



HAL
open science

Synthèse et évaluation de nouveaux antagonistes des récepteurs CXCR1-2 pour cibler conjointement l'angiogenèse et l'inflammation dans les pathologies cancéreuses

Lou Mateo

► **To cite this version:**

Lou Mateo. Synthèse et évaluation de nouveaux antagonistes des récepteurs CXCR1-2 pour cibler conjointement l'angiogenèse et l'inflammation dans les pathologies cancéreuses. Chimie thérapeutique. Université Côte d'Azur, 2021. Français. NNT : 2021COAZ4006 . tel-04213465

HAL Id: tel-04213465

<https://theses.hal.science/tel-04213465>

Submitted on 21 Sep 2023

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 DE DOCTORAT

Synthèse et évaluation de nouveaux antagonistes des récepteurs CXCR1-2 pour cibler conjointement l'angiogenèse et l'inflammation dans les pathologies cancéreuses.

Lou MATEO

Institut de Chimie de Nice (ICN)

Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en Chimie
de l'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Dr. Rachid BENHIDA

Co-encadrée par : Pr. Luc DEMANGE
et Dr. Cyril RONCO

Soutenue le : 8 février 2021

Devant le jury, composé de :

Pr. GUIANVARC'H Dominique, Professeur, HDR, Université Paris-Saclay.

Dr. MOREAU Emmanuel, Maître de conférence, HDR, Université d'Auvergne.

Dr. DUFIES Maëva, Chercheur HDR, Centre Scientifique de Monaco.

Dr. BENHIDA Rachid, Directeur de recherche, HDR, Université Côte d'Azur.

Pr. DEMANGE Luc, Professeur, HDR, Faculté de pharmacie de Paris.

Dr. RONCO Cyril, Maître de conférence, HDR, Université Côte d'Azur.

Synthèse et évaluation de nouveaux antagonistes des récepteurs CXCR1-2 pour cibler conjointement l'angiogenèse et l'inflammation dans les pathologies cancéreuses.

Jury :

Président du jury

Pr. GUIANVARC'H Dominique : Professeur, Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, Université Paris-Saclay

Rapporteurs

Pr. GUIANVARC'H Dominique : Professeur, HDR, Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, Université Paris-Saclay.

Dr. MOREAU Emmanuel, Maître de Conférence, HDR, Unité de Recherche IMoST, UMR 1240, INSERM, Université d'Auvergne.

Examineur

Dr. DUFIES Maëva, Chercheur HDR, Centre Scientifique de Monaco et LIA ROPSE, Laboratoire International Associé Université Côte d'Azur

Directeur et co-directeur

Dr. Rachid BENHIDA, Directeur de recherche, HDR, Institut de Chimie de Nice, Université Côté d'Azur.

Pr. DEMANGE Luc, Professeur, HDR, UMR 8038 CNRS – CiTCoM, Faculté de pharmacie de Paris.

Invités

Dr. RONCO Cyril, Maître de Conférence, HDR, Institut de Chimie de Nice, Université Côté d'Azur.

Synthèse et évaluation de nouveaux antagonistes des récepteurs CXCR1-2 pour cibler conjointement l'angiogenèse et inflammation dans les pathologies cancéreuses.

L'angiogenèse et l'inflammation sont primordiales dans le développement et la progression tumorale. L'intérêt des thérapies ciblées anti-angiogéniques actuelles, est limité du fait de l'apparition de résistances. En parallèle de la voie du VEGF, il existe un second axe pro-angiogénique et pro-inflammatoire : la voie des CXCL-ELR⁺/CXCR, qui est particulièrement sollicitée dans le cancer et notamment dans le cancer du rein métastatique. Le but de cette thèse a été de développer de petites molécules originales capables d'inhiber l'interaction ligands/récepteurs (CXCL/CXCR1-2) afin d'avoir une action duale : à la fois anti-inflammatoire et anti-angiogénique. Le motif 2-aminobenzothiazinone a été choisi pour la préparation de 3 familles d'inhibiteurs. Des stratégies de synthèse divergentes permettent d'obtenir les composés des 2 premières familles, bien que les conditions opératoires aient nécessité une adaptation en fonction de la réactivité de chaque substrat. La dernière famille de molécules, est accessible selon une stratégie de synthèse linéaire qui comporte cependant des limitations lors de la dernière étape. Les évaluations biologiques des molécules obtenues ont mis en évidence un composé prometteur possédant une IC₅₀ de 0.6 µM sur la lignée 786-O et inhibant la chimiotaxie des cellules exprimant les récepteurs CXCR1-2. Une campagne *in vivo* sur des poissons-zèbres, est envisagée avec ce composé afin d'étudier sa capacité à entraver l'angiogenèse.

Mots clés : Cytokines CXCL-ELR⁺, angiogenèse, inflammation, inhibiteurs de CXCR1 et CXCR2, 2-aminobenzothiazinones.

Synthesis and evaluation of new CXCR1-2 receptor antagonists to target both angiogenesis and inflammation in oncology.

Angiogenesis and inflammation represent two essential hallmarks in the development and progression of tumors. The emergence of resistance constitutes the main limitation of the anti-angiogenic targeted therapies. In parallel to VEGF pathway, another crucial pro-angiogenic and pro-inflammatory axis in cancer is the CXCL-ELR⁺/CXCR pathway, particularly in metastatic kidney cancer. The aim of this thesis was to develop small molecules able to inhibit the ligand/receptor interaction (CXCL / CXCR1-2) in order to have both anti-inflammatory and anti-angiogenic activities. The 2-aminobenzothiazinone chemical pattern was chosen for the preparation of 3 new classes of inhibitors. Divergent synthesis strategies were used to obtain the members of families 1 & 2, although the conditions have been adapted according to the reactivity of each substrate. The last family of molecules was prepared according to a linear synthesis. However, this latter strategy displayed some limitations during the last step. Biological evaluations revealed a promising compound exhibiting an IC₅₀ of 0.6 µM on the 786-O cell line together with the inhibition of the chemotaxis of cells expressing CXCR1-2 receptors. Further studies on zebrafish are planned with this compound in order to study its ability to interfere with the angiogenesis phenomenon *in vivo*.

Keywords: ELR⁺-CXCL cytokine, CXCR1 and CXCR2 inhibitors, angiogenesis, inflammation, 2-aminobenzothiazinones.

Remerciements

Il me sera difficile de remercier tout le monde dans un nombre de pages limité et sans oublier de noms, car c'est grâce à l'aide et au soutien de nombreuses personnes que je suis devant vous aujourd'hui.

Tout d'abord, je souhaite exprimer mon immense gratitude aux membres du jury : Pr. Dominique GUIANVARC'H, Dr. Emmanuel MOREAU et Dr. Maëva DUFIES qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse, et en particulier au Pr. Dominique GUIANVARC'H de me faire l'honneur d'être la présidente de ce jury.

De toute évidence, je ne peux poursuivre ces remerciements sans une mention spéciale au Dr. Emmanuel MOREAU sans qui je n'aurais jamais mis un pied dans la recherche. Sept ans ont passé et pourtant la passion que tu m'as transmise continue de faire son chemin. Je serai éternellement reconnaissante pour tout ce que tu as fait pour moi depuis le début jusqu'à encore hier. Tu as toujours su trouver les mots pour m'encourager à continuer, à me dépasser et surtout à ne jamais abandonner. Tu m'as transmis des valeurs inestimables et je suis si honorée que tu aies accepté d'être rapporteur de cette thèse : Manu, même un « merci pour tout » ne sera jamais suffisant.

J'aimerais également remercier tout particulièrement Maëva qui a consacré un peu de son temps précieux pour me former en biologie à la culture cellulaire et aux tests vitro. Merci pour ta patience et surtout pour avoir accepté une chimiste en biologie ! Tu es pétillante et ce fut un plaisir d'apprendre à tes côtés. Merci pour ta réactivité (surtout ces derniers mois) quand j'insistais LOURDEMENT pour avoir les résultats bio. Ton écoute, lors de mes périodes de désespoir, a été un soutien indéniable. Je n'oublierais jamais notre duo « coup de cœur » Chimiste-Biologiste.

J'adresse mes sincères remerciements au Dr. Rachid BENHIDA, sans lequel je n'aurais pu réaliser ces travaux. Merci pour ta confiance dès ma première semaine de stage en Master recherche et d'avoir vu en moi une candidate potentielle pour ce sujet de thèse. Toutes les responsabilités que tu m'as accordées au sein du laboratoire m'ont permises de m'épanouir et de gagner en assurance. Grâce à toi, j'ai développé des compétences au-delà de la chimie et je repars aujourd'hui avec un bagage bien étoffé. Ce fut un plaisir d'organiser une partie du symposium Franco-Japonais à tes côtés. Je ne pourrais terminer sans te remercier pour ton écoute : toujours attentive et bienveillante.

Merci au Pr. Luc DEMANGE, d'avoir accepté de codiriger ce projet, même à distance. Tes nombreux conseils lors de mes préparations d'oraux m'ont permis d'acquérir une aisance que je sous-estimais jusqu'alors. Ces derniers mois ont mis nos échanges à rude épreuve mais je te remercie pour ta patience, et de m'avoir poussé à dépasser mes limites. Ce fut délicat mais aujourd'hui je suis fière du travail accompli.

Merci au Dr. Gilles PAGES d'avoir accepté de m'accueillir au sein de son équipe afin de me permettre de réaliser les manip' bios. Ce fut un immense plaisir de partager ensemble ces nombreuses discussions scientifiques, sur l'origine du projet et les poursuites envisagées. C'était toujours très instructif et passionnant.

Je souhaite également remercier CDP innovation pour le soutien financier, et en particulier Messieurs Jean-Roger DESMURS et Jean-Marc PARIS pour le temps qu'ils ont consacré aux discussions lors de mes différentes présentations de travaux de thèse.

Maria, Audrey un très grand merci pour votre gentillesse et vos sourires. J'ai énormément apprécié vos conseils et vos remarques toujours très constructives lors des échanges que nous avons eus. Nadia, ton côté maternel est pour nous un véritable repère. Je tiens à te remercier infiniment pour ton écoute, ton dévouement et surtout pour ta tendresse. Heureusement que tu étais là, présente jusqu'au bout.

Je ne peux clôturer ces 3 années sans remercier mes collègues formidables, qui ont tous contribué à leur niveau à rendre cette thèse plus agréable et joviale.

Anthony, je ne sais par où commencer pour te remercier - *sans aucune restriction*- de tout ce que tu as fait pour moi pendant ces quatre longues années et surtout en ces derniers mois interminables. Depuis mes débuts en stage tu étais là et jamais tu n'as failli à ta mission. Tu t'es toujours rendu disponible pour m'écouter (souvent râler), m'aider, me conseiller, m'épauler. Tu as été l'un de mes piliers essentiels pour ne pas que tout s'écroule. Si j'ai tenu jusqu'au bout c'est en partie grâce à toi et tes mots toujours boostant, tes petits sms matinaux, tes compliments bien à toi sur mes splendides tenues et coiffures, alors juste un **immense merci**, pour ton soutien scientifique mais aussi personnel. J'aurais aimé dire que ton « *inéarrable* » humour ainsi que toutes les discussions enrichissantes des pauses café allaient me manquer, mais en réalité c'est déjà le cas. J'ai conscience d'avoir une chance inouïe pour avoir toujours mon billet composté : rien que pour ça je ne pourrai t'oublier. Il me serait possible d'écrire encore des lignes mais les autres vont finir par être jaloux (même si on sait tous que tu es mon préf.). J'espère simplement que tes « *qualités extraordinaires de chimistes auront un tant soit peu déteint sur ma modeste personne* ». MERCI Jojo : pour TOUT et pour ton infailible bienveillance !

Pascal, discret et pourtant si présent. Je me souviendrais toujours de ce premier séminaire du Cancéropôle lors duquel tu t'inquiétais pour la jeune et insouciant personne que j'étais. Je considère l'immense chance que j'aie eu d'avoir pu accéder à TON bureau par succession. Même avec ton nouveau poste de ministre je savais que j'avais juste à entrebâiller la porte pour bénéficier de ton écoute et de ta sagesse : si précieuses. Tes multiples conseils sont inestimables. Je tiens vraiment à te remercier profondément d'avoir toujours souhaité le meilleur pour moi. Nos nombreuses conversations scientifiques ou personnelles vont terriblement me manquer. Tu resteras mon Pascalou.

*Ces années n'auront pas été ce qu'elles ont été sans la **DREAM-TEAM** des Spies & Jerry. Votre soutien au-delà de la thèse : dans tous les projets fous que j'ai entrepris, m'a fait comprendre que certaines personnes sont spéciales et peuvent devenir bien plus que de simples collègues. **Pour ça je n'ai pas les mots tant ça n'a pas de prix.***

Cécé, tout commença avant cette thèse, mais tout se concrétisa pendant celle-ci. Nos confidences, nos repas de grosses, nos pétages de plombs, nos petites sessions ski, nos derniers moments cocooning devant les merveilleux films de Noël. J'ai trouvé grâce à toi une amie aussi folle que moi, qui peut aussi bien dévorer une tablette de chocolat, qu'un saucisson mais surtout quelqu'un qui râle bien plus que moi !! Je n'oublierai jamais non plus ton extrême gentillesse lorsqu'il s'agit de partager 5 chocolats en trois : 3 pour toi et 1 pour chacune (*j'en ris encore*). Tu as été une véritable découverte et je suis ravie que nos chemins continuent dans la même direction. Sache que peu importe les km qui vont nous séparer je serai toujours là pour toi. Merci pour toutes tes petites attentions, ton dévouement, ton écoute, et ton amitié. Je vais arrêter mes éloges ici de peur de te faire gonfler les pieds.

Chlo, je ne saurais expliquer pourquoi dès ce premier jour en face à face ça a matché, mais il faut avouer que la vie fait bien les choses. Quand tu m'as abandonné pour ton bureau au 6^{ème} j'ai eu peur que tout bascule, que les choses changent, mais finalement notre TRIO a tenu bon. Merci d'avoir entretenu ce lien tous les matins aux pauses café, durant toutes nos soirées filles. Ces derniers mois ont été éprouvants mais partager ensemble cette grossesse particulière a adouci ces moments d'épreuve. J'ai tenu bon grâce à toi ! Tu as

toujours eu des mots justes et rassurants, je suis tellement chanceuse d'avoir croisé ta route. Je suis si fière de ton parcours ma petite Dr. MAUCORT, la première d'une grande lignée. Et merci de m'avoir initiée à la plongée, en espérant partager un jour cette passion ensemble.

Guigui, malgré des débuts chaotiques tu as rejoint la team et j'en suis la plus ravie. Je ne saurais te remercier pour tes qualités exceptionnelles de psy mais aussi de prof de chimie. Tu as su alléger tous les obstacles qu'ils soient professionnels ou personnels. Tu as été mon binôme jusqu'au bout et je n'ai pas les mots pour te rendre tout ce que tu m'as apporté en tant que collègue, oreille attentive, soutien et ami. Je ne retrouverai jamais un acolyte de karaoké des vendredis après-midi aussi talentueux que toi. Tu mérites d'être heureux et de t'épanouir dans ton avenir proche, mais STP arrête de me proposer tes noix du Brésil au goût grenier car tu ME GONFLES.

Vous êtes tous les trois des personnes formidables et brillantes à qui je souhaite tout le meilleur pour l'avenir. Les Top-Chef parties vont terriblement me manquer et je vais sincèrement vous regretter (*faut pas pleurer on a dit !*).

Sarah, tu es une merveilleuse rencontre. Tu as donné un second souffle à notre étage, tu as réussi là où j'ai échoué à fédérer le groupe, et même à faire lever le weekend tous ceux qui ne se lèvent pas la semaine pour les randos, le beach-volley. Merci infiniment pour ta gentillesse, ta tendresse et ton autorité bien sûre. Ce n'est plus seulement loulou qui râle ! Dommage que tu sois arrivée si tard, mais j'aurai toujours un carré de chocolat pour me consoler.

Des **millions de mercis** aux sujets de sa Majesté Queen Loulou XIV, pour les moments de partage au labo ou lors des repas du midi (enfin plutôt 12h45), mais également les moments de rire, de chant, de complicité. Je pense particulièrement à Steve (pogneur agrégé) qui me suit depuis l'IUT, mais aussi à Mathilde, Maurrinne, Poulet et Mélanie. Je n'oublierai jamais tous les merveilleux moments passés ensemble : le weekend ski, les randos, les apéros-plage, les (trop) nombreuses raclettes, les repas de Noël, et j'en passe. Sans oublier Aicha, Mauro, Julien, Marie, Rost et Ngoan. Ce fut agréable de travailler avec vous tous dans cette bonne humeur quotidienne.

Aux stagiaires, pour certains devenus de véritables amis. Merci à toi Loïc, qui même après tout ce temps et cette distance continues d'être présent. Je te souhaite sincèrement le meilleur pour la suite au niveau professionnel mais aussi personnel. Tu mérites que tous tes efforts et sacrifices soient récompensés, et je suis certaine qu'une très belle carrière t'est promise.

A toutes les personnes des étages inférieurs qui ont partagé de près ou de loin un peu cette aventure rocambolesque : Lorenzo, Benjamin, Aurélien, Romain, Simon, Laure, Corentin, Marie, mais aussi Adrien, Raph (fondateur de la FFP) et tous ceux que j'oublie... Je repense aujourd'hui avec beaucoup d'affection aux nombreux repas des non-permanents et apéros toujours joyeux, qui ont été de vraies échappatoires.

A ceux qui prennent la relève, Paula, Marc et Kevin et qui ont le foie déjà bien accroché. Merci pour votre extrême gentillesse, pour tous nos moments de rigolades et pour les heureux souvenirs que vous me permettez d'emporter. Ma Paula, ma bitctchieeeeees, ton grand cœur va me manquer mais je sais que la couronne de Queen Loulou XIV est entre de bonnes mains. Long règne à toi V Queen !

Un petit détour hors labo et plus personnel qui me permet de remercier toutes les personnes qui se cachent dans l'ombre de cette thèse.

D'abord à toutes mes coéquipières de Team-Gym qui m'ont permis de réaliser un de mes rêves en décrochant notre participation aux Championnats de France. En particulier Laura et Sybil pour nos discussions

filles à refaire le monde, et nos soirées parfois (souvent) trop arrosées. Tous nos nombreux moments m'ont permis de déconnecter totalement de cette thèse et de renouer avec la gym.

Emma, ou devrais-je dire Dr. Rnd, tu seras à jamais mon coup de cœur amical. Depuis 5 ans tu partages mes aventures toujours plus folles les unes que les autres. Du master à la thèse, de Clermont à Copenhague, de Lyon à Nice on en a fait du chemin. Tu m'as permis de réaliser un merveilleux voyage en Islande qui a été une véritable bouffée d'oxygène. Ce voyage est à la hauteur de cette thèse, une aventure riche totalement folle mais non pas sans galères. Tu es une véritable source d'inspiration et je suis tellement fière d'être ton amie. Mille mercis d'être toujours là et surtout d'être HYPER-BELLE.

A Ludo, à qui je décerne aujourd'hui son doctorat en tant que meilleur soutien face aux montagnes russes émotionnelles. Tu es devenu tout aussi expert en chimie que tu ne l'es en maçonnerie ou SNCF. Tu as supporté mes angoisses, épongé mes pleurs, ouvert tes bras lorsque j'étais au plus bas. Tu as toujours eu les mots justes pour ne pas que je perde pied. Cette période a été éprouvante tout autant pour toi que pour moi, mais nous entamons l'avenir encore plus soudés. Je te remercie de n'avoir jamais renoncé, d'avoir enduré mes humeurs, d'avoir veillé des soirs à mes côtés pour que je termine mes pages d'écritures, d'avoir toujours été aux petits soins (et pas seulement lors de la rédaction). Tu es ma boule d'énergie et j'espère te rendre fière aujourd'hui et les jours à venir.

Je ne pourrais terminer sans remercier du plus profond de moi, mes parents et mon frère. Tous les 3 vous m'avez toujours poussé à aller plus loin, à croire en mes rêves et à m'y accrocher. Quand je n'avais plus la force vous avez pris le relais, quand j'étais insupportable vous avez fait abstraction, quand il a fallu relire les fautes et répéter vous étiez là, encore et toujours. Je n'ai pas les mots pour décrire tout l'amour que je ressens ainsi que toute la gratitude d'avoir des parents et un frère comme vous. Vous m'avez inculqué des valeurs de respect, de tolérance, de bienveillance, de persévérance. Si j'ai évolué jusque-là aujourd'hui et que j'ai su m'adapter et faire face à toutes les situations de la vie professionnelle ou personnelle c'est grâce à vous. Par ce parcours et les défis que j'ai pu relever j'espère vous avoir rendus fiers. Papa, maman, merci d'être les merveilleux parents que vous êtes et de m'avoir toujours montré le meilleur dans ce monde assez cruel. Théo, mon frère d'amour, je suis si fière de toi, de l'Homme que tu es devenu et du chemin que tu as déjà parcouru. Je suis persuadée que tu réussiras bien au-delà de tes espérances et nous serons toujours derrière toi.

Je vous aime sans conditions, sans restriction.

Table des matières

RÉALISATIONS SCIENTIFIQUES	1
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	3
INTRODUCTION GENERALE.....	5
INTRODUCTION.....	7
CHAPITRE 1 : CANCER ET THERAPIES ACTUELLES.....	11
1.1 LE CANCER	13
1.1.1 <i>Les chiffres clés du cancer en France</i>	13
1.2 LES THÉRAPIES ANTI-CANCÉREUSES : DÉFINITIONS ET LIMITES.....	15
1.2.1 <i>Les thérapies usuelles</i>	16
1.2.1.1 La chimiothérapie.....	16
1.2.1.2 Les thérapies ciblées	18
1.2.3 <i>Les thérapies émergentes</i>	19
1.2.3.1 Immunothérapie	19
1.2.3.2 La polypharmacologie	21
1.3 ANGIOGENÈSE ET INFLAMMATION : DEUX GRANDS MARQUEURS DU CANCER INTERCONNECTÉS	23
1.3.1 <i>L'inflammation</i>	24
1.3.1.1 Inflammation physiologique	24
1.3.1.2 Inflammation tumorale	25
1.3.2 <i>L'angiogenèse</i>	26
1.3.2.1 Angiogenèse physiologique.....	26
1.3.2.2 Angiogenèse tumorale	28
1.3.3 <i>Conclusion du chapitre 1</i>	30
CHAPITRE 2 : CIBLER L'ANGIOGENESE ET L'INFLAMMATION DE FAÇON CONCOMITANTE COMME NOUVELLE APPROCHE THERAPEUTIQUE.	31
2.1 LES CYTOKINES CXCL-ELR ⁺ ET LEURS RÉCEPTEURS	33
2.1.1 <i>La famille des chimiokines CXCL</i>	33
2.1.2 <i>La famille des chimiokines CXCL-ELR⁺ et leurs récepteurs CXCR.</i>	35
2.1.2.1 Rôle, structure et expression de l'interleukine-8 : CXCL8	35
2.1.2.2 Les récepteurs aux cytokines CXCL-ELR ⁺	36
2.1.2.3 L'exemple particulier des récepteurs CXCR1 et CXCR2	38
2.2 LES DIFFÉRENTS MODES DE RÉGULATION DE L'AXE CXL-ELR ⁺ /CXCR1-2	40
2.2.1 <i>Stratégies indirectes</i>	41
2.2.2 <i>Les stratégies directes pour cibler l'axe CXCL-ELR⁺-CXCR</i>	43

2.2.2.1 Anticorps neutralisants CXCL8	43
2.2.2.2 Anticorps neutralisants CXCR1/2	44
2.2.2.3 Les inhibiteurs peptidiques de CXCR1/2	44
2.2.2.4 Petites molécules inhibitrices connues des récepteurs CXCR1 et CXCR2	45
2.2.3 Conclusion du chapitre 2	50
CHAPITRE 3 : LES DIARYLUREES COMME PREUVE DE CONCEPT	51
3.1 TRAVAUX ANTÉRIEURS	53
3.1.1 Contexte du projet de thèse.....	53
3.1.2 Développement d'une molécule hit	53
3.1.3 Conception de nouvelles petites molécules inhibitrices, pour l'axe CXCL-ELR+/CXCR1-2	60
CHAPITRE 4 : SYNTHÈSE DE MODULATEURS ANTAGONISTES DES RECEPTEURS CXCR1/2	63
4.1 LES 1,3-BENZOTHIAZINE-4-ONES.....	65
4.2 SYNTHÈSE	71
4.2.1 Les différentes stratégies de synthèse envisagées	71
4.2.2 Préparation des composés pour les familles A et B selon la stratégie de synthèse décrite par Wolf.	71
4.2.2 Synthèse du précurseur pour la préparation des familles A et B: 1-(4-oxo-4H-benzo[e][1,3]thiazin-2-yl)guanidine	76
4.2.3 Synthèse des molécules de la famille A	77
4.2.3.1 Optimisations réactionnelles pour la préparation de la 2-((2-hydroxyphenyl)amino-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one.	77
4.2.3.2 Synthèse des dérivés de la famille A à partir d'anilines ou d'aminophénols.	80
4.2.4 Synthèse de la famille B.....	84
4.2.5 Vers la synthèse de la famille C	88
4.3.3.1 Variations du groupement R.	88
4.3.3.2 Du cycle benzène vers une pyridine.....	93
4.3.3.3 Nouvelles stratégies de synthèse pour développer la famille C.....	94
4.3.4 Conclusion du chapitre 4	98
CHAPITRE 5 : ÉVALUATIONS BIOLOGIQUES	99
5.1. PRÉSENTATION DES DIFFÉRENTS TESTS	101
5.1.1 Évaluer la stabilité des composés dans des conditions définies	101
5.1.2 Évaluer la capacité d'inhibition de la viabilité cellulaire des composés.....	101
5.1.3 Évaluer la capacité antagoniste des composés envers l'axe CXCL-ELR+/CXCR1-2	102
5.2 RÉSULTATS.....	103
5.2.1 Résultats des tests de stabilité	103

5.2.2 Résultats des tests de viabilité cellulaire	105
5.2.3 Résultats de la capacité antagoniste de CXCR1/2 des composés	108
5.3 CONCLUSION DU CHAPITRE 5	112
CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES	113
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	119
1- MATERIAL AND METHOD	121
2- CHEMICAL SYNTHESIS	123
2.1 FAMILY A.....	127
2.2 FAMILY B.....	148
2.3 FAMILY C.....	165
2.4 FAMILY D	173
3. BIOLOGICAL ASSAYS	178
BIBLIOGRAPHIE	179

Table des figures et schémas

FIGURE 1 : A. PHÉNOMÈNES D'INFLAMMATION ET D'ANGIOGENÈSE INDUITS PAR LA LIAISON DU LIGAND CXCL SUR SON RÉCEPTEUR CXCR. B. INHIBITION DE L'INTERACTION ENTRE LE LIGAND ET SON RÉCEPTEUR, AVEC DE PETITES MOLÉCULES PROVOQUANT L'INHIBITION DE LA SIGNALISATION SOUS-JACENTE À CXCR.	8
FIGURE 2 : : PRÉSENTATION DE SIX MÉCANISMES CELLULAIRES RESPONSABLES DE LA RÉSISTANCE DES CELLULES CANCÉREUSES AUX TRAITEMENTS.	14
FIGURE 3 : CHRONOLOGIE DES DIFFÉRENTES THÉRAPIES ANTI-CANCÉREUSES.	15
FIGURE 4 : LES DIFFÉRENTS SITES D'ACTION DES MÉDICAMENTS DE CHIMIOTHÉRAPIE.	16
FIGURE 5 : INHIBITION DES INTERACTIONS PDL-1/PD-1 ET B7/CTLA-4.	20
FIGURE 6 : LES DIFFÉRENTES STRATÉGIES DE CONCEPTIONS DES LIGANDS MULTI-CIBLES.	22
FIGURE 7 : LES DIFFÉRENTES ÉTAPES D'UNE RÉACTION IMMUNITAIRE. DE LA LÉSION CUTANÉE OU INFECTION, EN PASSANT PAR L'ACTIVATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE, JUSQU'À LA RÉPARATION DU TISSU OU L'ÉLIMINATION DE L'AGENT PATHOGÈNE. SOURCE : FIGURE INSPIRÉE ET ADAPTÉE DU SITE HTTP://WWW.MAXICOURS.COM	25
FIGURE 8 : LES DIFFÉRENTS RÉCEPTEURS DU VEGF ET LEURS ACTIONS ASSOCIÉES.	27
FIGURE 9 : STABILISATION DE HIF α DANS UN CAS PATHOLOGIQUE EN COMPARAISON AU FONCTIONNEMENT NORMAL DE LA VOIE HIF α . LA STABILISATION DE HIF α SUITE À UN STRESS HYPOXIQUE, OU PAR MUTATION/ DÉLÉTION DU GÈNE VHL (DANS LE CANCER DU REIN) ENTRAÎNE LA SUREXPRESSION DU FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ENDOTHÉLIUM VASCULAIRE VEGF.	28
FIGURE 10 : LES DIFFÉRENTES FAMILLES DES CHIMIOKINES CXCL.	34
FIGURE 11 : REPRÉSENTATION DE L'ÉQUILIBRE DES CHIMIOKINES ANGIOGÉNIQUES (ELR ⁺) ET ANGIOSTATIQUES (ELR ⁻) EN PHYSIOLOGIE NORMALE COMPARÉ À UN CONTEXTE PATHOLOGIQUE. *CXCL12 NE PRÉSENTE PAS LE MOTIF ELR ⁺ MAIS EST UNE CHIMIOKINE ANGIOGÉNIQUE.	34
FIGURE 12 : MÉCANISME D'ACTIVATION DES RÉCEPTEURS COUPLÉS À UNE PROTÉINE G. LA DISSOCIATION DES 3 SOUS-UNITÉS DE LA PROTÉINE-G, PERMET À LA SOUS-UNITÉ ALPHA D'ACTIVER DIFFÉRENTS EFFECTEURS INTRACELLULAIRES.	37
FIGURE 13 : LES DIFFÉRENTES FAMILLES DE RÉCEPTEURS AUX CHIMIOKINES CLASSÉS SELON LA MÊME NOMENCLATURE UTILISÉE POUR LES CHIMIOKINES, À SAVOIR SELON LA DISPOSITION DES PREMIÈRES CYSTÉINES (C) ET DES ACIDES AMINÉS LES SÉPARANT (X).	37
FIGURE 14 : MÉCANISME SIMPLIFIÉ D'INTERNALISATION DES RÉCEPTEURS CXCR1 ET CXCR2 APRÈS ACTIVATION PAR LEUR LIGAND. LA LIAISON DU LIGAND CONDUIT À L'ACTIVATION DU RCPG ET LA TRANSDUCTION DU SIGNAL (ÉTAPE1). LE RECRUTEMENT DES ARRESTINES AU NIVEAU DU DOMAINE INTRA CELLULAIRE C-TERMINAL DU RÉCEPTEUR INDUIT L'INTERNALISATION DE CE DERNIER (ÉTAPES 2 ET 3). LES RCPGS INTERNALISÉS SONT TRIÉS (ÉTAPE 4) VERS DES COMPARTIMENTS DE DÉGRADATION (ÉTAPE 5A) OU DE RECYCLAGE (ÉTAPE 5B). ⁷⁸	39
FIGURE 15 : PRÉSENTATION DES INHIBITEURS DIRECTS ET INDIRECTS DE L'AXE CXCL-ELR+/CXCR.	40
FIGURE 16 : INHIBITION DES BOUCLES I1 ET I3 DE CXCR1-2 PAR LES PEPDUCINES.	45
FIGURE 17 : EXEMPLES D'ANTAGONISTES DE CXCR1-2 DE TYPE URÉE.	46
FIGURE 18 : EXEMPLE D'ANTAGONISTE DE CXCR1-2.	47

FIGURE 19 : LA REPERTRAXINE UN EXEMPLE D'INHIBITEUR DE CXCR1-2 DE TYPE SULFONAMIDE.....	47
FIGURE 20 : STRUCTURE DU COMPOSÉ DF2162 DÉVELOPPÉ PAR DOMPÉ.....	48
FIGURE 21 : EXEMPLES D'ANTAGONISTES DÉVELOPPÉS PAR ASTRAZENECA.....	49
FIGURE 22 : CONCEPTION DE NOUVEAUX ANTAGONISTES À PARTIR DE LA MOLÉCULE SB225002.....	54
FIGURE 23 : COMPARAISON DES IC ₅₀ MESURÉES AVEC LE TEST XTT (48 H) DES COMPOSÉS MCK 133 ET MCK 140 AVEC LE COMPOSÉ SB225002 (70 > IC ₅₀ > 100 nM SUR CES LIGNÉES CELLULAIRES). LES RÉSULTATS SONT EXPRIMÉS EN nM, ET TOUTES LES VALEURS IC ₅₀ DONNÉES SUR LE GRAPHIQUE ONT MONTRÉ UN ÉCART TYPE DE 10%. LES RÉSULTATS SONT REPRÉSENTÉS PAR LA MOYENNE DE TROIS EXPÉRIENCES INDÉPENDANTES.....	55
FIGURE 24 : IMAGES DE MIGRATION CELLULAIRE OBSERVÉES PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DÉMONTRANT UNE DIMINUTION DE LA MIGRATION EN PRÉSENCE DE TRAITEMENT À 1 µM (MCK 133 ET MCK 140). TEST DE MIGRATION ADAPTÉ DU PRINCIPE DE LA CHAMBRE DE BOYDEN AFIN DE DÉTERMINER LA CAPACITÉ DES COMPOSÉS MCK133 ET MCK140 À INHIBER L'INTERACTION ENTRE CXCL5 ET LES RÉCEPTEURS CXCR1 ET CXCR2.....	56
FIGURE 25 : INHIBITION DE LA PHOSPHORYLATION DE ERK EN PRÉSENCE DU MCK 140, DÉMONTRANT QUE CE COMPOSÉ INHIBE LA VOIE DE SIGNALISATION DE L'INFLAMMATION, SOUS-JACENTE À L'ACTIVATION DE CXCR1 ET CXCR2.....	57
FIGURE 26 : EFFET DU MCK140 SUR DES CELLULES CANCÉREUSES DU REIN RÉSISTANTES AU SUNITINIB.....	57
FIGURE 27 : TEST DE CLONOGENICITÉ SUR CELLULES 786-O ET 786-R PERMETTANT D'OBSERVER LA FORMATION DE COLONIE OU NON EN PRÉSENCE ET EN ABSENCE DE TRAITEMENT. CES RÉSULTATS RÉSULTENT D'IMAGES MICROSCOPIQUES APRÈS UNE INCUBATION DE 10 JOURS ET UNE COLORATION AU BLEU DE GIESMA.....	58
FIGURE 28 : RÉSULTATS IN_VIVO SUR DES SOURIS XÉNOGREFFÉES AVEC DES CELLULES DU RCC. LORSQUE LA TUMEUR ATTEIGNAIT 100 mm ³ , LES SOURIS ÉTAIENT TRAITÉES CINQ FOIS PAR SEMAINE PENDANT DEUX SEMAINES PAR GAVAGE AVEC UN PLACEBO (VÉHICULE DEXTROSE EAU) OU AVEC LE MCK140 (100 mg/kg). A : ÉVOLUTION DU VOLUME TUMORAL EN PRÉSENCE DU TRAITEMENT COMPARÉ AU CONTROL. B : ÉVOLUTION DE LA MASSE TUMORALE EN PRÉSENCE DU TRAITEMENT COMPARÉ AU CONTROL. ** = p < 0,01 ; *** = p < 0,001.....	59
FIGURE 29 : MISE EN ÉVIDENCE DES SIMILITUDES ENTRE LES DIARYLURÉES ET LES BENZOTHIAZINONES.....	60
FIGURE 30 : PHARMACOMODULATIONS ENVISAGÉES POUR L'OBTENTION DE NOUVELLES MOLÉCULES POSSÉDANT UN NOYAU 2-AMINOBENZOTHIAZINONE, INSPIRÉES DU COMPOSÉ SB225002, DE LA MOLÉCULE HIT MCK 140 ET DES RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES DE RSA OBTENUS AVEC LES FAMILLES DE DIARYLURÉES ET DIARYLTHIOURÉES.....	61
FIGURE 31 : QUELQUES EXEMPLES DE DÉRIVÉS 1,3-BENZOTHIAZINONES ET 2-AMINO-1,3-BENZOTHIAZINONES CONNUS AINSI QUE LEURS DIFFÉRENTES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES. (SOURCE : FIGURE ADAPTÉE DU PAPIER DE LI JUNFANG ET AL.) ¹³¹	65
FIGURE 32 : STRUCTURE CHIMIQUE DES COMPOSÉS BZT 043 (NCT04044001) ET PBTZ 169 (NCT03334734), EN PHASE II.....	66
FIGURE 33 : PRÉSENTATION DES DIFFÉRENTES FAMILLES AVEC LES MODIFICATIONS STRUCTURALES ENVISAGÉES.....	71
FIGURE 34 : SCHÉMA DE SYNTHÈSE DU COMPOSÉ 2A PROVENANT D'UNE SUBSTITUTION NUCLÉOPHILE DU COMPOSÉ 5 OBTENU PRÉCÉDEMMENT SUR LE 2-BROMOPYRIDIN-3-OL (4A).....	72
FIGURE 35 : STRUCTURES CHIMIQUES ET RENDEMENT DES COMPOSÉS 2(A-s) OBTENUS POUR LA FAMILLE A, AVEC DEUX SÉRIES DISTINCTES : LA SÉRIE DES AMINOPHÉNOLS ET LA SÉRIE DES ANILINES.....	81

FIGURE 36 : CONDITIONS RÉACTIONNELLES GÉNÉRALES, PROPOSÉES EN FONCTION DU SUBSTRAT.....	83
FIGURE 37 : STRUCTURES CHIMIQUES DES DÉRIVÉS 2A-H OBTENUS SUIVANT LES CONDITIONS RÉACTIONNELLES INITIALES.	85
FIGURE 38 : STRUCTURES CHIMIQUES DES COMPOSÉS 2I-Q OBTENUS SELON LA PROCÉDURE UTILISANT L'APTS EN REMPLACEMENT DE L'AcOH.	86
FIGURE 39 : LES DEUX VOIES DE SYNTHÈSE SÉLECTIONNÉES POUR L'OBTENTION DES MOLÉCULES. POUR LES SUBSTITUANTS ACTIVANTS (MÉTHYLE, HALOGÈNE) : ACIDE ACÉTIQUE, 15-30 MIN, 120°C EST PRIVILÉGIÉE. POUR LES SUBSTITUANTS DÉSACTIVANTS (NITRO, TRIFLUORO) : APTS, DIOXANE, 15-30 MIN, 130-150°C.....	87
FIGURE 40 : STRUCTURE ET RENDEMENTS DES COMPOSÉS 1T ET 1U OBTENUS SELON LA VOIE 2 DE SYNTHÈSE (APTS).....	87
FIGURE 41 : REPRÉSENTATION DES DEUX MODIFICATIONS PRINCIPALES POUR LA FAMILLE C.	88
FIGURE 42 : STRUCTURE DES DIFFÉRENTES THIOURÉES (15) INTERMÉDIAIRES OBTENUES.....	90
FIGURE 43 : STRUCTURES CHIMIQUES DU COMPOSÉ 3E OBTENU.	91
FIGURE 44 : STRUCTURE DU COMPOSÉ 3C OBTENU SELON LES NOUVELLES CONDITIONS DE RÉACTION.	92
FIGURE 45 : STRUCTURES DES COMPOSÉS OBTENUS POUR LA FAMILLE D.....	97
FIGURE 46 : STRUCTURES CHIMIQUES DU SEL XTT ET DU FORMAZAN.	102
FIGURE 47 : PHOTO DES INSERTS ET DES PUIXS POUR LE TEST DE LA CHAMBRE DE BOYDEN.....	103
FIGURE 48 : RÉVÉLATION AU CRISTAL VIOLET DES CELLULES A498 AYANT MIGRÉ PAR L'ATTRACTION DE CXCL8, EN PRÉSENCE DE TRAITEMENT À UNE CONCENTRATION DE 5MM, EN COMPARAISON AVEC LE CONTRÔLE (ABSENCE DE TRAITEMENT) ET LE MCK 133 (MOLÉCULE DE RÉFÉRENCE).	109
FIGURE 49 : RÉVÉLATION AU CRISTAL VIOLET DES CELLULES A498 AYANT MIGRÉ PAR L'ATTRACTION DE CXCL8, EN PRÉSENCE DE TRAITEMENT À UNE CONCENTRATION DE 1 MM EN COMPARAISON AVEC LE CONTRÔLE (ABSENCE DE TRAITEMENT) ET LE MCK 140 (MOLÉCULE DE RÉFÉRENCE).	110
FIGURE 50 : PROPOSITION D'UTILISATION DU COMPLEXE BIOTINE-STREPTAVIDINE POUR CONFIRMER LA CIBLE BIOLOGIQUE ET IDENTIFIER LES CIBLES BIOLOGIQUES SECONDAIRES DE NOS COMPOSÉS.....	118
SCHÉMA 1 : CONCEPTION D'UN DOUBLE INHIBITEUR DE ERA ET VEGFR-2 INSPIRÉ DU TAMOXIFÈNE ET DE L'ACOLBIFÈNE. ²⁹	23
SCHÉMA 2 : PRÉPARATION DES DÉRIVÉS DE TYPE DIARYLURÉES OU DIARYLTHIOURÉES, À PARTIR D'UN ARYL ISO(THIO)CYANATE ET D'UNE AMINE AROMATIQUE (BENZOXAZOLE, BENZIMIDAZOLE OU BENZOTHIAZOLE).....	54
SCHÉMA 3 : PRÉSENTATION DES DIFFÉRENTES VOIES DE SYNTHÈSES POUR L'OBTENTION DU MOTIF 2-AMINO-BENZOTHIAZINONES, REPORTÉES DANS LA LITTÉRATURE.	66
SCHÉMA 4 : A. RÉTROSYNTHÈSE ENVISAGÉE POUR LA PRÉPARATION DES DÉRIVÉS COMPORTANT UN MOTIF DE TYPE 2-AMINOBENZOTHIAZINONE. B. SCHÉMA DE SYNTHÈSE DU COMPOSÉ 5 À PARTIR DES COMPOSÉS DISPONIBLES COMMERCIALEMENT : L'ACIDE 2-MERCAPTOBENZOÏQUE (6) ET DE LA CYANAMIDE (7).....	72

SCHÉMA 5 : PROPOSITION DU MÉCANISME DE FORMATION DU PRODUIT SECONDAIRE (8) ISSU DE L'HYDROLYSE DE LA 2-AMINO-4H-BENZO[E][1,3]THIAZIN-4-ONE (5). LE DOUBLET DE L'IMINE ENDOCYCLIQUE N'EST PAS DÉLOCALISABLE, RENDANT CETTE AMINE PLUS BASIQUE QUE L'AMINE PRIMAIRE.	74
SCHÉMA 6 : RÉTROSYNTHÈSE DU COMPOSÉ 1 MONTRANT L'INVERSION DES ESPÈCES NUCLÉOPHILES ET ÉLECTROPHILES.	75
SCHÉMA 7 : RÉACTION DE CONDENSATION ENTRE LES COMPOSÉS 6 ET 11 POUR FORMER LE PRÉCURSEUR 10. MÉCANISME RÉACTIONNEL PROPOSÉ.	76
SCHÉMA 8 : RÉACTION D'ADDITION-ÉLIMINATION ENTRE LE PRÉCURSEUR 10 ET LES ARYLAMINES 9.	77
SCHÉMA 9 : RÉTROSYNTHÈSE PROPOSÉE POUR LA PRÉPARATION DES COMPOSÉS 2.	84
SCHÉMA 10 : RÉTROSYNTHÈSE PROPOSÉE POUR L'OBTENTION DES DÉRIVÉS DE LA FAMILLE C QUEL QUE SOIT LA VARIATION ENVISAGÉE. ..	89
SCHÉMA 11 : SYNTHÈSE DES INTERMÉDIAIRES THIOURÉES (15) À PARTIR DES PRÉCURSEURS 2-CHLORO-4-NITROBENZOÏQUE, 2-CHLORO-5-NITROBENZOÏQUE.	89
SCHÉMA 12 : MÉCANISME PROPOSÉ POUR L'ÉTAPE DE CYCLISATION EN PRÉSENCE DE LiH.	91
SCHÉMA 13 : SYNTHÈSE ENVISAGÉE POUR L'OBTENTION DES ANALOGUES AVEC LE PRÉCURSEUR 2-CHLORO-5-(TRIFLUOROMÉTHYL)BENZOÏQUE.	92
SCHÉMA 14 : SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS 2-AMINOPYRIDOTHIAZINONES À PARTIR DES PRÉCURSEURS 22 ET 23.	93
SCHÉMA 15 : SUPPOSITION DE LA DOUBLE ADDITION BLOQUANT LA SUITE DE LA SYNTHÈSE À SAVOIR LA RÉACTION DE CYCLISATION SUIVANT UNE SUBSTITUTION AROMATIQUE INTRAMOLÉCULAIRE.	94
SCHÉMA 16 : STRATÉGIE DE SYNTHÈSE ENVISAGÉE ET MÉCANISME PROPOSÉ POUR LA PRÉPARATION DES COMPOSÉS DE TYPES N-(4-OXO-4H-BENZO[E][1,3]THIAZIN-2-YL)BENZAMIDE DE LA FAMILLE D.	97
SCHÉMA 17 : SYNTHÈSE ENVISAGÉE POUR LA FAMILLE D AVEC LES PRÉCURSEURS 10, 30 ET 31.	117

Table des tableaux

TABEAU 1 : DIVERS EXEMPLES D'INHIBITEURS INDIRECTS DE CXCL8.	41
TABEAU 2 : INHIBITEURS DIRECTS ET INDIRECTS DE L'AXE CXCL8/CXCR1-2 EN PHASE CLINIQUE.	50
TABEAU 3 : LES DIFFÉRENTES OPTIMISATIONS DE SYNTHÈSE POUR L'OBTENTION DU COMPOSÉ 1A.	79
TABEAU 4 : CONDITIONS D'OPTIMISATION POUR LA SYNTHÈSE DU PRÉCURSEUR 30.	95
TABEAU 5 : RESULTATS DES STABILITÉS SELON LES DIFFÉRENTES CONDITIONS.	103
TABEAU 6 : VALEURS D'IC ₅₀ (μM), POUR LES MOLECULES DES FAMILLES A ET B.	105

Réalisations scientifiques

Publications

New CXCR1/CXCR2 inhibitors represent an effective treatment for kidney or head and neck cancers sensitive or refractory to reference treatments. Maëva Dufies et al. Theranostics 2019; 9 (18): 5332-5346.

Posters

Design, synthesis and evaluation of di-aryleureas as a new antagonists for CXCR1-2 in oncology – Journées Franco-Italiennes de Chimie, SCI, Gênes (Italie) (avril 2018).

MCK-140, is a new antagonist for CXCR1-2, exerting both anti-inflammatory and anti-angiogenic effect in in-vitro and in-vivo. – European School of Medicinal Chemistry, Urbino (Italie) (juillet 2018).

Synthesis and studies of news CXCR1 and CXCR2 antagonists for application in oncology. – Journées Jeunes chercheurs de la SCT, Paris (février 2019).

Synthesis and studies of news CXCR1 and CXCR2 antagonists for application in oncology. – 26ème Journée de la chimie, SCF, Nice (avril 2019).

Design and synthesis of new inhibitors of CXCL-8/CXCR1-2 binding. – Séminaire du Cancéropôle, Saint-Raphaël (juin 2019).

Communications orales

Design and synthesis of new inhibitors of CXCL-8/CXCR1-2 binding – (Flash communication) – Séminaire du Cancéropôle, Saint-Raphaël (juin 2019).

Design, synthesis and evaluation of new antagonists for CXCR1-2 in oncology. – Séminaires annuels du laboratoire ICN (2018, 2019).

Synthesis and antagonist study of CXCR1 and CXCR2 Receptors for oncology applications. – 3rd WG Meeting- MuTaLig COST Action (février 2019). Distinction « Silver Price » par Genoschem.

Design and synthesis of new inhibitors of CXCL-8/CXCR1-2 binding – Réunion Interdisciplinaire Cancer du Rein (ReInCaRe) (décembre 2019).

*Chercheurs chimistes - biologistes:
Le duo gagnant pour le développement d'une nouvelle thérapie pour traiter les cancers du rein – en duo avec Dr. Maëva DUFIES lors de la Journée Plan cancer (février 2020). Distinction « Coup de Coeur du Jury » par la SATT-Sud-Est, la région Sud et le Cancéropôle.*

Liste des abréviations

-m :	<i>meta</i>	IRCAN :	Institute for Research on Cancer and Aging, Nice
-o :	<i>ortho</i>	ITK :	Inhibiteurs à Tyrosine Kinase
-p :	<i>para</i>	LC-MS :	Chromatographie en phase liquide couplée à une spectrométrie de masse
ADN :	Acide désoxyribonucléique	M :	Moléculaire
AINS :	Anti-inflammatoires non stéroïens	MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinases
APTS :	Acide <i>paratoluènesulfonique</i>	MMP :	Métalloprotéases Matricielles
ATP :	Adénosine Triphosphate	MTDL :	Ligands multi-cibles // Multi-Target Drug ligand
Bp :	Boiling point/point d'ébullition	NCT :	Number Clinical Trial
BPCO :	Bronchopneumopathie chronique obstructive	OMS :	Organisation mondiale de la Santé
CCM :	Chromatographie sur couche mince	PI3K :	Phosphoinositide 3-kinase
CKI :	Check Point Inhibitors	PKC :	Protéine Kinase C
CT :	Control	PLC :	Phospholipase C
CXCL :	Ligand de la famille des chimiokines	RCC :	Renal Cell Carcinoma
CXCR :	Récepteur aux chimiokines	RCPG :	Récepteur couplé à une protéine G
dba :	Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0)	RSA :	Relation-Structure Activité
DCM :	Dichlorométhane	RTK :	Récepteur Tyrosine Kinase
DMF :	<i>N,N</i> -diméthylformamide	SN_{Ar} :	Substitution Nucléophile aromatique
DMSO :	Diméthylsulfoxyde	TB :	Tuberculose
GDP :	Guanosine Diphosphate	TFA :	Acide trifluoroacétique
GTP :	Guanosine Triphosphate	TNF-α :	Facteur de nécrose tumorale- α
HIF :	Hypoxia-Inducible Factor	VEGF :	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
HPLC :	Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (High Performance Liquid Chromatography)	VEGFR :	Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
IC₅₀ :	Concentration inhibitrice médiane	XantPhos :	4,5-Bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène
ICN :	Institut Chimie de Nice	XTT :	Acide 3'-[1-(phénylaminocarbonyl)-3,4-tétrazolium]-bis (4-méthoxy-6-nitro)benzène sulfonique de sodium hydraté
IL :	Interleukine		
INCa :	Institut National du Cancer		

Introduction générale

Introduction

Le cancer est la seconde cause de mortalité, juste derrière les maladies cardio-vasculaires, avec 8,8 millions de décès en 2015 dans le monde.¹ Le terme général « cancer » englobe un grand groupe de pathologies, dont la principale caractéristique est la prolifération rapide et anarchique de cellules anormales de l'organisme.²

Le caractère multifactoriel du cancer le rend difficile à traiter et en fait l'une des maladies les plus étudiées. En effet, une cellule cancéreuse est caractérisée par différents paramètres liés à des mutations génétiques comme : une capacité à se multiplier rapidement et de manière anarchique, une habilité à envahir d'autres tissus et organes ainsi que des propriétés d'échappement aux traitements conventionnels. Elle est aussi capable d'induire des phénomènes complexes tels que l'inflammation et l'angiogenèse pour assurer sa survie. Ces deux acteurs majeurs de la progression tumorale résultent, entre autres, de l'activation d'une famille spécifique de récepteurs : les récepteurs aux cytokines. En effet, les chimiokines (CXCL) activent les récepteurs CXCR1 et CXCR2 induisant à la fois l'inflammation et l'angiogenèse (Figure 1A). Ces récepteurs sont exprimés sur les cellules endothéliales, les cellules du système immunitaire et sont surexprimés par les cellules cancéreuses.

L'interaction CXCL-ELR⁺/CXCR (ligand/récepteur), constitue donc une cible thérapeutique de choix pour le développement de nouveaux agents anticancéreux. Dans le cadre de ce travail, l'objectif a été de développer des antagonistes des récepteurs CXCR1 et CXCR2, capable d'inhiber la réponse biologique qui leur est associée, et ainsi de bloquer de façon concomitante les phénomènes d'inflammation et d'angiogenèse (Figure 1B).

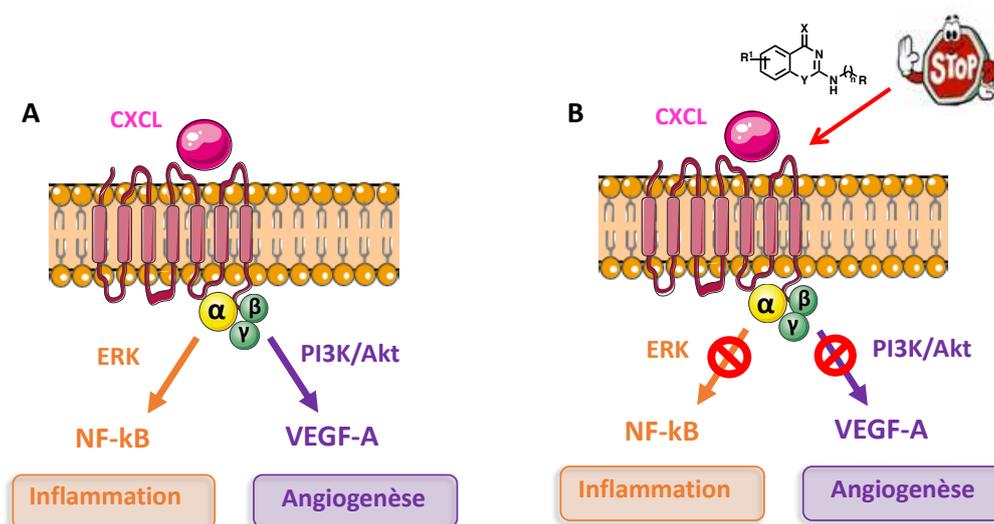


Figure 1 : A. Phénomènes d'inflammation et d'angiogenèse induits par la liaison du ligand CXCL sur son récepteur CXCR. B. Inhibition de l'interaction entre le ligand et son récepteur, avec de petites molécules provoquant l'inhibition de la signalisation sous-jacente à CXCR.

Dans ce contexte, un partenariat a été engagé entre l'Institut Chimie de Nice (ICN) et l'Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillessement de Nice (IRCAN). Les équipes impliquées dans ce projet ont travaillé en étroite collaboration pour réaliser la synthèse et les évaluations biologiques de nouveaux composés capables de bloquer l'interaction CXCL-ELR⁺/CXCR.

La vascularisation des cellules cancéreuses étant essentielle pour leur développement, nous avons choisi comme modèle d'étude l'un des cancers les plus vascularisés, présentant également une surexpression des récepteurs CXCR1 et CXCR2 : le cancer du rein. Ces particularités en font un modèle de choix pour étudier les phénomènes d'inflammation et d'angiogenèse.

Le premier chapitre de ce manuscrit évoquera succinctement les généralités sur les cancers et les thérapies actuelles et leurs limites. Puis nous présenterons les nouvelles stratégies thérapeutiques qui émergent depuis quelques années. Ainsi, le concept de polypharmacologie avec le développement de ligands multi-cibles sera abordé et servira d'appui pour la conception de nouveaux antagonistes des récepteurs CXCR1-2.

Dans un deuxième chapitre nous présenterons les cibles thérapeutiques : les récepteurs CXCR1 et CXCR2, et nous détaillerons leur implication biologique et physiologique dans les cancers, en particulier, dans le cancer du rein.³ Une énumération non-exhaustive des inhibiteurs directs et indirects, connus de l'interaction CXCL-ELR⁺/CXCR permettra d'identifier les différentes stratégies envisageables pour cibler cet axe biologique.

Dans le troisième chapitre, les travaux préliminaires réalisés par l'équipe « Molécules Bioactives », avec des composés de type diarylurée ou diaryltiourée seront évoqués. C'est en s'appuyant sur les résultats de ces travaux que nous avons envisagé la conception d'une nouvelle famille d'antagonistes pour les récepteurs CXCR1 et CXCR2, possédant un motif central original, dérivé des composés de type benzothiazinones.

La synthèse de ces nouvelles molécules sera détaillée dans le chapitre 4. Les difficultés rencontrées lors de la préparation des différents composés et les optimisations synthétiques que nous avons réalisées nous ont permis de définir diverses stratégies pour l'obtention de dérivés 2-aminobenzothiazinones.

Enfin le dernier chapitre sera consacré à l'évaluation biologique des composés synthétisés, afin de déterminer leur capacité à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du rein et celle à inhiber l'interaction CXCL-ELR⁺/CXCR.

Chapitre 1 :

Cancer et thérapies actuelles

1.1 Le cancer

1.1.1 Les chiffres clés du cancer en France

Selon les chiffres de l'Organisation Mondiale de la Santé, 8,8 millions de décès liés aux différentes formes de cancer ont été recensés en 2015. Selon un rapport publié par l'institut national du cancer (INCa), le nombre de décès liés au cancer en 2018 était estimé à 157 400 : 89 600 chez l'homme et 67 800 chez la femme. Bien que l'augmentation du nombre de cas de cancers tende à ralentir, voire même à se stabiliser ces dernières années, le cancer reste l'une des préoccupations majeures de santé publique.¹

L'une des principales caractéristiques des cancers est la prolifération rapide, incontrôlée et anarchique des cellules qui ne cessent de croître jusqu'à former des tumeurs de plus en plus grosses. Certaines cellules cancéreuses vont subir une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), ce qui les rend invasives et entraîne la formation de métastases. Les cancers sont ainsi classés suivant leur stade d'évolution :

- **Le stade localisé**, où la tumeur est primitive (ou cancer primitif) et reste à l'intérieur de l'organe d'origine.
- **Le stade localement avancé**, où la tumeur franchit l'enveloppe de cet organe pour envahir les tissus voisins.
- **Le stade métastatique**, où des tumeurs se développent au sein d'autres organes. Les cellules cancéreuses qui forment la métastase sont les mêmes que celles de la tumeur primitive. Ainsi des métastases pulmonaires seront très différentes selon qu'elles proviennent d'un cancer du rein, de la prostate ou du colon, ce qui justifie les approches potentiellement très différentes pour leur traitement.

Ce phénomène rend complexe la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un cancer, puisqu'il faut envisager un scénario différent pour chaque cas. Les efforts soutenus de recherche en oncologie ont permis des avancées prometteuses, et il existe plusieurs stratégies pour combattre l'avancée d'un cancer : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, les thérapies ciblées, l'immunothérapie. Cependant, des rechutes sont généralement observées car

les cellules cancéreuses (ou néoplasiques) sont capables d'acquérir des propriétés cellulaires spécifiques qui leur permettent : i) d'inactiver le médicament grâce à des enzymes spécifiques ou à des protéines (exemple « Long Resistance Protein (LRP) ») capables de séquestrer l'agent anti-cancéreux, ii) de sur-exprimer les molécules anti-apoptotiques (BCL2, MCL1 et BCL-XL) empêchant la mort cellulaire, iii) d'exprimer de façon sélective des protéines de résistance telles que (MDR1; ABCB1), afin d'éliminer les composés *via* un système d'efflux, iv) de muter la cible entraînant la non-reconnaissance de celle-ci par le médicament, v) de sur-exprimer la cible, provoquant une action insuffisante du médicament, vi) de déclencher des voies de signalisation alternatives à celle(s) inhibée(s), entraînant une redondance biologique, vii) d'activer leur système de réparation des dommages à l'ADN, permettant ainsi le maintien de l'intégrité génomique indispensable à la survie des cellules (Figure 2).⁴

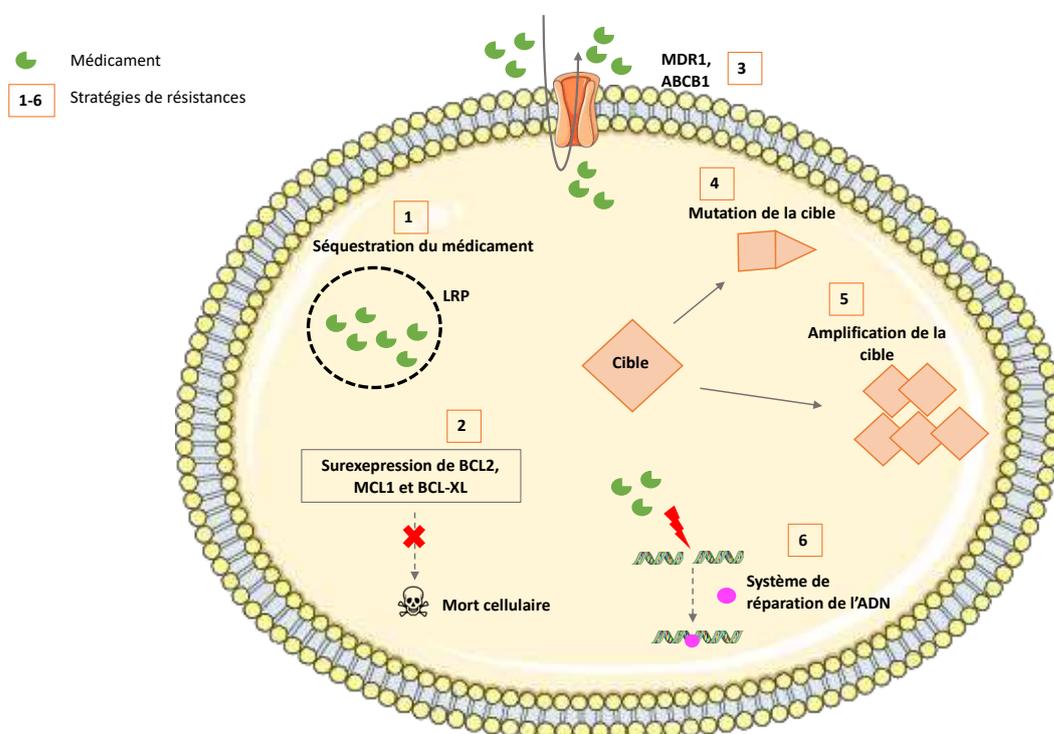


Figure 2 : : Présentation de six mécanismes cellulaires responsables de la résistance des cellules cancéreuses aux traitements.

Tous ces mécanismes cellulaires complexes rendent les cancers agressifs et difficiles à soigner. Malgré un taux de guérison qui augmente ces dernières années, celui-ci varie considérablement selon la localisation, le type de tumeur et le stade du cancer au moment du diagnostic (la survie à 5 ans varie ainsi de 4% à 98%, selon les chiffres de l'INCa). Il est donc urgent de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques, afin d'augmenter la survie des patients.

1.2 Les thérapies anti-cancéreuses : définitions et limites

Les thérapies « conventionnelles » regroupent un large arsenal thérapeutique anti-cancéreux (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie) qui n'a cessé d'évoluer au cours du temps (Figure 3).⁵

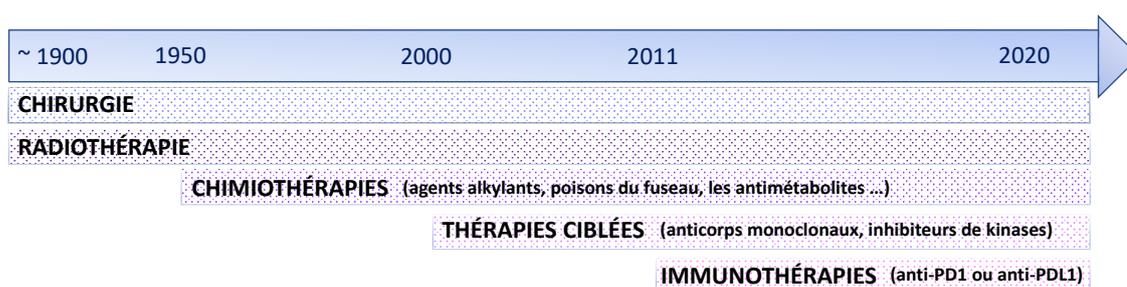


Figure 3 : Chronologie des différentes thérapies anti-cancéreuses.

La résection chirurgicale est couramment pratiquée pour les tumeurs localisées, accessibles, non hématologiques et de petites tailles. La radiothérapie (utilisation de rayonnements) et les chimiothérapies (utilisation de petites molécules chimiques) sont des méthodes efficaces qui peuvent être utilisées en aval de la chirurgie mais aussi en amont afin de rendre opérables certaines tumeurs volumineuses.⁶ De nouvelles thérapies plus spécifiques telles que les thérapies ciblées, permettent d'atteindre une (ou plusieurs) cible(s) précise(s) exprimée(s) ou surexprimée(s) par les cellules cancéreuses. D'autres stratégies thérapeutiques continuent d'émerger comme, par exemple, l'immunothérapie qui permet d'activer le système immunitaire en dormance, ou encore les approches « Multi-Target-Drug-Ligand », selon lesquelles une seule molécule agit sur plusieurs effecteurs biologiques, induisant des réponses biologiques multiples. Afin d'éviter les mécanismes de résistance, les rechutes ou de rendre les

tumeurs plus sensibles aux traitements administrés, certaines de ces thérapies peuvent être utilisées en combinaison.

1.2.1 Les thérapies usuelles

1.2.1.1 La chimiothérapie

Les molécules de chimiothérapie ciblent les cellules à croissance rapide et sont classées selon l'action qu'elles médient au niveau du cycle cellulaire. Ces molécules agissent soit directement au niveau de l'ADN, soit sur des enzymes responsables de la réplication ou de la dégradation de l'ADN (Figure 4).^{7,8}

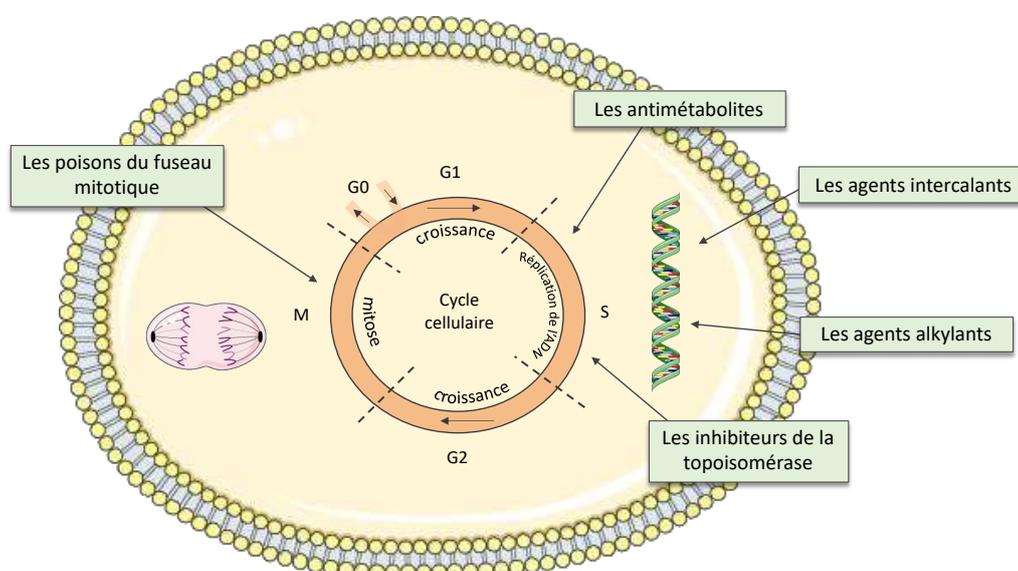


Figure 4 : Les différents sites d'action des médicaments de chimiothérapie.

Les agents alkylants (les moutardes azotées, les nitrosourées, les dérivés du platine) ainsi que les agents intercalants (les antracyclines, les anthracènes) vont agir directement au niveau de la double hélice de l'ADN, soit en réalisant des alkylations soit en s'intercalant dans le double brin, provoquant un changement conformationnel de l'ADN et empêchant ainsi sa réplication. D'autres molécules de chimiothérapie, vont agir sur des enzymes indispensables à la réplication de l'ADN, telles que les antimétabolites (le tétrahydrofolate, le méthotrexate) et les inhibiteurs

de la topoisomérase (l'irinotecan) qui agissent en phase S du cycle cellulaire. Les poisons du fuseau mitotique (les vinca-alcaloïdes ou les taxanes) vont quant à eux bloquer la transition métaphase-anaphase en empêchant respectivement la polymérisation ou la dépolymérisation des microtubules, provoquant ainsi l'arrêt de la division cellulaire.⁹

La chimiothérapie est généralement employée comme méthode courante de traitement. Néanmoins, les molécules de chimiothérapie vont agir sans distinction les cellules à croissance rapide telles que les cellules cancéreuses mais également les cellules saines comme les cellules de la moelle osseuse, de l'estomac, de l'intestin et des follicules pileux. Cette faible spécificité pour les cellules néoplasiques par rapport aux cellules saines engendre l'apparition d'effets secondaires importants.^{6,10} De plus, ces molécules possèdent une activité cycle-dépendante et/ou phase-dépendante, c'est-à-dire qu'elles vont agir seulement sur certaines phases du cycle cellulaire limitant la sensibilité des cellules face aux traitements.⁷ S'ajoute aussi l'apparition des résistances au sein des cellules cancéreuses. En effet, suite à une exposition répétée à des agents endommageant l'ADN après de nombreux cycles de chimiothérapie, les cellules cancéreuses vont utiliser des mécanismes enzymatiques complexes capables de détecter et de réparer les dommages de l'ADN, en interrompant le cycle cellulaire. Pour contrer cette chimiorésistance, l'utilisation d'un deuxième agent thérapeutique, inhibant les enzymes de réparation de l'ADN, est nécessaire. Par exemple, l'emploi d'un inhibiteur de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) qui est une enzyme capable de détecter les dommages de l'ADN, va potentialiser la cytotoxicité des agents anti-cancéreux ciblant l'ADN.¹¹ Le premier essai clinique combinant le témozolomide (agent alkylant l'ADN) avec un inhibiteur de PARP : le rucaparib, a été initié en 2003, dans le cadre des tumeurs solides avancées (en particulier des mélanomes). Cet essai a révélé un bénéfice clinique prometteur, puisque l'utilisation d'un inhibiteur de PARP permet d'augmenter les effets de cytotoxicité du témozolomide.^{12,13}

Néanmoins, même si cette stratégie de multi-thérapies permet d'améliorer l'efficacité thérapeutique globale des médicaments de chimiothérapie, l'utilisation d'un deuxième agent thérapeutique a augmenté les effets de toxicité.¹⁴

1.2.1.2 Les thérapies ciblées

Contrairement aux chimiothérapies conventionnelles, les thérapies ciblées vont être beaucoup plus spécifiques, puisqu'elles sont développées en fonction d'une cible biologique précise (kinase, récepteur, facteur de croissance), qui se trouve surexprimée dans les cellules cancéreuses.⁸ Cela induit une sensibilité aux traitements plus importante pour les cellules cancéreuses que pour les cellules saines. Ces thérapies sont basées sur le profil moléculaire de la tumeur et non plus sur son emplacement : **une même thérapie peut fonctionner pour des cancers sur des organes différents**, s'ils portent la même particularité moléculaire.^{8,15}

Les thérapies ciblées vont soit bloquer des cibles extracellulaires (cytokines, récepteurs) soit des cibles intracellulaires (kinases, enzymes).⁸ Ces agents pharmacologiques peuvent être classés en deux grandes catégories : les anticorps monoclonaux et les petites molécules. Les anticorps monoclonaux vont se lier spécifiquement à une cible extracellulaire (récepteur cellulaire ou protéine circulante), bloquant les sites d'amarrage des ligands ou le ligand lui-même, inhibant ainsi la signalisation intracellulaire normalement induite par l'interaction ligand-récepteur, responsable de la croissance et du développement tumoral.^{9,10} Malgré le potentiel thérapeutique très prometteur des anticorps monoclonaux, leur coût important constitue une des principales limites de leur utilisation sur des traitements de longue durée (exemple : il faut déboursier entre 40 000 à 50 000 euros par an pour le Bevacizumab).

La deuxième catégorie est représentée par des petites molécules capables d'inhiber différents mécanismes biologiques impliqués dans la croissance, la survie et la différenciation cellulaire, en agissant sur des cibles extracellulaires (inhibiteurs des interactions protéine-protéine (IPP)) ou intracellulaires (inhibiteurs de kinases, d'enzymes, des modulateurs de la traduction d'un gène spécifique).¹⁶⁻¹⁹ L'inhibition de l'interaction ligand-récepteur ou de l'activité kinase (phosphorylation) ou enzymatique, par ces petites molécules, permet de bloquer la cascade de signalisation sous-jacente impliquée dans la prolifération anormale des cellules, les événements anti-apoptotiques et angiogéniques produits par les cellules cancéreuses.^{9,17}

Cependant, les thérapies ciblées ne sont pas dénuées d'effets indésirables, et induisent régulièrement des toxicités cutanées, hématologiques, cardiaques, ou encore neurologiques.^{10,20} De plus, dans la majorité des cancers, l'implication de plusieurs voies biologiques permet aux cellules cancéreuses d'échapper aux traitements de thérapies ciblées. Pour contrer ce phénomène, l'association de différentes thérapies ciblées, peut être envisagée.²¹

1.2.3 Les thérapies émergentes

1.2.3.1 Immunothérapie

Depuis une dizaine d'années, l'immunothérapie est en plein essor, modifiant radicalement le pronostic de certains cancers.²² Les cellules cancéreuses sont capables d'inhiber le fonctionnement des lymphocytes T. Le système immunitaire des patients est alors affaibli et n'est plus en capacité d'identifier les cellules cancéreuses comme étant un corps étranger à l'organisme. L'immunothérapie a pour objectif de lever l'inhibition du système immunitaire par les cellules cancéreuses afin de restaurer ou d'augmenter la réponse immunitaire du patient.^{23,24}

Une meilleure connaissance de la physiologie du système immunitaire a permis d'identifier des points de contrôle (interaction ligand/récepteur) essentiels dans ces mécanismes d'inactivation de la réponse immunitaire. Des récepteurs spécifiques (exemples : CTLA-4 et PD-1) sont présents sur les lymphocytes T qui infiltrent les cancers, et leurs ligands sont exprimés sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les cellules tumorales (Figure 5).²⁵

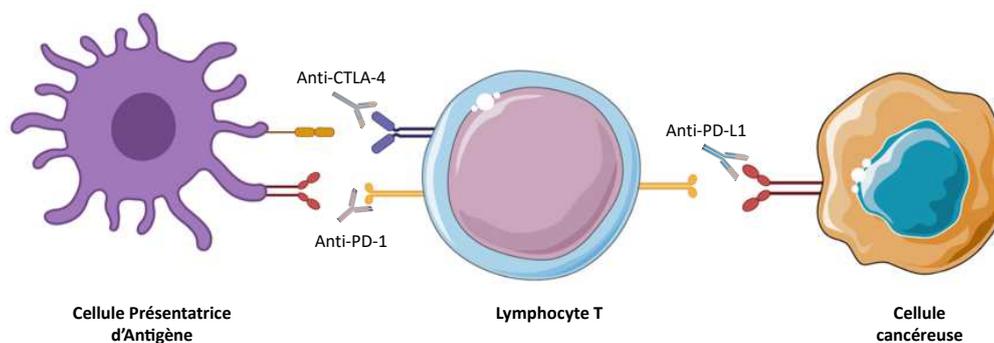


Figure 5 : Inhibition des interactions PDL-1/PD-1 et B7/CTLA-4.

Ainsi des anticorps monoclonaux, appelés *check-point inhibitors* (CKI), ont été conçus pour bloquer soit les récepteurs (avec des anti-PD-1, exemple le Nivolumab ou des anti-CTLA-4, exemple l'Ipilimumab) soit le ligand PDL-1 (anti-PDL-1 : l'Avelumab) et permettent ainsi de rétablir la fonction primaire des lymphocytes T, induisant des réponses complètes et durables chez les patients atteints de cancers au pronostic défavorable.^{24,25} Aujourd'hui, de nombreux essais cliniques sont en cours, évaluant la pertinence de ces entités biologiques à des stades plus précoces de la maladie (stratégies adjuvante ou d'induction). Seul huit anticorps monoclonaux sont actuellement utilisés en immunothérapie, dont 3 anti-PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab, Cémipimab), 3 anti-PD-L1 (Atézolizumab, Durvalumab, Avélumab), et 2 anti-CTLA-4 (Ipilimumab, Trémélimumab).²⁴

Néanmoins, 30% seulement des patients répondent à ces traitements par immunothérapie et dans 20% des cas une augmentation de la progression tumorale est observée chez les patients. A ceci, s'ajoute l'absence de marqueurs prédictifs spécifiques chez les patients atteints d'un cancer, qui ne permet pas d'assurer que l'immunothérapie va fonctionner. La population susceptible de tirer le meilleur bénéfice du traitement n'est donc pas encore clairement définie.^{22,23} Actuellement, les options thérapeutiques s'orientent plutôt vers des stratégies combinatoires, associées à de la chimiothérapie ou des thérapies ciblées. Ce type d'association permettrait d'améliorer le taux de réponse par rapport à des traitements séparés, et de limiter le risque d'échec thérapeutique sous immunothérapie, en particulier de limiter le

phénomène d'hyperprogression (reprise de la croissance tumorale), qui a été rapporté chez quelques patients traités par ces inhibiteurs.

1.2.3.2 La polypharmacologie

Le terme polypharmacologie a été inventé pour désigner la liaison d'une petite molécule à plusieurs cibles.²⁶ L'objectif principal étant de développer un agent thérapeutique unique capable de cibler différents effecteurs afin d'inhiber plusieurs voies de signalisation impliquées dans le développement ou la progression d'une même pathologie. Ainsi, l'inhibition de deux ou plusieurs cibles par une molécule permettrait d'agir en synergie pour une même indication.²⁷

La conception des ligands multi-cibles (MTDL) est particulièrement intéressante car elle permet de développer selon différentes stratégies des molécules contenant à minima deux pharmacophores distincts, ayant une activité avérée pour des protéines cibles (Figure 6). Différentes stratégies peuvent être envisagées afin de combiner les différents pharmacophores. Les stratégies A et B permettent de lier directement ou *via* un linker, les pharmacophores entre eux, tout en conservant les propriétés biologiques de chacune des molécules (pharmacophore 1 et pharmacophore 2). La stratégie C développe un nouveau squelette qui combine uniquement les groupements et/ou fonctions chimiques essentiels pour l'activité biologique, des pharmacophores initiaux. (Figure 6).

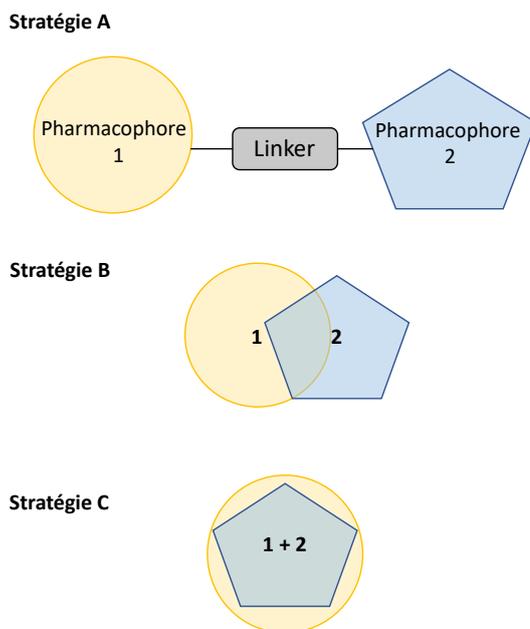


Figure 6 : Les différentes stratégies de conceptions des ligands multi-cibles.

Le développement des composés MTDL est cependant plus délicat que le développement de petite molécule ciblant une cible unique. En effet, pour ce type d'approche il est nécessaire de combiner les différentes activités dans une seule et même molécule sans compromettre les activités vis-à-vis de chaque des cibles initiales. Par exemple, des changements structuraux sur le pharmacophore 1 pour améliorer la spécificité envers une cible ne doivent pas compromettre l'activité biologique de la seconde cible. La conservation de la spécificité envers plusieurs cibles rend complexe la conception et l'optimisation des MTDL.²⁸

À titre d'exemple, le développement d'un MTDL inspiré de deux modulateurs connus des récepteurs aux œstrogènes ($E\alpha$) : l'acolibifène et le tamoxifène, utilisés dans le traitement du cancer du sein a permis de concevoir un double inhibiteur. Ce nouveau composé inhibe à la fois le récepteur au VEGF-2 ($IC_{50} = 0.099 \mu M$) et celui du récepteur aux oestrogènes ($IC_{50} = 7.2 \mu M$).²⁹ D'après l'étude de J. Zhou *et al.* la combinaison de deux motifs issus respectivement de l'acolibifène et du tamoxifène, a permis de diminuer d'un facteur 14 la valeur d' IC_{50} vis-à-vis du récepteur aux oestrogènes, comparé au tamoxifène seul (Schéma 1).²⁹

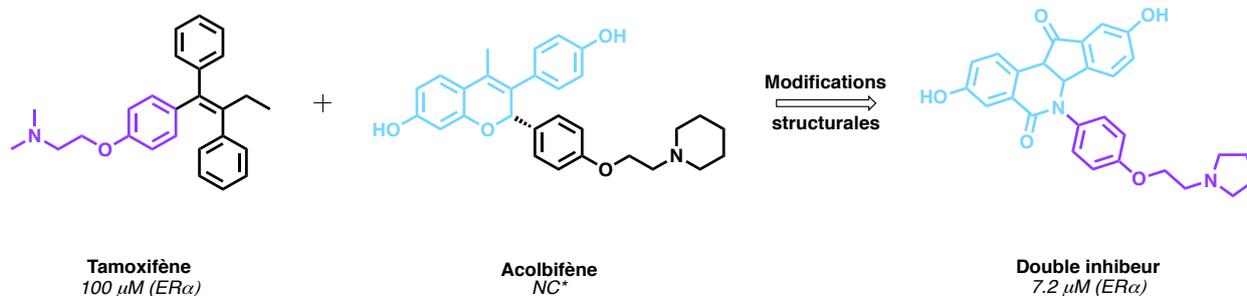


Schéma 1 : Conception d'un double inhibiteur de $\text{ER}\alpha$ et VEGFR-2 inspiré du tamoxifène et de l'acolibifène.²⁹
 NC* : Non communiqué.

Nous proposons d'adopter cette stratégie de polypharmacologie afin de développer de nouveaux antagonistes pour les récepteurs aux chimiokines (en particulier CXCR1 et CXCR2), impliqués dans la progression tumorale de nombreux cancers. Ces récepteurs sont présents sur les cellules cancéreuses mais aussi sur les cellules endothéliales et promeuvent à la fois l'angiogénèse et l'inflammation. Ainsi le développement d'un nouvel agent thérapeutique (antagoniste) pour ces deux récepteurs, permettra d'avoir une action duale : à la fois anti-angiogénique et anti-inflammatoire (*vide infra*), en agissant sur les différents types cellulaires qui expriment CXCR1 et CXCR2.

1.3 Angiogenèse et inflammation : deux grands marqueurs du cancer interconnectés

Dans la majorité des cancers, les microenvironnements tumoraux résultent en partie d'un stress hypoxique (manque d'oxygène au sein d'une cellule) ce qui favorise le développement de cellules immunitaires pro-inflammatoires.³⁰ Ces conditions inflammatoires induisent la production du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) qui active la migration des cellules endothéliales, entraînant une angiogénèse pathologique, permettant aux cellules cancéreuses d'assurer leur survie. Cette hyper vascularisation favorise à son tour le transport des cellules inflammatoires. Dans l'ensemble, l'inflammation induit une angiogénèse et l'angiogénèse augmente le caractère inflammatoire de la tumeur.³¹

1.3.1 L'inflammation

1.3.1.1 Inflammation physiologique

L'inflammation physiologique est un mécanisme inné de défense du système immunitaire, qui se met en place suite à une agression de facteurs endogènes ou exogènes. Ces facteurs peuvent soit être septiques (invasion virale, infection bactérienne) ou aseptiques (tissus lésés). On distingue 2 types de réponses : (i) aspécifique qui fait intervenir des mécanismes de réparation tissulaire *via* l'activation de l'immunité innée recrutant les macrophages et leucocytes, (ii) adaptative qui est une immunité spécifique, dirigée contre un seul antigène, impliquant les lymphocytes.³²

L'objectif principal de la réponse inflammatoire est donc d'éliminer les agents pathogènes et/ou de réparer les lésions tissulaires.²³ En effet, cette réponse inflammatoire active le système immunitaire inné et/ou acquis par un enchaînement précis d'étapes : (i) la phase initiale permet le recrutement des neutrophiles polynucléaires (NPs) *via* une sécrétion abondante de chimiokines pro-inflammatoires, (ii) la «phase vasculaire» provoque une vasodilatation permettant une diffusion plus importante en cellules immunitaires et médiateurs chimiques sur le site inflammatoire (iii) la «phase effectrice» permet de réparer le tissu lésé ou d'éliminer l'agent pathogène (par la phagocytose), (iiii) la «phase de résolution» qui permet une autorégulation du phénomène inflammatoire en sécrétant des médiateurs anti-inflammatoires (ex : IL-10) (Figure 7).^{33,34}

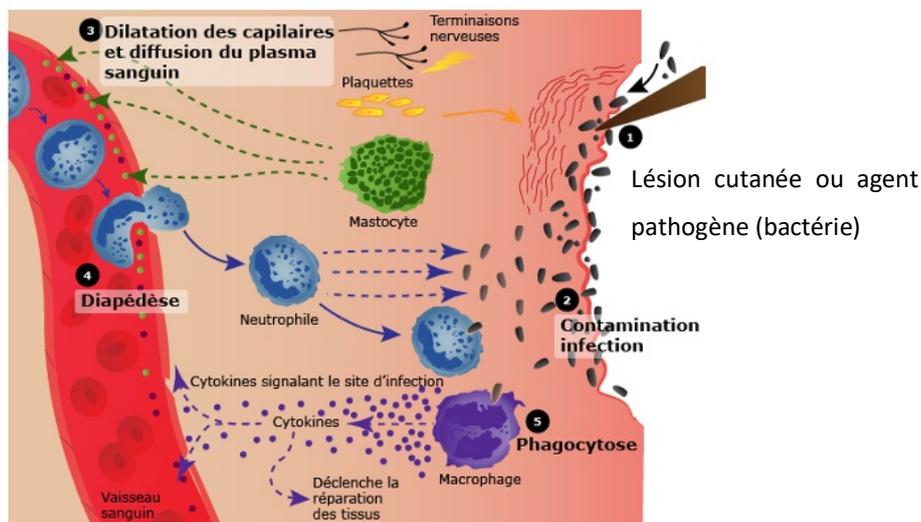


Figure 7 : Les différentes étapes d'une réaction immunitaire. De la lésion cutanée ou infection, en passant par l'activation de la réponse immunitaire, jusqu'à la réparation du tissu ou l'élimination de l'agent pathogène.
Source : figure inspirée et adaptée du site <http://www.maxicours.com>

Toutefois, dans certaines pathologies (par exemple : les cancers) l'inflammation peut être excessive. Suite au stress hypoxique subi par les cellules du microenvironnement, le phénomène inflammatoire se présente alors de façon chronique et persistant, ce qui induit une sécrétion anormale et démesurée de facteurs pro-inflammatoires et pro-angiogéniques.³⁵

1.3.1.2 Inflammation tumorale

Il est estimé que 20% des cancers résultent d'une inflammation chronique ou d'états inflammatoires.^{35,36} De nombreux médiateurs chimiques, comprenant : des amines vasoactives (telles que l'histamine et la sérotonine), des peptides (la bradykinine), des eicosanoïdes (par exemple, les thromboxanes, les leucotriènes et les prostaglandines)³⁷ ainsi que des chimiokines pro-inflammatoires (interleukine (IL)-1 β , IL-8, IL-6, IL-12), le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- α)), sont responsables de cet état inflammatoire.³⁸ Ces médiateurs induisent le recrutement massif et persistant des leucocytes et des cellules du stroma au niveau du site tumoral, et provoquent une sécrétion continue de cytokines pro-inflammatoires, ce qui favorise la croissance et la prolifération tumorale. Ainsi, de nombreuses tumeurs possèdent un micro-environnement riche en cytokines inflammatoires, mais manquent généralement de cytokines impliquées dans

une réponse immunitaire spécifique et soutenue.³⁷ L'homéostasie tissulaire normalement régie par un équilibre précis entre le recrutement, la prolifération, la migration et la mort des cellules impliquées dans la réponse inflammatoire est alors dérégulée provoquant un état d'inflammation chronique autour de la tumeur.^{35,36}

1.3.2 L'angiogenèse

1.3.2.1 Angiogenèse physiologique

L'angiogenèse est définie comme l'ensemble des processus régulés menant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par l'excroissance ou le bourgeonnement d'un réseau capillaire préexistant. Si cette dernière est très active au cours du développement (embryogénèse), elle est plus rare chez l'adulte où l'endothélium est quiescent avec un faible renouvellement des cellules endothéliales.^{39,40} Le processus angiogénique est activé suite à la liaison sur leur(s) récepteur(s) associé(s) de divers facteurs de croissance, tel que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, le facteur de croissance placentaire, les facteurs de croissance des fibroblastes, l'angiopoïétine-1 et -2, le facteur de croissance dérivé des plaquettes, le facteur de croissance des hépatocytes, le facteur de croissance des tissus conjonctifs et les facteurs de croissance transformants. Cependant, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est le facteur principal de l'angiogenèse. La famille des VEGF comporte plusieurs ligands (VEGF-A ; VEGF-B ; VEGF-C et VEGF-D) qui activent les différents récepteurs : VEGFR-1 ; VEGFR-2 ; VEGFR-3.⁴¹ Le VEGF induit la prolifération, le remodelage, la perméabilité vasculaire ainsi que la migration des cellules endothéliales en se liant aux récepteurs à tyrosine kinases (RTK) apparentés, VEGFR-1 (Flt1), VEGFR-2 (KDR / Flk1). Le VEGF se lie également au récepteur VEGFR-3 (Flt4) ainsi qu'aux récepteurs des neuropilines (NRP1 et NRP2) qui peuvent agir comme des co-récepteurs et ainsi moduler l'activation du récepteur VEGFR et sa signalisation. Les VEGFR-1 et 2 sont exprimés dans l'endothélium des vaisseaux sanguins alors que le VEGFR-3 se trouve au niveau des vaisseaux lymphatiques (Figure 8).^{42,43}

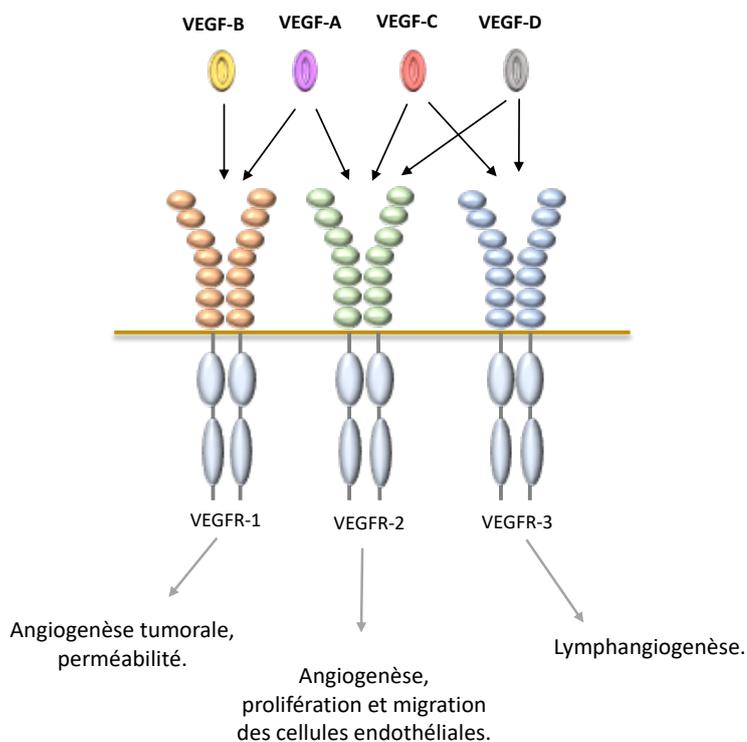


Figure 8 : Les différents récepteurs du VEGF et leurs actions associées.

L'angiogenèse est régulée par un équilibre entre des facteurs activateurs (angiogéniques) et des inhibiteurs (angiostatiques), qui contrôlent étroitement le système vasculaire.³⁹ Elle se produit de manière transitoire puisqu'elle peut être réprimée par des médiateurs inhibiteurs, tels que l'interféron- α ,⁴⁴ la thrombospondine-1,⁴⁵ l'angiostatine,⁴⁶ l'endostatine⁴⁷ ou le facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire (PEDF).⁴⁸ Dans un contexte pathologique tel que le cancer, cet équilibre est dérégulé au profit des facteurs pro-angiogéniques.

1.3.2.2 Angiogenèse tumorale

La formation d'un réseau vasculaire dédié à l'apport en oxygène et en nutriments fait partie intégrante de la progression tumorale.⁴⁹ En effet, au-delà d'une certaine taille (2-3 mm³) et dans un environnement hypoxique, les besoins des cellules cancéreuses vont augmenter et elles vont être capables de détourner à leur profit des mécanismes physiologiques fondamentaux afin de maintenir leur développement, leur prolifération et leur survie.⁵⁰⁻⁵² Les cellules cancéreuses libèrent des quantités abondantes de facteurs pro-inflammatoires et pro-angiogéniques, qui exercent des effets sur les cellules endothéliales, dégradent la matrice extracellulaire, et favorisent la formation de nouveaux vaisseaux. Par exemple, la stabilisation du facteur de transcription HIF α (Hypoxia Inducible Factor- α) en état hypoxique, va induire une suractivation de ses gènes cibles, comme par exemple celle du VEGF-A (forme la plus angiogène de la famille du VEGF) entraînant la mise en place de l'angiogenèse tumorale afin d'assurer le développement et la croissance de la tumeur (Figure 9).⁵³

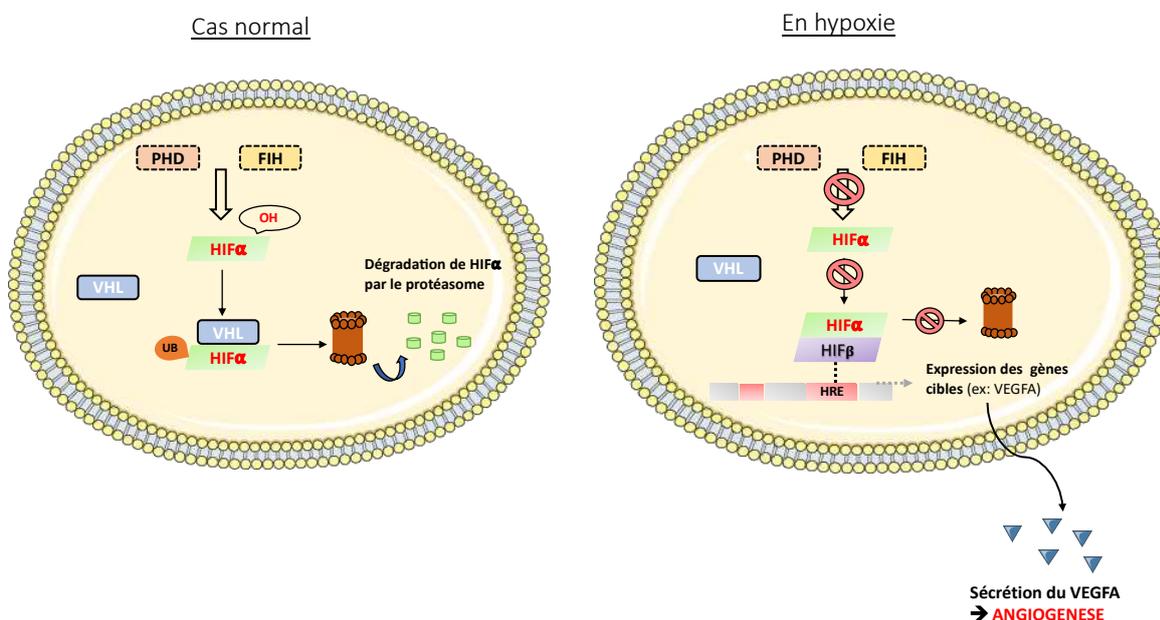


Figure 9 : Stabilisation de HIF α dans un cas pathologique en comparaison au fonctionnement normal de la voie HIF α . La stabilisation de HIF α suite à un stress hypoxique, ou par mutation/ délétion du gène VHL (dans le cancer du rein) entraîne la surexpression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF.

L'angiogenèse tumorale est donc un mécanisme biologique important dans le développement des tumeurs, la cibler est devenu une stratégie majeure. L'objectif principal de cette approche consiste à inhiber la formation des nouveaux vaisseaux, afin d'empêcher tout apport en oxygène et nutriments essentiels à la croissance tumorale.⁵⁴ Néanmoins, l'efficacité à long terme de ces thérapies anti-angiogéniques reste discutable. En effet, les anti-angiogéniques sont efficaces seulement lorsque le processus angiogénique tumoral s'est mis en place. De plus, ils réduisent considérablement le réseau vasculaire du microenvironnement tumoral empêchant par la suite toute délivrance d'un agent cytotoxique à la tumeur.⁵⁵ A ceci, s'ajoutent les phénomènes de résistance acquise qui comprennent les altérations au niveau de la cible (mutation, surexpression), l'activation d'un ou plusieurs effecteurs en aval ou d'une voie de signalisation alternative (c'est-à-dire de contournement).^{15,21,56} L'une des principales hypothèses pour expliquer l'échappement des tumeurs face aux anti-angiogéniques est l'activation d'une voie alternative : à la fois pro-angiogénique et pro-inflammatoire qui permet la prolifération des cellules cancéreuses, la migration des cellules endothéliales, ainsi que le maintien de l'inflammation tumorale.^{57,58} En effet, la sécrétion abondante de chimiokines dans le microenvironnement tumoral va stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins *via* l'activation de récepteurs spécifiques : CXCR1 et CXCR2, responsables des phénomènes angiogénique et inflammatoire.⁵² Ainsi, malgré l'inhibition de la voie VEGF/VEGFR, les cellules cancéreuses vont réguler à la hausse la transcription de l'interleukine-8 (CXCL-8 / IL-8) capable d'activer par la suite ces récepteurs CXCR1 et CXCR2.⁵²

1.3.3 Conclusion du chapitre 1

L'importante toxicité liée à l'utilisation des médicaments de chimiothérapie a entraîné l'apparition des thérapies ciblées. L'amélioration de la spécificité des nouveaux anti-cancéreux a réduit considérablement les effets de toxicité mais ne permet pas de résoudre les problèmes de résistance. L'immunothérapie est venue compléter cet arsenal thérapeutique. Cependant peu de patients répondent à ce traitement et l'absence de connaissances sur les marqueurs prédictifs est une réelle limite dans son utilisation. Ainsi, ce chapitre 1 a permis de positionner l'importance de continuer à développer de nouvelles molécules anti-cancéreuses. Par exemple, la polypharmacologie : le développement d'un agent thérapeutique affectant plusieurs effecteurs, permettrait de contourner les phénomènes de résistance et de redondance biologique observés avec les thérapies précédentes.

Chapitre 2 :

**Cibler l'angiogenèse et
l'inflammation de façon
concomitante comme
nouvelle approche
thérapeutique.**

2.1 Les cytokines CXCL-ELR⁺ et leurs récepteurs

2.1.1 La famille des chimiokines CXCL

Les chimiokines sont une famille de cytokines chimiotactiques qui ont d'abord été identifiées pour leur capacité à induire la migration de différents types cellulaires, en particulier celle des leucocytes pendant l'inflammation.⁵⁹

A ce jour, plus de 50 chimiokines humaines, et 20 de leurs récepteurs ont été identifiés. Les chimiokines sont de petites protéines (6 à 14 kDa), constituées de 70 à 125 acides aminés. Elles possèdent quatre résidus cystéines dans des positions hautement conservées au niveau de la région N-terminale, qui assurent l'intégrité de leur structure tridimensionnelle, grâce à la formation de ponts disulfures.⁶⁰ La disposition de ces quatre résidus permet de définir des sous-familles classées selon le schéma suivant : C, CC, CXC et CX₃C, dans lequel C représente l'emplacement des cystéines présentes dans la région N-terminale et X désigne le nombre d'acide aminé intermédiaire (Figure 10). Les sous-groupes CC et CXC sont les deux principaux de cette superfamille de chimiokines.^{61,62}

La sous-famille CXC est subdivisée en deux catégories, selon la présence ou l'absence d'un motif peptidique particulier : ELR (Glutamate, Leucine, Arginine) qui se situe entre le domaine N-terminal et la première cystéine. La présence de ces acides aminés (ELR⁺) confère une fonction angiogénique aux chimiokines CXC tandis que leur absence (ELR⁻) est caractéristique de propriétés angiostatiques.⁶¹

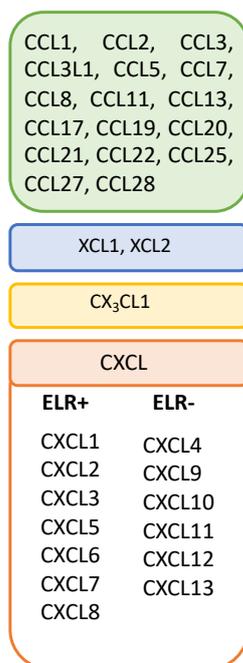


Figure 10 : Les différentes familles des chimiokines CXCL.

Les chimiokines angiogéniques (ELR⁺) et les chimiokines angiostatiques (ELR⁻) sont régulées de façon continue pour assurer le maintien d'une homéostasie au sein de l'organisme. Une perturbation de cet équilibre en faveur des chimiokines angiogéniques ou angiostatiques est à l'origine d'une situation pathologique (Figure 11). Dans les cancers, les chimiokines ELR⁺ sont prépondérantes dans le microenvironnement tumoral et elles favorisent l'angiogenèse.⁶³

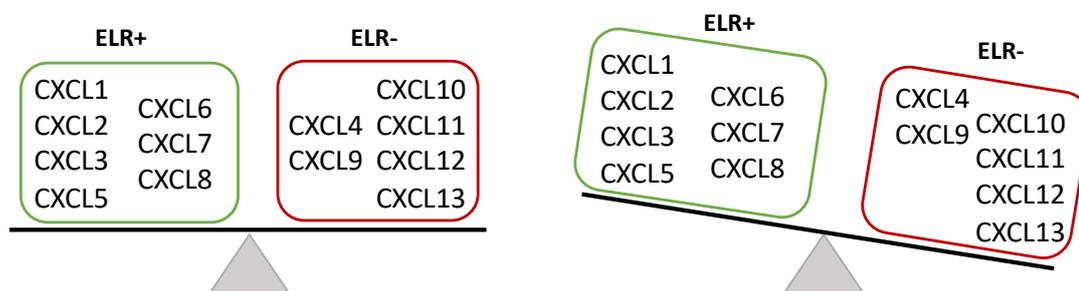


Figure 11 : Représentation de l'équilibre des chimiokines angiogéniques (ELR⁺) et angiostatiques (ELR⁻) en physiologie normale comparé à un contexte pathologique. *CXCL12 ne présente pas le motif ELR⁺ mais est une chimiokine angiogénique.

2.1.2 La famille des chimiokines CXCL-ELR⁺ et leurs récepteurs CXCR.

2.1.2.1 Rôle, structure et expression de l'interleukine-8 : CXCL8

La chimiokine CXC prototypique est CXCL8 (plus connue sous le nom d'interleukine-8 ; IL-8) et a été décrite comme la première chimiokine angiogénique en 1987 et est impliquée dans la progression de certain cancer (sein, prostate, poumon, colorectal).⁶⁴⁻⁶⁶ L'interleukine 8 sera prise comme exemple pour la description de cette sous-famille de chimiokines CXC.

CXCL8 est sécrétée par une large diversité de types cellulaires, tels que les leucocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les cellules cancéreuses malignes. Son expression est stimulée par de nombreuses cytokines (IL-1, IL-6, CXCL12 et TNF- α), l'hypoxie, les espèces réactives de l'oxygène (ROS), activant des voies de signalisation telles que la voie de la phosphoinositide-3 kinase (PI3K/Akt), la voie des MAP kinases (MPAK), dont celles de la p³⁸ MAPK, de ERK et de JNK, qui conduisent à la transcription du gène cible : CXCL8.^{67,68} Toutes ces voies de signalisation sont complémentaires, et agissent en synergie. Cette redondance biologique permet de parer à une déficience éventuelle d'une de ces voies, et ainsi d'assurer continuellement l'expression et la sécrétion de CXCL8.

L'interleukine-8 partage une identité de séquence de 24% à 46% avec les autres membres de la famille des chimiokines CXCL-ELR⁺. Elle existe sous forme de monomère mais aussi sous forme de dimère, capables d'activer et de réguler les deux récepteurs : CXCR1 et CXCR2.^{62,69} Le monomère CXCL8 considéré comme la forme biologiquement pertinente et active de cette chimiokine, se lie de façon plus affine que le dimère envers CXCR1. En revanche, les monomère et dimère de CXCL8 se lient à CXCR2 de manière équivalente.⁷⁰

Ces récepteurs sont exprimés par différents types cellulaires (cellules endothéliales, cellules suppressives dérivées de myéloïdes, cellules cancéreuses). Ainsi en fonction du type cellulaire que CXCL8 active *via* sa liaison sur CXCR1 et/ou CXCR2, plusieurs rôles biologiques lui sont conférés.⁶⁰

Par exemple, en cas d'infection ou de lésions tissulaires, l'IL-8 induit la chimiotaxie des granulocytes, principalement des neutrophiles, vers le site affecté. Une fois localisée sur le site de lésion, l'IL-8 favorise la résolution de l'infection en induisant une phagocytose.⁷¹ Elle active ensuite une réponse angiogénique réparatrice, aboutissant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. En effet, CXCL8 exerce son activité angiogénique en régulant positivement les protéines métalloprotéases matricielles (MMPs) responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire qui est requise pour la migration et l'organisation des cellules endothéliales, afin d'initier la néovascularisation. De cette manière, CXCL8 sert à la fois à résoudre le stimulus inflammatoire et à favoriser l'angiogénèse.^{60,71}

2.1.2.2 Les récepteurs aux cytokines CXCL-ELR⁺.

Les récepteurs aux chimiokines appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés à une protéine-G (RCPG), composés d'un domaine N-terminal extracellulaire, de 7 domaines transmembranaires et d'un domaine C-terminal en intracellulaire (Figure 12).⁶⁰ Leur activation par liaison de leur ligand dans la région juxtaposée à la boucle N-ter, va induire un changement conformationnel des récepteurs et entraîner la dissociation de la protéine-G, et d'activer ainsi un large éventail de voies de signalisation (Figure 12).⁶¹

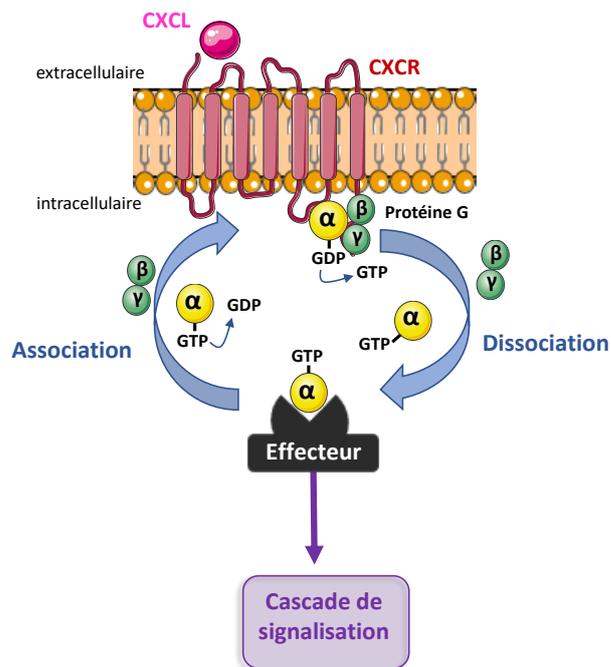


Figure 12 : Mécanisme d'activation des récepteurs couplés à une protéine G. La dissociation des 3 sous-unités de la protéine-G, permet à la sous-unité alpha d'activer différents effecteurs intracellulaires.

À ce jour, les récepteurs aux chimiokines sont au nombre de 20 mais n'ont pas encore été tous identifiés. La nomenclature des récepteurs est établie selon le même schéma que celle des chimiokines, ils sont ainsi classés en 4 grandes familles (Figure 13) : i) 8 récepteurs des chimiokines CXC (CXCR1 à CXCR7) ; ii) 10 récepteurs des chimiokines CC (de CCR1 à CCR10) ; iii) 1 récepteur des chimiokines C (XCR1) ; iv) 1 récepteur des chimiokines CX₃C (CX₃CR1).⁷²

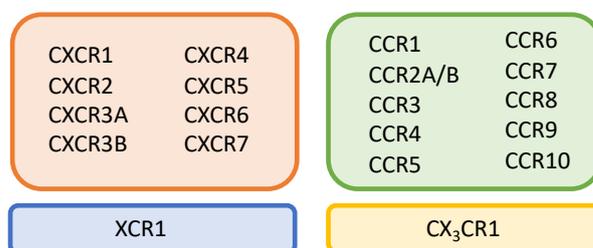


Figure 13 : Les différentes familles de récepteurs aux chimiokines classés selon la même nomenclature utilisée pour les chimiokines, à savoir selon la disposition des premières Cystéines (C) et des acides aminés les séparant (X).

La plupart de ces récepteurs reconnaissent plusieurs chimiokines, rendant la compréhension de leur réseau de signalisation complexe mais permettant une certaine robustesse du système. En effet, si l'une des chimiokines venait à être inhiber, d'autres chimiokines de la même famille prendraient alors le relais, afin d'assurer le maintien de la signalisation.⁷³

Dans ce manuscrit nous allons nous intéresser aux récepteurs de la famille des CXCR et en particulier aux récepteurs CXCR1 et CXCR2.⁷⁴

2.1.2.3 L'exemple particulier des récepteurs CXCR1 et CXCR2.

Les récepteurs CXCR1 et CXCR2 présentent une homologie de séquence de 78% au niveau des hélices α transmembranaires. Il existe d'autres ligands naturels que CXCL8 qui activent ces récepteurs, tels que CXCL1-3, et 5-7 qui sont également des chimiokines ELR⁺. Cependant, des différences d'affinité de liaison envers les deux récepteurs sont observées pour chaque ligand : CXCL6 et CXCL8 se lient à la fois aux récepteurs CXCR1 et CXCR2, tandis que les ligands CXCL1-3, 5, et 7 vont se lier préférentiellement au récepteur CXCR2.⁷⁵ L'activation de CXCR1 et CXCR2 par leur ligand permet d'obtenir des réponses cellulaires spécifiques suite à la l'interaction entre les chimiokines CXCL-ELR⁺ et ces récepteurs. Après leur activation, CXCR1/2 sont internalisés, triés puis recyclés ou dégradés (Figure 14).⁷⁶ L'internalisation des récepteurs CXCR1 et CXCR2 provoque une diminution de leur niveau d'expression à la surface des cellules, réduisant la signalisation induite par les ligands CXCL.^{77,78} Ainsi, le recyclage de ces récepteurs joue un rôle majeur dans la régulation de la signalisation qu'ils induisent, permettant un rétrocontrôle naturel de cette dernière.

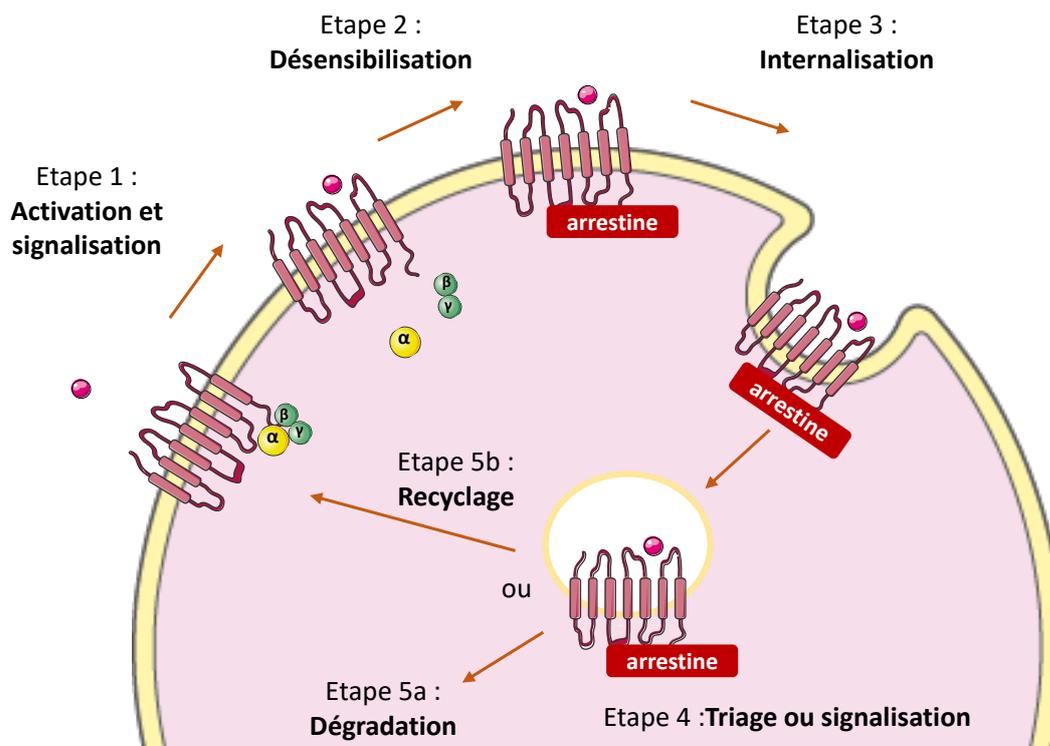


Figure 14 : Mécanisme simplifié d'internalisation des récepteurs CXCR1 et CXCR2 après activation par leur ligand. La liaison du ligand conduit à l'activation du RCPG et la transduction du signal (étape 1). Le recrutement des arrestines au niveau du domaine intra cellulaire C-terminal du récepteur induit l'internalisation de ce dernier (étapes 2 et 3). Les RCPGs internalisés sont triés (étape 4) vers des compartiments de dégradation (étape 5a) ou de recyclage (étape 5b).⁷⁸

L'expression des récepteurs CXCR1 et CXCR2 sur les cellules cancéreuses, les cellules endothéliales, les neutrophiles et les macrophages associés aux tumeurs suggère que la sécrétion de chimiokines par les cellules cancéreuses peut avoir un effet marqué sur le microenvironnement tumoral.^{63,75} En effet, en plus d'agir sur le stroma environnant, en initiant le recrutement des cellules non malignes (cellules endothéliales) pour favoriser l'angiogenèse tumorale, les chimiokines vont également agir sur les cellules cancéreuses grâce à des boucles de signalisation autocrines, afin de soutenir davantage leur sécrétion au sein du microenvironnement tumoral et promouvoir le développement, la prolifération et la survie des cellules cancéreuses.^{75,79,80}

2.2 Les différents modes de régulation de l'axe CXCL-ELR⁺/CXCR1-2

En raison des rôles joués par les chimiokines ELR⁺ dans la progression tumorale, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été élaborées pour interférer avec les fonctions de l'axe CXCL-ELR⁺/CXCR1-2. Cette voie biologique peut être inhibée directement, par des anticorps monoclonaux qui vont neutraliser le ligand avant sa liaison sur le récepteur, ou des petites molécules, qui permettent de réguler l'expression et la signalisation de cet axe. Mais la modulation de cette interaction (ligand/récepteur) peut aussi s'effectuer de façon indirecte, en ciblant cette fois-ci les facteurs de transcription responsables de la régulation de l'expression et de la sécrétion de certains gènes cibles, comme par exemple celui du ligand CXCL8 (Figure 15).^{68,75,81}

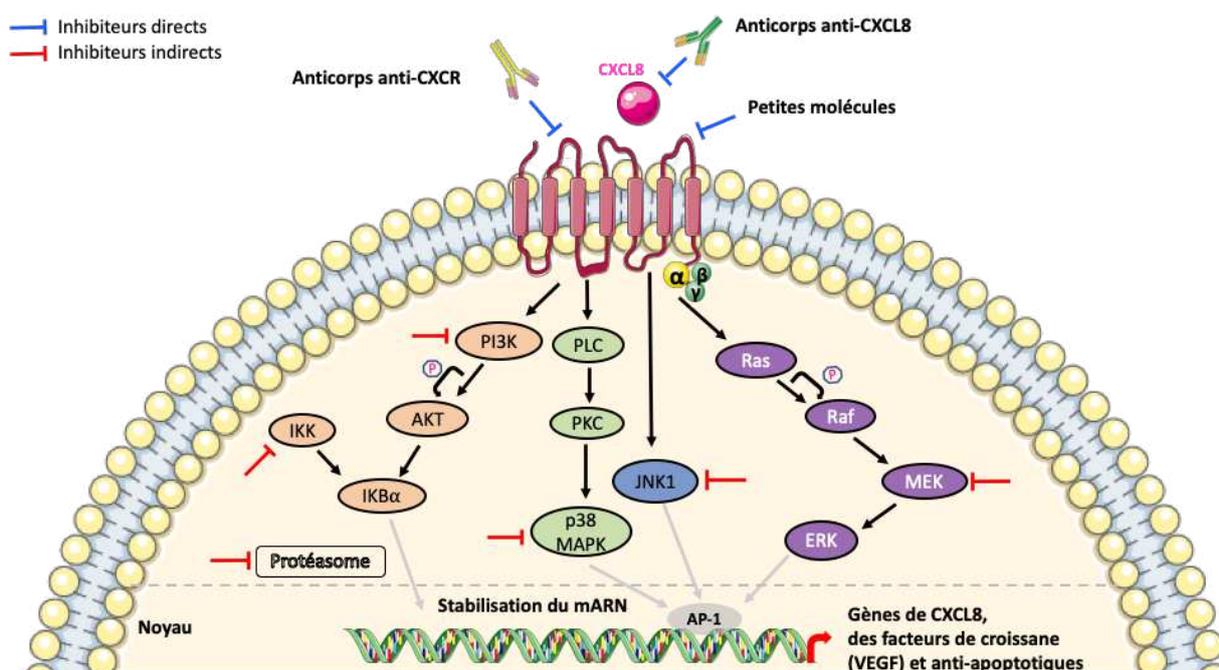
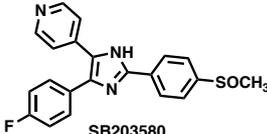
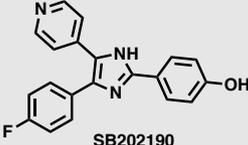
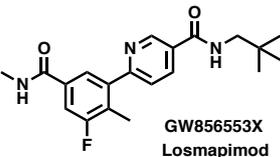
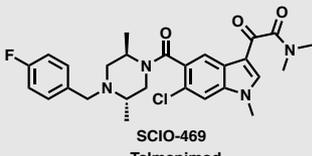


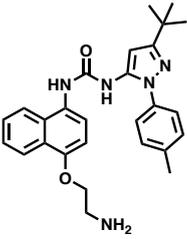
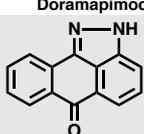
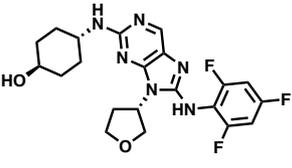
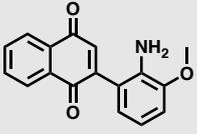
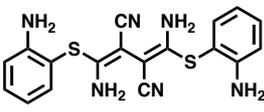
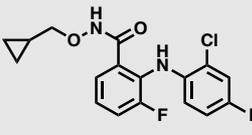
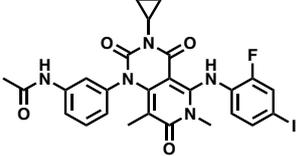
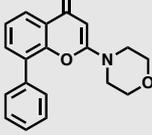
Figure 15 : Présentation des inhibiteurs directs et indirects de l'axe CXCL-ELR⁺/CXCR.

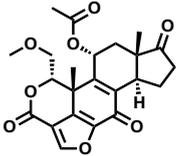
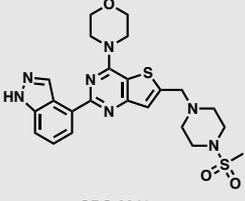
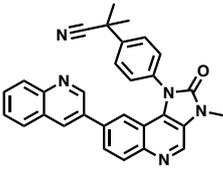
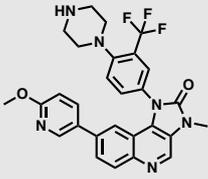
2.2.1 Stratégies indirectes

Les stratégies indirectes envisagées pour moduler l'expression de CXCL8, comptent différents inhibiteurs de kinases, tels que les inhibiteurs des MAPK, des voies de signalisation de la PI3K mais aussi des inhibiteurs du protéasome et certains anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Tableau 1). L'inhibition de ces différentes cascades en amont de la transcription de CXCL8, va engendrer une baisse de la production de celle-ci, ayant pour conséquence une signalisation atténuée *via* ses récepteurs. Ainsi, les cellules cancéreuses deviendront plus sensibles aux différentes interventions thérapeutiques conventionnelles puisque la signalisation de CXCL8 activant les voies alternatives pour la progression et la survie tumorale, sera diminuée.

Tableau 1 : Divers exemples d'inhibiteurs indirects de CXCL8.

Nom	Structure	Cible	Étude Clinique
SB203580 ⁸²	 SB203580	p ³⁸ MAPK (inhibiteur compétitif de l'ATP)	X
SB202190 ⁸²	 SB202190	p ³⁸ MAPK (inhibiteur compétitif de l'ATP)	X
Losmapimod ⁸³	 GW856553X Losmapimod	p ³⁸ MAPK (inhibiteur compétitif de l'ATP)	<ul style="list-style-type: none"> • Maladies cardiovasculaires (Phase III : NCT02145468) • Maladies pulmonaires inflammatoires (Phase II : NCT02299375) • Athérosclérose (Phase II : NCT00633022) • Dépression (Phase II : NCT00569062) • Arthrite rhumatoïde
Talmapimod ⁸³	 SCIO-469 Talmapimod	p ³⁸ MAPK (inhibiteur compétitif de l'ATP)	<ul style="list-style-type: none"> • Syndromes myélodysplasiques (Phase II : NCT00113893) • Myélome multiple (Phase II : NCT00095680) • Polyarthrite rhumatoïde (Phase II : NCT00043732)

Doramapimod ⁸⁴		p ³⁸ MAPK (inhibiteur allostérique de l'ATP)	<ul style="list-style-type: none"> • Psoriasis (Phase II : NCT02209753) • Arthrite rhumatoïde (Phase II : NCT02214888)
SP600125 ⁸⁵	 Doramapimod SP600125	JNK	X
Tanzisertib ⁸⁵	 CC-930 Tanzisertib	JNK	<ul style="list-style-type: none"> • Fibrose pulmonaire (Phase II : NCT01203943)
PD98059 ⁸⁶	 PD98059	MEK (inhibiteur compétitif de l'ATP)	X
U0126 ⁸⁶	 U0126	MEK (inhibiteur compétitif de l'ATP)	X
CI-1040 ⁸⁷	 CI-1040	MEK	<p>En Phase II (NCT00034827) pour les cancers suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cancer du sein • Cancer du pancreas • Cancer du poumon
Trametinib ⁸⁸	 Trametinib	MEK (inhibiteur allostérique)	> 150 études cliniques (Phase I, II, III et IV)
LY294002 ⁸⁹	 LY294002	PI3K	<ul style="list-style-type: none"> • Neuroblastome (Phase I : NCT02337309)

Wortmannin ⁹⁰		PI3K	X
GDC-0941 ⁹¹⁻⁹³		PI3K	<ul style="list-style-type: none"> • Cancer du sein (Phase II : NCT01740336) • Cancer du sein métastatique (Phase I : NCT00928330) • Cancer du poumon (Phase II : NCT01493843)
BEZ235 ⁹¹⁻⁹³		PI3K	Le composé BEZ235 a été évalué jusqu'en Phase II dans plusieurs cancers métastatiques chez des patients en échec thérapeutique. Les études terminées comme par exemple la NCT01717898 , n'ont pas été poursuivies en raison de la forte toxicité de ce composé même aux doses les plus faibles.
BGT226 ⁹¹⁻⁹³		PI3K	X

La plupart des inhibiteurs indirects de CXCL8 développés, n'ont pas atteint le stade clinique pour cause de toxicité. Pour ceux entrés dans des essais cliniques, ils ont démontré un bénéfice médiocre lorsqu'ils sont administrés en monothérapie. La résistance adaptative aux médicaments, est apparue comme une raison majeure de l'échec de ces approches, en plus de leurs sévères effets de toxicité et de leur faible spécificité pour une voie de signalisation.⁹⁴

2.2.2 Les stratégies directes pour cibler l'axe CXCL-ELR⁺-CXCR

2.2.2.1 Anticorps neutralisants CXCL8

Les anticorps anti-CXCL8 (ABX-IL8, HuMab 10F8) ciblent directement la chimiokine CXCL8 en empêchant sa liaison sur ses récepteurs. Cependant, l'utilisation d'anticorps anti-CXCL8 ne tient pas compte de la nature redondante de la signalisation des chimiokines qui permet aux cellules

cancéreuses d'échapper aux traitements et de garantir leur survie.⁹⁵ En effet, les anticorps anti-CXCL8 ne permettent pas d'inhiber l'action des autres chimiokines CXCL-ELR⁺ également surexprimées dans le microenvironnement tumoral, sur les récepteurs CXCR1-2. Ainsi, malgré l'inhibition de CXCL8 *via* l'utilisation d'anticorps monoclonaux, la signalisation de l'axe CXCL-ELR⁺/CXCR1-2 sera maintenue par d'autres chimiokines activatrices.⁹⁶ Par conséquent, le ciblage des récepteurs CXCR1 et CXCR2, est susceptible d'être plus efficace que la neutralisation de CXCL8 seul.

2.2.2.2 Anticorps neutralisants CXCR1/2

Plusieurs études ont révélé d'importants effets anti-tumoraux pour les anticorps monoclonaux anti-CXCR1 et anti-CXCR2 (en particulier dans le cancer du poumon à petites cellules).^{97,98} Malgré des résultats prometteurs illustrant la capacité de ces anticorps à entraver l'angiogenèse, aucun d'eux n'a été avancé à ce jour dans des essais cliniques en oncologie.^{99,100}

2.2.2.3 Les inhibiteurs peptidiques de CXCR1/2

Les pepducines sont de petites molécules pénétrant dans les cellules, qui agissent comme des modulateurs intracellulaires du transfert du signal des récepteurs aux protéines G. Elles sont composées d'une fraction lipidique qui est attachée à l'extrémité *N*-terminale d'une séquence d'acides aminés spécifiques, provenant de l'une des boucles intracellulaires (i1, i2 ou i3) ou de la queue C-terminale (i4) du RCPG d'intérêt.¹⁰¹ La fraction lipidique permet la translocation à travers la membrane plasmique afin d'ancrer la pepducine à la face intracellulaire de la membrane plasmique, où la séquence d'acides aminés peut inhiber l'activation de la signalisation en interrompant l'interaction entre les boucles intracellulaires du récepteur et de sa protéine G. Les pepducines inhibant CXCR1-2 ont été conçues pour cibler les première (i1) et troisième (i3) boucles intracellulaires de CXCR1 et CXCR2 (dont la séquence est identique à ce niveau du récepteur) permettant d'avoir un double ciblage de la signalisation de ces deux récepteurs (Figure 16).

— Inhibition des pepducines

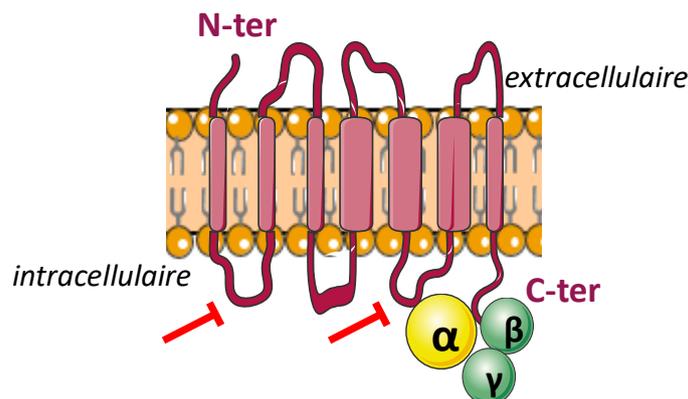


Figure 16 : Inhibition des boucles i1 et i3 de CXCR1-2 par les pepducines.

Les pepducines conçues contre les boucles intracellulaires i1 ou i3 de CXCR1/2 sont capables d'inverser certains processus associés au phénomène inflammatoire présent dans les cancers, en particulier de réduire le recrutement des neutrophiles lors de l'inflammation pathologique.¹⁰² Cependant, à ce jour, aucun essai clinique n'a été engagé.^{68,103}

2.2.2.4 Petites molécules inhibitrices connues des récepteurs CXCR1 et CXCR2

Les petites molécules capables d'inhiber l'axe CXCL-ELR⁺/CXCR ont d'abord été conçues pour être sélectives de CXCR2 par rapport à CXCR1 (à l'exception de la répertaxine, inhibiteur allostérique de CXCR1 et CXCR2). Toutes les chimiokines ELR⁺ se lient au récepteur CXCR2, contrairement à CXCR1. Ainsi l'inhibition de CXCR2 pourrait fournir une application thérapeutique plus large.⁸¹ Contrairement aux thérapies ciblées utilisant des anticorps spécifiques d'une seule CXCL, les inhibiteurs de CXCR1 et CXCR2 vont bloquer l'action de toutes les chimiokines (CXCL) augmentant considérablement leur efficacité. Il existe un certain nombre d'antagonistes connus de ces récepteurs utilisés actuellement en clinique dans le traitement de maladies inflammatoires notamment pour la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'asthme, le psoriasis, la fibrose kystique, l'arthrite et le cancer.¹⁰⁴

GlaxoSmithKline (GSK) a été l'une des premières sociétés pharmaceutiques à développer des antagonistes sélectifs CXCR2. La première famille d'antagonistes comportait des composés de type hydroxyphenyldiarylurées (Figure 17). Le composé SB225002 (*N*-(2-bromophényl)-*N'*-(2-hydroxy-4-nitrophényl)urée) est un antagoniste compétitif de CXCR2 et CXCR1, avec une sélectivité 150 fois supérieure pour CXCR2 ($IC_{50} = 22 \text{ nM}$).¹⁰⁵

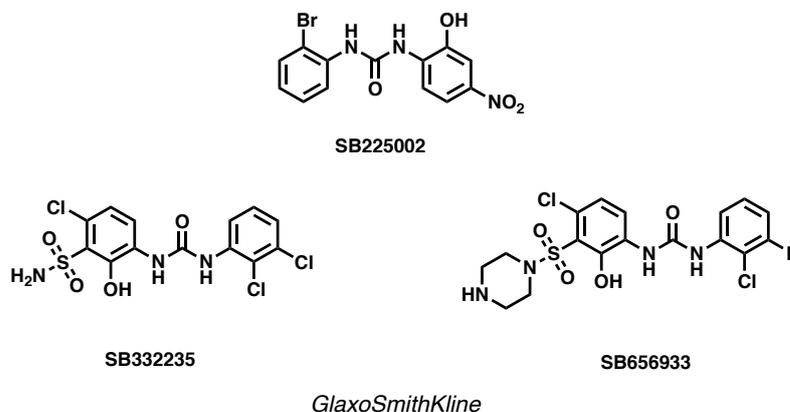
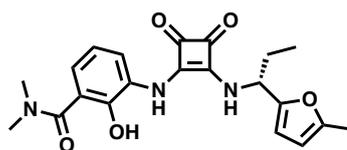


Figure 17 : Exemples d'antagonistes de CXCR1-2 de type urée.

Des optimisations structurales ont permis de mettre en évidence l'importance d'un motif sulfonamide dans le cycle phénolique pour les composés SB332235 et SB656933, afin améliorer la clairance métabolique (Figure 17).¹⁰⁶ Le composé SB656933 (*N*-(2-chloro-3-fluorophényl) -*N'*-[4-chloro-2-hydroxy-3- (pipérazin-1-ylsulfonyl) phényl]-urée), a été utilisé dans une étude clinique (NCT00748410) pour réduire l'inflammation des voies respiratoires induite par l'ozone chez des patients atteints de fibrose kystique et de BPCO.¹⁰⁷ Cependant, aucun changement dans la fonction pulmonaire n'a été constaté, suggérant que l'inhibition de CXCR2 seule n'est pas suffisante.¹⁰⁶

Un autre exemple, avec le composé SCH527123 [2-hydroxy-*N,N*-diméthyl-3-[[2-[[1(*R*)-(5-méthyl-2-furanyl)propyl] amino] -3,4-dioxo-1-cyclobuten-1-yl] amino] benzamide], qui est un puissant antagoniste allostérique de CXCR1 ($IC_{50} = 42 \text{ nm}$) et CXCR2 ($IC_{50} = 3 \text{ nm}$) développé par Schering Plough (Figure 18).^{108,109}



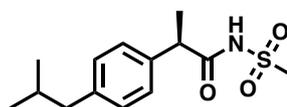
SCH-527123

Schering-Plough

Figure 18 : Exemple d'antagoniste de CXCR1-2

Dans les études précliniques, SCH527123 a montré des effets anticancéreux dans les modèles murins de cancer du côlon et du mélanome entraînant une réduction de la croissance tumorale et la densité des microvaisseaux. De plus, l'administration de SCH527123 en combinaison avec l'oxaliplatine a entraîné des réductions plus importantes de la prolifération cellulaire, de la croissance tumorale et de l'angiogenèse par rapport à leur utilisation en monothérapie chez des souris xénotransplantées avec des cellules cancéreuses du côlon (HCT 116).¹¹⁰ Plusieurs de ces études ont permis de mettre en évidence que le composé SCH527123 administré oralement s'est révélé être bien toléré, et qu'aucun effet indésirable n'a été induit (NCT00688467).¹¹¹

Dompé, a développé la réparixine (anciennement connue sous le nom de répertaxine) qui est un inhibiteur non-compétitif de CXCR1 et CXCR2 (Figure 19). Il s'agit d'un dérivé d'acylméthanesulfonamide : ((2R)-2-[4-(2-méthylpropyl)phényl]-N-(méthylsulfonyl)propanamide).¹¹²



Repertaxine

Figure 19 : La repertaxine un exemple d'inhibiteur de CXCR1-2 de type sulfonamide.

Cette molécule est structurellement différente des classes d'antagonistes antérieures. La modélisation moléculaire a montré que la réparixine est un antagoniste allostérique qui se lie à une poche transmembranaire juxtaposée de CXCR1.^{112,113}

Dans un modèle préclinique du cancer du sein, la réparixine a entraîné une réduction de la croissance tumorale et des métastases, à la fois lorsqu'elle est administrée en monothérapie et lorsqu'elle est administrée en association avec du docétaxel ou avec du paclitaxel et n'a révélée aucune toxicité lors des études de phase I.¹¹⁴ Une étude de phase II (NCT02370238) a ensuite été engagée utilisant la même combinaison (réparixine + paclitaxel).¹¹⁵ Elle a été évaluée dans d'autres essais cliniques de phase II, notamment pour les maladies pulmonaires inflammatoires (NCT00224406) mais aussi pour les patients atteints de diabète de type I ayant subi une transplantation d'îlots producteurs d'insuline (NCT01220856).¹¹⁶ Actuellement, c'est la molécule la plus avancé dans son développement clinique.

Dompé a également développé un certain nombre de composés apparentés, dont le DF2162 (4-[(1R)-2-amino-1-méthyl-2-oxoéthyl]phényl trifluorométhane sulfonate) qui est capable d'inhiber à la fois CXCR1 et CXCR2 (Figure 20). Le DF2162 a montré des résultats prometteurs dans les études précliniques de la polyarthrite et de la fibrose pulmonaire sur des modèles murins.¹¹⁷

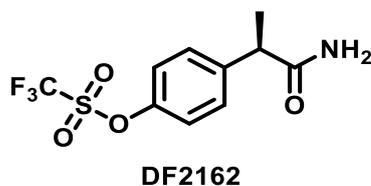


Figure 20 : Structure du composé DF2162 développé par Dompé.

AstraZeneca a également développé un certain nombre d'antagonistes sélectifs de CXCR2 fondés sur une famille possédant un noyau central de type pyrimidine (Figure 21).

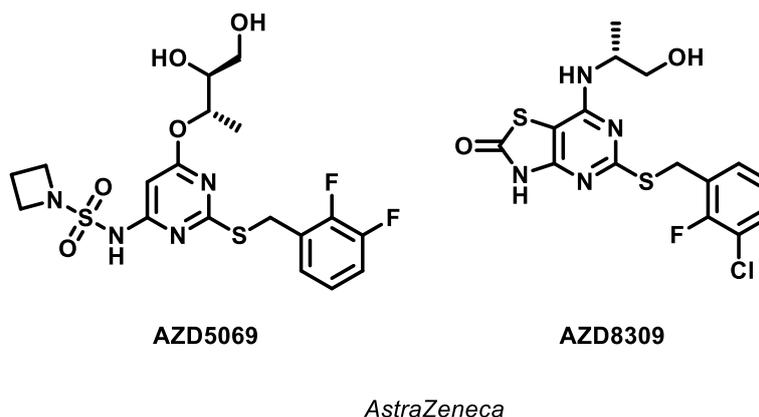


Figure 21 : Exemples d'antagonistes développés par AstraZeneca.

Un des agents de cette série, le composé AZD8309, a été utilisé dans des essais cliniques de phase I pour la BPCO (NCT00860821).¹¹⁸ Les études menées avec le composé AZD8309 ont été interrompues en 2007 suite à l'optimisation de cette série qui a permis le développement de nouveaux antagonistes de CXCR2 de type thiazolo [4,5-d] pyrimidine substituée.¹¹⁹ Par exemple, le composé AZD5069 (N-[2-[[[(2,3-difluorophény) méthyl]thio]-6-[[[(1R,2S)-2,3-dihydroxy-1-méthylpropyl] oxy] - 4-pyrimidinyl] -1-azétidinesulfonamide), s'est révélé être bien toléré tout au long d'une étude de phase I (NCT01233232) chez des sujets sains et a ensuite été soumis à plusieurs d'études de phase II (NCT01255592) pour des indications telles que la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPOC), la bronchectasie et l'asthme.^{118,120}

2.2.3 Conclusion du chapitre 2

Dans ce chapitre, le rôle clé de l'axe CXCL-ELR⁺/CXCR dans l'angiogenèse et dans la progression des cancers a été mis en lumière. Cependant, la redondance biologique de cette voie de signalisation due à une activation continue des récepteurs CXCR1 et CXCR2 par les diverses chimiokines CXCL-ELR⁺ rend très complexe le développement de nouveaux agents thérapeutiques et freine l'efficacité des traitements actuels. Un aperçu des différents inhibiteurs directs ou indirects de cette voie a été listé et permet d'appuyer la nécessité de développer de nouveaux antagonistes de l'axe CXCL-ELR⁺/CXCR pour le traitement des cancers. Aujourd'hui seulement neuf inhibiteurs (petites molécules ou anticorps) sont utilisés en clinique, majoritairement pour le traitement des maladies pulmonaires inflammatoires (Tableau 2).^{81,107}

Tableau 2 : Inhibiteurs directs et indirects de l'axe CXCL8/CXCR1-2 en phase clinique.

Structure des inhibiteurs	Phase clinique	Indication
Repertaxine	Phase 3	Pour la transplantation d'îlots pancréatiques dans le diabète de type 1
Navarixine (SCH 527123, MK-7123)	Phase 2	Asthme, psoriasis, BPCO
Danirixine (GSK1325756)	Phase 2	BPCO
Ladaraxine (DF2156A)	Phase 2	Pemphigoïde bulleuse
AZD5069	Phase 2	Asthme, BPCO, bronchectasie
AZD8309	Phase 1	Polyarthrite rhumatoïde, BPCO
SB656933	Phase 1	BPCO
ABX-IL8	Phase 1	BPCO
HuMax-IL8	Phase 1	Cancer de la prostate

Chapitre 3 :

Les diarylurées comme preuve de concept

3.1 Travaux antérieurs

3.1.1 Contexte du projet de thèse

Cibler l'axe CXCL-ELR⁺/CXCR1-2 semble être une hypothèse scientifique pertinente dans le cas des cancers incurables et résistants aux traitements actuels (exemple : le cancer du rein métastatique).^{59,105} En effet, dans les cellules cancéreuses rénales, les niveaux d'expression des cytokines et de leur récepteurs CXCR sont largement supérieurs à ceux retrouvés dans les cellules saines.^{121,122}

En collaboration avec l'équipe de l'IRCAN « Angiogenèse normale et pathologique » dirigée par Gilles PAGES, une preuve de concept *in vivo* a été apportée en 2014. Des souris xénogreffées avec des cellules cancéreuses du rein (786-O) ont été traitées avec le composé SB225002, et une diminution du volume tumoral ainsi qu'une réduction de la vascularisation de la tumeur ont été observées.⁵⁸

L'objectif de cette thèse est de synthétiser de nouveaux inhibiteurs de CXCR1 et CXCR2, ayant une activité à la fois pro-inflammatoire et pro-angiogénique. L'identification d'une molécule à activité duale, permettra de réduire les coûts de développement, de simplifier son mode d'administration, et de limiter le nombre d'effets secondaires associés à cet agent unique.

3.1.2 Développement d'une molécule hit

Notre équipe a développé une première série d'inhibiteurs de CXCR1 et CXCR2 de type diarylurées et diarylthiourées.⁵⁹ L'objectif principal de cette nouvelle série inspirée du composé SB225002, est d'améliorer sa valeur d'IC₅₀ sur les cellules cancéreuses du rein sensibles et résistantes au traitement de référence : le sunitinib, et également de potentialiser son effet anti-angiogénique. Des changements structurels ont été envisagés afin d'étudier l'impact de ces modulations envers les cibles CXCR1 et CXCR2 (Figure 22). Ces changements ont été effectués au niveau de la disubstitution des urées ou thiourées. Par exemple, le passage d'un dérivé phényle à un motif benzoxazole, benzimidazole ou benzothiazole a été réalisé.

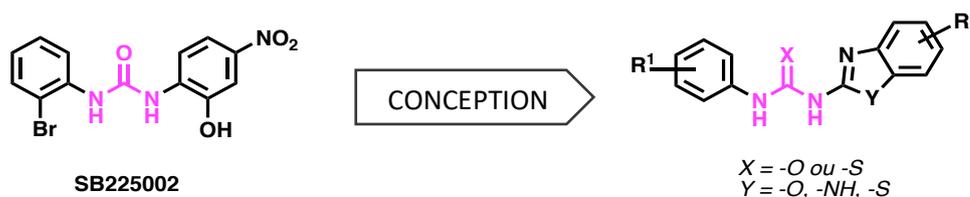


Figure 22 : Conception de nouveaux antagonistes à partir de la molécule SB225002.

La formation de ces diarylurées consiste en l'attaque nucléophile de différentes amines aromatiques de type benzothiazole, benzoxazole ou benzimidazole sur des phényles isocyanates ou isothiocyanates, suivie d'une tautomérisation spontanée. Ainsi, 33 molécules de type diarylurées ou diarylthiourées ont été obtenues avec des rendements compris entre 60-100%, à température ambiante dans le *N,N'*-diméthylformamide (DMF) (Schéma 2).⁵⁹

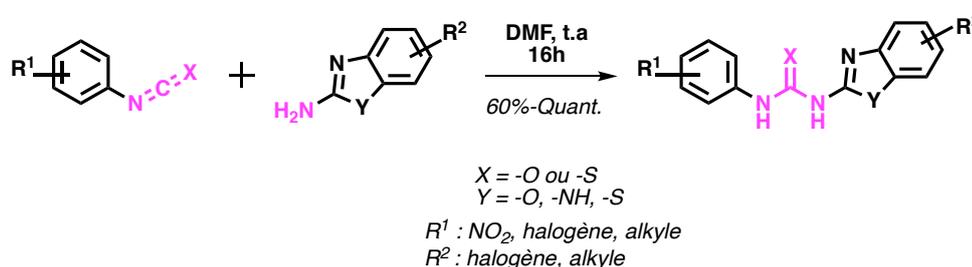


Schéma 2 : Préparation des dérivés de type diarylurées ou diarylthiourées, à partir d'un aryl iso(thio)cyanate et d'une amine aromatique (benzoxazole, benzimidazole ou benzothiazole).

Les IC_{50} de toutes les molécules ont été évaluées sur différentes lignées cellulaires : i) cancers du sein (MDA-MB-231), ii) du cou et de la tête (HNSCC 27 et 33), iii) du rein (786-O, RCC4, A498), iv) hématologiques (AML-2, AML-3, MolM13, MolM14, SKM1, K562) et sont présentées sur la figure 23. Cette étude a permis d'obtenir des résultats préliminaires de Relation-Structure-Activité. En effet, sur les 33 nouvelles molécules évaluées pour leur activité antiproliférative, seulement deux hits potentiels ont émergé, les composés MCK 133 et MCK 140, avec des activités antiprolifératives intéressantes en comparaison avec le composé SB225002.

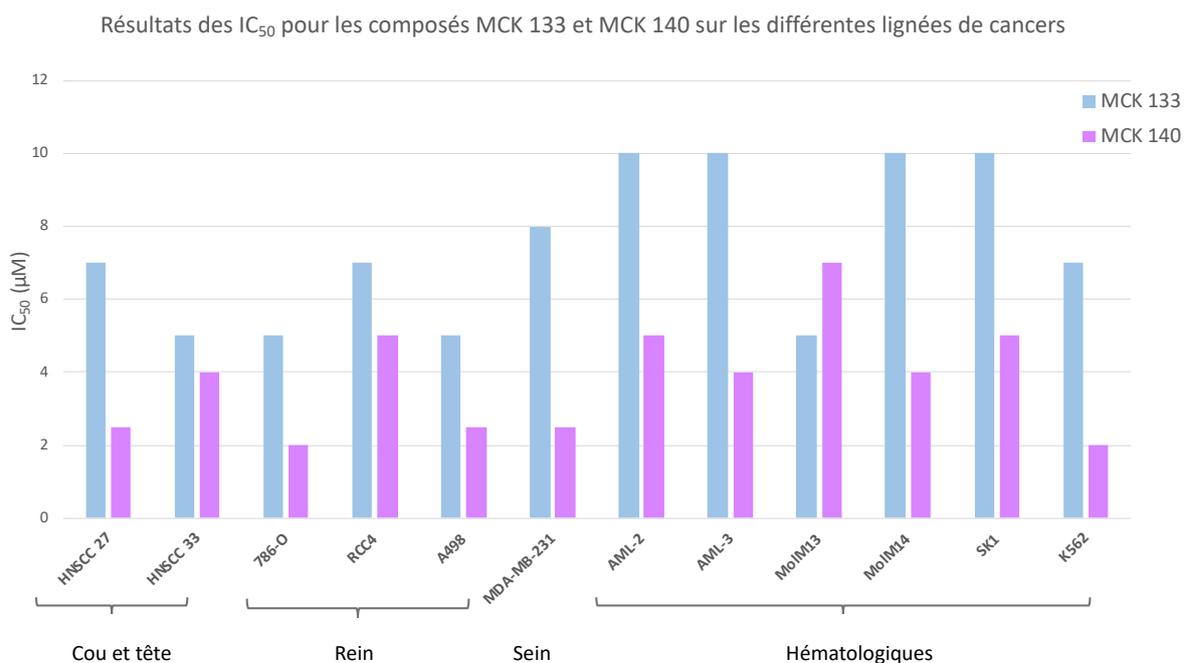
**MCK133** $IC_{50} = 5 \mu M$ (786-O)**MCK140** $IC_{50} = 2 \mu M$ (786-O)

Figure 23 : Comparaison des IC_{50} mesurées avec le test XTT (48 h) des composés MCK 133 et MCK 140 avec le composé SB225002 ($70 > IC_{50} > 100 \mu M$ sur ces lignées cellulaires). Les résultats sont exprimés en μM , et toutes les valeurs IC_{50} données sur le graphique ont montré un écart type de 10%. Les résultats sont représentés par la moyenne de trois expériences indépendantes.

Ces molécules ont des $IC_{50} < 10 \mu M$ bien inférieures à celles observées avec le composé SB225002 ayant des IC_{50} comprises entre $70 \mu M$ et $> 100 \mu M$ sur ces lignées (Figure 23). En outre, les composés MCK 133 et MCK 140 sont bien plus efficaces sur des lignées agressives (A498) avec des IC_{50} de $5 \mu M$ et $3 \mu M$, respectivement, et sur les lignées de cancer du rein (786-O) avec des IC_{50} respectives de $5 \mu M$ et $2 \mu M$. De plus, aucune toxicité notable sur les cellules saines (fibroblastes et cellules de rein sain) n'a été observée pour les composés MCK 133 et MCK 140.⁵⁹

Ces résultats ont également permis de déterminer l'importance de certains motifs et groupements chimiques, essentiels à cette activité antiproliférative. Les dérivés comportant un cycle benzoxazole n'ont démontré aucune activité antiproliférative en comparaison des composés possédant des motifs aromatiques de type benzimidazole ou benzothiazole. De plus, les valeurs d'IC₅₀ les plus intéressante correspondaient aux composés avec un cycle chlorophényle.

Par la suite, la capacité de ces composés à bloquer l'interaction entre les ligands CXCL-ELR⁺ (CXCL1-3, et 5-8) et leurs récepteurs CXCR1 et CXCR2 a été évaluée sur des cellules HUVECs (cellules endothéliales de veine de cordon ombilical). Ces cellules représentent en biologie un modèle de référence pour l'étude du phénomène de l'angiogenèse. Ainsi, l'inhibition de la chimiotaxie des cellules HUVECs, permet de valider l'interaction de nos molécules sur les récepteurs CXCR1 et CXCR2 (*cf.* chapitre 5). En présence des composés MCK 133 et MCK 140 introduits à une concentration de 1 μ M, une nette diminution de la migration des cellules HuVECs attirées par CXCL5 est observée par rapport au contrôle (Figure 24).

Motilité cellulaire (Chambre de Boyden)

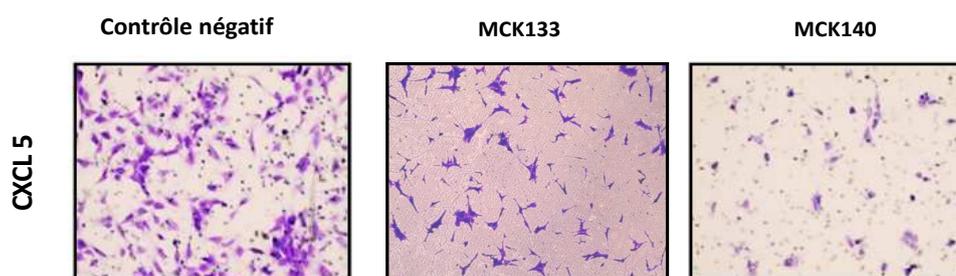


Figure 24 : Images de migration cellulaire observées par microscopie électronique démontrant une diminution de la migration en présence de traitement à 1 μ M (MCK 133 et MCK 140). Test de migration adapté du principe de la chambre de Boyden afin de déterminer la capacité des composés MCK133 et MCK140 à inhiber l'interaction entre CXCL5 et les récepteurs CXCR1 et CXCR2.

A une concentration de 1 μ M, le MCK 140 provoque des effets anti-migratoires plus marqués que le MCK 133. D'après les résultats précédents le composé MCK 140 semble être la molécule la plus prometteuse de cette série, présentant la meilleure IC₅₀ sur les différentes

cellules cancéreuses du rein (786-O, A498, RCC4) et des effets marqués sur l'interaction entre les récepteurs CXCR1/CXCR2 et leurs ligands.

Le composé MCK 140 a été pris comme molécule de référence pour la suite des tests biologiques. Ce composé inhibe l'activité de la voie de signalisation ERK/MAPK en empêchant la phosphorylation de la protéine ERK indirectement induite par les ligands CXCL5-7 (Figure 25).¹²³

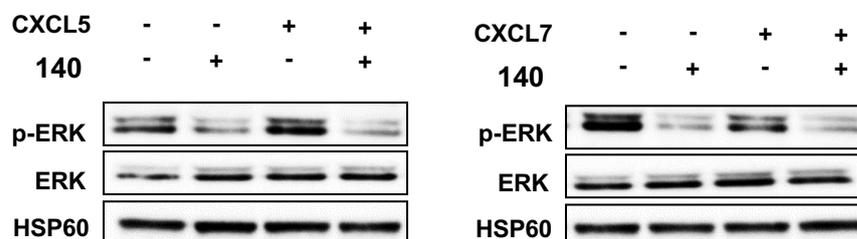


Figure 25 : Inhibition de la phosphorylation de ERK en présence du MCK 140, démontrant que ce composé inhibe la voie de signalisation de l'inflammation, sous-jacente à l'activation de CXCR1 et CXCR2.

Le traitement de référence pour les cancers du rein est le sunitinib, nous avons donc cherché à étudier les effets du composé MCK 140 sur un modèle cellulaire du carcinome du rein résistant au sunitinib : les cellules 786R (Figure 26).¹²⁴

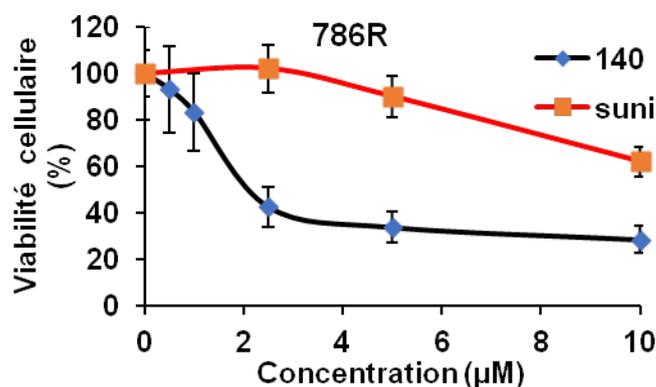


Figure 26 : Effet du MCK140 sur des cellules cancéreuses du rein résistantes au Sunitinib.

Le MCK 140 inhibe plus de 50% de la viabilité cellulaire des cellules 786R, à une concentration de 2 µM, alors que le sunitinib n'a aucun effet à cette même concentration (Figure

26). Des tests de clonogénicité, permettant d'évaluer la capacité d'une molécule à inhiber la formation de colonies, ont été effectués avec le MCK 140. Les résultats ont mis en évidence que ce composé inhibe la formation de colonies, à la fois sur les cellules cancéreuses du rein sensibles et résistantes au sunitinib (Figure 27).

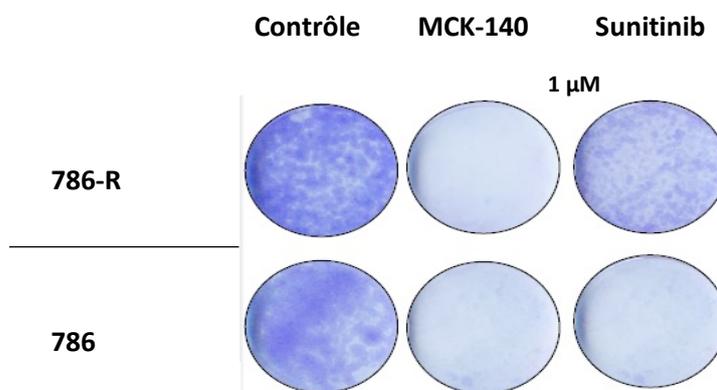


Figure 27 : Test de clonogénicité sur cellules 786-O et 786-R permettant d'observer la formation de colonie ou non en présence et en absence de traitement. Ces résultats résultent d'images microscopiques après une incubation de 10 jours et une coloration au bleu de Giesma.

Aux vues de ces résultats encourageants, le MCK 140 a été évalué *in vivo*. Ces études ont été réalisées sur des souris xéno-gréffées avec des cellules agressives du cancer du rein (A498) (Figure 28).

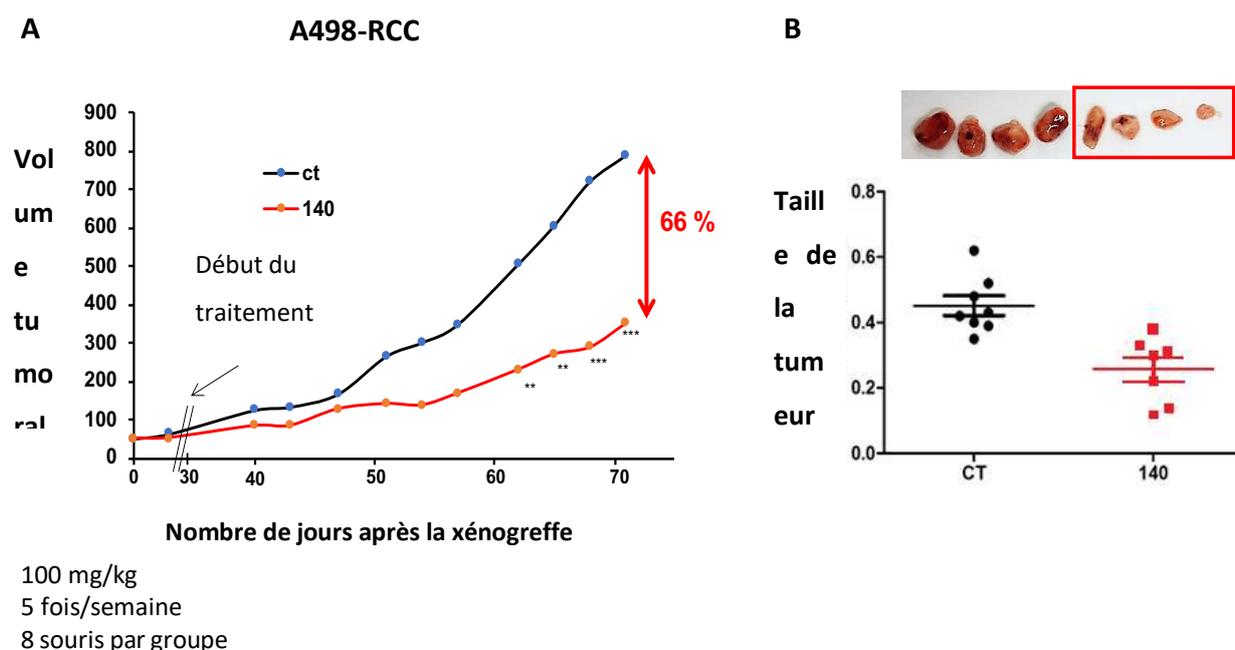


Figure 28 : Résultats *in vivo* sur des souris xéno greffées avec des cellules du RCC. Lorsque la tumeur atteignait 100 mm³, les souris étaient traitées cinq fois par semaine pendant deux semaines par gavage avec un placebo (véhicule dextrose eau) ou avec le MCK140 (100 mg/kg). A : Évolution du volume tumoral en présence du traitement comparé au control. B : Évolution de la masse tumorale en présence du traitement comparé au control. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

La molécule MCK 140 ralentit la croissance tumorale avec une diminution de plus de 66% du volume de la tumeur à la fin des 70 jours d'expérience, comparé au contrôle (Figure 28A). Ce résultat est en corrélation avec une diminution du poids de la tumeur de 40% pour le RCC (Figure 28B). De plus, aucune perte de poids des animaux du groupe traité n'a été observée, ce qui suggère que cette molécule n'a pas exercé de toxicité aiguë. Ainsi le composé MCK 140 a inhibé, *in vitro* à la fois la viabilité des cellules tumorales et l'angiogenèse et a démontré *in vivo*, une diminution de la masse tumorale sur des cellules du cancer du rein.^{59,125} Ces résultats ont ainsi permis de valider notre approche sur un modèle de cancer du rein à la fois sensible et résistant au traitement de référence (sunitinib).

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons envisagé de proposer un nouveau motif isostère de l'urée centrale. L'objectif de mon travail de thèse s'inscrit dans la continuité de ces

résultats, mais propose le développement et la synthèse d'une nouvelle famille d'inhibiteurs de type : 2-aminobenzothiazinones.

3.1.3 Conception de nouvelles petites molécules inhibitrices, pour l'axe CXCL-ELR+/CXCR1-2

Pour cette nouvelle famille de composés, nous proposons de remplacer les diarylurées qui ont été largement décrites,¹²⁶⁻¹²⁹ par le motif 2-aminobenzothiazinone peu étudié dans le développement de petites molécules anti-cancéreuses. Le noyau 2-aminobenzothiazinone permet de conserver une distribution électronique similaire à celle des molécules de type diarylurée en particulier grâce au motif indiqué en rose sur la figure qui permet la délocalisation du doublet de l'amine secondaire jusqu'au carbonyle (Figure 29). Cette délocalisation est semblable à celle retrouvée sur le motif urée et permet de considérer les amines secondaires de chaque molécule avec des propriétés chimiques proches.

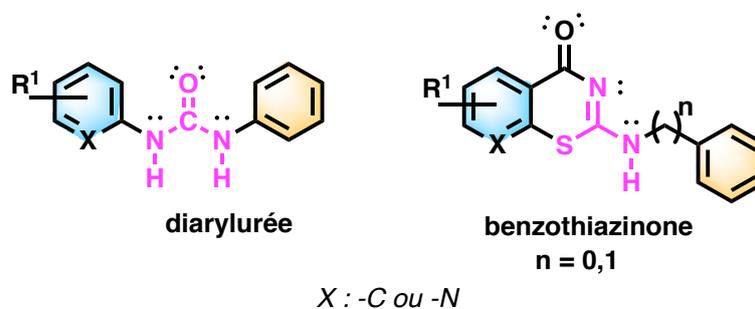


Figure 29 : Mise en évidence des similitudes entre les diarylurées et les benzothiazinones.

Ainsi, en nous basant sur les résultats préliminaires de Relation-Structure-Activité du laboratoire (en particulier de la molécule MCK 140) et en tenant compte des antagonistes de CXCR1 et CXCR2 déjà développés (en particulier du composé SB225002), nous avons proposé de nouvelles molécules comportant le motif 2-amino-1,3-benzothiazinones (Figure 30).

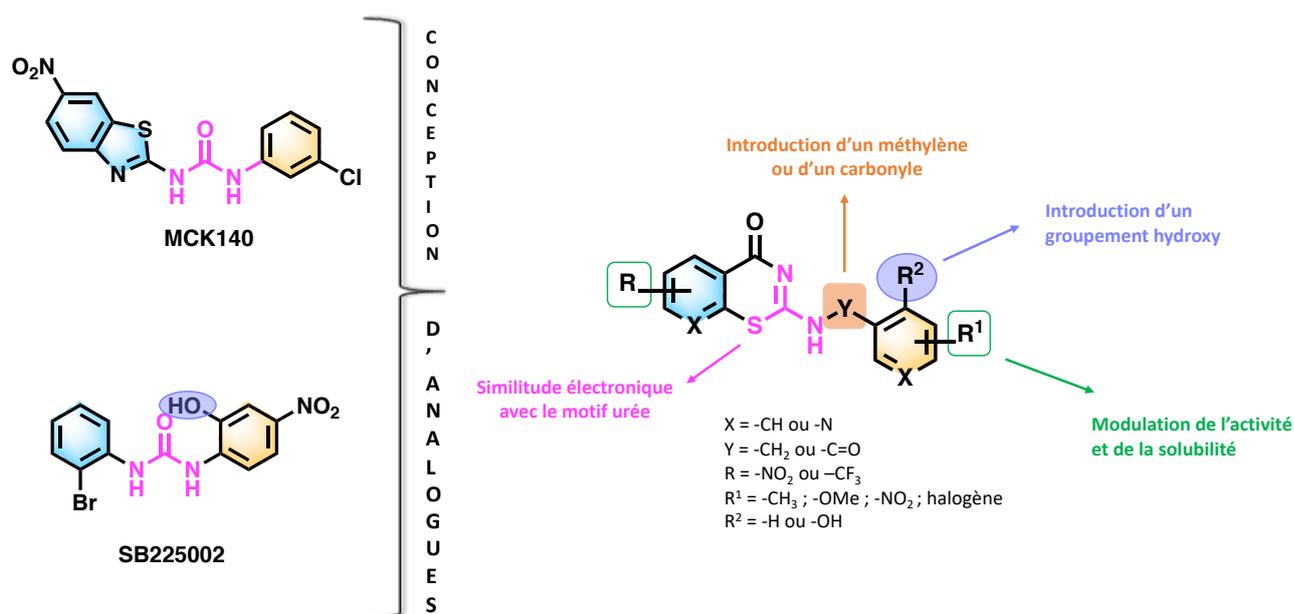


Figure 30 : Pharmacomodulations envisagées pour l'obtention de nouvelles molécules possédant un noyau 2-aminobenzothiazinone, inspirées du composé SB225002, de la molécule hit MCK 140 et des résultats préliminaires de RSA obtenus avec les familles de diarylurées et diarylthiurées.

Des modulations structurales avec divers substituants électroattracteurs (nitro, trifluoro), électrodonneurs (méthyle) ou des halogènes, seront envisagées sur les cycles Ouest et Est des molécules à des positions variables (*-ortho*, *-meta*, ou *-para*) pour compléter les études de RSA (groupements R et R¹ sur la Figure 30). Nous avons également décidé d'introduire un groupement hydroxyle en position *ortho* de l'amine secondaire (groupement R²; Figure 30), afin d'évaluer l'activité biologique des nouvelles molécules. Ce groupement hydroxyle a été choisi car il est présent sur un grand nombre d'antagonistes connus des récepteurs CXCR1 et CXCR2 (exemple le composé SB225002; Figure 30), répertoriés dans la revue de 2017 de H. Ha *et al.*⁶⁰ Soulignons qu'à ce jour, aucun des composés de type 2-amino-1,3-benzothiazinones ne possède un groupement hydroxyle en position *ortho* de l'amine secondaire. De plus, afin de récolter un maximum d'informations pour les études de RSA de ces nouvelles séries de molécules, nous souhaitons aussi préciser si l'éloignement de l'aryle Est influe sur les propriétés pharmacocinétiques des molécules. Pour cela, la nature chimique de l'espaceur va être modifiée soit par l'ajout d'un méthylène soit par l'ajout d'un carbonyle (groupement Y; Figure 30).

Ainsi, 3 grandes familles de molécules basées sur le noyau 2-aminobenzothiazinone et possédant des modifications structurales différentes seront développées. La famille A permettra d'étudier les effets biologiques liés à la présence du groupement hydroxyle en *ortho* de l'amine. La famille B permettra de définir la nature chimique de l'espaceur possédant les meilleures propriétés pharmacocinétiques et biologiques. La dernière famille, la famille C se focalisera en particulier sur deux modulations chimiques sur l'aryle Ouest des composés (groupement R et X ; Figure 30) tout en variant les groupements R¹ et R² de la partie Est.

Chapitre 4 :

Synthèse de modulateurs antagonistes des récepteurs CXCR1/2

4.1 Les 1,3-benzothiazine-4-ones

Les 1,3-benzothiazine-4-one sont une famille de molécules très étudiées et utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques, connues pour posséder différents types d'activité biologique. Par exemple, les 2-thioxobenzothiazine-4-ones naturelles présentes dans l'écorce de *Bretschneidera sinensis* utilisée en médecine chinoise traditionnelle pour soulager de la douleur. Par ailleurs, l'introduction d'un motif 2,3-dihydrobenzo-[1,3]-thiazin-4-one renforce l'activité antipaludique des composés 4-aminoquinoléines. Une étude récente de Junfang Li *et al.* (2020) exploite les dérivés 1,3-benzothiazine-4-one comme agents anti-inflammatoires. (Figure 31).¹³⁰

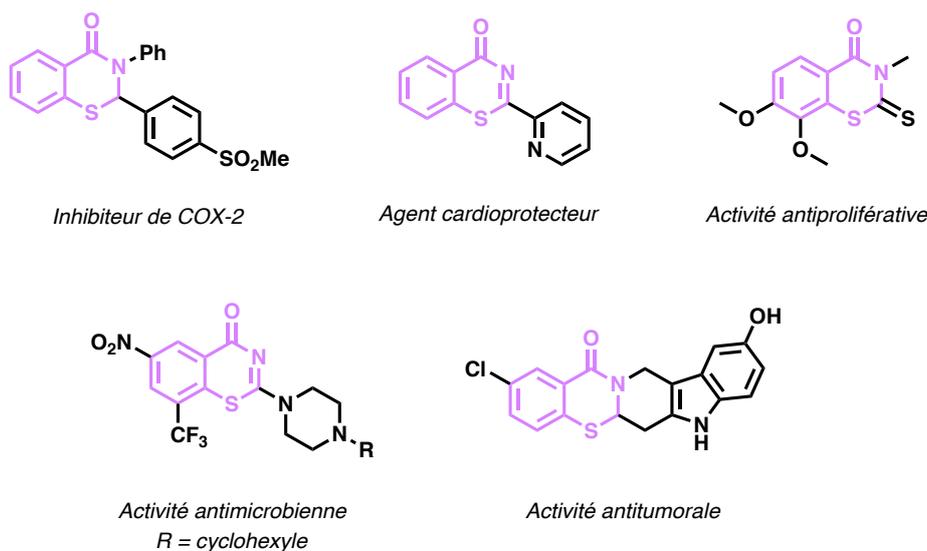


Figure 31 : Quelques exemples de dérivés 1,3-benzothiazinones et 2-amino-1,3-benzothiazinones connus ainsi que leurs différentes activités biologiques. (Source : figure adaptée du papier de LI JUNFANG *et al.*)¹³¹

De plus, des composés possédant un motif 2-amino-4*H*-benzo[*e*][1,3]thiazin-4-one forment une nouvelle classe d'anti-tuberculeux (anti-TB) potentiels : le BTZ 043 et le PBTZ169, sont actuellement en essai clinique de Phase II pour cette application (Figure 32).^{132,133}

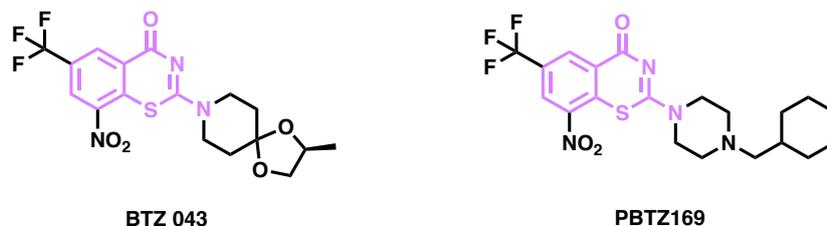


Figure 32 : Structure chimique des composés BZT 043 (NCT04044001) et PBTZ 169 (NCT03334734), en phase II.

Ces récentes études motivent la recherche et le développement de nouvelles molécules bioactives possédant le motif 2-amino-1,3-benzothiazine-4-ones. Les méthodes de synthèse pour ce noyau ont largement été étudiées (Schéma 3).

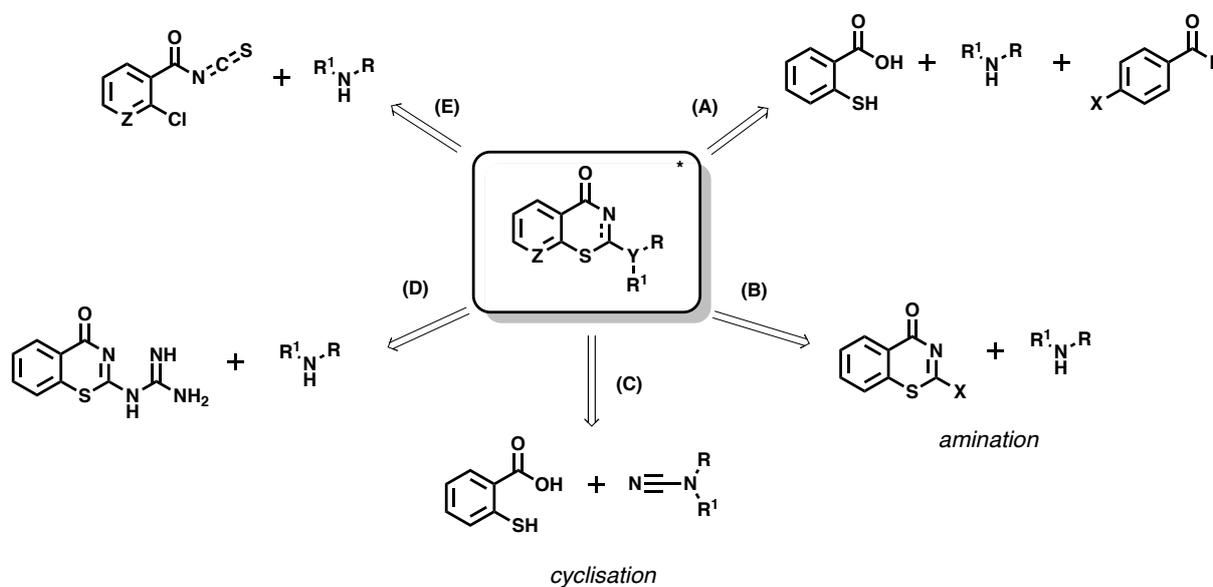
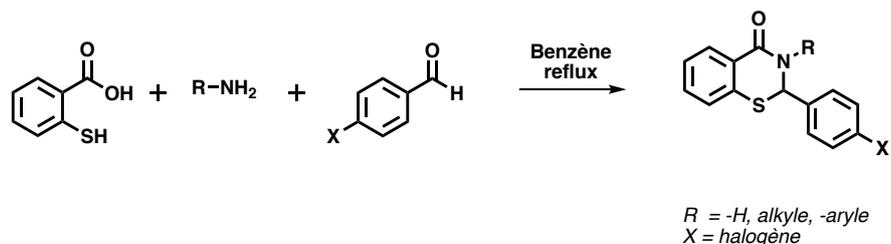


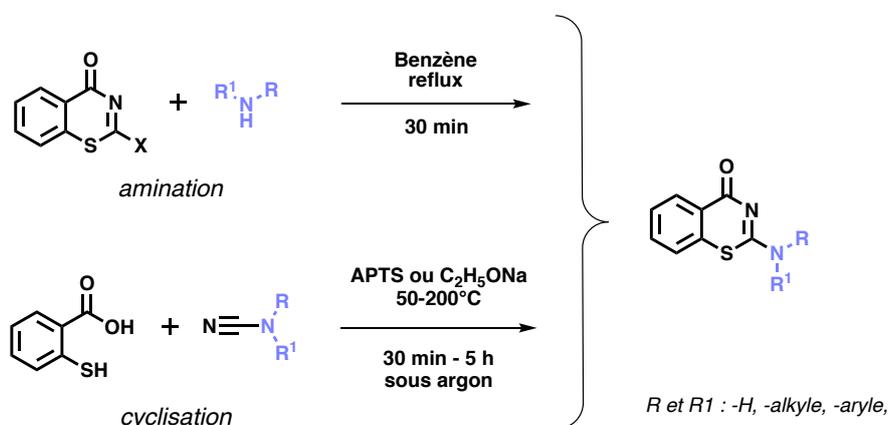
Schéma 3 : Présentation des différentes voies de synthèses pour l'obtention du motif 2-amino-benzothiazinones, reportées dans la littérature.

Voie A



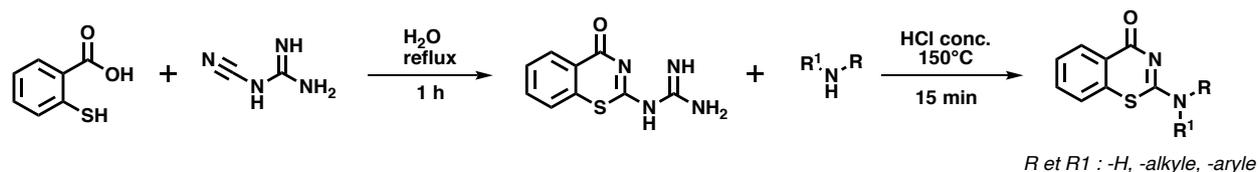
La voie A permet d'obtenir le motif 4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one non-aromatique, à partir d'un halogéno-benzaldéhyde, d'une amine primaire et de l'acide 2-mercaptobenzoïque (Schéma 3 : voie A).¹³⁴ Cette réaction multi-composante permet d'accéder en une seule étape à une grande variété de dérivés 1,3-benzothiazinones substitués ou non au niveau de l'amine. Cependant, cette méthode ne permet pas d'obtenir tous les dérivés souhaités en particulier dans le cas d'amines primaires encombrées (telle que l'aniline) ou d'amines secondaires. De plus, les conditions opératoires sont drastiques et nécessitent l'utilisation du benzène.¹³⁴

Voies B et C



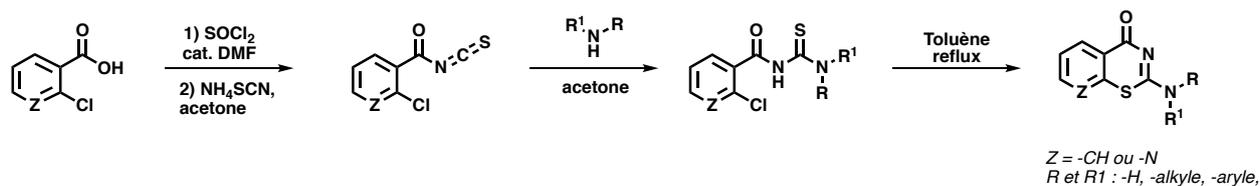
Wolf et son équipe, ont décrit en 1967 deux méthodes de synthèse qui consiste en la préparation de composés de type 2-amino-1,3-benzothiazinone (Schéma 3 : voies B et C).¹³⁵ La première méthode consiste à réaliser une réaction d'amination sur des 2-halogéno-1,3-benzothiazinones (voie B), tandis que la seconde permet par une étape de cyclisation entre l'acide 2-mercaptobenzoïque et un cyanamide, d'obtenir ces dérivés (voie C). Cependant, la voie d'accès par cyclisation est limitée par la disponibilité des réactifs utilisables pour cette étape: alkylthiocarbamide, isothiocyanate de méthyle, isocyanate ou chlorure de carbamoyle, et dicyclohexylcarbodiimide.^{134,136,137}

Voie D



En 2015, Shestakov *et al.* ont modifié les méthodes décrites par Wolf, en combinant les deux voies de synthèse précédentes (cyclisation et amination).¹³⁰ Pour l'étape de la cyclisation le cyanamide a été remplacé par la cyanoguanidine, ce qui permet l'obtention d'un précurseur avec non plus un halogène comme groupe partant mais la guanidine. Ensuite pour l'étape d'amination, l'acide chlorhydrique a été utilisé en remplacement du benzène favorisant les réactions d'addition-élimination sur le guanidinium formé en milieu acide et devenu un bon groupe partant (Schéma 3 : voie D).¹³⁰ Cette nouvelle stratégie permet d'obtenir rapidement (en 1 h 15 obtention des 2-aminobenzothiazinones) et efficacement (>75%), par précipitation les dérivés 2-aminobenzothiazinones dans des conditions de synthèse moins drastiques que celles décrites par Wolf.

Voie E



Une autre méthodologie de synthèse a largement été étudiée et décrite dans la littérature et permet d'obtenir à la fois des composés de type 2-amino-4*H*-benzo[e][1,3]thiazin-4-one mais aussi des dérivés de type 2-amino-4*H*-pyrido[3,2-*e*][1,3]thiazin-4-one (Schéma 3 : voie E).¹³⁸⁻¹⁴⁰ Une plus grande réactivité a été observée dans le cas des 2-aminopyridothiazinone, grâce au motif pyridine qui facilite l'attaque nucléophile en milieu acide lors de la dernière étape de cyclisation.¹⁴¹

L'étude de ces différentes voies synthétiques montre qu'à ce jour diverses méthodes efficaces sont utilisées pour la préparation de dérivés 2-aminobenzothiazinones. Cependant, selon les modulations structurales à apporter sur les composés, il faudra adapter la stratégie de synthèse. En effet, il n'existe à ce jour aucune voie de synthèse unique permettant une grande diversification structurale sur les parties Ouest et Est de ce noyau.

4.2 Synthèse

4.2.1 Les différentes stratégies de synthèse envisagées

Ce travail de thèse s'est articulé autour de trois grandes familles de dérivés de type 2-amino-1,3-benzothiazinone (Famille A et B) et 2-amino-1,3-pyridothiazinones (Famille C). Les dérivés obtenus ont été évalués en biologie pour compléter les études de Relation-Structure-Activité préliminaires (Figure 33).

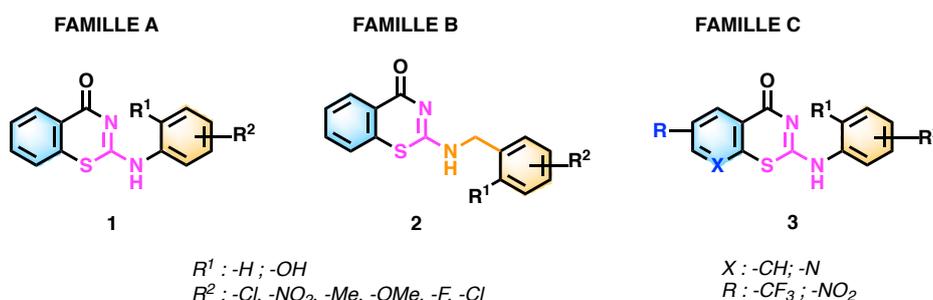


Figure 33 : Présentation des différentes familles avec les modifications structurales envisagées.

Différentes stratégies de synthèse ont ainsi été envisagées pour la préparation de ces trois familles, en tenant compte des modifications à apporter. Les stratégies décrites par Wolf *et al.* (voie C) et Shestakov *et al.* (voie D) ont été essayées et adaptées pour la préparation des familles A et B afin d'obtenir des conditions optimisées et reproductibles pour tous les substrats envisagés.^{130,135} Pour la préparation des composés de la famille C possédant le motif benzothiazinones ou pyridothiazinones, les conditions de synthèse de la voie E décrites par Inami *et al.* ont été appliquées.¹⁴¹

4.2.2 Préparation des composés pour les familles A et B selon la stratégie de synthèse décrite par Wolf.

Nous nous sommes inspirés des conditions de cyclisation proposées par Wolf *et al.* (cf. 4.1 : voie C) pour la préparation du substrat de départ la 2-amino-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (**5**).¹³⁵ Ce précurseur **5** est obtenu à la suite d'une condensation entre l'acide 2-

mercaptobenzoïque (**6**) et le cyanamide (**7**). Une réaction de substitution nucléophile aromatique (S_NAr) a ensuite été envisagée, à partir de ce précurseur **5** en présence de réactifs de type halogéno-(hétéro)aryles. La voie rétrosynthétique est présentée ci-dessous (Schéma 4.A).

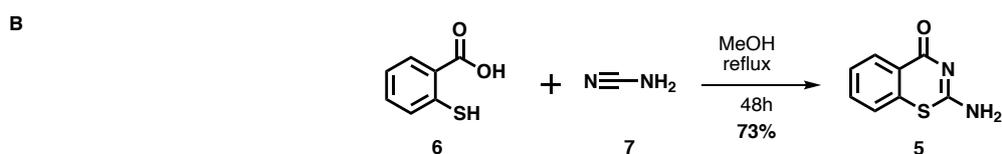
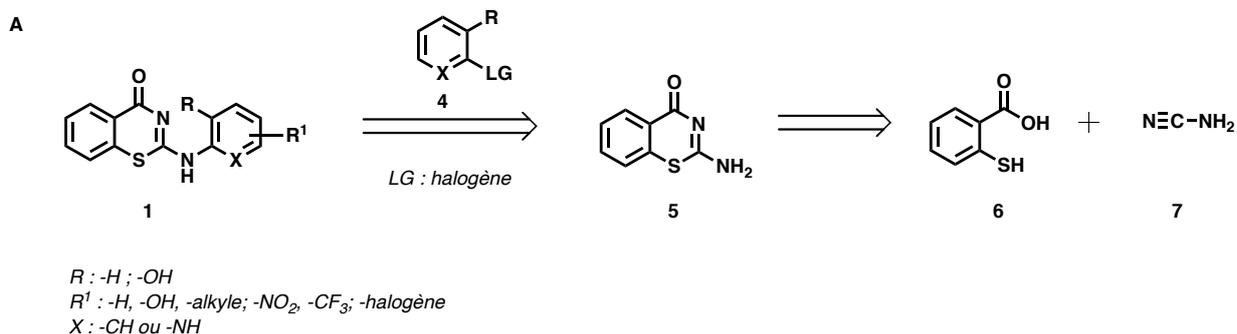


Schéma 4 : A. Rétrosynthèse envisagée pour la préparation des dérivés comportant un motif de type 2-aminobenzothiazinone. B. Schéma de synthèse du composé **5** à partir des composés disponibles commercialement : l'acide 2-mercaptobenzoïque (**6**) et de la cyanamide (**7**).

La 2-amino-4*H*-benzo[*e*][1,3]thiazin-4-one (**5**) a été obtenue après 48 heures au reflux du méthanol, avec un rendement de 73% (Schéma 4.B). Une première mise au point des conditions réactionnelles pour la réaction de substitution nucléophile aromatique a été réalisée avec le 2-bromopyridin-3-ol en proportions stœchiométriques dans chacun des cas (Figure 34). Ce substrat a été choisi pour la présence du groupement hydroxyle en *ortho* de l'amine, retrouvé sur l'antagoniste SB225002 (cf. paragraphe 3.1.3 Figure 30).

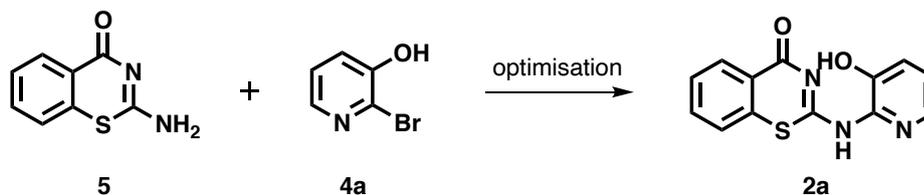
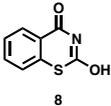


Figure 34 : Schéma de synthèse du composé **2a** provenant d'une substitution nucléophile du composé **5** obtenu précédemment sur le 2-bromopyridin-3-ol (**4a**).

Plusieurs essais en milieu acide (acide trifluoroacétique (TFA) ou acide chlorhydrique (HCl) concentré) ainsi qu'un couplage de Buchwald-Hartwig, ont été réalisés en parallèle. De simple observation par chromatographie sur couche mince (CCM) ont permis d'analyser rapidement les différents tests qui ne nous ont pas permis d'obtenir le composé désiré. Les résultats sont reportés dans le tableau 3 (entrées 1 à 4).

Tableau 3 : Présentation des résultats obtenu pour la réaction de substitution nucléophile entre le composé **5** et le 2-bromopyridin-3-ol (**4a**). Ces résultats proviennent d'observations par CCM et d'analyses LC-MS.

Entrée #	5 [éq]	4a [éq]	Solvant	Catalyseur ^a	Temps (h)	Temp. °C	Conversion	Observations
1	1	1	DMF	TFA (1eq → 10eq)	72	50 → 120	Aucune	Dégradation
2	1	1	DMF	HCl (1eq → 10eq)	48	80 → 120	Aucune	Dégradation
3	1	1	HCl (12M)	-	16	100	Totale	
4	1	1	Dioxane	[Pd] Pd ₂ dba ₃ * (5%)+ XantPhos (10%)	48	110	Aucune	-

^a dba = Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0); XantPhos = 4,5-Bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène.

Aucunes des conditions envisagées ci-dessus (Tableau 3 ; entrées 1 à 4) n'a permis l'obtention du produit désiré. D'après les observations faites, il se pourrait que le précurseur 2-amino-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (**5**) s'hydrolyse lors d'un chauffage prolongé (16 heures) en milieu acide à des températures élevées (> 100°C). Des résultats similaires ont été décrits par Shestakov *et al.* avec la 1-(4-oxo-4H-benzo[e][1,3]thiazin-2-yl)guanidine, où le guanidinium formé était éliminé suite à l'attaque nucléophile de l'eau provoquant la formation du produit d'hydrolyse suivant **8** (Schéma 5).¹³⁰

Mécanisme

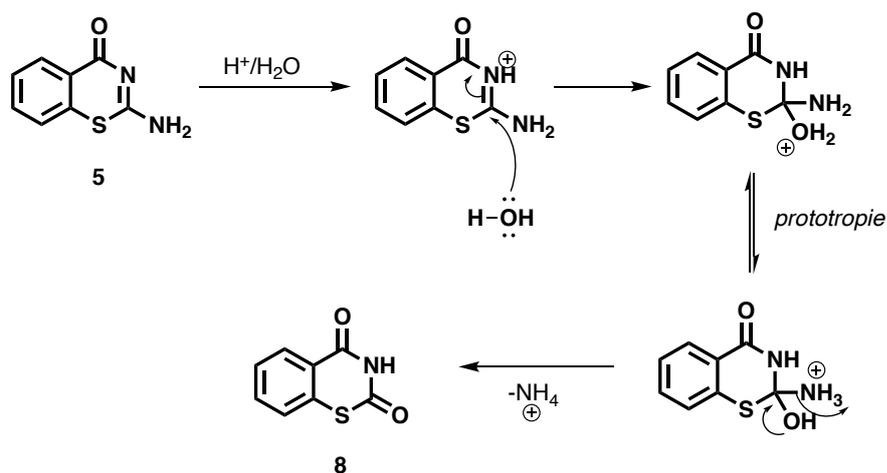


Schéma 5 : Proposition du mécanisme de formation du produit secondaire (8) issu de l'hydrolyse de la 2-amino-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (5). Le doublet de l'imine endocyclique n'est pas délocalisable, rendant cette amine plus basique que l'amine primaire.

A la suite de ces observations, nous avons décidé d'inverser dans notre schéma de synthèse les caractères électrophile et nucléophile des réactifs utilisés, tout en conservant un accès rapide en 2 étapes pour la préparation des 2-aminobenzothiazinones désirées (Schéma 6).

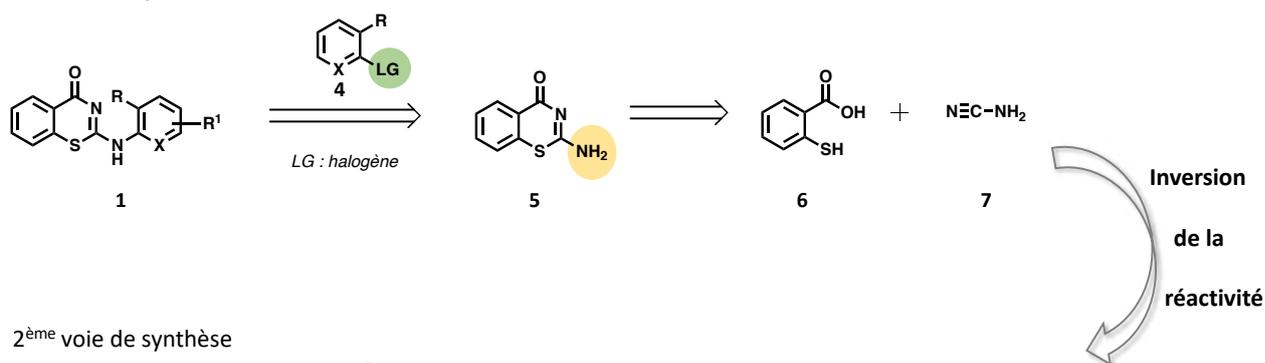
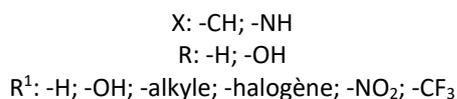
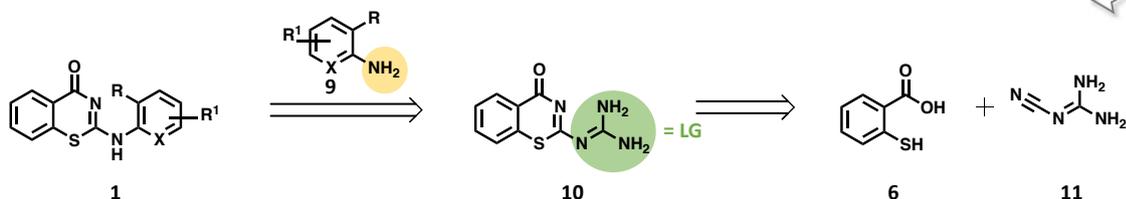
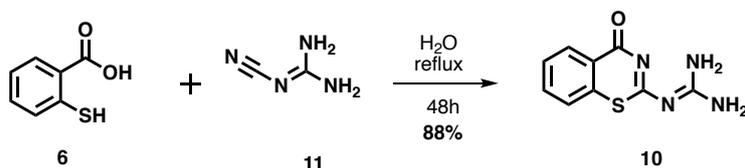
1^{ère} voie de synthèse2^{ème} voie de synthèse

Schéma 6 : Rétrosynthèse du composé 1 montrant l'inversion des espèces nucléophiles et électrophiles.

Dans la première stratégie de synthèse le doublet non-liant de l'amine primaire du composé **5**, peut se délocaliser sur la benzothiazinone, diminuant nettement son caractère nucléophile (Schéma 6). De plus, une base est nécessaire pour neutraliser l'halogène libéré lors de la réaction de S_NA_r, ce qui est en contradiction avec les résultats publiés par Shestakov qui a décrit que l'utilisation de conditions alcalines avec les dérivés benzothiazinones provoquent l'ouverture de l'hétérocycle.¹³⁰ Dans la deuxième stratégie proposée, l'amine primaire du composé **5** est remplacée par un groupement partant (LG) : la guanidine, qui permet d'éviter l'utilisation d'une base. D'autres raisons telles que : i) l'utilisation de solvant moins nocif (eau au reflux contre benzène au reflux pour la voie C), ii) la synthèse d'un précurseur commun à l'échelle du gramme, iii) une diversification plus aisée lors de l'étape d'addition-élimination grâce aux diverses amines disponibles (primaires, secondaires, arylamines, aminophénol, ...), nous ont incités à suivre cette stratégie.¹³⁰

4.2.2 Synthèse du précurseur pour la préparation des familles A et B: 1-(4-oxo-4H-benzo[e][1,3]thiazin-2-yl)guanidine

La première étape de synthèse a été reproduite suivant les conditions décrites par Shestakov *et al.*¹³⁰ et la 1-(4-oxo-4H-benzo[e][1,3]thiazin-2-yl)guanidine (**10**) a été obtenue avec un rendement de 88% (contre 67% décrit) après 48 heures au reflux de l'eau *via* une réaction de condensation entre l'acide 2-mercaptobenzoïque (**6**) et la cyanoguanidine (**11**) (Schéma 7).



Mécanisme

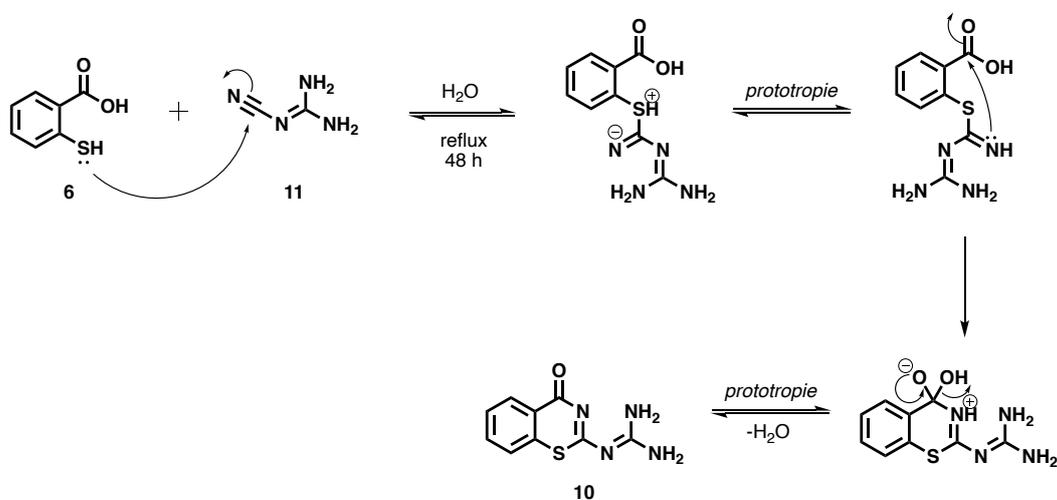


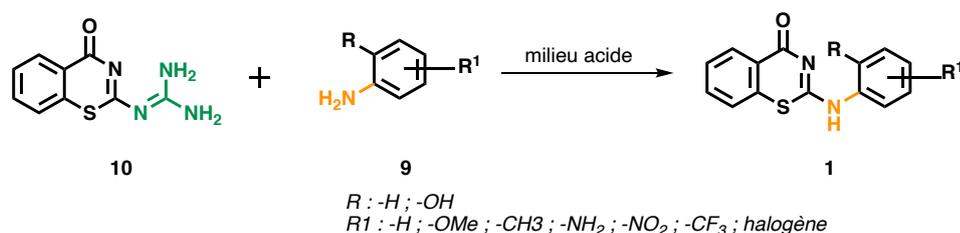
Schéma 7 : Réaction de condensation entre les composés **6** et **11** pour former le précurseur **10**. Mécanisme réactionnel proposé.

A la suite, une réaction d'addition-élimination de type 1-4 en milieu acide sur la 1-(4-oxo-4H-benzo[e][1,3]thiazin-2-yl)guanidine (**10**) en présence de diverses arylamines (**9**) permettra d'obtenir les dérivés 2-aminobenzothiazinones souhaités.

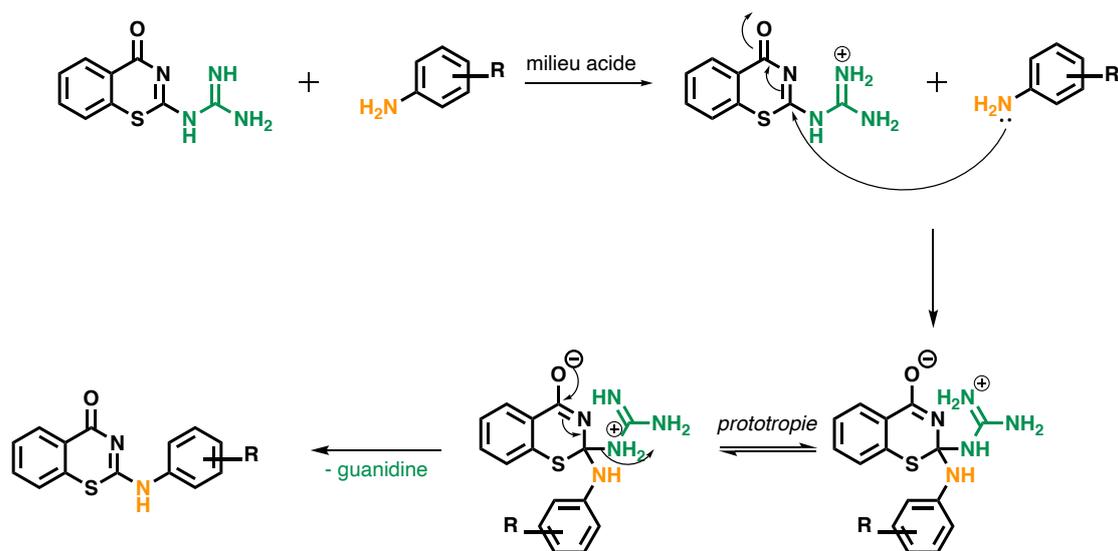
4.2.3 Synthèse des molécules de la famille A

4.2.3.1 Optimisations réactionnelles pour la préparation de la 2-((2-hydroxyphenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one.

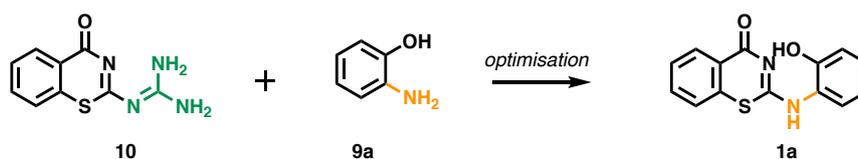
Les substrats de type aniline et aminophénol ont été sélectionnés pour la préparation des composés de la famille A. D'après les observations reportées par Shestakov *et al.* la protonation du motif guanidine en milieu acide (guanidinium) permet de faciliter l'attaque d'un nucléophile.^{130,142} Ainsi dans ces conditions, la protonation du motif guanidine va favoriser l'addition nucléophile de type 1,4 des arylamines (anilines ou aminophénol) et permettre l'élimination du guanidinium, devenu un bon groupement partant (Schéma 8).



Mécanisme

Schéma 8 : Réaction d'addition-élimination entre le précurseur **10** et les arylamines **9**.

Cependant pour cette étape d'addition-élimination, nous proposons de remplacer les conditions drastiques (acide chlorhydrique à 150°C) décrites par Shestakov *et al.*¹³⁰ Une mise au point des conditions réactionnelles a tout d'abord été nécessaire afin de trouver les conditions optimales pour la préparation de dérivés de la famille A. Le 2-aminophénol (**9a**) a été sélectionné comme composé initial pour les différents essais. La réaction entre le composé **10** et l'aminophénol (**9a**) a tout d'abord été réalisée en présence d'un équivalent d'acide chlorhydrique (HCl), dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF) qui permet de conserver la température élevée de la réaction (bp = 153°C). Cependant après 2 jours d'agitation à 80°C du DMF en présence d'un équivalent d'acide chlorhydrique, aucune conversion n'a été observée. Ces conditions ne permettant pas d'obtenir le produit **1a** désiré, une étude méthodologique pour l'optimisation de la réaction entre l'aminophénol (**9a**) et le dérivé guanidylé (**10**), a été amorcée. La nature du solvant, de l'acide utilisé, ainsi que le temps et la température ont été étudiés. La comparaison des différentes conditions par CCM, nous a permis d'analyser rapidement les nombreux tests réalisés et d'identifier les conditions optimales pour l'obtention de la molécule désirée : la 2-((2-hydroxyphenyl)amino-4*H*-benzo[*e*][1,3]thiazin-4-one (**1a**). Les résultats de ces essais sont répertoriés dans le tableau suivant (Tableau 3).

Tableau 4 : Les différentes optimisations de synthèse pour l'obtention du composé **1a**.

Entrée #	10 (éq.)	9a (éq.)	Acide (éq.)	Solvant (mL)	Temps	Temp.(°C)*	Méthode de chauffage	Observations**
1	1	1	H ₂ SO ₄ (1)	Dioxane	4h	t.a → 50	Thermique	Aucune conversion
2	1	1	H ₂ SO ₄ (1)	THF	6h	t.a → 50	Thermique	Aucune conversion
3	1	1	TFA (1)	THF	4h	t.a → 50	Thermique	Aucune conversion
4	1	1	-	AcOH	4h	t.a → 50	Thermique	Aucune conversion
5	1	1	-	AcOH	2h	80	Thermique	Conversion incomplète en produit 1a (6,3%)
6	1	1.2/4 /10	-	AcOH	2h	100	Thermique	Traces du produit désiré 1a et produits secondaires. (15%)
7	1	1	-	AcOH	15 min	80	Micro-onde	Aucune conversion
8	1	1	-	AcOH	15 min	100	Micro-onde	Conversion incomplète en 1a (37%)
9	1	1	-	AcOH	15 min	110	Micro-onde	Conversion incomplète en 1a (68%)
10	1	1	-	AcOH	15 min	120	Micro-onde	Conversion totale en 1a .
11	1	1	-	AcOH	15 min	130	Micro-onde	Produit secondaire

* t.a = température ambiante / ** Observations réalisées par CCM et LCMS. Taux de conversion du produit **1a** (en %) évalué en LCMS.

En présence d'un acide fort (1 équivalent), tel que l'acide sulfurique (H₂SO₄) ou l'acide trifluoroacétique (TFA) (Tableau 3 : entrées 1-3) aucune conversion n'a été observée. Nous avons supposé que l'utilisation d'un seul équivalent d'acide fort suffisait pour provoquer, en plus de la protonation du composé **10**, celle de l'aminophenol (**9a**) lui faisant perdre son caractère nucléophile. Ainsi, l'acide acétique a été utilisé pour la suite des optimisations de cette réaction d'addition-élimination (Tableau 3 : entrées 4-11).

Les résultats des entrées 1 à 6 démontrent que le nombre d'équivalent n'influe pas sur l'avancement de la réaction, contrairement à la température qui semble être un paramètre déterminant pour obtenir une conversion en produit **1a** (Tableau 3 : entrées 1-6). En effet, une légère conversion de 15% en produit **1a** est observée pour une température de 100°C (quel que soit le nombre d'équivalent utilisé) contre 6,3% de conversion pour une température de 80°C et aucune conversion à 50°C (Tableau 3 : entrées 4-6). Néanmoins, l'augmentation de la température (100°C) a provoqué la formation de produits secondaires correspondant à l'acétylation de l'amine de l'aminophénol (Tableau 3 : entrée 6).

Ainsi, après avoir réalisé tous ces essais par chauffage thermique nous avons envisagé de reproduire certaines conditions, *i.e* AcOH en utilisant le chauffage par micro-onde en faisant varier seulement la température (entre 80 et 130°C) pour espérer aboutir à une conversion totale en produit désiré (Tableau 3 : entrées 7 à 11). Une conversion totale en produit souhaité, a été observée à 120°C et nous a permis d'isoler le produit **1a** avec un rendement de 25% (Tableau 3 : entrée 10). Cependant, de trop hautes températures (130°C) entraînent à nouveau la formation de produits secondaires.

Tous ces résultats (Tableau 3 : entrées 1 à 11) nous ont permis de mettre en évidence, qu'un temps de réaction court, à des températures élevées (>100°C) semble indispensable pour former le produit **1a** souhaité. Ainsi, nous avons optimisé la stratégie de synthèse développée par Shestakov *et al.* en proposant l'utilisation du chauffage par microonde dans la préparation des dérivés 2-amino-1,3-benzothiazine-4-ones.

Pour la suite des synthèses, les conditions réactionnelles suivantes ont été sélectionnées : 1 équivalent du composé **10**, 1.2 équivalents des réactifs **9**, dans l'acide acétique pendant 15 min à 120°C au chauffage micro-onde.

4.2.3.2 Synthèse des dérivés de la famille A à partir d'anilines ou d'aminophénols.

Les conditions de réaction sélectionnées précédemment, ont été reproduites avec différents nucléophiles de type aniline ou aminophénol. Ainsi 19 molécules (**1a-s**) incluant des groupements alkyle, hydroxyle, halogéné, amino, nitro ont été obtenues par filtration suivie de

plusieurs lavages au méthanol et à l'éther di-éthylique, avec des rendements variables (2-59%) (Figure 35).

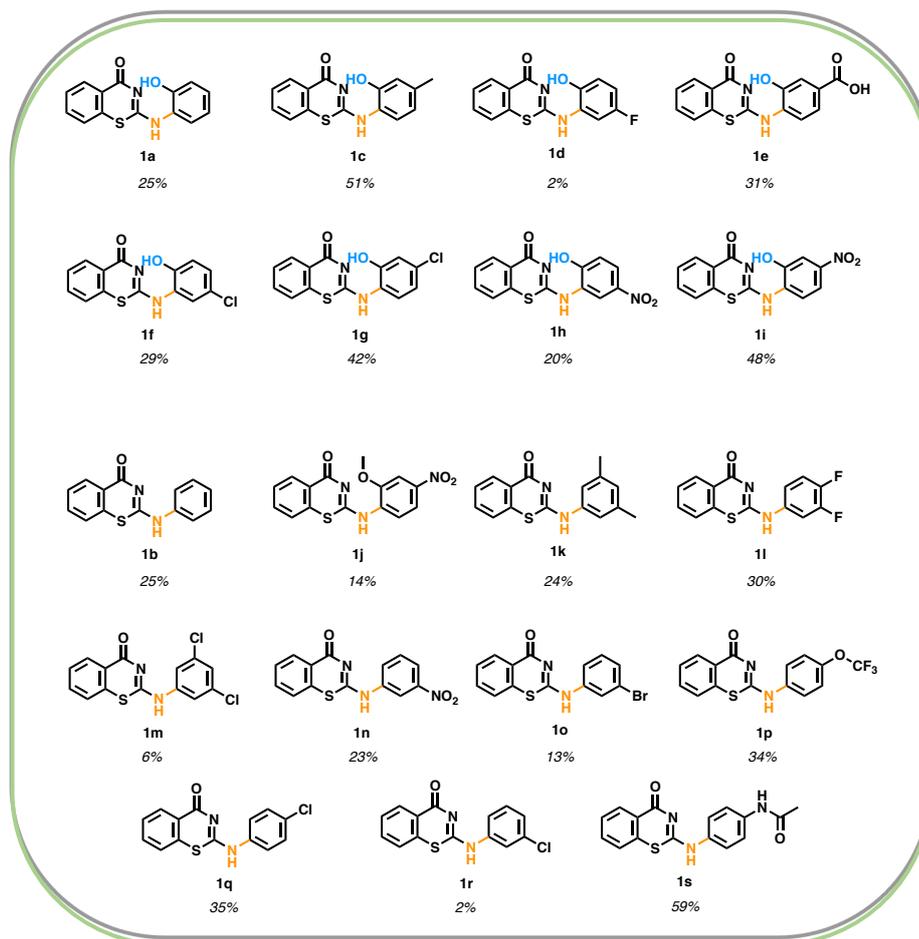
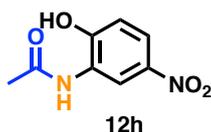


Figure 35 : Structures chimiques et rendement des composés **2(a-s)** obtenus pour la famille A, avec deux séries distinctes : la série des aminophénols et la série des anilines.

Les variations des rendements peuvent s'expliquer par la différence de réactivité des réactifs (**9a-s**) utilisés. En effet, dans le cas des nucléophiles désactivés par le groupement nitro (**1h**, **1i**, **1j** et **1n**), la température ainsi que le temps de réaction ont dû être augmentés (entre 10-20°C de plus, et de 15 min à 30 min). De façon surprenante, concernant les analogues **1h** et **1i**, le nitro en *meta* semble avoir un rôle plus marqué que le nitro en *para*, bien qu'électroniquement l'inverse soit attendu (Figure 35 : composés **1h** et **1i**). En effet, le composé **1h** (nitro en *-meta*) a été obtenu avec un faible rendement de 20% contre 48% pour l'analogue **1i** (nitro en *-para*). Cette observation peut s'expliquer par une réactivité plus importante du 2-amino-4-nitrophénol

(**9h** ; nitro en *-meta*) qui a conduit à la formation d'un produit secondaire. Comme énoncé précédemment, pour faciliter la réaction entre le composé **10** et les anilines désactivées, la température a été augmentée, ce qui induit l'apparition de produit secondaire avec les anilines les moins désactivées ($R^1 = \text{NO}_2$ en position *-meta*). Le produit secondaire observé dans le cas de la synthèse du composé **1h**, a été identifié grâce aux analyses LC-MS et correspond au composé **12h**. Il provient de l'acétylation du réactif **9h** de départ. Ce type de réaction d'acétylation d'une aniline à chaud, dans l'anhydride acétique pendant un temps relativement court (environ 15 min) a déjà été reportée dans la littérature.^{143,144}



La formation des produits d'acétylation a été observée pour les anilines **9b**, **9d**, **9h**, **9i**, **9m**, **9n**, **9r** et **9s**. A ce stade, il n'a pas été envisagé d'optimiser les conditions réactionnelles précédemment utilisées, puisque les produits secondaires **12** correspondants étaient minoritaires et que nous obtenions les produits finaux désirés avec des rendements corrects pour les isoler en quantité suffisante, sauf dans les cas des anilines **9d**, **9m** et **9r** expliquant les très faibles rendements (2%, 6% et 2% respectivement). La trop faible quantité de produit obtenue pour ces composés (**1d**, **1m** et **1r**), n'a pas permis de les caractériser complètement.

Lors de la réaction avec la *p*-phénylènediamine nous n'avons malheureusement pas obtenu la 2-((4-aminophenyl)amino)-4*H*-benzo[*e*][1,3]thiazin-4-one souhaitée, mais seulement la formation du composé **1s** provenant de l'acétylation de la *p*-phénylènediamine. La réaction a été reproduite à une température moindre (120°C au lieu de 140°C) mais la même observation a été faite : seule la formation du produit secondaire **1s** a été notifiée.

Ces résultats ont permis de mettre en lumière la difficulté à obtenir des conditions réactionnelles reproductibles. Cette stratégie est relativement efficace pour obtenir rapidement divers composés, mais nécessite l'adaptation des conditions réactionnelles (variation du temps et de la température), pour pallier les problèmes de réactivité rencontrés. Le spectre d'application de cette méthode de synthèse est limité à la fois par la présence de groupements

désactivants (exemple : nitro) mais aussi par l'encombrement stérique. En effet, quelles que soient les conditions de synthèse utilisées, les substrats di-substitués en *ortho* de l'amine n'ont absolument pas réagi, même à des températures très élevées (150°C). Cependant, dans la majorité des cas : pour les réactifs substitués par des groupements activants (A) sur les positions *ortho* et *para*, les conditions « classiques » (120°C pendant 15 min) suffisaient. En revanche, pour les groupements désactivants (D) une température plus élevée (130-150°C), et parfois un temps plus long (30 min) sont nécessaires (Figure 36). De plus, pour la plupart des réactifs porteurs de substituants désactivants, la conversion observée est généralement incomplète (même à une température maximale de 150°C), mais elle permet d'obtenir les composés souhaités en quantité suffisante pour les tests biologiques.

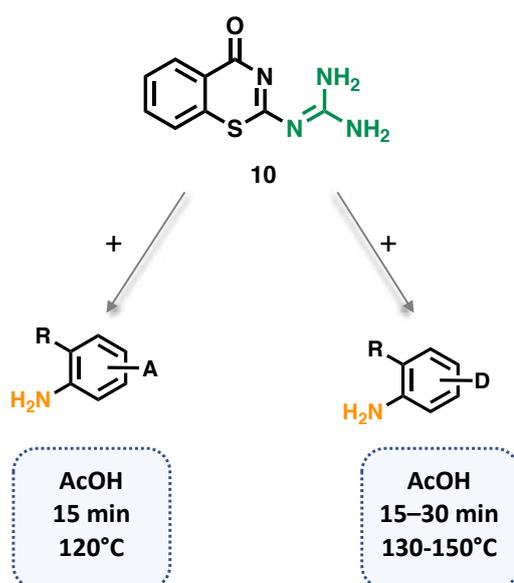


Figure 36 : Conditions réactionnelles générales, proposées en fonction du substrat.

Si une synthèse à grande échelle est envisagée, les conditions réactionnelles et de traitement seront à améliorer pour éviter la formation des produits secondaires issus de l'acétylation des anilines afin d'augmenter les rendements.

4.2.4 Synthèse de la famille B.

Les dérivés de la famille B ont été préparés selon la procédure de synthèse établie pour la préparation des composés de la famille A (AcOH, 120°C, 15 min au micro-onde). Ainsi, les différents composés **2**, ont été obtenus suite à une réaction d'addition-élimination entre la 1-(4-oxo-4H-benzo[e][1,3]thiazin-2-yl)guanidine (**10**) et les différentes benzylamines **13** (Schéma 9).

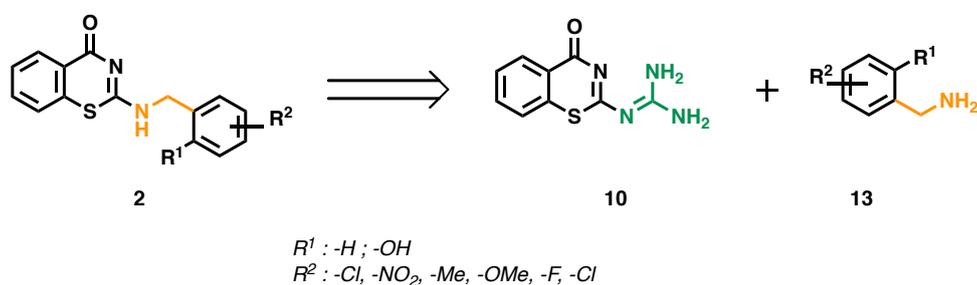


Schéma 9 : Rétrosynthèse proposée pour la préparation des composés **2**.

Des benzylamines diversement substituées (alkyle, hydroxyle, halogéné, nitro, pyridine), ont été utilisées. La température a été augmentée (de 120 à 140°C) pour les benzylamines substituées par un groupement électroattracteur ($R = CF_3 ; NO_2$). Ainsi, 8 nouveaux composés pour la famille B, ont été obtenus avec des rendements compris entre 9% et 45% (Figure 37 : **2a-h**). La nucléophilie accrue des benzylamines par rapport à celle des anilines ou aminophénol, permet d'expliquer l'obtention de meilleurs rendements.

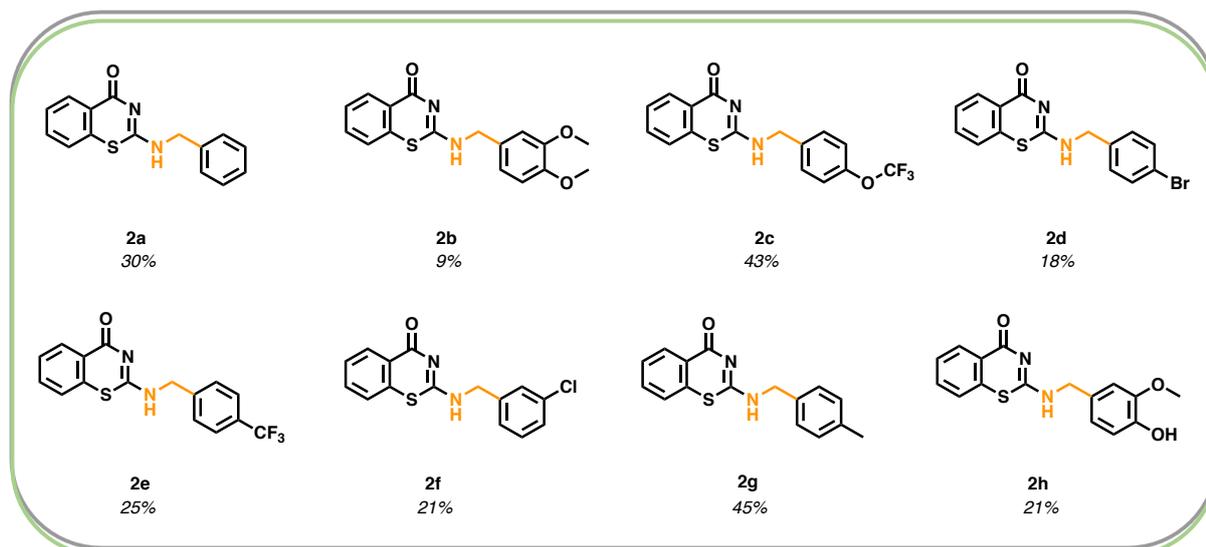
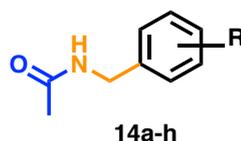


Figure 37 : Structures chimiques des dérivés **2a-h** obtenus suivant les conditions réactionnelles initiales.

Pendant, comme dans le cas des anilines pour la famille A, l'acétylation de l'amine causée par le solvant (AcOH) a aussi été constatée.



Cette fois-ci, la formation de ce produit secondaire (**14**) a été observée avec toutes les différentes benzylamines utilisées (**13a-h**). Nous avons alors décidé de modifier les conditions réactionnelles. Une nouvelle mise au point a été réalisée avec la (2-methoxyphenyl)methanamine (**13i**), pour remplacer l'acide acétique responsable de la formation du produit d'acétylation des benzylamines (et anilines). Nous avons choisi l'acide *paratoluènesulfonique* (APTS) en remplacement de l'AcOH car cet acide a été utilisé en quantité catalytique par Wolf *et al.* pour la préparation des 2-aminobenzothiazinones.¹³⁵

Ainsi, l'utilisation d'1 équivalent d'APTS dans le 1,4-dioxane à 130°C pendant 15 min au chauffage micro-onde, nous a permis d'obtenir le produit désiré **2i** avec un rendement de 52%, sans observer la formation du produit d'acétylation. Par ce nouveau protocole, 9 nouveaux dérivés de la famille B ont ainsi été préparés et obtenus après une filtration suivie de plusieurs

lavages à l'éthanol (Figure 38). Dans la majorité des cas, l'utilisation de l'APTS dans le 1,4-dioxane a permis une augmentation significative (78% contre 45% précédemment) des rendements obtenus.

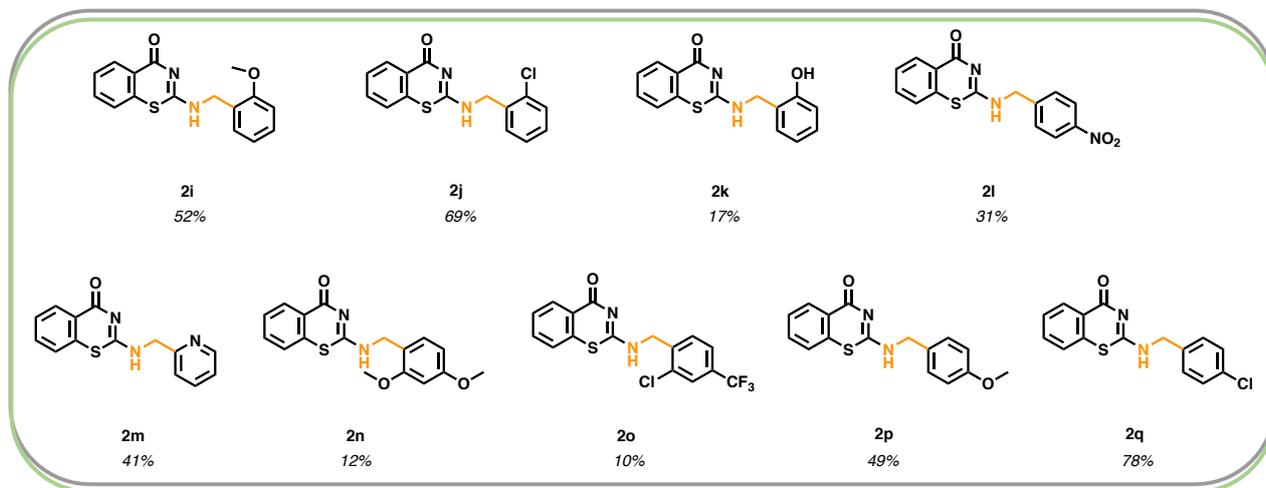


Figure 38 : Structures chimiques des composés **2i-q** obtenus selon la procédure utilisant l'APTS en remplacement de l'AcOH.

Au total 17 composés (**2a-q**) comportant un espaceur de type méthylène ont été obtenus pour la famille B. De plus, le problème récurrent de l'acétylation de la benzylamine causée par le solvant (AcOH) nous a permis de révéler une deuxième voie de synthèse efficace pour la préparation des dérivés 2-amino-benzothiazinones évitant la formation des produits secondaires d'acétylation (Figure 39). Cependant, la réaction étant dépendante du substrat, il est nécessaire dans chacune des stratégies de synthèse (1 ou 2) d'adapter la température (120-150°C) ainsi que le temps de réaction (15 ou 30 min) (Figure 39).

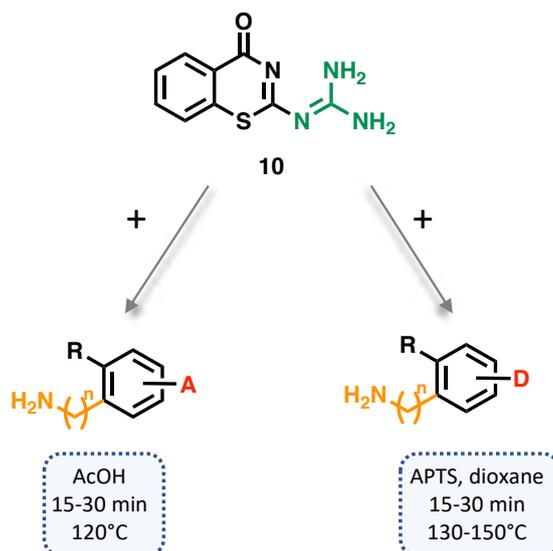


Figure 39 : Les deux voies de synthèse sélectionnées pour l'obtention des molécules. Pour les substituants activants (méthyle, halogène) : acide acétique, 15-30 min, 120°C est privilégiée. Pour les substituants désactivants (nitro, trifluoro) : APTS, dioxane, 15-30 min, 130-150°C.

Par ailleurs, en vue d'améliorer certains rendements des dérivés de la famille A, la voie 2 de synthèse a été envisagée. L'utilisation de l'APTS dans le dioxane nous a permis d'obtenir les dérivés **1t** et **1u**, qui n'avaient pas pu être obtenus dans les conditions initiales (AcOH), avec des rendements respectifs de 36% et 33% (Figure 40). Dans le cas particulier du composé **1t**, ces conditions ont permis d'éviter la formation du produit acétylé **1s**.

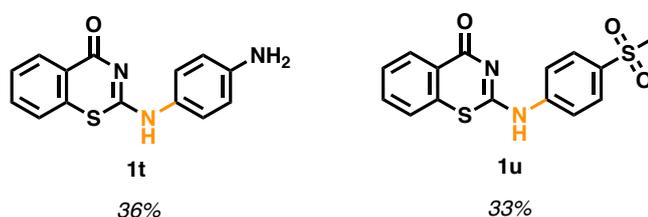


Figure 40 : Structure et rendements des composés **1t** et **1u** obtenus selon la voie 2 de synthèse (APTS).

Cependant, ces nouvelles conditions opératoires ne nous ont toujours pas permis d'obtenir les anilines di-substituées en *-ortho* par des halogènes, confirmant que l'encombrement stérique est une limite non négligeable dans la préparation des dérivés 2-aminobenzothiazinones.

4.2.5 Vers la synthèse de la famille C

Pour cette nouvelle famille d'analogues (**3**) nous proposons la variation du groupement R ($-CF_3$ ou $-NO_2$) ainsi que sa position (6 ou 7 sur le cycle benzothiazinone) ou l'incorporation d'une pyridine sur la partie Ouest des molécules (Figure 41).

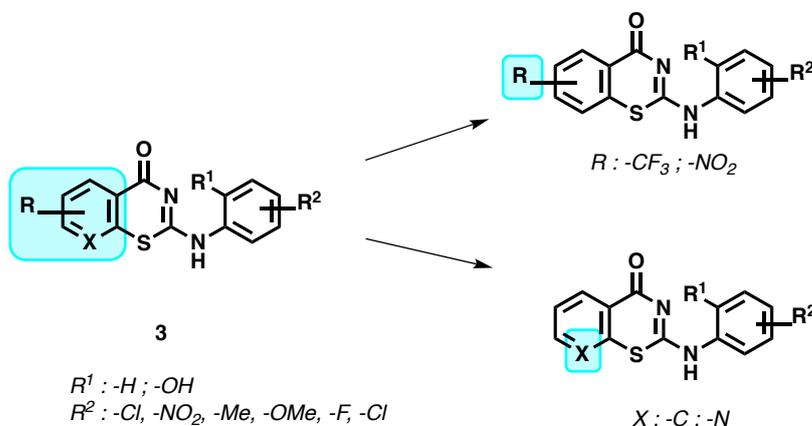


Figure 41 : Représentation des deux modifications principales pour la famille C.

4.3.3.1 Variations du groupement R.

Le chemin synthétique précédent faisant intervenir l'addition-élimination d'un nucléophile sur la 1-(4-oxo-4H-benzo[e][1,3]thiazin-2-yl)guanidine (**10**), n'est pas adapté pour obtenir les dérivés de la famille C avec la variation du substituant R. En effet, il est impossible d'introduire un substituant (aux positions 5-8) sur un motif 2-aminobenzothiazinone déjà construit. Ainsi, pour cette nouvelle famille de composés, nous avons privilégié une stratégie de synthèse linéaire, permettant d'introduire la variation du groupement R en position 6 ou 7 des 2-aminobenzothiazinones, dès la première étape de synthèse. Cette stratégie permet de préparer des dérivés 2-aminobenzothiazinones et 2-aminopyridothiazinones, substitués sur la partie Ouest des motifs, *via* des intermédiaires de type thiourées capables de cycliser lors de la dernière étape de synthèse. Nous avons choisi de reproduire la méthode usuelle décrite et largement utilisée par KOŠČIK *et al.* (1992), Inami *et al.* (2015), et Kazmi *et al.* (2017), pour la préparation des intermédiaires thiourées.^{139,140,145} Pour l'étape de cyclisation, nous réaliserons

plusieurs essais inspirés des stratégies de KOŠČÍK *et al.* et Inami *et al.*.^{139,141} La rétrosynthèse envisagée pour la préparation des dérivés de la famille C est présentée ci-dessous (Schéma 10).

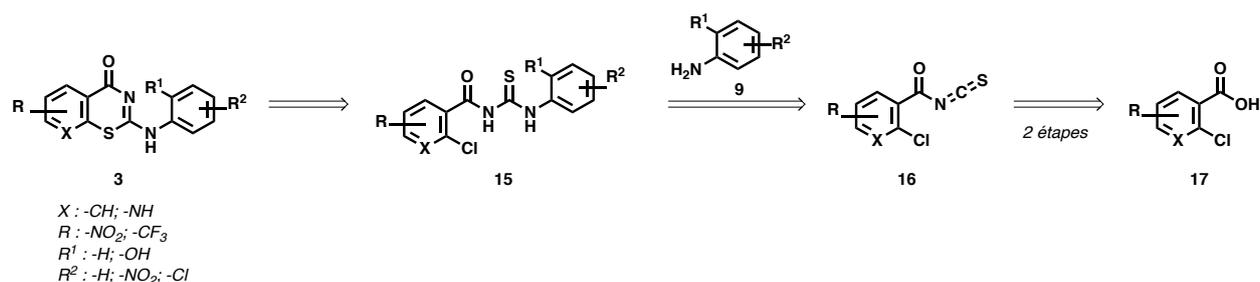


Schéma 10 : Rétrosynthèse proposée pour l'obtention des dérivés de la famille C quel que soit la variation envisagée.

Les différents composés **3** sont obtenus après la cyclisation du composé **15** médiée par une attaque nucléophile de l'atome de soufre sur le groupement chloro (en position *ortho* du carbonyle). Le composé **15** a été synthétisé *via* une réaction de condensation de l'aniline **9** sur l'isothiocyanate **16**. Une réaction d'addition-élimination par le thiocyanate de potassium (KSCN) sur le chlorure de benzoyle permet d'obtenir ce composé **16**. Le chlorure de benzoyle provient quant à lui de l'acide carboxylique correspondant (**17**) après une étape de chloration réalisée au reflux du chlorure de thionyle (SOCl₂).

Nous avons sélectionné les acides 2-chloro-4-nitrobenzoïque et 2-chloro-5-nitrobenzoïque comme précurseurs pour la préparation des nouveaux analogues (Schéma 11).

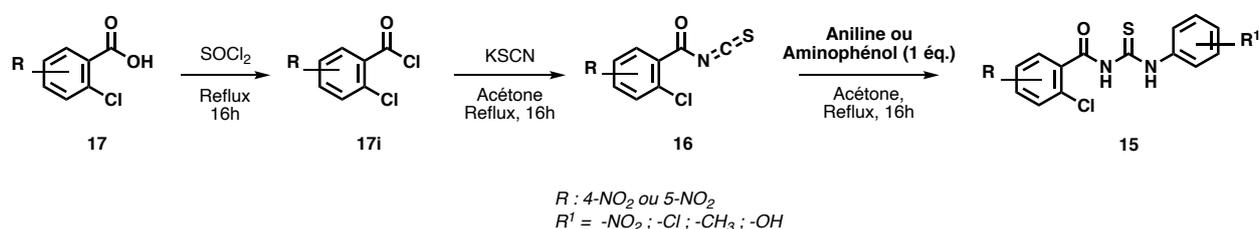


Schéma 11 : Synthèse des intermédiaires thiourées (**15**) à partir des précurseurs 2-chloro-4-nitrobenzoïque, 2-chloro-5-nitrobenzoïque.

Le chlorure de benzoyle est obtenu par traitement de l'acide carboxylique correspondant au reflux du SOCl₂ pendant 16 heures, puis est engagé dans la seconde étape de synthèse. La réaction entre l'isothiocyanate de potassium et le chlorure de benzoyle, a permis d'obtenir le 2-

chlorobenzoyl isothiocyanate correspondant (**16**). Cet intermédiaire a ensuite été engagé dans l'étape d'addition-élimination en présence des substrats **9** (anilines ou aminophénol), pour conduire à la formation des différentes thiourées (**15a-f**) avec des rendements acceptables (45-60%) (Figure 42).

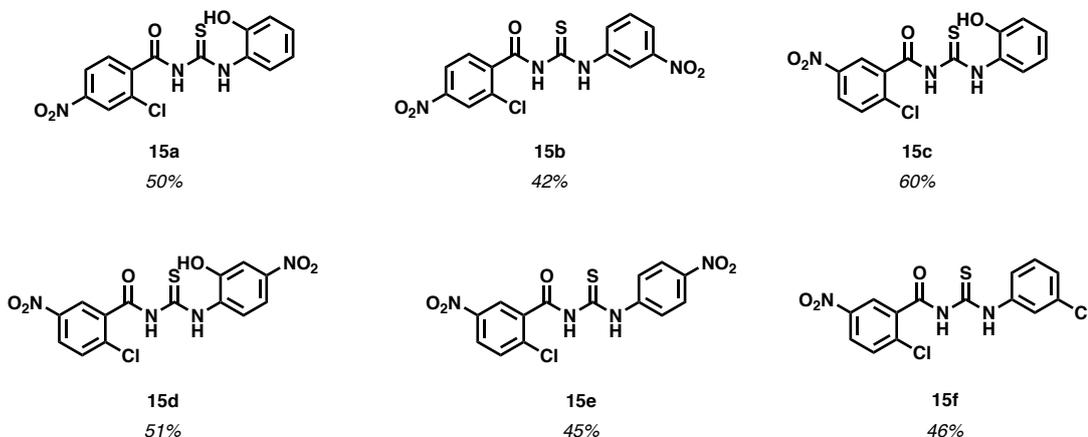


Figure 42 : Structure des différentes thiourées (**15**) intermédiaires obtenues.

Pour réaliser l'étape de cyclisation, les intermédiaires thiourées **15a-f** ont été chauffés au reflux du toluène pendant 24 heures.¹⁴¹ Malheureusement, aucune conversion en produit final correspondant n'a été observée dans ces conditions. Cette absence de réactivité peut s'expliquer d'une part par la très faible solubilité de ces thio-urées et d'autre part par la faible nucléophilie du motif thio-urée totalement conjugué. De plus, nous supposons que la présence du noyau pyridine pour les composés décrits par Inami *et al.*¹⁴¹ facilite l'attaque nucléophile du soufre grâce à l'exacerbation du caractère électrophile du carbone porteur de l'halogène.

Il a alors été décidé de reproduire les conditions de cyclisation décrites par KOŠČIK *et al.* utilisant un équivalent d'hydruure de lithium (LiH) au reflux du DMF.¹³⁹ Cette étape a donc été réalisée en parallèle avec les différentes thiourées **15a-f** (Schéma 12).

Mécanisme

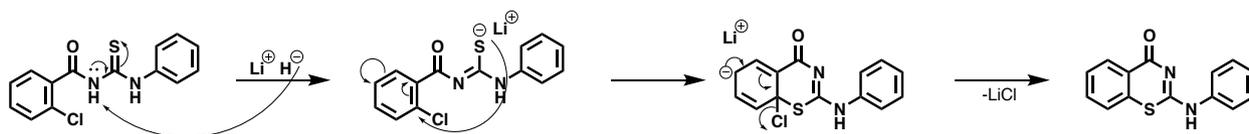
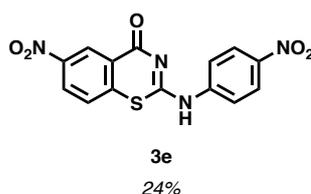


Schéma 12 : Mécanisme proposé pour l'étape de cyclisation en présence de LiH.

Seulement le produit final **3e** a été obtenu avec un rendement de 24%, selon ces conditions (Figure 43).

Figure 43 : Structures chimiques du composé **3e** obtenu.

Les produits de cyclisation avec les intermédiaires **15a** et **15b** n'ont malheureusement pas été obtenus, nous laissant supposer que les effets désactivant du nitro en *meta* du chloro sont très marqués, et qu'ils ne permettent pas de promouvoir l'attaque nucléophile du soufre. Lors de la synthèse des composés **3c**, **3d** et **3f** de la dégradation a été observée. Pour les composés **15c** et **15d** nous avons supposé que la présence du groupement hydroxyle était défavorable pour que la réaction ait lieu. En effet, l'équivalent d'hydrure de lithium peut déprotonner l'hydroxyle et non plus l'amine de la thiourée limitant l'attaque nucléophile du soufre sur le carbone porteur du chloro.

Un crible de différentes bases plus faibles, dans le DMF a donc été effectué afin d'optimiser les paramètres de cette étape de cyclisation. La mise au point de ces nouvelles conditions a été effectuée avec le composé **3c**. Pour ces différents essais, il a été utilisé des bases non nucléophiles afin d'éviter toutes réactions parasites de substitution de l'atome de chlore. En présence de triéthylamine (Et₃N) ou de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU), malgré l'augmentation de la température (t.a → 80°C) et un temps réactionnel relativement long (48

heures), aucune conversion en produit **3c** n'a été observée. Cependant, l'utilisation de carbonate de potassium (K_2CO_3) à 80°C du DMF nous a permis d'obtenir le composé **3c** avec un rendement de 12% (Figure 44).

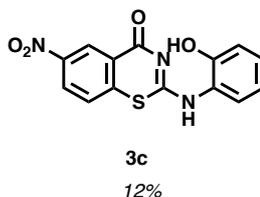


Figure 44 : Structure du composé **3c** obtenu selon les nouvelles conditions de réaction.

Nous n'avons pas poursuivi l'optimisation, afin d'augmenter le rendement du composé **3c** obtenu précédemment. Néanmoins, ces conditions pourront être essayées avec les intermédiaires **15d** et **15f**.

Afin de diversifier les dérivés de la famille C, cette voie de synthèse a été reproduite en parallèle pour la préparation des analogues avec le groupement trifluorométhyle en remplacement du nitro (en *para* du chloro) (Schéma 13). Cependant, lors de l'attaque nucléophile de l'isothiocyanate de potassium sur les chlorures de benzoyle correspondants (**19**), la formation de produits secondaires a été constatée. Nous avons donc répété cette étape de réaction à température ambiante afin de limiter leur formation, mais l'abaissement de la température n'a pas permis d'obtenir les isothiocyanates de benzoyle (**20**) souhaités.

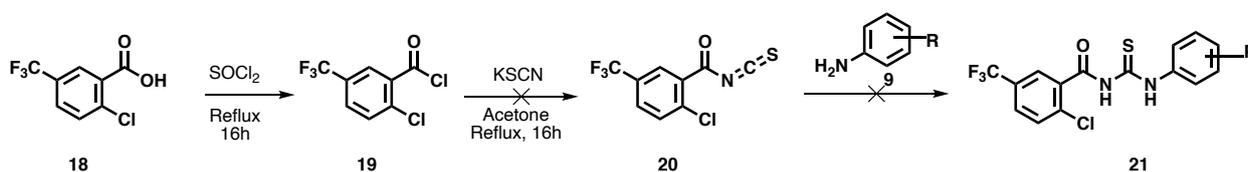


Schéma 13 : Synthèse envisagée pour l'obtention des analogues avec le précurseur 2-chloro-5-(trifluorométhyl)benzoïque.

Malgré l'obtention de certains composés (**3c-e**), les conditions de cyclisation ne sont pas reproductibles avec les différentes thiourées envisagées. Des optimisations devront être engagées pour une plus grande diversification de molécules. De plus, une réaction contrôle

pourra être envisagée avec l'acide 2-chlorobenzoïque comme précurseur, dans le but de comparer sa réactivité avec un précurseur substitué (en *meta* ou *para*) par un groupement électroattracteur (ex : nitro). Cette comparaison permettra d'appuyer si la présence du groupement NO₂ est essentielle pour favoriser l'attaque nucléophile par le soufre. Afin de proposer des analogues avec le groupement CF₃, l'acide 2-chloro-3-nitro-5- (trifluorométhyl) benzoïque pourra être suggéré comme nouveau précurseur. Il a été utilisé par Karoli *et al.*¹⁴⁶ dans une publication de 2012 qui est la seule à décrire la synthèse de dérivés benzothiazinones comportant un groupement CF₃ en position 6 et un groupement NO₂ en position 8.

4.3.3.2 Du cycle benzène vers une pyridine.

Les étapes de synthèse précédentes ont été reproduites avec l'acide 2-chloronicotinique (**22**) et l'acide 2-fluoronicotinique (**23**) afin d'insérer le motif pyridine dans nos séries de molécules. Nous avons choisi de réaliser ces synthèses en parallèle afin de comparer la réactivité entre Cl et F (Schéma 14).

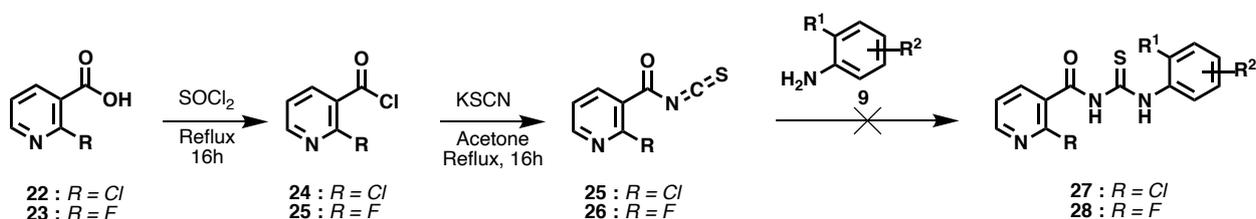


Schéma 14 : Synthèse des dérivés 2-aminopyridothiazinones à partir des précurseurs **22** et **23**.

Le remplacement du chloro par le fluoro va rendre le carbone encore plus électrophile et ainsi devrait faciliter la substitution nucléophile du soufre lors de l'étape de cyclisation. La chloration de l'acide carboxylique correspondant (**22** et **23**) au reflux de SOCl₂ a permis d'obtenir les chlorures de benzoyle correspondants (**24** et **25**). Lors de l'attaque nucléophile de l'isothiocyanate de potassium sur le chlorure de 2-fluoronicotinoyl **23**, beaucoup de dégradation a été observée. En effet, lors de la première étape de réaction, les conditions utilisées pour former le chlorure d'acyle libèrent du HCl dans le milieu réactionnel. La présence du HCl va entraîner la protonation de la pyridine et former ainsi le pyridinium. Sous la forme

pyridinium le caractère électrophile du carbone porteur de l'halogène (ici le fluor) va être accentué. Les attaques nucléophiles pourront alors se faire à la fois sur le chlorure d'acyle et sur le carbone en position *ortho* du pyridinium. Cette hypothèse a été confirmée par les analyses LC-MS réalisées dans du MeOH. En effet, la double addition du MeOH a été observée sur le chlorure de 2-fluoronicotinoyle **23**, permettant par la suite une double substitution par les anilines, empêchant toute suite de réaction possible (Schéma 15).

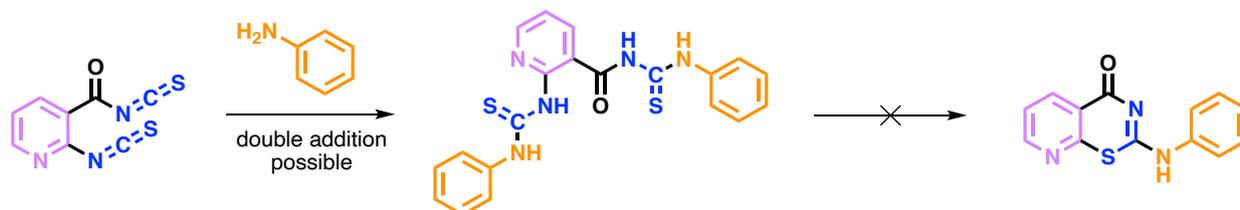


Schéma 15 : Supposition de la double addition bloquant la suite de la synthèse à savoir la réaction de cyclisation suivant une substitution aromatique intramoléculaire.

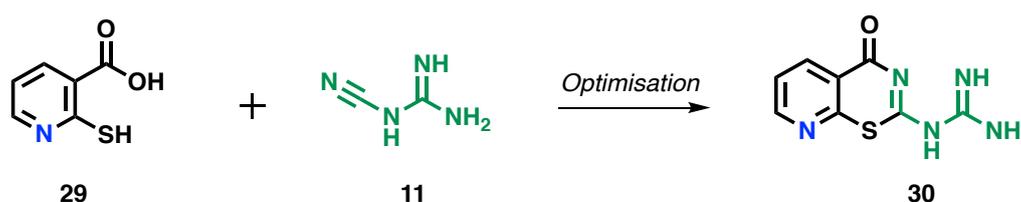
Ainsi, l'acide 2-fluoronicotinique (**23**) n'est pas un précurseur de choix pour cette synthèse. Le composé **24** a quant à lui été obtenu avec un rendement de 86% et a ensuite été engagé dans l'étape suivante sans purification. Cependant, la formation des intermédiaires **26** n'a jamais été observée, malgré un chauffage prolongé (48 h) au reflux de l'acétone. De plus, des temps réactionnels rallongés (jusqu'à 2 jours au reflux) lors de cette étape de synthèse n'ont entraîné que de la dégradation.

Quel que soit le précurseur utilisé (**22** ou **23**), cette voie de synthèse ne nous a pas permis d'aboutir à la formation des analogues **27** et **28** de type thiourées et donc aucune étape de cyclisation n'a pu être engagée pour obtenir les 2-aminopyridothiazinones désirées. S'inspirant de la voie de synthèse utilisée pour la préparation des dérivés des familles A et B, nous avons envisagé de reproduire ces conditions avec l'acide 2-mercaptonicotinique, afin de conserver le cycle pyridine sur la partie Ouest des molécules.

4.3.3.3 Nouvelles stratégies de synthèse pour développer la famille C.

La synthèse du précurseur 2-(4-oxo-4H-pyrido[3,2-e][1,3]thiazin-2-yl)guanidine (**30**), a été envisagée selon les conditions définies précédemment pour la famille A : au reflux du méthanol pendant 48h. Cependant d'importants problèmes de solubilité rencontrés avec l'acide 2-mercaptonicotinique ne nous ont pas permis d'obtenir le précurseur attendu par ce protocole. Une optimisation de synthèse a donc été effectuée, et nous avons décidé d'introduire 1 équivalent d'acide dans le milieu réactionnel afin de protonner le motif pyridine (pyridinium) pour augmenter la solubilité de l'acide 2-mercaptonicotinique. Un crible avec divers acides, a donc été réalisé (Tableau 4 : entrées 1-6).

Tableau 5 : Conditions d'optimisation pour la synthèse du précurseur **30**.



Entrée #	29 (éq.)	11 (éq.)	Solvant	Réactifs*	Temps (h)	Temp (°C)	Conversion**	Observations***
1	1	1,2	H ₂ O	APTS (1éq.)	24	reflux	Aucune	-
2	1	1,2	H ₂ O	H ₂ SO ₄ (1éq.)	24	reflux	Aucune	-
3	1	1,2	dioxane	AlCl ₃ (1,1 éq.)	6	t.a	Incomplète (36%) + Dégradation	Produit désiré majoritaire selon les analyses LC-MS
4	1	1,2	dioxane	AlCl ₃ (1,1 éq.)	16	reflux	Dégradation	-
5	1	1,2	dioxane	BF ₃ éthérate (1,1 éq.)	16	t.a	Incomplète (43%)	
6	1	1,2	dioxane	BF ₃ éthérate (1,1 éq.)	16	50	Dégradation	Trace de produit désiré

* AlCl₃ : chlorure d'aluminium / BF₃ : trifluorure de bore / ** Taux de conversion (en %) selon les analyses LC-MS /

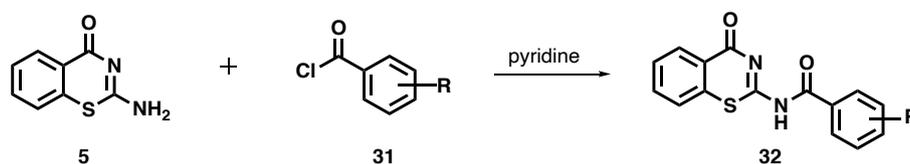
*** Observations réalisées par suivi CCM

Malgré 24 heures au reflux de l'eau en présence d'acide paratoluène sulfonique ou d'acide sulfonique, aucune conversion en produit **30** n'a été observée (Tableau 5 : entrées 1 et

2). L'utilisation d'un acide de Lewis (AlCl_3 ou BF_3 étherate) dans le 1,4-dioxane à une température élevée (50°C ou reflux) pendant un temps réactionnel relativement long (>16 heures) a entraîné de la dégradation (Tableau 5 : entrées 4 et 6). Cependant, l'utilisation d'un de ces acides (AlCl_3 ou BF_3 étherate) dans le 1,4-dioxane à température ambiante a offert une conversion incomplète en produit **30** (Tableau 5 : entrées 3 et 5). Malgré une conversion incomplète de 43%, nous avons sélectionné les conditions de l'entrée 5, pour la préparation du précurseur **30**, qui a été obtenu en faible quantité (4%, 56.6 mg) après une purification sur gel de silice.

Ces conditions devront être reproduites en augmentant le temps de réaction afin d'augmenter la conversion de la réaction pour obtenir une quantité suffisante du précurseur **30**, qui pourra ensuite être engagé dans l'étape suivante de synthèse avec les différents nucléophiles **9** de type anilines ou aminophénols. Les travaux précédents d'optimisation pour cette étape d'addition-élimination (réalisés lors de la préparation des dérivés des familles A et B), ont permis de décrire des conditions qui pourront être répétées avec ce nouveau précurseur **30** afin d'obtenir les analogues 2-aminopyridothiazinones pour la famille C.

Néanmoins, les échecs rencontrés lors des différentes synthèses présentées pour la préparation des dérivés de la famille C, nous ont amené à considérer une nouvelle famille de composés (famille D). Une nouvelle stratégie de synthèse nous a permis d'introduire un espaceur de type carbonyle pour cette nouvelle série d'analogues de type benzamide. Le composé **5** initialement synthétisé lors de la préparation de la famille A, a été mis en réaction avec divers chlorures de benzoylé (**31**) en présence de pyridine pour former les dérivés **32** correspondants (Schéma 16).^{147,148}



Mécanisme

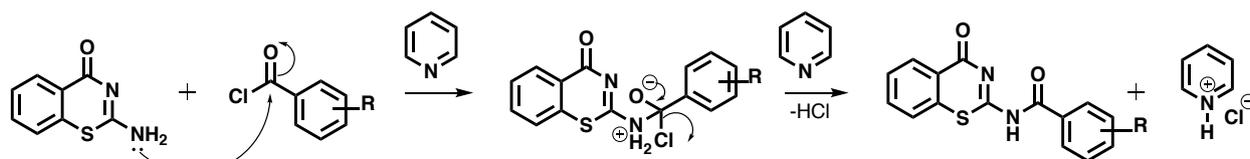


Schéma 16 : Stratégie de synthèse envisagée et mécanisme proposé pour la préparation des composés de types *N*-(4-oxo-4H-benzo[e][1,3]thiazin-2-yl)benzamide de la famille D.

Ces conditions nous ont permis d'obtenir cinq nouveaux 2-amino(benzothiazinone) benzamides (**32a-e**) avec des rendements compris entre 19% et 73%. (Figure 45).

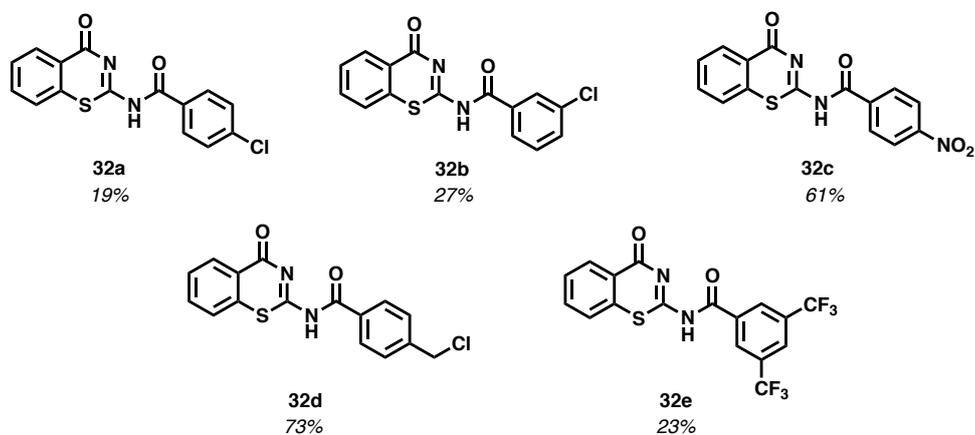


Figure 45 : Structures des composés obtenus pour la famille D.

Cette stratégie prometteuse devra être poursuivie pour un développement plus conséquent de nouvelles molécules (famille D).

4.3.4 Conclusion du chapitre 4

Dans ce chapitre, toutes les synthèses ont été présentées et ont permis de mettre en avant les nombreuses phases d'optimisation réalisées pour la préparation des composés souhaités. Ainsi 38 molécules ont été synthétisées pour les familles A et B confondues, selon une stratégie de synthèse divergente (en deux étapes).

La préparation des composés de la famille C s'est révélée délicate, en particulier lors de l'étape de cyclisation des intermédiaires thiourées. Pour cette famille, 6 intermédiaires ont été obtenus conduisant à l'obtention de seulement 2 produits finaux.

Enfin, l'obtention de 5 premiers exemples de composés benzamides avec des rendements relativement corrects (19-73%) nous permet de proposer le développement d'une nouvelle famille d'analogues.

Chapitre 5 :

Évaluations biologiques

Ces évaluations biologiques ont été effectuées en collaboration avec Dr. Maëva DUFIES de l'équipe de l'IRCAN « Angiogenèse normale et pathologique » dirigée par Gilles PAGES.

5.1. Présentation des différents tests

5.1.1 Évaluer la stabilité des composés dans des conditions définies

Plusieurs composés des familles A, B et C ont été sélectionnés afin d'évaluer leur stabilité, dans des conditions acide (pH = 1), physiologique (pH = 7.4) et basique (pH = 8.2), pendant une période déterminée. Ces tests de stabilité permettent de déceler une instabilité chimique élevée qui pourrait entraîner des données biologiques *in vitro* aberrantes suite à la formation de métabolites. Ces tests ont été réalisés selon une procédure établie et utilisée couramment au sein du laboratoire (*cf.* partie expérimentale : 3. **Biological assays**).

5.1.2 Évaluer la capacité d'inhibition de la viabilité cellulaire des composés

La capacité des dérivés des familles A et B, à inhiber la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses (cellules cancéreuses du rein : 786-O, 786-R, RCC4 et A498) a été évaluée en mesurant la viabilité des cellules cancéreuses après traitement grâce à l'utilisation d'un sel de tétrazonium, le XTT (acide 3'-[1-(phénylaminocarbonyl)-3,4-tétrazolium]-bis (4-méthoxy-6-nitro)benzène sulfonique de sodium hydraté). Ces tests de viabilité cellulaire vont donc permettre de quantifier le nombre de cellules vivantes en absence ou en présence d'un traitement (les composés des familles A et B), à différentes concentrations (de 5 M à 20 M).^{149,150}

Le principe de ce test est de déterminer la viabilité cellulaire en fonction de la capacité des enzymes mitochondriales des cellules viables à réduire le XTT incolore en un produit clivé : le formazan (produit de couleur pourpre) (Figure 46).

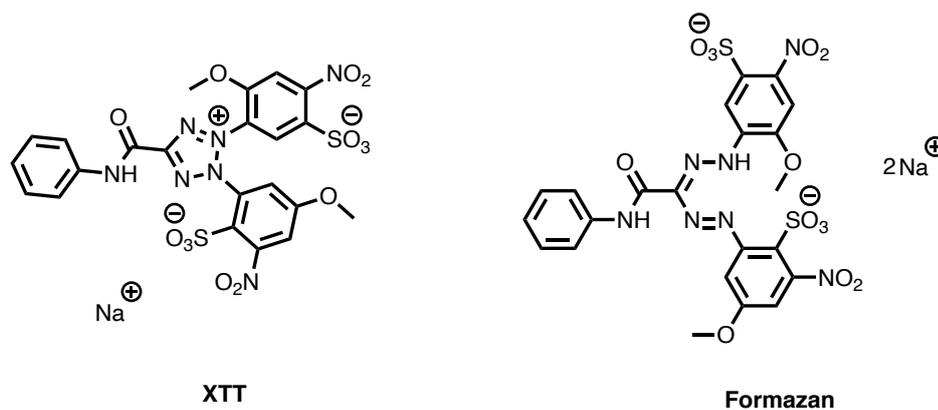


Figure 46 : Structures chimiques du sel XTT et du Formazan.

Ainsi la réduction du sel de Tétrazolium en Formazan par les cellules viables, va entraîner un changement de couleur au sein des puits (incolore à orange). Cette coloration orange est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et reflète la capacité antiproliférative de nos molécules.

5.1.3 Évaluer la capacité antagoniste des composés envers l'axe CXCL-ELR⁺/CXCR1-2

Un test basé sur la capacité chimiotactique des récepteurs CXCR vis-à-vis de leurs ligands CXCL a permis d'étudier l'inhibition de la migration des cellules exprimant les récepteurs CXCR1 et CXCR2 (les cellules cancéreuses du rein : A498), en présence ou en absence de nos composés. Si une inhibition de la migration des cellules attirées par les ligands CXCL est observée, alors l'hypothèse que les composés interagissent avec CXCR1 et CXCR2 pourra être validée.

Les ligands chimio-attractants (ici : CXCL5 et CXCL7) ont été placés au fond des puits avec du sérum (Figure 47). L'insert est ensuite introduit dans la partie supérieure du puits. Les cellules A498 traitées par les composés sont ensuiteensemencées dans l'insert. Après un temps d'incubation de 48 h, les cellules qui auront migré sur la partie inférieure de l'insert seront quantifiées par des méthodes colorimétriques (cristal violet). La comparaison du nombre de cellules qui ont migré en comparaison du contrôle (puits non traités) permettra de définir le potentiel antagoniste des différentes molécules.

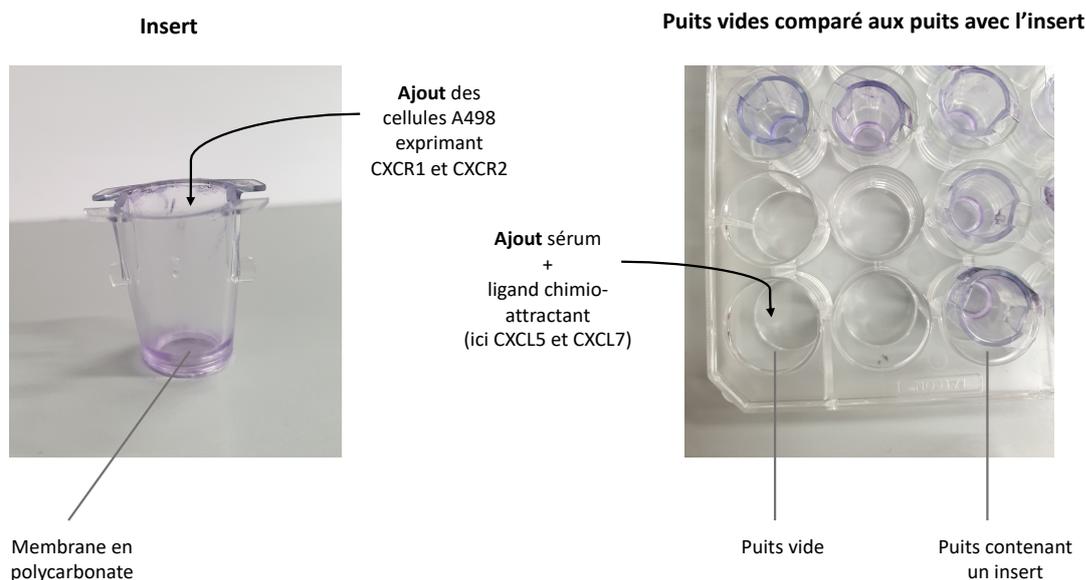


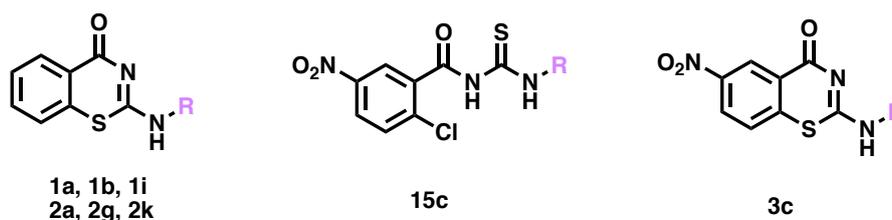
Figure 47 : Photo des inserts et des puits pour le test de la chambre de Boyden.

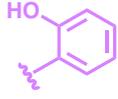
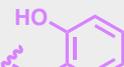
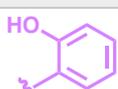
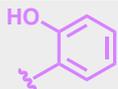
5.2 Résultats

5.2.1 Résultats des tests de stabilité

Les études de stabilité ont été réalisées avec différents dérivés de chaque famille, ayant des effets électroniques variables. La comparaison de ces résultats permettra d'observer si les effets électroniques influencent la stabilité des composés ou non. Le Tableau 5 regroupe toutes les expériences aux différents pH (1, 7.4, 8.2) comprises entre le temps initial ($t = 0$) et $t = 48$ heures, avec les composés (**1a** ; **1b** ; **1i** ; **2a** ; **2g** ; **2k** ; **15c** et **3c**).

Tableau 6: Résultats des stabilités selon les différentes conditions.



N°	R	pH 1			pH 7.4			pH 8.2		
		t = 0*	t = 24h	t = 48h	t = 0	t = 24h	t = 48h	t = 0	t = 24h	t = 48h
1a		S	D. 10%	X	S	D. 41%	X	S	D. 24%	X
1b		S	D. 48%	X	S	S	S	S	S	S
1i		S	S	D. 82%	S	S	S	S	S	S
2a		S	S	S	S	S	S	S	S	S
2g		S	D. 68%	X	S	S	S	S	S	S
2k		S	D. 76%	X	S	S	S	S	S	S
15c		S	S	S	D. 90%	D. 48%	X	S	D. 73%	X
3c		D. 89%	D. 69%	X	D. 61%	X	X	D. 44%	X	X

* S = stable / D = dégradation / X = arrête des mesures.

Au-delà de 75% de dégradation observée pour les différents composés, les analyses de stabilité n'ont pas été poursuivies. A contrario, les composés stables à 48h ont ensuite été évalués après 4 jours, 7 jours et 17 jours. Une tendance pour les familles A et B se révèle grâce au tableau ci-dessus. La majorité de ces dérivés **1b**, **1i**, **2a**, **2g** et **2k** sont stables aux pH 7.4 et 8.2 que ce soit après 4, 7 ou 17 jours. Cependant, ces composés sont sensibles en condition acide lors d'une exposition à un temps supérieur à 24 heures, en particulier les composés **1a**, **1b**, **2g**, et **2k**. Le composé **1a** se dégrade quasiment entièrement après 24 heures dans les trois conditions de pH utilisées. La présence du groupement hydroxyle en position 2, sans autres substituants contrebalançant ses effets électrodonneurs, peut être responsable de la plus grande sensibilité de ce composé.

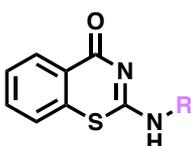
Concernant les dérivés de la famille C, même si l'intermédiaire de type thiourée est stable en condition acide, les composés **15c** et **3c** sont très sensibles. Le composé cyclisé **1c** se dégrade instantanément dans chaque condition de pH étudiée. Actuellement seulement ces deux molécules ont été évaluées, et les résultats obtenus ne permettent pas de poursuivre les évaluations biologiques. Néanmoins, les autres dérivés de cette famille devront être évalués. Si des observations similaires sont observées avec les autres dérivés, alors les évaluations biologiques ne seront pas poursuivies avec cette famille de dérivés.

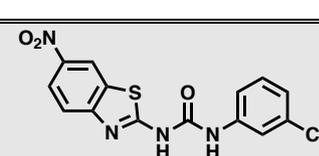
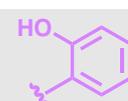
5.2.2 Résultats des tests de viabilité cellulaire

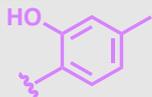
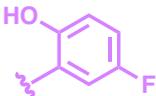
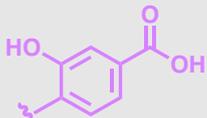
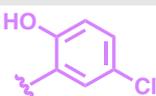
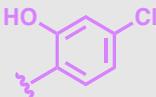
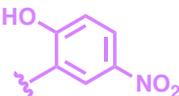
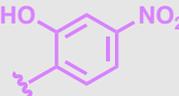
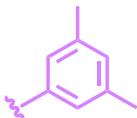
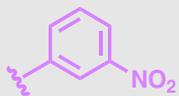
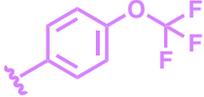
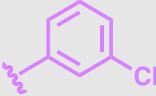
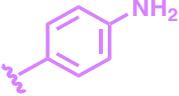
Les différentes molécules synthétisées ont été étudiées pour leur capacité à inhiber la prolifération et la croissance cellulaires de quatre lignées du cancer du rein : 786-O, 786-R (résistante au sunitinib), RCC4 et A498.

Le Tableau 6 regroupe les différentes expériences d'IC₅₀ des composés (**10** ; **1a-b** ; **1c-i** ; **1k** ; **1n** ; **1p** ; **1s** ; **2a-d** ; **2f** ; **2h-j** ; **2m** et **2o**) sur les 4 lignées cellulaires définies, en comparaison avec le MCK 140 (molécule de référence).

Tableau 7 : Valeurs d'IC₅₀ (μM), pour les molécules des familles A et B.



N°	R	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀
		786-O	786-R*	RCC4	A498
MCK 140		2	NC	5	2.5
10		>25	>25	>25	>25
1a		>25	>25	>25	>25

1b		>25	>25	>25	>25
1c		>25	>25	>25	>25
1d		>25	>25	>25	>25
1e		>25	>25	>25	>25
1f		>25	>25	>25	>25
1g		>25	>25	>25	>25
1h		>25	>25	>25	>25
1i		0,6	2	25	10
1k		>25	>25	>25	>25
1n		>25	>25	>25	>25
1p		>25	>25	>25	>25
1r		10	>25	>25	>25
1s		>25	>25	>25	>25

2a		>25	>25	>25	>25
2b		>25	>25	>25	>25
2c		>25	>25	>25	>25
2d		>25	>25	>25	>25
2f		>25	>25	>25	>25
2h		>25	>25	>25	>25
2i		>25	>25	>25	>25
2j		>25	>25	>25	>25
2m		>25	>25	>25	>25
2o		>25	>25	>25	>25

*NC = non communiqué

Ces résultats préliminaires laissent supposer que les dérivés de type benzylamines (**2a-d** ; **2f** ; **2h-j** ; **2m** et **2o**) ne sont pas des motifs de choix pour la préparation de dérivés de type benzothiazinones capables d'inhiber la prolifération et la croissance cellulaires sur ces quatre lignées. L'éloignement du cycle Est ne semble pas favoriser les interactions avec la cible, puisque aucune valeur d' IC_{50} mesurée pour ces composés n'est inférieure à 25 μ M.

Deux molécules de la famille A ont révélé des IC_{50} intéressantes, en particulier la molécule **1r** avec une IC_{50} de 10 μM sur les cellules 786-O, et **1j** avec des IC_{50} prometteuses sur des lignées aussi bien sensibles au sunitinib (786-O ; $IC_{50} = 0.6 \mu\text{M}$) que résistantes (786-R ; $IC_{50} = 2 \mu\text{M}$) et sur la lignée A498 ($IC_{50} = 10 \mu\text{M}$). Cette molécule est d'ailleurs plus efficace que le MCK 140 sur la lignée 786-O avec une IC_{50} proche du nanomolaire, tandis que ce dernier possède une IC_{50} de l'ordre du micromolaire (2 μM) sur cette même lignée.

Cependant, les résultats préliminaires issus de la comparaison des analogues **1a** et **1b** ; **1f** et **1r**, ne permet pas d'affirmer avec certitude que le groupement hydroxyle en position 2 est nécessaire pour avoir une activité biologique avérée sur la cible. Nous devons répéter ces expériences avec les composés **1i** et **1r** afin de confirmer les valeurs d' IC_{50} qui leur sont associées. Une expérience de comparaison avec le composé **1i** et son analogue direct de type aniline, le composé : 2-((4-nitrophenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one sera envisagée pour confirmer cette hypothèse.

5.2.3 Résultats de la capacité antagoniste de CXCR1/2 des composés

Les composés **1a-t** ; **2a-j** et **2m-p** ont été étudiés pour leur capacité à antagoniser les récepteurs CXCR1 et CXCR2 présents sur les cellules A498. Dans un premier temps, tous ces dérivés ont été évalués à 10 μM . Les composés inhibant la migration des cellules A498 attirées par CXCL-8, à cette concentration ont ensuite été testés à 5 μM , et ceux révélant un fort potentiel d'inhibition de la migration des cellules A498, ont été évalués à 1 μM . Les résultats présentés ci-dessous concernent seulement les composés ayant un fort pouvoir inhibiteur sur la migration des cellules A498 à 5 μM et 1 μM . Pour l'évaluation à 5 μM la molécule MCK 133 (cf. chapitre 3) a servi de référence (Figure 48), cependant n'ayant aucun effet à 1 μM , c'est la molécule MCK 140 qui a alors été prise comme référence (Figure 49).

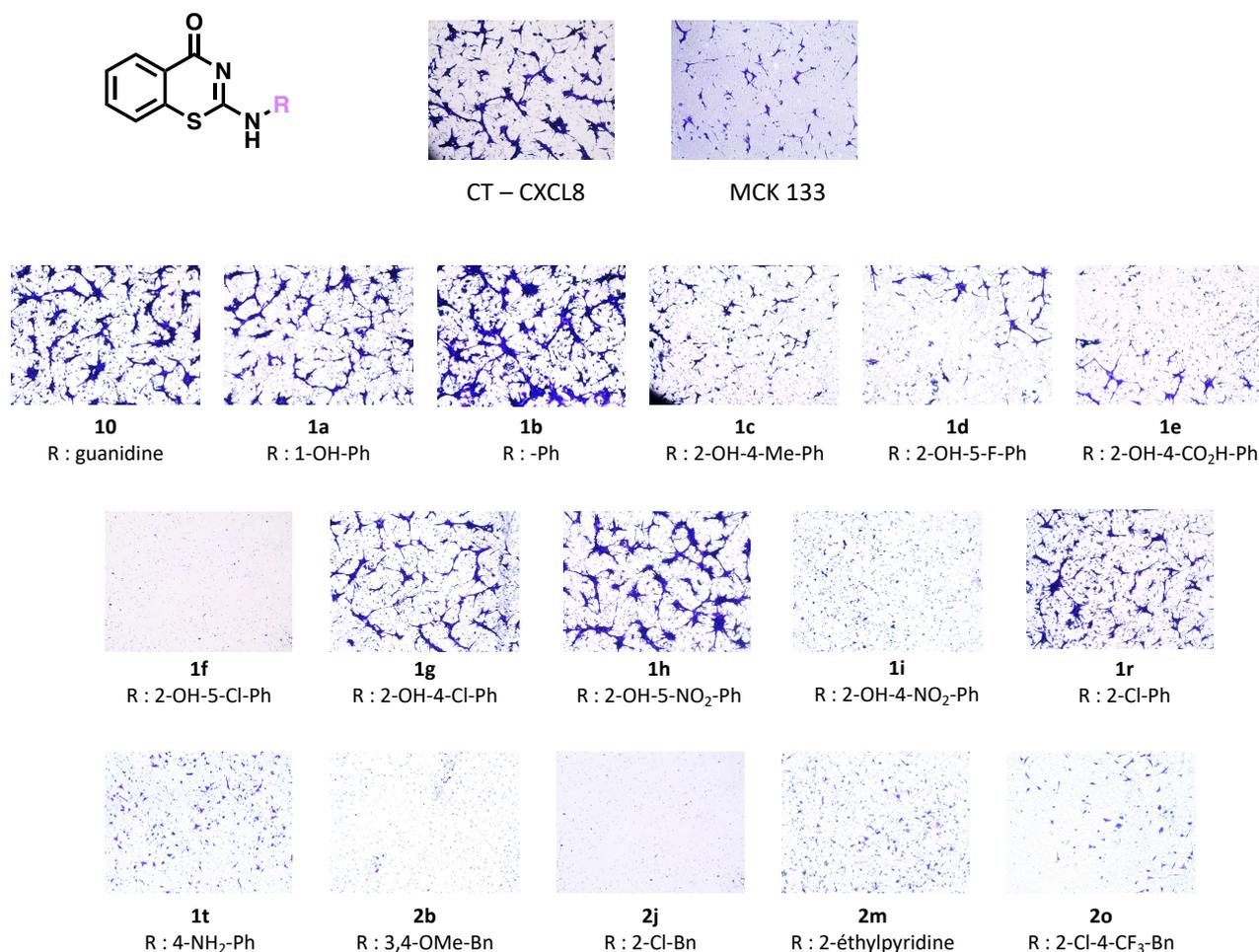
Migration : A498 – CXCL8 à 5 μ M

Figure 48 : Révélation au cristal violet des cellules A498 ayant migré par l'attraction de CXCL8, en présence de traitement à une concentration de 5 μ M, en comparaison avec le contrôle (absence de traitement) et le MCK 133 (molécule de référence).

En comparaison avec le contrôle (CT-CXCL8), les composés **10**, **1a**, **1b**, **1g** et **1h** ne bloquent pas la migration des cellules A498 à une concentration de 5 μ M. En revanche à cette même concentration les autres composés inhibent la migration des cellules A498, et en particulier les composés **1f**, **1i**, **1t**, **2b**, **2j**, **2m** et **2o** qui ont une capacité d'inhibition plus marquée que la molécule de référence MCK 133 (Figure 48). Ces molécules étant plus efficaces que le MCK

133 au niveau de leur capacité d'inhibition, elles ont ensuite été testées à une concentration de 1 μM sur la même lignée cellulaire (A498).

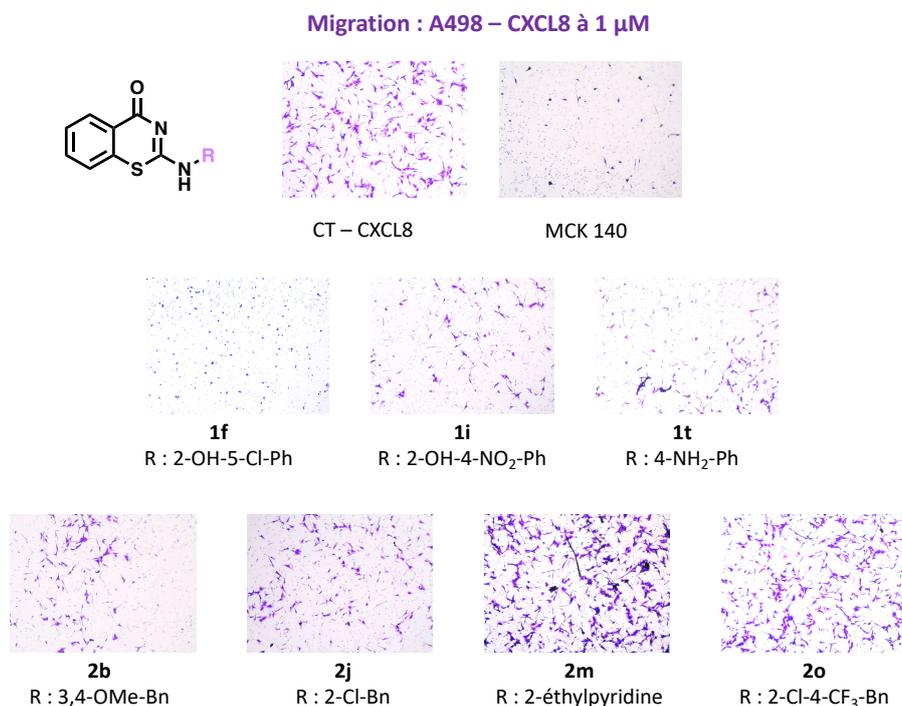


Figure 49 : Révélation au cristal violet des cellules A498 ayant migré par l'attraction de CXCL8, en présence de traitement à une concentration de 1 μM en comparaison avec le contrôle (absence de traitement) et le MCK 140 (molécule de référence).

Les dérivés de la famille B, **2b**, **2j**, **2m** et **2o**, possèdent une capacité d'inhibition intéressante à 5 μM , mais malheureusement ne sont pas efficaces à 1 μM comparé au MCK 140. Cependant, des évaluations supplémentaires à 5 μM sur d'autres lignées cancéreuses du rein seront envisagées. La comparaison de ces images de microscopie révèle trois molécules (**1f**, **1i** et **1t**) toutes aussi efficaces, voire plus (**1f**) que le MCK 140 sur l'inhibition de la migration des cellules A498 à 1 μM (Figure 49).

Tous les résultats précédents combinés démontrent que la molécule **1i** possède la meilleure IC₅₀ (10 μM) sur les cellules A498 et semble être un inhibiteur prometteur de

l'interaction CXCL-ELR⁺/CXCR, car c'est l'une des rares molécules avec les composés **1f** et **1t** à inhiber la chimiotaxie des cellules A498 à très faible concentration (1 μM). Ces études devront être reproduites sur d'autres lignées du cancer du rein afin de compléter les résultats préliminaires obtenus avec cette molécule.

5.3 Conclusion du chapitre 5

Les résultats préliminaires obtenus ont mis en lumière le composé **1i** qui semble être un inhibiteur potentiellement prometteur de CXCR1 et CXCR2. Il a révélé des valeurs d'IC₅₀ relativement faibles (2 μM sur 786-R et 10 μM sur A498) dont une meilleure IC₅₀ (0.6 μM) sur la lignée 786-O que celle observée avec le composé de référence MCK 140 (IC₅₀ = 2 μM). Une activité anti-migratoire marquée lui est aussi attribuée, à une concentration de 1 μM.

Conclusion générale

&

Perspectives

Des thérapies émergentes basées sur le principe de la polypharmacologie sont de plus en plus utilisées pour le développement de médicaments anti-cancéreux capables d'agir sur différentes fonctions biologiques afin de contourner les phénomènes de résistance aux traitements actuels. La signalisation par la voie des chimiokines CXCL-ELR⁺ *via* leurs récepteurs CXCR1 et CXCR2 promeut à la fois l'angiogenèse et l'inflammation (deux acteurs principaux dans le développement et la progression tumorale) et est sur-activée dans un certain nombre de cancers. Cette voie représente une niche thérapeutique de grand intérêt pour cibler conjointement ces deux phénomènes en utilisant un seul agent. Nous avons donc synthétisé et étudié plusieurs séries de composés capables d'antagoniser les récepteurs CXCR1 et CXCR2 dans le but d'avoir une action duale.

Dans un premier temps, un travail d'optimisation a été effectué à partir d'une molécule de référence (MCK 140), nous permettant de développer plusieurs nouvelles familles d'antagonistes. Des synthèses courtes utilisant une stratégie divergente ont été utilisées pour la préparation des dérivés des familles A et B, afin d'obtenir rapidement et efficacement les différents analogues (**1a-u**). Cependant, la synthèse des dérivés de type 2-aminobenzothiazinones s'est révélée plus complexe que prévue, et il a fallu adapter les synthèses au cas par cas, en modifiant aussi bien les températures que les temps réactionnels en fonction du substrat. Néanmoins, nous avons synthétisé 50 analogues dont 43 jamais décrits, en modifiant la nature et la position des substituants. Les familles A et B ont servi de comparatif pour évaluer si la présence ou l'absence d'un groupement hydroxyle en position *ortho* de l'aniline est indispensable pour avoir une activité biologique. A ce jour, les résultats préliminaires ne nous permettent pas d'affirmer avec certitude cette hypothèse. Il est envisagé de poursuivre le développement d'analogues possédant le groupement hydroxyle afin d'affiner les études de Relation-Structure-Activité. Cependant, l'ensemble de ces résultats préliminaires nous a tout de même permis de révéler un composé particulièrement prometteur : la molécule **1i**. Des valeurs d'IC₅₀ proches du nanomolaire pour la lignée 786-O (0.6 μM) ainsi qu'un potentiel antagoniste des récepteurs CXCR1-2 très marqué à 1 μM en font un composé de choix pour poursuivre les

évaluations biologiques. Une campagne *in_vivo* sur zebrafish (poisson zèbre) est envisagée prochainement avec ce composé **1i**. Les poissons zèbres représentent un nouveau modèle biologique alternatif aux souris dans la recherche sur le cancer et sont utilisés comme outil pour exploiter et étudier l'angiogenèse tumorale.^{151,152}

Pour la préparation des analogues de la famille C, une deuxième stratégie de synthèse a été suivie. Cependant, l'étape de cyclisation des thiourées étant délicate et dépendante du substrat, il n'a pas été possible de décrire une méthodologie applicable pour tous les composés. Néanmoins, les différences de réactivité nous ont permis de démontrer que cette étape de cyclisation était favorisée pour les composés substitués par un nitro en *para* comparés à ceux substitués en *ortho*. Enfin, la synthèse des composés 2-aminopyridothiazinone pour la famille C, a été un échec. Le noyau pyridine sur la partie ouest des molécules nous a posé d'énormes problèmes, aussi bien de solubilité que réactionnels. Nous avons néanmoins obtenu 6 intermédiaires thiourées (**15a-f**) et 2 composés finaux (**3c** et **3e**). Nous avons également proposé le développement d'une nouvelle famille d'analogues (famille D). La stratégie de synthèse employée nous a permis d'obtenir 5 composés de types *N*-(4-oxo-4*H*-benzo[*e*][1,3]thiazin-2-yl)benzamide, et pourra être amplifiée avec d'autres substrats de type chlorure de benzoyle. Les évaluations biologiques des composés des familles C et D doivent encore être réalisées. Les résultats nous permettront de décider si la synthèse de nouvelles molécules pour ces familles doit être poursuivie.

Il pourra également être envisagé de décliner cette stratégie intéressante de synthèse avec divers précurseurs de départ, comme par exemple les composés **10**, **30** et **33** afin d'obtenir des analogues de type 2-aminopyridinothiazinones (Schéma 17).

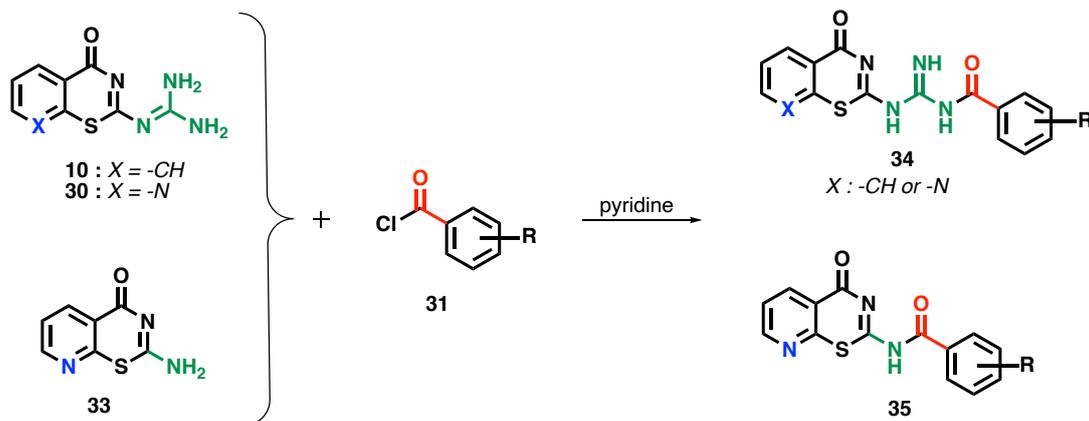


Schéma 17 : Synthèse envisagée pour la famille D avec les précurseurs 10, 30 et 31.

La synthèse de nouvelles molécules permettra d'obtenir une chimiothèque conséquente afin d'aboutir à des études de RSA complètes, tout en optimisant les paramètres physico-chimiques des composés des familles précédentes.

L'objectif principal de ces travaux étant de développer un inhibiteur de l'interaction CXCL-ELR⁺/CXCR, des études supplémentaires sont nécessaires afin de valider les résultats préliminaires obtenus. Ainsi, dans le but d'approfondir les connaissances sur le mode d'action de nos molécules, des études mécanistiques pourront être envisagées. Pour ces études il sera intéressant de synthétiser des sondes biotinyllées avec les molécules les plus prometteuses, ce qui permettra d'identifier les cibles moléculaires primaires et secondaires. Celles-ci seront révélées grâce à l'utilisation de la streptavidine qui permet de capturer les complexes : molécule-biotine/cible (Figure 50). Ces derniers seront ensuite analysés par western blot ou par protéomique. L'analyse par western blot permettra de confirmer l'interaction des composés au niveau des récepteurs CXCR1 et CXCR2, tandis que les analyses protéomiques permettront d'identifier potentiellement toutes les cibles biologiques secondaires.

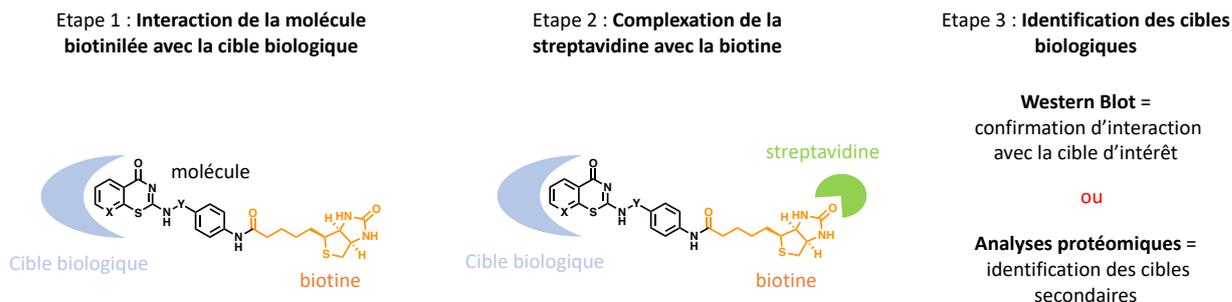


Figure 50 : Proposition d'utilisation du complexe biotine-streptavidine pour confirmer la cible biologique et identifier les cibles biologiques secondaires de nos composés.

De nombreuses applications thérapeutiques sont envisageables pour la suite avec les différents analogues 2-aminobenzothiazinones. En effet, les dérivés de type benzothiazinones ont suscité un intérêt grandissant depuis 2010 (10-18 publications par an comparé aux années précédentes 2-5 publications par an). Ainsi, en plus de développer un potentiel agent anti-cancéreux, il serait intéressant d'envisager de tester nos composés pour d'autres applications thérapeutiques où l'angiogenèse et l'inflammation sont prépondérantes et où les traitements actuels ne sont pas curatifs, comme par exemple : pour la dégénérescence maculaire liée à l'âge. De plus, comme il a été présenté dans le chapitre 2, les récepteurs CXCR1 et CXCR2 sont exprimés par différents types cellulaires, dont les cellules myéloïdes suppressives. L'inhibition de CXCR1 et CXCR2 sur ces cellules permettrait de restaurer la réponse immunitaire en dormance dans un certain nombre de pathologies

Partie Expérimentale

1- Material and method

The commercial products are used without purification. The solvents are used without previous distillation.

Analytical thin layer-chromatographies (TLC) have been performed on pre-coated silica gel plates (Kieselgel 60 F254, E. Merck, Germany), and chromatograms were visualized by UV-irradiation (254 nm and 365 nm). Then by staining with ninhydrin or potassium permanganate according to the compound.

Purification by silicagel flash chromatography has been performed on a CombiFlash Rf+, TELEDYNE Isco, using prepacked column (CHROMABOND Flash, SiOH 40-63 μm , MACHEREY NAGEL).

NMR spectroscopies were recorded in deuterated DMSO, acetone- d_6 , methanol- d_4 , on a Bruker AC 200, or on a Bruker AC 400 spectrometers at 200 MHz or 400 MHz for ^1H NMR and ^{13}C NMR; δ is expressed in ppm related to TMS (0 ppm) as internal standard. Splitting patterns are designated as follow: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet) m (multiplet), br (broad). Coupling constants (J values) are listed in Hertz (Hz).

Mass spectra (ESI-MS) were recorded on a Bruker Daltonics Esquire 3000+, and the samples were diluted in methanol or acetone.

For **microwaves experiments** we used CEM Discover 201A15 with a puissance of 150 Watts.

The purity of compounds was assayed by **HPLC analysis** on Alliance, (waters 2695, separation module), with Ascentis Express C18 analytical column (SUPELCO) and with NUCLEOSHELL RP 18.5 μm column (MACHEREY-NAGEL).

Method 1: Supelco analytical column Ascentis Express C18, 100mm x 46 mm 5 μm . UV-detection: 214; 254; 280; 320 nm. Eluent A: water with 1‰ formic acid, Eluent B: CH_3CN with 1‰ formic acid. 0-10 min: 10%B; 10-18 min: 10-95%B; 18-20 min: 95-95%B; 20-24min: 95-10%B; 24-25: 10%B.

Method 2: Supelco analytical column Ascentis Express C18, 100mm x 46 mm 5 μ m. UV-detection: 214; 254; 280; 320 nm. Eluent A: water with 1‰ formic acid, Eluent B: CH₃CN with 1‰ formic acid. 0-1 min: 10%B; 1-4 min: 10-100%B; 4-6 min: 100-100%B; 6-7min: 100-10%B; 7-8min: 10%B.

Method 3: Supelco analytical column Ascentis Express C18, 100mm x 46 mm 5 μ m. UV-detection: 214; 254; 280; 320 nm. Eluent A: water with 1‰ formic acid, Eluent B: CH₃CN with 1‰ formic acid. 0-3 min: 10%B; 3-5 min: 10-100%B; 5-13 min: 100-100%B; 13-18min: 100-10%B; 18-20min: 10%B.

Method 4: MACHEREY-NAGEL column NUCLEOSHELL RP 18.5 μ m. UV-detection: 214; 254; 280; 320 nm. Eluent A: water with 1‰ formic acid, Eluent B: CH₃CN with 1‰ formic acid. 0-3 min: 10%B; 3-5 min: 10-100%B; 5-13 min: 100-100%B; 13-18min: 100-10%B; 18-20min: 10%B.

2- Chemical synthesis

General procedure for the formation of 2-amino-benzothiazinone cores (A)

To a solution of 1-(4-oxo -4*H*-benzo[*e*][1,3]thiazin-2-yl)guanidine (200,00 mg, 0.91 mmol, 1 eq.) in acetic acid (4 mL), was added the corresponding aminophenol (1.2 eq). The reaction was heated under microwave irradiation at 120-150°C for 15-30 min. Then AcOH was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in the minimum of DCM. A precipitate appeared which was filtered and washed with MeOH followed by Et₂O.

General procedure for the formation of 2-amino-benzothiazinone cores (B)

To a solution of 1-(4-oxo -4*H*-benzo[*e*][1,3]thiazin-2-yl)guanidine (200,00 mg, 0.91 mmol, 1 eq.) in dioxane (4 mL), was added APTS.H₂O (1 eq), followed by the corresponding substrate (1 eq.). The reaction was heated under microwave irradiation at 130-150°C for 15 min. Then dioxane was removed under reduced pressure. Water was added to the residue and the precipitate was filtered, washed several times with water, followed by Et₂O.

Synthesis of 2-amino-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (5)¹³⁵

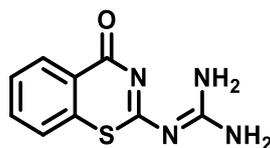
Chemical Formula: C₈H₆N₂OS
 Exact Mass: 178,02
 Molecular Weight: 178,21

To a solution of thiosalicylic acid (10.01 g, 64.80 mmol, 1eq.) in MeOH (50 mL), was added slowly the cyanamide (4.24 g, 97.2 mmol, 1.5eq.) at room temperature. After 1 hour stirring at reflux (66°C), a yellow precipitate appeared. The reaction was stirred at reflux under argon for 48 hours. After the completion of the reaction a white precipitate appeared. A filtration was done, the white precipitated was washed with MeOH (20 mL), EtOH (150 mL), followed by Et₂O (50 mL) to afford the desired compound as a white powder (8.43 g, 47.3 mmol, 73 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.52 (br. s, 2H), 8.19 (dd, *J* = 7.9, 1.0 Hz, 1H), 7.62 – 7.52 (m, 2H), 7.48 – 7.43 (m, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.4, 163.9, 132.9, 132.2, 129.4, 127.6, 125.9, 122.5.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 179.07 and [2M+H]⁺ = 356.80, *t*_R = 4.62 min.

Synthesis of 1-(4-oxo-4H-benzo[e][1,3]thiazin-2-yl)guanidine (10) ¹³⁰Chemical Formula: C₉H₈N₄OS

Exact Mass: 220,0419

Molecular Weight: 220,2500

To a solution of thiosalicylic acid (10.00 g, 64.80 mmol, 1eq.) in water (25 mL), was added cyanoguanidine (10.85 g, 129.00 mmol, 2 eq). The reaction mixture was stirred at reflux temperature (105°C) for 2 days. The white precipitate was filtered and washed with MeOH (100 mL). The desired compound was obtained as a white powder used further without needed a purification (12.58 g, 57.10 mmol, 88%).

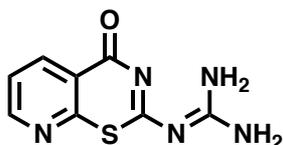
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.47 (br. s, 2H), 8.18 (dd, *J* = 7.9, 0.9 Hz, 1H), 7.56 (td, *J* = 7.8, 0.9 Hz, 1H), 7.46 – 7.37 (m, 2H), 7.18 (br. s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170.2, 168.2, 159.4, 136.5, 132.3, 129.6, 127.1, 125.4, 122.4.

LC-MS-ESI: [M-H⁺COO]⁻ = 264 and [M+H]⁺ = 220.93, *t*_R = 2.04 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity > 99%; and (λ₂₈₀): Purity > 99%; *t*_R: 0.96 min (method 2).

Synthesis of 2-(4-oxo-4H-pyrido[3,2-e][1,3]thiazin-2-yl)guanidine (30)



Chemical Formula: C₈H₇N₅OS
 Exact Mass: 221,04
 Molecular Weight: 221,24

To a solution of 2-mercaptopyridine (1.00 g, 6,40 mmol, 1 eq.) in dioxane (30 mL) was added the BF₃-etherate (1.09 g, 7.68 mmol, 1.2 eq.), followed by the cyanoguanidine (1,07 g, 12,80 mmol, 1.2 eq.) The reaction mixture was stirred at room temperature for overnight. Then NaOH 4M added carefully until pH = 7. An extraction was done with EtOAc (3 x 100 mL) and the organic layers were combined, dried over MgSO₄ and finally concentrated under reduced pressure.

The desired compound **30** was obtained after a purification on flash chromatography column (4g) eluted with a gradient CHCl₃/MeOH (9/1; v/v), as a beige powder yielded 4% (56.6 mg, 0.27 mmol).

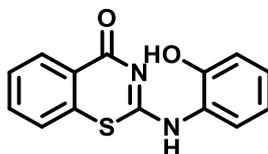
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.66 (dd, *J* = 4.6, 1.7 Hz, 1H), 8.47 (br. s, 2H), 8.43 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.46 (dd, *J* = 7.9, 4.7 Hz, 1H), 7.35 (br. s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170.3, 168.6, 159.4, 159.4, 157.9, 152.9, 137.4, 122.9, 120.1.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 222.00, *t*_R = 1.93 min.

2.1 Family A

Synthesis of 2-((2-hydroxyphenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (1a)



Chemical Formula: C₁₄H₁₀N₂O₂S

Exact Mass: 270,0463

Molecular Weight: 270,3064

The desired compound **1a** was obtained following the general procedure A (120 °C, for 15min), as a pink powder yielded 25% (106.10 mg, 0.39 mmol).

Mp = 228 °C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.61 (br. s, 1H), 9.35 (br. s, 1H), 8.18 (dd, *J* = 7.9, 1.0 Hz, 1H), 7.60 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.50 – 7.39 (m, 2H), 7.04 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.82 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H).

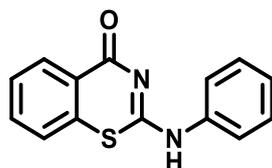
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.4, 163.2, 149.3, 132.8, 132.6, 129.0, 126.8, 126.0, 125.3, 123.6, 122.3, 119.0, 115.9, 109.9.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 271.07 and [2M+H]⁺ = 540.70, [M-H]⁻ = 268.80, *t*_R = 7.92 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 95.7%; and (λ₂₈₀): Purity = 97.8%; *t*_R = 3.33 min (method 2).

HRMS-ESI (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₀O₂N₂S, 271.05357; found: 271.05356.

Synthesis of 2-(phenylamino-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (1b)

Chemical Formula: C₁₄H₁₀N₂OS

Exact Mass: 254.0514

Molecular Weight: 254.3070

The desired compound **1b** was obtained following the general procedure A (120 °C, 15min), as a white powder yielded 25% (58,00 mg, 0.23 mmol).

Mp = 174 °C.

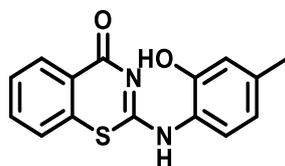
¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.29 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.59 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.45 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.38 (t, J = 7.6 Hz, 4H), 7.19 (t, J = 7.5 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.9, 136.1, 132.9, 132.5, 131.8, 129.1, 129.0, 127.0, 126.6, 125.4, 124.9, 124.1, 122.2, 121.0.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 255.07, [2M+H]⁺ = 508.3, t_R = 8.74 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 97,40%; and (λ₂₈₀): Purity = 98,62%; t_R: 3.58 min (method 2).

Synthesis of 2-((2-hydroxy-4-methylphenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one
(1c)



Chemical Formula: C₁₅H₁₂N₂O₂S

Exact Mass: 284.0619

Molecular Weight: 284.3330

The desired compound **1c** was obtained following the general procedure A (120 °C, for 15min), as a beige powder yielded 51% (132.90 mg, 0.47 mmol).

Mp = 202 °C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₃) δ 8.35 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.54 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.40 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.88 (br. s, 1H), 6.74 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 2.31 (s, 3H).

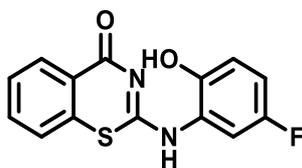
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.3, 158.7, 155.4, 147.8, 139.1, 137.5, 132.8, 130.3, 129.7, 129.1, 125.1, 118.3, 117.4, 110.0, 79.2.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 285.00, [2M+H]⁺ = 568.47 and [M-H]⁻ = 282.93, *t*_R = 8.41 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 96.9%; *t*_R: 3.42 min (method 2).

HRMS-ESI (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₅H₁₂N₂O₂S, 285.06924; found: 285.06922

Synthesis of 2-((2-hydroxy-4-methylphenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one
(1d)



Chemical Formula: C₁₄H₉FN₂O₂S

Exact Mass: 288.0369

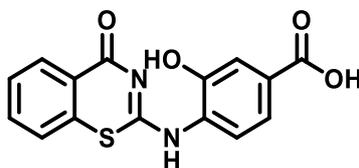
Molecular Weight: 288.2964

The desired compound **1d** was obtained following the general procedure A (120 °C, for 15min), after a purification by silica gel flash chromatography CH/EtOAc (8/2, v/v), as a beige powder yielded 2% (5.60 mg, 0.02 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ 10.04 (br. s, 1H), 9.72 (br. s, 1H), 7.98 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.61 (td, *J* = 8.1, 1.1, Hz 1H), 7.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 6.93 (t, *J* = 11.1 Hz, 2H).

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 289.07 ; 290.00 and [M-H]⁻ = 286.87, *t*_R = 8.36 min.

Synthesis of 3-hydroxy-4-((4-oxo-4H-benzo[e][1,3]thiazin-2-yl)amino)benzoic acid
(1e)



Chemical Formula: C₁₅H₁₀N₂O₄S

Exact Mass: 314.0361

Molecular Weight: 314.3150

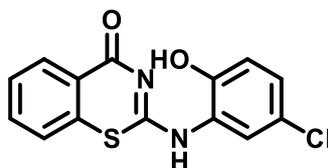
The desired compound **1e** was obtained following the general procedure A (150 °C, 15min), as a clear red powder yielded 31% (88.00 mg, 0.28 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.22 (br. s, 2H), 9.67 (br. s, 1H), 8.18 (dd, *J* = 7.9, 1.1 Hz, 1H), 7.65 – 7.57 (m, 1H), 7.51 – 7.39 (m, 4H), 7.02 (br. s, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.2, 167.1, 162.9, 148.6 (2C), 133.7, 132.9, 129.6, 127.9, 127.2, 125.7, 122.8, 121.1, 117.0, 111.5.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 315.07 and [M-H]⁻ = 312.87, *t*_R = 7.12 min.

HRMS-ESI (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₅H₁₀N₂O₄S, 315.04346; Found: 315.04340.

Synthesis of 2-((4-chloro-2-hydroxyphenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (**1f**)Chemical Formula: C₁₄H₉ClN₂O₂S

Exact Mass: 304.0073

Molecular Weight: 304.7480

The desired compound **1f** was obtained following the general procedure A (120 °C, for 30 min), as a clear pink powder yielded 29% (78.00 mg, 0.26 mmol).

Mp = 264 °C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ 11.73 (br. s, 1H), 9.60 (br. s, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.61 (td, *J* = 8.1, 1.1, Hz 1H), 7.50 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 6.91 (t, *J* = 11.1 Hz, 2H).

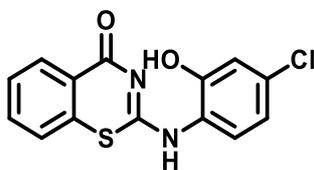
¹³C NMR (101 MHz, DMSO- *d*₆) 163.7, 157.9, 148.1, 134.3, 133.6, 132.9, 129.6, 127.2, 125.7, 125.1, 122.7, 122.5, 117.6, 110.8.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 305.00 and [M-H]⁻ = 302.80, *t*_R = 9.01 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 96.5%; and (λ₂₈₀): Purity = 95.8%; *t*_R: 3.62 min (method 2).

HRMS-ESI (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₉ClN₂O₂S, 305.01471; found: 305.01460.

Synthesis of 2-((5-chloro-2-hydroxyphenyl)amino)-4H-benzoe[e][1,3]thiazin-4-one
(1g)



Chemical Formula: C₁₄H₉ClN₂O₂S

Exact Mass: 304.0073

Molecular Weight: 304.7480

The desired compound **1g** was obtained following the general procedure A (150 °C, 15min), as a clear beige powder yielded 42% (115 mg, 0.38 mmol).

Mp = 252 °C.

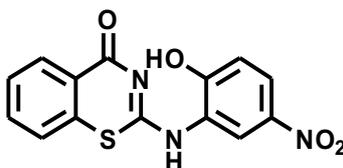
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.79 (br. s, 1H), 9.84 (br. s, 1H), 8.19 – 8.10 (m, 2H), 7.62 – 7.56 (m, 2H), 7.50 – 7.36 (m, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.2, 163.7, 162.8, 150.3, 133.5, 132.9, 129.6, 129.3, 127.2, 125.7, 124.6, 122.8, 119.3, 116.2.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 305.00 and 306.93, *t*_R = 8.98 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 96.3 %; and (λ₂₈₀): Purity = 98.0 %; *t*_R: 3.62 min (method 2).

Synthesis of 2-((2-hydroxy-5-nitrophenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (1h)

Chemical Formula: C₁₄H₉N₃O₄S

Exact Mass: 315,0314

Molecular Weight: 315,3040

The desired compound **1h** was obtained following the general procedure A (140 °C, for 15min), as a yellow powder yielded 20% (56.00 mg, 0.17 mmol).

Mp: 264°C.

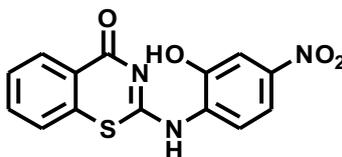
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.06 (br. s, 1H), 10.99 (br. s, 1H), 8.19 (dd, *J* = 7.9, 1.1 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.68 – 7.56 (m, 1H), 7.55 – 7.34 (m, 2H), 7.07 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.7, 162.5, 155.9, 139.7, 139.5, 133.8, 132.6, 129.7, 127.3, 125.7, 122.7, 121.9, 118.4, 116.3.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 316.07 and [M-H]⁻ = 313.93, *t*_R = 8.56 min.

HPLC (λ254): Purity = 96.07 %; and (λ280): Purity = 94.49 %; *t*_R: 3.49 min (method 2).

HRMS-ESI (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₉N₃O₄S, 316.03873; Found: 316.03865.

Synthesis of 2-((2-hydroxy-4-nitrophenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (**1i**)Chemical Formula: C₁₄H₉N₃O₄S

Exact Mass: 315,0314

Molecular Weight: 315,3040

The desired compound **1i** was obtained following the general procedure A (150 °C, 15min), as a yellow powder yielded 48% (138 mg, 0.43 mmol).

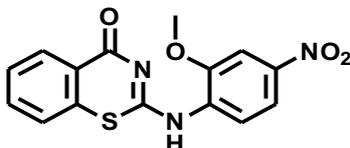
¹H NMR (400 MHz DMSO-*d*₆) δ 12.06 (br. s, 1H), 10.35 (br. s, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.87 – 7.68 (m, 2H), 7.68 – 7.55 (m, 1H), 7.46 (dd, *J* = 17.3, 7.8 Hz, 2H), 7.13 (br. s, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.8, 162.4, 148.9, 144.3, 140.9, 133.9, 132.5, 129.7, 127.3, 125.6, 122.8, 122.6, 115.4, 110.8.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 316.00 and [M-H]⁻ = 313.80, *t*_R = 8.77 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 97.8%; and (λ₂₈₀): Purity = 97.4%; *t*_R: 3.53 min (method 2).

HRMS-ESI (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₉N₃O₄S, 316.03873; found: 316.03865.

Synthesis of 2-((2-methoxy-4-nitrophenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (**1j**)Chemical Formula: C₁₅H₁₁N₃O₄S

Exact Mass: 329.0470

Molecular Weight: 329.3300

The desired compound **1j** was obtained following the general procedure B (140 °C, 15min), as a yellowish powder yielded 14% (41 mg, 0.12 mmol).

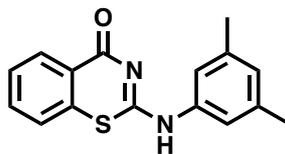
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.20 (br. s, 1H), 8.19 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.47 (s, 2H), 7.31 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.6, 156.5, 151.5, 140.8, 133.8, 132.3, 129.7, 127.4, 125.7, 122.6, 121.7, 112.2, 109.6, 106.8, 56.6.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 330.07 and 658.60; *t*_R = 11.66 min.

HPLC (λ254): Purity = 92.45%; and (λ280): Purity = 95.36%; *t*_R: 5.96 min (method 3).

Synthesis of 2-((3,5-dimethylphenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (1k)

Chemical Formula: C₁₆H₁₄N₂OS

Exact Mass: 282,08

Molecular Weight: 282,36

The desired compound **1k** was obtained following the general procedure A (120 °C, 15min), after a purification on flash chromatography column (12g) eluted with a gradient CH/EtOAc (8/2 to 7/3; v/v), as a white powder yielded 24% (61 mg, 0.22 mmol).

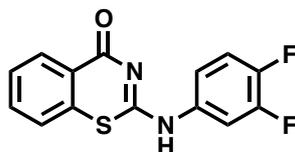
¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂-d₂) δ 9.32 (br. s, 1H), 8.30 (dd, *J* = 7.9, 0.7 Hz, 1H), 7.52 (ddd, *J* = 8.8, 7.7, 1.5 Hz, 1H), 7.41 – 7.34 (m, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.64 (s, 2H), 2.32 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂-d₂) δ 162.9, 148.2, 145.5, 139.3 (2C), 133.6, 133.5, 130.2, 126.9, 126.7, 125.3, 123.2, 119.2 (2C), 21.1 (2C).

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 283.00 ; *t_R* = 9.86 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 96.3%; and (λ₂₈₀): Purity = 97.2%; *t_R*: 5.21 min (method 2).

Synthesis of 2-((3,4-difluorophenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (1I)



Chemical Formula: C₁₄H₈F₂N₂OS
 Exact Mass: 290,03
 Molecular Weight: 290,29

The desired compound **1I** was obtained following the general procedure A (150 °C, 15min), as a white powder yielded 30% (158 mg, 0.54 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.82 (br. s, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.63 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.57 – 7.39 (m, 3H), 6.92 (m, 2H).

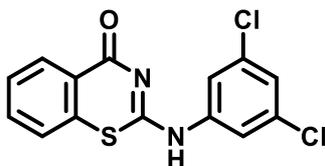
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 154.5, 150.7, 147.6, 145.2, 133.6, 132.5, 129.6, 127.5, 125.9, 122.5, 118.1, 117.9, 110.7, 110.6.

¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO-*d*₆): -136.75 (q) , -144.52 (br. s).

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 291.00 ; [M-H]⁻ = 288.80 ; *t*_R = 9.01 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 96.7%; and (λ₂₈₀): Purity = 98.8%; *t*_R: 3.76 min (method 2).

Synthesis of 2-((3,4-difluorophenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (1m)

Chemical Formula: C₁₄H₈Cl₂N₂OS

Exact Mass: 321.9734

Molecular Weight: 323.1910

The desired compound **1m** was obtained following the general procedure A (150 °C, 15min). Two purification by silica gel flash chromatography CH/EtOAc (8/2, v/v) were needed to afford the desired compound **1m** as a white powder, yielded 6% (17 mg, 0.05 mmol).

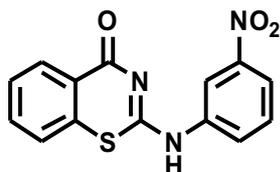
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.10 (br. s, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.70 – 7.42 (m, 4H), 7.35 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.07 (m, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.4, 164.3, 160.5, 149.6, 134.7, 133.8, 132.5, 129.7 (2C), 127.6, 125.9, 123.7, 122.6, 120.1.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 322.93 and 325.00.; [M-H]⁻ = 320.80 and 322.80 ; *t*_R = 10.83 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 98.6%; and (λ₂₈₀): Purity = 99.4%; *t*_R: 4.28 min (method 2).

Synthesis of 2-((3-nitrophenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (1n)

Chemical Formula: C₁₄H₉N₃O₃S

Exact Mass: 299,0365

Molecular Weight: 299,3040

The desired compound **1n** was obtained following the general procedure A (150 °C, 15min), as a white powder yielded 23% (62.60 mg, 0.21 mmol).

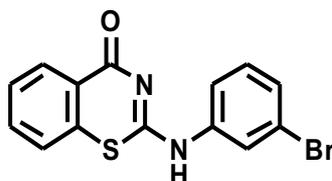
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.17 (br. s, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.01 (dd, *J* = 8.2, 1.5 Hz, 1H), 7.82 – 7.61 (m, 3H), 7.48 (m, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.9, 148.5, 134.3, 133.5, 130.9, 130.1, 129.6, 128.0, 127.5, 125.9, 125.5, 122.5, 118.9, 115.8.

LCMS-ESI (*m/z*): [M-H]⁻ = 297.80 [M+H]⁺ = 300.00, *t*_R = 9.23 min .

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 94.68 %; (λ₂₈₀): Purity = 97.48%; *t*_R: 3.66 min (method 2).

Synthesis of 2-((3-bromophenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (1o)

Chemical Formula: C₁₄H₉BrN₂OS

Exact Mass: 331.9619

Molecular Weight: 333.2030

The desired compound **1o** was obtained following the general procedure A (150 °C, 15min). A purification by silica gel flash chromatography DCM/MeOH (10/0 to 9/1, v/v) afforded the desired compound as a white powder yielded 13% (38.60 mg, 0.12 mmol).

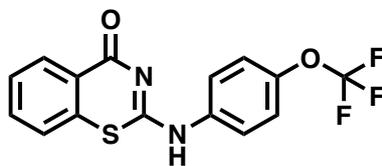
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.90 (br. s, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.57 – 7.32 (m, 5H), 7.18 (m, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.7, 148.2, 133.6, 132.6, 131.3, 129.6 (2C), 127.4, 127.0, 125.8, 123.7, 122.6, 122.0, 120.3.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 332.8 334.93 and [2M+H]⁺ = 540.70, [M-H]⁻ = 268.80, *t*_R = 7.92 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 96.9 %; and (λ₂₈₀): Purity = 97.4%; *t*_R: 3.95 min (method 2).

Synthesis of 2-((4-(trifluoromethoxy)phenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one
(1p)



Chemical Formula: C₁₅H₉F₃N₂O₂S

Exact Mass: 338,03

Molecular Weight: 338,30

The desired compound **1p** was obtained following the general procedure A (150 °C, 15min), as a white powder yielded 34% (103.00 mg, 0.30 mmol).

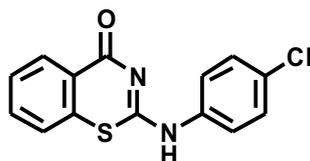
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.67 (br. s, 1H, -NH), 8.19 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.63 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.49 – 7.42 (m, 1H), 7.39 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.18 (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.5, 144.7, 133.5, 132.7, 129.6 (2C), 127.5, 125.9, 123.9, 122.9 (2C), 122.6, 122.2, 121.6, 119.5 (q, *J* = 511.5, 256.5 Hz, 1C).

¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO-*d*₆) δ -56.97.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 339.00; [2M+H]⁺ = 676.27; [M-H]⁻ = 336.87; *t*_R = 10.07 min.

HPLC (λ280): Purity = 97.79%; *t*_R: 4.02 min (method 2).

Synthesis of 2-((4-chlorophenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazine-4-one (**1q**)

Chemical Formula: C₁₄H₉ClN₂OS

Exact Mass: 288.0124

Molecular Weight: 288.7490

The desired compound **1q** was obtained following the general procedure A (150 °C, 15min), as a white powder yielded 35% (92 mg, 0.32 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.97 (br. s, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 15.7, 7.9 Hz, 2H), 7.59 – 7.38 (m, 7H), 7.11 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.9, 134.3, 133.5, 132.7, 130.1, 129.6, 129.3, 128.5, 128.3, 127.5, 125.9, 125.5, 123.1, 122.6.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 289.00, 291.07; [M-H]⁻ = 286.87, 288.73; *t*_R = 12.46 min.

HPLC (λ280): Purity = 98.6%; *t*_R: 5.15 min (method 2).

Synthesis of 2-((3-chlorophenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (1r)

Chemical Formula: C₁₄H₉ClN₂OS

Exact Mass: 288,0124

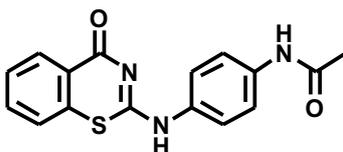
Molecular Weight: 288,7521

The desired compound **1r** was obtained following the general procedure A (140 °C, 15min), after a purification on flash chromatography column (12g) eluted with a gradient CH/EtOAc (8/2 to 7/3; v/v), as a white powder 2% (3.70 mg, 0.02 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.43 (br. s, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.72 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.61 – 7.48 (m, 5H), 7.24 (m, 1H).

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 289.00, 291.07 and [2M+H]⁺ = 576.40, *t*_R = 9.77 min

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 93.5% and (λ₂₈₀): Purity = 98.4% *t*_R: 3.92 min (method 2).

Synthesis of *N*-(4-((4-oxo-4*H*-benzo[*e*][1,3]thiazin-2-yl)amino)phenyl)acetamide (**1s**)Chemical Formula: C₁₆H₁₃N₃O₂S

Exact Mass: 311.0728

Molecular Weight: 311.3590

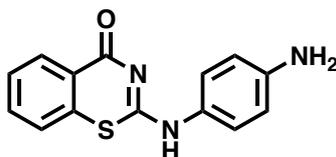
The desired compound **1s** was obtained following the general procedure A (140 °C, 15min), as a white powder yielded 59% (163.80 mg, 0.54 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.63 (br. s, 1H), 9.98 (br. s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.53 (d, *J* = 53.1 Hz, 6H), 7.05 (s, 1H, H4), 2.04 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.2, 167.9, 136.2, 134.6, 133.3, 132.9, 129.5 (2C), 127.5, 125.9, 122.7, 122.1, 119.9, 119.4, 23.9, 23.7.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 312.00; [M-H]⁻ = 309.80; *t*_R = 9.45 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 95.53%; and (λ₂₈₀): Purity = 94.80%; *t*_R: 1.17 min (method 2).

Synthesis of 2-((4-aminophenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (**1t**)

Chemical Formula: C₁₄H₁₁N₃OS
 Exact Mass: 269,06
 Molecular Weight: 269,32

The desired compound **1t** was obtained following the general procedure B (130 °C, 15min), after a purification by silica gel on flash chromatography (24g, solid deposit, DCM/MeOH:9/1, DCM 100% to 90%), as a yellow powder yielded 36% (262.70 mg, 0.98 mmol).

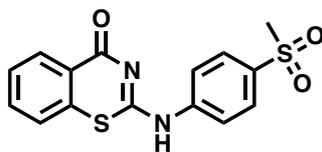
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.37 (br. s, 1H), 8.17 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.59 (s, 2H), 7.46 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.59 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 5.15 (br. s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.4, 147.6, 133.1, 132.8, 129.4, 127.5, 126.0(2C), 125.4, 123.4(2C), 122.7, 114.4, 113.6.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 270.00 and [2M+H]⁺ = 538.53; *t*_R = 7.75min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 98.57%; and (λ₂₈₀): Purity = 98.26%; *t*_R: 4.49 min (method 2).

Synthesis of 2-((4-(methylsulfonyl)phenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (1u)

Chemical Formula: C₁₅H₁₂N₂O₃S₂

Exact Mass: 332,03

Molecular Weight: 332,39

The desired compound **1u** was obtained following the general procedure B (140 °C, 15min), as a yellow powder yielded 33% (99.80mg, 0.30 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.14 (br. s), 8.21 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 6.0 Hz, 2), 7.65 (s, 1H), 7.48 (s, 2H), 7.22 (s, 2H), 3.23 (s, 3H).

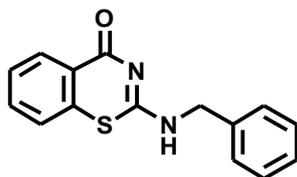
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.6, 147.6, 136.1, 133.8, 132.3, 129.6 (2C), 128.7, 127.5, 125.9, 122.5, 121.7 (2C), 66.4, 43.7.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 333.07; [M-H]⁻ = 330.87; *t*_R = 10.24min.

HPLC (λ254): Purity = 96.93%; and (λ280): Purity = 98.41%; *t*_R: 5.48 min (method 3).

2.2 Family B

Synthesis of 2-((3,4-dichlorophenyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (2a)



Chemical Formula: C₁₅H₁₂N₂OS

Exact Mass: 268.0670

Molecular Weight: 268.3340

The desired compound **2a** was obtained following the general procedure A (130 °C, 15min), as a white powder yielded 30% (74.00 mg, 0.28 mmol).

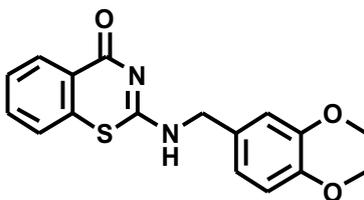
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.43 (br. s, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.64 – 7.52 (m, 2H), 7.46 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H2), 7.35 (d, *J* = 3.6 Hz, 4H), 7.31 – 7.24 (m, 1H), 4.67 (s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.0, 161.9, 137.9, 132.9, 132.4, 129.6, 128.5 (2C), 127.7, 127.6 (2C), 127.3, 125.9, 122.9, 44.8.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 269.00 ; [2M+H]⁺ = 536.37; *t*_R = 7.96 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 98.26%; and (λ₂₈₀): Purity = 99.2%; *t*_R: 3.37 min (method 2).

Synthesis of 2-((3,4-dimethoxybenzyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (2b)

Chemical Formula: C₁₇H₁₆N₂O₃S

Exact Mass: 328.0882

Molecular Weight: 328.3860

The desired compound **2b** was obtained following the general procedure A (140 °C, 15min), as a white powder yielded 9% (27.92 mg, 0.09).

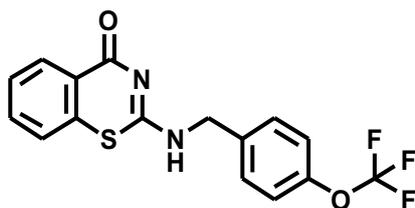
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.31 (s, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 10.9, 4.0 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.73 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 161.6, 148.7, 148.1, 132.9, 132.3, 130.0, 129.5, 127.6, 125.9, 122.9, 120.0, 111.9, 111.8, 55.6, 55.5, 44.8.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 328.87 ; [2M+H]⁺ = 656.67; *t*_R = 10.04 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 97.78%; and (λ₂₈₀): Purity = 97.76%; *t*_R: 4.55 min (method 2).

Synthesis of 2-((4-(trifluoromethoxy)benzyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one
(2c)



Chemical Formula: C₁₆H₁₁F₃N₂O₂S

Exact Mass: 352.0493

Molecular Weight: 352.3312

The desired compound **2c** was obtained following the general procedure A (150 °C, 15min), as a white powder yielded 43% (136,80 mg, 0.39 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.44 (br. s, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 15.0, 7.4 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 7.7 Hz, 3H), 7.35 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 4.70 (s, 2H).

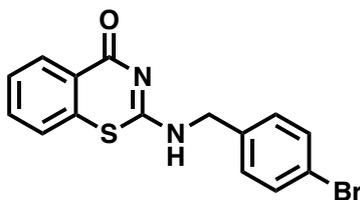
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 162.0, 147.5, 137.4, 132.9, 132.3, 129.5, 129.5 (2C), 127.7, 125.9, 122.9, 121.1(2C), 120.08 (q, *J* = 1.02 Hz, *J* = 2.04 Hz), 44.1.

¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆) δ -56.85.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 353.00 ; [2M+H]⁺ = 704.73; [M-H]⁻ = 350.87; *t*_R = 11.91 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 99.13%; and (λ₂₈₀): Purity = 96.95%; *t*_R: 4.90 min (method 2).

Synthesis of 2-((4-bromobenzyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazine-4-one (2d)



Chemical Formula: C₁₅H₁₁BrN₂OS
 Exact Mass: 345,98
 Molecular Weight: 347,23

To a solution of 1-(4-oxo -4H-benzo[e][1,3]thiazin-2-yl)guanidine (LMA94-lot3) (400.00 mg, 1.82 mmol, 1eq.) in acetic acid (4 mL), was added 4-bromobenzylamine (338.50 mg, 1.82 mmol, 1eq.). The reaction was heated under microwave irradiation at 150°C for 15 min. Then AcOH was removed under reduced pressure. Water was added, and the aqueous layer was extract with EtOAc (3x50 mL). After evaporation the grey powder was washed with a mixture of DCM/MeOH (95/5, v/v). The desired compound **2d** was obtain as a white powder yielded 18% (113 mg, 0.32 mmol).

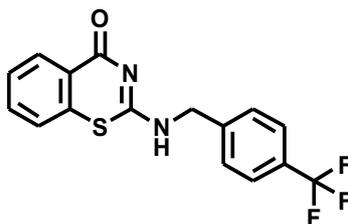
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.42 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 19.9, 7.3 Hz, 4H), 7.46 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.63 (s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 161.9, 137.4, 132.8, 132.4, 131.4(2C), 129.8(2C), 129.5, 127.7, 125.9, 122.8, 120.3, 44.2.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 346.87, 348.87; [M-H]⁻ = 345.00, 346.73; *t*_R = 11.57 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity > 99%; and (λ₂₈₀): Purity = 98.2%; *t*_R: 4.72 min (method 2).

Synthesis of 2-((4-(trifluoromethyl)benzyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (2e)

Chemical Formula: C₁₆H₁₁F₃N₂OS

Exact Mass: 336.0544

Molecular Weight: 336.3322

The desired compound **2e** was obtained following the general procedure A (150 °C, 15min) as a clear grey powder yielded 25% (152,60 mg, 0.45 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.50 (s, 1H), 8.21 (dd, *J* = 19.8, 7.7 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.59 (dt, *J* = 11.6, 7.2 Hz, 4H), 7.48 (dd, *J* = 15.5, 8.2 Hz, 1H), 4.76 (s, 2H).

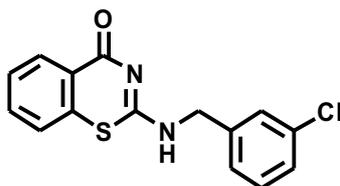
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 162.1, 142.8, 134.3, 132.8, 132.4, 130.1, 129.5, 128.1 (2C), 127.6, 125.9, 125.4, 125.3, 122.8, 44.34.

¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆) δ -60.87.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 337.07 and [2M+H]⁺ = 672.60; [M-H]⁻ = 334.93; *t*_R = 7.96 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 95.6%; *t*_R: 3.69 min (method 2).

Synthesis of 2-((3-chlorobenzyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (2f)

Chemical Formula: C₁₅H₁₁ClN₂OS

Exact Mass: 302.0281

Molecular Weight: 302.7760

The desired compound **2f** was obtained following the general procedure A (150 °C, 15min), as a white powder yielded 21% (115.70 mg, 0.38 mmol).

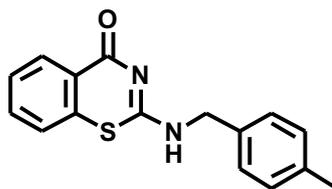
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.43 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.65 – 7.53 (m, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.36 (dd, *J* = 20.4, 12.9 Hz, 4H), 4.68 (s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 162.1, 140.5, 133.1, 132.8, 132.4, 130.4, 129.7, 127.7, 127.4, 127.2, 126.3, 125.9, 122.8, 44.2.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 303.07; [2M+H]⁺ = 604.60 [M+H]⁻ = 300.80; *t*_R = 11.42 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 99.31%; and (λ₂₈₀): Purity = 97.47%; *t*_R: 4.63 min (method 2).

Synthesis of 2-((3-methylbenzyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazine-4-one (2g)

Chemical Formula: C₁₆H₁₄N₂OS

Exact Mass: 282.0827

Molecular Weight: 282.3610

The desired compound **2g** was obtained following the general procedure A (150 °C, 15min), as a white powder yielded 45% (230,54 mg, 0.82 mmol).

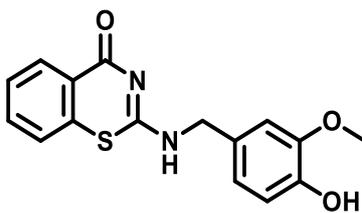
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.53 (br. s, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.61 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.62 (s, 2H), 2.28 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.7, 161.8, 136.5, 135.7, 134.7, 132.8, 132.4, 129.5, 129.0, 128.8, 127.7, 127.3, 125.9, 122.8, 44.6, 20.7.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 282.87 and [2M+H]⁺ = 564.73; *t*_R = 11.26 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 92.7%; *t*_R = 3.58 min (method 2).

Synthesis of 2-((4-hydroxy-3-methoxybenzyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one
(2h)



Chemical Formula: C₁₆H₁₄N₂O₃S

Exact Mass: 314.0725

Molecular Weight: 314.3590

The desired compound **2h** was obtained following the general procedure A (140 °C, 15min), as a white powder yielded 21% (61 mg, 0.19 mmol).

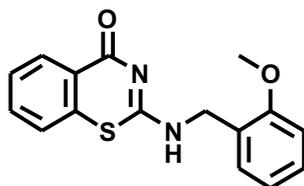
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.30 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.59 (ddd, *J* = 17.6, 10.6, 4.2 Hz, 3H), 7.46 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.52 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 161.6, 146.9, 146.5, 133.9, 132.9, 132.3, 130.3, 130.0, 129.5, 127.6, 125.8, 125.5, 122.9, 55.7, 44.5.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 314.93 and [2M+H]⁺ = 628.60; *t*_R = 9.65 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 99.4%; and (λ₂₈₀): Purity = 99.5%; *t*_R = 1.15 min (method 2).

Synthesis of 2-((2-methoxybenzyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (2i)

Chemical Formula: C₁₆H₁₄N₂O₂S

Exact Mass: 298.0776

Molecular Weight: 298.3600

The desired compound **2i** was obtained following the general procedure B (140 °C, 15min), as a beige powder yielded 52% (140 mg, 0.47 mmol).

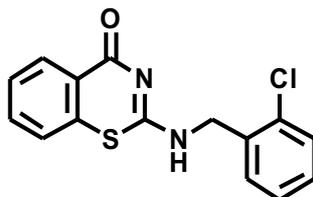
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.25 (br. s, 1H), 8.17 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.29 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 161.8, 156.9, 132.9, 132.3, 129.5, 128.7, 128.3, 127.6, 125.8, 125.1, 122.8, 120.2, 110.7, 55.4, 40.5.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 299.00 and [2M+H]⁺ = 596.73; *t*_R = 11.05 min.

HPLC (λ254): Purity = 97.93%; and (λ280): Purity = 95.47%; *t*_R: 4.42min (method 2).

2-((2-chlorobenzyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (2j)



Chemical Formula: C₁₅H₁₁ClN₂OS

Exact Mass: 302.0281

Molecular Weight: 302.7760

The desired compound **2j** was obtained following the general procedure B (140 °C, 15min), as a white powder yielded 69% (189.30 mg, 0.62 mmol).

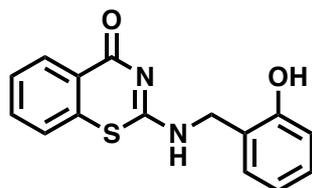
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.41 (br. s, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.65 – 7.60 (m, 1H), 7.58 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.52 – 7.45 (m, 2H), 7.44 – 7.39 (m, 1H), 7.38 – 7.31 (m, 2H), 4.72 (s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 167.9, 162.0, 134.8, 132.8, 132.4, 132.3, 129.5, 129.4, 129.3, 129.2, 127.7, 127.4, 125.9, 122.8, 42.9.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 303.07 and 305 [2M+H]⁺ = 604.60; *t_R* = 11.52 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 97.39%; *t_R*: 5.85 min (method 3).

Synthesis of 2-((2-hydroxybenzyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (2k)



Chemical Formula: C₁₅H₁₂N₂O₂S
 Exact Mass: 284,06
 Molecular Weight: 284,33

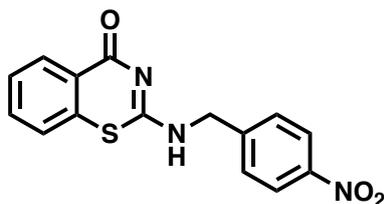
The desired compound **2k** was obtained following the general procedure B (140 °C, 15min), after a purification by flash chromatography eluted with a mixture of DCM/MeOH (9/1, v/v) as a white powder yielded 12% (31 mg, 0.11 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.76 (br. s, 1H), 9.30 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.63 – 7.58 (m, 1H), 7.55 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H3), 7.18 (d, *J* = 7.4 Hz), 7.14 – 7.08 (m, 1H), 6.84 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.78 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.57 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.8, 161.8, 147.1, 146.9, 132.9, 132.3, 129.5, 129.1, 128.5, 127.6, 125.8, 123.5, 122.8, 118.9, 40.7.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 284.93; [M-H]⁻ = 282.93; *t*_R = 10.27min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 96.50%; *t*_R: 5.49 min (method 3).

Synthesis of 2-((4-nitrobenzyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (**2I**)

Chemical Formula: C₁₅H₁₁N₃O₃S
 Exact Mass: 313,05
 Molecular Weight: 313,33

The desired compound **2I** was obtained following the general procedure B (140 °C, 15min), as a yellow powder yielded 3% (8.7mg, 0.03 mmol).

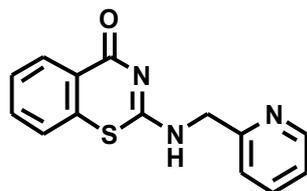
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.59 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.17 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.66 – 7.55 (m, 4H), 7.50 – 7.43 (m, 1H), 4.81 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 162.3, 146.7, 146.1, 132.7, 132.4, 129.5, 128.4 (2C), 127.8, 125.9, 123.6 (2C), 122.8, 44.2.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 314 and 626.67; [M+H]⁻ = 311.93 and 624.27; *t*_R = 10.72 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 97.5%; and (λ₂₈₀): Purity = 98.8%; *t*_R: 5.64 min (method 3).

Synthesis of 2-((pyridine-2-ylmethyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (2m)

Chemical Formula: C₁₄H₁₁N₃OS

Exact Mass: 269.0623

Molecular Weight: 269.3220

The desired compound **2m** was obtained following the general procedure B (140 °C, 15min), as a yellow powder yielded 41% (100.10 mg, 0.37 mmol).

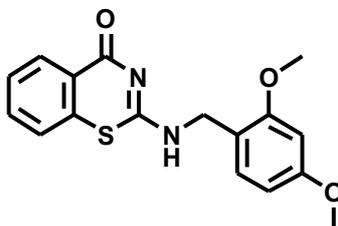
¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.51 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 8.34 – 8.29 (m, 1H), 7.82 (td, *J* = 7.7, 1.1 Hz, 1H), 7.65 – 7.60 (m, 1H), 7.49 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H), 7.36 – 7.30 (m, 1H), 4.89 (s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ 172.1, 165.8, 158.0, 150.0, 138.9, 134.9, 133.9, 131.1, 129.0, 126.7, 124.1, 123.9, 123.6, 68.1.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 332.93 and [M-H]⁻ = 330.87; *t*_R = 11.61 min.

HPLC (λ254): Purity = 95.60%; *t*_R: 4.79 min (method 3).

Synthesis of 2-((2-chloro-5-(trifluoromethyl)benzyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (2n)



Chemical Formula: C₁₇H₁₆N₂O₃S

Exact Mass: 328.0882

Molecular Weight: 328.3860

The desired compound **2n** was obtained following the general procedure B (130 °C, 15min), as a white powder yielded 12% (35 mg, 0.11 mmol).

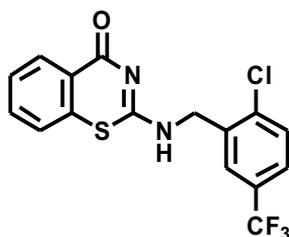
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.15 (br. s, 1H), 8.18 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.66 – 7.49 (m, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.17 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.50 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.52 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.74 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 161.5, 160.2, 158.0, 133.0, 132.2, 129.7, 129.5, 127.6, 125.8, 122.9, 117.2, 104.5, 98.4, 66.4, 55.5, 55.3.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 328.80 and [2M+H]⁺ = 656.60; *t*_R = 11.10 min.

HPLC (λ254): Purity > 97.44%; and (λ280): Purity > 96.16%; *t*_R: 5.75 min (method 3).

Synthesis of 2-((2-chloro-5-(trifluoromethyl)benzyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (2o)



Chemical Formula: C₁₆H₁₀ClF₃N₂OS

Exact Mass: 370.0154

Molecular Weight: 370.7742

The desired compound **2o** was obtained following the general procedure B (140 °C, 15min), after a purification on silica gel by flash chromatography eluted with a mixture of CH/EtOAc (100:0 to 50/50; v/v over 20min and 50/50 to 40/60; v/v for 5 min), as a white powder yielded 10% (33.00 mg, 0.09 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.43 (br. s, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 10.9, 3.9 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.48 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.80 (s, 2H).

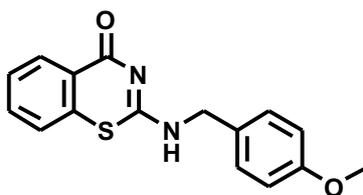
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.8, 162.1, 137.0, 136.5, 132.7, 132.4, 130.7, 129.6 (2C), 128.1, 127.8, 126.4, 125.9, 125.1, 122.7, 42.9.

¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO-*d*₆) δ -61.05.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 368.87 and 370.87 [M+H]⁻ = 370.93 and 373.00; *t*_R = 12.24 min.

HPLC (λ254): Purity > 99%; and (λ280): Purity > 99%; *t*_R: 4.99 min (method 2).

Synthesis of 2-((4-methoxybenzyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (2p)

Chemical Formula: C₁₆H₁₄N₂O₂S

Exact Mass: 298.0776

Molecular Weight: 298.3600

The desired compound **2p** was obtained following the general procedure B (150 °C, 15min), as a yellow powder yielded 49% (134 mg, 0.44 mmol).

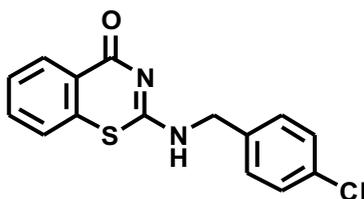
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.33 (br. s, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 10.9, 4.0 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.59 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 161.6, 158.5, 132.9, 132.3, 129.7, 129.5, 129.1 (2C), 127.6, 125.8, 122.9, 113.9(2C), 55.1, 44.4.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 298.93 and [2M+H]⁺ = 596.60; *t*_R = 10.74min.

HPLC (λ254): Purity = 96.85%; and (λ280): Purity = 97.94%; *t*_R: 4.22 min (method 2).

Synthesis of 2-((4-chlorobenzyl)amino)-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (2q)

Chemical Formula: C₁₅H₁₁ClN₂OS

Exact Mass: 302.0281

Molecular Weight: 302.7760

The desired compound **2q** was obtained following the general procedure B (140 °C, 15min), as a clear yellow powder yielded 78% (215 mg, 0.71 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.43 (br. s, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J* = 10.9, 4.0 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.95 (s, 4H), 4.65 (s, 2H).

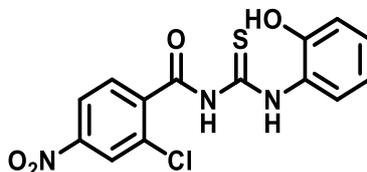
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 162.3, 146.7, 146.1, 132.7, 132.4, 129.5, 128.4 (2C), 127.8, 125.9, 123.6 (2C), 122.8, 44.2.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 302.93 and 604.53; [M+H]⁻ = 300.93; *t*_R = 11.57 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity > 99%; and (λ₂₈₀): Purity = 95.9%; *t*_R: 5.91 min (method 3).

2.3 Family C

Synthesis of 2-chloro-N-((2-hydroxyphenyl)carbamoithioyl)-4-nitrobenzamide (15a)



Chemical Formula: C₁₄H₁₀ClN₃O₄S

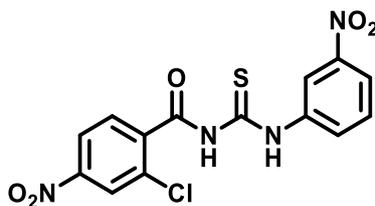
Exact Mass: 351.0081

Molecular Weight: 351.7610

A solution of 2-chloro-4-nitrobenzoic acid (4.55 mmol, 1.00 g, 1 eq.) in thionyl chloride (5ml) was heated under reflux (76°C) for 1h30. SOCl₂ was removed under reduced pressure, then a co-evaporation with toluene was repeated twice. The intermediate was used further without purification. To a solution of hetero-arylchloride corresponding in acetone (30 ml) was added the potassium isothiocyanate (KSCN) (4.55 mmol, 441.70 mg, 1 eq.). The reaction was stirred under reflux (56°C) for 30min. After the completion of the reaction, 2-aminophenol (9.92 mmol, 1.40 mg, 1 eq.) was added and the reaction was stirred under reflux (56 °C) for overnight. A precipitate appeared, the reaction was cold down to room temperature and pour into ice-cold-water. The clear brown precipitate was filtered and recrystallized in EtOH. The desired compound **15a** was obtain as beige crystals yielded 50% (2.27 mmol, 798.70 mg).

¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ 12.57 (s, 1H), 12.05 (s, 1H), 10.33 (s, 1H), 8.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.09 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 8.07 – 8.01 (m, 2H), 8.00 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H).

Synthesis of 2-chloro-4-nitro-N-((3-nitrophenyl)carbamothiol)benzamide (15b)

Chemical Formula: C₁₄H₉ClN₄O₅S

Exact Mass: 379.9982

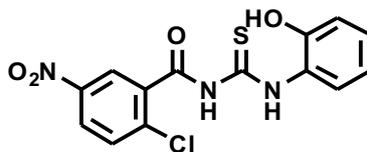
Molecular Weight: 380.7590

A solution of 2-chloro-4-nitrobenzoic acid (9.92 mmol, 2.00 g, 1 eq.) in thionyl chloride (5ml) was heated under reflux (76°C) for 1h30. SOCl₂ was removed under reduced pressure, then a co-evaporation with toluene was repeated twice. The intermediate was used further without purification. To a solution of hetero-arylchloride corresponding in acetone (30 ml) was added KSCN (9.92 mmol, 964.03 mg, 1 eq.). The reaction was stirred under reflux (56°C) for 30min. After the completion of the reaction, 3-nitroaniline (9.92 mmol, 1.40 mg, 1 eq.) was added and the reaction was stirred under reflux (56 °C) for overnight. A precipitate appeared, the reaction was cold down to room temperature and pour into ice-cold-water. The clear yellow precipitate was filtered and recrystallized in EtOH. The desired compound **15b** was obtain as a yellow powder yielded 42% (4.17 mmol, 1.59 mg).

¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ 12.37 (s, 1H), 12.27 (s, 1H), 8.73 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.31 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 8.16 – 8.12 (m, 1H), 8.06 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.72 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 179.0, 165.7, 148.9, 147.6, 139.9, 139.1, 131.4, 131.2, 130.5, 130.1, 124.5, 122.4, 121.2, 119.4.

2-chloro-N-((2-hydroxyphenyl)carbamoithioyl)-5-nitrobenzamide (15c)

Chemical Formula: C₁₄H₁₀ClN₃O₄S

Exact Mass: 351.0081

Molecular Weight: 351.7610

2-chloro-5-nitrobenzoic acid (2.00 g, 9.09 mmol, 1eq) was dissolved in SOCl₂ (5mL), and stirred under reflux (76°C) for overnight. After the reaction cooled down to room temperature, SOCl₂ was removed under reduced pressure and the residue was then co-evaporated. The crude residue was dissolved in acetone and KSCN (883 mg, 9.09 mmol, 1eq) was added. The reaction mixture was stirred under reflux (56°C). After the completion of reaction, acetone was removed under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography eluted with a mixture of DCM/MeOH (9/1, v/v). The desired isothiocyanate compound was obtained as a beige powder yielded 50%. Then the isothiocyanate compound (500.00 mg, 2.06 mmol, 1eq.) was dissolved in acetone, and 2-aminophenol (224.8 mg, 2.06 mmol, 1eq.) was added to the reaction mixture for overnight under reflux. After completion of reaction a filtration was down and the yellow powder was washed several times with acetone, followed by Et₂O. The desired compound **15c** was obtained as a clear yellow powder yielded 60% (435.2 mg, 1.24 mmol).

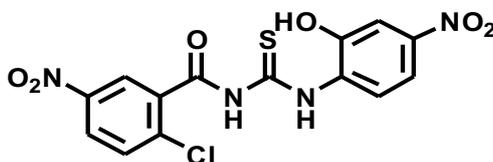
R_f = 0.89 (CH₂Cl₂/MeOH; 9/1; v/v)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.60 (s, 1H), 12.08 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 8.66 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 8.61 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.36 (dd, *J* = 8.9, 2.8 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.09 (td, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 6.96 (dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 6.88 – 6.83 (m, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 176.4, 165.3, 148.6, 145.9, 137.1, 135.4, 131.1, 126.5, 126.5, 125.8, 124.7, 122.4, 118.4, 115.1.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 99.4 %; and (λ₂₈₀): Purity = 98.5 %; *t_R*: 6.07 min (method 2).

Synthesis of 2-chloro-N-((2-hydroxy-4-nitrophenyl)carbamothioyl)-5-nitrobenzamide
(15d)



Chemical Formula: C₁₄H₉ClN₄O₆S

Exact Mass: 395.9931

Molecular Weight: 396.7580

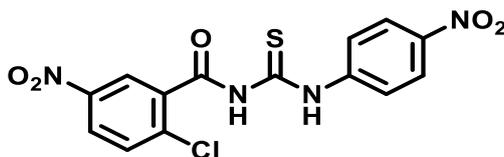
To a solution of 2-chloro-5-nitrobenzoyl isothiocyanate (200.00 mg, 0.82 mmol, 1eq.) in acetone was added 2-amino-5-nitrophenol (126.4 mg, 0.82 mmol, 1eq.) and the reaction mixture was stirred under reflux for overnight. After the completion of the reaction, a filtration was down. The yellow powder was washed several times with acetone, followed by Et₂O. The desired compound **15d** was obtained as a yellow powder yielded 51% (156 mg, 0.42 mmol).

R_f = 0.51 (CH/EtOAc; 1/1; v/v)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.96 (s, 1H), 12.35 (s, 1H), 11.85 (s, 1H), 9.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.37 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 178.61, 178.17, 166.59, 146.10, 143.67, 133.00, 131.60, 126.70, 124.69, 121.28, 118.26, 115.57, 108.89, 106.96.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 97.4 %; t_R: 3.79 min (method 2).

Synthesis of 2-chloro-N-(4-nitrophenyl)carbamoithioyl)-5-nitrobenzamide (**15e**)¹⁴⁰Chemical Formula: C₁₄H₉ClN₄O₅S

Exact Mass: 379.9982

Molecular Weight: 380.7590

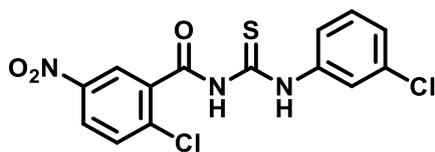
2-chloro-5-nitrobenzoic acid (2.00 g, 9.09 mmol, 1eq) was dissolved in SOCl₂ (5mL), and stirred under reflux (76°C) for overnight. After the reaction cooled down to room temperature, SOCl₂ was removed under reduced pressure and the residue was then co-evaporated with toluene and used further without purification. The residue was dissolved in acetone and KSCN (883 mg, 9.09 mmol, 1eq) was added. The reaction mixture was stirred under reflux (56°C). After the completion of the reaction, 4-nitroaniline (170.79 mg, 1.24 mmol, 1eq.) was added. The reaction mixture was stirred under reflux for overnight. Then, a filtration was down and the precipitated was washed several times with acetone, followed by Et₂O. The desired compound **15e** was obtained as a yellow powder yielded 10% (49 mg, 0.12 mmol).

R_f = 0.86 (CH/EtOAc; 1/1; v/v)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.59 (br. s, 1H), 11.58 (br. s, 1H), 8.85 (d, *J* = 28.8 Hz, 1H), 8.45 (d, *J* = 24.4 Hz, 1H), 8.31 (s, 2H), 8.09 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177.6, 171.5, 149.5, 146.4, 144.7, 134.7, 128.1, 125.8 (2C), 124.6(2C), 123.6, 122.3, 118.7.

Synthesis of 2-chloro-N-((3-chlorophenyl)carbamoithioyl)-5-nitrobenzamide (15f)

Chemical Formula: C₁₄H₉Cl₂N₃O₃S

Exact Mass: 368.9742

Molecular Weight: 370.2040

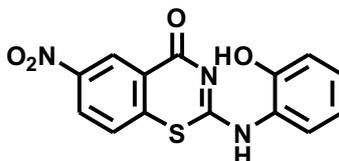
To a solution of 2-chloro-5-nitrobenzoyl isothiocyanate (200.00 mg, 0.82 mmol, 1eq.) in acetone was added 3-chloroaniline (104.6 mg, 0.82 mmol, 1eq.) and the reaction was stirred under reflux for overnight. After the completion of the reaction a filtration was down. The precipitate was washed several times with acetone, followed by Et₂O. The desired compound **15f** was obtained as a white powder yielded 46% (140.5 mg, 0.38 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.44 (s, 1H), 11.50 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.76 (d, *J* = 49.9 Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.00 (d, *J* = 44.2 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 178.7, 165.2, 145.9, 139.3, 137.1, 135.2, 132.7, 131.2, 130.4, 126.6, 126.4, 124.6, 124.2, 123.3.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 94.5 %; *t*_R: 3.87 min (method 2).

Synthesis of 2-((2-hydroxyphenyl)amino)-6-nitro-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (3c)

Chemical Formula: C₁₄H₉N₃O₄S

Exact Mass: 315.0314

Molecular Weight: 315.3030

To a solution of 2-chloro-*N*-((2-hydroxyphenyl)carbamothioyl)-5-nitrobenzamide (200mg, 0.57 mmol, 1eq.) in DMF (5 mL) was added K₂CO₃ (39 mg, 0.57 mmol, 1eq.). The reaction mixture was heated at 80°C for 3 hours. After the completion of the reaction, DMF was evaporated under reduced pressure. Then NH₄Cl was added to the residue and an extraction was done with EtOAc (2x50 mL). The organic layers were combined and dried with brine (NaCl saturated), follow by MgSO₄, and concentrated under reduced pressure to afford a yellow powder.

The crude residue was purified on silica gel by flash chromatography column eluted with CH/EtOAc, (1/1, v/v) and the desired pure compound **3c** was obtained pure as a yellow clear powder (22.10 mg, 0.07 mmol, 12%)

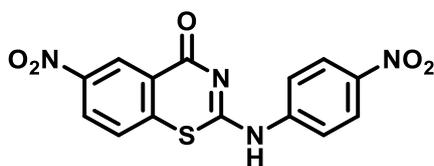
R_f = 0.46 (CH/EtOAc; 1/1; v/v)

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.97 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.28 (dd, *J* = 9.3, 2.6 Hz, 1H), 7.42 – 7.36 (m, 2H), 7.13 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.07 – 7.00 (m, 2H), 6.72 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H).

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 316.00 ; [M+H]⁻ = 313.87 ; t_R = 10.73 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 98.5 %; and (λ₂₈₀): Purity = 98.9 %; t_R: 4.43 min (method 2).

Synthesis of 2-((2-hydroxy-4-nitrophenyl)amino)-6-nitro-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (**3e**)¹⁴⁰



Chemical Formula: C₁₄H₈N₄O₅S

Exact Mass: 344.0215

Molecular Weight: 344.3010

To a solution of 2-chloro-*N*-((4-nitrophenyl) carbamothioyl)-5-nitrobenzamide (200.00 mg, 0.53 mmol, 1eq.) in DMF (5 mL) was added LiH (4.22 mg, 0.53 mmol, 1eq.). The reaction mixture was stirred under reflux for overnight. After the completion of the reaction, DMF was evaporated under reduced pressure. Then HCl 1M was added until pH = 3. An extraction was done EtOAc (2x50 mL). The organic layers were combined and dried with brine, followed by MgSO₄. The combined organic layers were concentrated under reduced pressure. A purification was done on silica gel by flash chromatography column eluted with CH/EtOAc, (1/1, v/v) and the desired pure compound **3e** was obtained as a yellow clear powder yielded 24% (43.80 mg, 0.13 mmol).

R_f = (CH/AcOEt, v/v)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.74 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.45 (dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.04 – 7.95 (m, 2H), 7.68 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H).

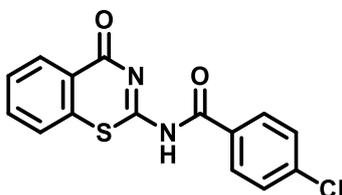
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.0, 152.4, 146.6, 141.7, 141.3, 137.7, 134.1, 127.9, 125.7, 124.5(2C), 123.0, 122.3 (2C).

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 344.93 ; [M+H]⁻ = 342.93; *t*_R = 11.47 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity = 99.3 % and (λ₂₈₀): Purity = 99.5 %; *t*_R: 4.81 min (method 2).

2.4 Family D

Synthesis of 4-chloro-N-(4-oxo-4H-benzo[e][1,3]thiazin-2-yl)benzamide (32a) ¹⁴⁷



Chemical Formula: C₁₅H₉ClN₂O₂S

Exact Mass: 316.0073

Molecular Weight: 316.7590

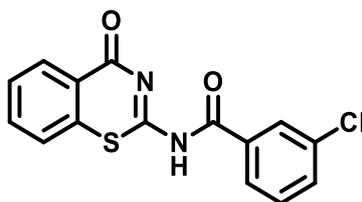
To a solution of 2-amino-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (200 mg, 1.10 mmol, 1eq.) in pyridine (5-10 mL), was added slowly 4-chlorobenzoyl chloride (192.50 mg, 1.10 mmol, 1.1 eq.). The reaction was stirred under reflux for 2 hours. After the completion of the reaction, ice-cold water was added to the reaction mixture and a white precipitate appeared. A filtration was done, the precipitate was washed with cold water several times (30 mL), followed by Et₂O. Then a recrystallisation was done in DMF to afford the desired compound **32a** as a white powder yielded 19% (66.4 mg, 0.21 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.83 (br. s, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.96 – 7.86 (m, 2H), 7.79 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 7.72 – 7.65 (m, 4H).

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 316.73 and 318.93 [M-H]⁻ = 314.84 and 316,75; *t*_R = 13.08 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity > 99%; and (λ₂₈₀): Purity > 99%; *t*_R: 4.99 min (method 2).

Synthesis of 3-chloro-N-(4-oxo-4H-benzo[e][1,3]thiazin-2-yl)benzamide (32b)

Chemical Formula: C₁₅H₉ClN₂O₂S

Exact Mass: 316.0073

Molecular Weight: 316.7590

The 2-amino-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (200 mg, 1.10 mmol, 1 eq.) was suspended in pyridine (1mL) for 10min. Then 3-chlorobenzoyl chloride (192.50 mg, 1.10 mmol, 1 eq.) was added slowly. The reaction mixture was stirred under reflux for 16 hours. After the completion of the reaction, the mixture was allowed to cool down at room temperature and HCl 3M was added, until pH=3. The reaction mixture was extracted with EtOAc (2x50 mL). The organic layers were combined and dried with brine follow by MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure.

A purification on flash chromatography eluted with a mixture of CH/EtOAc (1/1; v/v) afford the desired pure compound **32b** as a white powder yielded 27% (94.4 mg, 0.30 mmol)

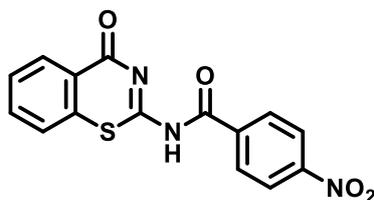
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.83 (br. s, 1H), 8.27 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.60 (dt, *J* = 15.5, 6.0 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.4, 164.3, 145.6, 142.3, 134.4, 134.2, 133.3, 132.7, 130.6, 129.2, 129.1, 128.6, 127.8, 126.6, 123.8.

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 316.93 and [M-H]⁻ = 314.73; *t*_R = 13.14 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity >99 % and (λ₂₈₀): Purity >99 %; *t*_R: 4.08 min (method 3).

Synthesis of 4-nitro-N-(4-oxo-4H-benzo[e][1,3]thiazin-2-yl)benzamide (32c)

Chemical Formula: C₁₅H₉N₃O₄S

Exact Mass: 327.0314

Molecular Weight: 327.3140

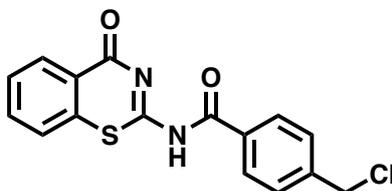
To a solution of 2-amino-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (200 mg, 1.10 mmol, 1 eq.) in pyridine, was added the 4-nitrobenzoyl chloride (174.40 mg, 1.10 mmol, 1 eq.). The reaction was stirred under microwave irradiation at 100 °C for 15 min. Then add HCl 3M to the mixture until pH = 6-7. An extraction was done with EtOAc (2 x 50mL). The organic layers were combined, dried with MgSO₄, and concentrated under reduced pressure to afford the desired compound **32c** as a beige powder yielded 61% (222.5 mg, 0.68 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.02 (s, 1H), 8.39 (s, 4H), 8.28 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.85 – 7.80 (m, 2H), 7.63 (ddd, *J* = 8.2, 5.8, 2.7 Hz, 1H).

LC-MS-ESI: [M+H]⁺ = 327.87 ; [M-H]⁻ = 325.87 ; *t*_R = 12.30 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity > 99 %; *t*_R: 3.75 min (λ₂₈₀): Purity > 99 %; *t*_R: 3.76 min (method 2).

Synthesis of 4-(chloromethyl)-N-(4-oxo-4H-benzo[e][1,3]thiazin-2-yl)benzamide
(32d)



Chemical Formula: C₁₆H₁₁ClN₂O₂S
Exact Mass: 330,02
Molecular Weight: 330,79

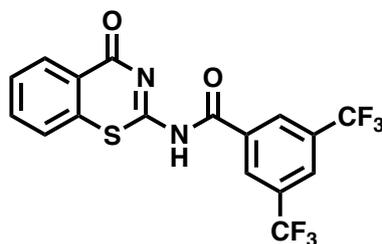
To a solution of 2-amino-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one (200 mg, 1.10 mmol, 1 eq.) in pyridine, was added the 4-(chloromethyl)benzoyl chloride (211.70 mg, 1.10 mmol, 1 eq.). The reaction was stirred under microwave irradiation at 100 °C for 15 min. Then HCl 3M was added to the reaction mixture until pH = 6-7. An extraction was done with EtOAc (2 x 50mL). The organic layers were dried with MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford the desired compound **32d** as a white powder yielded 75% (273.9 mg; 0.83 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ δ 12.44 (br. s, 1H), 8.25 (dd, *J* = 12.4, 8.3 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.85 (t, *J* = 9.3 Hz, 2H).

LC-MS-ESI: [M-H]⁻ = 328.70 and 331.10; *t*_R = 12.59 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity 95.2% ; *t*_R: 4.27 min (method 2).

Synthesis of *N*-(4-oxo-4*H*-benzo[*e*][1,3]thiazin-2-yl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide (**32e**)



Chemical Formula: C₁₇H₈F₆N₂O₂S
 Exact Mass: 418,02
 Molecular Weight: 418,31

To a solution of 2-amino-4*H*-benzo[*e*][1,3]thiazin-4-one (200 mg, 1.10 mmol, 1 eq.) in pyridine, was added the 3,5-bis(trifluoromethyl)benzoyl chloride (309.80 mg, 1.10 mmol, 1 eq.). The reaction was stirred under microwave irradiation at 100 °C for 15 min. Then HCl 3M was added to the reaction mixture until pH = 6-7. An extraction was done with EtOAc (2 x 50mL). The organic layers were dried with MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford the desired compound **32e** as a white powder yielded 23% (106.0 mg; 0.25 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.07 (br. s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.34 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.98 – 7.93 (m, 1H), 7.73 (dd, *J* = 11.7, 4.6 Hz, 1H).

LC-MS-ESI: [M-H]⁻ = 416.90 ; *t*_R = 17.25 min.

HPLC (λ₂₅₄): Purity >99%; *t*_R: 6.00 min (method 2).

3. Biological assays

Stability assay

1 mg of the previous synthesized compound were dissolved in 200 μ L of DMSO, to have a final concentration of 10% of DMSO for each sample. After 10 min stirring at room temperature, 1.8 mL of appropriated buffer pH (pH= 1, 7.4, 8.2) was added into the vial.

Stability was measured by HPLC analysis from $t = 0$ to $t = 7$ days and the results were compared with the reference HPLC spectrum of each concerned compound.

Cell viability assay

Renal cancer cells (786-O, RCC4, and A498) were plated at 3×10^3 cells per well in 96-well plate in 200 μ L of media. Cells were treated with the tested compounds at different concentrations one day after seeding. After 48 h of incubation at 37 °C, the culture media was removed, fifty microliters of sodium 3'-[1-phenylaminocarbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate (XTT) reagent from Roche® was added to each well and the plates were incubated at 37 °C for 1–2 h. Then, optical Density (OD) was measured with a microplate reader at 490 nm giving the amount of formazan dye presents in each well, directly correlated with the number of metabolically active cells reflecting cell proliferation and viability. Each assay was performed in quadruplicate.

Boyden chamber assay

CXCL7 or CXCL5-stimulated chemotaxis assays were monitored using modified Boyden chambers containing polycarbonate membranes (8- μ m pores, Transwell; Corning, Sigma). HUVECs were seeded into the upper side of the filters, were treated with the inhibitors at different concentrations, and chambers were placed on 24-well plates containing CXCL7 or CXCL5 (50ng/ml). Cell migration was followed for 24 h at 37°C in 5% CO₂. Migratory cells on the lower membrane surface were fixed in 3% paraformaldehyde, stained with 0.1% crystal violet, and the OD at 595 nm was measured for detecting cell adhesion.

Bibliographie

- (1) Torre, L. A.; Siegel, R. L.; Ward, E. M.; Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends - An Update. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2016**, *25* (1), 16–27.
- (2) Roy, P. S.; Saikia, B. J. Cancer and Cure: A Critical Analysis. *Indian J. Cancer* **2016**, *53* (3), 441–442.
- (3) Méjean, A.; Leuret, T. Prise En Charge Du Cancer Rénal Métastatique. *Prog. en Urol.* **2008**, *18* (7), 298–308.
- (4) Sotiropoulou, P. A.; Christodoulou, M. S.; Silvani, A.; Herold-Mende, C.; Passarella, D. Chemical Approaches to Targeting Drug Resistance in Cancer Stem Cells. *Drug Discov.* **2014**, *19* (10), 1547–1562.
- (5) Bonnichon, P.; Berger, J. P.; Bonni, N.; Fontaine, M.; Pion-Graff, J. Histoire Du Cancer et de La Chimiothérapie Avant La Chimiothérapie. *Hist. Sci. Med.* **2014**, *48* (4), 469–474.
- (6) Wang, J. J.; Lei, K. F.; Han, F. Tumor Microenvironment: Recent Advances in Various Cancer Treatments. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2018**, *22* (12), 3855–3864.
- (7) Ledford, H. The Poisonous History of Chemotherapy. In *Nature*; **2020**, 585, 346–347.
- (8) Chabner, B. A.; Jr, T. G. R. Chemotherapy and the War on Cancer. *Nat. Rev.* **2005**, *5*.
- (9) Baudino, T. A. Targeted Cancer Therapy : The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2015**, *12*, 3–20.
- (10) Pérez-Herrero, E.; Fernández-Medarde, A. Advanced Targeted Therapies in Cancer: Drug Nanocarriers, the Future of Chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *93*, 52–79.
- (11) Pernin, V.; Mégnin-Chanet, F.; Pennaneach, V.; Fourquet, A.; Kirova, Y.; Hall, J. Inhibiteurs de PARP et Radiothérapie: Rationnel et Perspectives Pour Une Utilisation En Clinique. *Cancer/Radiothérapie* **2014**, *18* (8), 790–798.
- (12) Schreiber, V.; Illuzzi, G.; Héberlé, E.; Dantzer, F. From Poly(ADP-Ribose) Discovery to PARP Inhibitors in Cancer Therapy. *Bull. Cancer* **2015**, *102* (10), 863–873.
- (13) Costello, L. Double-Barreled Gun: Combination of PARP Inhibitor with Conventional Chemotherapy. *Physiol. Behav.* **2019**, *176* (5), 139–148.
- (14) Ronco, C.; Martin, A. R.; Demange, L.; Benhida, R. ATM, ATR, CHK1, CHK2 and WEE1 Inhibitors in Cancer and Cancer Stem Cells. *Medchemcomm.* **2017**, *8* (2), 295–319.
- (15) Lee, Y. T.; Tan, Y. J.; Oon, C. E. Molecular Targeted Therapy: Treating Cancer with Specificity. *European Journal of Pharmacology.* **2018**, 188–196.
- (16) Daniel E Shumer, N. J. N. N. P. S. Inhibitors of Protein-Protein Interactions (PPIs): An Analysis of Scaffold Choices and Buried Surface Area. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *44*, 75–86.
- (17) Maximiano, S.; Magalhães, P.; Guerreiro, M. P.; Morgado, M. Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. *BioDrugs.* **2016**, 75–86.
- (18) Claudiani, S.; Apperley, J. F. The Argument for Using Imatinib in CML. *Hematol.* **2018**, *1*, 161–167.
- (19) Pagliaro, L.; Felding, J.; Audouze, K.; Nielsen, S. J.; Terry, R. B.; Krog-Jensen, C.; Butcher, S. Emerging Classes of Protein-Protein Interaction Inhibitors and New Tools for Their Development. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8* (4), 442–449.
- (20) Lacouture, M.; Sibaud, V. Toxic Side Effects of Targeted Therapies and Immunotherapies Affecting the Skin, Oral Mucosa, Hair, and Nails. *American Journal of Clinical Dermatology.*

- 2018**, 31–39.
- (21) Lin, J. J.; Shaw, A. T. Resisting Resistance: Targeted Therapies in Lung Cancer. *Trends Cancer* **2016**, 2 (7), 350–364.
 - (22) Helmy, K. Y.; Patel, S. A.; Nahas, G. R.; Rameshwar, P. Cancer Immunotherapy: Accomplishments to Date and Future Promise. *Therapeutic Delivery*. **2013**, 1307–1320.
 - (23) Abbott, M.; Ustoyev, Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Seminars in Oncology Nursing*. **2019**, p 150923.
 - (24) Dubois, M.; Ardin, C.; André, F.; Scherpereel, A.; Mortier, L. L'immunothérapie, Une Révolution En Oncologie - Revue de l'efficacité Des Inhibiteurs de Points de Contrôle Immunitaire. *Medecine sciences : M/S*. **2019**, 937–945.
 - (25) Couzin-Frankel, J. Cancer Immunotherapy. *Science*. **2013**, 1432–1433.
 - (26) Geromichalos, G. D.; Alifieris, C. E.; Geromichalou, E. G.; Trafalis, D. T. Overview on the Current Status on Virtual High-Throughput Screening and Combinatorial Chemistry Approaches in Multi-Target Anticancer Drug Discovery; Part II. *J. B.U.ON*. **2016**, 21 (6), 1337–1358.
 - (27) Chen, J.-N. Editorial: Multi-Target Drug Discovery - Part II. *Curr. Top. Med. Chem*. **2017**, 17 (28), 3081–3083.
 - (28) Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. *J. Med. Chem*. **2005**, 48 (21), 6523–6543.
 - (29) Zhou, J.; Jiang, X.; He, S.; Jiang, H.; Feng, F.; Liu, W.; Qu, W.; Sun, H. Rational Design of Multitarget-Directed Ligands: Strategies and Emerging Paradigms. *J. Med. Chem*. **2019**, 62 (20), 8881–8914.
 - (30) Aggarwal, B. B.; Shishodia, S.; Sandur, S. K.; Pandey, M. K.; Sethi, G. Inflammation and Cancer: How Hot Is the Link? *Biochem. Pharmacol*. **2006**, 72 (11), 1605–1621.
 - (31) Wolf, M.; Albrecht, S.; Märki, C. Proteolytic Processing of Chemokines: Implications in Physiological and Pathological Conditions. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. **2008**, 40, 1185–1198.
 - (32) Ward, P. A.; Lentsch, A. B. The Acute Inflammatory Response and Its Regulation. *Am. Med. Assoc*. **1999**, 134, 666–669.
 - (33) Varela, M. L.; Mogildea, M.; Moreno, I.; Lopes, A. Acute Inflammation and Metabolism. *Inflammation*. **2018**, 1115–1127.
 - (34) Larsen, G. L.; Henson, P. M. Mediators of Inflammation. *Annual review of immunology*. **1983**, 335–359.
 - (35) Mantovani, A. Molecular Pathways Linking Inflammation and Cancer. *Curr. Mol. Med*. **2010**, 10 (4), 369–373.
 - (36) Inflammation and cancer: a multifaceted link. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. **2010**, 14, 263-268.
 - (37) Aoki, T.; Narumiya, S. Prostaglandins in Chronic Inflammation. In *Chronic Inflammation*. **2016**, 3–17.
 - (38) Korniluk, A.; Koper, O.; Kemon, H.; Dymicka-Piekarska, V. From Inflammation to Cancer. *Irish Journal of Medical Science*. **2017**, 57–62.
 - (39) Risau, W. Mechanisms of Angiogenesis. *Nature* **1997**, 386, 671–674.
 - (40) Geudens, I.; Gerhardt, O. Coordinating Cell Behaviour during Blood Vessel Formation. *Development* **2011**, 138 (21), 4569–4583.
 - (41) Marneros, A. G.; Fan, J.; Yokoyama, Y.; Gerber, H. P.; Ferrara, N.; Crouch, R. K.; Olsen, B. R.

- Vascular Endothelial Growth Factor Expression in the Retinal Pigment Epithelium Is Essential for Choriocapillaris Development and Visual Function. **2005**, *167* (5), 1451–1459.
- (42) Olsson, A.; Dimberg, A.; Kreuger, J.; Claesson-welsh, L. REVIEWS VEGF Receptor Signalling — in Control of Vascular Function. *Nat. Rev.* **2006**, *7*, 359–371.
- (43) Apte, R. S.; Chen, D. S.; Ferrara, N.; Sciences, V.; View, M.; Diego, S.; Diego, S.; Diego, S. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* **2020**, *176* (6), 1248–1264.
- (44) Sun, T.; Yang, Y.; Luo, X.; Cheng, Y.; Zhang, M.; Wang, K.; Ge, C. Inhibition of Tumor Angiogenesis by Interferon- γ by Suppression of Tumor-Associated Macrophage Differentiation. *Oncol. Res.* **2013**, *21* (5), 227–235.
- (45) Lawler, P. R.; Lawler, J. Molecular Basis for the Regulation of Angiogenesis by Thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2* (5), 1–14.
- (46) Jendraschak, E.; Sage, E. H. Regulation of Angiogenesis by SPARC and Angiostatin : Implications for Tumor Cell Biology. *cancer Biol.* **1996**, *7*, 139–146.
- (47) Matsumoto, G.; Hirohata, R.; Hayashi, K.; Sugimoto, Y.; Kotani, E. Biomaterials Control of Angiogenesis by VEGF and Endostatin-Encapsulated Protein Microcrystals and Inhibition of Tumor Angiogenesis. *Biomaterials* **2014**, *35* (4), 1326–1333.
- (48) Michalczyk, E. R.; Chen, L.; Fine, D.; Zhao, Y.; Mascarinas, E.; Grippo, P. J.; Dipietro, L. A. Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) as a Regulator of Wound Angiogenesis. *Nature* **2018**, 1–13.
- (49) Tobelem, G. L'angiogenèse Tumorale. *Med. Sci. (Paris)*. **1990**, *6*, 426–432.
- (50) Denis Gingras ; Richard Bélivieux. L'angiogenèse Tumorale : Une Nouvelle Cible Thérapeutique Anticancéreuse. *Med. Sci. (Paris)*. **1997**, *13*, 1428–1435.
- (51) Matsumoto, K.; Ema, M. Roles of VEGF-A Signalling in Development, Regeneration, and Tumours. *J. Biochem.* **2014**, *156* (1), 1–10.
- (52) Carmeliet, P.; Jain, R. K. Angiogenesis in Cancer and Other Diseases. *Nature* **2000**, *407*, 249–257.
- (53) Martin, A. R.; Ronco, C.; Demange, L.; Benhida, R. Hypoxia Inducible Factor Down-Regulation, Cancer and Cancer Stem Cells (CSCs): Ongoing Success Stories. *Medchemcomm* **2017**, *8* (1), 21–52.
- (54) J. FOLKMAN. Tumor Angiogenesis Therapeutic Implications. *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182–1186.
- (55) Gerstner, E. R.; Emblem, K. E.; Chang, K.; Vakulenko-Lagun, B.; Yen, Y. F.; Beers, A. L.; Dietrich, J.; Plotkin, S. R.; Catana, C.; Hooker, J. M.; Duda, D. G.; Rosen, B.; Kalpathy-Cramer, J.; Jain, R. K.; Batchelor, T. Bevacizumab Reduces Permeability and Concurrent Temozolomide Delivery in a Subset of Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26* (1), 206–212.
- (56) Housman, G.; Byler, S.; Heerboth, S.; Lapinska, K.; Longacre, M.; Snyder, N.; Sarkar, S. Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers (Basel)*. **2014**, *6* (3), 1769–1792.
- (57) Giuliano, S.; Guyot, M.; Grépin, R.; Pagès, G. The ELR+CXCL Chemokines and Their Receptors CXCR1/CXCR2: A Signaling Axis and New Target for the Treatment of Renal Cell Carcinoma. *Oncoimmunology* **2014**, *3* (4), 8–11.
- (58) Grepin, R.; Guyot, M.; Giuliano, S.; Boncompagni, M.; Ambrosetti, D.; Chamorey, E.; Scoazec, J. Y.; Negrier, S.; Simonnet, H.; Pages, G. The CXCL7/CXCR1/2 Axis Is a Key Driver

- in the Growth of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* **2014**, *74* (3), 873–883.
- (59) Dufies, M.; Grytsai, O.; Ronco, C.; Camara, O.; Ambrosetti, D.; Hagege, A.; Parola, J.; Mateo, L.; Ayrault, M.; Giuliano, S.; Grépin, R.; Lagarde, N.; Montes, M.; Auberger, P.; Demange, L.; Benhida, R.; Pagès, G. New CXCR1/CXCR2 Inhibitors Represent an Effective Treatment for Kidney or Head and Neck Cancers Sensitive or Refractory to Reference Treatments. *Theranostics* **2019**, *9* (18), 5332–5346.
- (60) Ha, H.; Debnath, B.; Neamati, N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics* **2017**, *7* (6), 1543–1588.
- (61) Le, Y.; Zhou, Y.; Iribarren, P.; Wang, J. Chemokines and Chemokine Receptors: Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease. *Cell. Mol. Immunol.* **2004**, *1* (2), 95–104.
- (62) Ha, H.; Debnath, B.; Neamati, N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics* **2017**, *7* (6), 1543–1588.
- (63) Rosenkilde, M. M.; Schwartz, T. W. The Chemokine System - A Major Regulator of Angiogenesis in Health and Disease. *Apmis* **2004**, *112*, 481–495.
- (64) Baggiolini, M. CXCL8 - the First Chemokine. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 6–8.
- (65) Sparmann, A.; Bar-Sagi, D. Ras-Induced Interleukin-8 Expression Plays a Critical Role in Tumor Growth and Angiogenesis. *Cancer Cell* **2004**, *6* (5), 447–458.
- (66) Lugano, R.; Ramachandran, M.; Dimberg, A. Tumor Angiogenesis : Causes , Consequences , Challenges and Opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77* (9), 1745–1770.
- (67) Holmes, W. E.; Lee, J.; Kuang, W. J.; Rice, G. C.; Wood, W. I. Structure and Functional Expression of a Human Interleukin-8 Receptor. *Science.* **1991**, *253* (5025), 1278–1280.
- (68) Campbell, L. M.; Maxwell, P. J.; Waugh, D. J. J. *Rationale and Means to Target Pro-Inflammatory Interleukin-8 (CXCL8) Signaling in Cancer*; **2013**, 6.
- (69) Baldwin, E. T.; Weber, I. T.; St. Charles, R.; Xuan, J. C.; Appella, E.; Yamada, M.; Matsushima, K.; Edwards, B. F. P.; Marius Clore, G.; Gronenborn, A. M.; Wlodawer, A. Crystal Structure of Interleukin 8: Symbiosis of NMR and Crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88* (2), 502–506.
- (70) Segerer, S.; Nelson, P. J.; Schlöndorff, D. Chemokines, Chemokine Receptors, and Renal Disease: From Basic Science to Pathophysiologic and Therapeutic Studies. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2000**, *11* (1), 152–176.
- (71) Baggiolini, M.; Loetscher, P.; Moser, B. Interleukin-8 and the Chemokine Family. *Int. J. Immunopharmacol.* **1995**, *17* (2), 103–108.
- (72) Burteau, C.; Willems, L.; Kettmann, R. Les Chémokines et Leurs Récepteurs: Rôle Dans Les Infections Virales et Dans Les Pathologies Cancéreuses. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2007**, *11* (2), 121–127.
- (73) Mantovani, A. The Chemokine System: Redundancy for Robust Outputs. *Immunology Today.* Elsevier Ltd June 1, 1999, 254–257.
- (74) Raman, D.; Baugher, P. J.; Thu, Y. M.; Richmond, A. Role of Chemokines in Tumor Growth. *Cancer Letters.* **2007**, 137–165.
- (75) Waugh, D. J. J.; Wilson, C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (21), 6735–6741.
- (76) Feniger-Barish, R.; Ran, M.; Zaslaver, A.; Ben-Baruch, A. Differential Modes of Regulation of CXC Chemokine-Induced Internalization and Recycling of Human CXCR1 and CXCR2. *Cytokine* **1999**, *11* (12), 996–1009.

- (77) Matityahu, E.; Feniger-Barish, R.; Meshel, T.; Zaslaver, A.; Ben-Baruch, A. Intracellular Trafficking of Human CXCR1 and CXCR2: Regulation by Receptor Domains and Actin-Related Kinases. *Eur. J. Immunol.* **2002**, *32* (12), 3525–3535.
- (78) Nicole F. Neel, Evemie Schutyser, Jiqing Sai, Guo-Huang Fan, A. R. Chemokine Receptor Internalization and Intracellular Trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2005**, *16* (6), 637–658.
- (79) Liu, Q.; Li, A.; Tian, Y.; Wu, J. D.; Liu, Y.; Li, T.; Chen, Y.; Han, X.; Wu, K. The CXCL8-CXCR1/2 Pathways in Cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2016**, *31*, 61–71.
- (80) Turner, M. D.; Nedjai, B.; Hurst, T.; Pennington, D. J. Cytokines and Chemokines: At the Crossroads of Cell Signalling and Inflammatory Disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2014**, *1843* (11), 2563–2582.
- (81) Alfaro, C.; Sanmamed, M. F.; Rodríguez-Ruiz, M. E.; Teijeira, Á.; Oñate, C.; González, Á.; Ponz, M.; Schalper, K. A.; Pérez-Gracia, J. L.; Melero, I. Interleukin-8 in Cancer Pathogenesis, Treatment and Follow-Up. *Cancer Treat. Rev.* **2017**, *60*, 24–31.
- (82) Young, P. R.; McLaughlin, M. M.; Kumar, S.; Kassis, S.; Doyle, M. L.; McNulty, D.; Gallagher, T. F.; Fisher, S.; McDonnell, P. C.; Carr, S. A.; Huddleston, M. J.; Seibel, G.; Porter, T. G.; Livi, G. P.; Adams, J. L.; Lee, J. C. Pyridinyl Imidazole Inhibitors of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Bind in the ATP Site. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (18), 12116–12121.
- (83) Lee, M.; Dominguez, C. MAP Kinase P38Inhibitors: Clinical Results and an Intimate Look at Their Interactions with P38α Protein. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12* (25), 2979–2994.
- (84) Regan, J.; Moss, N.; Pargellis, C.; Pav, S.; Proto, A.; Swinamer, A.; Tong, L.; Torcellini, C.; Breitfelder, S.; Cirillo, P.; Gilmore, T.; Graham, A. G.; Hickey, E.; Klaus, B.; Madwed, J.; Moriak, M. Pyrazole Urea-Based Inhibitors of P38 MAP Kinase: From Lead Compound to Clinical Candidate. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (14), 2994–3008.
- (85) Plantevin Krenitsky, V.; Nadolny, L.; Delgado, M.; Ayala, L.; Clareen, S. S.; Hilgraf, R.; Albers, R.; Hegde, S.; D'Sidocky, N.; Sapienza, J.; Wright, J.; McCarrick, M.; Bahmanyar, S.; Chamberlain, P.; Delker, S. L.; Muir, J.; Giegel, D.; Xu, L.; Celeridad, M.; Lachowitz, J.; Bennett, B.; Moghaddam, M.; Khatsenko, O.; Katz, J.; Fan, R.; Bai, A.; Tang, Y.; Shirley, M. A.; Benish, B.; Bodine, T.; Blease, K.; Raymon, H.; Cathers, B. E.; Satoh, Y. Discovery of CC-930, an Orally Active Anti-Fibrotic JNK Inhibitor. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (3), 1433–1438.
- (86) Cohen, P. The Development and Therapeutic Potential of Protein Kinase Inhibitors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3* (4), 459–465.
- (87) Allen, L. F.; Sebolt-Leopold, J.; Meyer, M. B. CI-1040 (PD184352), a Targeted Signal Transduction Inhibitor of MEK (MAPKK). In *Seminars in Oncology*. **2003**, *30*, 105–116.
- (88) Zeiser, R.; Andrlová, H.; Meiss, F. Trametinib (GSK1120212). In *Recent Results in Cancer Research*. **2018**, *211*, 91–100.
- (89) Gharbi, S. I.; Zvelebil, M. J.; Shuhleworth, S. J.; Hancox, T.; Saghir, N.; Timms, J. F.; Waterfield, M. D. Exploring the Specificity of the PI3K Family Inhibitor LY294002. *Biochem. J.* **2007**, *404* (1), 15–21.
- (90) Wymann, M. P.; Bulgarelli-Leva, G.; Zvelebil, M. J.; Pirola, L.; Vanhaesebroeck, B.; Waterfield, M. D.; Panayotou, G. Wortmannin Inactivates Phosphoinositide 3-Kinase by Covalent Modification of Lys-802, a Residue Involved in the Phosphate Transfer Reaction. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16* (4), 1722–1733.

- (91) Zhang, Y.; Wang, L.; Zhang, M.; Jin, M.; Bai, C.; Wang, X. Potential Mechanism of Interleukin-8 Production from Lung Cancer Cells: An Involvement of EGF-EGFR-PI3K-Akt-Erk Pathway. *Journal of Cellular Physiology*. **2012**, 35–43.
- (92) Wu, Y. Y.; Wu, H. C.; Wu, J. E.; Huang, K. Y.; Yang, S. C.; Chen, S. X.; Tsao, C. J.; Hsu, K. F.; Chen, Y. L.; Hong, T. M. The Dual PI3K/MTOR Inhibitor BEZ235 Restricts the Growth of Lung Cancer Tumors Regardless of EGFR Status, as a Potent Accompanist in Combined Therapeutic Regimens. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, 38 (1).
- (93) Chang, K. Y.; Tsai, S. Y.; Wu, C. M.; Yen, C. J.; Chuang, B. F.; Chang, J. Y. Novel Phosphoinositide 3-Kinase/MTOR Dual Inhibitor, NVP-BGT226, Displays Potent Growth-Inhibitory Activity against Human Head and Neck Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Clin. Cancer Res.* **2011**, 17 (22), 7116–7126.
- (94) Bagrodia, S.; Smeal, T.; Abraham, R. T. Mechanisms of Intrinsic and Acquired Resistance to Kinase-Targeted Therapies. *Pigment Cell and Melanoma Research*. **2012**, 819–831.
- (95) Allegretti, M.; Cesta, M. C.; Garin, A.; Proudfoot, A. E. I. Current Status of Chemokine Receptor Inhibitors in Development. *Immunol. Lett.* **2012**, 145 (1–2), 68–78.
- (96) Acharyya, S.; Oskarsson, T.; Vanharanta, S.; Malladi, S.; Kim, J.; Morris, P. G.; Manova-Todorova, K.; Leversha, M.; Hogg, N.; Seshan, V. E.; Norton, L.; Brogi, E.; Massagué, J. A CXCL1 Paracrine Network Links Cancer Chemoresistance and Metastasis. *Cell* **2012**, 150 (1), 165–178.
- (97) Zhu, Y. M.; Webster, S. J.; Flower, D.; Woll, P. J. Interleukin-8/CXCL8 Is a Growth Factor for Human Lung Cancer Cells. *Br. J. Cancer* **2004**, 91 (11), 1970–1976.
- (98) Matsuo, Y.; Raimondo, M.; Woodward, T. A.; Wallace, M. B.; Gill, K. R.; Tong, Z.; Burdick, M. D.; Yang, Z.; Strieter, R. M.; Hoffman, R. M.; Guha, S. CXC-Chemokine/CXCR2 Biological Axis Promotes Angiogenesis in Vitro and in Vivo in Pancreatic Cancer. *Int. J. Cancer* **2009**, 125 (5), 1027–1037.
- (99) Huang, S.; Mills, L.; Mian, B.; Tellez, C.; McCarty, M.; Yang, X. D.; Gudas, J. M.; Bar-Eli, M. Fully Humanized Neutralizing Antibodies to Interleukin-8 (ABX-IL8) Inhibit Angiogenesis, Tumor Growth, and Metastasis of Human Melanoma. *Am. J. Pathol.* **2002**, 161 (1), 125–134.
- (100) Skov, L.; Beurskens, F. J.; Zachariae, C. O. C.; Reitamo, S.; Teeling, J.; Satijn, D.; Knudsen, K. M.; Boot, E. P. J.; Hudson, D.; Baadsgaard, O.; Parren, P. W. H. I.; van de Winkel, J. G. J. IL-8 as Antibody Therapeutic Target in Inflammatory Diseases: Reduction of Clinical Activity in Palmoplantar Pustulosis. *J. Immunol.* **2008**, 181 (1), 669–679.
- (101) O’Callaghan, K.; Kuliopulos, A.; Covic, L. Turning Receptors on and off with Intracellular Pepducins: New Insights into G-Protein-Coupled Receptor Drug Development. *Journal of Biological Chemistry*. **2012**, 12787–12796.
- (102) Dimond, P.; Carlson, K.; Bouvier, M.; Gerard, C.; Xu, L.; Covic, L.; Agarwal, A.; Ernst, O. P.; Janz, J. M.; Schwartz, T. W.; Gardella, T. J.; Milligan, G.; Kuliopulos, A.; Sakmar, T. P.; Hunt, S. W. G Protein-Coupled Receptor Modulation with Pepducins: Moving Closer to the Clinic. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, 1226 (1), 34–49.
- (103) Agarwal, A.; Tressel, S. L.; Kaimal, R.; Balla, M.; Lam, F. H.; Covic, L.; Kuliopulos, A. Identification of a Metalloprotease-Chemokine Signaling System in the Ovarian Cancer Microenvironment: Implications for Antiangiogenic Therapy. *Cancer Res.* **2010**, 70 (14), 5880–5890.

- (104) Allegretti, M.; Cesta, M. C.; Garin, A.; Proudfoot, A. E. I. Current Status of Chemokine Receptor Inhibitors in Development. *Immunol. Lett.* **2012**, *145* (1–2), 68–78.
- (105) White, J. R.; Lee, J. M.; Young, P. R.; Hertzberg, R. P.; Jurewicz, A. J.; Chaikin, M. A.; Widdowson, K.; Foley, J. J.; Martin, L. D.; Griswold, D. E.; Sarau, H. M. Identification of a Potent, Selective Non-Peptide CXCR2 Antagonist That Inhibits Interleukin-8-Induced Neutrophil Migration. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (17), 10095–10098.
- (106) Jin, Q.; Nie, H.; McClelland, B. W.; Widdowson, K. L.; Palovich, M. R.; Elliott, J. D.; Goodman, R. M.; Burman, M.; Sarau, H. M.; Ward, K. W.; Nord, M.; Orr, B. M.; Gorycki, P. D.; Busch-Petersen, J. Discovery of Potent and Orally Bioavailable N,N'-Diarylurea Antagonists for the CXCR2 Chemokine Receptor. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (17), 4375–4378.
- (107) Chapman, R. W.; Phillips, J. E.; Hipkin, R. W.; Curran, A. K.; Lundell, D.; Fine, J. S. CXCR2 Antagonists for the Treatment of Pulmonary Disease. *Pharmacology and Therapeutics.* **2009**, 55–68.
- (108) Gonsiorek, W.; Fan, X.; Hesk, D.; Fossetta, J.; Qiu, H.; Jakway, J.; Billah, M.; Dwyer, M.; Chao, J.; Deno, G.; Taveras, A.; Lundell, D. J.; Hipkin, R. W. Pharmacological Characterization of Sch527123, a Potent Allosteric CXCR1/CXCR2 Antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *322* (2), 477–485.
- (109) Fu, S.; Chen, X.; Lin, H. J.; Lin, J. Inhibition of Interleukin 8/C-X-C Chemokine Receptor 1,₂ Signaling Reduces Malignant Features in Human Pancreatic Cancer Cells. *Int. J. Oncol.* **2018**, *53* (1), 349–357.
- (110) Ning, Y.; Labonte, M. J.; Zhang, W.; Bohanes, P. O.; Gerger, A.; Yang, D.; Benhaim, L.; Paez, D.; Rosenberg, D. O.; Nagulapalli Venkata, K. C.; Louie, S. G.; Petasis, N. A.; Ladner, R. D.; Lenz, H. J. The CXCR2 Antagonist, SCH-527123, Shows Antitumor Activity and Sensitizes Cells to Oxaliplatin in Preclinical Colon Cancer Models. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11* (6), 1353–1364.
- (111) Nair, P.; Gaga, M.; Zervas, E.; Alagha, K.; Hargreave, F. E.; O'Byrne, P. M.; Stryszak, P.; Gann, L.; Sadeh, J.; Chanez, P. Safety and Efficacy of a CXCR2 Antagonist in Patients with Severe Asthma and Sputum Neutrophils: A Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Clin. Exp. Allergy* **2012**, *42* (7), 1097–1103.
- (112) Casilli, F.; Bianchini, A.; Gloaguen, I.; Biordi, L.; Alesse, E.; Festuccia, C.; Cavalieri, B.; Strippoli, R.; Cervellera, M. N.; Bitondo, R. Di; Ferretti, E.; Mainiero, F.; Bizzarri, C.; Colotta, F.; Bertini, R. Inhibition of Interleukin-8 (CXCL8/IL-8) Responses by Repertaxin, a New Inhibitor of the Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69* (3), 385–394.
- (113) Moriconi, A.; Cesta, M. C.; Cervellera, M. N.; Aramini, A.; Coniglio, S.; Colagioia, S.; Beccari, A. R.; Bizzarri, C.; Cavicchia, M. R.; Locati, M.; Galliera, E.; Di Benedetto, P.; Vigilante, P.; Bertini, R.; Allegretti, M. Design of Noncompetitive Interleukin-8 Inhibitors Acting on CXCR1 and CXCR2. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (17), 3984–4002.
- (114) Brandolini, L.; Cristiano, L.; Fidoamore, A.; Pizzol, M. De; Giacomo, E. Di; Florio, T. M.; Confalone, G.; Galante, A.; Cinque, B.; Benedetti, E.; Ruffini, P. A.; Cifone, M. G.; Giordano, A.; Alecci, M.; Allegretti, M.; Cimini, A. Targeting CXCR1 on Breast Cancer Stem Cells: Signaling Pathways and Clinical Application Modelling. *Oncotarget* **2015**, *6* (41), 43375–43394.
- (115) Schott, A. F.; Goldstein, L. J.; Cristofanilli, M.; Ruffini, P. A.; McCanna, S.; Reuben, J. M.;

- Perez, R. P.; Kato, G.; Wicha, M. Phase Ib Pilot Study to Evaluate Reparixin in Combination with Weekly Paclitaxel in Patients with HER-2–Negative Metastatic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23* (18), 5358–5365.
- (116) Citro, A.; Cantarelli, E.; Maffi, P.; Nano, R.; Melzi, R.; Mercalli, A.; Dugnani, E.; Sordi, V.; Magistretti, P.; Daffonchio, L.; Ruffini, P. A.; Allegretti, M.; Secchi, A.; Bonifacio, E.; Piemonti, L. CXCR1/2 Inhibition Enhances Pancreatic Islet Survival after Transplantation. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122* (10), 3647–3651.
- (117) Russo, R. C.; Guabiraba, R.; Garcia, C. C.; Barcelos, L. S.; Roffê, E.; Souza, A. L. S.; Amaral, F. A.; Cisalpino, D.; Cassali, G. D.; Doni, A.; Bertini, R.; Teixeira, M. M. Role of the Chemokine Receptor CXCR2 in Bleomycin-Induced Pulmonary Inflammation and Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2009**, *40* (4), 410–421.
- (118) Kirsten, A. M.; Förster, K.; Radeckzy, E.; Linnhoff, A.; Balint, B.; Watz, H.; Wray, H.; Salkeld, L.; Cullberg, M.; Larsson, B. The Safety and Tolerability of Oral AZD5069, a Selective CXCR2 Antagonist, in Patients with Moderate-to-Severe COPD. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2015**, *31*, 36–41.
- (119) Hunt, F.; Austin, C.; Austin, R.; Bonnert, R.; Cage, P.; Christie, J.; Christie, M.; Dixon, C.; Hill, S.; Jewell, R.; Martin, I.; Robinson, D.; Willis, P. SAR Studies on Thiazolo[4,5-d]Pyrimidine Based CXCR2 Antagonists Involving a Novel Tandem Displacement Reaction. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (10), 2731–2734.
- (120) Leaker, B. R.; Barnes, P. J.; O'Connor, B. Inhibition of LPS-Induced Airway Neutrophilic Inflammation in Healthy Volunteers with an Oral CXCR2 Antagonist. *Respir. Res.* **2013**, *14*.
- (121) Giuliano, S.; Boncompagni, M.; Ambrosetti, D.; Gr, R. The CXCL7 / CXCR1 / 2 Axis Is a Key Driver in the Growth of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* **2020**, *16*, 873–883.
- (122) Dufies, M.; Giuliano, S.; Viotti, J.; Borchiellini, D.; Cooley, L. S.; Ambrosetti, D.; Guyot, M.; Ndiaye, P. D.; Parola, J.; Claren, A.; Schiappa, R.; Gal, J.; Frangeul, A.; Jacquelin, A.; Cassuto, O.; Grépin, R.; Auberger, P.; Bikfalvi, A.; Milano, G.; Escudier, B.; Rioux-Leclercq, N.; Porta, C.; Negrier, S.; Chamorey, E.; Ferrero, J. M.; Pagès, G. CXCL7 Is a Predictive Marker of Sunitinib Efficacy in Clear Cell Renal Cell Carcinomas. *Br. J. Cancer* **2017**, *117* (7), 947–953.
- (123) Grepin, R.; Guyot, M.; Jacquelin, M.; Durivault, J.; Chamorey, E.; Sudaka, A.; Serdjebi, C.; Lacarelle, B.; Scoazec, J. Y.; Negrier, S.; Simonnet, H.; Pages, G. Acceleration of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Growth in Mice Following Bevacizumab/Avastin Treatment: The Role of CXCL Cytokines. *Oncogene* **2012**, *31* (13), 1683–1694.
- (124) Giuliano, S.; Cormerais, Y.; Dufies, M.; Grépin, R.; Colosetti, P.; Belaid, A.; Parola, J.; Martin, A.; Lacas-Gervais, S.; Mazure, N. M.; Benhida, R.; Auberger, P.; Mograbi, B.; Pagés, G. Resistance to Sunitinib in Renal Clear Cell Carcinoma Results from Sequestration in Lysosomes and Inhibition of the Autophagic Flux. *Autophagy* **2015**, *11* (10), 1891–1904.
- (125) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674.
- (126) Shan, Y.; Wang, C.; Zhang, L.; Wang, J.; Wang, M.; Dong, Y. Expanding the Structural Diversity of Diaryldiarylureas as Multi-Target Tyrosine Kinase Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24* (4), 750–758.
- (127) Kenlan, D. E.; Rychahou, P.; Sviripa, V. M.; Weiss, H. L.; Liu, C.; Watt, D. S.; Evers, B. M. Fluorinated N,N'-Diaryldiarylureas as Novel Therapeutic Agents against Cancer Stem Cells. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16* (5), 831–837.

- (128) Yamasaki, R.; Honjo, Y.; Ito, A.; Fukuda, K.; Okamoto, I. Spontaneous and Direct Transformation of N,O-Diaryl Carbamates into N,N'-Diarylureas. *Chem. Pharm. Bull.* **2018**, *66* (9), 880–884.
- (129) Nguyen, T.; Gamage, T. F.; Decker, A. M.; German, N.; Langston, T. L.; Farquhar, C. E.; Kenakin, T. P.; Wiley, J. L.; Thomas, B. F.; Zhang, Y. Diarylureas Containing 5-Membered Heterocycles as CB 1 Receptor Allosteric Modulators: Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10* (1), 518–527.
- (130) Shestakov, A. S.; Present, M. A.; Zlatoustovskaya, E. O.; Shikhaliev, K. S.; Falaleev, A. V.; Sidorenko, O. E. Alkylation of 1,3-Benzothiazin-4-One 2-Oxo-, 2-Arylimino-, and 2-Thioxo Derivatives. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2015**, *51* (4), 370–376.
- (131) Li, J.; Fan, X.; Deng, J.; Liang, Y.; Ma, S.; Lu, Y.; Zhang, J.; Shi, T.; Tan, W.; Wang, Z. Design and Synthesis of 1,3-Benzothiazinone Derivatives as Potential Anti-Inflammatory Agents. *Bioorganic Med. Chem.* **2020**, *28* (11), 115526.
- (132) González-Martínez, N. A.; Lozano-Garza, H. G.; Castro-Garza, J.; De Osio-Cortez, A.; Vargas-Villarreal, J.; Cavazos-Rocha, N.; Ocampo-Candiani, J.; Makarov, V.; Cole, S. T.; Vera-Cabrera, L. In Vivo Activity of the Benzothiazinones PBTZ169 and BTZ043 against *Nocardia Brasiliensis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9* (10).
- (133) Neres, J.; Pojer, F.; Molteni, E.; Chiarelli, L. R.; Dhar, N.; Boy-Röttger, S.; Buroni, S.; Fullam, E.; Degiacomi, G.; Lucarelli, A. P.; Read, R. J.; Zanoni, G.; Edmondson, D. E.; De Rossi, E.; Pasca, M. R.; McKinney, J. D.; Dyson, P. J.; Riccardi, G.; Mattevi, A.; Cole, S. T.; Binda, C. Structural Basis for Benzothiazinone-Mediated Killing of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4* (150).
- (134) Loev, B. 2,3-Dihydro-4H-1,3-Benzothiazinones-4. *J. Org. Chem.* **1963**, *28* (8), 2160.
- (135) Wolf, M. and Sellstedt, 2-SUBSTITUTED-4H-1,3-BENZOTHAZIN-N 4-ONE DERIVATIVES, United States Patent Office, 3. 470. 16., **1969**.
- (136) A. E. Kretov, A. P. Momsenko, and Y. A. L. Synthesis of Dihydro-1,3-Thiazine Derivates. **1973**, *5*, 644–646.
- (137) Takagi, K. Novel Construction of 4H-2,3-Dihydro-1,3-Benzothiazine Ring via Nickel(0)-Catalyzed Reaction of o -Iodobenzamide or o -Iodobenzonitrile with Thioureas . *Chem. Lett.* **1990**, *19* (12), 2205–2206.
- (138) MAKAROV Vadim, COLE, Stewart, M. W. 2007/13. New Benzothiazinone Derivates and Their Use as Antibacterial Agents, **2007**.
- (139) Kutschy, P. Activative Influence of the Nitro Group in the Cyclization Reactions of the Addition Products of 2-Chloro- 5-Nitrobenzoyl Isothiocyanate with the Amines and 2-Propanol. **1992**, *857* (1990), 405–409.
- (140) Kazmi, M.; Zaib, S.; Amjad, S. T.; Khan, I.; Ibrar, A.; Saeed, A.; Iqbal, J. Exploration of Aroyl/Heteroaroyl Iminothiazolines Featuring 2,4,5-Trichlorophenyl Moiety as a New Class of Potent, Selective, and in Vitro Efficacious Glucosidase Inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2017**, *74*, 134–144.
- (141) Inami, H.; Shishikura, J. I.; Yasunaga, T.; Ohno, K.; Yamashita, H.; Kato, K.; Sakamoto, S. Synthesis, Structure-Activity Relationships, and Anticonvulsant Activities of 2-Amino-4H-Pyrido[3,2-e][1,3]Thiazin-4-One Derivatives as Orally Active AMPA Receptor Antagonists. *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, *23* (8), 1788–1799.
- (142) Ishikawa, T.; Kumamoto, T. Guanidines in Organic Synthesis. *Synthesis.* **2006**, 737–752.

- (143) Kalopissis et al.; US005334225A. KERATINOUS FIBER DYE COMPOSITION CONTAINING A 2-SUBSTITUTED AMINO-5-ALKYLPHENOL DERIVATIVE COUPLER, **1994**.
- (144) Mao, Y.; He, Y.; Zhu, F.; Chen, W.; Shen, J.; Li, J. New Synthesis of N-(4-Chloro-3-Cyano-7-Ethoxyquinolin- 6-Yl)Acetamide. *Heterocycles* **2014**, *89* (5), 1203–1209.
- (145) Inami, H.; Shishikura, J. I.; Yasunaga, T.; Ohno, K.; Yamashita, H.; Kato, K.; Sakamoto, S. Synthesis, Structure-Activity Relationships, and Anticonvulsant Activities of 2-Amino-4H-Pyrido[3,2-e][1,3]Thiazin-4-One Derivatives as Orally Active AMPA Receptor Antagonists. *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, *23* (8), 1788–1799.
- (146) Karoli, T.; Becker, B.; Zuegg, J.; Mö, U.; Ramu, S.; Huang, J. X.; Cooper, M. A. Identification of Antitubercular Benzothiazinone Compounds by Ligand-Based Design. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7940-7944.
- (147) Shestakov, A. S.; Gusakova, N. V.; Shikhaliev, K. S.; Timoshkina, A. G. Cyanamides in the Synthesis of 1,3-Thiazole and 1,3-Thiazine Derivatives. *Russ. J. Org. Chem.* **2007**, *43* (12), 1825–1829.
- (148) Kaiya, T.; Fujiwara, T.; Kohda, K. Syntheses and Properties of 1-Methyl-3-Phenylaminobenzimidazolium Salts, Models of DNA Adducts of N7-Arylamino deoxyguanosinium Salt. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13* (10), 993–1001.
- (149) Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, *6*, 469–471.
- (150) Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D. Analysis of Cell Viability by the Alamarblue Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, *6*, 462–464.
- (151) Tobia, C.; de Sena, G.; Presta, M. Zebrafish Embryo, a Tool to Study Tumor Angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **2011**, *55* (4–5), 505–509.
- (152) Cross, L. M.; Cook, M. A.; Lin, S.; Chen, J. N.; Rubinstein, A. L. Rapid Analysis of Angiogenesis Drugs in a Live Fluorescent Zebrafish Assay [1]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* **2003**, 911–912.