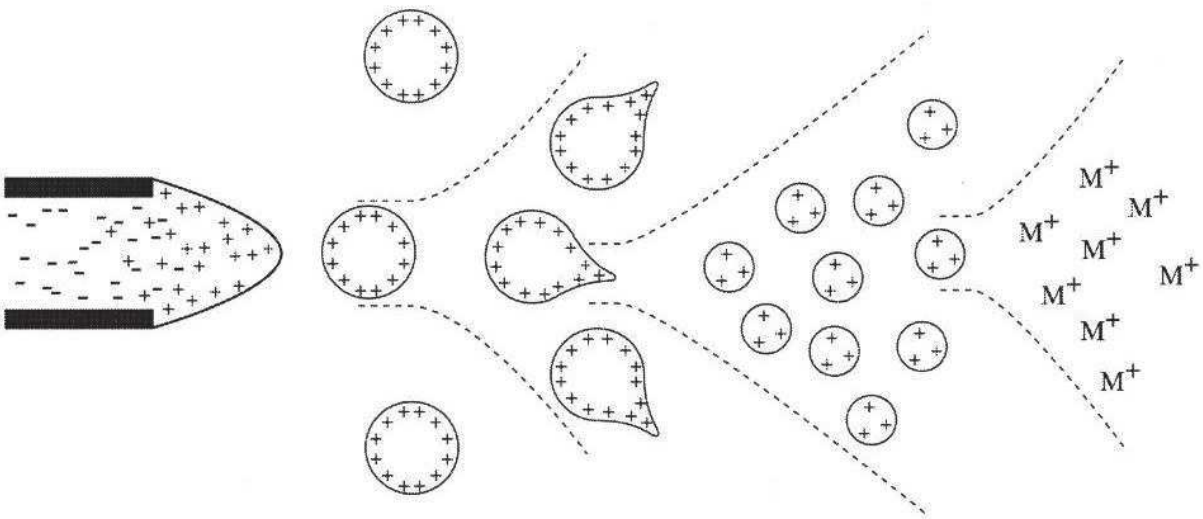


Figure 46. Mécanisme d'ionisation par électrospray d'un flux continu de solution d'échantillon passé à travers un capillaire en « mode positif », d'après Ho CS et al. [259].

Une nuée de gouttelettes fortement chargées avec la même polarité que la tension du capillaire est générée à la sortie du capillaire. Un potentiel est appliqué à la solution au niveau du capillaire, l'interface liquide /air se polarise et provoque la formation d'un cône. Lorsque l'équilibre entre la tension de surface du liquide et les forces électrostatiques est atteint, on parle alors de « cône de Taylor » [260]. Ces gouttelettes chargées transmettent un gradient de pression et un gradient de potentiel vers la région de l'analyseur du spectromètre de masse. A l'aide d'une température de source élevée et/ou d'un courant de gaz de séchage (souvent de l'azote), les gouttelettes chargées sont continuellement réduites en taille par évaporation du solvant, entraînant une augmentation de la densité de charge de surface et une diminution du rayon des gouttelettes [261]. Enfin, la force du champ électrique à l'intérieur de la gouttelette chargée atteint un point critique qui permet aux ions à la surface des gouttelettes d'être éjectés dans la phase gazeuse. Les ions émis sont ensuite accélérés vers l'analyseur.

II - 3. Principe de l'analyseur quadripolaire

Un analyseur quadripolaire est constitué de quatre électrodes parallèles de section hyperbolique ou cylindrique soumises deux à deux à un potentiel ϕ_0 composé d'une tension continue U et d'une tension alternative V de haute fréquence (ω) tel que:

$$\phi_0 = U - V \cos \omega t$$

Un champ électrostatique quadripolaire est ainsi créé entre les quatre électrodes. Le principe de fonctionnement est décrit par Paul et Steinwedel en 1953 [262] et son utilisation comme analyseur en spectrométrie de masse est proposée dès l'année 1958 [263]. Les ions expulsés de la source d'ionisation arrivent dans l'analyseur et subissent l'effet du champ quadripolaire (Figure 47). Les différentes valeurs de tension peuvent engendrer deux types de trajectoire pour les ions : une trajectoire stable pour laquelle les ions oscillent autour de l'axe de l'analyseur et une trajectoire instable pour laquelle les ions s'écartent de l'axe de l'analyseur et seront donc perdus.

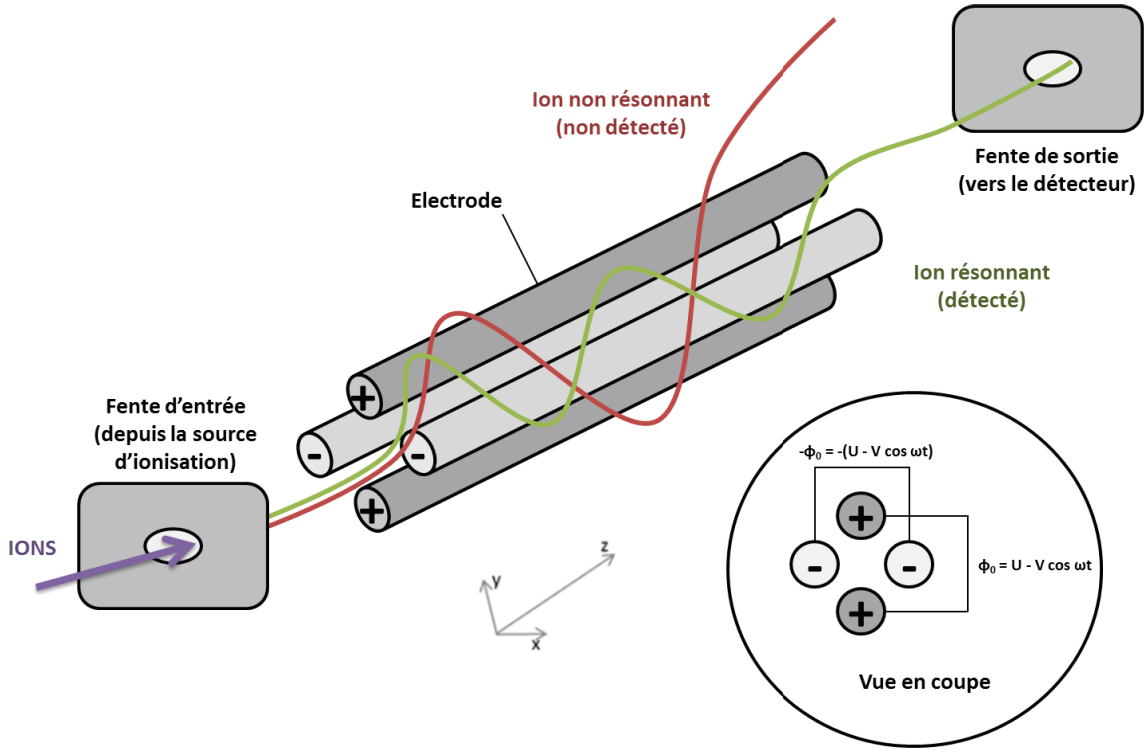


Figure 47. Principe de fonctionnement d'un analyseur quadripolaire.

La trajectoire d'un ion ne sera stable que pour certaines combinaisons des paramètres de masse, de tensions (U et V) et de fréquence. Les ions qui suivent une trajectoire stable sont résonnants et arrivent sur le détecteur où ils engendrent un courant électrique. Pour les ions non résonnants, la trajectoire parcourue n'étant pas stable, ils sont perdus dans l'analyseur. La trajectoire oscillante des ions est régie par l'équation de Mathieu (1886):

$$\frac{d^2x}{dt^2} = -\left(\frac{e}{m}\right)\frac{[U + V\cos(\omega t)]}{r_0^2}\,x,$$
$$\frac{d^2y}{dt^2} = \left(\frac{e}{m}\right)\frac{[U + V\cos(\omega t)]}{r_0^2}\,y,$$
$$\frac{d^2z}{dt^2} = 0.$$

Les coordonnées à l'instant t des ions sont définies selon les axes x et y (la direction z étant indépendante du champ quadripolaire). La valeur r_0 correspond à la moitié de la distance entre 2 électrodes. Les valeurs U, V et ω déterminent la stabilité des ions qui pénètrent dans le quadripôle. La solution à cette équation permet de définir les domaines de stabilité des ions en fonction des tensions U et V.

Plusieurs modes d'utilisation sont possibles :

- Le mode « full scan » : l'analyseur est scanné de manière séquentielle pour qu'un seul rapport m/z à la fois soit pris en compte par l'analyseur.

- Le mode « single Ion monitoring » (SIM) : un seul ion cible de rapport m/z fixé est recherché. Ce mode permet une excellente sensibilité pour la quantification mais dans les matrices biologiques il peut manquer de sélectivité (en cas d'ions de même masse au sein de la matrice).

Les avantages de cet analyseur sont nombreux :

- Le contrôle des tensions U et V est aisé et permet d'acquérir une grande vitesse de balayage.

- Le passage du mode d'ionisation positif à négatif (ou l'inverse) est simple et peut être pulsé.

- Les coûts d'achat et d'entretien sont peu onéreux.

- Le couplage est possible avec la chromatographie liquide.

- C'est un outil très efficace pour la spectrométrie de masse en tandem.

II – 4. L'analyseur triple quadripolaire (QqQ) et la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) permet de fragmenter les ions précurseurs en donnant des ions fragments. Ces ions fragments servent à accéder à la structure d'une molécule inconnue ou à identifier et quantifier une molécule connue. L'association de trois analyseurs quadripolaires en série permet une fragmentation dans l'espace. Le premier analyseur quadripôle Q1 permet la sélection de l'ion précurseur. Le second quadripôle n'a pas le rôle d'un analyseur ; il sert de cellule de collision dans laquelle l'ion précurseur est fragmenté en divers ions fragments. Le troisième quadripôle sert d'analyseur pour la séparation des ions fragments selon le rapport m/z (Figure 48).

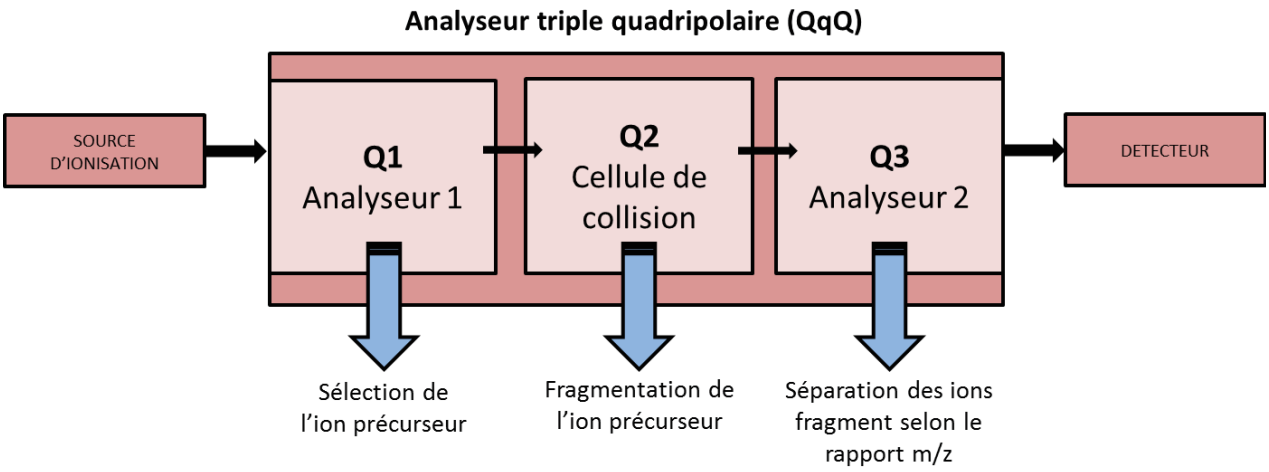


Figure 48. Structure et principe de fonctionnement d'un analyseur triple quadripolaire.

Il existe quatre modes d'acquisition possibles en spectrométrie de masse en tandem :

- Le balayage des ions fragments (*product ion scan*) : focalisation sur un ion de m/z fixé dans le premier analyseur (Q1) qui va subir la fragmentation dans la cellule de collision (Q2) puis analyse des ions fragments dans le dernier analyseur (Q3).

- Le balayage des ions parents (*precursor ion scan*) : focalisation sur un ion de m/z fixé dans le second analyseur quadripôle (Q3) et balayage des ions dans le premier quadripôle (Q1). Dans ce cas, il y a détection de tous les ions qui produisent l'ion sélectionné après fragmentation.

- Le balayage en perte de neutre (*neutral loss scan*) : balayage en parallèle entre le premier et le second analyseur quadripôle (Q1 et Q3) avec un décalage de masse correspondant à

une perte d'un fragment neutre. Cela permet de détecter tous les ions qui se fragmentent avec perte de neutre.

- La détection de réaction(s) sélectionnée(s) : sélection d'une réaction (SRM pour *Single Reaction Monitoring*) ou de plusieurs réactions de fragmentation (MRM pour *Multiple* Reaction Monitoring). Ce mode de fonctionnement présente une double sélectivité, au niveau des sélections de l'ion précurseur et de l'ion fragment. Dans le mode SRM, le premier analyseur est focalisé sur un ion précurseur puis fragmenté dans la cellule de collision et enfin le second analyseur est focalisé sur les ions fragments issu de cette fragmentation. Pour le mode MRM, il s'agit de suivre en simultanée plusieurs réactions selon le même principe. La sensibilité de ces deux modes de détection est particulièrement améliorée par rapport aux autres modes d'acquisition, faisant du SRM et du MRM des modes de choix pour la quantification.

Nous avons choisi de travailler avec le mode MRM en se basant sur deux transitions (suivis de fragmentation) afin d'être plus spécifique. Chaque transition prend en compte l'ion parent et le fragment spécifique majoritaire.

II - 5. Couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse

La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) est une technique analytique permettant de séparer les composants d'un mélange complexe selon leurs caractéristiques physico-chimiques. Elle est fréquemment utilisée pour l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques. Pour notre étude, nous avons utilisé une chromatographie de partage à polarité de phase inversée. Dans ce cas-là, la phase stationnaire est composée d'une colonne apolaire (silice greffée par des groupements alkyls ou phényls) alors que la phase mobile est composée d'un mélange polaire (de l'eau ou une solution tamponnée associée à un solvant organique tel que l'acétonitrile ou le méthanol) [264]. Le couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse à source d'ionisation par électrospray (LC/ESI-MS) constitue une technique analytique très puissante qui est capable d'analyser des petites et des grosses molécules de polarités différentes au sein d'un échantillon biologique complexe. La performance de ce couplage peut être encore améliorée par l'utilisation de chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC), couplée avec des spectromètres de masse haute résolution (HRMS).

II - 6. Méthodologie

II - 6. 1. Molécules étudiées

L'**EAPB02302** et l'**EAPB02303** sont les composés ayant fait l'objet d'une validation de méthode de dosage en milieu biologique. Pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser un étalon interne issu de la même famille chimique : l'**EAPB0602** (3-(4-aminoimidazo[1,2-a]quinoxalin-1-yl)phénol). Ce composé présente un groupement phénol en position 1 et une fonction amine primaire en position 4 (Figure 49). L'ajout de l'étalon interne en quantité parfaitement connue dans tous les échantillons nous permet de quantifier l'**EAPB02303** et l'**EAPB02302** de façon relative. L'intensité du signal obtenu pour chaque analyte est rapportée à l'intensité du signal de l'étalon interne et permet d'obtenir un rapport des concentrations entre l'analyte et l'étalon interne.

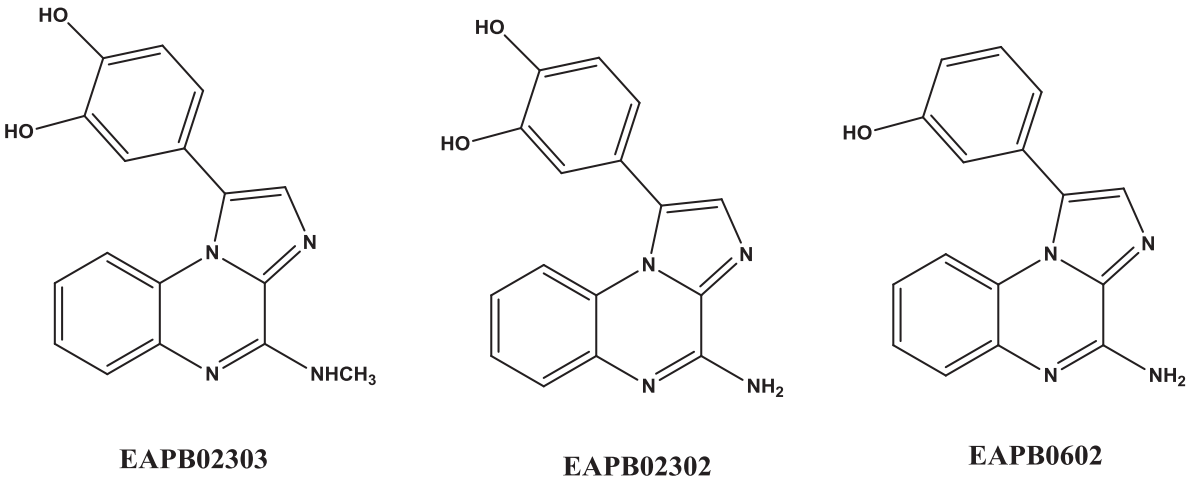


Figure 49. Structure chimique de l'**EAPB02303**, de l'**EAPB02302** et de l'**EAPB0602**.

Un étalon interne doit posséder des propriétés physiques et chimiques proches de celles des analytes à doser. Idéalement, un marquage du composé à doser (aux isotopes stables du carbone 13 ou de l'azote 15 par exemples) permet une coélution et une ionisation similaire entre l'analyte et l'étalon. L'inconvénient de cette méthode est son coût important. Pour cette raison, nous n'avons pas pu utiliser cette méthode. L'étalonnage interne avec un composé de la même famille chimique représente une bonne alternative.

II - 6. 2. Prétraitement des échantillons biologiques

L'un des inconvénients de l'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est sa susceptibilité à l'effet matrice [265]. L'effet matrice est dépendant du type d'ionisation utilisée, du type de matrice biologique et du prétraitement des échantillons. Les recommandations émanant de la FDA indiquent que l'effet matrice doit être évalué lors du développement et de la validation d'une méthode de dosage afin de garantir que la fidélité, la sélectivité et la sensibilité de la méthode ne soient pas compromis [266]. La diminution ou l'augmentation du signal analytique par l'effet matrice peut être une limitation à la validation d'une méthode de dosage. Pour passer outre cette contrainte, il est primordial de réaliser un prétraitement des échantillons biologiques. Pour cela, il existe quatre types de préparation d'échantillons utilisés en bioanalyse [267]: la précipitation de protéines (PP), l'extraction liquide-liquide (LLE), l'extraction sur support solide (SPE) et la commutation de colonnes (*column-switching*).

Dans le cadre de cette étude, nous avons testé plusieurs solvants afin de réaliser un prétraitement des échantillons biologiques par extraction liquide-liquide (acétonitrile, méthanol, acétate d'éthyle, chloroforme et dichlorométhane). Parmi ceux-ci, seul l'acétate d'éthyle nous a permis de limiter la perte d'analyte lors de cette étape. Par conséquent, nous avons choisi de faire subir à tous les échantillons biologiques une extraction par ce solvant.

III – Critères de validation, résultats et discussion

La validation d'une méthode de dosage en bioanalyse est une étape fondamentale lors du développement de nouveaux composés jusqu'à l'enregistrement auprès des autorités de santé. Pour ce faire, notre démarche de validation s'appuie sur les critères internationaux de recommandations pour la validation de méthode bioanalytique pour l'industrie pharmaceutique émanant de la FDA et de l'EMA [268–270]. Nous nous sommes également appuyés sur l'*International Conference on Harmonisation* (ICH) qui établit les exigences minimales pour la validation des méthodes de dosages en bioanalyse [271].

III - 1. Critères de validation

III - 1. 1. Spécificité

La spécificité est définie selon la norme ISO/AWI 5725-1 comme étant la capacité de la méthode à permettre une évaluation non équivoque de l'analyte en présence de composants qui sont susceptibles d'être présents. Dans notre étude, il s'agit de prouver que les constituants du milieu biologique n'interfèrent pas avec la détection et la quantification des composés. Nous cherchons donc à mettre en évidence l'absence d'effet matrice.

III - 1. 2. Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité à obtenir, à l'intérieur d'un intervalle de dosage, des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) de la substance à examiner dans l'échantillon.

III - 1. 3. Exactitude

L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur expérimentale et la valeur de référence ou la valeur considérée comme vraie par convention.

III - 1. 4. Fidélité

La fidélité est définie par l'étroitesse d'accord entre une série de mesures obtenues dans des conditions prescrites à partir de prises d'essais multiples provenant d'un même échantillon homogène. Elle a été estimée en calculant la répétabilité (exprime la fidélité évaluée dans

des conditions opératoires identiques et dans un court intervalle de temps) et la fidélité intermédiaire (exprime la variabilité intra-laboratoire).

III - 1. 5. Intervalle de validité

L'intervalle de validité d'une méthode est compris entre la concentration (quantité) la plus élevée et la plus faible de la substance à analyser pour lesquels il a été démontré que la méthode présente une fidélité, une exactitude et une linéarité satisfaisantes.

III - 1. 5. Limite de détection et limite de quantification

La limite de quantification d'une méthode analytique est définie comme la quantité la plus faible d'analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une fidélité et une exactitude appropriée. De même, la limite de détection correspond à la quantité la plus petite d'analyte qui peut être détectée mais pas nécessairement quantifiée.

III - 1. 6. Stabilité

La capacité des solutions à rester stable au cours des analyses est définie à court et long terme lors de la validation d'une méthode de dosage.

III - 1. 7. Robustesse

La robustesse d'une méthode est la capacité du protocole de rester non affecté par des variations faibles mais délibérément introduites dans les paramètres de la méthode.

III - 2. Résultats

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article 3 "*Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for quantitative estimation of new imiqualine leads with potent anticancer activities in rat and mouse plasma. Application to a pharmacokinetic study in mice*" publié par la revue *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, le 22 Octobre 2017.

III - 3. Discussion

Une méthode analytique utilisant la LC-MS/MS a été mise au point et validée afin de quantifier l'**EAPB02303** et l'**EAPB02302** dans le plasma de rat et le plasma de souris. Cette méthode permet de quantifier de manière simultanée les deux composés leaders des Imiqualines de deuxième génération. Les performances de la méthode ont été évaluées sur la base de différentes courbes d'étalonnage et à partir d'échantillons contrôle-qualité. L'utilisation d'un étalon interne issu de la même famille chimique nous a permis de nous affranchir des variations de rendement lors de l'étape d'extraction mais également lors de l'étape d'ionisation par ESI. La spécificité de la spectrométrie de masse en tandem et l'utilisation en mode MRM permet une analyse avec une grande sensibilité et une grande spécificité de détection.

Cette méthode a permis de déterminer les paramètres pharmacocinétiques de l'**EAPB02303** chez la souris suite à une administration unique par voie intrapéritonéale. Cette étude a également mis en évidence le fait que le composé **EAPB02302** n'était pas un métabolite de l'**EAPB02303** obtenu par déméthylation chez la souris. Cette hypothèse a été avancée car les composés de première génération ont présenté cette voie de métabolisme par déméthylation. L'utilisation à venir de cette méthode de dosage lors des études d'efficacité *in vivo* chez la souris sera particulièrement utile.

IV - Article 3: "Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for quantitative estimation of new imiqualine leads with potent anticancer activities in rat and mouse plasma. Application to a pharmacokinetic study in mice."

Article publié par la revue *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, le 22 Octobre 2017.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 148 (2018) 369–379

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for quantitative estimation of new imiqualine leads with potent anticancer activities in rat and mouse plasma. Application to a pharmacokinetic study in mice

Adrien Chouchou[a], Bénédicte Marion[a], Christine Enjalbal[a], Céline Roques[a], Pierre Cuq[a], Pierre-Antoine Bonnet[a], Franç oise M.M. Bressolle-Gomeni[b,*], Carine Deleuze-Masquéfa[a]

[a] IBMM, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France
[b] R&D Department, Pharmacometrica France, Longcol, La Fouillade, France

article info

Article history:
Received 12 June 2017
Received in revised form 19 September 2017
Accepted 22 October 2017
Available online 24 October 2017

Keywords:
Imiqualines: EAPB02303 EAPB02302
Anticancer agents
LC/MRM-MS
Robustness
Rat mouse plasma
Pharmacokinetics

abstract

Imidazoquinoxaline derivatives (imiqualines) are a new series of anticancer compounds. Two lead compounds (EAPB0203 and EAPB0503) with remarkable *in vitro* and *in vivo* activity on melanoma and T-cell lymphomas have been previously identified. The modulation of the chemical structure of the most active compound, EAPB0503, has led to the synthesis of two compounds, EAPB02302 and EAPB02303, 7 and 40 times more active than EAPB0503 against A375 human melanoma cancer cell line, respectively. The aim of this study was to develop and validate a sensitive and accurate liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method to simultaneously quantify EAPB02303 and its potential active metabolite, EAPB02302, in rat and mouse plasma. Analytes were detected in multiple reaction monitoring acquisition mode using an electrospray ionization detector in positive ion mode. Following a liquid-liquid extraction with ethyl acetate, analytes and internal standard were separated by HPLC reversed-phase on a C18 RP18 Nucleoshell column (2.7 μ,m, 4.6 × 100 mm). The method was validated according to FDA and EMA Bioanalytical Method Validation guidelines. The robustness of the method was assessed by introducing small variations in nine nominal analytical parameters. Statistical interpretation was performed by mean of the Student's *t*-test. Standard curves were generated via unweighted quadratic regression of calibrators (EAPB02303: 1.95–1000 ng/mL, EAPB02302: 7.81–1000 ng/mL in rat plasma; EAPB02303: 0.98–1000 ng/mL, EAPB02302: 1.95–1000 ng/mL in mouse plasma). From the analysis of QC samples, intra- and inter-assay precision and accuracy studies demonstrated %R.S.Ds. <12.5% and percent deviation from nominal concentration <7%. Matrix effects (mean matrix factors from 91.8-108.5% in rat plasma; and from 90.4-102.4% in mouse plasma) and stability assays (recoveries >87%) were acceptable and in accordance with the guidelines. No quantifiable carryover effect was observed. The LLOQs were 1.95 ng/mL for EAPB02303 and 7.81 ng/mL for EAPB02302 in rat plasma, and 0.98 ng/mL and 1.95 ng/mL for the two compounds in mouse plasma, respectively. This method was successfully implemented to support a mouse pharmacokinetic study following a single intraperitoneal administration of EAPB02303 in male C57Bl/6 mice. The obtained pharmacokinetic parameters of EAPB02303 would be useful to optimize the dosing and the rhythm of administration for subsequent preclinical *in vivo* activity studies.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

According to estimates from the International Agency for Research on Cancer (IARC), the cutaneous malignant melanoma incidence has presented an exponential increase around the world for over 7 decades [1,2]. Melanoma is an aggressive and heterogeneous skin cancer with a multifactorial development. The pathophysiological process implies a malignant transformation of the melanocytes under the influence of risk factors such as ultraviolet light exposure, genetic predisposition or also skin phenotype [3,4]. Despite the development of new anticancer agents by pharmaceutical industry [5], the mortality rate remains high and the

* Corresponding author.
E-mail address: fbressolle@yahoo.fr (F.M.M. Bressolle-Gomeni).
https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.10.025
0731-7085/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

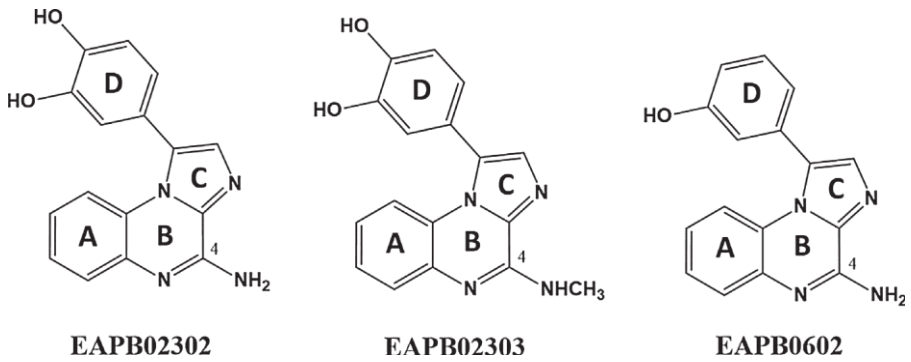


Fig. 1. Structural formulas of EAPB02302, EAPB02303 and EAPB0602 (internal standard).

cure rate low. Therefore, the development of compounds with original mechanisms of action is necessary.

Heterocyclic systems containing the quinoxaline moiety exhibit important biological activities. Many imidazoquinoxaline derivatives have shown interesting potential as active pharmaceutical products [6,7]. Our group is particularly involved in the study and development of new imidazo[1,2-*a*]quinoxaline compounds, also called imiqualines, which have been protected by different patents since 2008 [8] and granted in the USA on February 2013 and Canada on May 2016 [9,10].

Two active compounds, EAPB0203 and EAPB0503, have previously emerged as promising drugs with interesting antitumoral activities against a panel of human cancer cell lines including melanoma, T-lymphoma, myeloid leukemia and colon carcinoma [11–18]. EAPB0203 has shown significant *in vitro* cytotoxic activity against A375 human melanoma cell line, 110 and 45 times higher than fotemustine and imiquimod, respectively [11,15]. Tested *in vivo* in M4Be xenograft female Swiss Nude mice, EAPB0203 caused a significant decrease in tumor growth compared to vehicle control and fotemustine treatments [11,15]. EAPB0503 is 7–9 times more active than EAPB0203 on A375 human melanoma cell line and has been identified as our first lead compound [13,14]. Recently, EAPB0503 and its structural imidazo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives have demonstrated major microtubule-interfering agents properties [19]. Studies to determine the absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicology properties of EAPB0203 and EAPB0503 have also been investigated [14,15,18,20,21].

The modulation of the chemical structures of the first identified lead compound (nature and/or position of the substituents) affects and modifies its biological properties. Among the synthesized compounds, EAPB02303 and its *N*-demethylated derivative, EAPB02302 (Fig. 1), have recently been identified as new lead compounds due to their *in vitro* activities [22].

To perform *in vivo* studies, a method for assaying these compounds in biological matrices should be developed and validated. Furthermore, pharmacokinetic data are required to optimize doses and rhythm of administration during preclinical activity studies.

In previous papers, we have found that, in all species, the main metabolite of EAPB0203 and EAPB0503 is formed after *N*-demethylation [14,15,18]. So, in the present paper, a liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method (LC-ESI–MS/MS) was developed and validated to simultaneous quantify EAPB02303 and its potential active metabolite, EAPB02302, in rat and mouse plasma. The robustness of the method was assessed by introducing small variations in nine nominal analytical parameters. Statistical interpretation was performed by mean of the Student's *t*-test. The choice of these two types of matrix is justified by the fact that during the preclinical development of drugs, rat is one of the principal species to be studied and mice xenografts are the most used *in vivo* melanoma models.

Then, the validated method was used during a pharmacokinetic study performed in mice after intraperitoneal administration of EAPB02303.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

EAPB02303 (4-(4-(methylamino)imidazo[1,2-*a*]quinoxalin-1-yl)benzene-1,2-diol; molecular weight, 306 Da), EAPB02302 (4-(4-aminoimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-1-yl)benzene-1,2-diol; molecular weight, 292 Da) and the internal standard (IS) EAPB0602 (3-(4-aminoimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-1-yl)phenol; molecular weight, 276 Da) (Fig. 1), were synthesized by the "Oncopharmacochemistry and Cutaneous Pharmacotoxicology" laboratory (IBMM, Montpellier University, France). Briefly, they were synthesized in good yields via a bimolecular condensation of 2-imidazole carboxylic acid, followed by a coupling with ortho-fluoroaniline and subsequent substitution on the imidazole ring by Suzuki Cross-Coupling reaction using microwave assistance [22]. The purity of the compounds (higher than 99%) was evaluated by elemental analysis and NMR. They were stored at 20 °C protected from light.

Acetonitrile and ethyl acetate (HPLC grade) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), isopropyl alcohol, and hydrochloric acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium formate and formic acid were purchased from VWR Chemicals (Radnor, Pennsylvania, USA). All chemicals were of the highest purity available.

Six different batches of drug free rat (from healthy male Sprague Dawley rats weighting 230–280 g) and mouse (from Swiss mice weighting 20–25 g) plasma pools were obtained from Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, France). These plasma pools were obtained from blood collected on lithium heparinate to prevent coagulation. Blank matrices were aliquoted and stored at −80 °C until used. The same lot was used during the study in the preparation of standards and quality control (QC) samples. The other lots were used to verify the specificity of the method and the absence of matrix effect. Formate buffer pH 3 was prepared by dissolving 126 mg of ammonium formate in 1 L of purified water; the pH was adjusted with formic acid. Purified water was generated by a Milli-Q reagent water system (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. In vitro cytotoxic activity study

A375 cell line was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, Md., USA). Cells were maintained in Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, ThermoFisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) supplemented with 10%

heat-inactived (56 °C) foetal bovine serum (FBS) (Polylabo, Paris, France), 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin G sodium, 100 μ,g/mL streptomycin sulfate, and 0.25 μ,g/mL amphotericin B. Cells were cultured in a humidified atmosphere with 5% CO_2 at 37 °C. All studies were done with cells at 70–80% confluence. The day of experiment, cells were harvested with 0.02% trypsin, 0.05% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, ThermoFisher Scientific) for 5 min at 37 °C, counted and resuspended. Then, 100 μ,L of cell suspension (i.e., 5000 cells/well) were seeded with a multichannel pipet into the individual wells of a 96-well tissue culture plate with lid (TPP, Trasadingen, Switzerland), and allowed to attach overnight. After 24 h of incubation, the medium was aspirated carefully from the plates using a sterile Pasteur pipette, and cells were exposed (in six replicates) (i) to vehicle controls (1% DMSO/culture medium and culture medium alone), (ii) vemurafenib at concentrations of 3.10^{-7}–10^{-9} M, diluted in the culture medium, and (iii) EAPB02303 and EAPB02302 (3.10^{-7}–10^{-9} M) dissolved in a mixture 1% DMSO/culture medium (v/v). Vemurafenib was chosen as reference instead of dacarbazine, fotemustine or imiquimod because this compound has shown improved rates of overall and progression-free survival in patients with previously untreated melanoma with the BRAF V600E mutation [23]. After 96 h of incubation, the supernatant of each well was aspirated and the cell viability was determined by MTT assay. The proliferation test is based on the color reaction of mitochondrial dehydrogenase in living cells by MTT. Thus, MTT (final concentration 5 mg/mL in phosphate-buffered saline pH 7.4 from ThermoFisher Scientific) was added to each well, which was then incubated at 37 °C in 5% CO_2 for 4 h. Thereafter, the supernatant was carefully aspirated and the colored crystals of produced formazan were dissolved in 100 μ,L of a mixture of isopropyl alcohol and 1 M hydrochloric acid (96/4, v/v). The absorbance was measured at 570 nm on Microplate Reader (Dynatech MR 5000, France).

Cell proliferation was calculated as the ratio of absorbance of treated group divided by the absorbance of control group, multiplied by 100 to give a percentage proliferation. The individual cell line growth curves confirmed that all cell lines in control medium remained in the log phase of cell growth 96 h after plating. The IC_{50} values defined as the concentrations of drugs which produced 50% cell growth inhibition (i.e., 50% reduction of absorbance) were estimated from the sigmoidal dose-response curves.

2.3. Fragmentation pathways of EAPB02303 and EAPB02302

Mass spectra were acquired on a Synapt G2-S (Waters Milford, CA) equipped with an ESI source fitted with a lock spray for high resolution mass measurements and a QTof mass analyzer configuration. Nitrogen constituted both nebulizing and desolvation gas. MS and MS/MS data were recorded in the positive mode between m/z 50 and 500 Th with a scan time of 0.1 s and an interscan delay of 0.015 s. The source tuning consisted of a capillary voltage of 3 kV, a cone voltage of 30 V, a desolvation gas flow of 1000 L/h and source and desolvation temperatures of 140 °C and 450 °C, respectively. The mass spectrometer was calibrated using 1% phosphoric acid in H_2O/CH_3CN solution (50:50, v/v). Reference solutions of EAPB02303 and EAPB02302 dissolved in acetonitrile–purified water (50:50, v/v) were infused into the ESI source at a flow rate of 5 μ,L/min. Exact mass spectra measurements were performed across the entire mass range (m/z 50–500) upon high resolution acquisition mode (HRMS) using leucine enkephalin infused as the calibration standard via the lock spray system. In MS/MS experiments, the protonated molecular ion was selected as precursor ion on the first quadrupole, the second quadrupole analyzer was set in the rf mode using argon as collision gas, and the collision energy varied from 25 to 50 eV to give optimal fragmentation. MassLynx v. 4.1 (Waters) software was used for data acquisition and processing.

2.4. Quantification of EAPB02303 and EAPB02302 in rat and mice plasma

2.4.1. LC-ESI–MS/MS analyses

Assay development and sample analysis were performed on an Agilent 1100 LC system (Agilent Technologies, Les Ulis, France) linked with an API 3000 tandem triple quadrupole mass spectrometer (ABSciex, Courtaboeuf, France). The chromatographic separation was conducted by injecting 5 μ,L of each reconsti- tuted sample extract on a C18 RP18 Nucleoshell column (2.7 μ,m, 4.6 × 100 mm) from Macherey-Nagel (Düren, Germany) at 30 °C. A guard column (Nucleoshell RP 18, 2.7 μ,m, 4 × 2 mm) was used to safeguard the analytical column. A mixture of acetonitrile (eluent A) and 2 mM ammonium formate buffer pH 3 (eluent B) (70/30, v/v) was used as mobile phase at a flow rate of 0.5 mL/min without split. All solvents were filtered through a 0.20 μ,m millipore filter (Molsheim, France) before use and degassed 15 min in an ultrasonic bath. The autosampler was set at 4 °C.

Analytes were ionized in positive ion mode using ESI probe set at 400 °C. The curtain, nebulizer, and collision gases were nitrogen and were set at 8, 8 and 4 psi, respectively. The ion spray voltage was set at 5000 V, and the entrance potential at 10 V. Detection of EAPB02303 and EAPB02302 was performed using multiple reac- tion monitoring (MRM). The optimal MRM transitions for precursor ion $[M+H]^+$ to specific product ion were m/z 307 → 292 and m/z 307 → 278 for EAPB02303 (Fig1A-a of the online Data Supplement), m/z 293 → 104, m/z 293 → 90 and m/z 293 → 77 for EAPB02302 (Fig1B-a of the online Data Supplement), and m/z 277 → 117 for the internal standard. MRM transitions and optimal compound depen- dent parameters are given in Table 1. The acquisition dwell time was 150 ms for all transitions. Mass spectra were collected in scan mode (m/z 50–500). The LC–MS/MS system was controlled and the analytical data were collected and processed using Analyst software version 1.5 (AB Sciex).

2.4.2. Stock and working solutions

Stock solutions of EAPB02303, EAPB02302 and internal standard (IS) were prepared individually in DMSO at 1 mg/mL. Two sets of stock solutions were prepared, one for the preparation of calibration standards and the other for the preparation of QC samples. They were stored at −20 °C until use.

Stock solutions were extemporaneously and serially diluted in the mobile phase as appropriate to yield working solutions ranging from 19.5 to 20000 ng/mL for EAPB02303, from 39.1 to 20000 ng/mL for EAPB02302 and at 2500 ng/mL for the inter-

Table 1
Multiple reaction monitoring transitions selected for quantitation and optimal compound dependent MS/MS parameters.

	Quadrupole 1 (m/z)	Quadrupole 2 (m/z)	DP (V)	FP (V)	CE (eV)	CXP (V)
EAPB02303	307	292	61	250	41	16
EAPB02302	293	104	61	240	63	6
EAPB0602 (IS)	277	117	51	210	57	8

Quadrupole 1 was set to transmit the molecular ion and quadrupole 2 to transmit the product ions. DP, declustering potential; FP, focusing potential; CE, collision energy; CXP, collision cell exit potential.

Table 2
Robustness: Factors investigated in the design.

Factors	Units	Limits	Level (-1)	Level (+1)	Nominal
LC parameters					
(1) Mobile phase flow rate	mL/min	± 0.05	0.45	0.55	0.5
(2) pH of the buffer	–	± 0.3	2.7	3.3	3.0
(3) Column temperature	°C	± 3	27	33	30
(4) Percentage of acetonitrile in the mobile phase	%	± 2	68	72	70
MS/MS parameters					
(5) Nebulizer gas pressure	psi	± 1	7	9	8
(6) Declustering potential	V	± 6	55	67	61
(7) Focusing potential	V	± 25	225	275	250 (EAPB02303)
		± 24	216	264	240 (EAPB02302)
(8) Collision energy	eV	± 4	37	45	41 (EAPB02303)
		± 6	57	69	63 (EAPB02302)
(9) Ion source temperature	°C	± 40	360	440	400

nal standard. Unextracted solutions containing 3.91, 62.5 and 500 ng/mL of the two analytes and 125 ng/mL of IS in the mobile phase were injected before each run to check the performance of the LC-ESI–MS/MS system.

2.4.3. Preparation of calibration curves and QC samples

Drug-free plasma (200 μL from rat or 100 μL from mouse) was spiked with appropriate working solutions of EAPB02303 and EAPB02302. The final concentrations of plasma calibration standards were 1.95, 7.81, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 ng/mL for EAPB02303, and 7.81 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 ng/mL for EAPB02302. In mouse plasma, the lowest calibration standard was at 0.98 ng/mL for EAPB02303 and 1.95 ng/mL for EAPB02302 (Tables 1 and 2 of the online Data Supplement). Different calibration curves were performed on the same day (n = 6) and on separate days (n = 14) in rat plasma. For mouse plasma, calibration curves were obtained on separate days (n = 6). Calibration curves were generated by plotting the peak area ratios (analyte/IS) versus the nominal concentrations. Different models were tested: i) unweighted or weighted least-squares linear regression analysis ($Y = aX + b$) and ii) quadratic relationship ($Y = aX^2 + bX + c$) with Y = peak area ratio and X = nominal concentration. The regression curve was not forced through zero. The resulting equation parameters were used to calculate back-calculated concentrations for the calibrators that were statistically evaluated.

QC samples were prepared in the same way by spiking drug- free matrices with working solutions to provide low, medium, and high concentrations: 3.91, 46.9, 187 and 750 ng/mL for EAPB02303 and 11.7, 46.9, 187 and 750 ng/mL for EAPB02302. In mice plasma, additional QC samples were prepared at 1.95 ng/mL for EAPB02303 and 3.91 ng/mL for EAPB02302. QC samples were used during the study to determine matrix effect, extraction efficiencies and stability assays, as well as to evaluate accuracy and precision of the method.

2.4.4. Sample preparation

Calibration standards, QC samples, and study samples were processed using liquid-liquid extraction. The optimized sample pretreatment was as follows: to 200 μL of rat plasma or 100 μL of mouse plasma, 10 μL of the internal standard solution (2500 ng/mL) and 10 μL of 1% (v/v) formic acid in water were added. After vortex mixing for 15 s, 600 μL of ethyl acetate were added. The mixture was vigorously vortexed twice for 15 s and then centrifuged at 4 °C (5 min at 25,830*g*). The upper organic phase was removed and evaporated to dryness at 40 °C under a gentle stream of nitrogen. The residue was reconstituted in 200 μL of mobile phase. The mixture was vortexed for 15 s and then centrifuged at 4 °C (5 min at 9400*g*). One hundred microliters of the supernatant were transferred into polypropylene autosampler vials and a 5 μL volume was injected into the LC–MS/MS system.

2.4.5. Method validation

Method validation was performed based on the "guidance for Industry Bioanalytical Method Validation" recommended by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) [24–27].

The assay selectivity was investigated by using six individ- ual lots of blank plasma. Each blank sample was extracted and chromatographed to determine the extent to which endogenous plasma components may contribute to chromatographic interference with EAPB02303 and EAPB02302. One hemolyzed plasma was also checked for specificity.

Intra-day accuracy and precision were determined by analyzing six replicates of each QC sample on the same day against a calibra- tion curve. Inter-day accuracy and precision were determined by analyzing QC samples on separate days against a calibration curve. Accuracy was expressed as percentage recovery and precision as relative standard deviation (R.S.D.) of replicate measurements.

The lower limit of quantitation (LLOQ) was defined as the low- est concentration that could be determined with accuracy within 80–120% and a precision <20% on a day-to-day basis. To determine the analytical error in the LLOQ, spiked QC samples were used.

The matrix effect (i.e., suppression or enhancement of ionization of analytes by the presence of matrix components) was investigated by using six different batches of drug-free plasma by comparing peak areas of spiked samples with or without biological matrix at concentrations of QC samples (n = 3 replicates per QC). Matrix factor was defined as a ratio of the analyte peak response in the presence of matrix ions to the analyte peak response in the absence of matrix ions. Matrix factor values between 0.85-1.15 were judged acceptable.

The extraction efficiency of EAPB02303 and EAPB02302 from plasma was calculated by comparing peak areas of samples spiked before and after extraction at concentrations of QC samples (n ≥ 6 replicates per QC).

Carryover was assessed by injecting blank sample after a high concentration sample or standard. The within-laboratory assessment of robustness was carried out with a standard solution containing 31.3 ng/mL of the three analytes in the mobile phase. Nine analytical parameters (factors potentially affecting the results) were selected from the operating procedure: flow rate, pH of buffer, column temperature, composition of the mobile phase, nebulizer gas pressure, declustering potential, focusing potential, collision energy and ion source temperature. Ten percent variations were induced in their nominal values with the exception of the percentage of acetonitrile in the mobile phase where a 3% variation was considered (Table 2). One factor at the time was varied

to estimate the impact on the following parameters: peak areas, peak area ratios (analyte/EAPB0602) and retention times. In each run, four replicate injections of the standard solution were done. The mean values of each parameter measured at the nominal conditions were compared to the mean values measured at the altered conditions to determine the impact of each factor. The robustness of the method was assessed: (i) by computing the percent prediction errors, and (ii) by a statistical comparison of the percent prediction errors to zero (the expected value in absence of estimation bias) using a Student's *t*-test. The percent prediction error was defined by: %prediction error = 100 x (nominal condition – altered condition)/nominal condition. Moreover, the overall distribution of the absolute prediction error of each factor evaluated for robustness was presented using radar chart plots generated using SAS software (Version 9.4). The absolute prediction error of each factor is displayed on an axis that starts from the center. All axes are arranged radially, with equal distances between each other, while maintaining the same scale between all axes. The absolute prediction error of each factor was plotted along its individual axis and all the absolute prediction errors are connected together to form a polygon. In the radar plots, the inner circle, the intermediate circle and the external circle identified the minimal, average and maximal absolute values, respectively.

Ruggedness of the method was evaluated by using different analysts and different lots of columns and reagents; results were evaluated from standard curve fitting.

2.4.6. Dilution integrity

Dilution integrity was carried out to ensure the integrity of analytes in those samples which are beyond upper limit of the standard curve and need to be diluted. QC samples containing EAPB02303 and EAPB02302 at concentrations of 1250, 2500, 5000 and 10000 ng/mL were prepared. They were then diluted 2.5-, 5-, 10- and 20-fold with the same blank plasma, respectively. Three aliquots of each dilution were processed along with freshly spiked calibration standards and analyzed by back-calculation using regression equation obtained. The integrity of the samples was considered to be maintained if % recoveries are within ± 15% of nominal values and % R.S.Ds. ≤ 15% at all diluted levels.

2.4.7. Stability assays

The stability of EAPB02303 and EAPB02302 stock solutions was tested at the storage temperature of −20 °C after a six-month period, by comparing with freshly prepared stock solutions. The stability of EAPB02303 and EAPB02302 in rat and mice plasma including (i) three freeze-thaw cycles; (ii) storage for four months at −20 °C and −80 °C; (iii) storage for 72 h at 4 °C; and (iii) bench-top room temperature storage (20 °C) for 6 h was investigated by analyzing QC samples against freshly prepared calibration curves. Each determination was performed in triplicate. In addition, the stability of EAPB02303 and EAPB02302 was assessed at concentrations of calibration curve in processed samples in the autosampler (72 h at 4 °C). A drug was considered stable if at least 85% of the intact drug was retained at the end of the study period.

2.5. Pharmacokinetic study

Male C57Bl/6 mice used in this study were from Janvier Labs. Mean body weight was 22.8 g at the study initiation. The minimum and maximum weight in the group was within a range of ± 20% of the group mean. This research adhered to the "Principles of Laboratory Animal Care" (National Institutes of Health publication #85-23, revised 1985). The animal study was approved by the local Animal Use Committee.

Each mouse received a single intraperitoneal administration of 37.5 mg/kg of EAPB02303 dissolved in 200 µL of a mixture of DMSO, Tween 80 and sodium chloride solution 0.9% (10/10/80, v/v/v). Blood samples (one sample per mouse) were collected in spray-dried heparinized polypropylene tubes (0.5 mL, Greiner Bio-One, Les Ulis, France) through the retro-orbital sinus at the follow- ing time-points (3 animals per time-point): 5, 10, 15, 30 min, and 1, 2, 4, 8, and 24 h after drug administration. Before sampling, animals were anaesthetized with isoflurane. Blood samples were centrifuged at 4 °C (10 min at 4000*g*). Plasma samples were transferred into polypropylene tubes and immediately stored at −70 °C until assay.

At study termination animals were sacrificed by cervical dislocation.

The assay method described in 2.4 was used to quantify EAPB02303 and EAPB02302 in plasma samples drawn during this study.

Pharmacokinetic parameters (CL (total clearance); V_1 (central volume of distribution); Vss (steady-state volume of distribution); AUC (area under curve) and terminal half-life) were computed from the average concentration values at each time point using the NONMEM® software [28]. CL, V_1 and Vss were uncorrected for bioavailability (F).

Table 3
IC_{50} values against A375 human melanoma cancer cell line obtained in six replicates.

	IC_{50} (nM)
EAPB02303	10
EAPB02302	60
Vemurafenib	63
EAPB0503	383

IC_{50}, concentration of the compound producing 50% cell growth inhibition after 96 h of drug exposure, as determined by the MTT assay

3. Results and discussion

3.1. In vitro cytotoxic activity

Results are presented in Table 3. On the A375 human melanoma cancer cell line, EAPB02303 exhibits *in vitro* cytotoxic activity 6 times higher than vemurafenib, while similar cytotoxic activi- ties are observed for EAPB02302 and vemurafenib. Interestingly, EAPB02303 shows an *in vitro* cytotoxic activity about 40 times higher than that of our first identified lead compound, EAPB0503 [13]. On the other hand, the *in vitro* cytotoxic activities of fotemustine and imiquimod, the drugs used as references in our previous studies, against A375 human melanoma cancer cell line are much lower with IC_{50} values of 173 and 70 µ,M, respectively [11].

3.2. MS/MS fragmentations of EAPB02303 and EAPB02302

High resolution experiments were performed in both MS and MS/MS mode of acquisition in order to deduce the elemental compositions of the $[M+H]^+$ precursor ions and some of the observed fragment ions. The difference between the measured and the calculated exact masses was lower than 3 ppm which indicated relatively good mass accuracies (± 0.01 Th). QTof-MS/MS spectra of the $[M+H]^+$ precursor ions at *m/z* 307 (EAPB02303) and *m/z* 293 (EAPB02302) recorded at increasing collision energies are presented in Fig. 1 A and B of the online Data Supplement, respectively.

At low collision energies, EAPB02303 shows predominant fragment ions at *m/z* 292/291 (resulting from the loss of $CH_3^{\cdot}$ (loss of 15 Da)/CH_4 (loss of 16 Da) from *m/z* 307) and *m/z* 278 (resulting from the loss of the imine $NHCH_2$ (loss of 29 Da) from *m/z* 307). Although the loss of a radical is scarcely observed with soft ionization techniques as electrospray ionization (ESI), which produce even electron ions, such behavior has been previously described

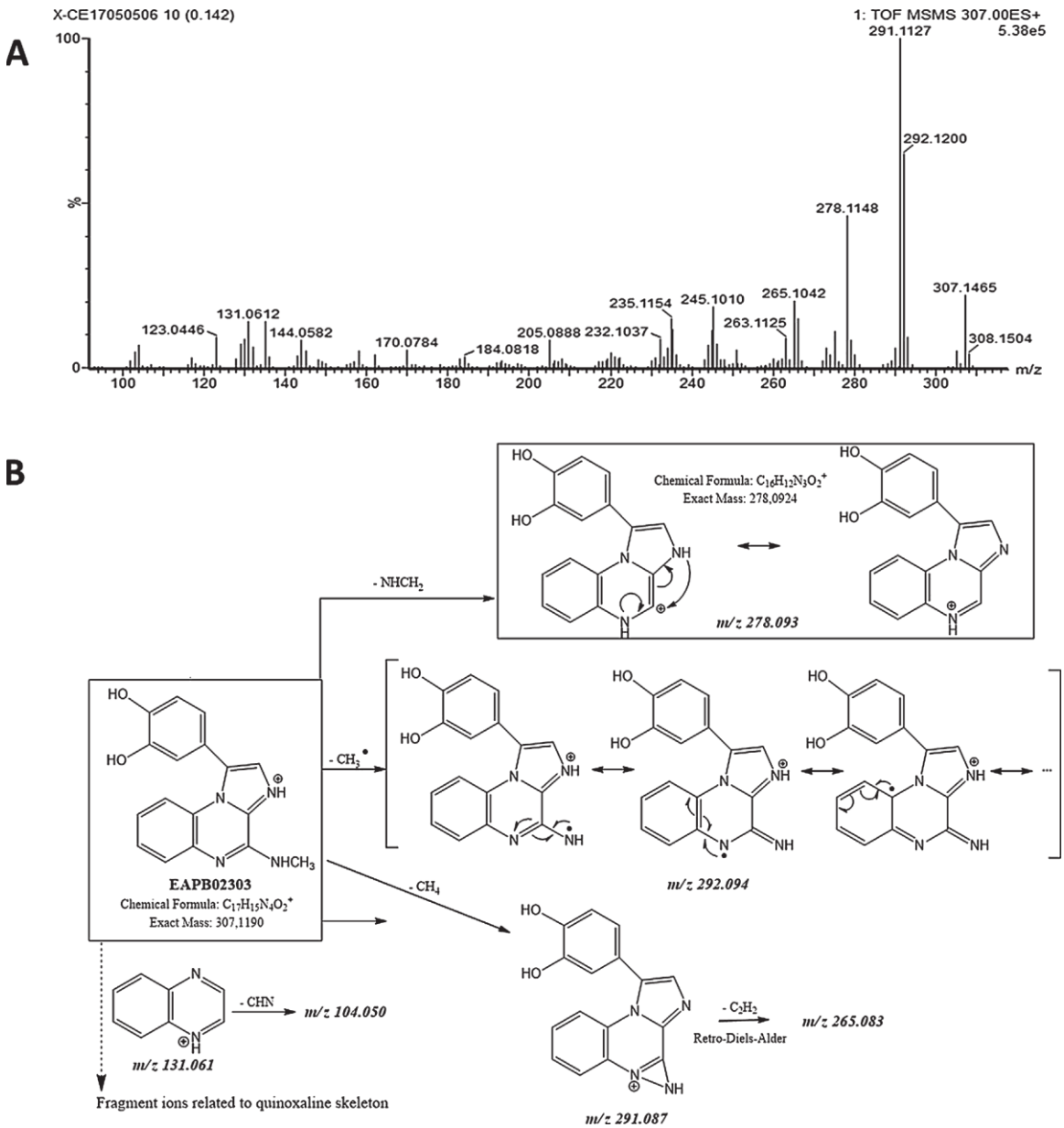


Fig. 2. MS/MS spectra of EAPB02303 recorded with the QTof instrument at collision energy of 35 keV (A) and proposed fragmentation pathways (B).

for other compounds of the same chemical series [20,21] and was thus expected to occur since the loss of $CH_3^{\bullet}$ radical give stable fragment radical cations as depicted in Fig. 2. Minor fragments are observed at m/z 265 (loss of the alkene C_2H_2 from m/z 291) via retro-Diels–Alder reactions and m/z 280 (loss of the nitrile CHN from m/z 307). A fragment ion at m/z 131, related to quinoxaline skeleton, is also observed giving m/z 104 by the consecutive loss of CHN (27 Da). The MS/MS spectrum recorded at 35 eV and the main fragmentation pathways are presented in Fig. 2. Increasing the collision energy provided more abundant low mass fragment ions. Fig. 1A-b of the online Data Supplement displayed all MS/MS spectra acquired with the QTof instrument.

In contrast, at the same collision energy of 35 eV, EAPB02302 shows predominant fragment ions only issued from small neutral losses such as CHN and H_2O to give, respectively, m/z 266 and m/z 275 (from $(M+H)^+$ at m/z 293). These ions underwent further dissociations to produce secondary fragments by the loss of CHN, H_2O, NH_3 and CO as displayed in Fig. 3. In this case, the loss of a radical only represented minor dissociation pathways with the corresponding fragment ions observed at m/z 292 (loss of $H^{\bullet}$) and m/z 276 (loss of $OH^{\bullet}$). Fragment ions at m/z 144 and 131 related to quinoxaline skeleton and at m/z 104 after the loss of CHN from m/z 131 are also observed. Fig. 1B-b of the online Data Supplement showed all MS/MS data acquired under various dissociation conditions.

The two different fragmentation patterns observed with EAPB02303 and EAPB02302 clearly show the specific implication of the C ₦ sigma bond in the generation of fragments. The initial loss of the CH3˙ radical in EAPB02303 dramatically sensitizes the extranuclear C ₦ bond on position 4 of the heterocycle and induces specific patterns of secondary fragmentations in the near environment of the amino group.

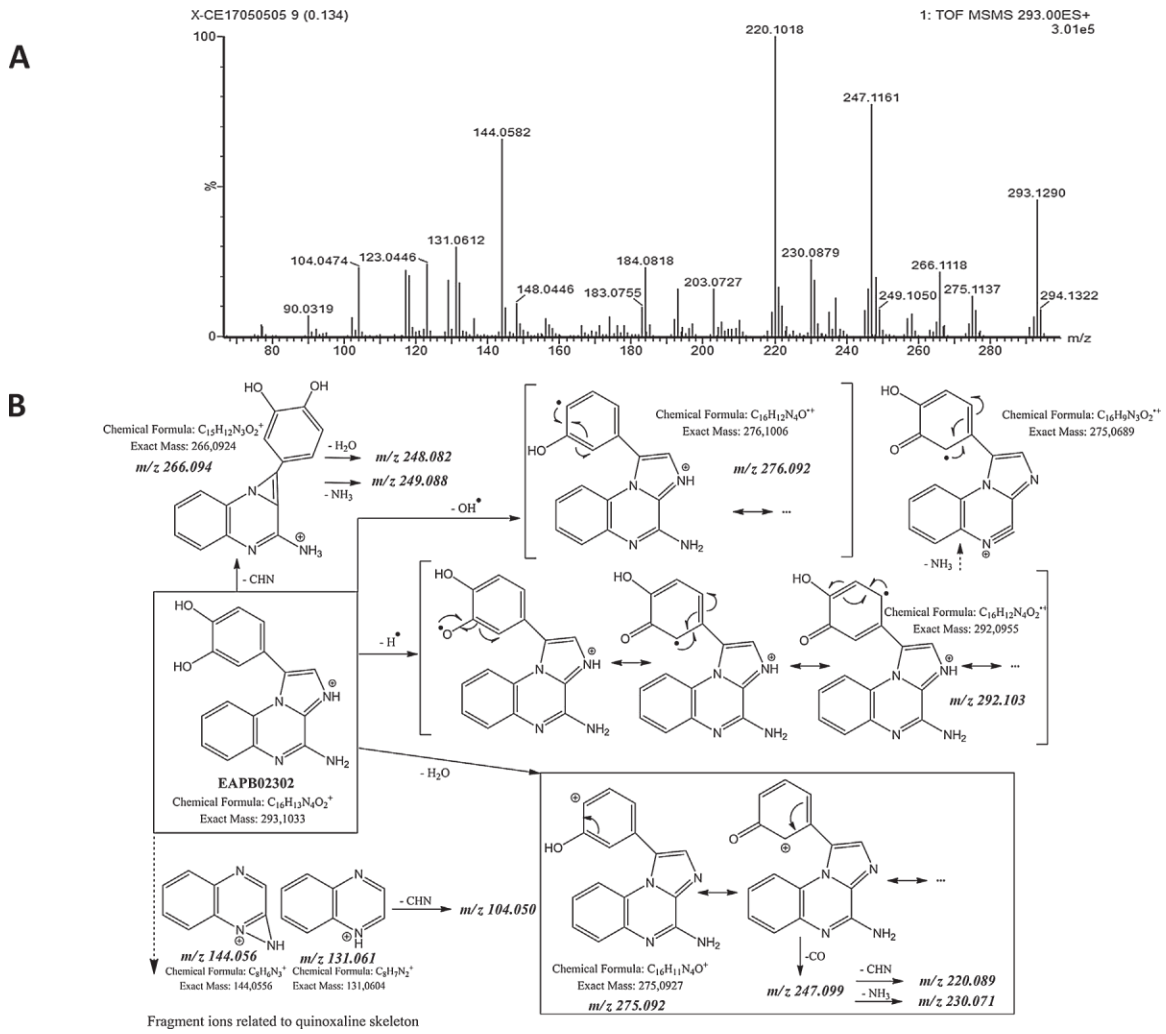


Fig. 3. MS/MS spectra of EAPB02302 recorded with the QTof instrument at collision energy of 35 keV (A) and proposed fragmentation pathways (B).

3.3. *Quantitation of EAPB02303 and EAPB02302 in rat and mouse plasma*

3.3.1. *Method development*

In previous papers from our group [14,15,18], a solid-phase extraction procedure using Oasis HLB cartridge was used to quantify EAPB0203, EAPB0503 and their metabolites in rat plasma. This clean-up method gave good results but it was cost-effective due to material costs. Moreover, this method was not fully automated.

Organic precipitation and liquid-liquid extraction were then tested for sample preparation in this experiment. It was found that organic precipitation with acetonitrile, methanol or ace- tone did not provide the satisfactory recovery of EAPB02303 and EAPB02302. To achieve higher recovery and sensitivity as well as eliminating endogenous interferences, liquid-liquid extraction was undertaken. In an initial step, the most important parameters affecting both extraction and clean-up efficiencies were optimized. The following parameters were included in this screening design:

i) the acid used to precipitate proteins before extraction (formic acid or trifluoroacetic acid), and ii) the type of solvents (ethyl acetate, dichloromethane, chlorobutane) to extract the analytes from the matrix. Finally, better recoveries for EAPB02303 and EAPB02302 were achieved by adding 1% formic acid in the extraction solution and conducting the extraction with ethyl acetate. In a second step, the best conditions were slightly modified to obtain a good selectivity regarding endogenous compounds from the matrix. Different internal standards from this new group of compounds were also checked. Thus, EAPB0602 was chosen as internal standard because of its similar structure, physiochemical properties and mass spectrometric behavior compared to those of EAPB02303 and EAPB02302. In addition, there was no interference at the retention time of this compound. Chromatographic conditions were optimized to improve peak shape, increase signal response of analytes and shorten run time. This included column type (C8 Zorbax Eclipse XDB, C18 RP18 Nucleoshell, C18HD nucleosil, ODS Hypersil, and EVO Kinetex), composition of the mobile phase (methanol or acetonitrile), pH of buffer solution and flow rate. Acetonitrile was chosen as the organic phase because it provided higher responses and lower background noise than methanol. The presence of organic acid (formic, acetic, or trifluoroacetic acid) or buffer (formate or acetate) in the mobile phase was evaluated.

For all analytes the signals obtained in positive mode had much higher intensities than those obtained in negative mode. To optimize MS parameters, preliminary tuning experiments were carried out via direct infusion into the mass spectrometer of a standard solution containing 5000 ng/mL of EAPB02303, EAPB02302 and IS dissolved in the mobile phase. The most intense transitions $[M + H]^+$ at m/z 307 → 292 for EAPB02303, m/z 293 → 104 for EAPB02302 and m/z 277 → 177 for EAPB0602 were used as a quantifier; the other transitions were used as qualifier.

This optimization procedure has led to the optimal experimental conditions described in 2.4.1 and 2.4.4.

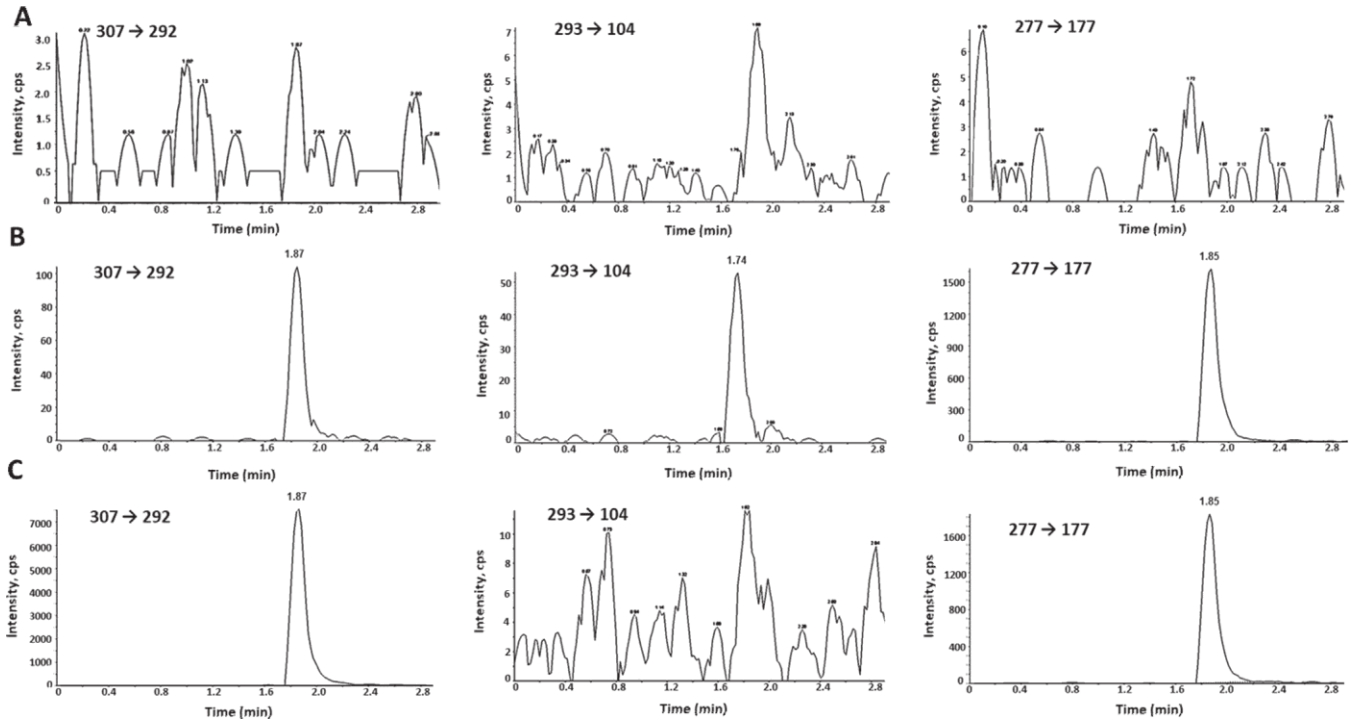


Fig. 4. Representative MRM chromatograms of (A) blank mouse plasma; (B) blank mouse plasma spiked with EAPB02303 and EAPB02302 at the LLOQ; and (C) mouse plasma sample collected 10 min after EAPB02303 intraperitoneal administration of 37.5 mg/kg, this sample has been diluted to 1/5 before analysis, concentration 3100 ng/mL.

3.3.2. Validation results

EAPB02303 and EAPB02302 eluted at retention times (rt) of 1.87 ± 0.03 min and 1.74 ± 0.02 min (n = 48), respectively. To verify if any isobaric compounds are present at the retention time of EAPB02303 and EAPB02302, compound identification was performed using the ratio of the qualifier ion to quantifier ion. The analyte MRM ratios does not vary more than 5% of the average ratios of the standard indicating positive identification and the absence of isobaric compounds.

The six different lots of rat and mouse plasma, commercially procured, were chromatographically screened for interfering substances and did not show significant interference at the retention times of the analytes. Representative MRM chromatograms of the blank rat plasma and blank rat plasma spiked with EAPB02303 and EAPB02302 at two concentrations (LLOQ and 1000 ng/mL) and internal standard may be found in Fig. 2 of the online Data Supplement. Chromatograms of a blank mouse plasma, a blank mouse plasma spiked with EAPB02303 and EAPB02302 at the LLOQ and internal standard (EAPB0602) at 125 ng/mL, and a plasma sample from a mouse 10 min after treatment with EAPB02303 (37.5 mg/kg) are presented in Fig. 4.

In rat plasma, the method was validated over the range 1.95–1000 ng/mL for EAPB02303 and 7.81–1000 ng/mL for EAPB02302. In mouse plasma, the calibration ranges were 0.98–1000 ng/mL and 1.95–1000 ng/mL for the two analytes, respectively. Based on the analysis of residuals and the acceptance criteria [24–26] of the concomitant QC samples calculated according the different models applied to a particular calibration set, the best fit for the standard curves was obtained using an unweighted quadratic function. The R.S.D. values on the slope were below 15%. Mean parameters are presented in Table 4. Variations in back-calculated concentrations (given as R.S.D. (%)) of all calibration curves ranged from 0.37% to 6.17% for EAPB02303 and from 1.82% to 8.78% for EAPB02302; the mean bias between back-calculated and nominal concentrations were between −5.4% to 2.8% for EAPB02303 and between −2.9% to 5.2% for EAPB02302. Results are presented in Tables 1 (rat plasma) and 2 (mouse plasma) of the online Data Supplement. The goodness of fit between back-calculated concentrations and introduced concentrations was statistically verified (Student's *t*-test). The mean relative predictor error calculated from the difference between back-calculated and nominal concentrations was not statistically different from zero. The 95% confidence intervals in rat plasma were −1.55;1.48 for EAPB02303 and −1.71;2.24 for EAPB02302. In mouse plasma, they were −4.02;4.18 for EAPB02303 and −1.86;1.70 for EAPB02302. Distributions of residuals are presented in Fig. 3 of the online Data Supplement.

Table 4
Mean parameters of the quadratic equation ($Y = aX^2 + bX + c$).

	EAPB02302	EAPB02303
	Rat plasma	
Within day (n = 6)		
a	6.15×10^{-7}	1.52×10^{-6}
b	4.87×10^{-3} (6.3%)	1.53×10^{-2} (7.9%)
c	2.91×10^{-3}	1.00×10^{-2}
Between-day (n = 14)		
a	3.69×10^{-7}	1.12×10^{-7}
b	4.19×10^{-3} (14.4%)	1.39×10^{-2} (9.1%)
c	6.80×10^{-4}	8.81×10^{-3}
	Mouse plasma	
Between-day (n = 6)		
a	-6.00×10^{-8}	-7.01×10^{-7}
b	4.15×10^{-3} (7.6%)	1.36×10^{-2} (12.9%)
c	8.57×10^{-4}	2.95×10^{-3}

R.S.Ds are given between parentheses.

Precision and accuracy complied with the FDA and EMA recommendations [24–26]. The upper concentration limits can be extended to 10000 ng/mL. The mean back-calculated concentrations for 1/20, 1/10, 1/5 and 1/2.5 dilution samples were within 90.6-103.6% of their nominal values. Results are reported in Table 5.

For EAPB02303, extraction recoveries were 98.9% (R.S.D., 9.0%) in rat plasma and 93.3% (R.S.D., 6.4%) in mouse plasma. They were 99.4% (R.S.D., 8.1%,) and 96.8% (R.S.D., 10.0%) for EAPB02302, and

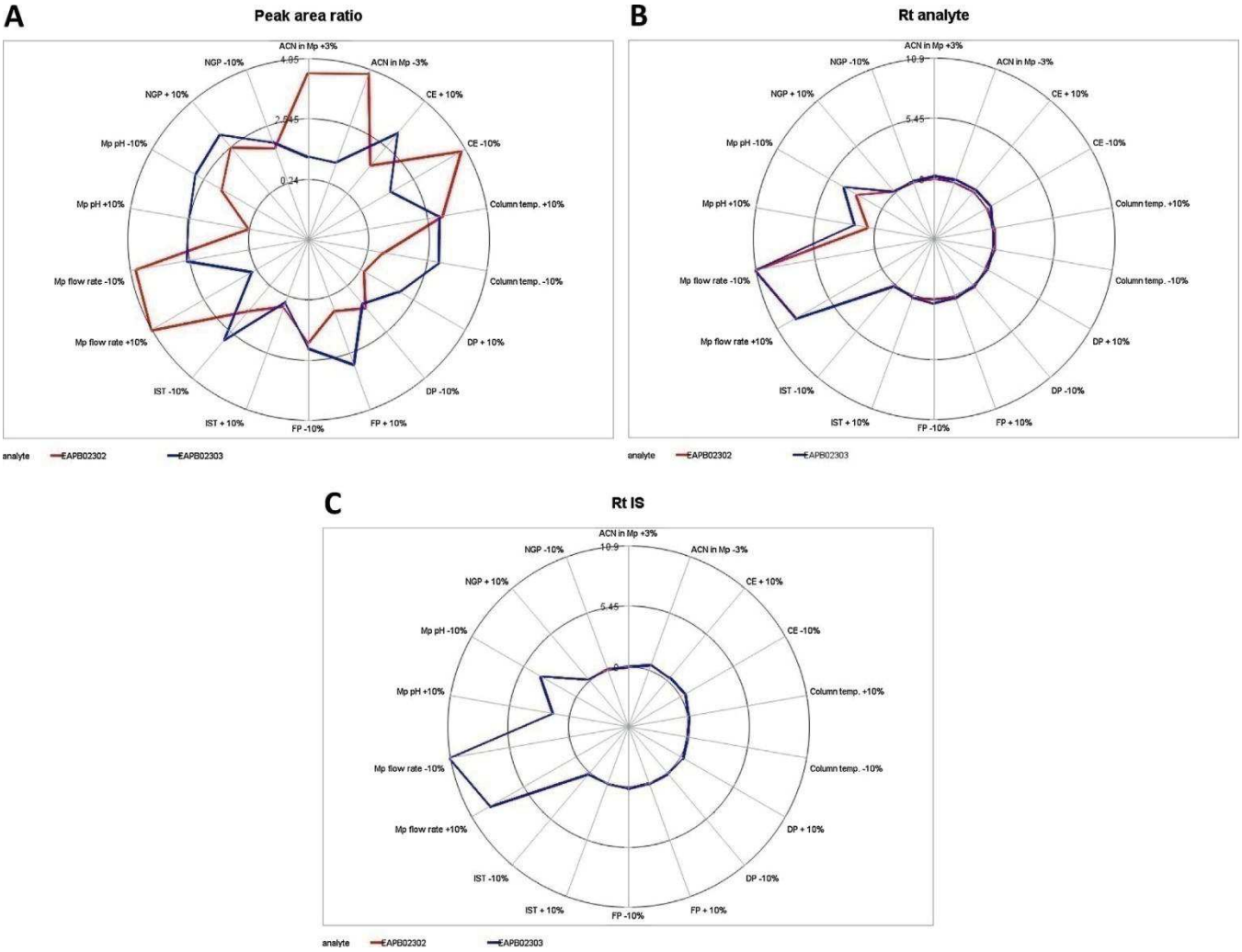


Fig. 5. Analysis of the radar plots.
IS (internal standard); retention time (Rt); nebulizer gas pressure (NGP); declustering potential (DP); focusing potential (FP); collision energy (CE); ion source temperature (IST); temperature (temp.); mobile phase (Mp); acetonitrile (ACN).

98.2% (R.S.D., 5.3%) and 96.9% (R.S.D., 8.1%) for the internal standard in rat and mouse plasma, respectively. These recoveries were not statistically different over the range of concentrations studied.

In rat plasma, the LLOQs were 1.95 ng/mL for EAPB02303 and 7.81 ng/mL for EAPB02302. In mouse plasma, they were 0.98 ng/mL and 1.95 ng/mL for the two analytes, respectively. At these levels, the precision of determination, expressed as R.S.D. was < 8.2% with adequate assay accuracy (96.8-103.7%).

The mean matrix factors in rat plasma ranged from 98.3% to 104.0% (R.S.D. ≤ 6.9%) for EAPB02303 and from 91.8% to 108.5% (R.S.D. ≤ 8.8%) for EAPB02302. In mouse plasma, they ranged from 90.4% to 102.4% (R.S.D. ≤ 7.6%) and from 90.4% to 98.2% (R.S.D. ≤ 7.3%) for EAPB02303 and EAPB020302, respectively. Moreover, no suppression/enhancement for the internal standard could be detected when compound in neat injection solvent was compared with compound in extracted blank biological matrix (107.8% (R.S.D., 4.2%) in rat plasma; 102.5% (R.S.D., 3.8%) in mouse plasma).

In this analysis, no quantifiable carryover effect was observed when a series of blank plasma solutions were injected immediately following the highest calibration standard.

Results of the robustness analysis are presented in Table 3 of the online Data Supplement. The *t*-test showed no prediction bias (prediction error not statistically different from zero) when variations in the nine LC–MS/MS factors evaluated were introduced. For the peak area ratio (the relevant parameter for the quantification of analytes), the overall absolute prediction errors were < 5%. The analysis of the radar plots showed that EAPB02303 is marginally affected by the changes in the nine factors. For EAPB02302, the changes in mobile phase flow rate and in the percentage of acetonitrile in the mobile phase, and the decrease of collision energy are the most influential factors; the other factors presented low influence (Fig. 5A). Concerning the peak areas of the analytes and of the internal standard, the absolute prediction errors were <9.5%. The retention times of the analytes were more considerably influenced by two factors: the changes in mobile phase flow rate and the decrease in the pH buffer (Fig. 5B,C). The 10% changes in mobile phase flow rate induced a reduction/increase of about 0.2 min in the retention times (absolute prediction errors ranging from 8.9% to 10.9%). The decrease in the pH buffer from 3 to 2.7 presented lower effect on the retention times (a decrease of about 0.1 min was observed; absolute prediction errors <3.9%). These results showed that the analytical method developed to quantify EAPB02303 and EAPB02302 produced robust results in presence of small variations in the nine evaluated factors of the chromatographic method.

The validated method demonstrated excellent performance in term of ruggedness.

Table 5
Intra- and inter-assay precision and accuracy results.

Nominal concentrations (ng/mL)	Precision, % (Recovery, %)	
EAPB02302		EAPB02303
Rat plasma Intra-day (n = 6)		
3.91	–	4.09 (102.3)
11.7	3.36 (103.4)	–
46.9	4.23 (104.3)	5.09 (102.3)
187	4.08 (103.4)	2.33 (102.0)
750	1.85 (101.3)	4.18 (98.8)
Inter-day (n = 37)		
3.91	–	7.18 (99.5)
11.7	5.98 (100.2)	–
46.9	4.99 (100.6)	4.55 (98.2)
187	6.33 (98.4)	5.55 (101.2)
750	6.25 (96.4)	4.79 (99.9)
Dilution integrity (n = 3)		
10000	8.21 (100.8)	1.28 (90.6)
5000	4.61 (102.9)	12.5 (103.6)
2500	7.95 (97.0)	2.02 (93.1)
1250	6.14 (95.0)	1.83 (97.1)
Mouse plasma		
Inter-day (n = 9)		
1.95	–	5.39 (98.7)
3.91	5.95 (100.6)	3.87 (99.8)
11.7	5.07 (99.4)	–
46.9	3.02 (98.2)	4.47 (102.5)
187	4.75 (95.9)	2.66 (98.7)
750	3.29 (99.3)	3.50 (101.3)

3.3.3. Stability

Stock solutions of EAPB02303 and EAPB02302 were stable at −20 °C for up to 6 months.

In rat and mouse plasma, stored at −20 and −80 °C, EAPB02303 and EAPB02302 at the concentrations of QC samples were stable for at least 4 months. After bench-top storage at room temperature for 6 h, recoveries were > 87.8% for EAPB02303 and EAPB02302. Stored at 4 °C for 3 days, recoveries were > 92% for EAPB02303; and > 91% for EAPB02302. Reconstituted extracts in the mobile phase were stable in the autosampler at 4 °C for 48 h. Three freeze-thaw cycles did not affect the stability of EAPB02303 and EAPB02302.

3.4. Pharmacokinetic study

This developed and validated LC–MS/MS method was used to quantify EAPB02303 and EAPB02302 in mouse plasma drawn during a pharmacokinetic study performed in C57Bl/6 mice. Semilogarithmic plot of the mean (±SD) EAPB02303 plasma concentration-time profile is presented in Fig. 6. EAPB02303 plasma concentrations decline in a biphasic manner. We can observe that EAPB02303 plasma concentrations remain greater than 4-fold the IC_{50} value against A375 cell line for more than 8 h following administration. After intraperitoneal administration, the peak plasma concentration was obtained in 10 min following administration. These data suggest that EAPB02303 is rapidly absorbed from the peritoneal fluid into the blood compartment. Pharmacokinetic parameters are as follows: CL/F, 33.4 L/h/kg; V_1/F, 6.26 L/kg; Vss/F, 51.9 L/kg; AUC, 1122.8 µ,gxh/L; and terminal half-life, 6.11 h.

EAPB02302 was not detected in plasma. Thus, unlike EAPB0203 and EAPB0503, the first two lead compounds, the *N*-demethylation of EAPB02303 does not appear to be a metabolic pathway in mice. EAPB02303 has a structure close to that of EAPB0503. Follow- ing incubation of EAPB0503 with liver microsomes from different species, mouse is the species that metabolizes the least [21]. We have found that hydroxylation reaction occurred on the C- and D-rings of the drug [21]. The presence of hydroxylated metabolite(s)

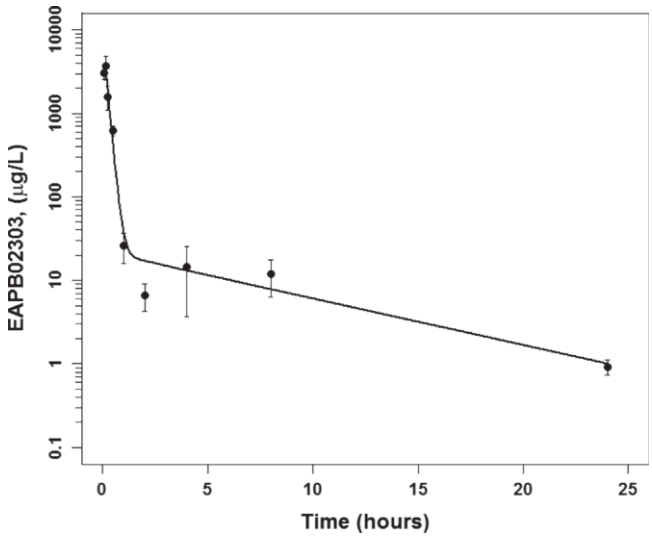


Fig. 6. Mean ± SD plasma concentration-time profile of EAPB02303 in male C57Bl/6 mice after intraperitoneal administration of 37.5 mg/kg.

has been checked on the chromatograms obtained in scan mode. Unfortunately, no other peaks than those observed for the analyte and the internal standard were detected. A metabolism study of EAPB02303 is planned by using *in vitro* systems with human, rat, mouse, and dog liver microsomes and hepatocytes.

4. Conclusion

Since several years, our group is particularly involved in the study and development of new imidazo[1,2-*a*]quinoxaline compounds [8–10,29]. Two compounds, EAPB0203 and EAPB0503, were first identified as lead compounds due to their interesting antitumoral activities against a variety of tumors, particularly on the melanoma. The modulation of the chemical structure of these compounds has led to the synthesis of EAPB02303 and EAPB02302 exhibiting a significant increase of the *in vitro* cytotoxic activity. Thus, before to perform an *in vivo* activity study in a xenograft mouse model, a sensitive, specific, and reproducible LC–MS/MS method was developed and validated for the simultaneous analysis of these compounds in rat and mouse plasma. The assay showed excellent intra- and inter-day precision and accuracy. The levels of quantification were 1.95 ng/mL for EAPB02303 and 7.81 ng/mL for EAPB02302 in rat plasma, and 0.98 ng/mL and 1.95 ng/mL for the two compounds in mouse plasma, respectively with %R.S.D. and bias values both considerably below the +/− 20% criteria. This method was successfully applied to the determination of EAPB02303 in male C57Bl/6 mouse plasma after single intraperitoneal administration of 37.5 mg/kg. The *N*-demethylation of EAPB02303 does not appear to be a metabolic pathway in mice. The pharmacokinetic parameters calculated during this study will be used to determine the doses and rhythm of administration during the future preclinical activity studies.

Financial disclosures

Non applicable.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Société d'Accélération du Trans- fert de Technologie AxLR (Montpellier, France) for its financial support and 4P-Pharma (Lille, France) for its technical support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.10.025.

References

[1] W.B. Grant, Critique of the International Agency for Research on Cancer's meta-analyses of the association of sunbed use with risk of cutaneous malignant melanoma, Dermato Rndocrinol. 1 (2009) 294–299.
[2] F. Erdmann, J. Lortet-Tieulent, J. Schüz, H. Zeeb, R. Greinert, E.W. Breitbart, F. Bray, International trends in the incidence of malignant melanoma 1953–2008–are recent generations at higher or lower risk? Int. J. Cancer 132 (2013) 385–400.
[3] S.C. Azoury, J.R. Lange, Epidemiology risk factors, prevention, and early detection of melanoma, Surg. Clin. North Am. 94 (2014) 945–962.
[4] J.E. Russak, D.S. Rigel, Risk factors for the development of primary cutaneous melanoma, Dermatol. Clin. 30 (2012) 363–368.
[5] R. Dummer, A. Hauschild, N. Lindenblatt, G. Pentheroudakis, U. Keilholz, ESMO guidelines committee, cutaneous melanoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. 26 (Suppl'. 5) (2015) v126–132.
[6] J.A. Pereira, A.M. Pessoa, M.N.D.S. Cordeiro, R. Fernandes, C. Prudêncio, J.P. Noronha, M. Vieira, Quinoxaline: its derivatives and applications: a State of the Art review, Eur. J. Med. Chem. 97 (2015) 664–672.
[7] V.A. Mamedov, A.A. Kalinin, Advances in the synthesis of imidazo[1, 5-a]- and imidazo[1, 2-*a*]quinoxalines, Russ. Chem. Rev. 83 (9) (2014) 820–847.
[8] C. Deleuze-Masquefa, G. Moarbess, P.A. Bonnet, F. Pinguet, A. Bazarbachi, F. Bressolle, Imidazo[1,2-a]quinoxalines et dérivés pour le traitement des cancers, 2009 (WO2009043934 A1).
[9] C. Deleuze-Masquefa, G. Moarbess, P.A. Bonnet, F. Pinguet, A. Bazarbachi, F. Bressolle. Patent US 20138378098 B2 (2013).
[10] C. Deleuze-Masquefa, G. Moarbess, P.A. Bonnet, F. Pinguet, A. Bazarbachi, F. Bressolle. Canadian Patent 2 701 386 (2016).
[11] G. Moarbess, C. Deleuze-Masquéfa, V. Bonnard, S. Paniagua, J.R. Vidal, F. Bressolle, F. Pinguet, P.A. Bonnet, In vitro and in vivo antitumoral activities of imidazo[1,2-*a*]quinoxaline, imidazo[1,5-*a*]quinoxaline, and pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives, Bioorg, Med. Chem. 16 (2008) 6601–6610.
[12] G. Moarbess, H. El-Hajj, Y. Kfoury, M.E. El-Sabban, Y. Lepelletier, O. Hermine, C. Deleuze-Masquéfa, P.A. Bonnet, A. Bazarbachi, EAPB0203, a member of the imidazoquinoxaline family, inhibits growth and induces caspase dependent apoptosis in T cell lymphomas and HTLV-I associated adult T-cell leukemia/lymphoma, Blood 111 (2008) 3770–3777.
[13] C. Deleuze-Masquéfa, G. Moarbess, S. Khier, N. David, S. Gayraud-Paniagua, F. Bressolle, F. Pinguet, P.A. Bonnet, New imidazo[1, 2-*a*]quinoxaline derivatives synthesis and in vitro activity against human melanoma, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 3406–3411.
[14] S. Khier, G. Moarbess, C. Deleuze-Masquéfa, D. Margout, I. Solassol, F. Pinguet, P.A. Bonnet, F.M.M. Bressolle, Quantitation of two imidazo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives (EAPB0503 and EAPB0603) with anti-tumoral activity in human and rat plasma by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Application to a Pharmacokinetic Study, J. Sep. Sci. 32 (2009) 1363–1373.
[15] S. Khier, C. Deleuze-Masquéfa, G. Moarbess, F. Gattacceca, D. Margout, I. Solassol, J.F. Cooper, F. Pinguet, P.A. Bonnet, F.M.M. Bressolle, Pharmacology of EAPB0203 a novel imidazo[1,2-*a*]quinoxaline derivative with anti-tumoral activity on melanoma, Eur. J. Pharm. Sci. 39 (2010) 23–29.
[16] J. Saliba, C. Deleuze-Masquéfa, A. Iskandarani, R. El Eit, R. Hmadi, F.-X. Mahon, A. Bazarbachi, P.A. Bonnet, R. Nasr, EAPB0503, a novel imidazoquinoxaline derivative, inhibits growth and induces apoptosis in chronic myeloid leukemia cells, Anticancer. Drugs. 25 (2014) 624–632.
[17] A.I. Nabbouh, R.S. Hleihel, J.L. Saliba, M.M. Karam, M.H. Hamie, H.-C.J.M. Wu, C.P. Berthier, N.M. Tawil, P.A. Bonnet, C. Deleuze-Masquefa, H.A. El Hajj, Imidazoquinoxaline derivative EAPB0503: a promising drug targeting mutant nucleophosmin 1 in acute myeloid leukemia, Cancer (January (5)) (2017), http://dx.doi.org/10.1002/cncr.30515.
[18] S. Khier, F. Gattacceca, S. El Messaoudi, F. Lafaille, C. Deleuze-Masquéfa, J. Bompart, J.F. Cooper, I. Solassol, F. Pinguet, P.A. Bonnet, F.M.M. Bressolle, Metabolism and pharmacokinetics of EAPB0203 and EAPB0503, two imidazoquinoxaline compounds previously shown to have anti-tumoral activity on melanoma and T-lymphomas, Drug Metab. Dispos. 38 (2010) 1836–1847.
[19] Z. Zghaib, J.F. Guichou, J. Vappiani, N. Bec, K. Hadj-Kaddour, L.A. Vincent, S. Paniagua-Gayraud, C. Larroque, G. Moarbess, P. Cuq, I. Kassab, C. Deleuze-Masquéfa, M. Diab-Assaf, P.A. Bonnet, New imidazoquinoxaline derivatives: synthesis biological evaluation on melanoma, effect on tubulin polymerization and structure-activity relationships, Bioorg. Med. Chem. 24 (2016) 2433–2440.
[20] F. Lafaille, B. Banaigs, N. Inguimbert, C. Enjalbal, P.E. Doulain, P.A. Bonnet, C. Masquefa, F.M.M. Bressolle, Characterization of a new anticancer agent, EAPB0203 and its main metabolites: nuclear magnetic resonance and liquid chromatography-mass spectrometry studies, Anal. Chem. 84 (2012) 9865–9872.
[21] F. Lafaille, I. Solassol, C. Enjalbal, B. Bertrand, P.E. Doulain, J. Vappiani, P.A. Bonnet, C. Deleuze-Masquéfa, F.M. Bressolle, Structural characterization of in vitro metabolites of the new anticancer agent EAPB0503 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Pharm. Biomed. Anal. 88 (2014) 429–440.
[22] P. Cuq, C. Deleuze-Masquefa, P.-A. Bonnet, C. Patinotte, Nouveaux imidazo[1,2-a]quinoxalines et dérivés pour le traitement des cancers, 2016 (WO2016107895 A1).
[23] G. Kim, A.E. McKee, Y.M. Ning, M. Hazarika, M. Theoret, J.R. Johnson, Q.C. Xu, S. Tang, R. Sridhara, X. Jiang, K. He, D. Roscoe, W.D. McGuinn, W.S. Helms, A.M. Russell, S.P. Miksinski, J.F. Zirkelbach, J. Earp, Q. Liu, A. Ibrahim, R. Justice, R. Pazdur, FDA approval summary: vemurafenib for treatment of unresectable or metastatic melanoma with the BRAFV600E mutation, Clin. Cancer Res. 20 (2014) 4994–5000.
[24] G. Tiwari, R. Tiwari, Bioanalytical method validation: an updated review, Pharm. Methods 1 (2010) 25–38.
[25] C.T. Viswanathan, S. Bansal, B. Booth, A.J. DeStefano, M.J. Rose, J. Sailstad, V.P. Shah, J.P. Skelly, P.G. Swann, R. Weiner, Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays, Pharm. Res. 24 (2007) 1962–1973.
[26] European Medicines Agency Guideline on Bioanalytical Method Validation, 2011 http://www.ema.europa.eu/docs/enGB/documentlibrary/Scientificguideline/2011/08/WC500109686.pdf.
[27] A. Cappiello, G. Famiglini, P. Palma, E. Pierini, V. Termopoli, H. Trufelli, Overcoming matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry, Anal. Chem. 80 (2008) 9343–9348.
[28] S. Beal, L.B. Sheiner, A. Boeckmann, R.J. Bauer, NONMEM User's Guides. (1989–2009), Icon Development Solutions, MD, USAMD, USA, Ellicott City, 2009.
[29] C. Patinote, K. Hadj-Kaddour, M. Damian, C. Deleuze-Masquéfa, P. Cuq, P.A. Bonnet, Fluorescence study of imidazoquinoxalines, J. Fluoresc. (2017), http:// dx.doi.org/10.1007/s10895-017-2097-z.

Supplemental Table 1

R.S.D.s and recoveries, calculated from back calculated concentrations, from calibration curves performed in rat plasma.

Nominal concentrations (ng/mL)	R.S.Ds, % (Recovery, %)	
	EAPB02302	**EAPB02303**
Within day (n = 6)		
1.95	–	0.77 (100.7)
7.81	6.27 (97.1)	4.51 (97.0)
15.6	6.82 (98.9)	5.67 (94.6)
31.2	6.12 (99.0)	2.80 (97.5)
62.5	8.78 (99.4)	4.95 (102.8)
125	2.27 (98.9)	4.69 (101.1)
250	2.03 (105.2)	3.07 (99.9)
500	3.35 (103.2)	2.04 (101.1)
1000	1.82 (97.7)	0.49 (99.3)
Between-day (n = 14)		
1.95	–	3.65 (99.4)
7.81	2.54 (101.5)	6.17 (99.1)
15.6	5.82 (97.3)	4.33 (99.7)
31.2	5.40 (97.3)	4.66 (100.4)
62.5	4.92 (104.0)	4.82 (99.7)
125	4.12 (100.3)	6.15 (98.8)
250	4.40 (98.5)	4.89 (100.4)
500	4.41 (101.2)	3.71 (101.2)
1000	2.40 (99.7)	2.66 (99.6)

Supplemental Table 2

R.S.D.s and recoveries, calculated from back calculated concentrations, from calibration curves performed in mouse plasma.

Nominal concentrations (ng/mL)	R.S.Ds, % (Recovery, %)	
	EAPB02302	**EAPB02303**
Between-day (n = 6)		
0.98		0.37 (99.8)
1.95	1.93 (99.0)	
7.81	6.91 (100.9)	3.39 (100.8)
15.6	8.19 (103.7)	1.03 (99.6)
31.2	4.33 (98.9)	1.81 (102.0)
62.5	4.17 (97.6)	1.76 (100.8)
125	5.18 (99.0)	3.69 (100.2)
250	3.65 (99.2)	2.83 (96.8)
500	4.57 (97.3)	1.87 (98.4)
1000	3.40 (101.9)	0.84 (101.3)

Supplemental Table 3. Results obtained for evaluation of the robustness

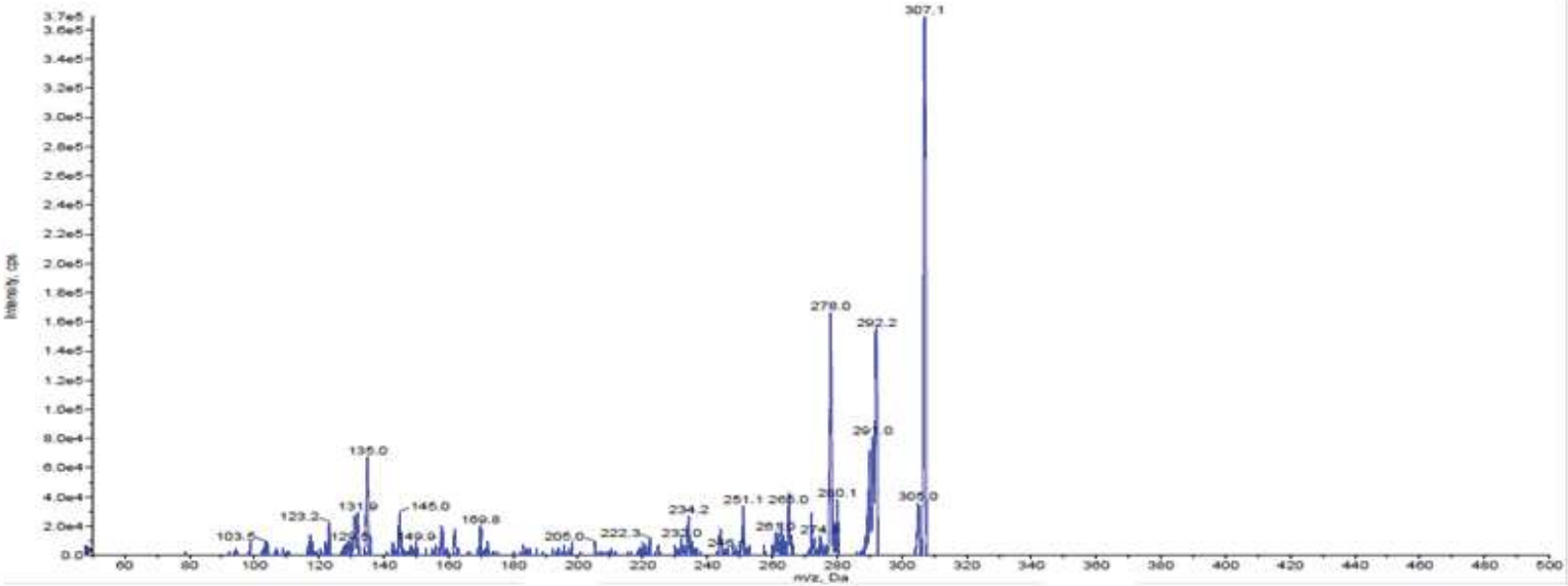
Factors	%PE				
	Peak area analyte	Peak area IS	Peak area ratio	Rt analyte	Rt IS
			EAPB02303		
NGP + 10%	−2.22	0.76	−3.16	0.13	0.13
NGP -10%	−2.22	0.53	−1.89	−0.13	0
DP + 10%	−1.33	0.40	−1.93	0.13	0.26
DP -10%	7.38	6.25	1.14	0.13	0.13
FP + 10%	4.95	7.54	−3.02	−0.26	0
FP -10%	−4.59	−2.82	−2.07	0.39	0.13
CE + 10%	−0.46	2.49	−3.26	−0.39	0.39
CE -10%	−4.02	−5.95	1.57	0.52	0.52
IST + 10%	1.16	1.56	−0.47	-0.13	0
IST -10%	−0.17	2.50	−2.93	0.13	-0.13
Mp flow rate +10%	4.47	3.66	0.41	8.94	8.94
Mp flow rate -10%	−7.10	−4.82	−2.65	−10.9	−10.9
Mp pH +10%	1.43	−1.20	2.56	1.82	1.42
Mp pH -10%	2.41	−0.81	2.90	3.90	3.63
Column temp. +10%	2.18	4.94	−3.03	0	0.13
Column temp. -10%	−1.69	1.23	−3.01	0	0
ACN in Mp +3%	1.29	1.70	−1.11	−0.26	0
ACN in Mp -3%	−1.70	−3.26	1.08	−0.26	−0.52
Student's t-test (p)	0.46	0.25	0.60	0.88	0.95
			EAPB02302		
NGP + 10%	−0.91	1.86	−2.52	0.14	−0.13
NGP -10%	0.96	2.79	−1.66	0	0.13
DP + 10%	−0.89	0.40	0.40	0	0.26
DP -10%	2.56	4.04	−1.36	0.28	0.13
FP + 10%	6.53	5.79	−0.83	−0.14	0
FP -10%	−1.02	−2.82	1.88	0	−0.13
CE + 10%	2.54	4.02	−1.63	−0.14	−0.39
CE -10%	0.33	−4.84	4.69	0.14	0.52
IST + 10%	−0.41	−0.30	−0.65	0.14	0
IST -10%	2.20	0.65	1.49	0	-0.13
Mp flow rate +10%	1.28	−4.05	4.85	8.86	8.94
Mp flow rate -10%	−4.29	−9.23	4.61	−10.8	−10.9
Mp pH +10%	−3.53	−3.34	0.24	−0.56	−1.42
Mp pH -10%	5.67	−6.24	−1.75	2.53	3.63
Column temp. +10%	1.86	4.94	−3.15	−0.14	0.13
Column temp. -10%	1.54	2.34	−0.83	−0.14	0
ACN in Mp +3%	6.17	−1.46	−4.30	0	0
ACN in Mp -3%	3.51	−1.12	4.69	0	0.52
Student's t-test (p)	0.12	0.66	0.13	0.88	0.96

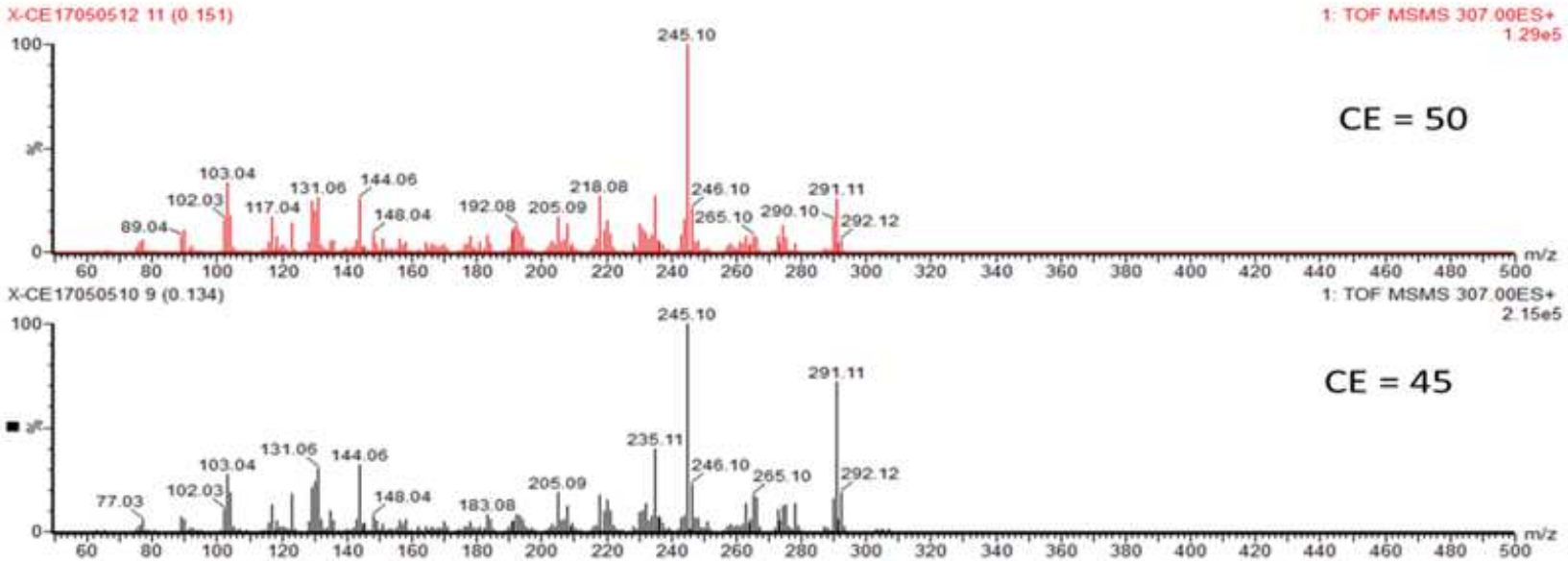
%PE (percent prediction error); IS (internal standard); retention time (Rt); prediction error (PE); nebulizer gas pressure (NGP); declustering potential (DP); focusing potential (FP); collision energy (CE); ion source temperature (IST); temperature (temp.); mobile phase (Mp); acetonitrile (ACN).

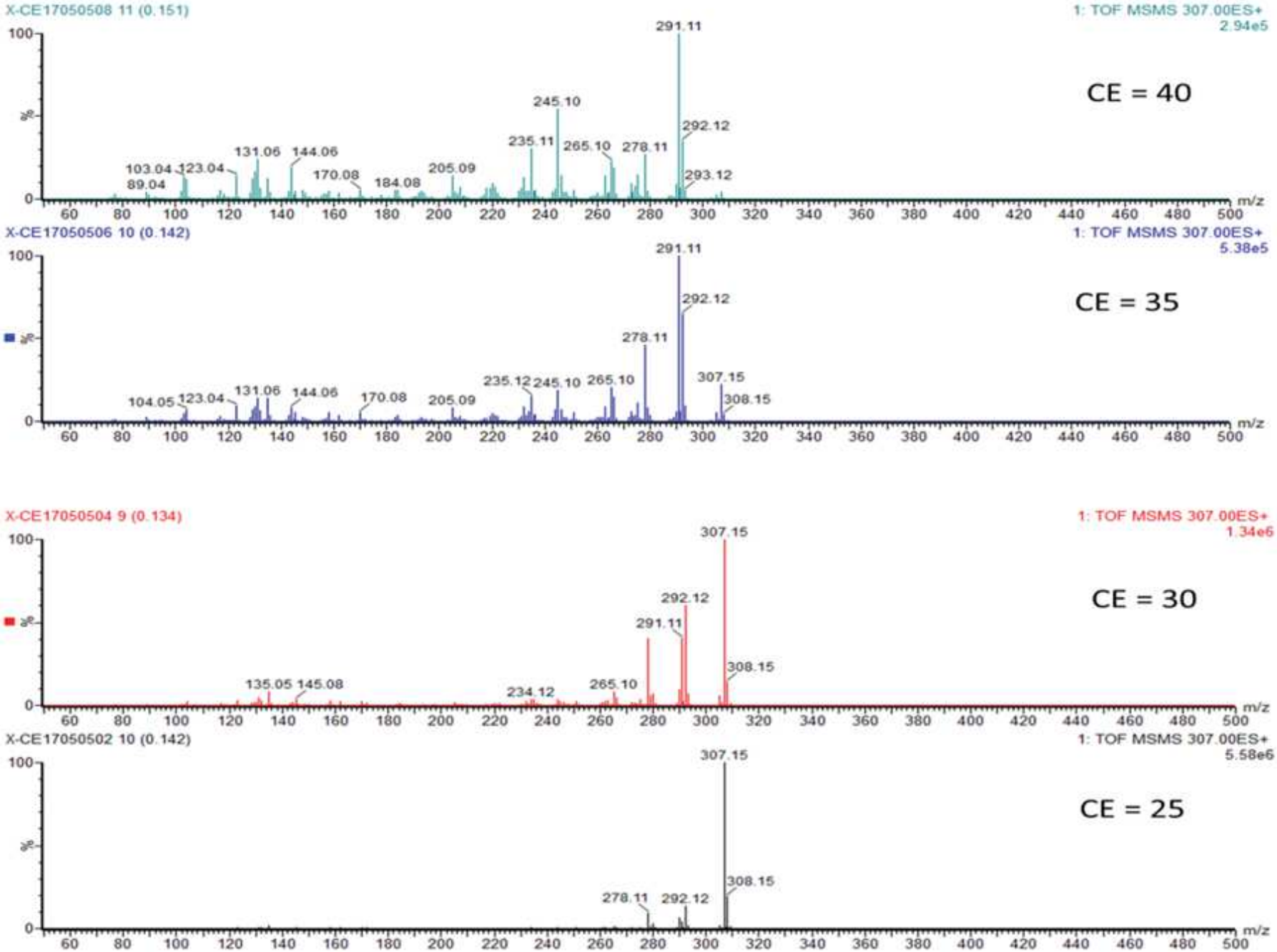
Supplemental Fig. 1A: MS/MS spectra of EAPB2303.

a) recorded with the QqQ (API 3000 tandem triple quadrupole MS) instrument

b) recorded with the QTof instrument at decreasing Collision Energy (CE)



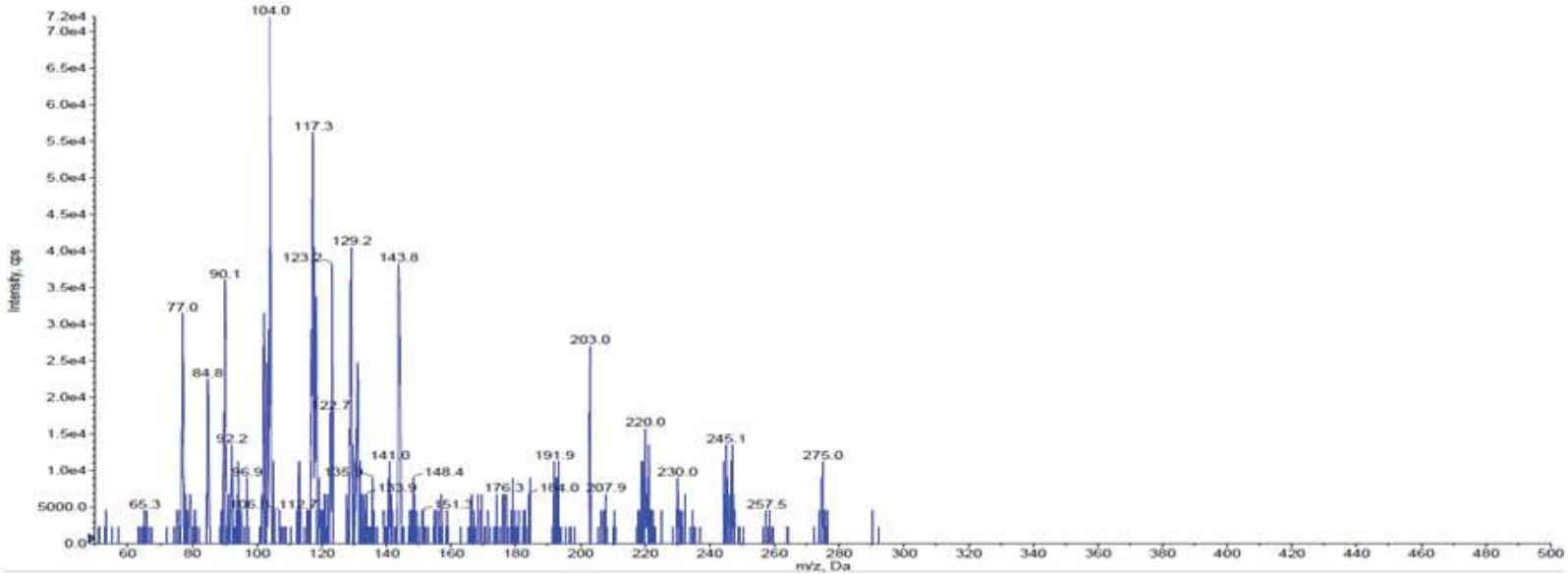


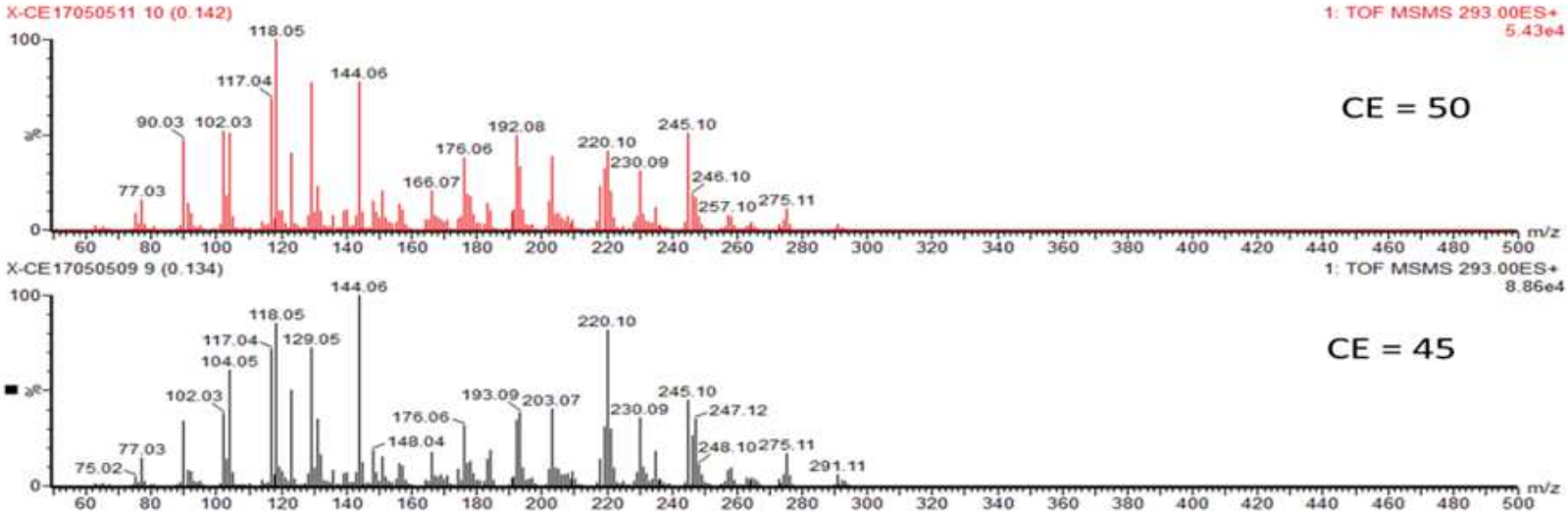

X-CE17050508 11 (0.151)
1: TOF MSMS 307.00ES+
2.94e5
CE = 40
291.11
245.10
292.12
235.11
265.10
278.11
131.06
144.06
103.04
123.04
89.04
170.08
184.08
205.09
293.12
X-CE17050506 10 (0.142)
1: TOF MSMS 307.00ES+
5.38e5
CE = 35
291.11
292.12
278.11
307.15
308.15
104.05
123.04
131.06
144.06
170.08
205.09
235.12
245.10
265.10
X-CE17050504 9 (0.134)
1: TOF MSMS 307.00ES+
1.34e6
CE = 30
307.15
292.12
291.11
308.15
135.05
145.08
234.12
265.10
X-CE17050502 10 (0.142)
1: TOF MSMS 307.00ES+
5.58e6
CE = 25
307.15
308.15
278.11
292.12
m/z

Supplemental Fig. 1B: MS/MS spectra of EAPB2302.

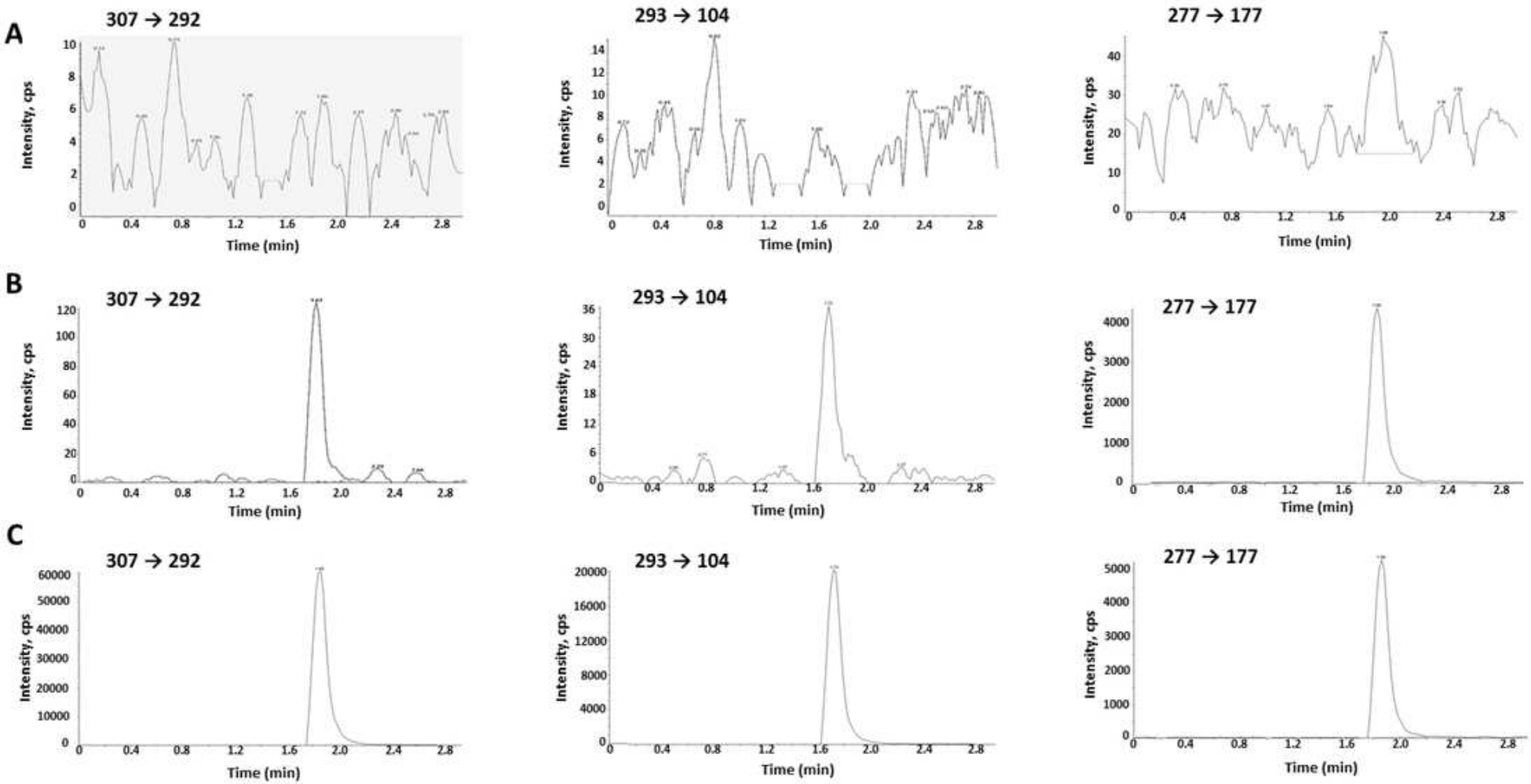
a) recorded with the QqQ (API 3000 tandem triple quadrupole MS) instrument

b) recorded with the QTof instrument at decreasing Collision Energy (CE)

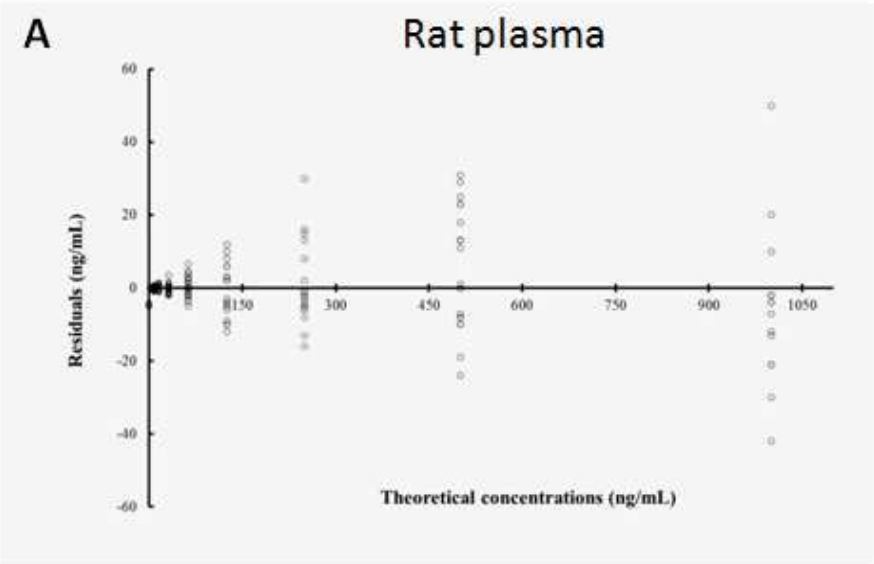


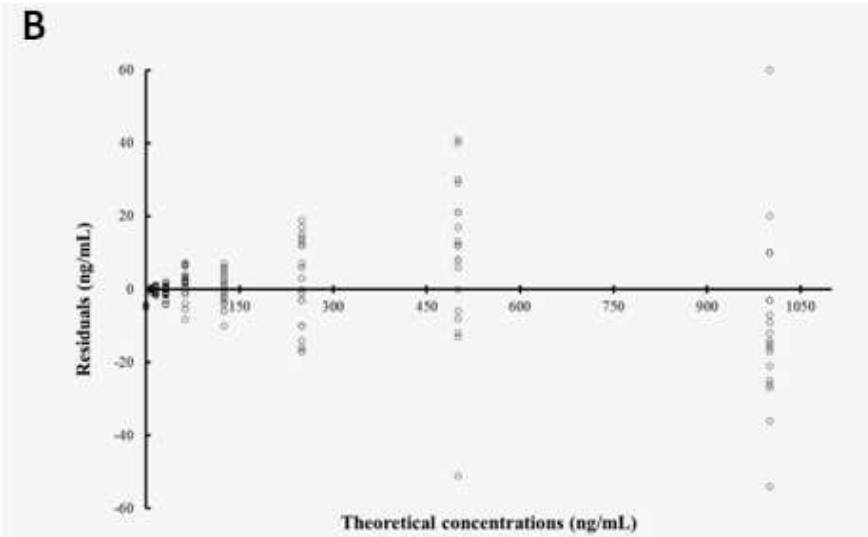


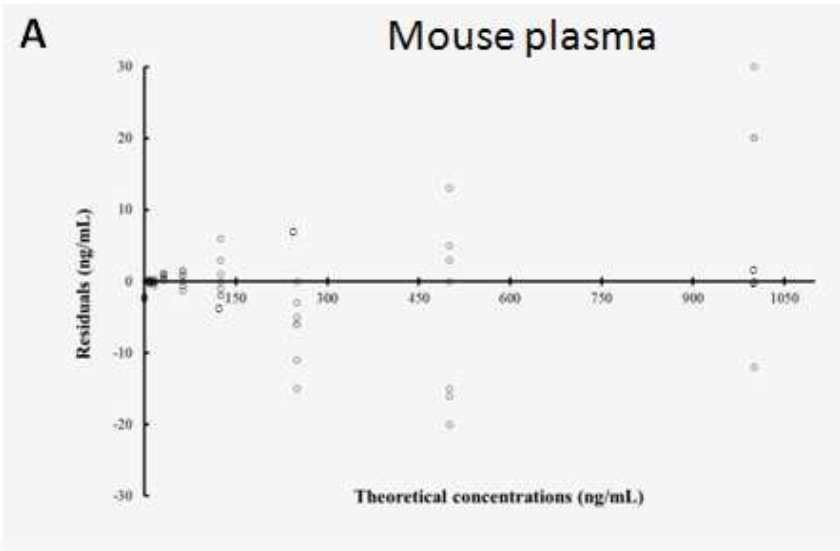
Supplemental Fig. 2. Representative MRM chromatograms of (A) blank rat plasma; (B) blank rat plasma spiked with EAPB02303 and EAPB02302 at the LLOQ and internal standard (EAPB0602) at 125 ng/mL; (C) blank rat plasma spiked EAPB02303 and EAPB02302 at 1000 ng/mL and internal standard (EAPB0602) at 125 ng/mL.

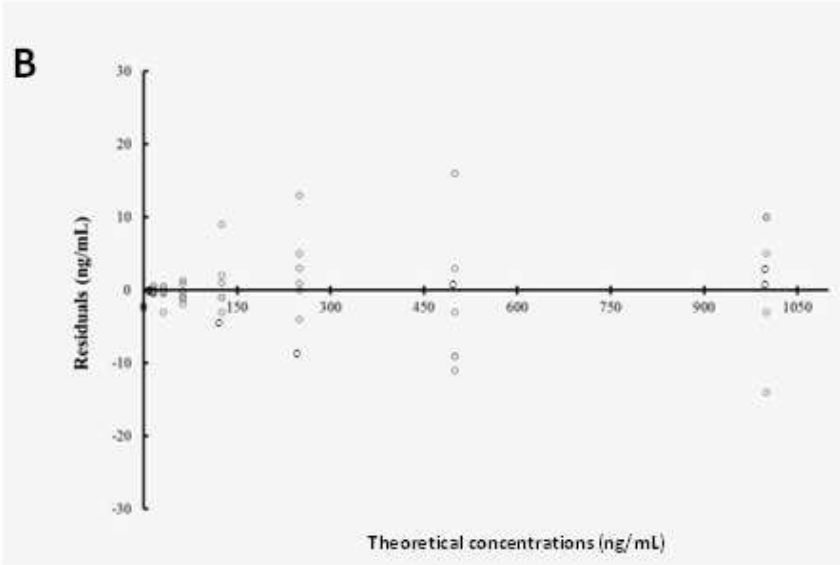


Supplemental Fig. 3. Residuals versus theoretical concentrations for EAPB02303 (A) and EAPB02302 (B) calculated concentrations, from calibration curves performed in rat plasma.









CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux de développement préclinique des Imiqualines (ou dérivés imidazo[1,2-*a*]quinoxaliniques) réalisés au sein de l'équipe « Oncopharmacochimie et pharmacotoxicologie cutanée » de l'IBMM. Ces molécules hétérocycliques de faible poids moléculaire (Figure 50) présentent des activités cytotoxiques comparables à celles des meilleurs anticancéreux actuellement sur le marché ou en développement. Les Imiqualines sont actives sur de nombreuses lignées cellulaires de cancers humains ; en particulier sur des lignées de mélanome.

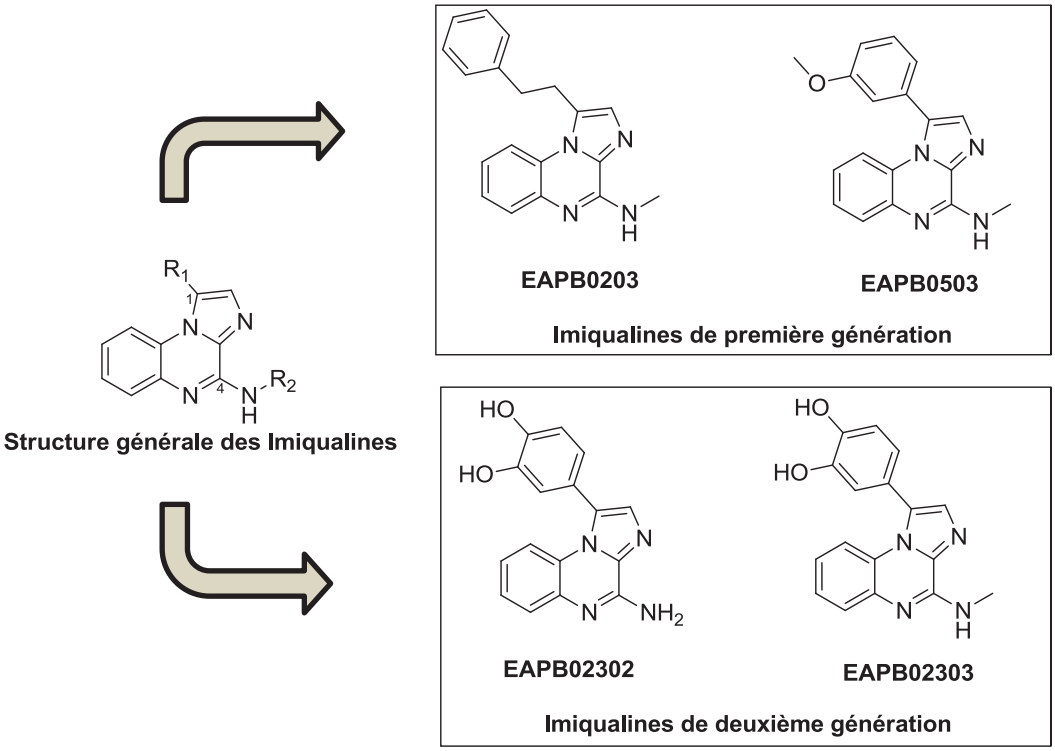


Figure 50. Structure générale des Imiqualines. Structures chimiques des composés leaders de première et deuxième génération.

Depuis une vingtaine d'année, l'incidence du mélanome cutané ne cesse d'augmenter. Lors de l'année 2017, on estime que 15 404 nouveaux patients sont atteints par cette pathologie, pour une estimation totale de 399 626 nouveaux cas de cancers [23]. La mortalité pour cette même année serait de 1 783 patients. Les modes d'expositions aux rayonnements ultra-violets, les antécédents de coups de soleil reçus (notamment pendant l'enfance) et le vieillissement de la population permettent de prédire que l'incidence du mélanome va continuer d'augmenter dans les années à venir [272]. L'arsenal thérapeutique actuellement

disponible ne permet pas toujours de soigner pleinement les patients. L'efficacité est particulièrement limitée pour les formes métastasées. De nombreuses résistances se développent avec les nouvelles molécules disponibles sur le marché. Par conséquent, la recherche de nouveaux composés présentant des modes d'action innovants est une priorité dans le domaine pharmaceutique. C'est dans ce cadre que notre projet prend tout son sens. Les résultats préliminaires de ce projet ont mis en lumière le potentiel de cette famille chimique permettant ainsi la maturation du projet *via* la SATT AxLR (Société d'Accélération du Transfert de Technologies). Ce soutien financier a favorisé une avancée majeure du projet avec la création d'un partenariat industriel. Le dépôt d'un brevet international [6] puis d'un brevet de sélection [7] a permis de protéger ces travaux.

Ma thèse s'inscrit dans le cadre du développement de ce projet. Plusieurs problématiques inhérentes au développement de nouveaux candidats médicaments ont été traitées. Tout d'abord, l'optimisation de la solubilité en milieu aqueux des composés leaders a dû être réalisée. Pour cela, nous avons développé deux stratégies distinctes. Dans un premier temps, nous avons procédé au développement d'une formulation galénique à base de nanocapsules lipidiques permettant une administration *in* vivo du composé **EAPB0503**, leader de première génération. Dans un second temps, nous avons mis en place une étude de modulation des composés de deuxième génération avec l'introduction d'un résidu acide aminé sur la position 4. Ce greffage permet d'introduire des groupements hydrophiles améliorant les propriétés physicochimiques des composés sans perte de leur activité intrinsèque. Enfin, dans un troisième temps, nous avons développé et validée une méthode de dosage des composés leaders de deuxième génération, l'**EAPB02303** et l'**EAPB02302**. Cette étape est primordiale dans le cadre du développement de nouveaux composés actifs. Une méthode de dosage validée permet d'envisager des études *in vivo* d'efficacité, de pharmacocinétique et de toxicité. Ces travaux de thèse m'ont permis d'explorer différents domaines de recherche du développement préclinique pharmaceutique.

Dans le **chapitre 1**, nous avons présenté les données actuelles sur le mélanome cutané. Après avoir rappelé les généralités concernant cette pathologie (définitions, formes cliniques, diagnostics clinique et histologique), nous avons détaillé avec plus de précision les différentes voies de signalisation impliquées (ou potentiellement impliquées) dans la genèse du mélanome cutané. Ainsi, les voies des *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), de la *Phosphatidylinositol 3-Kinase* (PI3K) et de l'Adénosine Monophosphate cyclique (AMPc) ont été particulièrement décrites. L'implication potentielle d'autres voies a également été discutée. La compréhension de ces différentes voies a connu un bond en avant ces dernières années avec la focalisation de plusieurs équipes de recherche sur cette thématique. Il apparaît évident qu'une amélioration de la compréhension des mécanismes de physiopathologie du mélanome cutanée est primordial au développement de nouveaux composés actifs sur cette pathologie. A l'heure actuelle, l'arsenal thérapeutique est composé de deux grands axes : la chirurgie et les traitements médicamenteux. L'exérèse chirurgicale constitue l'approche prioritaire de par son efficacité. Cependant, elle doit être réalisée précocement. Elle demeure inefficace en cas de forme métastatique. Dans ce cas, seule l'approche médicamenteuse est possible. On retrouve trois classes médicamenteuses : les chimiothérapies cytotoxiques, l'immunothérapie et les thérapies ciblées. Les avancées des deux dernières citées ont considérablement amélioré la prise en charge des patients. Cependant, ces thérapeutiques ont l'inconvénient d'être à l'origine de nombreuses résistances qui ne permettent pas encore de traiter efficacement tous les patients. Le développement de nouvelles molécules demeure une priorité pour pallier à cette difficulté. Ces dernières années, les avancées dans la connaissance des voies de signalisations ont été majeures et permettent d'envisager de nouveaux mécanismes d'actions innovants. La complexité des mécanismes de formation du mélanome cutané et les nombreuses connexions entre les voies de signalisation laissent à penser que l'efficacité de la prise en charge passera par la synergie d'action entre des composés ayant des mécanismes d'action différents mais complémentaires. Le développement de nouveaux composés tels que les Imiqualines pourrait permettre d'améliorer la survie des patients présentant des formes métastatiques de mélanome cutané.

Au cours du **chapitre 2**, nous avons développé la mise au point d'une formulation de nanocapsules lipidiques contenant l'**EAPB0503**, composé leader des Imiqualines de première génération. Cette étude avait pour objectif de mettre au point une formulation galénique permettant d'encapsuler l'**EAPB0503** au sein de nanocapsules lipidiques. La finalité de cette étude était d'augmenter sensiblement la solubilité apparente de l'**EAPB0503**. Ce composé possède une solubilité théorique dans l'eau à pH=7,4 de $2{,}60.10^{-3}$ mg/mL. Avec la formulation galénique développée, les concentrations des solutions en **EAPB0503** sont de 1,7 ± 0,1 mg/mL pour la formulation basse et de 8,2 mg/mL pour la formulation haute. La mise au point de ces formulations est réalisée avec un procédé simple et des composants reconnus pour leur absence de toxicité. Par ailleurs, ces solutions sont composées de particules de tailles homogènes inférieures à 200 nm (111,7 ± 0,9 nm et 116,5 nm, pour les formulations basse et haute, respectivement). La solution de formulation basse est stable sur une période de quatre semaines à des températures de 4°C, 20°C et 37°C. L'activité cytotoxique de l'**EAPB0503** n'est pas perturbée par cette encapsulation dans les nanocapsules (sur les lignées cellulaires de mélanome A375, de cancer du sein MCF7 et de cancer du côlon LS174T). Ces résultats encourageants nous permettent d'améliorer sensiblement la solubilité apparente de l'**EAPB0503** tout en conservant son efficacité. Cela nous permet d'envisager sereinement les prochaines études *in vivo*.

Dans le **chapitre 3**, nous avons abordé les composés de deuxième génération de la famille des Imiqualines. Une étude de modulation des Imiqualines de deuxième génération a permis de synthétiser une librairie de nouveaux composés greffés par un résidu acide aminé en position 4. Ce greffage a permis d'augmenter nettement les solubilités théoriques dans l'eau par rapport aux Imiqualines leaders. Les composés synthétisés ont été évalués pour leur activité cytotoxique sur la lignée de mélanome humain A375. Certains présentent des activités cytotoxiques du même ordre de grandeur que celles des Imiqualines de première génération. Cette étude nous permet également d'obtenir de nouvelles données concernant la Relation Structure-Activité des Imiqualines. La présence d'un groupement pyrocatéchol en position 1 est indispensable au maintien de l'activité cytotoxique sur la lignée cellulaire de mélanome A375. Par ailleurs, la présence d'un acide aminé en position 4 ne modifie pas significativement l'activité cytotoxique des composés.

En perspective de ces travaux, nous envisageons de tester le métabolisme *in vitro* de ces composés afin de déterminer le comportement de ces composés en présence d'enzymes du métabolisme (utilisation pour cela de lysats de microsomes hépatiques). Le clivage de l'acide aminé greffé pourrait permettre la libération de métabolites selon la réaction proposée dans la figure 44. Cette réaction pourrait libérer l'**EAPB02302** suite à une réaction de clivage par certaines enzymes telles que les peptidases. Cela pourrait permettre d'administrer, dans des études *in vivo* à venir, l'**EAPB02302** sous forme de prodrogue et ainsi s'affranchir du problème posé par la faible solubilité de ce composé.

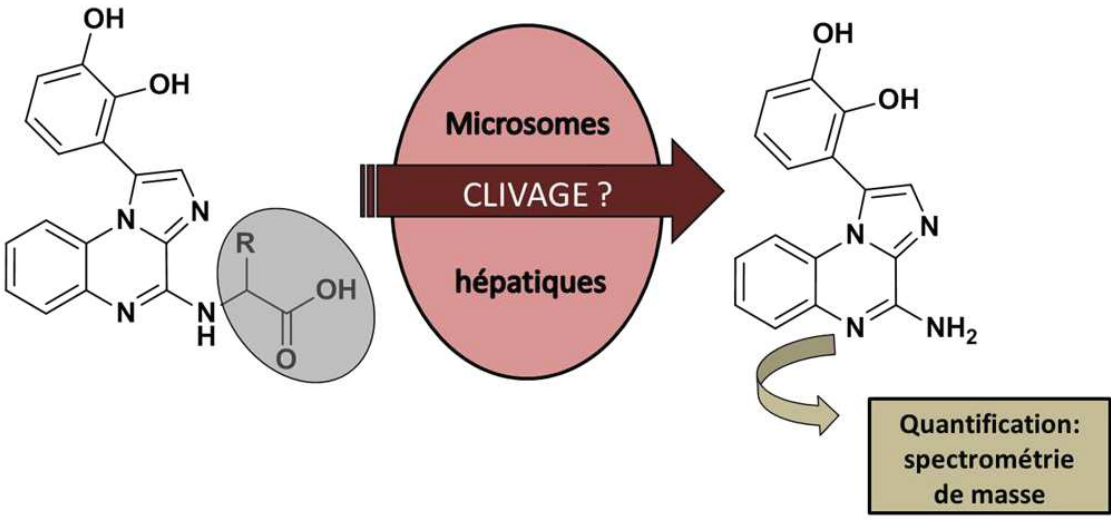


Figure 44. Perspectives d'étude des nouveaux composés synthétisés présentant un acide aminé greffé en position 4 : étude du clivage de cette fonction et dosage par LC-ESI-MS/MS du composé obtenu après clivage.

Au cours du **chapitre 4**, nous avons présenté les travaux de mise au point et de validation d'une méthode de dosage des composés leaders de deuxième génération des Imiqualines en milieu biologique. Cette méthode utilise la LC-MS/MS afin de quantifier l'**EAPB02303** et l'**EAPB02303** dans les plasmas de rat et de souris. Ainsi, il est possible de quantifier de manière simultanée les deux composés leaders des Imiqualines de deuxième génération. La spécificité de la spectrométrie de masse en tandem et l'utilisation en mode MRM a permis une analyse avec une grande sensibilité et une grande spécificité de détection. Notre démarche de validation s'est appuyée sur les critères internationaux de recommandations

pour la validation de méthode bioanalytique pour l'industrie pharmaceutique émanant de la FDA et de l'EMA.

Cette méthode a permis de déterminer les paramètres pharmacocinétiques de l'**EAPB02303** chez la souris suite à une administration unique par voie intrapéritonéale. L'utilisation à venir de cette méthode de dosage lors des études d'efficacité *in vivo* chez la souris sera particulièrement utile.

Ces travaux ont été valorisés par deux publications au sein de revues internationales, ainsi qu'une publication en cours de soumission. Par ailleurs, ces travaux ont été présentés à différents congrès nationaux et internationaux sous forme de posters dont un a reçu le prix de la Société de Chimie Thérapeutique.

Plusieurs études vont être développées sur l'**EAPB02303**. Nous envisageons de déterminer dans un premier temps la liaison de ce composé aux protéines plasmatiques. Cette étude est primordiale pour la mise en place d'études d'efficacité. *In vivo*, les composés ont la possibilité de s'associer aux protéines plasmatiques pour former des complexes. Sous cette forme, les composés ne peuvent plus interagir avec leur cible biologique et se trouve alors sous forme inactive. Il est essentiel de déterminer les pourcentages de composé susceptibles de se trouver sous les formes liée et libre.

Les connaissances acquises sur les propriétés pharmacocinétiques de l'**EAPB02303** vont permettre d'optimiser les protocoles d'administration pour les études *in vivo* d'efficacité. Les schémas d'administration vont être calculés par rapport à la demi-vie d'élimination du composé afin de maintenir une concentration minimale entre les prises. Cela va permettre de maximiser les effets biologiques de l'**EAPB02303** et donc de favoriser l'efficacité de la molécule par rapport aux composés qui seront pris comme référence dans les études.

L'amélioration des paramètres de pharmacocinétique devrait permettre d'augmenter la biodisponibilité. Elle pourrait également permettre de favoriser par exemple le passage de la barrière hémato-encéphalique. Ceci serait particulièrement intéressant pour le traitement des métastases avec localisation au sein du système nerveux central.

Par ailleurs, il est indispensable de déterminer la (ou les) cibles(s) de l'**EAPB02303** afin d'élucider le mécanisme d'action. Dans le cadre du développement d'un médicament, la connaissance du mécanisme est nécessaire pour entre autre anticiper les effets indésirables potentiels. Cette identification est en cours notamment à l'aide d'études de biologie chimique (chromatographie d'affinité). Lorsque la cible sera déterminée, nous pourrons entrevoir la mise en place d'études d'efficacité en associant l'**EAPB02303** avec une (ou des) molécule(s) active(s) sur le mélanome métastasé possédant un (ou des) mécanisme(s) d'action différent(s) mais complémentaire(s) dans le but de provoquer une synergie d'action.

Ce travail de thèse a permis de répondre à différentes problématiques du projet global de développement des Imiqualines en tant que molécules anticancéreuses potentielles. Un long travail reste encore à réaliser pour espérer obtenir des molécules exploitables en clinique, et notamment l'élucidation complète du mécanisme d'action de ces molécules. J'espère avoir contribué à l'avancée de ce projet qui devait se poursuivre et se développer encore grâce à l'implication de l'équipe de recherche, aussi bien en chimie qu'en biologie, au soutien de la SATT AxLR et au développement d'un partenariat industriel.

BIBLIOGRAPHIE

[1] R.F. de Menezes, A. Bergmann, L.C.S. Thuler, Alcohol consumption and risk of cancer: a systematic literature review, Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP. 14 (2013) 4965–4972.

[2] R. Gordon, Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors, Semin. Oncol. Nurs. 29 (2013) 160–169. doi:10.1016/j.soncn.2013.06.002.

[3] INCA - Les cancers en France. Rapport décembre 2017., (n.d.). http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/ (accessed July 10, 2018).

[4] Les cancers en France en 2016 : l'essentiel des faits et chiffres - Actualités | Institut National Du Cancer, (n.d.). http://www.e-cancer.fr/Actualites-et-evenements/Actualites/Les-cancers-en-France-en-2016-l-essentiel-des-faits-et-chiffres (accessed March 26, 2018).

[5] Anticancéreux : Les points essentiels, (n.d.). https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/anticancereux-les-points-essentiels (accessed March 26, 2018).

[6] C. Deleuze-Masquefa, G. Moarbess, P.-A. Bonnet, F. Pinguet, A. Bazarbachi, F. Bressolle, Imidazo[1,2-a]quinoxalines and derivatives for the treatment of cancers. Patent WO2009043934 A1, 2009.

[7] P. Cuq, C. Deleuze-Masquefa, P.-A. Bonnet, C. Patinote, New imidazo[1,2-a]quinoxalines and derivatives for the treatment of cancers. Patent WO2016107895 A1, 2016.

[8] La peau : Système tégumentaire, Enseign. Cours Profs Pour Enseign. Parents. (n.d.). http://www.enseignons.be/preparations/peau-systeme-tegumentaire/ (accessed July 10, 2018).

[9] M. Rinnerthaler, M.K. Streubel, J. Bischof, K. Richter, Skin aging, gene expression and calcium, Exp. Gerontol. 68 (2015) 59–65. doi:10.1016/j.exger.2014.09.015.

[10] J.Y. Lin, D.E. Fisher, Melanocyte biology and skin pigmentation, Nature. 445 (2007) 843–850. doi:10.1038/nature05660.

[11] W.H. Tolleson, Human melanocyte biology, toxicology, and pathology, J. Environ. Sci. Health Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 23 (2005) 105–161. doi:10.1080/10590500500234970.

[12] S. López, S. Alonso, A. García de Galdeano, I. Smith-Zubiaga, Melanocytes from dark and light skin respond differently after ultraviolet B irradiation: effect of keratinocyte-conditioned medium, Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 31 (2015) 149–158. doi:10.1111/phpp.12169.

[13] J.A. Lo, D.E. Fisher, The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics, Science. 346 (2014) 945–949. doi:10.1126/science.1253735.

[14] B. Owens, Melanoma, Nature. 515 (2014) S109. doi:10.1038/515S109a.

[15] J.E. Russak, D.S. Rigel, Risk factors for the development of primary cutaneous melanoma, Dermatol. Clin. 30 (2012) 363–368. doi:10.1016/j.det.2012.05.002.

[16] S.C. Azoury, J.R. Lange, Epidemiology, risk factors, prevention, and early detection of melanoma, Surg. Clin. North Am. 94 (2014) 945–962, vii. doi:10.1016/j.suc.2014.07.013.

[17] K. Vuong, K. McGeechan, B.K. Armstrong, AMFS Investigators, GEM Investigators, A.E. Cust, Occupational sun exposure and risk of melanoma according to anatomical site, Int. J. Cancer. 134 (2014) 2735–2741. doi:10.1002/ijc.28603.

[18] ald_30_guide_melanome_web.pdf, (n.d.). https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-03/ald_30_guide_melanome_web.pdf (accessed January 16, 2018).

[19] G. Palmieri, M. Capone, M.L. Ascierto, G. Gentilcore, D.F. Stroncek, M. Casula, M.C. Sini, M. Palla, N. Mozzillo, P.A. Ascierto, Main roads to melanoma, J. Transl. Med. 7 (2009) 86. doi:10.1186/1479-5876-7-86.

[20] M.C. Sini, V. Doneddu, P. Paliogiannis, M. Casula, M. Colombino, A. Manca, G. Botti, P.A. Ascierto, A. Lissia, A. Cossu, G. Palmieri, Genetic alterations in main candidate genes during melanoma progression, Oncotarget. 9 (2018) 8531–8541. doi:10.18632/oncotarget.23989.
[21] J.E. Gershenwald, G.P. Guy, Stemming the Rising Incidence of Melanoma: Calling Prevention to Action, J. Natl. Cancer Inst. 108 (2016). doi:10.1093/jnci/djv381.
[22] S. Ribero, D. Glass, V. Bataille, Genetic epidemiology of melanoma, Eur. J. Dermatol. EJD. 26 (2016) 335–339. doi:10.1684/ejd.2016.2787.
[23] F. Binder-Foucard, N. Bossard, P. Delafosse, A. Belot, A.-S. Woronoff, L. Remontet, French network of cancer registries (Francim), Cancer incidence and mortality in France over the 1980-2012 period: solid tumors, Rev. Epidemiol. Sante Publique. 62 (2014) 95–108. doi:10.1016/j.respe.2013.11.073.
[24] Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2017 / 2018 / Maladies chroniques et traumatismes / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil, (n.d.). http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2018/Projection-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-en-2017 (accessed March 26, 2018).
[25] Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2013 - Partie 1 : tumeurs solides / 2016 / Maladies chroniques et traumatismes / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil, (n.d.). http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2016/Survie-des-personnes-atteintes-de-cancer-en-France-metropolitaine-1989-2013-Partie-1-tumeurs-solides (accessed March 26, 2018).
[26] Cancer Statistics Review, 1975-2012 - Previous Version - SEER Cancer Statistics Review, (n.d.). https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2012/ (accessed February 14, 2018).
[27] Cancer Facts & Figures 2018 | American Cancer Society, (n.d.). https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2018.html (accessed March 26, 2018).
[28] cancer-facts-and-figures-2018.pdf, (n.d.). https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf (accessed February 13, 2018).
[29] S. Menzies, R. Barry, P. Ormond, Multiple primary melanoma: a single centre retrospective review, Melanoma Res. 27 (2017) 638–640. doi:10.1097/CMR.0000000000000395.
[30] M. Baccard, O. Verola, [Dubreuilh melanoma], Ann. Dermatol. Venereol. 136 (2009) 749–751. doi:10.1016/j.annder.2008.09.029.
[31] M. González, G. Tchernev, A. Atanasova-Chokoeva, K. França, T. Lotti, Multiple Primary Acral Lentiginous Melanomas (MPALM), Open Access Maced. J. Med. Sci. 5 (2017) 805–806. doi:10.3889/oamjms.2017.162.
[32] G. Richtig, E. Richtig, C. Massone, R. Hofmann-Wellenhof, Analysis of clinical, dermoscopic and histopathological features of primary melanomas of patients with metastatic disease--a retrospective study at the Department of Dermatology, Medical University of Graz, 2000-2010, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV. 28 (2014) 1776–1781. doi:10.1111/jdv.12413.
[33] E. Crocetti, P. Carli, Only superficial spreading melanoma is causing the melanoma epidemics?, Eur. J. Epidemiol. 19 (2004) 91–92.
[34] K.J. Wernli, N.B. Henrikson, C.C. Morrison, M. Nguyen, G. Pocobelli, P.R. Blasi, Screening for Skin Cancer in Adults: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force, JAMA. 316 (2016) 436–447. doi:10.1001/jama.2016.5415.
[35] Melanoma Pictures, Tenderness.Co. (n.d.). http://tenderness.co/melanoma-pictures/ (accessed July 10, 2018).
[36] C.M. Balch, J.E. Gershenwald, S.-J. Soong, J.F. Thompson, M.B. Atkins, D.R. Byrd, A.C. Buzaid, A.J. Cochran, D.G. Coit, S. Ding, A.M. Eggermont, K.T. Flaherty, P.A. Gimotty, J.M. Kirkwood, K.M. McMasters, M.C. Mihm, D.L. Morton, M.I. Ross, A.J. Sober, V.K. Sondak, Final version of

2009 AJCC melanoma staging and classification, J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 27 (2009) 6199–6206. doi:10.1200/JCO.2009.23.4799.
[37] D. Skin, A. Clinic, Melanoma, Dr Kenton Busch. (2014). http://dyersburgskinandallergyclinic.com/?p=311 (accessed March 26, 2018).
[38] 17959.pdf, (n.d.). http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/17959.pdf (accessed January 22, 2018).
[39] S. Mourah, C. Lebbé, Altérations moléculaires dans les mélanomes et thérapies ciblées, Bull. Cancer (Paris). 101 (2014) S5–S11. doi:10.1684/bdc.2014.2055.
[40] K.G. Chen, J.C. Valencia, B. Lai, G. Zhang, J.K. Paterson, F. Rouzaud, W. Berens, S.M. Wincovitch, S.H. Garfield, R.D. Leapman, V.J. Hearing, M.M. Gottesman, Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103 (2006) 9903–9907. doi:10.1073/pnas.0600213103.
[41] M.L. Hartman, B. Talar, A. Gajos-Michniewicz, M. Czyz, MCL-1, BCL-XL and MITF Are Diversely Employed in Adaptive Response of Melanoma Cells to Changes in Microenvironment, PloS One. 10 (2015) e0128796. doi:10.1371/journal.pone.0128796.
[42] L.F. Fecker, C.C. Geilen, G. Tchernev, U. Trefzer, C. Assaf, B.M. Kurbanov, C. Schwarz, P.T. Daniel, J. Eberle, Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis, J. Invest. Dermatol. 126 (2006) 1366–1371. doi:10.1038/sj.jid.5700192.
[43] L. Zhuang, C.S. Lee, R.A. Scolyer, S.W. McCarthy, X.D. Zhang, J.F. Thompson, P. Hersey, Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma, Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc. 20 (2007) 416–426. doi:10.1038/modpathol.3800750.
[44] J.A. Curtin, K. Busam, D. Pinkel, B.C. Bastian, Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma, J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 24 (2006) 4340–4346. doi:10.1200/JCO.2006.06.2984.
[45] G.S. Inamdar, S.V. Madhunapantula, G.P. Robertson, Targeting the MAPK pathway in melanoma: why some approaches succeed and other fail, Biochem. Pharmacol. 80 (2010) 624–637. doi:10.1016/j.bcp.2010.04.029.
[46] H. Davies, G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M.J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B.A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G.J. Riggins, D.D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J.W.C. Ho, S.Y. Leung, S.T. Yuen, B.L. Weber, H.F. Seigler, T.L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C.J. Marshall, R. Wooster, M.R. Stratton, P.A. Futreal, Mutations of the BRAF gene in human cancer, Nature. 417 (2002) 949–954. doi:10.1038/nature00766.
[47] J.M. Stahl, A. Sharma, M. Cheung, M. Zimmerman, J.Q. Cheng, M.W. Bosenberg, M. Kester, L. Sandirasegarane, G.P. Robertson, Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma, Cancer Res. 64 (2004) 7002–7010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1399.
[48] L.A. Garraway, H.R. Widlund, M.A. Rubin, G. Getz, A.J. Berger, S. Ramaswamy, R. Beroukhim, D.A. Milner, S.R. Granter, J. Du, C. Lee, S.N. Wagner, C. Li, T.R. Golub, D.L. Rimm, M.L. Meyerson, D.E. Fisher, W.R. Sellers, Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma, Nature. 436 (2005) 117–122. doi:10.1038/nature03664.
[49] E.R. Sauter, U.-C. Yeo, A. von Stemm, W. Zhu, S. Litwin, D.S. Tichansky, G. Pistritto, M. Nesbit, D. Pinkel, M. Herlyn, B.C. Bastian, Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma, Cancer Res. 62 (2002) 3200–3206.
[50] A. Birck, V. Ahrenkiel, J. Zeuthen, K. Hou-Jensen, P. Guldberg, Mutation and allelic loss of the PTEN/MMAC1 gene in primary and metastatic melanoma biopsies, J. Invest. Dermatol. 114 (2000) 277–280. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00877.x.

[51] N.E. Sharpless, L. Chin, The *INK4a/ARF* locus and melanoma, Oncogene. 22 (2003) 3092–3098. doi:10.1038/sj.onc.1206461.
[52] O. Straume, L.A. Akslen, Alterations and prognostic significance of p16 and p53 protein expression in subgroups of cutaneous melanoma, Int. J. Cancer. 74 (1997) 535–539. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19971021)74:5<535::AID-IJC10>3.0.CO;2-5.
[53] M.S. Soengas, P. Capodieci, D. Polsky, J. Mora, M. Esteller, X. Opitz-Araya, R. McCombie, J.G. Herman, W.L. Gerald, Y.A. Lazebnik, C. Cordón-Cardó, S.W. Lowe, Inactivation of the apoptosis effector *Apaf-1* in malignant melanoma, Nature. 409 (2001) 207–211. doi:10.1038/35051606.
[54] V. Gray-Schopfer, C. Wellbrock, R. Marais, Melanoma biology and new targeted therapy, Nature. (2007). doi:10.1038/nature05661.
[55] R. Halaban, The regulation of normal melanocyte proliferation, Pigment Cell Res. 13 (2000) 4–14.
[56] R.J. Sullivan, K. Flaherty, MAP kinase signaling and inhibition in melanoma, Oncogene. 32 (2013) 2373–2379. doi:10.1038/onc.2012.345.
[57] A.S. Dhillon, S. Hagan, O. Rath, W. Kolch, MAP kinase signalling pathways in cancer, Oncogene. 26 (2007) 3279–3290. doi:10.1038/sj.onc.1210421.
[58] P. Wee, Z. Wang, Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways, Cancers. 9 (2017). doi:10.3390/cancers9050052.
[59] M.M. McKay, D.K. Morrison, Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK, Oncogene. 26 (2007) 3113–3121. doi:10.1038/sj.onc.1210394.
[60] S. Schubbert, K. Shannon, G. Bollag, Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer, Nat. Rev. Cancer. 7 (2007) 295–308. doi:10.1038/nrc2109.
[61] M. Malumbres, M. Barbacid, RAS oncogenes: the first 30 years, Nat. Rev. Cancer. 3 (2003) 459–465. doi:10.1038/nrc1097.
[62] C. Wellbrock, M. Karasarides, R. Marais, The RAF proteins take centre stage, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5 (2004) 875–885. doi:10.1038/nrm1498.
[63] Y. Sun, W.-Z. Liu, T. Liu, X. Feng, N. Yang, H.-F. Zhou, Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis, J. Recept. Signal Transduct. Res. 35 (2015) 600–604. doi:10.3109/10799893.2015.1030412.
[64] M.J. Garnett, R. Marais, Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene, Cancer Cell. 6 (2004) 313–319. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.022.
[65] M. Karasarides, A. Chiloeches, R. Hayward, D. Niculescu-Duvaz, I. Scanlon, F. Friedlos, L. Ogilvie, D. Hedley, J. Martin, C.J. Marshall, C.J. Springer, R. Marais, B-RAF is a therapeutic target in melanoma, Oncogene. 23 (2004) 6292–6298. doi:10.1038/sj.onc.1207785.
[66] S.R. Hingorani, M.A. Jacobetz, G.P. Robertson, M. Herlyn, D.A. Tuveson, Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation, Cancer Res. 63 (2003) 5198–5202.
[67] R. Ciampi, Y.E. Nikiforov, Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors, Endocr. Pathol. 16 (2005) 163–172.
[68] A. Sharma, N.R. Trivedi, M.A. Zimmerman, D.A. Tuveson, C.D. Smith, G.P. Robertson, Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors, Cancer Res. 65 (2005) 2412–2421. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2423.
[69] P. Tschandl, A.S. Berghoff, M. Preusser, S. Burgstaller-Muehlbacher, H. Pehamberger, I. Okamoto, H. Kittler, NRAS and BRAF mutations in melanoma-associated nevi and uninvolved nevi, PloS One. 8 (2013) e69639. doi:10.1371/journal.pone.0069639.
[70] I. Yeh, A. von Deimling, B.C. Bastian, Clonal BRAF mutations in melanocytic nevi and initiating role of BRAF in melanocytic neoplasia, J. Natl. Cancer Inst. 105 (2013) 917–919. doi:10.1093/jnci/djt119.
[71] J. Liu, M. Fukunaga-Kalabis, L. Li, M. Herlyn, Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma, Arch. Biochem. Biophys. 563 (2014) 13–21. doi:10.1016/j.abb.2014.07.023.

[72] E. Pérez-Guijarro, C.-P. Day, G. Merlino, M.R. Zaidi, Genetically engineered mouse models of melanoma, Cancer. 123 (2017) 2089–2103. doi:10.1002/cncr.30684.
[73] W. Zhang, L. Yin, G. Song, X. Han, Z. Yin, D. Luo, LKB1 loss cooperating with BRAF V600E promotes melanoma cell invasion and migration by up-regulation MMP-2 via PI3K/Akt/mTOR pathway, Oncotarget. 8 (2017) 113847–113857. doi:10.18632/oncotarget.22943.
[74] D.P. Brazil, J. Park, B.A. Hemmings, PKB binding proteins. Getting in on the Akt, Cell. 111 (2002) 293–303.
[75] B.D. Manning, L.C. Cantley, AKT/PKB signaling: navigating downstream, Cell. 129 (2007) 1261–1274. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009.
[76] F. McCormick, Cancer: survival pathways meet their end, Nature. 428 (2004) 267–269. doi:10.1038/428267a.
[77] H. Cheng, M. Walls, S.M. Baxi, M.-J. Yin, Targeting the mTOR pathway in tumor malignancy, Curr. Cancer Drug Targets. 13 (2013) 267–277.
[78] H. Pópulo, J.M. Lopes, P. Soares, The mTOR signalling pathway in human cancer, Int. J. Mol. Sci. 13 (2012) 1886–1918. doi:10.3390/ijms13021886.
[79] L. Simpson, R. Parsons, PTEN: life as a tumor suppressor, Exp. Cell Res. 264 (2001) 29–41. doi:10.1006/excr.2000.5130.
[80] J.C. García-Borrón, Z. Abdel-Malek, C. Jiménez-Cervantes, MC1R, the cAMP pathway, and the response to solar UV: extending the horizon beyond pigmentation, Pigment Cell Melanoma Res. 27 (2014) 699–720. doi:10.1111/pcmr.12257.
[81] C.I. Rodríguez, V. Setaluri, Cyclic AMP (cAMP) signaling in melanocytes and melanoma, Arch. Biochem. Biophys. 563 (2014) 22–27. doi:10.1016/j.abb.2014.07.003.
[82] M.L. Hartman, M. Czyz, MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity, Cell. Mol. Life Sci. CMLS. 72 (2015) 1249–1260. doi:10.1007/s00018-014-1791-0.
[83] C. Levy, M. Khaled, D.E. Fisher, MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene, Trends Mol. Med. 12 (2006) 406–414. doi:10.1016/j.molmed.2006.07.008.
[84] E. Pasquali, J.C. García-Borrón, M.C. Fargnoli, S. Gandini, P. Maisonneuve, V. Bagnardi, C. Specchia, F. Liu, M. Kayser, T. Nijsten, E. Nagore, R. Kumar, J. Hansson, P.A. Kanetsky, P. Ghiorzo, T. Debniak, W. Branicki, N.A. Gruis, J. Han, T. Dwyer, L. Blizzard, M.T. Landi, G. Palmieri, G. Ribas, A. Stratigos, M.L. Council, P. Autier, J. Little, J. Newton-Bishop, F. Sera, S. Raimondi, M-SKIP Study Group, MC1R variants increased the risk of sporadic cutaneous melanoma in darker-pigmented Caucasians: a pooled-analysis from the M-SKIP project, Int. J. Cancer. 136 (2015) 618–631. doi:10.1002/ijc.29018.
[85] L. Larue, V. Delmas, The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma, Front. Biosci. J. Virtual Libr. 11 (2006) 733–742.
[86] B. Bellei, A. Pitisci, C. Catricalà, L. Larue, M. Picardo, Wnt/β-catenin signaling is stimulated by α-melanocyte-stimulating hormone in melanoma and melanocyte cells: implication in cell differentiation, Pigment Cell Melanoma Res. 24 (2011) 309–325. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00800.x.
[87] L. Larue, F. Luciani, M. Kumasaka, D. Champeval, N. Demirkan, J. Bonaventure, V. Delmas, Bypassing melanocyte senescence by beta-catenin: a novel way to promote melanoma, Pathol. Biol. (Paris). 57 (2009) 543–547. doi:10.1016/j.patbio.2008.11.003.
[88] L. Demkova, L. Kucerova, Role of the HGF/c-MET tyrosine kinase inhibitors in metastasic melanoma, Mol. Cancer. 17 (2018) 26. doi:10.1186/s12943-018-0795-z.
[89] R. Barrow-McGee, S. Kermorgant, Met endosomal signalling: in the right place, at the right time, Int. J. Biochem. Cell Biol. 49 (2014) 69–74. doi:10.1016/j.biocel.2014.01.009.
[90] I. Garajová, E. Giovannetti, G. Biasco, G.J. Peters, c-Met as a Target for Personalized Therapy, Transl. Oncogenomics. 7 (2015) 13–31. doi:10.4137/TOG.S30534.
[91] K.E. Sheppard, G.A. McArthur, The Cell-Cycle Regulator CDK4: An Emerging Therapeutic Target in Melanoma, Clin. Cancer Res. 19 (2013) 5320–5328. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0259.

[92] M. Potrony, C. Badenas, P. Aguilera, J.A. Puig-Butille, C. Carrera, J. Malvehy, S. Puig, Update in genetic susceptibility in melanoma, Ann. Transl. Med. 3 (2015) 210. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.08.11.
[93] S.M. Levine, R.L. Shapiro, Surgical treatment of malignant melanoma: practical guidelines, Dermatol. Clin. 30 (2012) 487–501. doi:10.1016/j.det.2012.04.009.
[94] M.J. Sladden, O.E. Nieweg, J. Howle, B.J. Coventry, J.F. Thompson, Updated evidence-based clinical practice guidelines for the diagnosis and management of melanoma: definitive excision margins for primary cutaneous melanoma, Med. J. Aust. 208 (2018) 137–142.
[95] G.P. Lawton, S. Ariyan, Regional lymph node dissections in malignant melanoma, Clin. Plast. Surg. 27 (2000) 431–440, ix.
[96] E. Colomba, Z. Hélias-Rodzewicz, A. Von Deimling, C. Marin, N. Terrones, D. Pechaud, S. Surel, J.-F. Côté, F. Peschaud, D. Capper, H. Blons, U. Zimmermann, T. Clerici, P. Saiag, J.-F. Emile, Detection of BRAF p.V600E mutations in melanomas: comparison of four methods argues for sequential use of immunohistochemistry and pyrosequencing, J. Mol. Diagn. JMD. 15 (2013) 94–100. doi:10.1016/j.jmoldx.2012.09.001.
[97] Patients atteints de mélanome de stade III inopérable ou de stade IV / Société française de dermatologie, septembre 2017., n.d.
[98] G. Matthijs, E. Souche, M. Alders, A. Corveleyn, S. Eck, I. Feenstra, V. Race, E. Sistermans, M. Sturm, M. Weiss, H. Yntema, E. Bakker, H. Scheffer, P. Bauer, Guidelines for diagnostic next-generation sequencing, Eur. J. Hum. Genet. EJHG. 24 (2016) 1515. doi:10.1038/ejhg.2016.63.
[99] C.E. Cottrell, H. Al-Kateb, A.J. Bredemeyer, E.J. Duncavage, D.H. Spencer, H.J. Abel, C.M. Lockwood, I.S. Hagemann, S.M. O'Guin, L.C. Burcea, C.S. Sawyer, D.M. Oschwald, J.L. Stratman, D.A. Sher, M.R. Johnson, J.T. Brown, P.F. Cliften, B. George, L.D. McIntosh, S. Shrivastava, T.T. Nguyen, J.E. Payton, M.A. Watson, S.D. Crosby, R.D. Head, R.D. Mitra, R. Nagarajan, S. Kulkarni, K. Seibert, H.W. Virgin, J. Milbrandt, J.D. Pfeifer, Validation of a next-generation sequencing assay for clinical molecular oncology, J. Mol. Diagn. JMD. 16 (2014) 89–105. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.10.002.
[100] Plateformes de génétique moléculaire : missions et localisation - Les plateformes de génétique moléculaire des cancers | Institut National Du Cancer, (n.d.). http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-therapies-ciblees/Les-plateformes-de-genetique-moleculaire-des-cancers/Missions-et-localisation-des-plateformes (accessed April 20, 2018).
[101] B. Guillot, S. Dalac, M.G. Denis, A. Dupuy, J.F. Emile, A. De La Fouchardiere, E. Hindie, T. Jouary, N. Lassau, X. Mirabel, S. Piperno Neumann, S. De Raucourt, R. Vanwijck, French updated recommendations in Stage I to III melanoma treatment and management, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV. 31 (2017) 594–602. doi:10.1111/jdv.14064.
[102] C. Garbe, K. Peris, A. Hauschild, P. Saiag, M. Middleton, L. Bastholt, J.-J. Grob, J. Malvehy, J. Newton-Bishop, A.J. Stratigos, H. Pehamberger, A.M. Eggermont, European Dermatology Forum (EDF), European Association of Dermato-Oncology (EADO), European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC), Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016, Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990. 63 (2016) 201–217. doi:10.1016/j.ejca.2016.05.005.
[103] I.A. Cree, Diagnostic RAS mutation analysis by polymerase chain reaction (PCR), Biomol. Detect. Quantif. 8 (2016) 29–32. doi:10.1016/j.bdq.2016.05.001.
[104] G. Ponti, M. Manfredini, S. Greco, G. Pellacani, R. Depenni, A. Tomasi, M. Maccaferri, S. Cascinu, BRAF, NRAS and C-KIT. Advanced Melanoma: Clinico-pathological Features, Targeted-Therapy Strategies and Survival, Anticancer Res. 37 (2017) 7043–7048. doi:10.21873/anticanres.12175.
[105] G. Graziani, L. Tentori, P. Navarra, Ipilimumab: a novel immunostimulatory monoclonal antibody for the treatment of cancer, Pharmacol. Res. 65 (2012) 9–22. doi:10.1016/j.phrs.2011.09.002.
[106] M. Vétizou, J.M. Pitt, R. Daillère, P. Lepage, N. Waldschmitt, C. Flament, S. Rusakiewicz, B. Routy, M.P. Roberti, C.P.M. Duong, V. Poirier-Colame, A. Roux, S. Becharef, S. Formenti, E.

Golden, S. Cording, G. Eberl, A. Schlitzer, F. Ginhoux, S. Mani, T. Yamazaki, N. Jacquelot, D.P. Enot, M. Bérard, J. Nigou, P. Opolon, A. Eggermont, P.-L. Woerther, E. Chachaty, N. Chaput, C. Robert, C. Mateus, G. Kroemer, D. Raoult, I.G. Boneca, F. Carbonnel, M. Chamaillard, L. Zitvogel, Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota, Science. 350 (2015) 1079–1084. doi:10.1126/science.aad1329.

[107] R. Marconcini, F. Spagnolo, L.S. Stucci, S. Ribero, E. Marra, F.D. Rosa, V. Picasso, L.D. Guardo, C. Cimminiello, S. Cavalieri, L. Orgiano, E. Tanda, L. Spano, A. Falcone, P.Q. for the I.M. Intergroup (IMI), R. Marconcini, F. Spagnolo, L.S. Stucci, S. Ribero, E. Marra, F. De Rosa, V. Picasso, L. Di Guardo, C. Cimminiello, S. Cavalieri, L. Orgiano, E. Tanda, L. Spano, A. Falcone, P.Q. for the I. Melanoma Intergroup (IMI), Current status and perspectives in immunotherapy for metastatic melanoma, Oncotarget. 9 (2017) 12452–12470. doi:10.18632/oncotarget.23746.

[108] T.H. Borch, M. Donia, M.H. Andersen, I.M. Svane, Reorienting the immune system in the treatment of cancer by using anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies, Drug Discov. Today. 20 (2015) 1127–1134. doi:10.1016/j.drudis.2015.07.003.

[109] K.K. Tsai, I. Zarzoso, A.I. Daud, PD-1 and PD-L1 antibodies for melanoma, Hum. Vaccines Immunother. 10 (2014) 3111–3116. doi:10.4161/21645515.2014.983409.

[110] C. Robert, J. Schachter, G.V. Long, A. Arance, J.J. Grob, L. Mortier, A. Daud, M.S. Carlino, C. McNeil, M. Lotem, J. Larkin, P. Lorigan, B. Neyns, C.U. Blank, O. Hamid, C. Mateus, R. Shapira-Frommer, M. Kosh, H. Zhou, N. Ibrahim, S. Ebbinghaus, A. Ribas, KEYNOTE-006 investigators, Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma, N. Engl. J. Med. 372 (2015) 2521–2532. doi:10.1056/NEJMoa1503093.

[111] C. Robert, G.V. Long, B. Brady, C. Dutriaux, M. Maio, L. Mortier, J.C. Hassel, P. Rutkowski, C. McNeil, E. Kalinka-Warzocha, K.J. Savage, M.M. Hernberg, C. Lebbé, J. Charles, C. Mihalcioiu, V. Chiarion-Sileni, C. Mauch, F. Cognetti, A. Arance, H. Schmidt, D. Schadendorf, H. Gogas, L. Lundgren-Eriksson, C. Horak, B. Sharkey, I.M. Waxman, V. Atkinson, P.A. Ascierto, Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation, N. Engl. J. Med. 372 (2015) 320–330. doi:10.1056/NEJMoa1412082.

[112] J. Larkin, C.D. Lao, W.J. Urba, D.F. McDermott, C. Horak, J. Jiang, J.D. Wolchok, Efficacy and Safety of Nivolumab in Patients With BRAF V600 Mutant and BRAF Wild-Type Advanced Melanoma: A Pooled Analysis of 4 Clinical Trials, JAMA Oncol. 1 (2015) 433–440. doi:10.1001/jamaoncol.2015.1184.

[113] A. Ribas, I. Puzanov, R. Dummer, D. Schadendorf, O. Hamid, C. Robert, F.S. Hodi, J. Schachter, A.C. Pavlick, K.D. Lewis, L.D. Cranmer, C.U. Blank, S.J. O'Day, P.A. Ascierto, A.K.S. Salama, K.A. Margolin, C. Loquai, T.K. Eigentler, T.C. Gangadhar, M.S. Carlino, S.S. Agarwala, S.J. Moschos, J.A. Sosman, S.M. Goldinger, R. Shapira-Frommer, R. Gonzalez, J.M. Kirkwood, J.D. Wolchok, A. Eggermont, X.N. Li, W. Zhou, A.M. Zernhelt, J. Lis, S. Ebbinghaus, S.P. Kang, A. Daud, Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial, Lancet Oncol. 16 (2015) 908–918. doi:10.1016/S1470-2045(15)00083-2.

[114] M.A. Postow, J. Chesney, A.C. Pavlick, C. Robert, K. Grossmann, D. McDermott, G.P. Linette, N. Meyer, J.K. Giguere, S.S. Agarwala, M. Shaheen, M.S. Ernstoff, D. Minor, A.K. Salama, M. Taylor, P.A. Ott, L.M. Rollin, C. Horak, P. Gagnier, J.D. Wolchok, F.S. Hodi, Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma, N. Engl. J. Med. 372 (2015) 2006–2017. doi:10.1056/NEJMoa1414428.

[115] J.D. Wolchok, V. Chiarion-Sileni, R. Gonzalez, P. Rutkowski, J.-J. Grob, C.L. Cowey, C.D. Lao, J. Wagstaff, D. Schadendorf, P.F. Ferrucci, M. Smylie, R. Dummer, A. Hill, D. Hogg, J. Haanen, M.S. Carlino, O. Bechter, M. Maio, I. Marquez-Rodas, M. Guidoboni, G. McArthur, C. Lebbé, P.A. Ascierto, G.V. Long, J. Cebon, J. Sosman, M.A. Postow, M.K. Callahan, D. Walker, L. Rollin, R. Bhore, F.S. Hodi, J. Larkin, Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma, N. Engl. J. Med. 377 (2017) 1345–1356. doi:10.1056/NEJMoa1709684.

[116] FDA Approved Drugs for Melanoma, AIM Melanoma. (n.d.). https://www.aimatmelanoma.org/melanoma-treatment-options/fda-approved-drugs-for-melanoma/ (accessed January 26, 2018).
[117] European Medicines Agency - Find medicine, (n.d.). http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=/pages/medicines/landing/epar_search.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 (accessed January 26, 2018).
[118] C. Garbe, S. Abusaif, T.K. Eigentler, Vemurafenib, Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer. 201 (2014) 215–225. doi:10.1007/978-3-642-54490-3_13.
[119] K.T. Flaherty, I. Puzanov, K.B. Kim, A. Ribas, G.A. McArthur, J.A. Sosman, P.J. O'Dwyer, R.J. Lee, J.F. Grippo, K. Nolop, P.B. Chapman, Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma, N. Engl. J. Med. 363 (2010) 809–819. doi:10.1056/NEJMoa1002011.
[120] G.A. McArthur, P.B. Chapman, C. Robert, J. Larkin, J.B. Haanen, R. Dummer, A. Ribas, D. Hogg, O. Hamid, P.A. Ascierto, C. Garbe, A. Testori, M. Maio, P. Lorigan, C. Lebbé, T. Jouary, D. Schadendorf, S.J. O'Day, J.M. Kirkwood, A.M. Eggermont, B. Dréno, J.A. Sosman, K.T. Flaherty, M. Yin, I. Caro, S. Cheng, K. Trunzer, A. Hauschild, Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study, Lancet Oncol. 15 (2014) 323–332. doi:10.1016/S1470-2045(14)70012-9.
[121] A. Hauschild, J.-J. Grob, L.V. Demidov, T. Jouary, R. Gutzmer, M. Millward, P. Rutkowski, C.U. Blank, W.H. Miller, E. Kaempgen, S. Martín-Algarra, B. Karaszewska, C. Mauch, V. Chiarion-Sileni, A.-M. Martin, S. Swann, P. Haney, B. Mirakhur, M.E. Guckert, V. Goodman, P.B. Chapman, Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial, Lancet Lond. Engl. 380 (2012) 358–365. doi:10.1016/S0140-6736(12)60868-X.
[122] B. Escudier, N. Lassau, E. Angevin, J.C. Soria, L. Chami, M. Lamuraglia, E. Zafarana, V. Landreau, B. Schwartz, E. Brendel, J.-P. Armand, C. Robert, Phase I trial of sorafenib in combination with IFN alpha-2a in patients with unresectable and/or metastatic renal cell carcinoma or malignant melanoma, Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 13 (2007) 1801–1809. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1432.
[123] T. Eisen, T. Ahmad, K.T. Flaherty, M. Gore, S. Kaye, R. Marais, I. Gibbens, S. Hackett, M. James, L.M. Schuchter, K.L. Nathanson, C. Xia, R. Simantov, B. Schwartz, M. Poulin-Costello, P.J. O'Dwyer, M.J. Ratain, Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis, Br. J. Cancer. 95 (2006) 581–586. doi:10.1038/sj.bjc.6603291.
[124] R. Roskoski, Allosteric MEK1/2 inhibitors including cobimetanib and trametinib in the treatment of cutaneous melanomas, Pharmacol. Res. 117 (2017) 20–31. doi:10.1016/j.phrs.2016.12.009.
[125] J.I. Trujillo, MEK inhibitors: a patent review 2008 - 2010, Expert Opin. Ther. Pat. 21 (2011) 1045–1069. doi:10.1517/13543776.2011.577068.
[126] J. Larkin, P.A. Ascierto, B. Dréno, V. Atkinson, G. Liszkay, M. Maio, M. Mandalà, L. Demidov, D. Stroyakovskiy, L. Thomas, L. de la Cruz-Merino, C. Dutriaux, C. Garbe, M.A. Sovak, I. Chang, N. Choong, S.P. Hack, G.A. McArthur, A. Ribas, Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma, N. Engl. J. Med. 371 (2014) 1867–1876. doi:10.1056/NEJMoa1408868.
[127] G.V. Long, K.T. Flaherty, D. Stroyakovskiy, H. Gogas, E. Levchenko, F. de Braud, J. Larkin, C. Garbe, T. Jouary, A. Hauschild, V. Chiarion-Sileni, C. Lebbe, M. Mandalà, M. Millward, A. Arance, I. Bondarenko, J.B. a. G. Haanen, J. Hansson, J. Utikal, V. Ferraresi, P. Mohr, V. Probachai, D. Schadendorf, P. Nathan, C. Robert, A. Ribas, M.A. Davies, S.R. Lane, J.J. Legos, B. Mookerjee, J.-J. Grob, Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study, Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. 28 (2017) 1631–1639. doi:10.1093/annonc/mdx176.

[128] S. Pasquali, A.V. Hadjinicolaou, V. Chiarion Sileni, C.R. Rossi, S. Mocellin, Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma, Cochrane Database Syst. Rev. 2 (2018) CD011123. doi:10.1002/14651858.CD011123.pub2.
[129] F. Teimouri, S. Nikfar, M. Abdollahi, Efficacy and side effects of dacarbazine in comparison with temozolomide in the treatment of malignant melanoma: a meta-analysis consisting of 1314 patients, Melanoma Res. 23 (2013) 381–389. doi:10.1097/CMR.0b013e3283649a97.
[130] C. Ma, A.W. Armstrong, Severe adverse events from the treatment of advanced melanoma: a systematic review of severe side effects associated with ipilimumab, vemurafenib, interferon alfa-2b, dacarbazine and interleukin-2, J. Dermatol. Treat. 25 (2014) 401–408. doi:10.3109/09546634.2013.813897.
[131] K.L. Abbott, G.S. Harman, Combination chemotherapy for disseminated malignant melanoma, Anticancer. Drugs. 6 (1995) 489–497.
[132] M.B. Lens, T.G. Eisen, Systemic chemotherapy in the treatment of malignant melanoma, Expert Opin. Pharmacother. 4 (2003) 2205–2211. doi:10.1517/14656566.4.12.2205.
[133] C.A. Barker, N.Y. Lee, Radiation therapy for cutaneous melanoma, Dermatol. Clin. 30 (2012) 525–533. doi:10.1016/j.det.2012.04.011.
[134] A. Mahadevan, V.L. Patel, N. Dagoglu, Radiation Therapy in the Management of Malignant Melanoma, Oncol. Williston Park N. 29 (2015) 743–751.
[135] J. Oxenberg, J.M. Kane, The role of radiation therapy in melanoma, Surg. Clin. North Am. 94 (2014) 1031–1047, viii. doi:10.1016/j.suc.2014.07.006.
[136] S. Shukla, Z.-S. Chen, S.V. Ambudkar, Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance, Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother. 15 (2012) 70–80. doi:10.1016/j.drup.2012.01.005.
[137] K.B. Kim, K.T. Flaherty, P.B. Chapman, J.A. Sosman, A. Ribas, G.A. McArthur, R.K. Amaravadi, R.J. Lee, K.B. Nolop, I. Puzanov, Pattern and outcome of disease progression in phase I study of vemurafenib in patients with metastatic melanoma (MM)., J. Clin. Oncol. (2016). doi:10.1200/jco.2011.29.15_suppl.8519.
[138] A. Scholtens, M.H. Geukes Foppen, C.U. Blank, J.V. van Thienen, H. van Tinteren, J.B. Haanen, Vemurafenib for BRAF V600 mutated advanced melanoma: results of treatment beyond progression, Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990. 51 (2015) 642–652. doi:10.1016/j.ejca.2015.01.009.
[139] K.B. Kim, R. Kefford, A.C. Pavlick, J.R. Infante, A. Ribas, J.A. Sosman, L.A. Fecher, M. Millward, G.A. McArthur, P. Hwu, R. Gonzalez, P.A. Ott, G.V. Long, O.S. Gardner, D. Ouellet, Y. Xu, D.J. DeMarini, N.T. Le, K. Patel, K.D. Lewis, Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor Trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor, J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 31 (2013) 482–489. doi:10.1200/JCO.2012.43.5966.
[140] S.Y. Lim, A.M. Menzies, H. Rizos, Mechanisms and strategies to overcome resistance to molecularly targeted therapy for melanoma, Cancer. 123 (2017) 2118–2129. doi:10.1002/cncr.30435.
[141] P.A. Ascierto, S.S. Agarwala, G. Ciliberto, S. Demaria, R. Dummer, C.P.M. Duong, S. Ferrone, S.C. Formenti, C. Garbe, R. Halaban, S. Khleif, J.J. Luke, L.M. Mir, W.W. Overwijk, M. Postow, I. Puzanov, P. Sondel, J.M. Taube, P. Thor Straten, D.F. Stroncek, J.A. Wargo, H. Zarour, M. Thurin, Future perspectives in melanoma research “Melanoma Bridge”, Napoli, November 30th-3rd December 2016, J. Transl. Med. 15 (2017) 236. doi:10.1186/s12967-017-1341-2.
[142] Z.A. Cooper, A. Reuben, J. Austin-Breneman, J.A. Wargo, Does It MEK a Difference? Understanding Immune Effects of Targeted Therapy, Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 21 (2015) 3102–3104. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0363.
[143] A. Ribas, F.S. Hodi, M. Callahan, C. Konto, J. Wolchok, Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab, N. Engl. J. Med. 368 (2013) 1365–1366. doi:10.1056/NEJMc1302338.

[144] D.R. Minor, I. Puzanov, M.K. Callahan, B.A. Hug, A. Hoos, Severe gastrointestinal toxicity with administration of trametinib in combination with dabrafenib and ipilimumab, Pigment Cell Melanoma Res. 28 (2015) 611–612. doi:10.1111/pcmr.12383.

[145] A. Daud, H.M. Kluger, R. Kurzrock, F. Schimmoller, A.L. Weitzman, T.A. Samuel, A.H. Moussa, M.S. Gordon, G.I. Shapiro, Phase II randomised discontinuation trial of the MET/VEGF receptor inhibitor cabozantinib in metastatic melanoma, Br. J. Cancer. 116 (2017) 432–440. doi:10.1038/bjc.2016.419.

[146] O. Surriga, V.K. Rajasekhar, G. Ambrosini, Y. Dogan, R. Huang, G.K. Schwartz, Crizotinib, a c-Met inhibitor, prevents metastasis in a metastatic uveal melanoma model, Mol. Cancer Ther. 12 (2013) 2817–2826. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0499.

[147] F. Qian, S. Engst, K. Yamaguchi, P. Yu, K.-A. Won, L. Mock, T. Lou, J. Tan, C. Li, D. Tam, J. Lougheed, F.M. Yakes, F. Bentzien, W. Xu, T. Zaks, R. Wooster, J. Greshock, A.H. Joly, Inhibition of tumor cell growth, invasion, and metastasis by EXEL-2880 (XL880, GSK1363089), a novel inhibitor of HGF and VEGF receptor tyrosine kinases, Cancer Res. 69 (2009) 8009–8016. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4889.

[148] F. Shojaei, J.H. Lee, B.H. Simmons, A. Wong, C.O. Esparza, P.A. Plumlee, J. Feng, A.E. Stewart, D.D. Hu-Lowe, J.G. Christensen, HGF/c-Met acts as an alternative angiogenic pathway in sunitinib-resistant tumors, Cancer Res. 70 (2010) 10090–10100. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0489.

[149] C. Chattopadhyay, J.A. Ellerhorst, S. Ekmekcioglu, V.R. Greene, M.A. Davies, E.A. Grimm, Association of activated c-Met with NRAS-mutated human melanomas, Int. J. Cancer. 131 (2012) E56-65. doi:10.1002/ijc.26487.

[150] L. Kucerova, L. Demkova, S. Skolekova, R. Bohovic, M. Matuskova, Tyrosine kinase inhibitor SU11274 increased tumorigenicity and enriched for melanoma-initiating cells by bioenergetic modulation, BMC Cancer. 16 (2016) 308. doi:10.1186/s12885-016-2341-y.

[151] D. Etnyre, A.L. Stone, J.T. Fong, R.J. Jacobs, S.B. Uppada, G.M. Botting, S. Rajanna, D.N. Moravec, M.R. Shambannagari, Z. Crees, J. Girard, C. Bertram, N. Puri, Targeting c-Met in melanoma: mechanism of resistance and efficacy of novel combinatorial inhibitor therapy, Cancer Biol. Ther. 15 (2014) 1129–1141. doi:10.4161/cbt.29451.

[152] P.E. Hughes, K. Rex, S. Caenepeel, Y. Yang, Y. Zhang, M.A. Broome, H.T. Kha, T.L. Burgess, B. Amore, P.J. Kaplan-Lefko, J. Moriguchi, J. Werner, M.A. Damore, D. Baker, D.M. Choquette, J.-C. Harmange, R. Radinsky, R. Kendall, I. Dussault, A. Coxon, In Vitro and In Vivo Activity of AMG 337, a Potent and Selective MET Kinase Inhibitor, in MET-Dependent Cancer Models, Mol. Cancer Ther. 15 (2016) 1568–1579. doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0871.

[153] L. Liu, A. Siegmund, N. Xi, P. Kaplan-Lefko, K. Rex, A. Chen, J. Lin, J. Moriguchi, L. Berry, L. Huang, Y. Teffera, Y. Yang, Y. Zhang, S.F. Bellon, M. Lee, R. Shimanovich, A. Bak, C. Dominguez, M.H. Norman, J.-C. Harmange, I. Dussault, T.-S. Kim, Discovery of a potent, selective, and orally bioavailable c-Met inhibitor: 1-(2-hydroxy-2-methylpropyl)-N-(5-(7-methoxyquinolin-4-yloxy)pyridin-2-yl)-5-methyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazole-4-carboxamide (AMG 458), J. Med. Chem. 51 (2008) 3688–3691. doi:10.1021/jm800401t.

[154] R.A. Parikh, P. Wang, J.H. Beumer, E. Chu, L.J. Appleman, The potential roles of hepatocyte growth factor (HGF)-MET pathway inhibitors in cancer treatment, OncoTargets Ther. 7 (2014) 969–983. doi:10.2147/OTT.S40241.

[155] M. Pool, A.G.T. Terwisscha van Scheltinga, A. Kol, D. Giesen, E.G.E. de Vries, M.N. Lub-de Hooge, 89Zr-Onartuzumab PET imaging of c-MET receptor dynamics, Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 44 (2017) 1328–1336. doi:10.1007/s00259-017-3672-x.

[156] B. Xie, R. Xing, P. Chen, Y. Gou, S. Li, J. Xiao, J. Dong, Down-regulation of c-Met expression inhibits human HCC cells growth and invasion by RNA interference, J. Surg. Res. 162 (2010) 231–238. doi:10.1016/j.jss.2009.04.030.

[157] Z. Firtina Karagonlar, D. Koc, E. Iscan, E. Erdal, N. Atabey, Elevated hepatocyte growth factor expression as an autocrine c-Met activation mechanism in acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells, Cancer Sci. 107 (2016) 407–416. doi:10.1111/cas.12891.

[158] H.S. Okuma, S. Kondo, Trends in the development of MET inhibitors for hepatocellular carcinoma, Future Oncol. Lond. Engl. 12 (2016) 1275–1286. doi:10.2217/fon.16.3.
[159] M. Suzuki, H. Shiraha, T. Fujikawa, N. Takaoka, N. Ueda, Y. Nakanishi, K. Koike, A. Takaki, Y. Shiratori, Des-gamma-carboxy prothrombin is a potential autologous growth factor for hepatocellular carcinoma, J. Biol. Chem. 280 (2005) 6409–6415. doi:10.1074/jbc.M406714200.
[160] S.N. Steinway, H. Dang, H. You, C.B. Rountree, W. Ding, The EGFR/ErbB3 Pathway Acts as a Compensatory Survival Mechanism upon c-Met Inhibition in Human c-Met+ Hepatocellular Carcinoma, PloS One. 10 (2015) e0128159. doi:10.1371/journal.pone.0128159.
[161] D. Diaz, K.A. Ford, D.P. Hartley, E.B. Harstad, G.R. Cain, K. Achilles-Poon, T. Nguyen, J. Peng, Z. Zheng, M. Merchant, D.P. Sutherlin, J.J. Gaudino, R. Kaus, S.C. Lewin-Koh, E.F. Choo, B.M. Liederer, D.M. Dambach, Pharmacokinetic drivers of toxicity for basic molecules: strategy to lower pKa results in decreased tissue exposure and toxicity for a small molecule Met inhibitor, Toxicol. Appl. Pharmacol. 266 (2013) 86–94. doi:10.1016/j.taap.2012.10.026.
[162] J.J. Cui, H. Shen, M. Tran-Dubé, M. Nambu, M. McTigue, N. Grodsky, K. Ryan, S. Yamazaki, S. Aguirre, M. Parker, Q. Li, H. Zou, J. Christensen, Lessons from (S)-6-(1-(6-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]pyridazin-3-yl)ethyl)quinoline (PF-04254644), an inhibitor of receptor tyrosine kinase c-Met with high protein kinase selectivity but broad phosphodiesterase family inhibition leading to myocardial degeneration in rats, J. Med. Chem. 56 (2013) 6651–6665. doi:10.1021/jm400926x.
[163] A. Santoro, M. Simonelli, C. Rodriguez-Lope, P. Zucali, L.H. Camacho, A. Granito, N. Senzer, L. Rimassa, G. Abbadessa, B. Schwartz, M. Lamar, R.E. Savage, J. Bruix, A Phase-1b study of tivantinib (ARQ 197) in adult patients with hepatocellular carcinoma and cirrhosis, Br. J. Cancer. 108 (2013) 21–24. doi:10.1038/bjc.2012.556.
[164] T.K. Choueiri, U. Vaishampayan, J.E. Rosenberg, T.F. Logan, A.L. Harzstark, R.M. Bukowski, B.I. Rini, S. Srinivas, M.N. Stein, L.M. Adams, L.H. Ottesen, K.H. Laubscher, L. Sherman, D.F. McDermott, N.B. Haas, K.T. Flaherty, R. Ross, P. Eisenberg, P.S. Meltzer, M.J. Merino, D.P. Bottaro, W.M. Linehan, R. Srinivasan, Phase II and biomarker study of the dual MET/VEGFR2 inhibitor foretinib in patients with papillary renal cell carcinoma, J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 31 (2013) 181–186. doi:10.1200/JCO.2012.43.3383.
[165] D. Kazandjian, G.M. Blumenthal, H.-Y. Chen, K. He, M. Patel, R. Justice, P. Keegan, R. Pazdur, FDA approval summary: crizotinib for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer with anaplastic lymphoma kinase rearrangements, The Oncologist. 19 (2014) e5-11. doi:10.1634/theoncologist.2014-0241.
[166] Z. Tao, J. Barker, S.D.-H. Shi, M. Gehring, S. Sun, Steady-state kinetic and inhibition studies of the mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase domain and mTOR complexes, Biochemistry (Mosc.). 49 (2010) 8488–8498. doi:10.1021/bi100673c.
[167] K. Masui, W.K. Cavenee, P.S. Mischel, mTORC2 in the center of cancer metabolic reprogramming, Trends Endocrinol. Metab. TEM. 25 (2014) 364–373. doi:10.1016/j.tem.2014.04.002.
[168] A.M. Martelli, F. Buontempo, J.A. McCubrey, Drug discovery targeting the mTOR pathway, Clin. Sci. Lond. Engl. 1979. 132 (2018) 543–568. doi:10.1042/CS20171158.
[169] J. Li, S.G. Kim, J. Blenis, Rapamycin: one drug, many effects, Cell Metab. 19 (2014) 373–379. doi:10.1016/j.cmet.2014.01.001.
[170] T. van Gelder, R.H. van Schaik, D.A. Hesselink, Pharmacogenetics and immunosuppressive drugs in solid organ transplantation, Nat. Rev. Nephrol. 10 (2014) 725–731. doi:10.1038/nrneph.2014.172.
[171] B.K. Law, Rapamycin: an anti-cancer immunosuppressant?, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 56 (2005) 47–60. doi:10.1016/j.critrevonc.2004.09.009.
[172] M. Xu, L.-M. Bu, K. Wu, L.-G. Lu, X.-P. Wang, Rapamycin inhibits the proliferation of SW1990 pancreatic cancer cell, Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 19 (2015) 3072–3079.

[173] C.P. Eng, S.N. Sehgal, C. Vézina, Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors, J. Antibiot. (Tokyo). 37 (1984) 1231–1237.
[174] H. Zhou, Y. Luo, S. Huang, Updates of mTOR inhibitors, Anticancer Agents Med. Chem. 10 (2010) 571–581.
[175] M.-A. Bjornsti, P.J. Houghton, The TOR pathway: a target for cancer therapy, Nat. Rev. Cancer. 4 (2004) 335–348. doi:10.1038/nrc1362.
[176] Z. Zou, J. Chen, J. Yang, X. Bai, Targeted Inhibition of Rictor/mTORC2 in Cancer Treatment: A New Era after Rapamycin, Curr. Cancer Drug Targets. 16 (2016) 288–304.
[177] L. Du, X. Li, L. Zhen, W. Chen, L. Mu, Y. Zhang, A. Song, Everolimus inhibits breast cancer cell growth through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, Mol. Med. Rep. 17 (2018) 7163–7169. doi:10.3892/mmr.2018.8769.
[178] R. Wesolowski, M. Abdel-Rasoul, M. Lustberg, M. Paskell, C.L. Shapiro, E.R. Macrae, Treatment-related mortality with everolimus in cancer patients, The Oncologist. 19 (2014) 661–668. doi:10.1634/theoncologist.2013-0355.
[179] M. Schulze, C. Stock, M. Zaccagnini, D. Teber, J.J. Rassweiler, Temsirolimus, Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer. 201 (2014) 393–403. doi:10.1007/978-3-642-54490-3_24.
[180] M. Mita, K. Sankhala, I. Abdel-Karim, A. Mita, F. Giles, Deforolimus (AP23573) a novel mTOR inhibitor in clinical development, Expert Opin. Investig. Drugs. 17 (2008) 1947–1954. doi:10.1517/13543780802556485.
[181] B. Raungaard, L.O. Jensen, H.-H. Tilsted, E.H. Christiansen, M. Maeng, C.J. Terkelsen, L.R. Krusell, A. Kaltoft, S.D. Kristensen, H.E. Bøtker, L. Thuesen, J. Aarøe, S.E. Jensen, A.B. Villadsen, P. Thayssen, K.T. Veien, K.N. Hansen, A. Junker, M. Madsen, J. Ravkilde, J.F. Lassen, Scandinavian Organization for Randomized Trials with Clinical Outcome (SORT OUT), Zotarolimus-eluting durable-polymer-coated stent versus a biolimus-eluting biodegradable-polymer-coated stent in unselected patients undergoing percutaneous coronary intervention (SORT OUT VI): a randomised non-inferiority trial, Lancet Lond. Engl. 385 (2015) 1527–1535. doi:10.1016/S0140-6736(14)61794-3.
[182] M. Moschetta, A. Reale, C. Marasco, A. Vacca, M.R. Carratù, Therapeutic targeting of the mTOR-signalling pathway in cancer: benefits and limitations, Br. J. Pharmacol. 171 (2014) 3801–3813. doi:10.1111/bph.12749.
[183] M. Abbaspour Babaei, B. Kamalidehghan, M. Saleem, H.Z. Huri, F. Ahmadipour, Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells, Drug Des. Devel. Ther. 10 (2016) 2443–2459. doi:10.2147/DDDT.S89114.
[184] M.C. Heinrich, C.L. Corless, G.D. Demetri, C.D. Blanke, M. von Mehren, H. Joensuu, L.S. McGreevey, C.-J. Chen, A.D. Van den Abbeele, B.J. Druker, B. Kiese, B. Eisenberg, P.J. Roberts, S. Singer, C.D.M. Fletcher, S. Silberman, S. Dimitrijevic, J.A. Fletcher, Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor, J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 21 (2003) 4342–4349. doi:10.1200/JCO.2003.04.190.
[185] F.S. Hodi, C.L. Corless, A. Giobbie-Hurder, J.A. Fletcher, M. Zhu, A. Marino-Enriquez, P. Friedlander, R. Gonzalez, J.S. Weber, T.F. Gajewski, S.J. O'Day, K.B. Kim, D. Lawrence, K.T. Flaherty, J.J. Luke, F.A. Collichio, M.S. Ernstoff, M.C. Heinrich, C. Beadling, K.A. Zukotynski, J.T. Yap, A.D. Van den Abbeele, G.D. Demetri, D.E. Fisher, Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin, J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 31 (2013) 3182–3190. doi:10.1200/JCO.2012.47.7836.
[186] E.I. Buchbinder, J.A. Sosman, D.P. Lawrence, D.F. McDermott, N.H. Ramaiya, A.D. Van den Abbeele, G.P. Linette, A. Giobbie-Hurder, F.S. Hodi, Phase 2 study of sunitinib in patients with metastatic mucosal or acral melanoma, Cancer. 121 (2015) 4007–4015. doi:10.1002/cncr.29622.
[187] V.A. Mamedov, A.A. Kalinin, Advances in the synthesis of imidazo[1,5-a]- and imidazo[1,2-a]quinoxalines, Russ. Chem. Rev. 83 (2014) 820. doi:10.1070/RC2014v083n09ABEH004424.

[188] M.R. Myers, W. He, B. Hanney, N. Setzer, M.P. Maguire, A. Zulli, G. Bilder, H. Galzcinski, D. Amin, S. Needle, A.P. Spada, Potent quinoxaline-based inhibitors of PDGF receptor tyrosine kinase activity. Part 1: SAR exploration and effective bioisosteric replacement of a phenyl substituent, Bioorg. Med. Chem. Lett. 13 (2003) 3091–3095.
[189] D. Schneidenbach, S. Ammermann, M. Debeaux, A. Freund, M. Zöllner, C. Daniliuc, P.G. Jones, W. Kowalsky, H.-H. Johannes, Efficient and long-time stable red iridium(III) complexes for organic light-emitting diodes based on quinoxaline ligands, Inorg. Chem. 49 (2010) 397–406. doi:10.1021/ic9009898.
[190] S. Dailey, W.J. Feast, R.J. Peace, I.C. Sage, S. Till, E.L. Wood, Synthesis and device characterisation of side-chain polymer electron transport materials for organic semiconductor applications, J. Mater. Chem. 11 (2001) 2238–2243. doi:10.1039/B104674H.
[191] P.K. Sasmal, R. Majumdar, R.R. Dighe, A.R. Chakravarty, Photocytotoxicity and DNA cleavage activity of L-arg and L-lys Schiff base oxovanadium(IV) complexes having phenanthroline bases, Dalton Trans. Camb. Engl. 2003. 39 (2010) 7104–7113. doi:10.1039/c001867h.
[192] A. Zarrouk, A. Dafali, B. Hammouti, H. Zarrok, S. Boukhris, M. Zertoubi, Synthesis, characterization and comparative study of functionalized quinoxaline derivatives towards corrosion of copper in nitric acid medium, Int J Electrochem Sci. 5 (2010) 46–55.
[193] F. Baffert, C.H. Régnier, A. De Pover, C. Pissot-Soldermann, G.A. Tavares, F. Blasco, J. Brueggen, P. Chène, P. Drueckes, D. Erdmann, P. Furet, M. Gerspacher, M. Lang, D. Ledieu, L. Nolan, S. Ruetz, J. Trappe, E. Vangrevelinghe, M. Wartmann, L. Wyder, F. Hofmann, T. Radimerski, Potent and selective inhibition of polycythemia by the quinoxaline JAK2 inhibitor NVP-BSK805, Mol. Cancer Ther. 9 (2010) 1945–1955. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0053.
[194] S.-B. Lee, Y.I. Park, M.-S. Dong, Y.-D. Gong, Identification of 2,3,6-trisubstituted quinoxaline derivatives as a Wnt2/β-catenin pathway inhibitor in non-small-cell lung cancer cell lines, Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 5900–5904. doi:10.1016/j.bmcl.2010.07.088.
[195] E.S. el Ashry, A.A. Abdel-Rahman, N. Rashed, H.A. Rasheed, Homoacyclovir analogues of unnatural bases and their activity against hepatitis B virus, Pharm. 54 (1999) 893–897.
[196] L.E. Seitz, W.J. Suling, R.C. Reynolds, Synthesis and antimycobacterial activity of pyrazine and quinoxaline derivatives, J. Med. Chem. 45 (2002) 5604–5606.
[197] M.M. Badran, K.A.M. Abouzid, M.H.M. Hussein, Synthesis of certain substituted quinoxalines as antimicrobial agents (Part II), Arch. Pharm. Res. 26 (2003) 107–113.
[198] A.A. Abu-Hashem, M.A. Gouda, F.A. Badria, Synthesis of some new pyrimido[2',1':2,3]thiazolo[4,5-b]quinoxaline derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 1976–1981. doi:10.1016/j.ejmech.2010.01.042.
[199] E. Hanna, R. Abadi, O. Abbas, Imiquimod in dermatology: an overview, Int. J. Dermatol. 55 (2016) 831–844. doi:10.1111/ijd.13235.
[200] S. Tyring, Immune response modification: imiquimod, Australas. J. Dermatol. 39 Suppl 1 (1998) S11-13.
[201] A. Weber, C. Zimmermann, A.K. Mausberg, B.C. Kieseier, H.P. Hartung, H.H. Hofstetter, Induction of pro-inflammatory cytokine production in thymocytes by the immune response modifiers Imiquimod and Gardiquimod™, Int. Immunopharmacol. 17 (2013) 427–431. doi:10.1016/j.intimp.2013.06.023.
[202] C.-H. Kim, J.H. Ahn, S.U. Kang, H.S. Hwang, M.H. Lee, J.H. Pyun, H.Y. Kang, Imiquimod induces apoptosis of human melanocytes, Arch. Dermatol. Res. 302 (2010) 301–306. doi:10.1007/s00403-009-1012-0.
[203] A. El-Khattouti, D. Selimovic, M. Hannig, E.B. Taylor, Z.Y. Abd Elmageed, S.Y. Hassan, Y. Haikel, E. Kandil, M. Leverkus, R.T. Brodell, M. Megahed, M. Hassan, Imiquimod-induced apoptosis of melanoma cells is mediated by ER stress-dependent Noxa induction and enhanced by NF-κB inhibition, J. Cell. Mol. Med. 20 (2016) 266–286. doi:10.1111/jcmm.12718.
[204] G. Moarbess, C. Deleuze-Masquefa, V. Bonnard, S. Gayraud-Paniagua, J.-R. Vidal, F. Bressolle, F. Pinguet, P.-A. Bonnet, In vitro and in vivo anti-tumoral activities of imidazo[1,2-

a]quinoxaline, imidazo[1,5-a]quinoxaline, and pyrazolo[1,5-a]quinoxaline derivatives, Bioorg. Med. Chem. 16 (2008) 6601–6610. doi:10.1016/j.bmc.2008.05.022.

[205] C. Deleuze-Masquefa, G. Moarbess, S. Khier, N. David, S. Gayraud-Paniagua, F. Bressolle, F. Pinguet, P.-A. Bonnet, New imidazo[1,2-a]quinoxaline derivatives: synthesis and in vitro activity against human melanoma, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 3406–3411. doi:10.1016/j.ejmech.2009.02.007.

[206] A. Courbet, N. Bec, C. Constant, C. Larroque, M. Pugniere, S. El Messaoudi, Z. Zghaib, S. Khier, C. Deleuze-Masquefa, F. Gattacceca, Imidazoquinoxaline anticancer derivatives and imiquimod interact with tubulin: Characterization of molecular microtubule inhibiting mechanisms in correlation with cytotoxicity, PloS One. 12 (2017) e0182022. doi:10.1371/journal.pone.0182022.

[207] C. Deleuze-Masquéfa, G. Gerebtzoff, G. Subra, J.-R. Fabreguettes, A. Ovens, M. Carraz, M.-P. Strub, J. Bompart, P. George, P.-A. Bonnet, Design and synthesis of novel imidazo[1,2-a]quinoxalines as PDE4 inhibitors, Bioorg. Med. Chem. 12 (2004) 1129–1139. doi:10.1016/j.bmc.2003.11.034.

[208] L.C. Meurer, R.L. Tolman, E.W. Chapin, R. Saperstein, P.P. Vicario, M.M. Zrada, M. MacCoss, Synthesis and hypoglycemic activity of substituted 8-(1-piperazinyl)imidazo[1,2-a]pyrazines, J. Med. Chem. 35 (1992) 3845–3857.

[209] I.J.S. Fairlamb, Regioselective (site-selective) functionalization of unsaturated halogenated nitrogen, oxygen and sulfur heterocycles by Pd-catalysed cross-couplings and direct arylation processes, Chem. Soc. Rev. 36 (2007) 1036–1045. doi:10.1039/b611177g.

[210] S. Khier, F. Gattacceca, S. El Messaoudi, F. Lafaille, C. Deleuze-Masquéfa, J. Bompart, J.-F. Cooper, I. Solassol, F. Pinguet, P.-A. Bonnet, F.M.M. Bressolle, Metabolism and pharmacokinetics of EAPB0203 and EAPB0503, two imidazoquinoxaline compounds previously shown to have antitumoral activity on melanoma and T-lymphomas, Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem. 38 (2010) 1836–1847. doi:10.1124/dmd.110.034579.

[211] S. Khier, C. Deleuze-Masquéfa, G. Moarbess, F. Gattacceca, D. Margout, I. Solassol, J.-F. Cooper, F. Pinguet, P.-A. Bonnet, F.M.M. Bressolle, Pharmacology of EAPB0203, a novel imidazo[1,2-a]quinoxaline derivative with anti-tumoral activity on melanoma, Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci. 39 (2010) 23–29. doi:10.1016/j.ejps.2009.10.006.

[212] S. Khier, G. Moarbess, C. Deleuze-Masquefa, I. Solassol, D. Margout, F. Pinguet, P.-A. Bonnet, F.M.M. Bressolle, Quantitation of imidazo[1,2-a]quinoxaline derivatives in human and rat plasma using LC/ESI-MS, J. Sep. Sci. 32 (2009) 1363–1373. doi:10.1002/jssc.200800668.

[213] C. Farenc, J.R. Fabreguette, F. Bressolle, Pk-fit: a pharmacokinetic/pharmacodynamic and statistical data analysis software, Comput. Biomed. Res. Int. J. 33 (2000) 315–329. doi:10.1006/cbmr.2000.1548.

[214] Z.J. Li, K.-C. Sohn, D.-K. Choi, G. Shi, D. Hong, H.-E. Lee, K.U. Whang, Y.H. Lee, M. Im, Y. Lee, Y.-J. Seo, C.D. Kim, J.-H. Lee, Roles of TLR7 in activation of NF-κB signaling of keratinocytes by imiquimod, PloS One. 8 (2013) e77159. doi:10.1371/journal.pone.0077159.

[215] G. Moarbess, H. El-Hajj, Y. Kfoury, M.E. El-Sabban, Y. Lepelletier, O. Hermine, C. Deleuze-Masquéfa, P.-A. Bonnet, A. Bazarbachi, EAPB0203, a member of the imidazoquinoxaline family, inhibits growth and induces caspase-dependent apoptosis in T-cell lymphomas and HTLV-I-associated adult T-cell leukemia/lymphoma, Blood. 111 (2008) 3770–3777. doi:10.1182/blood-2007-11-121913.

[216] Z. Zghaib, Etude des effets cytotoxique et antitubuline des imidazoquinoxalines: Etude du mécanisme d'action par une analyse transcriptomique, n.d.

[217] S. Morjaria, C. Deleuze-Masquefa, V. Lafont, S. Gayraud, J. Bompart, P.A. Bonnet, J. Dornand, Impairment of TNF-alpha production and action by imidazo[1,2- alpha] quinoxalines, a derivative family which displays potential anti-inflammatory properties, Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 19 (2006) 525–538. doi:10.1177/039463200601900308.

[218] B. Testa, P. Crivori, M. Reist, P.-A. Carrupt, The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples, Perspect. Drug Discov. Des. 19 (2000) 179–211. doi:10.1023/A:1008741731244.
[219] Y. Henchoz, B. Bard, D. Guillarme, P.-A. Carrupt, J.-L. Veuthey, S. Martel, Analytical tools for the physicochemical profiling of drug candidates to predict absorption/distribution, Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 707–729. doi:10.1007/s00216-009-2634-y.
[220] K.J. Box, J.E.A. Comer, Using measured pKa, LogP and solubility to investigate supersaturation and predict BCS class, Curr. Drug Metab. 9 (2008) 869–878.
[221] A. Avdeef, Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state), Curr. Top. Med. Chem. 1 (2001) 277–351.
[222] D.C. Wood, F.S. Weber, M.A. Palmquist, Continued studies in the toxicology of dimethyl sulfoxide (DMSO), J. Pharmacol. Exp. Ther. 177 (1971) 520–527.
[223] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust, J.-P. Benoit, A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers, Pharm. Res. 19 (2002) 875–880.
[224] Protection for the Hydroxyl Group, Including 1,2- and 1,3-Diols, in: Prot. Groups Org. Synth., Wiley-Blackwell, 2002: pp. 17–245. doi:10.1002/0471220574.ch2.
[225] S. Rivara, D. Pala, A. Lodola, M. Mor, V. Lucini, S. Dugnani, F. Scaglione, A. Bedini, S. Lucarini, G. Tarzia, G. Spadoni, MT1-selective melatonin receptor ligands: synthesis, pharmacological evaluation, and molecular dynamics investigation of N-{[(3-O-substituted)anilino]alkyl}amides, ChemMedChem. 7 (2012) 1954–1964. doi:10.1002/cmdc.201200303.
[226] G. Spadoni, A. Bedini, P. Orlando, S. Lucarini, G. Tarzia, M. Mor, S. Rivara, V. Lucini, M. Pannacci, F. Scaglione, Bivalent ligand approach on N-{2-[(3-methoxyphenyl)methylamino]ethyl}acetamide: synthesis, binding affinity and intrinsic activity for MT(1) and MT(2) melatonin receptors, Bioorg. Med. Chem. 19 (2011) 4910–4916. doi:10.1016/j.bmc.2011.06.063.
[227] E. Perspicace, A. Giorgio, A. Carotti, S. Marchais-Oberwinkler, R.W. Hartmann, Novel N-methylsulfonamide and retro-N-methylsulfonamide derivatives as 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (17β-HSD2) inhibitors with good ADME-related physicochemical parameters, Eur. J. Med. Chem. 69 (2013) 201–215. doi:10.1016/j.ejmech.2013.08.026.
[228] E. Perspicace, L. Cozzoli, E.M. Gargano, N. Hanke, A. Carotti, R.W. Hartmann, S. Marchais-Oberwinkler, Novel, potent and selective 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 inhibitors as potential therapeutics for osteoporosis with dual human and mouse activities, Eur. J. Med. Chem. 83 (2014) 317–337. doi:10.1016/j.ejmech.2014.06.036.
[229] R.C. Williams, J.C. Lee, Preparation of tubulin from brain, Methods Enzymol. 85 Pt B (1982) 376–385.
[230] V.L. Battula, K. Nguyen, J. Sun, M.K. Pitner, B. Yuan, C. Bartholomeusz, N. Hail, M. Andreeff, IKK inhibition by BMS-345541 suppresses breast tumorigenesis and metastases by targeting GD2+ cancer stem cells, Oncotarget. 8 (2017) 36936–36949. doi:10.18632/oncotarget.16294.
[231] N. Dyballa, S. Metzger, Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in Polyacrylamide Gels, J. Vis. Exp. (2009). doi:10.3791/1431.
[232] M. Remko, A. Remková, R. Broer, A Comparative Study of Molecular Structure, pKa, Lipophilicity, Solubility, Absorption and Polar Surface Area of Some Antiplatelet Drugs, Int. J. Mol. Sci. 17 (2016) 388. doi:10.3390/ijms17030388.
[233] G.A. Fridgeirsdottir, R. Harris, P.M. Fischer, C.J. Roberts, Support Tools in Formulation Development for Poorly Soluble Drugs, J. Pharm. Sci. 105 (2016) 2260–2269. doi:10.1016/j.xphs.2016.05.024.
[234] A.M.M. Eggermont, A. Spatz, C. Robert, Cutaneous melanoma, Lancet Lond. Engl. 383 (2014) 816–827. doi:10.1016/S0140-6736(13)60802-8.
[235] A. Stratigos, C. Garbe, C. Lebbe, J. Malvehy, V. del Marmol, H. Pehamberger, K. Peris, J.C. Becker, I. Zalaudek, P. Saiag, M.R. Middleton, L. Bastholt, A. Testori, J.-J. Grob, European Dermatology Forum (EDF), European Association of Dermato-Oncology (EADO), European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), Diagnosis and treatment of

invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline, Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990. 51 (2015) 1989–2007. doi:10.1016/j.ejca.2015.06.110.

[236] A. Kwong, M. Sanlorenzo, K. Rappersberger, I. Vujic, Update on advanced melanoma treatments: small molecule targeted therapy, immunotherapy, and future combination therapies, Wien. Med. Wochenschr. 1946. (2017). doi:10.1007/s10354-016-0535-1.

[237] Drugs Approved for Melanoma, Natl. Cancer Inst. (n.d.). https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/melanoma (accessed December 11, 2017).

[238] I.C. Glitza, D.W. Kim, Y.K. Chae, K.B. Kim, Targeted Therapy in Melanoma, in: Genet. Melanoma, Springer, New York, NY, 2016: pp. 237–265. doi:10.1007/978-1-4939-3554-3_11.

[239] H.R. Keller, X. Zhang, L. Li, H. Schaider, J.W. Wells, Overcoming resistance to targeted therapy with immunotherapy and combination therapy for metastatic melanoma, Oncotarget. 8 (2017) 75675–75686. doi:10.18632/oncotarget.18523.

[240] J. Basken, S.A. Stuart, A.J. Kavran, T. Lee, C.C. Ebmeier, W. Old, N.G. Ahn, Specificity of phosphorylation responses to MAP kinase pathway inhibitors in melanoma cells, Mol. Cell. Proteomics MCP. (2017). doi:10.1074/mcp.RA117.000335.

[241] G. Moarbess, C. Deleuze-Masquefa, V. Bonnard, S. Gayraud-Paniagua, J.-R. Vidal, F. Bressolle, F. Pinguet, P.-A. Bonnet, In vitro and in vivo anti-tumoral activities of imidazo[1,2-a]quinoxaline, imidazo[1,5-a]quinoxaline, and pyrazolo[1,5-a]quinoxaline derivatives, Bioorg. Med. Chem. 16 (2008) 6601–6610. doi:10.1016/j.bmc.2008.05.022.

[242] C. Deleuze-Masquefa, G. Moarbess, S. Khier, N. David, S. Gayraud-Paniagua, F. Bressolle, F. Pinguet, P.-A. Bonnet, New imidazo[1,2-a]quinoxaline derivatives: synthesis and in vitro activity against human melanoma, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 3406–3411. doi:10.1016/j.ejmech.2009.02.007.

[243] A. Chouchou, B. Marion, C. Enjalbal, C. Roques, P. Cuq, P.-A. Bonnet, F.M.M. Bressolle-Gomeni, C. Deleuze-Masquéfa, Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for quantitative estimation of new imiqualine leads with potent anticancer activities in rat and mouse plasma. Application to a pharmacokinetic study in mice, J. Pharm. Biomed. Anal. 148 (2018) 369–379. doi:10.1016/j.jpba.2017.10.025.

[244] D.C. Wood, F.S. Weber, M.A. Palmquist, Continued studies in the toxicology of dimethyl sulfoxide (DMSO), J. Pharmacol. Exp. Ther. 177 (1971) 520–527.

[245] V. Abet, F. Filace, J. Recio, J. Alvarez-Builla, C. Burgos, Prodrug approach: An overview of recent cases, Eur. J. Med. Chem. 127 (2017) 810–827. doi:10.1016/j.ejmech.2016.10.061.

[246] D.H. Jornada, G.F. dos Santos Fernandes, D.E. Chiba, T.R.F. de Melo, J.L. dos Santos, M.C. Chung, The Prodrug Approach: A Successful Tool for Improving Drug Solubility, Molecules. 21 (2015) 42. doi:10.3390/molecules21010042.

[247] C. Deleuze-Masquefa, G. Moarbess, S. Khier, N. David, S. Gayraud-Paniagua, F. Bressolle, F. Pinguet, P.-A. Bonnet, New imidazo[1,2-a]quinoxaline derivatives: synthesis and in vitro activity against human melanoma, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 3406–3411. doi:10.1016/j.ejmech.2009.02.007.

[248] Z. Zghaib, J.-F. Guichou, J. Vappiani, N. Bec, K. Hadj-Kaddour, L.-A. Vincent, S. Paniagua-Gayraud, C. Larroque, G. Moarbess, P. Cuq, I. Kassab, C. Deleuze-Masquéfa, M. Diab-Assaf, P.-A. Bonnet, New imidazoquinoxaline derivatives: Synthesis, biological evaluation on melanoma, effect on tubulin polymerization and structure-activity relationships, Bioorg. Med. Chem. 24 (2016) 2433–2440. doi:10.1016/j.bmc.2016.04.004.

[249] B. Testa, P. Crivori, M. Reist, P.-A. Carrupt, The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples, Perspect. Drug Discov. Des. 19 (2000) 179–211. doi:10.1023/A:1008741731244.

[250] Y. Henchoz, B. Bard, D. Guillarme, P.-A. Carrupt, J.-L. Veuthey, S. Martel, Analytical tools for the physicochemical profiling of drug candidates to predict absorption/distribution, Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 707–729. doi:10.1007/s00216-009-2634-y.

[251] K.J. Box, J.E.A. Comer, Using measured pKa, LogP and solubility to investigate supersaturation and predict BCS class, Curr. Drug Metab. 9 (2008) 869–878.
[252] A. Avdeef, Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state), Curr. Top. Med. Chem. 1 (2001) 277–351.
[253] M. Remko, A. Remková, R. Broer, A Comparative Study of Molecular Structure, pKa, Lipophilicity, Solubility, Absorption and Polar Surface Area of Some Antiplatelet Drugs, Int. J. Mol. Sci. 17 (2016) 388. doi:10.3390/ijms17030388.
[254] G.A. Fridgeirsdottir, R. Harris, P.M. Fischer, C.J. Roberts, Support Tools in Formulation Development for Poorly Soluble Drugs, J. Pharm. Sci. 105 (2016) 2260–2269. doi:10.1016/j.xphs.2016.05.024.
[255] ISO/IEC 17025:2017(en), General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, (n.d.). https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v1:en (accessed June 28, 2018).
[256] M. Yamashita, J.B. Fenn, Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme, J. Phys. Chem. 88 (1984) 4451–4459. doi:10.1021/j150664a002.
[257] C.M. Whitehouse, R.N. Dreyer, M. Yamashita, J.B. Fenn, Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers, Anal. Chem. 57 (1985) 675–679.
[258] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, Science. 246 (1989) 64–71.
[259] C. Ho, C. Lam, M. Chan, R. Cheung, L. Law, L. Lit, K. Ng, M. Suen, H. Tai, Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications, Clin. Biochem. Rev. 24 (2003) 3–12.
[260] P. Kebarle, A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry, J. Mass Spectrom. JMS. 35 (2000) 804–817. doi:10.1002/1096-9888(200007)35:7<804::AID-JMS22>3.0.CO;2-Q.
[261] P. Kebarle, L. Tang, From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry, Anal. Chem. 65 (1993) 972A-986A. doi:10.1021/ac00070a001.
[262] W. Paul, H. Steinwedel, Notizen: Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld, Z. Naturforschung Teil A. 8 (1953) 448–450. doi:10.1515/zna-1953-0710.
[263] W. Paul, H.P. Reinhard, U. von Zahn, Das elektrische Massenfilter als Massenspektrometer und Isotopentrenner, Z. Für Phys. 152 (1958) 143–182. doi:10.1007/BF01327353.
[264] I.M. Bird, High performance liquid chromatography: principles and clinical applications, BMJ. 299 (1989) 783–787.
[265] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11 (2000) 942–950. doi:10.1016/S1044-0305(00)00163-X.
[266] Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, (n.d.). https://google2.fda.gov/search?q=cache:bbv-5lH5gTUJ:www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070107.pdf+BIOANALYTICAL&client=FDAgov&site=FDAgov&lr=&proxystylesheet=FDAgov&output=xml_no_dtd&ie=UTF-8&access=p&oe=UTF-8 (accessed July 12, 2018).
[267] E. Bourgogne, M. Wagner, [Sample preparation and bioanalysis in mass spectrometry], Ann. Biol. Clin. (Paris). 73 (2015) 11–23. doi:10.1684/abc.2014.1016.
[268] G. Tiwari, R. Tiwari, Bioanalytical method validation: An updated review, Pharm. Methods. 1 (2010) 25–38. doi:10.4103/2229-4708.72226.
[269] N. Kadian, K.S.R. Raju, M. Rashid, M.Y. Malik, I. Taneja, M. Wahajuddin, Comparative assessment of bioanalytical method validation guidelines for pharmaceutical industry, J. Pharm. Biomed. Anal. 126 (2016) 83–97. doi:10.1016/j.jpba.2016.03.052.
[270] F. Garofolo, J. Michon, V. Leclaire, B. Booth, S. Lowes, C.T. Viswanathan, J. Welink, S. Haidar, L. de S. Teixeira, D. Tang, B. Desilva, US FDA/EMA harmonization of their bioanalytical guidance/guideline and activities of the Global Bioanalytical Consortium, Bioanalysis. 4 (2012) 231–236. doi:10.4155/bio.12.1.

[271] J. Abraham, International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, in: A. Brouder, C. Tietje (Eds.), Handb. Transnatl. Econ. Gov. Regimes, Brill, 2009: pp. 1041–1054. doi:10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897.

[272] Mieux se protéger du soleil - Exposition aux rayonnements UV | Institut National Du Cancer, (n.d.). http://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Reduire-les-risques-de-cancer/Exposition-aux-rayonnements-UV/Mieux-se-proteger-du-soleil (accessed July 12, 2018).

RESUME

Le projet concerne des molécules hétérocycliques, de faible poids moléculaire, présentant des activités cytotoxiques comparables à celles des meilleurs anticancéreux actuellement sur le marché. Ces molécules sont originales, protégées par un brevet international et un brevet de sélection déposé en décembre 2014. La synthèse des premières molécules leaders est maîtrisée et l'exemplification de la diversité moléculaire est en cours. Les études menées pour définir leur profil d'activité permettent d'identifier des caractéristiques tout à fait originales. Le projet, en phase de développement préclinique académique, a permis l'identification de composés leaders présentant des potentiels de développement en tant qu'anticancéreux. Le mécanisme exact des molécules développées est encore en cours d'étude et permettra de définir s'il s'agit d'un mode d'action unique ou multiple. Plusieurs têtes de séries ont pu être identifiées avec visiblement des modes d'actions différents. En effet, les composés **EAPB0203** et **EAPB0503** montrent un effet dose à partir de 1 µM sur la polymérisation de la tubuline mais la molécule **EAPB02303**, la plus active sur la lignée A375 (CI_{50} = 10 nM, de dix fois à cent fois plus active que les deux précédentes), ne montre aucune fixation à la tubuline à la dose de 1µM suggérant un mécanisme d'action différent et original. Le sujet de recherche présenté concerne le développement des études précliniques de ces molécules à visée anticancéreuse. Le premier axe de travail a été de mettre au point une formulation galénique de l'**EAPB0503** sous forme de nanocapsules lipidiques. Afin d'optimiser la biodisponibilité des composés, sans perdre leur activité intrinsèque, nous avons ensuite réalisé une modulation chimique sur la structure la plus active des Imiqualines : l'**EAPB02303**. Afin d'améliorer la balance globale hydrophilie/lipophilie (HLB) des composés dérivés de l'**EAPB02303**, nous avons greffé un résidu acide aminé en position 4. Enfin, la mise au point d'une méthode de dosage de l'**EAPB02303** et l'**EAPB02302** en milieu plasmatique en vue d'une étude pharmacocinétique a été le dernier axe du travail de thèse.

Mots-clés : Imidazoquinoxalines, Mélanome, Synthèse, Nanocapsules Lipidiques, Bioanalyse.

ABSTRACT

The project relates to heterocyclic molecules, low molecular weight, having cytotoxic activities similar to those presented by the best anticancer agents currently on the market. These molecules are originals, protected by an international patent and a selection patent filed in December 2014. The synthesis of the first molecules leader is under control and the exemplification of molecular diversity is underway. Studies to define their activity profile allow to identify quite original features. The project, in its academic preclinical development phase, enabled the identification of leader's compounds with potential for development as anticancer. The exact mechanism of the molecules developed is still under study and will determine whether there is a single or multiple mode of action. Several series leads were identified with apparently different modes of action. Indeed, compounds **EAPB0203** and **EAPB0503** show a dose effect from 1 µM on tubulin polymerization but compound **EAPB02303**, the more active on A375 cell line (IC_{50} = 10 nM, ten times to hundred times more active than the preceding two), shows no binding to tubulin at a dose of 1 µM suggesting a different and original mechanism of action. The research topic presented concerns the preclinical development of these anticancer molecules. The first line of work was to develop a galenic formulation of **EAPB0503** in the form of lipid nanocapsules. To optimize the bioavailability of the compounds, without losing their intrinsic activity, we achieved chemical modulation on the most active structure Imiqualines: **EAPB02303**. To improve the overall balance hydrophilic / lipophilic (HLB) of compounds derived from **EAPB02303**, we considered grafting amino acids on position 4. Finally, the development of a method for assaying **EAPB02303** and **EAPB02302** in plasma for a pharmacokinetic study has been the final focus of the thesis work.

Keywords: Imidazoquinoxalines, Melanoma, Synthesis, Lipidic Nanocapsules, Bioanalysis.