UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

EA7501 GICC – Equipe Innovation Moléculaire et Thérapeutique

THÈSE présentée par :

Bruno OYALLON

soutenue le : **05 décembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Science de la Vie et de la Santé

Conception, synthèse et évaluations biologiques de quinoxalines et d'analogues comme inhibiteurs de la kinase *Hs*Pim-1

THÈSE dirigée par :

Mme VIAUD-MASSUARD Marie-Claude	Professeur des Universités, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Mme VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Professeur des Universités, Université de Caen Normandie
M. BOUMENDJEL Ahcene	Professeur des Universités, Université de Grenoble

PRESIDENT DU JURY

M. SCHMIDT Frédéric	Directeur de Recherche CNRS, Institut Curie

JURY :

M. BERTHELOT Pascal	Professeur des Universités, Université de Lille
M. BOUMENDJEL Ahcene	Professeur des Universités, Université de Grenoble
Mme DENEVAULT-SABOURIN Caroline	Maître de Conférences Universitaire, Université de Tours
M. ROGER Sébastien	Maître de Conférences Universitaire, Université de Tours
Mme VIAUD-MASSUARD Marie-Claude	Professeur des Universités, Université de Tours
Mme VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Professeur des Universités, Université de Caen Normandie

REMERCIEMENTS

L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit a été réalisé au sein de l'équipe Innovation Moléculaire et Thérapeutique appartenant à l'unité EA7501 GICC. Ce projet de thèse a été effectué sous la direction du Professeur Marie-Claude Viaud-Massuard et le co-encadrement du Docteur Caroline Denevault-Sabourin.

Tout d'abord, je souhaite adresser mes remerciements au Professeur Marie-Claude Viaud-Massuard qui m'a offert la chance de travailler dans son laboratoire sur cette thématique. Merci pour votre générosité, votre patience et votre implication dans ce projet. Je remercie également le Docteur Caroline Denevault-Sabourin pour sa disponibilité, son encadrement ainsi que ses remarques pendant ces trois années de thèse.

Je remercie sincèrement les membres du jury pour leur participation dans la validation de ces travaux de thèse. Merci au Professeur Anne-Sophie Voisin-Chiret et au Professeur Ahcène Boumendjel d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci également au Professeur Pascal Berthelot, au Docteur Frédéric Schmidt et au Docteur Sébastien Roger d'avoir accepté de l'examiner.

Je remercie l'ensemble des partenaires biologistes de Tours et de Roscoff qui ont réalisé les évaluations de nos composés, en particulier le Docteur Marie Brachet-Botineau pour sa réactivité et son professionnalisme dans la réalisation de ces tests. Je remercie également nos collaborateurs en modélisation moléculaire de Nantes et d'Orléans pour les études *in silico*. Merci également au Docteur Cyril Colas pour les analyses HRMS de nos composés.

Je remercie l'ensemble des membres de l'IMT et de l'équipe de *Mc*SAF pour leur accueil, leur aide et leurs conseils pendant les cinq années passées dans ce labo : Ofélia, Stéphanie, Badia, Imène, Marion, Eloi, Vincent, Steve, Sylvain, Ludo, CamilleM, CamilleG, Gildas, Christine, Audrey, Christophe et tous les autres. Je remercie tout particulièrement le Docteur Cécile Croix, pour m'avoir montré les ficelles du métier, ainsi que pour les nombreux conseils, aussi bien professionnels (comment ranger une hotte, par exemple) que personnels (les Amants de St-Jean, ça va 5 minutes, il parait). On s'est bien marré pendant ces quelques années.

Je tiens à remercier ma famille, sans qui rien de tout cela n'aurait pu avoir lieu. Merci à Rosine, pour avoir réussi l'exploit de me supporter au quotidien jusqu'à maintenant. Merci également à Marie, Jean, Vicky, Philippe, Thomas, Pierre & Loraine, Amaury, Kévin, Lilian & Adrianne, Elise et tous les autres pour avoir été là quand il y en avait besoin.

RESUME

Les kinases Pim (*proviral integration site for moloney murine leukemia virus*) sont impliquées dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que dans l'apoptose et la chimiorésistance. Elles agissent comme des facteurs de survie oncogéniques. Du fait de leurs particularités structurales et leur implication dans l'oncogénèse, les kinases Pim représentent des cibles de choix pour le développement de nouveaux traitements anti-cancéreux.

Des travaux préliminaires ont permis d'identifier un nouveau chef de file **1** de type acide quinoxalin-2-carboxylique, capable d'inhiber in vitro l'activité enzymatique de *Hs*Pim-1 (CI_{50} = 74 nM). Les études *in silico* suggèrent que ce composé agit comme un inhibiteur non mimétique de l'ATP. L'objectif de ce projet était de concevoir des analogues du composé **1** inhibiteurs de *Hs*Pim-1. Ces composés ont été testés sur un panel de kinases de mammifères incluant *Hs*Pim-1 ainsi que sur 3 lignées cellulaires de leucémie.

ABSTRACT

Pim (*proviral integration site for Moloney murine leukemia virus*) kinases play a crucial role in cell survival, proliferation and cell differentiation as well as in apoptosis and chemoresistance. They act as oncogenic survival factors. Due to their structural features and their role in oncogenesis, Pim kinases are relevant targets for new anti-cancer therapies.

Preliminary studies permitted to identify quinoxaline-2-carboxylic acid **1** as a new lead compound. This compound was able to inhibit *Hs*Pim-1 *in vitro* activity (IC_{50} = 74 nM). *In silico* studies have shown that this compound could act as a non-mimetic ATP inhibitor. Our objective was to design and synthesize analogues of compound **1** with an optimised activity on *Hs*Pim-1. These compounds were tested on a panel of mammalian kinases and on 3 leukemic cell lines.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION **23**

I. Généralités sur le cancer **24**

II. Facteurs de risque du cancer **25**

III. Dépistage, diagnostic et prise en charge du cancer **26**

A. Dépistage 26

B. Diagnostic 26

C. Traitements du cancer 27

1. Chirurgie (ou exérèse) 27
2. Radiothérapie 27
3. Chimiothérapie 28

IV. Les protéines kinases **30**

A. Rôle physiologique 30

B. Implication dans les maladies et premiers médicaments 32

V. Les kinases Pim **34**

A. Généralités 34

B. La place des kinases Pim dans les voies de signalisation cellulaires 35

1. Voies de signalisation impliquées dans l'expression de Pim-1 35
2. Rôles physiologiques des kinases Pim 36
3. Mécanismes affectant l'expression de Pim-1 37
4. Conséquences de la surexpression de Pim-1 au sein des cellules cancéreuses 38
   a. Régulation du cycle cellulaire et de la prolifération 38
   b. Régulation de la survie cellulaire et de l'apoptose 42
   c. Rôle dans la chimiorésistance 45
   d. Fonctions promigratoires 45

C. Analyses structurales de *Hs*Pim-1 47

VI. Inhibiteurs de *Hs*Pim-1 en cours de développement **51**

A. Exemples d'inhibiteurs de *Hs*Pim-1 ATP mimétiques 52

1. Staurosporine et dérivés 52
2. Flavonoïdes 53
3. Complexes de ruthénium 54
4. Isoxazolo[3,4-*b*]quinoléine-3,4(1*H*,9*H*)-diones 56

B. Exemples d'inhibiteurs de *Hs*Pim-1 non mimétiques de l'ATP 57

1. Imidazo[1,2-*b*]pyridazines 57
2. Triazolo[4,3-*b*]pyridazines 58
3. Quinoléines 59
4. 5-Fluoropicolinamides 59
5. Thiazolidine-2,4-dione 62
6. Benzo[*c*][2,6]naphthyridines 62
7. Benzo[*d*]imidazole 63

C. Conclusion 65

OBJECTIFS 66

I. Travaux antérieurs 67

II. Objectifs 68

A. Pharmacomodulations envisagées 69

B. Pharmacomodulations de la position 3 du noyau quinoxaline 70

C. Pharmacomodulations des positions 6 et 7 du noyau quinoxaline 72

PARTIE THEORIQUE 73

I. Aperçu bibliographique 74

A. Applications en chimie thérapeutique 75

B. Synthèse et réactivité du noyau quinoxaline 76

II. Travaux réalisés 79

A. Analyse rétrosynthétique 79

B. Accès au noyau 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 79

C. Chloration en position 3 81

D. Synthèse des amines d'intérêt 82

1. Synthèse des (3-aminophényl)carbamate de *tert*-butyle **20** et (4-aminophényl) carbamate de *tert*-butyle **21** 82
2. Synthèse de la 4-(*N*-méthylpipéridin-4-yl)aniline **23** 83

E. Réaction d'amination 84

F. Saponification 87

G. Conclusion 90

ETUDE ET RESULTATS PHARMACOLOGIQUES 91

I. Matériels et méthodes 92

A. Test de perméabilité membranaire 92

B. Tests enzymatiques 93

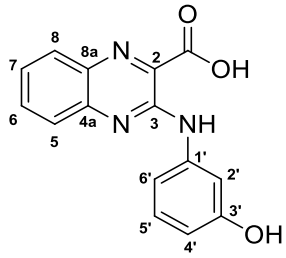
C. Tests cellulaires 95

1. Test colorimétrique au MTT 95
2. Test colorimétrique au bleu trypan 96
II. Résultats 97
A. Test de perméabilité membranaire 97
B. Tests enzymatiques 98
1. Inhibition de l'activité enzymatique de *Hs*Pim-1 98
2. Profil de sélectivité sur kinases de mammifères 102
C. Tests *in vitro* sur lignées cellulaires 104
ETUDES *IN SILICO* 106
I. Matériel et méthode 107
II. Résultats 108
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 111
I. Conclusion 112
II. Perspectives de recherche 113
PARTIE EXPERIMENTALE 116
I. Généralités 117
II. Résonance magnétique nucléaire 117
III. Chemistry 120
A. 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline scaffold synthesis 120
1. Ethyl 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**2**) 120
2. Ethyl 6-fluoro-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**3**) and ethyl 4-fluoro-3-oxo -3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**4**) 121
3. Ethyl 6-chloro-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**5**) and ethyl 7-chloro-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**6**) 122
4. Ethyl 6-bromo-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**7**) and ethyl 7-bromo-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**8**) 123
5. Ethyl 3-oxo-6-(trifluoromethyl)-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**9**) and ethyl 3-oxo-7-(trifluoromethyl)-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**10**) 124
B. Chloration on position 3 125
1. Ethyl 3-chloroquinoxaline-2-carboxylate (**11**) 125
2. Ethyl 3-chloro-6-fluoroquinoxaline-2-carboxylate (**12**) 126
3. Ethyl 3-chloro-7-fluoroquinoxaline-2-carboxylate (**13**) 127
4. Ethyl 3,6-dichloroquinoxaline-2-carboxylate (**14**) 128
5. Ethyl 3,7-dichloroquinoxaline-2-carboxylate (**15**) 129

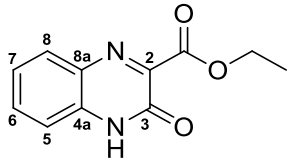
6. Ethyl 6-bromo-3-chloroquinoxaline-2-carboxylate (**16**) 130
7. Ethyl 7-bromo-3-chloroquinoxaline-2-carboxylate (**17**) 131
8. Ethyl 3-chloro-6-(trifluoromethyl)quinoxaline-2-carboxylate (**18**)..... 132
9. Ethyl 3-chloro-7-(trifluoromethyl)quinoxaline-2-carboxylate (**19**)..... 133
C. Amine synthesis 134
1. *tert*-Butyl (3-aminophenyl)carbamate (**20**)..... 134
2. *tert*-Butyl (4-aminophenyl)carbamate (**21**)..... 135
3. 4-(*N*-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)aniline (**22**)..... 136
4. 4-(*N*-methylpiperidin-4-yl)aniline (**23**)..... 137
D. Amination of the quinoxaline scaffold..... 138
1. Ethyl 3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**24**)..... 138
2. Ethyl 3-((3-morpholinophenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**25**)..... 139
3. Ethyl 3-((1*H*-indol-5-yl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**26**) 140
4. Ethyl 3-((4-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**27**)..... 141
5. Ethyl 3-(((4-((*tert*-butoxycabonyl)amino)phenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**28**) 142
6. Ethyl 3-((4-(*N*-methylpiperidin-4-yl)phenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**29**) 143
7. Ethyl 3-((2-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**30**)..... 144
8. Ethyl 3-((3-aminophenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**31**) 145
9. Ethyl 3-((4-aminophenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**32**) 146
10. Ethyl 3-((3-methoxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**33**) 147
11. Ethyl 3-((phenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**34**)..... 148
12. Ethyl 3-((2-(4-chlorophenyl)ethyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**35**) 149
13. Ethyl 3-((3-(4-chlorophenyl)propyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**36**).... 150
14. Ethyl 3-((4-(4-chlorophenyl)butyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**37**)..... 151
15. Ethyl 6-fluoro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**38**) .. 152
16. Ethyl 7-fluoro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**39**) .. 153
17. Ethyl 6-chloro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**40**) .. 154
18. Ethyl 7-chloro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**41**) .. 155
19. Ethyl 6-bromo-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**42**).. 156
20. Ethyl 7-bromo-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**43**).. 157
21. Ethyl 3-((3-hydroxyphenyl)amino)-6-(trifluoromethyl)quinoxaline-2-carboxylate (**44**) 158

22. Ethyl 3-((3-hydroxyphenyl)amino)-7-(trifluoromethyl)quinoxaline-2-carboxylate (**45**) 159
E. Saponification 160
1. 3-((3-Hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**1**) 160
2. 3-((3-Morpholinophenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**46**) 161
3. 3-((1*H*-Indol5-yl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**47**) 162
4. 3-((4-Hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**48**) 163
5. 3-((4-*N*-Methylpiperidin-4-yl)phenyl))aminoquinoxaline-2-carboxylic acid (**49**) 164
6. 3-((2-Hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**50**) 165
7. 3-((Phenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**51**) 166
8. 3-((3-Methoxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**52**) 167
9. 3-(((2-(4-chlorophenyl)ethyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**53**) 168
10. 3-((3-(4-chlorophenyl)propyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**54**) 169
11. 3-((4-(4-chlorophenyl)butyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**55**) 170
12. 6-Fluoro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**56**) 171
13. 7-Fluoro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**57**) 172
14. 6-Chloro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**58**) 173
15. 7-Chloro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**59**) 174
16. 6-Bromo-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**60**) 175
17. 7-Bromo-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**61**) 176
18. 3-((3-Hydroxyphenyl)amino)-6-(trifluoromethyl)quinoxaline-2-carboxylic acid (**62**) 177
19. 3-((3-Hydroxyphenyl)amino)-7-(trifluoromethyl)quinoxaline-2-carboxylic acid (**63**) 178
20. Potassium 3-((3-aminophenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**64**) 179
21. Potassium 3-((4-aminophenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**65**) 180
BIBLIOGRAPHIE 181

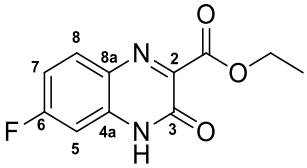
LISTE DES MOLECULES



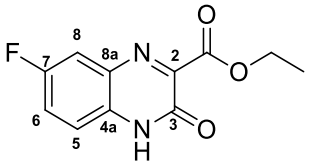
1



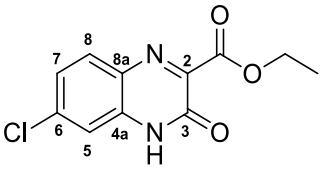
2



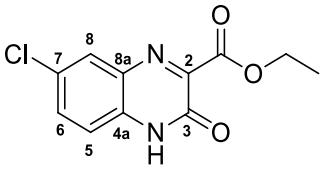
3



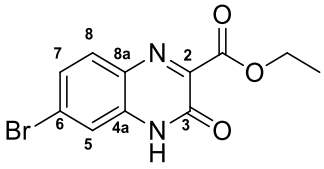
4



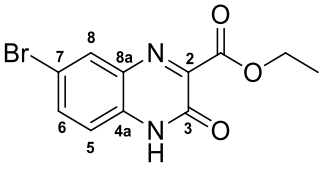
5



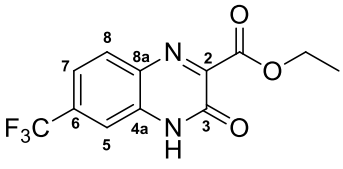
6



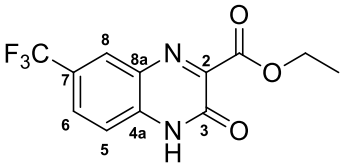
7



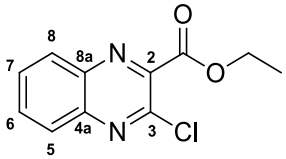
8



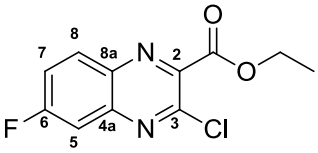
9



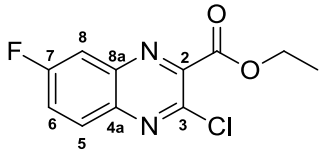
10



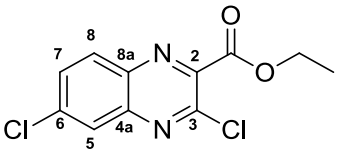
11



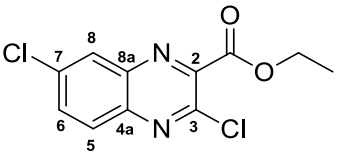
12



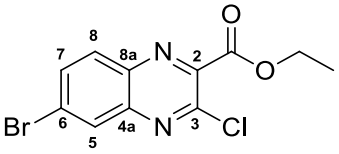
13



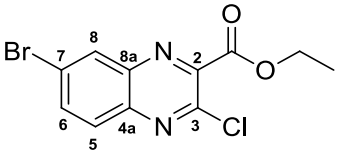
14



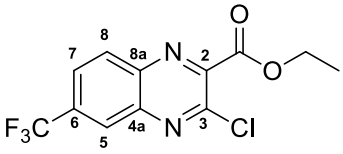
15



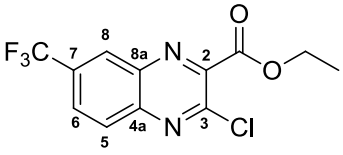
16



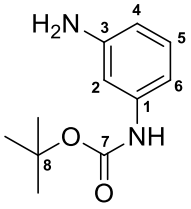
17



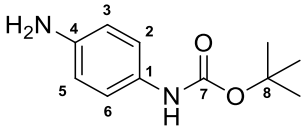
18



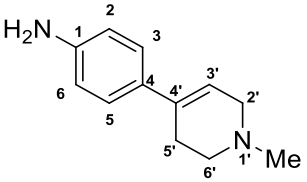
19



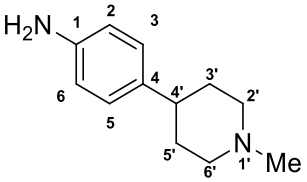
20



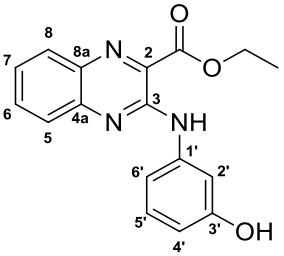
21



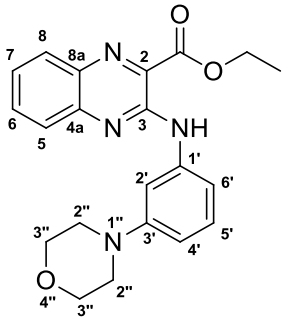
22



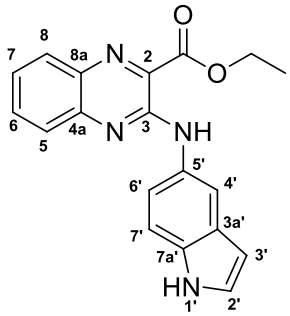
23



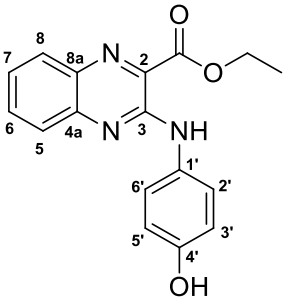
24



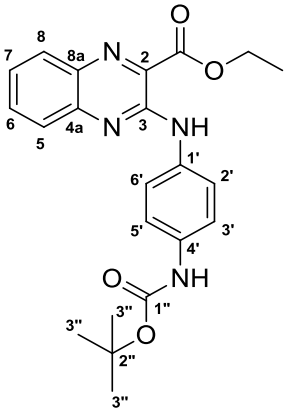
25



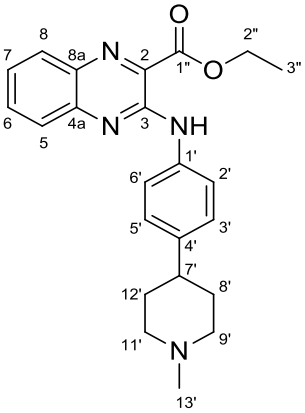
26



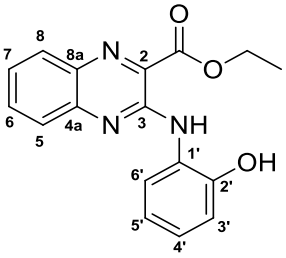
27



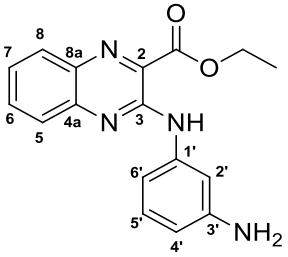
28



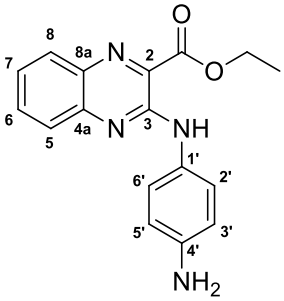
29



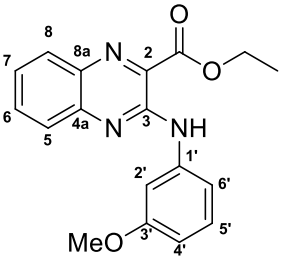
30



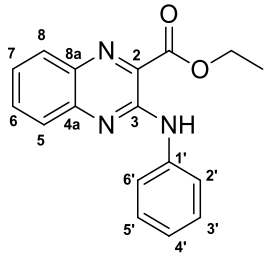
31



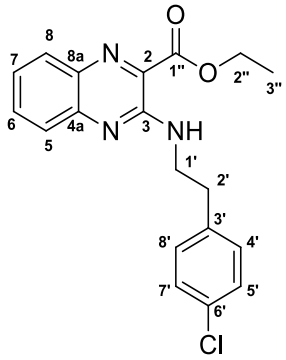
32



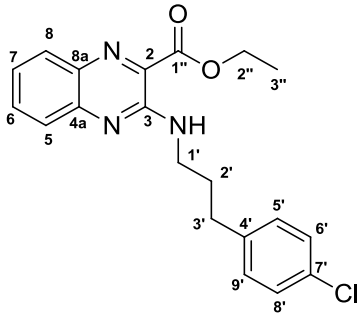
33



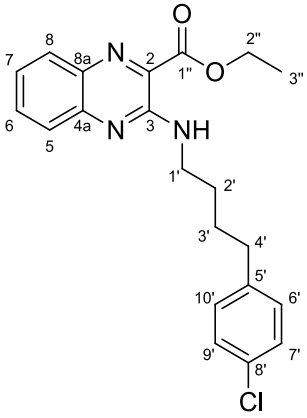
34



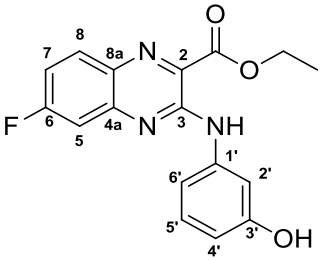
35



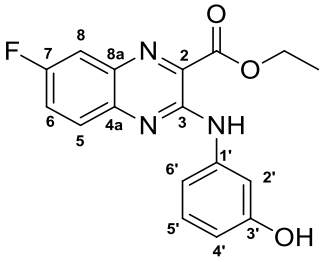
36



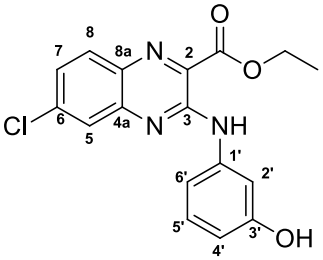
37



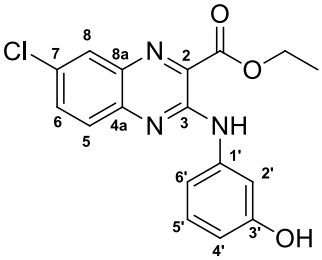
38



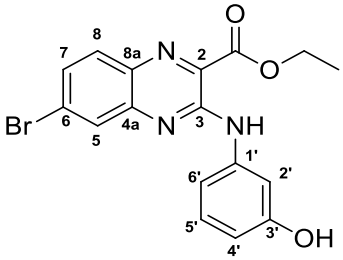
39



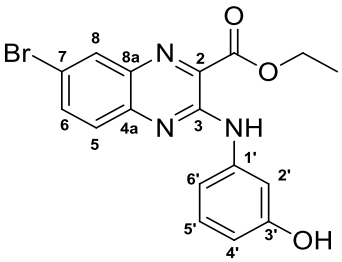
40



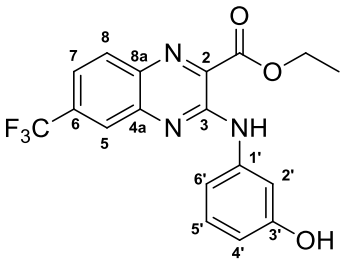
41



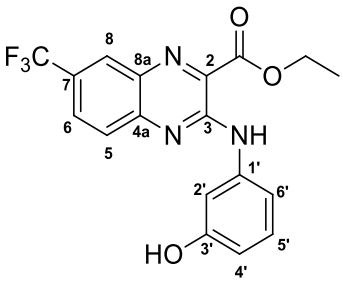
42



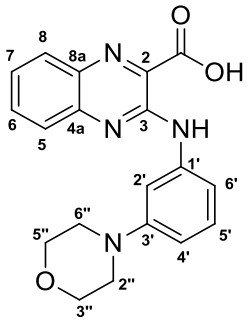
43



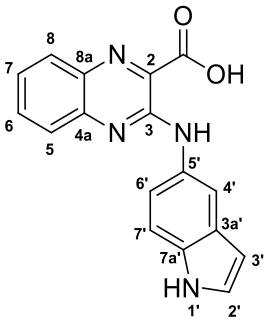
44



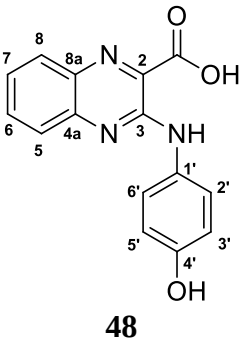
45



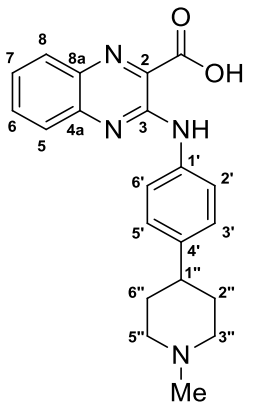
46



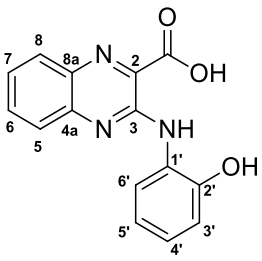
47



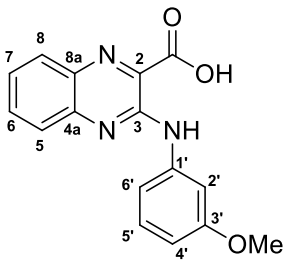
48



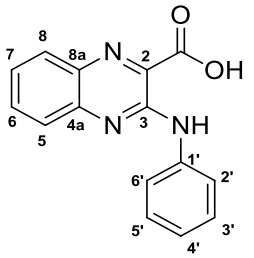
49



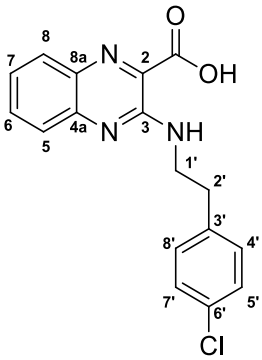
50



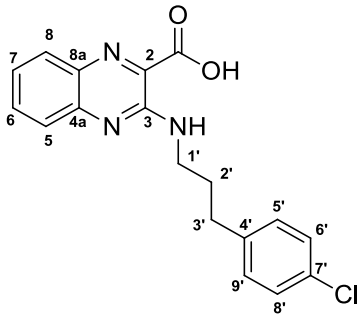
51



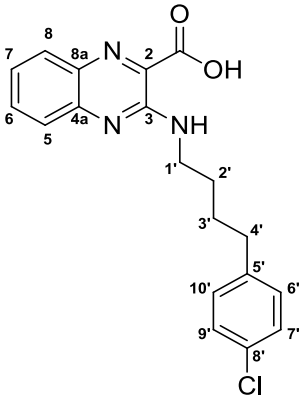
52



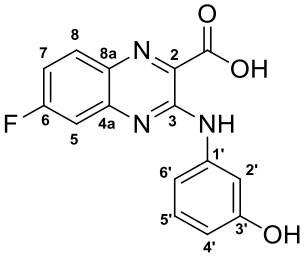
53



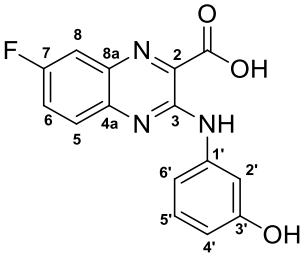
54



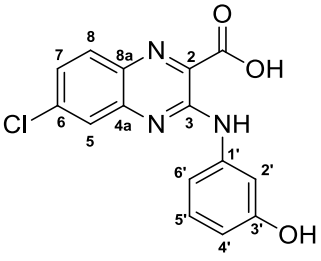
55



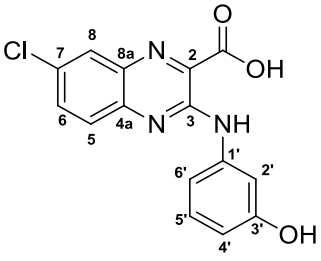
56



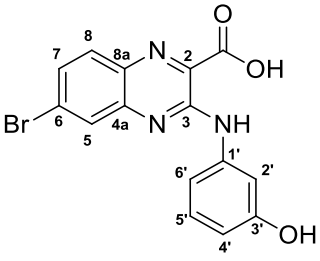
57



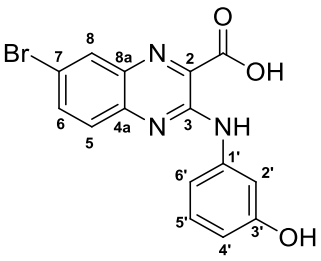
58



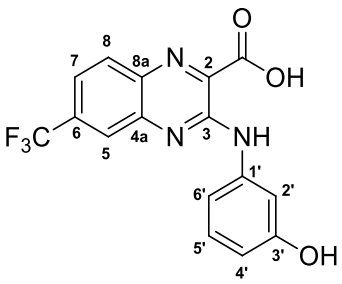
59



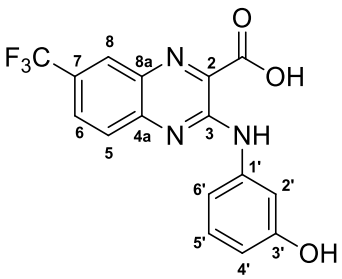
60



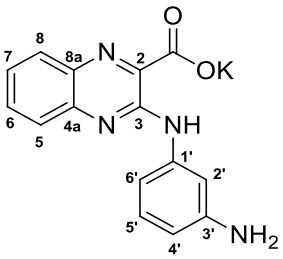
61



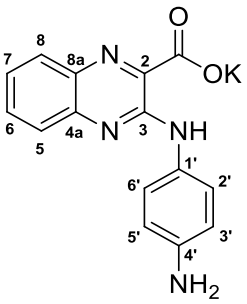
62



63



64



65

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Mécanisme général du contrôle de la phosphorylation d'un substrat 31
Figure 2. Structure de l'imatinib (GLIVEC®) 33
Figure 3. Place de la kinase Pim-1 dans la voie de signalisation JAK/STATs 36
Figure 4. Le cycle cellulaire 39
Figure 5. Rôle de Pim-1 dans le point de contrôle G_1/S 40
Figure 6. Rôle de Pim-1 dans le point de contrôle G_2/M 41
Figure 7. Voie de signalisation pro-apoptotique Bcl-2/BAD 43
Figure 8. Rôle de Pim-1 dans la survie cellulaire dans des conditions de stress induites par le docétaxel 44
Figure 9. Autres substrats associés à la survie cellulaire 44
Figure 10. Structure de *Hs*Pim-1 48
Figure 11. A. Structure de l'AMP-PNP ; B. Interactions de l'AMP-PNP au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 48
Figure 12. Fixation de l'ATP au niveau de la région charnière de la majorité des kinases (A.) et de *Hs*Pim-1 (B.) 49
Figure 13. Interactions des phosphates de l'AMP-PNP avec *Hs*Pim-1 50
Figure 14. Alignement structural des charnières de plusieurs kinases 50
Figure 15. Alignement des structures de *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 (d'après Bullock *et al.*) 51
Figure 16. Interactions de la staurosporine au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 52
Figure 17. Interactions du composé LY333531 au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 53
Figure 18. Structures et valeurs des CI_{50} sur *Hs*Pim-1 de la staurosporine et de ses dérivés 53
Figure 19. A. Structure et activité de la quercétagétine ; B. Interactions de la quercétagétine au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 54
Figure 20. Conception des complexes de ruthénium 54
Figure 21. Structure du composé (*S*)-I 55
Figure 22. Interactions du composé (*S*)-I au sein de la poche catalytique de *Hs*Pim-1 55
Figure 23. Structures et activités des énantiomères du composé II 56
Figure 24. Structure et activités du composé III 56
Figure 25. A. Structure et activités du composé IV ; B. Interactions du composé IV au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 57
Figure 26. Structure et activités du composé SGI-1776 57
Figure 27. Structure et Ki du TP-3654 58
Figure 28. Structures et activités des composés V à IX 58
Figure 29. Structures et activités des composés X à XV sur *Hs*Pim-1 59
Figure 30. Modélisation du composé XIII au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 59

Figure 31. A. Structure et Ki du composé XVIa ; B. Interactions du composé XVIa au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 60
Figure 32. A. Structure et Ki du composé XVIb ; B. Interactions du composé XVIb au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 60
Figure 33. A. Structure et activités du composé LGH447 (PIM447) ; B. Interactions du composé LGH447 (PIM447) au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 61
Figure 34. Structure et activité du composé INCB053914 62
Figure 35. Structure et activité du composé AZD1208 62
Figure 36. Structure et activité du composé CX-4945 63
Figure 37. Structures et activités des composés XVIIa-c 63
Figure 38. Structure et Kd du composé SEL24-B489 64
Figure 39. Inhibiteurs des kinase Pim en cours d'essais cliniques 65
Figure 40. Structure de l'acide quinoxaline-2-carboxylique 1 67
Figure 41. Représentations 3D (A.) et 2D (B.) du *docking* du composé 1 au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 (3A99.pdb) 68
Figure 42. Collaborations mises en place pour ce projet 69
Figure 43. Modèle d'étude chimique général 69
Figure 44. Pharmacomodulations de la position 3 du noyau quinoxaline 71
Figure 45. Pharmacomodulations des positions 6 et 7 du noyau quinoxaline 72
Figure 46. Modèle d'étude chimique général 72
Figure 47. Exemples de quinoxalines ayant des propriétés biologiques 76
Figure 48. Illustration de l'appareillage PAMPA 92
Figure 49. Principe de la méthode ADP-Glo™ 94
Figure 50. Plaque 96-puits utilisée pour un test MTT 96
Figure 51. *Docking* du composé 1 au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 (3A99.pdb) 108
Figure 52. Structure (A.) et *docking* (B.) du composé 58 au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 108
Figure 53. Structure (A.) et *docking* (B.) du composé 59 au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 109
Figure 54. Structures et activités des nouveaux composés chef de file identifiés 112
Figure 55. Nouveau modèle d'étude chimique issu des composés 58 et 59 114

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1. Structures générales des diazanaphtalènes 74
Schéma 2. Structures générales des benzodiazines 74
Schéma 3. Méthode de synthèse des quinoxalines employée par Hinsberg et Körner 75
Schéma 4. Exemples de voies d'accès au noyau quinoxaline 77
Schéma 5. Principale méthode de synthèse du noyau 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 77
Schéma 6. Synthèse du 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 78
Schéma 7. Fonctionnalisation du noyau quinoxaline 78
Schéma 8. Synthèse des 6 et 7-chloro-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 78
Schéma 9. Analyse rétrosynthétique 79
Schéma 10. Obtention du composé 2 79
Schéma 11. Mécanisme supposé de la cyclocondensation du composé 2 80
Schéma 12. Obtention des composés 3 à 10 80
Schéma 13. Obtention des composés 11 à 19 81
Schéma 14. Mécanisme de chloration du composé 11 82
Schéma 15. Obtention des composés 20 et 21 83
Schéma 16. Obtention du composé 22 83
Schéma 17. Obtention du composé 23 83
Schéma 18. Obtention des composés 24 à 30 84
Schéma 19. Obtention du composé 31 85
Schéma 20. Obtention du composé 32 85
Schéma 21. Obtention des composés 33 à 45 86
Schéma 22. Obtention des composés 1 et 47 à 50 87
Schéma 23. Obtention des composés 51 à 63 88
Schéma 24. Obtention des composés 64 et 65 90
Schéma 25. Réduction du MTT au sein des cellules vivantes 95

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Caractéristiques chémoinformatiques de la règle de Lipinski....70
Tableau II. Obtention des composés 3 à 10....80
Tableau III. Obtention des composés 11 à 19....81
Tableau IV. Obtention des composés 24 à 30....84
Tableau V. Obtention des composés 33 à 45....86
Tableau VI. Obtention des composés 1 et 47 à 50....88
Tableau VII. Obtention des composés 51 à 63....89
Tableau VIII. Résultats de l'étude PAMPA du composé 1....97
Tableau IX. CI_{50} des composés issus des pharmacomodulations de la position 3 du noyau quinoxaline....99
Tableau X. CI_{50} des composés issus des pharmacomodulations des positions 6 et 7 du noyau quinoxaline....101
Tableau XI. Résultats du criblage des composés les plus actifs sur le panel de kinases de mammifères sélectionnées 103
Tableau XII. Activités *in cellulo* des composés les plus actifs sur *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2....104

LISTE DES ABREVIATIONS

δ	déplacement chimique
µL	microlitre(s)
µM	micromole(s) par litre
^{1}H-NMR	^{1}H *nuclear magnetic resonance*
^{13}C-NM	^{13}C *nuclear magnetic resonance*
^{19}F-NMR	^{19}F *nuclear magnetic resonance*

A

ABC	*ATP-binding cassette*
ABCB1/3	*ATP-binding cassette subfamily B member 1/3*
Ac. citrique	acide citrique
ADN	acide désoxyribonucléique
AKT	protéine kinase B
AMM	autorisation de mise sur le marché
AMPc	adénosine-3',5'-monophosphate cyclique
aPK	protéine kinase atypique
APTS	acide *para*-toluènesulfonique
ARN	acide ribonucléique
ASK1	*apoptosis signaling kinase 1*
Asn	asparagine
Asp	aspartate
ATP	adénosine triphosphate
AURKB	aurora B kinase

B

BAD	*Bcl-2-associated death promoter*
BAX	*Bcl-2-associated X protein*
Bcl-2	*B-cell lymphoma 2*
Bcl-xL	*B-cell lymphoma-extra large*
Bcr-abl	*breakpoint cluster region fused with the Abelson gene*
BCRP	*brest cancer resistance protein*
BIM	*Bcl-2-like protein 11*
Boc_2O	dicarbonate de di-*tert*-butyle
bs	*broad signal*

C

CAMK	calcium/calmoduline-dependent kinases
cAPK	kinase AMPc-dépendante

Cat.	catalytique
CCM	chromatographie sur couche mince
CD_3OD	méthanol deutéré
Cdc25a	*cell division cycle 25 homolog A; M-phase inducer phosphatase 1*
Cdc25c	*cell division cycle 25 homolog C; M-phase inducer phosphatase 13*
$CDCl_3$	chloroforme deutéré
CDK2/CyclinA	*Cyclin-dependent kinase 2*
CDK5/CyclinT	*Cyclin-dependent kinase 5*
cHex	cyclohexyl
cPr	cyclopropyl
C-terminal	domaine carboxy-terminal
CE_{50}	concentration effectrice 50 %
CI_{50}	concentration inhibitrice 50 %
c-IAP2	*caspase-linked inhibitor of apoptosis protein 2*
CK1δ/ε	*casein kinase 1 delta/epsilon*
CK1/2	*casein kinase 1 et 2*
CLK1	*CDC2-like kinase 1*
CNRS	centre national de la recherche scientifique
c-TAK1	*Cdc25c associated protein kinase 1*
CXCR4	*C-X-C motif chemokine receptor 4*
CXCL12	*CXC ligand 12*

D

d	*doublet*
DCM	dichlorométhane
dd	*doublet of doublets*
ddd	*doublet of doublet of doublets*
DLBCL	*diffuse large B-cell lymphoma*
DMF	*N,N*-diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxide
DMSO-d_6	DMSO deutéré
dt	*doublet of triplet*

E

EBV	Epstein-Barr virus
ePK	protéine kinase eucaryote
EtOH	éthanol

F

FAS ligands	tumor necrosis factor type II transmembrane protein
FLT3-ITD	*FMS-like tyrosine kinase 3 - internal tandem duplication*
FOXO1a/3a/P3	forkhead box O1a, O3a et P3

G

GC-SF	*granulocyte colony stimulating factor*
GIST	*gastro-intestinal stromal tumors*
Glu	glutamate
Gly	glycine
GM-CSF	*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*
GSK3α/β	*glycogen synthase kinase 3 alpha/beta*
Gu.Cl	chlorhydrate de guanidine

H

H_2	dihydrogène
H_2O	eau
HASPIN	*haploid germ cell-specific nuclear protein kinase*
HIF-1	*hypoxia-inducible factor 1*
HP1β	*heterochromatin protein 1β*
HPV	*Human papillomavirus*
Hs	*Homo sapiens*
HSP70/90	*heat shock protein* 70/90 kDa
Hz	Hertz

I

IL	Interleukine
Ile	Isoleucine

J

J	constante de couplage
JAK	Janus kinase

K

K_2CO_3	carbonate de potassium
kinase Etk	kinase de la famille Tec

L

LAM	leucémie aiguë myéloïde
Leu	leucine
LMC	leucémie myéloïde chronique
Lys	lysine

M

m	*multiplet*
MCL-1	*induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1*
MDM2	*mouse double minute 2 homolog*
MDR1	*multidrug resistance protein 1*
MeOH	méthanol
mg	milligramme
$MgSO_4$	sulfate de magnésium
MHz	mégahertz
mL	millilitre(s)
Mm	*Mus musculus*
mmol	millimole(s)
MP	*melting point*
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium

N

N1ICD	*NOTCH1 intra-cellular domain*
NaOH	hydroxyde de sodium
NFATC1	*nuclear factor of activated T-cell 1*
NH-κB	*nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells*
nM	nanomole(s) par litre
nm	nanomètre(s)
NumA	*nuclear mitotic apparatus*
N-terminal	domaine amino-terminal
OMS	organisation mondiale de la Santé

P

p53	*tumor suppressor protein 53 kDa*
p73	*tumor suppressor protein 73 kDa*
PAMPA	*parallel artificial membrane permeability assay*
PBS	*phosphotate buffered saline*
PCNA	*proliferation nuclear antigen*
Pd/C	palladium sur charbon
$Pd_2(dba)_3$	tris(dibenzylideneacetone)dipalladium (0)
Pe	perméabilité effective
Pgp	*P glycoprotein*
pH	potentiel hydrogène
Phe	phénylalanine
Pim	*proviral integration site for Moloney murine leukemia virus*

PKCτ	protéine kinase C Tau
PKN1	protéine kinase N1
pM	picomole(s) par litre
$POCl_3$	oxychlorure de phosphore
pRB	*retinoblastoma protein*
Pro	proline

Q

q	*quadruplet*
Quant.	quantitatif(s)

R

RIPK3	*receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*
DYRK1A	*dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1a*
Rn	*Rattus norvegicus*
ROS	*reactive oxygen species*

S

s	*singlet*
SND1	*staphylococcal nuclease and tudor domain containing protein 1*
SOCS	*suppressor of cytokine signaling*
Ssc	*Sus scrofa*
STAT	*signal transducer and activator of transcription*

T

t	*triplet*
TA	température ambiante
TFA	acide trifluoroacétique
TLK	*Tousled-like kinase 1*

V

Val	valine
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

X

XIAP	*X-linked inhibitor of apoptosis protein*
X-Phos	2-dicyclohéxylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphényl

INTRODUCTION

I. Généralités sur le cancer

Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS),[1] le terme général de « cancer » s'applique à un grand groupe de maladies pouvant toucher n'importe quelle partie de l'organisme. On parle aussi de tumeurs malignes ou de néoplasmes. L'un des traits caractéristiques du cancer est la prolifération rapide de cellules anormales qui, au-delà de leur délimitation habituelle, peuvent envahir des parties adjacentes de l'organisme, puis essaimer dans d'autres organes. On parle alors de métastases, celles-ci étant la principale cause de décès par cancer.

Les cancers figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. En 2012, on comptait approximativement 14 millions de nouveaux cas dans le monde.[2] En France métropolitaine, le nombre de nouveaux cas de cancers a été estimé, pour l'année 2015, à 385 000 dont 211 000 chez les hommes et 174 000 chez les femmes. Pour cette même année, 149 500 décès par cancer ont été recensés (84 100 pour l'homme et 65 400 pour la femme).

L'impact économique croissant du cancer est considérable. On a estimé en 2010 à 1160 milliards de dollars le coût annuel total de la maladie dans le monde.

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde à l'origine de 8,8 millions de décès en 2015, soit près d'un décès sur 6. Les cancers ayant entraîné le plus de décès sont les suivants :

- Cancer du poumon (1,69 million de décès),
- Cancer du foie (788 000 décès),
- Cancer colorectal (774 000 décès),
- Cancer de l'estomac (754 000 décès),
- Cancer du sein (571 000 décès).

Le cancer apparaît à partir de la transformation de cellules normales en cellules tumorales, un processus passant par plusieurs étapes, avec classiquement une évolution vers une lésion précancéreuse puis vers une tumeur maligne. Ces modifications proviennent des interactions entre les facteurs génétiques propres au sujet et des agents extérieurs pouvant être classés en 3 catégories :

- Les cancérogènes physiques, comme le rayonnement ultraviolet et les radiations ionisantes,

- Les cancérogènes chimiques, comme l'amiante, les composants de la fumée du tabac, l'aflatoxine (contaminant des denrées alimentaires) ou l'arsenic (polluant de l'eau de boisson),
- Les cancérogènes biologiques, comme des infections dues à certains virus, bactéries ou parasites.

Le vieillissement est un autre facteur fondamental dans l'apparition du cancer. On observe en effet une augmentation spectaculaire de l'incidence avec l'âge, vraisemblablement due à l'accumulation des risques de cancers spécifiques tout au long de la vie, conjuguée au fait que les mécanismes de réparation tendent généralement à perdre de leur efficacité avec l'âge.

II. Facteurs de risque du cancer

Le tabagisme, la consommation d'alcool, une mauvaise alimentation et la sédentarité sont les principaux facteurs de risque dans le monde.

Certaines infections chroniques qui touchent particulièrement les pays à revenu faible ou intermédiaire sont également des facteurs de risque de cancer. Environ 15 % des cas de cancer diagnostiqués en 2012 étaient imputables à des infections cancérogènes, provoquées notamment par *Helicobacter pylori*, le papillomavirus humain (HPV), les virus de l'hépatite B et de l'hépatite C et le virus d'Epstein Barr (EBV). Les virus de l'hépatite B et de l'hépatite C, d'un côté, et certains types de HPV de l'autre, augmentent respectivement le risque de développer un cancer du foie ou du col de l'utérus. Par ailleurs, l'infection à VIH (virus de l'immunodéficience humaine) accroît fortement le risque de développer un cancer comme celui du col de l'utérus.

Actuellement 30 à 50 % des cancers peuvent être prévenus. La prévention suppose la réduction des facteurs de risque et l'application des stratégies préventives existantes fondées sur des bases factuelles. On peut aussi réduire la charge du cancer par le dépistage précoce et la prise en charge des patients. Avec une détection précoce et un traitement adéquat, les chances de guérison sont grandes pour de nombreux cancers.

Le tabagisme est le facteur de risque le plus important du cancer, responsable d'environ 22 % du total des décès.[3] Les vaccinations contre le HPV et le virus de l'hépatite pourraient, quant à elles, prévenir 1 million de cas annuels de cancer dans le monde.[4]

III. Dépistage, diagnostic et prise en charge du cancer

A. Dépistage

Le dépistage vise à repérer les sujets asymptomatiques présentant des anomalies évocatrices d'un cancer particulier ou d'un stade précancéreux et à les adresser rapidement à des structures appropriées pour le diagnostic et le traitement.

Les programmes de dépistage peuvent être efficaces pour certains types de cancers, en utilisant et en appliquant correctement les tests appropriés dans le cadre du dépistage et en assurant la qualité des interventions. Quelques exemples de méthodes de dépistage :

- L'inspection visuelle après application d'acide acétique (IVA) pour le cancer du col de l'utérus,
- Le test de dépistage du HPV pour le cancer du col de l'utérus,
- Le test de Papanicolaou (ou frottis cervico-utérin) pour le dépistage du cancer du col de l'utérus,
- La mammographie pour le dépistage du cancer du sein.

B. Diagnostic

Un traitement a plus de chances d'être efficace, avec une meilleure probabilité de survie, une réduction de la morbidité et des coûts moins élevés, si le cancer est diagnostiqué précocement. Des améliorations sensibles peuvent être apportées à la vie des patients en cas de diagnostic précoce et si l'on évite les retards dans le traitement.

Le diagnostic précoce comprend 3 étapes qui doivent être intégrées et assurées en temps opportun :

1. La sensibilisation et l'accès aux soins,
2. L'évaluation clinique, le diagnostic et la détermination du stade,
3. L'accès au traitement.

Le diagnostic précoce est utile dans toutes les situations pour la majorité des cancers. Lorsque le diagnostic intervient à un stade avancé, un traitement curatif n'est parfois plus possible. Des programmes peuvent être conçus pour réduire les retards et les obstacles et permettre aux patients d'avoir accès suffisamment tôt à un traitement.

Par ailleurs, l'exactitude du diagnostic est essentielle pour administrer un traitement adapté et efficace car chaque type de cancer nécessite un traitement spécifique.

C. Traitements du cancer

La première étape importante dans la prise en charge d'un cancer consiste à déterminer le but du traitement ou des soins palliatifs. Un objectif primordial est généralement de guérir la maladie ou de prolonger l'espérance de vie. Améliorer la qualité de vie des patients est aussi un objectif de premier plan. Les soins de support (dont le soutien psychologique) et les soins palliatifs peuvent y contribuer.

La prise en charge d'un cancer est typiquement basée sur une triade thérapeutique alliant différents types de traitement : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Cette triade thérapeutique pourra être également renforcée par d'autres traitements tels que l'hormonothérapie (principalement utilisée dans certains cancers du sein, de la prostate ou encore de la thyroïde) ou l'immunothérapie (qui consiste à stimuler le système immunitaire du patient afin que celui agisse sur les cellules cancéreuses).

1. Chirurgie (ou exérèse)

Selon l'Institut National du Cancer, la chirurgie (ou ablation/exérèse tumorale) est un traitement local du cancer qui a pour objectif d'enlever la tumeur, les ganglions correspondants et les éventuelles métastases.[5]

Les effets secondaires de la chirurgie sont en partie liés au type de chirurgie réalisée, à la zone opérée ainsi qu'à l'état de santé du patient. Ils surviennent tout de suite après l'opération, à moyen ou long terme, et peuvent être transitoires ou définitifs. Certaines séquelles sont prévisibles voire attendues et sont donc prises en charge par les équipes soignantes. Parmi les séquelles, on pourra trouver, de façon non exhaustive : la douleur, des nausées et vomissements, des infections, des thromboses veineuses, des hémorragies, ou encore des œdèmes.

La chirurgie reste le principal traitement des tumeurs cancéreuses solides, elle peut être utilisée seule ou en combinaison avec d'autres types de traitements (radiothérapie, chimiothérapie).

2. Radiothérapie

La radiothérapie est un traitement locorégional des cancers.[6] Elle consiste en l'utilisation de rayonnements pour détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier.

L'irradiation a pour but de détruire les cellules cancéreuses tout en préservant le mieux possible les tissus sains et les organes avoisinants. Plus de 50 % des patients atteints d'un cancer seront traités par radiothérapie à une étape de leur parcours de soin.

On distingue deux types de thérapie par rayonnements : la radiothérapie externe (dont les rayons sont émis en faisceaux ; ils traversent la peau et les tissus pour atteindre la tumeur), et la curiethérapie (les rayons sont émis par une source radioactive directement implantée à l'intérieur du corps du patient).

La difficulté la plus importante liée à la radiothérapie vient du fait qu'en irradiant une tumeur, il sera impossible d'éviter l'irradiation des tissus sains environnants. En effet, il y a un risque d'altérations des cellules saines situées à proximité de la zone qu'on souhaite traiter. Cependant, les cellules saines sont capables de se régénérer, à l'inverse des cellules cancéreuses.

On distingue deux types d'effets secondaires associés à ce traitement : les effets secondaires immédiats, également appelés aigus ou précoces, qui se produisent pendant le traitement et dans les quelques semaines qui le suivent ; et les effets secondaires tardifs, également appelés complications ou séquelles.

Il existe une grande variabilité d'effets indésirables entre les individus qui dépend notamment de la localisation de la tumeur, du volume irradié, de la dose délivrée, de la radiosensibilité du patient ainsi que de son état général.

Parmi les effets secondaires liés à la radiothérapie, on pourra retrouver la fatigue, des troubles sexuels, des problèmes de fertilité, des réactions inflammatoires (œdèmes), des nausées et des vomissements ainsi que des effets hématologiques.

3. Chimiothérapie

La chimiothérapie correspond à l'administration de médicaments qui agissent sur les cellules cancéreuses, soit en les détruisant, soit en les empêchant de se multiplier. Comme l'hormonothérapie, la chimiothérapie présente la capacité d'agir sur l'intégralité de l'organisme.

Il existe deux types de chimiothérapie, se distinguant en fonction du moment où elles sont utilisées dans le traitement :

- La chimiothérapie néo-adjuvante : l'administration se fait avant tout autre traitement. Elle est généralement utilisée pour réduire la taille de la tumeur, afin de faciliter son élimination par chirurgie et/ou radiothérapie.
- La chimiothérapie adjuvante : l'administration se fait après retrait de tout ou partie de la tumeur. La chimiothérapie adjuvante est souvent prescrite lorsque : le risque

de récidive est élevé malgré l'ablation de la tumeur, ou quand la tumeur est de taille importante et/ou à un stade avancé. Elle est prescrite lorsque la tumeur est chimiosensible, même en cas de métastases. L'objectif d'une chimiothérapie adjuvante est de diminuer fortement le risque de récidives ou la formation de métastases en éliminant les cellules tumorales disséminées dans l'organisme.

Il existe actuellement plus d'une centaine de principes actifs indiqués dans le traitement du cancer - utilisés seuls ou en association à d'autres traitements. Parmi les traitements utilisés, il faut distinguer les chimiothérapies dites « conventionnelles » des thérapies ciblées. Les chimiothérapies « conventionnelles » agissent sur le matériel génétique (intercalation entre deux brins d'ADN (ex. doxorubicine, ADRIBLASTINE®), alkylation de l'ADN (ex. cyclophosphamide, ENDOXAN®) ou sur des complexes cellulaires qui y sont associés (stabilisation des microtubules (ex. paclitaxel, TAXOL®), inhibition des topoisomérases (ex. irinotécan, HYCAMTIN®), empêchant la multiplication et/ou la survie des cellules tumorales. Ces modes d'action ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses. Ces molécules vont également agir sur toutes les cellules saines à renouvellement rapide de l'organisme, ce qui va générer un nombre très important d'effets indésirables. Parmi ceux-ci, les effets indésirables les plus fréquemment rencontrés sont :

- Des mucites (inflammations des muqueuses), notamment buccales,
- Des troubles digestifs tels que des nausées et vomissements,
- Une toxicité hématologiques qui peut affecter :
    - Les érythrocytes, provoquant des anémies,
    - Les lignées leucocytaires, entraînant des dépressions du système immunitaire qui peuvent conduire à des infections (potentiellement mortelles), à des états septiques et à la survenue de cancers secondaires,
    - Les lignées thrombocytaires, pouvant conduire à des hémorragies.
- Des atteintes des phanères, avec des alopécies (perte de cheveux), ou des toxicités unguéales (lésions des ongles pouvant être douloureuses et inesthétiques),
- Une hépatotoxicité,
- Des effets graves sur l'appareil reproducteur (stérilité),
- Une embryotoxicité et des effets tératogènes.

D’autres effets indésirables graves générés par différents mécanismes existent et peuvent être spécifiques de certaines classes pharmacologiques (ex. toxicité cardiaque (anthracyclines), rénales (ex. méthotrexate, cyclophosphamide), pulmonaire (ex. bléomycine), atteintes du système nerveux central).

Ainsi, afin d’augmenter l’efficacité des traitements et de diminuer les effets indésirables, les chercheurs ont développé de nouvelles thérapies dites « ciblées », c’est-à-dire capables d’agir préférentiellement sur des mécanismes oncogéniques. La découverte de nouveaux mécanismes cellulaires et acteurs biologiques impliqués dans l’oncogenèse ne font qu’augmenter les cibles potentielles pour développer ces composés plus sélectifs. Les thérapies ciblées développées à l’heure actuelle agissent sur des cibles impliquées dans des voies de signalisation oncogéniques, dans l’angiogénèse, l’apoptose ou encore la réparation de l’ADN. Parmi ces cibles, une famille essentielle à la mécanistique cellulaire et jouant un rôle dans de nombreuses voies de signalisation oncogéniques attire particulièrement l’attention depuis plusieurs décennies : les protéines kinases.

IV. Les protéines kinases

A. Rôle physiologique

Les kinases sont des enzymes du groupe des phospho-transférases, catalysant les réactions de phosphorylation par l’ajout d’un groupement phosphate, provenant de l’ATP (*adénosine-5’-triphosphate*), sur une molécule cible appelée « substrat », qui peut être une protéine, un acide nucléique, un lipide, un sucre ou une autre kinase.[7]

Les protéines kinases appartiennent à un groupe d’enzymes qui phosphorylent une fonction hydroxyle de la chaîne latérale d’un résidu sérine (Ser), thréonine (Thr) ou tyrosine d’un substrat protéique. De manière générale, la phosphorylation protéique est contrôlée par l’action coordonnée de protéines kinases et de phosphatases, qui ajoutent et retirent respectivement un phosphate d’un substrat (**Figure 1**).

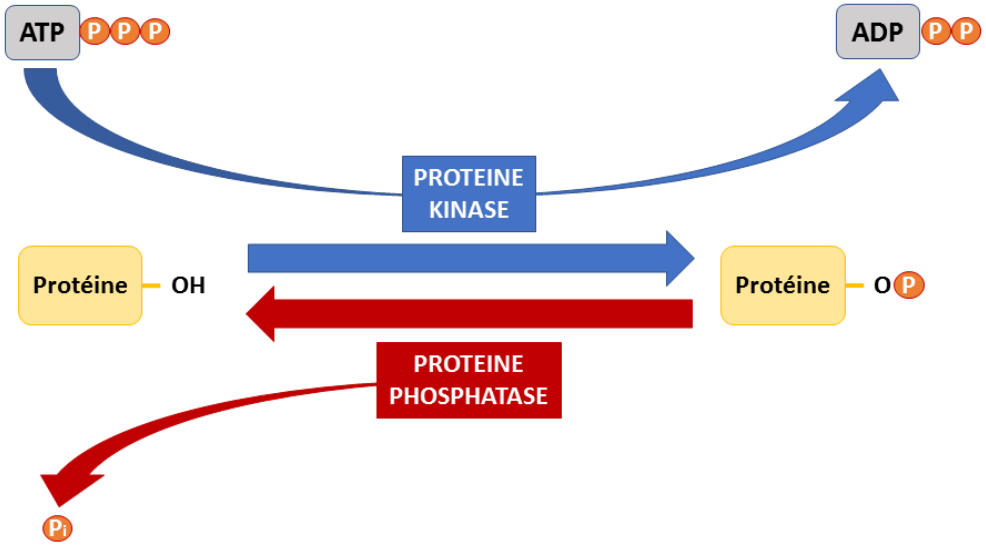


Figure 1. Mécanisme général du contrôle de la phosphorylation d'un substrat

Initialement, la phosphorylation protéique, bien que connue, n'était perçue que comme étant une conséquence de réactions métaboliques. Ce n'est qu'en 1956, avec les travaux de Krebs et Fischer[8] sur la glycogène synthase, et en 1968, avec ceux de Walsh[9] concernant la protéine kinase AMPc (*adénosine-3',5'-monophosphate cyclique*)-dépendante (cAPK) que la phosphorylation sera considérée comme un mécanisme de régulation. A partir de là, les travaux sur cette famille d'enzymes vont se multiplier, mettant au premier plan le rôle fondamental des modifications post-traductionnelles. En effet, la phosphorylation d'un substrat protéique peut engendrer une amplification ou une inhibition de son activité, provoquer un changement de localisation cellulaire, ou encore un changement de structure qui permet son association avec d'autres protéines. Les mécanismes de phosphorylation-déphosphorylation sont extrêmement fréquents pour réguler l'activité de la cellule.[10] Ainsi, les protéines kinases peuvent réguler une grande variété de processus cellulaires, parmi lesquels le métabolisme des carbohydrates et des lipides, la biosynthèse des neurotransmetteurs, la transcription et la réplication de l'ADN, le transport des organelles et la différenciation cellulaire.

On estime que plus de la moitié des protéines humaines seraient régulées de la sorte, faisant de la phosphorylation un des plus importants mécanismes de régulation post-traductionnelle.

A la fin du siècle dernier, on estimait à près de 2000 le nombre total de protéines kinases contenues dans les génomes eucaryotes. Finalement, le séquençage du génome humain associé aux travaux de Hanks et Hunter[11] et à ceux de Manning[12] permettra le recensement de 518 protéines kinases humaines. Ce chiffre place les kinases comme l'une des plus larges familles de protéines humaines, constituant environ 1,7 % du génome humain.

Parmi les 518 protéines kinases humaines, regroupées sous le terme de « kinome », 478 possèdent un (voire deux) domaine(s) catalytique(s) de type eucaryote (ePK), tandis que les 40 restantes sont considérées comme « atypiques » (aPK). Pour ces dernières, le domaine catalytique est différent de celui des kinases ePK mais l'activité protéine kinase a été cependant démontrée.[12] Le kinome a ainsi été scindé en 10 groupes phylogénétiques, basés principalement sur les identités de séquence entre les domaines catalytiques :

- AGC (contenant les familles PKA, PKG, PKC),
- CAMK (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase*),
- CMGC (contenant les familles CDK, MAPK, GSK3, CLK),
- CK1 (*casein kinase 1*),
- STE (*homologs of yeast sterile 7, sterile 11, sterile 20 kinases*),
- TK (*tyrosine kinase*),
- TKL (*tyrosine kinase-like*),
- RGC (*receptor guanylate cyclase*),
- « Autres ePK » (*eukariotic protein kinases*),
- Les kinases atypiques.

D'autres variations existent entre les protéines kinases. Elles se localisent en dehors de ces domaines catalytiques et consistent, la plupart du temps, en une addition de domaines ou sous-unités ayant un rôle dans la régulation de l'enzyme.

B. Implication dans les maladies et premiers médicaments

Certaines kinases peuvent se retrouver constitutivement activées, dès lors que leurs mécanismes de régulation échouent, qu'elles sont surexprimées ou bien qu'elles subissent des mutations. Ces dérégulations peuvent avoir des conséquences dramatiques telles que l'apparition de cancer, de maladies immunologiques, cardiovasculaires, neurologiques, métaboliques ou encore infectieuses.

La leucémie myéloïde chronique (LMC), un cancer du sang, fut la première maladie grave à être traitée efficacement par un inhibiteur de kinase. C'est en 1990, plus précisément, que l'activité tyrosine kinase constitutive de la protéine de fusion Bcr-Abl (*breakpoint cluster region fused with the Abelson gene*), indispensable à la prolifération de la LMC, a été mise en évidence. Ces résultats n'ont pas tardé à intéresser les chercheurs qui se sont mis à développer

une multitude de petites molécules chimiques susceptibles d'inhiber l'activité catalytique de cette oncoprotéine. Deux années plus tard, et après de nombreux échecs de molécules trop toxiques, ils parvinrent à identifier une molécule : l'imatinib (GLIVEC®, **Figure 2**).[13,14]

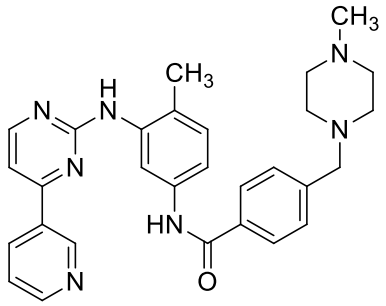


Figure 2. Structure de l'imatinib (GLIVEC®)

Alors que la majorité des chimiothérapies conventionnelles étaient peu efficaces et hautement toxiques vis-à-vis des cellules saines, l'imatinib (GLIVEC®) a montré la preuve de son efficacité, illustrant pour la première fois le concept de « thérapie ciblée ». Cette molécule s'est révélée capable de stopper efficacement la leucémie, tout en présentant très peu d'effets indésirables. Son autorisation de mise sur le marché (AMM) a été obtenue en 2001 aux États-Unis et un an plus tard en Europe. Son activité remarquable a fait envisager son utilisation dans d'autres tumeurs présentant une protéine à activité tyrosine kinase dérégulée. C'est ainsi que l'imatinib s'est révélé efficace contre les tumeurs du tube digestif appelées GIST (*gastro-intestinal stromal tumors*) en inhibant le domaine tyrosine kinase du récepteur c-Kit. Devant de tels résultats, d'autres molécules ont ensuite rapidement obtenu leur AMM : on en dénombre actuellement plus de 25 sur le marché, indiquées dans diverses pathologies.[15] Bien que ce nombre soit faible comparé à d'autres classes thérapeutiques, du fait notamment de l'intérêt tardif pour les kinases, plus d'une centaine d'inhibiteurs sont actuellement en développement clinique.

Le champ d'exploration des kinases reste donc encore vaste. Certaines d'entre elles présentent des propriétés particulièrement intéressantes en intervenant dans des fonctions annexes essentielles à la survie des cancers, comme l'établissement de mécanismes de chimiorésistance. C'est le cas notamment des kinases Pim (*proviral integration site for Moloney murine leukemia virus*), une famille d'oncoprotéines à activité sérine/thréonine kinase impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que la survie, la prolifération ou la différenciation cellulaire.

V. Les kinases Pim

A. Généralités

Les kinases Pim sont des oncoprotéines appartenant à une famille de sérine/thréonine kinases du groupe CAMK (*calcium/calmoduline-dependent kinases*). Il existe trois isoformes différentes de ces kinases (Pim-1, Pim-2 et Pim-3) possédant de forts taux d'homologie[16] : Pim-1 et Pim-3 sont identiques à 71 %, tandis que Pim-1 et Pim-2 partagent 61 % de leurs séquences protéiques.[17] En conséquence de ces fortes homologies, des redondances fonctionnelles des trois kinases Pim ont été démontrées *in vitro*[18–20] et *in vivo*.[21–23]

Bien que les trois isoformes soient généralement ubiquitaires, il existe des différences au niveau de leur expression[24,25] : Pim-1 est présente à des taux plus élevés au sein des cellules hématopoïétiques ; Pim-2 est retrouvée préférentiellement au sein des tissus cérébraux et lymphoïdes ; Pim-3 est présente au niveau des cellules rénales, cérébrales et mammaires. De plus, il a été constaté des différences d'expression de ces kinases en fonction de l'âge. On retrouve ainsi de forts taux protéiques de ces kinases au niveau du foie et de la rate lors de l'hématopoïèse fœtale, mais quasiment aucune expression chez l'adulte dans ces mêmes tissus.[26]

Grâce à l'identification de sites alternatifs d'initiation de la transcription, il a été déterminé que le gène *pim-1* codait pour deux isoformes, Pim-1S (34 kDa) et Pim-1L (44 kDa), présentant des activités similaires *in vitro*.[27] Le même phénomène a été décrit pour le gène *pim-2*, permettant l'identification de trois protéines de 35, 37 et 40 kDa. Dans le cas du gène *pim-3*, cependant, une seule protéine a été décrite.

Les kinases Pim sont principalement régulées par leur expression et leur stabilisation protéique. En effet, ces enzymes ne présentent pas de domaine régulateur et sont constitutivement actives quand elles sont exprimées.[28] Cette activité constitutive est liée à la présence de résidus acides dans la boucle d'activation A (Asp200 pour Pim-1, Asp196 et Asp198 pour Pim-2) qui forment des ponts salins avec des résidus basiques de la boucle catalytique et du lobe N-terminal et conduit à une conformation active des kinases sans nécessité d'une phosphorylation préalable.[29,30] Ainsi, leur régulation s'effectue principalement par stabilisation, par exemple *via* le couple de protéines chaperonnes HSP70/HSP90 (*heat shock protein 70 and 90 kDa*). Ainsi, HSP70 induira la dégradation protéosomique de Pim-1, diminuant ainsi son activité. HSP 90 aura, quant à elle, un effet stabilisant sur Pim-1, augmentant ainsi les taux protéiques de la kinase au sein des cellules, ce qui contribuera à accroître ses effets.[31–33]

Le premier substrat de la kinase Pim-1 a été identifié en 1998 par l'équipe de Leverson *et al.* Cette protéine, nommée à l'époque « co-activateur p100 » et depuis renommée SND1 (*staphylococcal nuclease and tudor domain containing protein 1*) est une protéine multifonctionnelle impliquée notamment dans des processus clef centrés autour de l'ARN (*acide ribonucléique*). Il semblerait également qu'elle permette à la kinase Pim-1 de trouver d'autres substrats, tel que le facteur de transcription c-Myb dont l'activité est dépendante d'une phosphorylation Pim-dépendante. [34]

Depuis, d'autres substrats des kinases Pim ont été identifiés, permettant d'avoir une meilleure compréhension de ces protéines et de leur implication en cancérologie.

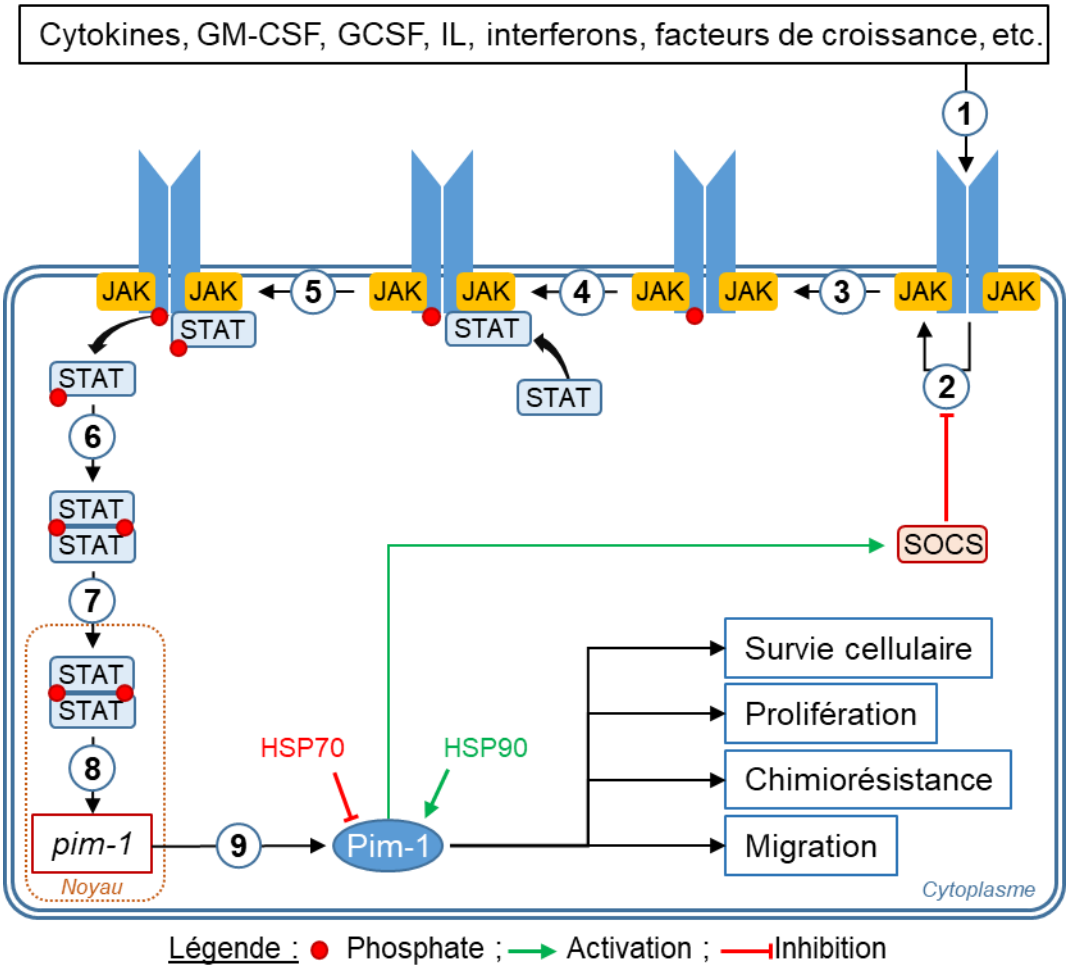
B. La place des kinases Pim dans les voies de signalisation cellulaires

1. Voies de signalisation impliquées dans l'expression de Pim-1

Les gènes *pim* sont des gènes dont la transcription est induite en réponse à un large panel de facteurs de croissance (ex. interleukines (IL), GM-CSF (g*ranulocyte-macrophage colony-stimulating factor)*, GC-SF (*granulocyte colony-stimulating factor*), interférons).[35,36] La majorité de ces facteurs transmettent leurs signaux par la voie de signalisation JAK/STATs[37] (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*, **Figure 3**), plaçant cette voie de signalisation à un poste central dans la régulation de l'expression des gènes *pim*.[17,22]

La voie de signalisation JAK/STATs est activée par la liaison de cytokines à leurs récepteurs membranaires (**Figure 3**, étapes **1** et **2**). La kinase JAK phosphoryle ensuite le domaine cytoplasmique du récepteur (**Figure 3**, étape **3**), créant ainsi un site de recrutement pour les STATs ainsi que pour d'autres protéines de signalisation (**Figure 3**, étape **4**). L'activation des STATs *via* leur phosphorylation par JAK (**Figure 3**, étape **5**) conduit à leur dimérisation (**Figure 3**, étape **6**) et à leur translocation nucléaire (**Figure 3**, étape **7**). Dans le noyau, elles régulent l'expression de gènes cibles en se liant à leurs régions promotrices (**Figure 3**, étape **8**). STAT3 et STAT5 se lient directement à la région promotrice du gène *pim-1*, augmentant ainsi l'expression de ce gène (**Figure 3**, étape **9**). De plus, la kinase Pim-1 est capable d'exercer un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation JAK/STATs en activant les protéines SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) 1 et 3, un groupe de protéines régulatrices qui agissent comme des suppresseurs de tumeur. On pense que cette boucle de rétrocontrôle est impliquée dans la régulation des protéines STATs après qu'elles aient été activées par des cytokines pendant la croissance normale des cellules.

L'expression des trois gènes *pim* est également induite par l'activation de facteurs de transcription situés en aval des voies de signalisation des facteurs de croissance, tel que le facteur NF-κB (*nuclear factor of kappa light chain gene enchancer in B cells*) qui va augmenter l'expression des kinases Pim en supprimant l'atténuation transcriptionnelle.



1) Fixation et dimérisation des récepteurs transmembranaires ; 2) Activation de JAK ; 3) Phosphorylation du récepteur ; 4) Recrutement des protéines STATs ; 5) Phosporylation des protéines STATs ; 6) Dimérisation des protéines STATs ; 7) Translocation nucléaire du dimère STATs ; 8) Fixation sur la région promotrice du gène pim-1 *; 9) expression de Pim-1.*

Figure 3. Place de la kinase Pim-1 dans la voie de signalisation JAK/STATs

2. Rôles physiologiques des kinases Pim

Les gènes *pim* sont hautement conservés au cours de l'évolution des vertébrés. Cependant, les fonctions directes et indirectes des kinases Pim ne sont toujours pas bien définies à l'heure actuelle. L'inactivation d'un ou deux des trois membres des kinases Pim aboutit à des souris viables, fertiles et sans anomalies phénotypiques apparentes. Cependant, l'inactivation des trois kinases Pim conduit à des retards de croissance ainsi qu'à une réduction de la taille corporelle. Cette diminution de la taille corporelle est principalement corrélée à une diminution du nombre

de cellules, révélant ainsi l'implication de cette famille de kinase dans le contrôle de la prolifération et du cycle cellulaire. De plus, ces souris invalidées pour les trois kinases Pim présentent également des réponses cytokiniques plus faibles au niveau des cellules hématopoïétiques. Pim-1 et Pim-3 semblent jouer un rôle majeur dans la prolifération des cellules pré-B tardives médiée par l'IL-7 tandis que Pim-2 semble jouer un rôle plus important dans la prolifération des cellules T périphériques. Il a également été démontré que Pim-1 semble être un modulateur clé dans la réponse à l'IL-3.[29] De nouvelles analyses phénotypiques, réalisées sur cette même lignée de souris, ont permis de déceler des déficiences au sein des cellules souches hématopoïétiques sur les plans de l'auto-renouvèlement et de la repopulation à long terme de la moelle osseuse.[22,38] Cependant, les conséquences d'une inhibition des trois kinases Pim sur un modèle non inactivé pour ces trois kinases sont encore inconnues.

3. Mécanismes affectant l'expression de Pim-1

Il a été démontré que certaines mutations ou réarrangement chromosomiques peuvent affecter l'expression des kinases Pim, notamment Pim-1. C'est le cas de la mutation FLT3-ITD (*FMS-like tyrosine kinase 3 - internal tandem duplication*), fréquente dans les LAM (leucémies aiguës myéloïdes). Ce gène muté code pour un récepteur FLT3 constitutivement actif et est un marqueur de mauvais pronostic en cancérologie.[39]

Dans une cellule saine, l'activation des récepteurs FLT3 non-mutés donnera lieu à la phosphorylation de la protéine STAT5 qui, comme expliqué précédemment, induira l'expression de Pim-1 dans les cellules. Dans le cas d'une mutation FLT3-ITD, l'activation constitutive de ces récepteurs conduira à une surexpression de Pim-1, même en absence de cytokines, *via* une suractivation de STAT5.

Certains réarrangements chromosomiques peuvent également induire des surecpression de Pim-1. Ainsi, la protéine de fusion Bcr-Abl, issue du gène de fusion *Bcr-Abl* obtenu par translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 est retrouvée chez la quasi-totalité des patients atteints de LMC. Cette oncoprotéine induit une surexpression dePim-1 en activant la protéine STAT5. Il a été démontré que la surexpression de Pim-1 dans ces cellules cancéreuses leur permettait de mieux résister à l'apoptose. De plus, toutes les kinases Pim phosphorylent le domaine intracellulaire du récepteur NOTCH1 qui augmente à son tour l'expression des kinases Pim.[40]

Enfin, l'expression de Pim-1 peut être induite par des facteurs de stress cellulaire, tel que l'hypoxie dans les tumeurs solides, protégeant ainsi les cellules de l'apoptose.[17,41]

4. Conséquences de la surexpression de Pim-1 au sein des cellules cancéreuses

Pim-1 phosphoryle et régule l'activité de nombreuses molécules impliquées dans divers processus cellulaires. Son expression dans les tissus sains est quasiment indétectable. Cependant, des taux accrus de Pim-1 ont été reportés dans diverses pathologies cancéreuses hématologiques ainsi que dans plusieurs tumeurs solides. De plus, ces taux semblent corrélés avec des stades plus avancés de la maladie voire même des stades métastatiques.[42] Cette caractéristique suggère que Pim-1 peut servir de biomarqueur utile dans le diagnostic et le pronostic de plusieurs cancers.

La surexpression expérimentale de Pim-1 dans des modèles de lignées cellulaires murines conduit à la formation de tumeurs. Cependant, une telle surexpression isolée n'est pas suffisante pour induire la tumorigenèse et nécessite des collaborations avec d'autres oncogènes activés, tels que les membres de la famille de gènes *myc*. Dans le cas des cancers hématologiques, la surexpression de *myc* associée à celles de Pim-1 ou Pim-2 a été observée dans le lymphome diffus à large cellules B (DLBCL, *diffuse large B-cell lymphoma*), ainsi que dans le sous-type blastoïde du lymphome des cellules du manteau.

La surexpression de Pim-1 semble intervenir dans l'oncogenèse selon trois axes majeurs : en promouvant la prolifération cellulaire, en inhibant l'apoptose et en favorisant les instabilités génomiques.

a. Régulation du cycle cellulaire et de la prolifération

Le cycle cellulaire est constitué d'un ensemble de processus contrôlant la division cellulaire.[37,43] Il permet à une cellule mère de se diviser pour donner deux cellules filles identiques. Il est constitué de quatre phases distinctes (**Figure 4**) :

- G_1 (*gap 1*) : première période de croissance cellulaire,
- S (*synthèse*) : la réplication de l'ADN a lieu pendant cette phase,
- G_2 (*gap 2*) : seconde période de croissance,
- M (*mitose*), qui est elle-même scindée en quatre phases (prophase, métaphase, anaphase et télophase).

L'activation de chacune de ces phases est dépendante de la progression et de la correcte complétion de la phase précédente. Les cellules qui ont arrêté de se diviser, de façon temporaire ou réversible, sont dans un état dit « de quiescence » également appelé phase G_0.

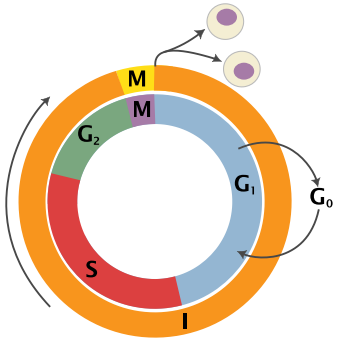


Figure 4. Le cycle cellulaire

Le bon déroulement du cycle est également assuré grâce à la présence de points de contrôle qui permettent à la cellule de s'assurer qu'un matériel génétique incomplet ou endommagé n'est pas transmis aux cellules filles. Il en existe trois principaux : G_1/S, G_2/M et le point de contrôle mitotique pendant la métaphase.

Le premier point de contrôle G_1/S, également appelé point de restriction, est une étape limitante du cycle cellulaire. Lors de celui-ci, la cellule s'assure qu'elle dispose de suffisamment de matériaux pour mener à bien la réplication du matériel génétique. Des cellules malsaines ou malnutries resteront généralement bloquées à cette étape.

Lors du point de contrôle G_2/M, la cellule s'assure qu'elle dispose de suffisamment de cytoplasme et de phospholipides pour générer deux cellules filles. La cellule s'assure également que le bon moment est venu pour se diviser. En effet, certaines situations nécessitent que de nombreuses cellules se divisent de manière concertée (par exemple, lors de la croissance d'un embryon). Cela est assuré par ce point de contrôle.

Le point de contrôle de la métaphase joue un rôle relativement mineur dans le sens où une fois que la cellule a atteint cette étape du cycle, elle est forcée de se diviser. Cependant, cela n'implique pas que ce point de contrôle n'est pas important. Lors de cette étape, la cellule s'assure que les fuseaux mitotiques se sont formés et que les chromosomes sont bien alignés sur l'axe équatorial avant le début de l'anaphase.

Ainsi, la formation d'une tumeur peut être considérée comme étant la résultante d'un mauvais contrôle du cycle cellulaire, ce qui conduira à une prolifération aberrante des cellules.

❖ **Point de contrôle G1/S :**

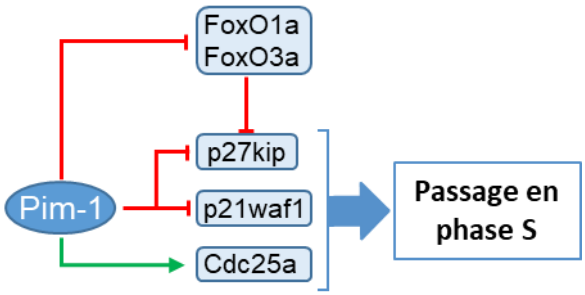


Figure 5. Rôle de Pim-1 dans le point de contrôle G_1/S

Il a été démontré que Pim-1 intervient au niveau de cette transition G_1/S en accélérant le passage en phase S de plusieurs façons (**Figure 5**).

Pim-1 phosphoryle p21waf1 au niveau du résidu Thr145, stabilisant cet inhibiteur du point de contrôle G_1/S, ce qui conduit à son accumulation cytoplasmique et donc à une prolifération cellulaire accrue.[44,45] De plus, Pim-1 inhibe également la liaison de p21waf1 à PCNA (*proliferating cell nuclear* antigen). PCNA est un facteur d'aptitude au traitement des ADN polymérases δ et ε, mieux connu pour son implication dans la synthèse et la réparation de l'ADN. Cette dissociation de p21waf1 et PCNA dans le noyau restaure la synthèse d'ADN mais conduit également à une diminution de la précision du mécanisme de réparation de l'ADN. Pim-1 phosphoryle également la kinase « point de contrôle » CHEK1, régulant son activité. Cette kinase est capable de phosphoryler différents substrats, tels que p53, Cdc25a (*cell division cycle 25 homolog A; M-phase inducer phosphatase 1)*, Cdc25c (*cell division cycle 25 homolog C; M-phase inducer phosphatase 13*) ou encore Wee1, conduisant à l'inhibition de ces kinases cycline-dépendantes et donc à l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, la kinase CHEK1 est nécessaire pour initier les processus de contrôle du bon état du matériel génétique de la cellule.[46] Par conséquent, Pim-1 accélère la réplication du matériel génétique et augmente par la même occasion le risque d'erreur au sein de celui-ci. Cette action de Pim-1 sur p21waf1, PCNA et CHEK1 pourrait être un facteur clé expliquant les instabilités chromosomiques observées dans les cellules surexprimant Pim-1.

Par ailleurs, Pim-1 phosphoryle Cdc25a, activant cette enzyme qui a pour rôle de faciliter le passage de ce point de contrôle.

Pim-1 agit également sur p27kip. Ce régulateur du point de contrôle G1/S se comporte comme un suppresseur tumoral. Pim-1 va altérer les taux protéiques et l'activité de p27kip de deux façons :[47]

- Au niveau transcriptionnel en phosphorylant et en désactivant les facteurs de transcription FOXO1a et FOXO3a (*forkhead box O 1a and 3a*), diminuant l'expression de p27kip.
- En phosphorylant directement p27kip, accentuant les interactions de celui-ci avec les protéines 14-3-3 et sa dégradation protéosomique au niveau du cytoplasme.[48]

❖ **Point de contrôle G_2/M :**

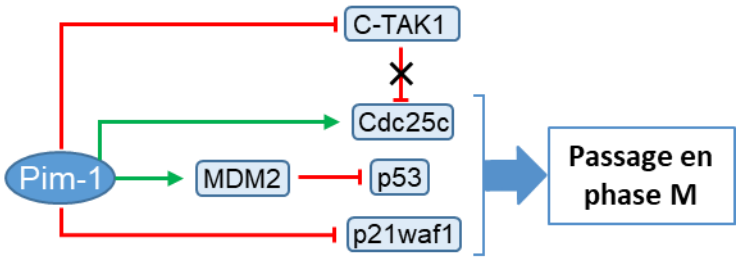


Figure 6. Rôle de Pim-1 dans le point de contrôle G_2/M

D'une manière similaire à celle du point de contrôle G_1/S, Pim-1 intervient au niveau du point de contrôle G_2/M afin de faciliter le passage de la cellule en mitose (phase M). Cet effet est obtenu grâce à l'action de Pim-1 sur plusieurs éléments cellulaires (**Figure 6**).

Ainsi, Pim-1 phosphoryle Cdc25c, activant cette enzyme qui a pour rôle de faciliter le passage de ce point de contrôle. De plus, Pim-1 phosphoryle c-TAK1, un inhibiteur de Cdc25c. La phosphorylation de c-TAK1 entraîne son inactivation, diminuant ainsi le mécanisme de sous-régulation de Cdc25c. Ces augmentations directes et indirectes de l'activité de Cdc25c conduisent donc à la prolifération cellulaire.[49,50]

De plus, la ligase MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*), une enzyme impliquée dans la dégradation du suppresseur tumoral p53, est également phosphorylée par Pim-1. L'activation de MDM2 par Pim-1 va induire la dégradation du suppresseur tumoral p53, diminuant ainsi les capacités pro-apoptotique et antiprolifératives de cette protéine.[51]

Ce point de contrôle est également contrôlé par la protéine p21waf1. L'action de Pim-1 sur cette protéine induit le passage de la cellule en mitose.

Ainsi, Pim-1 favorise la prolifération cellulaire en régulant la progression du cycle cellulaire au niveau de différents points de contrôles en affectant diverses protéines cibles.

❖ Mitose

Pim-1 facilite également le fonctionnement de l'appareil mitotique.

Il a ainsi été observé que Pim-1 est capable de phosphoryler les protéines NuMA (*nuclear mitotic apparatus*) ainsi que l'hétérochromatine HP1β.[52] Les protéines NuMA sont essentielles pour la formation du fuseau mitotique, sa stabilisation ainsi que pour sa liaison aux pôles nucléaires. La phosphorylation de NuMA par Pim-1 entraîne son association à un complexe combinant également des dynéines, des dynactines ainsi que HP1β, facilitant la mitose en assurant le correct alignement des fuseaux mitotiques et la séparation du matériel génétique de la cellule.

Il apparaît également que la surexpression de Pim-1 affecte la dynamique des fuseaux mitotiques en altérant le fonctionnement normal du complexe équatorial, contribuant ainsi à l'apparition d'anomalies génomiques, ce qui expliquerait en partie la contribution de Pim-1 dans la tumorigenèse.

b. Régulation de la survie cellulaire et de l'apoptose

Il a été observé que la surexpression de Pim-1 protégeait les cellules de l'apoptose, qu'elle soit induite par l'exposition à des facteurs de stress comme la dexaméthasone, ou qu'elle soit due au retrait de facteurs de croissance essentiels.

❖ Action de Pim-1 sur la voie de signalisation Bcl-2/BAD

Il est connu depuis de nombreuses années que l'apoptose induite par divers facteurs (ex. radiations, retrait de facteurs de croissance, glucocorticoïdes ou chimiothérapie) est inhibée par des taux élevés de protéine Bcl-2. Or ce n'est que récemment qu'il a été déterminé que Pim-1 est capable de promouvoir la survie cellulaire en influençant la voie de signalisation Bcl-2.[53,54]

La voie de signalisation pro-apoptotique associée à la protéine BAD s'effectue *via* la libération du cytochrome C du milieu mitochondrial vers le cytoplasme (**Figure 7**). Plus précisément, quand la protéine BAD n'est pas phosphorylée, elle est capable de réaliser une hétérodimérisation avec Bcl-2 et Bcl-xL, des membres d'une famille de protéines anti-apoptotiques localisées sur la membrane extérieure de la mitochondrie. Dans des conditions normales anti-apoptotiques, Bcl-2 et Bcl-xL forment des complexes hétérodimériques avec BAX, une protéine pro-apoptotique également localisée sur la membrane externe de la mitochondrie, inhibant son activité pro-apoptotique. La protéine BAD est capable de complexer les protéines Bcl-2 et Bcl-xL (**Figure 7A,** étape **1**), permettant la libération de la protéine BAX

de la membrane mitochondriale dans le cytoplasme (**Figure 7A,** étape **2**). Une fois libérée, BAX sera capable de s'homodimériser (**Figure 7A,** étape **3**), permettant la formation de pores pro-apoptotiques dans la membrane mitochondriale qui permettront le passage du cytochrome C de la mitochondrie au cytoplasme (**Figure 7A,** étape **4**), déclenchant l'apoptose (**Figure 7A,** étape **5**).

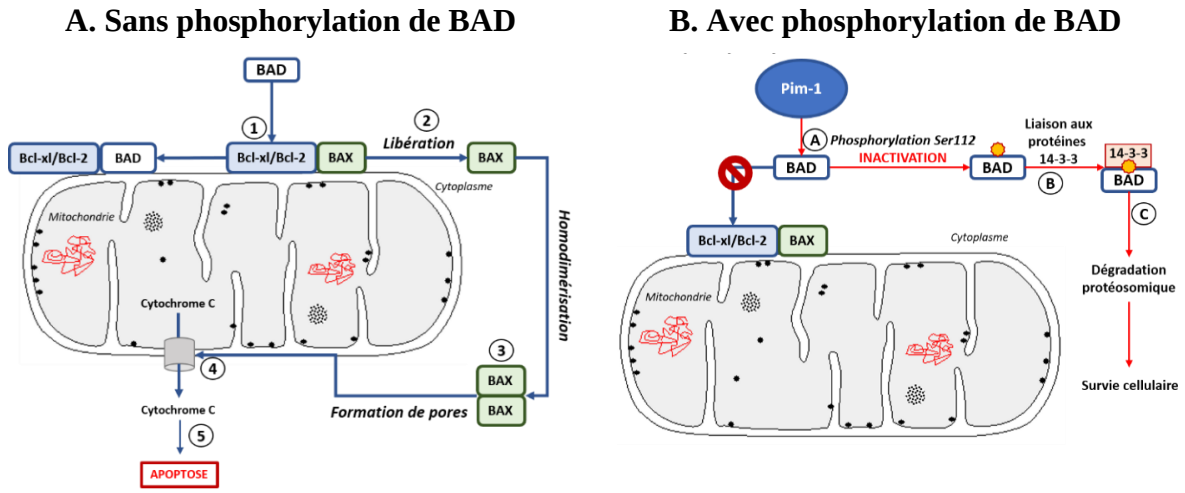


Figure 7. Voie de signalisation pro-apoptotique Bcl-2/BAD

L'un des premiers modèles moléculaires proposés pour expliquer comment Pim-1 intervient dans la survie cellulaire est basé sur l'interaction qui existe entre la kinase Pim-1 et la protéine BAD (**Figure 7B**). Il a été ainsi démontré que Pim-1 phosphoryle la sérine 112 de BAD (**Figure 7B,** étape **A**), un acide aminé essentiel dans l'inactivation de BAD. Cette phosphorylation accentue la liaison de BAD aux protéines 14-3-3 (**Figure 7B,** étape **B**), résultant en une séquestration cytoplasmique du complexe BAD-14-3-3, augmentant sa dégradation protéosomique (**Figure 7B,** étape **C**). Ainsi, la phosphorylation de BAD par Pim-1 conduit à son inactivation, promouvant par conséquent la survie cellulaire.

❖ Pim-1 et stress cellulaire

Les voies de signalisation associées à la survie cellulaire sont fréquemment activées par des stress cellulaires tels que l'hypoxie ou le stress oxydatif. De plus, des molécules antitumorales peuvent parfois induire un stress, résultant en une survie tumorale accrue.[37]

Le mécanisme associé à cet accroissement de la survie cellulaire en conditions de stress a été élucidé grâce au docétaxel. En effet, ce médicament peut induire une survie cellulaire dans des lignées cellulaires de cancer prostatique en activant la protéine STAT3, qui induira l'expression de Pim-1. A son tour, Pim-1 induira l'activation de NF-κB. Or on sait que cette

voie de signalisation régule l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xl, XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) ou encore c-IAP2. On sait également que le docétaxel induit une hausse des taux de ROS (*reactive oxygen species*), ce qui conduit à l'activation de la kinase pro-apoptotique ASK1 (*apoptosis signaling kinase 1*).

Il a été récemment prouvé que Pim-1 est capable de phosphoryler ASK1, inactivant cette enzyme (**Figure 8**). Il a également été démontré que Pim-1 pouvait être induite en cas d'hypoxie. Ainsi, Pim-1 est un élément-clef associé à la survie cellulaire dans des conditions de stress.

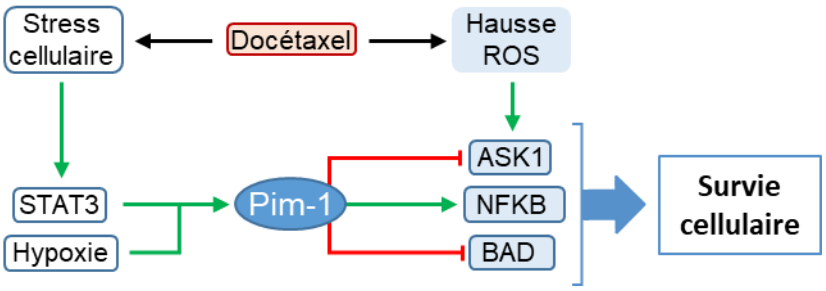


Figure 8. Rôle de Pim-1 dans la survie cellulaire dans des conditions de stress induites par le docétaxel

❖ **Autres substrats de Pim-1 associés à la survie cellulaire**

Il existe deux autres protéines que Pim-1 peut phosphoryler et qui ont la capacité de promouvoir la survie cellulaire : FOXO3a et MDM2 (**Figure 9**).

Le facteur de transcription pro-apoptotique FOXO3a, en plus d'induire l'expression de p27kip, promeut également la transcription d'autres composés pro-apoptotiques (ex. BIM, *FAS ligand*). Pim-1 est capable de phosphoryler FOXO3a, ce qui induit sa dégradation par MDM2. Pim-1 phosphoryle également MDM2, activant cette ligase qui est chargée de dégrader de nombreuses protéines (incluant pRB, HIF-1, p73, p53 NF-κB, E3F1).[55,56] MDM2 est surexprimée dans de nombreux types de cancers (ex. leucémies, lymphomes, carcinomes)[57–61] et des taux élevés de cette enzyme sont fréquemment associés à un mauvais pronostic pour le patient (ex. cancers avancés, mauvaise réponse à la chimiothérapie).[62,63]

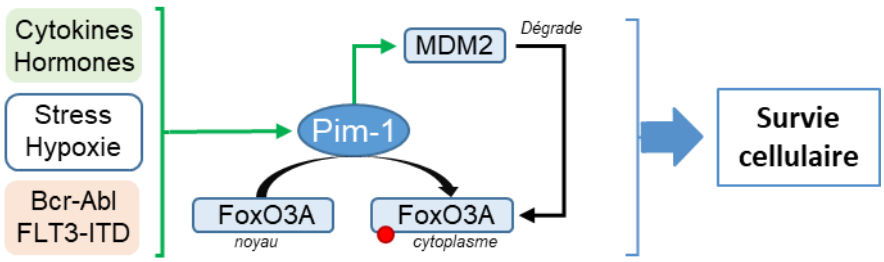


Figure 9. Autres substrats associés à la survie cellulaire

c. Rôle dans la chimiorésistance

La chimiorésistance est un terme utilisé en cancérologie pour se référer à un certain nombre de mécanismes qui réduisent l'efficacité des composés chimiothérapeutiques. Le développement clinique d'une résistance aux chimiothérapies est l'un des problèmes majeurs, responsable des échecs thérapeutiques. Ces mécanismes de chimiorésistance peuvent être opérant dès le début du traitement (on parle de résistance « intrinsèque ») ou se développer au cours du traitement (désignés sous le terme de résistances « acquises »). Ces dernières peuvent être dues à une expression accrue et/ou à des mutations de la protéine cible, à l'activation des voies de signalisation de survie cellulaire, ou encore à des hausses des mécanismes d'efflux.

La chimiorésistance induite par Pim-1 est basée, entre autre, sur la capacité qu'a cette kinase de phosphoryler et d'activer la kinase Etk. Celle-ci promeut la survie cellulaire en inhibant l'action du suppresseur tumoral p53.[64]

Pim-1 est également capable d'interagir avec certains transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*), une superfamille de protéines transmembranaires qui permettent l'efflux d'un large panel de composés, majoritairement hydrophobes, hors de la cellule. Cette famille contient notamment la glycoprotéine P (Pgp, *p-glycoprotein*, également appelée ABCB1 ou MDR1 (*multidrug resistance protein 1*)), le transporteur ABCG2 et la protéine BCRP (*breast cancer resistance protein*). Pim-1 est capable de phosphoryler ces transporteurs, ce qui va augmenter leur stabilité et permettre ainsi d'accroitre leur multimérisation et leur expression membranaire, renforçant ainsi les mécanismes d'efflux des principes actifs liés à ces transporteurs.[65,66]

d. Fonctions promigratoires

Plusieurs substrats des kinases Pim sont impliqués dans la régulation de la mobilité cellulaire. En phosphorylant ces protéines ou en agissant indirectement sur d'autres facteurs de régulation, les kinases Pim promeuvent non seulement la mobilité des cellules cancéreuses mais également la migration des cellules hématopoïétiques ainsi que le comportement angiogénique des cellules endothéliales.

Le premier substrat associé à la mobilité cellulaire identifié est le CXCR4 (*C-X-C motif chemokine receptor 4*), qui est essentiel au phénomène de « *homing* » des cellules souches hémaotopoïétiques.[67] L'inactivation de Pim-1 chez des souris conduit à une diminution du nombre de cellules sanguines et de plaquettes, suggérant un rôle de Pim-1 dans la reconstitution de la moelle osseuse. De plus, il a été démontré que Pim-1 et Pim-3, mais pas Pim-2, phosphorylent CXCR4, conduisant à une augmentation de l'expression du récepteur au niveau

de la membrane cellulaire ainsi qu'à une migration plus importante vers CXCL12 (*CXC ligand 12*), un ligand de CXCR4.[68]

La voie de signalisation CXCR4/CXCL12 joue un rôle important dans la migration des cellules hématopoïétiques saines et malignes. Ainsi, il a été démontré que, pour certains cancers hématologiques (LAM, DLBCL, leucémie lymphoïde chronique), le niveau d'expression de Pim-1 était corrélé à l'hyperphosphorylation de CXCR4 et que la sous-régulation ou l'inhibition de Pim-1 dans ces mêmes cellules diminuaient également l'expression membranaire de CXCR4. [68,69] Cette voie de signalisation est également connue pour contrôler la migration et l'invasion des cellules cancéreuses adhérentes, participant ainsi à la formation de métastases[70,71]. De manière concordante, l'inhibition de Pim-1 semble limiter les capacités invasives des cellules de cancer de la prostate PC-3.[72,73]

Depuis, d'autres substrats des kinases Pim ont été identifiés comme contributeurs des effets promigratoires de ces kinases. C'est le cas notamment des facteurs de transcriptions NFATC1 (*nuclear factor of activated T-cell 1*), FOXP3 (*forkhead box P3*) et NOTCH1. Il a été prouvé que le facteur de transcription NFATC1, qui joue un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire, était impliqué dans la progression et les capacités invasives de certains cancers.[74] De plus, NFATC1 est fortement exprimé dans diverses lignées cellulaires de cancers de la prostate (notamment la lignée cellulaire PC-3) mais pas chez les cellules saines.[75,76] De façon similaire aux kinases Pim, la surexpression de NFATC1 accroit la mobilité des cellules PC-3. Cependant l'inhibition des kinases Pim par l'inhibiteur DHPCC-9 conduit à une suppression totale des effets promigratoires de NFATC1, suggérant que la phosphorylation de NFATC1 par les kinases Pim est nécessaire pour que NFATC1, ou un de ses effecteurs partagés avec les kinases Pim, exercent leur activité.[72]

Un de ces effecteurs semble être la COX2 (*cyclooxygénase 2*), dont le gène est un gène cible de NFATC1 et qui permet à celui-ci de promouvoir la migration invasive des cellules de cancer du sein.[74,77] COX2 est un facteur pro-inflammatoire et pro-angiogénique qui catalyse la production de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. L'expression de COX2 est accrue dans les lignées cellulaires PC-3 surexprimant Pim-1 et est diminuée quand l'expression ou l'activité de Pim-1 sont inhibées.[78]

Dans les cellules de cancer gastrique, il a été montré que les protéines GSK3B et FOXP3 sont capables d'inhiber l'expression de COX2 ainsi que la migration des cellules cancéreuses.[79,80] Ces deux protéines sont phosphorylées et inactivées par les kinases Pim. Le facteur de transcription FOXP3 est un biomarqueur des cellules T régulatrice qui accroit

l'expression de la kinase Pim-2.[81] Il peut cependant agir comme un suppresseur tumoral et son gène, localisé au niveau du chromosome X, est fréquemment inactivé dans les cancers du sein et de la prostate.[82] Il a été démontré que Pim-2 inhibait les fonctions immunosuppressives des lymphocytes T régulateurs en phosphorylant plusieurs résidus de FOXP3 au niveau N-terminal, tandis que Pim-1 phosphorylait 2 résidus localisés au niveau C-terminal.[78,83,84] Cette phosphorylation par Pim-1 régule l'habilité de FOXP3 à inhiber la migration des cellules PC-3. La kinase GSK3β est également phosphorylée par Pim-1 et il semblerait que cette phosphorylation (qui se réalise sur le résidu Ser9 du site régulateur négatif), contrairement à celle de FOXP3, permette d'accroître l'expression de COX2.[78]

Une dérégulation de la signalisation NOTCH a été observée dans des cancers solides et hématologiques où elle est associée à des migrations, des invasions et des croissances métastatiques accrues.[85,86] Les récepteurs NOTCH sont des phosphoprotéines mais les rôles des diverses modifications post-traductionnelles qu'ils peuvent subir n'ont pas encore été totalement élucidés. L'activation de cette voie de signalisation par son ligand naturel Jagged1 augmente les capacités migratoires des cellules PC-3. Il a été prouvé que les trois kinases Pim phosphorylent le récepteur NOTCH1 au niveau du résidu sérine 2162.[40] Ce résidu est situé à proximité du domaine de localisation nucléaire qui est nécessaire à la translocation du domaine intracellulaire N1ICD (*NOTCH1 intra-cellular domain)* de NOTCH1 au niveau du noyau après activation et clivage du récepteur. La phosphorylation de NOTCH1 par Pim promeut la translocation nucléaire du N1ICD, augmentant ainsi ses effets transactivateurs sur ses gènes cibles, notamment ceux des kinases Pim.[40]

C. Analyses structurales de *Hs*Pim-1

La kinase *Hs*Pim-1 présente une structure typique constituée de deux lobes : un domaine amino-terminal (N-terminal, résidus 33-121) formé principalement de feuillets β et un domaine carboxy-terminal (C-terminal, résidus 128-305) comportant des hélices α, les deux étant reliés par une région charnière (ou *Hinge,* résidus 121-126). La poche catalytique (résidus 29-131), site de fixation de l'ATP, se situe entre les deux lobes et est délimitée par la région charnière, la boucle G (résidus 44-52) riche en glycines et la boucle A (résidus 186-210) dite boucle d'activation (**Figure 10**).[87]

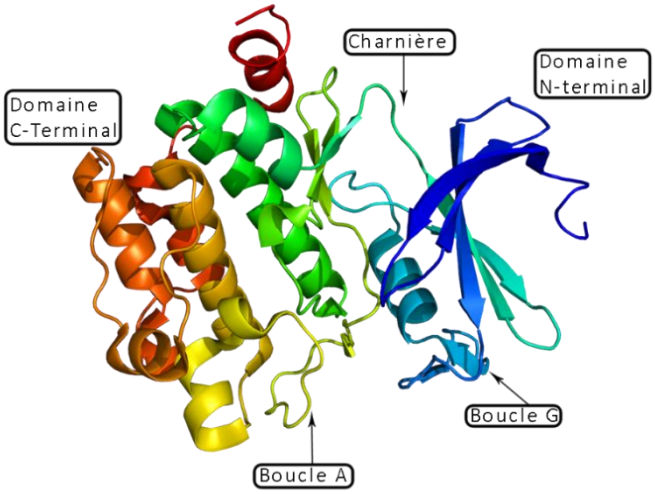
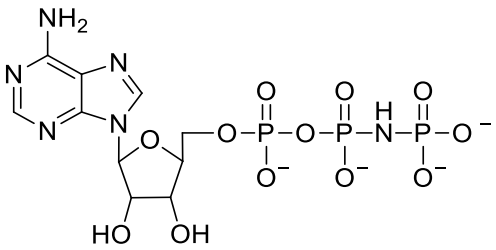


Figure 10. Structure de *Hs*Pim-1

En 2005, deux équipes sont parvenues à réaliser la co-cristallisation de *Hs*Pim-1 avec l'AMP-PNP (*5'-adénylyl-β,γ-imidodiphosphate*), un analogue non hydrolysable de l'ATP (**Figure 11A** et **B**).[30,88] Grace à ces travaux, plusieurs éléments caractéristiques de *Hs*Pim-1 ont pu être mis en évidence, permettant de la distinguer des autres kinases déjà identifiées.

A.



AMP-PNP

B.

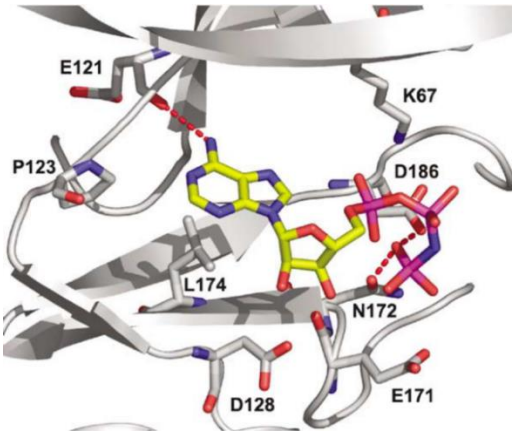


Figure 11. A. Structure de l'AMP-PNP ; B. Interactions de l'AMP-PNP au sein du site ATP de *Hs*Pim-1

*Hs*Pim-1 se distingue des autres kinases par différentes particularités au niveau de sa région charnière. Une des caractéristiques les plus remarquables se situe au niveau du site de fixation de l'ATP. En effet, au sein de la majorité des kinases, l'ATP se lie par l'intermédiaire de deux liaisons hydrogènes à la région « *Hinge* ». De fait, cette paire de donneurs et d'accepteurs de liaisons hydrogènes est considérée comme une signature caractéristique des kinases (**Figure 12A**). Dans le cas de *Hs*Pim-1, une seule liaion hydrogène subsiste à cause de la présence d'un résidu proline en position 123 (Pro123) qui ne possède pas de propriétés de donneur de liaisons hydrogènes et qui exclut donc la formation d'une liaison hydrogène avec le noyau adénine de

l'ATP. Il n'existe donc plus qu'une seule liaison hydrogène entre l'atome d'oxygène du groupement carbonyle du résidu glutamate 121 (Glu121) et le NH_2 de l'adénine (**Figure 12B**). Cette particularité est également retrouvée au niveau des sites catalytiques des isoformes *Hs*Pim-2 et *Hs*Pim-3.

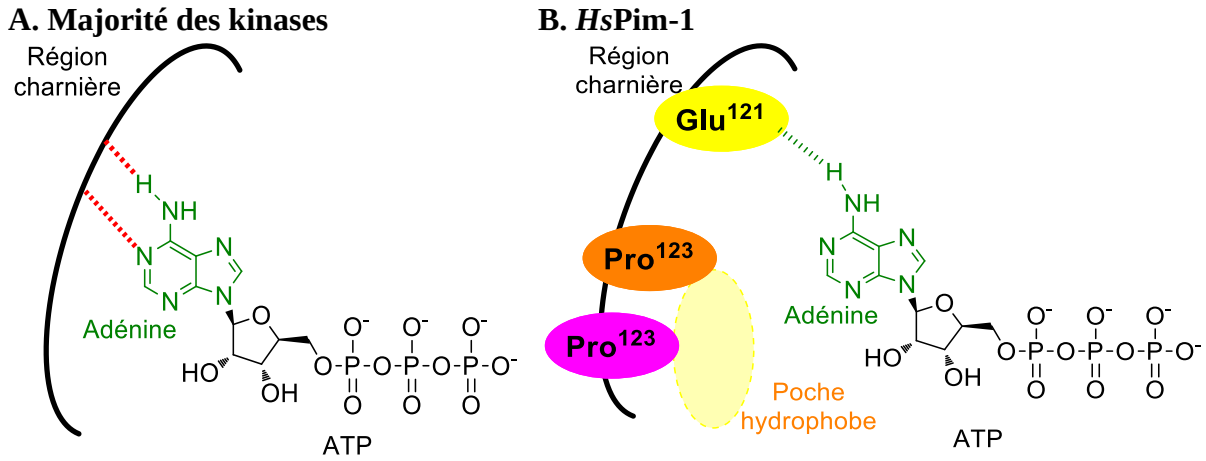
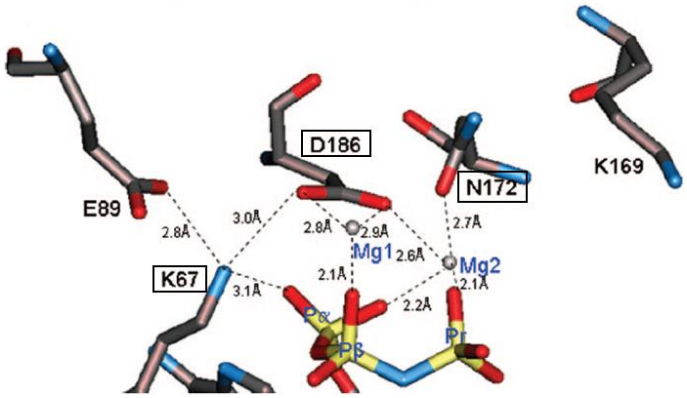


Figure 12. Fixation de l'ATP au niveau de la région charnière de la majorité des kinases (A.) et de *Hs*Pim-1 (B.)

De plus, l'existence d'une poche hydrophobe, créée par la présence des résidus Pro123 et Pro125 et entourée par différents acides aminés (Ala65, Arg122, Leu44, Leu174) chez *Hs*Pim-1, est un élément supplémentaire permettant de différencier les kinases Pim des autres kinases humaines. [88]

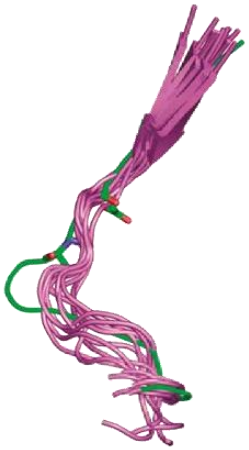
La partie phosphate participe également à la stabilisation du subtrat dans le site catalytique en formant deux liaisons conservées parmi les kinases. D'une part, le résidu Lysine 67 (Lys67 ou K67) établit une liasion ionique avec l'oxygène du phosphate en α du ribose. D'autre part, les rédidus asparagine 172 (Asn172 ou N172) et aspartate 186 (Asp186 ou D186) interagissent avec les phosphates *via* une coordination avec des ions Mg^{2+} (**Figure 13**). De plus, ces trois acides aminés (Lys68, Asn172, Asp186) sont conservés au sein des trois isoformes des kinases Pim.



K67, N172, D186 : acides aminés conservés entre les 3 isoformes des kinases Pim.

Figure 13. Interactions des phosphates de l'AMP-PNP avec *Hs*Pim-1

Enfin, l'alignement structural des charnières de plusieurs kinases, dont celle de *Hs*Pim-1, montre que la charnière de celle-ci est plus longue d'au moins un acide aminé. En effet, il a été démontré que *Hs*Pim-1 présentait l'insertion d'une valine en positon 126, que l'on ne retrouve pas chez les autres kinases. Cette insertion entraîne un excentrage de la région charnière de *Hs*Pim-1 (**Figure 14**).

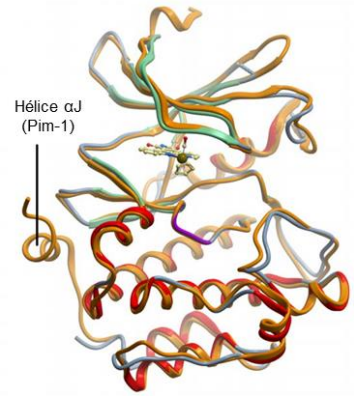


En vert : charnière de Hs*Pim-1 ; en rose : charnière des autres kinases*

Figure 14. Alignement structural des charnières de plusieurs kinases

Des travaux de co-cristallisation de *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 avec des complexes de ruthénium ont permis d'accéder à la structure de la kinase *Hs*Pim-2. Les analyses cristallographiques ont permis de constater que la poche ATP de ces deux kinases est conservée entre *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 mais des différences structurales existent néanmoins (**Figure 15**). L'un de ces différences est liée à l'hélice αJ, qui est absente dans le cas de *Hs*Pim-2. Dans le cas de *Hs*Pim-1, cette hélice αJ permet de créer des interactions stabilisatrices entre les lobes N- et C-terminaux. Cependant, pour *Hs*Pim-2, l'absence de cette hélice va conduire à une

désorganisation de cette région en augmentant la flexibilité dans le lobe N-terminal de *Hs*Pim-2.[89]



En orange : structure de Hs*Pim-1 ; en vert et rouge : structure de* Hs*Pim-2*

Figure 15. Alignement des structures de *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 (d'après Bullock *et al.*)

Les grandes similarités structurales entre les trois isoformes *Hs*Pim-1, *Hs*Pim-2 et *Hs*Pim-3 permettent donc d'envisager la conception d'inhibiteurs mixtes pan-Pim. En effet, étant donné les fortes redondances fonctionnelles de ces trois isoformes, un inhibiteur pan-Pim serait particulièrement intéressant en thérapeutique.

VI. Inhibiteurs de *Hs*Pim-1 en cours de développement

De par ses particularités structurales et son implication dans l'oncogénèse et la chimiorésistance, *Hs*Pim-1 représente une cible de choix pour le développement de nouveaux traitements anticancéreux.

En effet, la surexpression des kinases Pim dans divers types de tumeurs, ainsi que leur rôle dans la régulation de voies de signalisation considérées comme « d'intérêt » en cancérologie, font de ces kinases des cibles attrayantes pour le développement de nouveaux composés anticancéreux. De plus, les kinases Pim semblent jouer un rôle limité au sein des cellules saines puisque des souris triple-négatives en Pim-1, Pim-2 et Pim-3 présentent peu d'anomalies phénotypiques (diminution de la masse corporelle ainsi que de légères modifications des signalisations cellulaires hématopoïétiques).

Ainsi, de nombreux inhibiteurs de *Hs*Pim-1 sont actuellement en cours de développement. La plupart d'entre eux sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, c'est-à-dire qu'ils se fixent au niveau de la poche ATP de *Hs*Pim-1.[16] De nombreux composés ont confirmé leur activité *in vitro* sur lignées cellulaires et également *in vivo* sur différents modèles de xénogreffes

tumorales. Pour les candidats les plus prometteurs, des essais cliniques sont en cours.[90] Nous présentons ici quelques exemples de familles d'inhibiteurs agissant sur les kinases Pim.

A. Exemples d'inhibiteurs de *Hs*Pim-1 ATP mimétiques

Les inhibiteurs ATP-mimétiques liés à *Hs*Pim-1 sont intercalés entre les résidus hydrophobes de la boucle G, le domaine C-terminal et la charnière de la kinase *Hs*Pim-1 et établissent une liaison avec cette dernière. Comme expliqué auparavant, la présence d'un résidu proline en position 123 empêche la formation d'une seconde liaison hydrogène avec la charnière de *Hs*Pim-1, résultant en l'existence d'une seule liaison hydrogène entre le résidu Glu121 de cette charnière et les ligands.

1. Staurosporine et dérivés

La staurosporine est un inhibiteur non sélectif de kinases.[19] L'indolocarbazole se place au sein d'une zone hydrophobe du site catalytique et l'atome d'hydrogène de la pyrrolidinone permet d'établir la liaison hydrogène avec le résidu Glu121 de la charnière. Enfin, la partie osidique se place dans le site de fixation du ribose de l'ATP par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes entre l'amine exocyclique et les résidus Asp128 et Glu171 de *Hs*Pim-1 (**Figure 16**).[87]

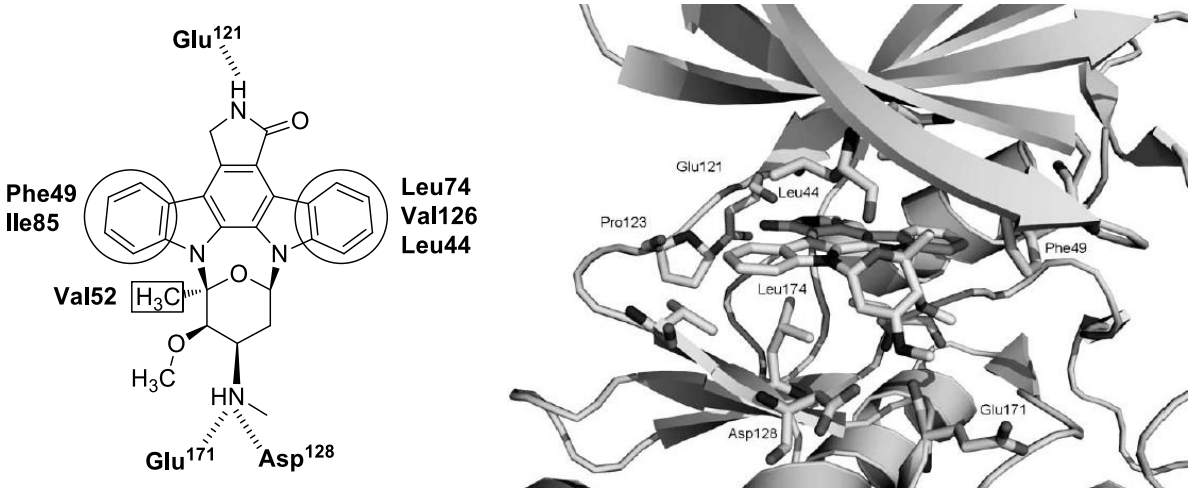


Figure 16. Interactions de la staurosporine au sein du site ATP de *Hs*Pim-1

Des analogues bisindolylmaléimides (BIM-1, BIM-9 et LY333531) ont également été décrits. La partie bisindolylmaléimide se place dans une poche hydrophobe. Par exemple, dans le cas du LY333531, des interactions hydrophobes sont établies avec les résidus Phe49, Ile104 et Ile185 (**Figure 17**).[91]

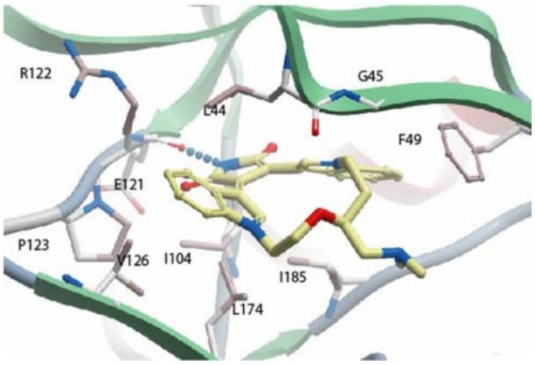
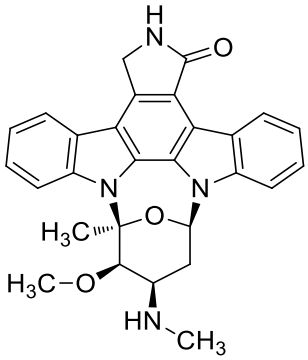
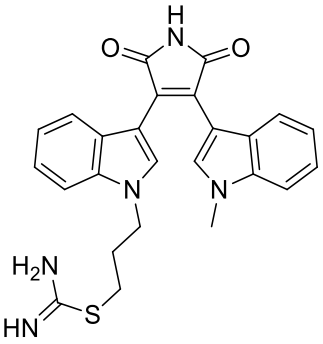


Figure 17. Interactions du composé LY333531 au sein du site ATP de *Hs*Pim-1

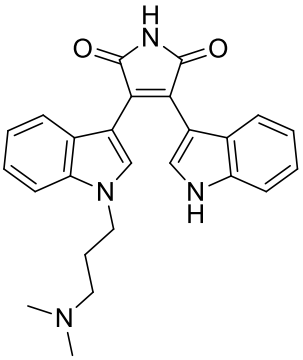
Tous ces composés présentent une CI_{50} (*concentration inhibitrice à 50 %*) au submicromolaire vis-à-vis de *Hs*Pim-1 (**Figure 18**).



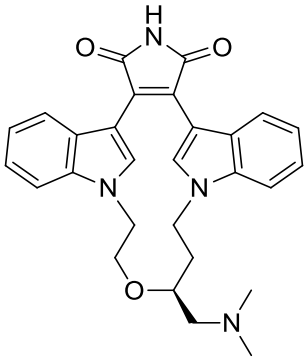
Staurosporine
CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 0,01 µM



BIM-9
CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 0,01 µM



BIM-1
CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 0,15 µM



LY333531
CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 0,2 µM

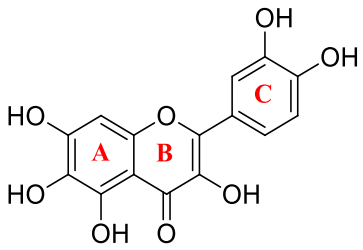
Figure 18. Structures et valeurs des CI_{50} sur *Hs*Pim-1 de la staurosporine et de ses dérivés

2. Flavonoïdes

Un premier criblage de 20 représentants de cette famille de composés, déjà connus pour leur activité inhibitrice vis-à-vis de kinases, a permis d'identifier la quercétagétine (**Figure 19A**) comme étant un inhibiteur submicromolaire de *Hs*Pim-1 avec une CI_{50} de 340 nM.[92]

Les analyses cristallographiques de la quercétagétine compléxée à *Hs*Pim-1 ont mis en évidence l'établissement d'une liaison hydrogène entre le résidu Glu121 et le groupement hydroxyle en position 3. Deux interactions hydrogènes supplémentaires mettent en jeu l'hydroxyle en position 4' de la quercétagétine et les résidus Lys67 et Glu89 de la poche de liaison aux phosphates de l'ATP (**Figure 19B**).

A.



Quercétagétine

CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 340 nM

B.

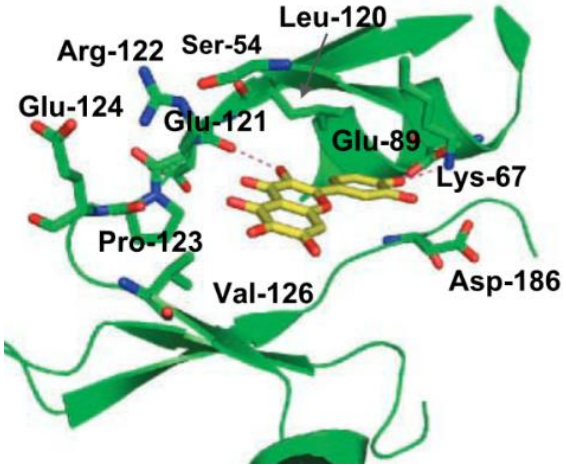
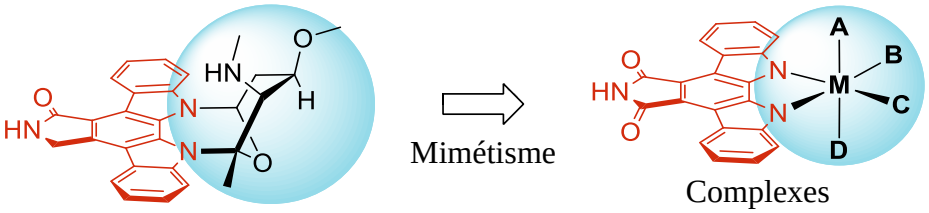


Figure 19. A. Structure et activité de la quercétagétine ; B. Interactions de la quercétagétine au sein du site ATP de *Hs*Pim-1

3. Complexes de ruthénium

Des complexes organométalliques de ruthénium ont été identifiés par E. Meggers comme de puissants inhibiteurs de kinases. Ces inhibiteurs ont été conçus à partir de la structure de la staurosporine en remplaçant le motif indolocarbazole par un pyridocarbazole et le lactame par un imide. Les atomes d'azote de la partie pyridocarbazole sont compléxés avec un métal (ex. le ruthénium) qui remplace la partie hétérocyclique oxygénée de la staurosporine (**Figure 20**).[93]

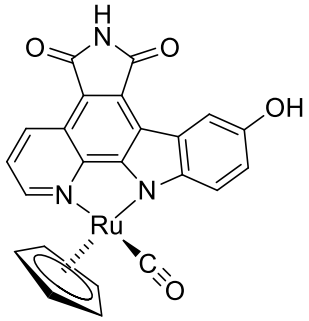


Staurosporine

Complexes organométalliques

Figure 20. Conception des complexes de ruthénium

L'un des représentants de cette famille, le composé (*S*)-**I**, a démontré une excellente activité inhibitrice de *Hs*Pim-1 avec une CI_{50} de 0,22 nM (**Figure 21**).



(*S*)-**I**

CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 0,22 nM

Figure 21. Structure du composé (*S*)-I

La résolution par diffraction aux rayons X de la structure du co-cristal *Hs*Pim-1/(*S*)-**I** a révélé que le motif pyridocarbazole était situé dans une poche hydrophobe et que la cohésion du complexe était assurée entre autres par trois liaisons hydrogène. La première s'effectue entre l'hydrogène du NH de l'imide et le résidu Glu121 (**Figure 22A**), les deux autres se réalisant entre la fonction phénol portée par le pyridocarbazole et deux molécules d'eau au voisinage du résidu Glu89. Les autres ligands du ruthénium (cyclopentadiényle et CO) sont engagés dans des interactions faibles de type Van der Waals, notamment avec le méthylène du résidu Gly45 (**Figure 22B**). Il est intéressant de noter que le métal n'interagit pas avec l'enzyme et joue un rôle purement structural en orientant spatialement ses ligands.

A. **B.**

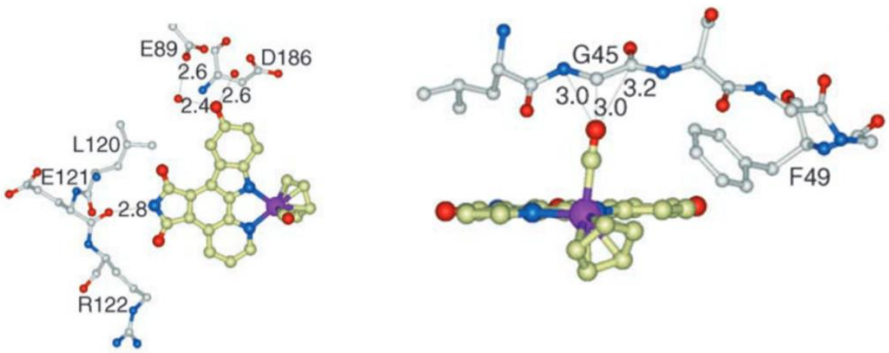
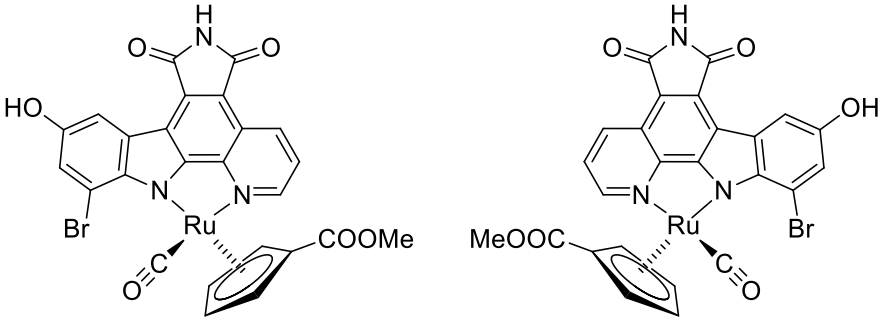


Figure 22. Interactions du composé (*S*)-I au sein de la poche catalytique de *Hs*Pim-1

L'activité biologique est corrélée à la configuration de l'atome de ruthénium. Par exemple, il a été montré que le composé (*S*)-**II** possède une activité inhibitrice sur *Hs*Pim-1 dix fois supérieure à celle de l'énantiomère correspondant (*R*)-**II**, avec des CI_{50} respectives de 3 et 35 nM (**Figure 23**).[94]



(*R*)-**II**
CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 35 nM

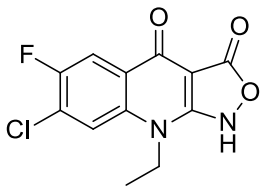
(*S*)-**II**
CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 3 nM

Figure 23. Structures et activités des énantiomères du composé II

Ces composés ont été utilisés pour la résolution de la structure de l'enzyme *Hs*Pim-2.[89]

4. Isoxazolo[3,4-*b*]quinoléine-3,4(1*H*,9*H*)-diones

Les laboratoires Abbot ont identifié le composé **III** comme chef de file en série isoxazolo[3,4-*b*]quinoléine-3,4(1*H*,9*H*)-dione.[95] Ce composé possède des activités de l'ordre du submicromolaire sur *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 (**Figure 24**).



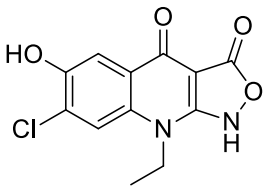
III

CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 21,8 nM
CI_{50} (*Hs*Pim-2) = 174 nM

Figure 24. Structure et activités du composé III

Des études de modélisation moléculaire simulant l'arrimage de ce composé au sein du site actif de *Hs*Pim-1 ont montré que cette molécule était engagée, par l'intermédiaire de ses deux carbonyles, dans un réseau de liaisons hydrogènes avec la Lys67 et une molécule d'eau. Afin d'optimiser les interactions avec la kinase, l'atome de fluor a été remplacé par un groupement hydroxyle (composé **IV**, **Figure 25A**) destiné à former une liaison hydrogène avec le résidu Glu121 de la région charnière (**Figure 25B**). Ce composé **IV** possède une CI_{50} de 2,5 nM sur *Hs*Pim-1 ainsi qu'une bonne sélectivité sur un panel de 22 kinases.

A. **B.**



IV

CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 2,5 nM
CI_{50} (*Hs*Pim-2) = 43,5 nM

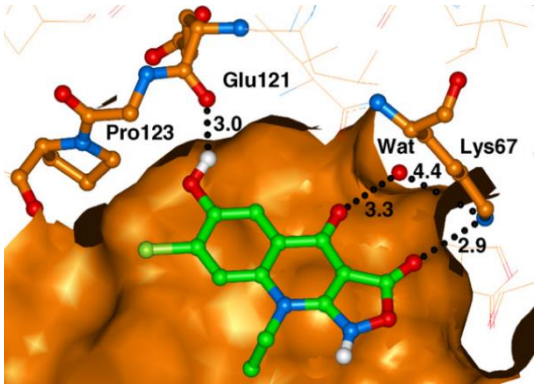


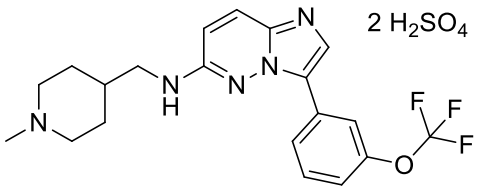
Figure 25. A. Structure et activités du composé IV ; B. Interactions du composé IV au sein du site ATP de *Hs*Pim-1

B. Exemples d'inhibiteurs de *Hs*Pim-1 non mimétiques de l'ATP

Ces inhibiteurs présentent un mode de fixation atypique caractérisé par une absence d'interaction avec le résidu Glu121 de la région charnière.

1. Imidazo[1,2-*b*]pyridazines

Le composé **SGI-1776** (**Figure 26**) est une imidazo[1,2-*b*]pyridazine capable d'inhiber *Hs*Pim-1 (CI_{50} = 7 nM), *Hs*Pim-2 (CI_{50} = 363 nM) et *Hs*Pim-3 (CI_{50} = 69 nM), avec un profil intéressant de sélectivité (lors d'un criblage de plus de 200 protéines kinases, seules FLT-3 (CI_{50} = 44 nM) et Haspin (CI_{50} = 34 nM) ont été inhibées par le SGI-1776). Son action sur ces deux dernières cibles complique cependant l'élucidation de la contribution de l'inhibition des kinases Pim dans les effets biologiques de ce composé. Des rapports ont démontré que le SGI-1776 induit l'arrêt en G_1 du cycle cellulaire et l'apoptose de cellules de cancer de la prostate, corrélant avec des diminutions des phosphorylations de $p21^{waf1}$ et BAD. De plus, le SGI-1776 réduit également les taux de la protéine anti-apoptotique MCL-1, promouvant l'apoptose. Le traitement par le SGI-1776 réduit la viabilité cellulaire et rétablit la sensibilité aux thérapies à base de taxane au sein de cellules chimiorésistantes notamment en inhibant l'activité du transporteur MDR1.[96–100]



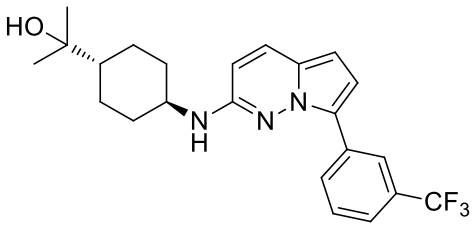
SGI-1776

CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 7 nM
CI_{50} (*Hs*Pim-2) = 363 nM
CI_{50} (*Hs*Pim-3) = 69 nM

Figure 26. Structure et activités du composé SGI-1776

Le développement de cette molécule, bien que prometteuse, a cependant été arrêté suite à la survenue de cardiotoxicités prolongées lors d'essais cliniques de phase I.

Un analogue du SGI-1776 a été développé par les laboratoires Astex Pharmaceuticals, le **TP-3654** (**Figure 27**). Cette molécule présente des niveaux d'activité semblables à ceux du SGI-1776 mais en s'affranchissant de la cardiotoxicité de celui-ci.[101] Cette molécule a commencé en octobre 2018 un essai clinique de phase I pour le traitement de patients atteints de tumeurs solides avancées.[102]



TP-3654

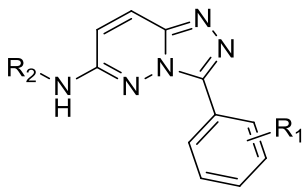
Ki (*Hs*Pim-1) = 5 nM
Ki (*Hs*Pim-2) = 239 nM
Ki (*Hs*Pim-3) = 42 nM

Figure 27. Structure et Ki du TP-3654

2. Triazolo[4,3-*b*]pyridazines

L'introduction d'un atome d'azote supplémentaire sur le squelette du SGI-1776 a permis d'accéder à de nouveaux inhibiteurs sélectifs de *Hs*Pim-1.[103]

Après identification du chef de file **V** par criblage haut-débit, une étude de relations structure-activité a été entreprise sur une série de triazolo[4,3-*b*]pyridazines (**Figure 28**). Ces travaux ont permis d'accéder à des inhibiteurs plus actifs sur *Hs*Pim-1 que le chef de file **V**. De plus, les composés **V-IX** se sont avérés sélectifs de la kinase *Hs*Pim-1 lorsqu'ils ont été testés sur un panel de 21 autres kinases.



V-IX

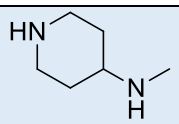
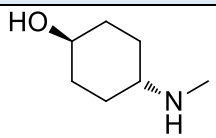
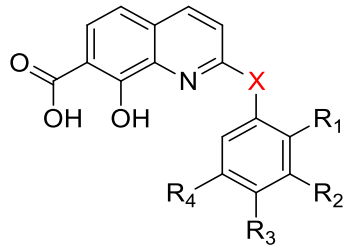
Composé	R_1	R_2	CI_{50} (*Hs*Pim-1) (nM)
V	4-CF_3	CH_2-cPr	320
VI	3-CF_3	CH_2-cPr	18
VII	3-CF_3	CH_2-cHex	11
VIII	3-CF_3		21
IX	3-CF_3		< 5

Figure 28. Structures et activités des composés V à IX

3. Quinoléines

Sliman *et al.*[104] ont décrit récemment une série de 7-carboxy-8-hydroxyquinoléines dont certains représentants possèdent des CI_{50} au submicromolaire sur *Hs*Pim-1. Le composé **XV** est le plus actif de cette série avec une CI_{50} de 0,2 µM (**Figure 29**).



X-XV

Composé	X	R_1	R_2	R_3	R_4	CI_{50} *Hs*Pim-1 (µM)
X	$(CH)_2$	OH	H	OH	H	0,5
XI	$(CH)_2$	H	OH	OMe	H	0,5
XII	$(CH)_2$	H	OH	H	OH	0,4
XIII	$CONHCH_2$	H	OH	H	OH	0,6
XIV	$HNCONHCH_2$	H	H	OH	OH	0,5
XV	$CONHCH_2$	OH	H	OH	H	0,2

Figure 29. Structures et activités des composés X à XV sur *Hs*Pim-1

Afin d'étudier le mode d'interaction entre ces composés et le site actif de la kinase *Hs*Pim-1, des travaux de modélisation moléculaire ont été entrepris sur le composé **XII**. Cela a permis de mettre en évidence l'ancrage de la molécule dans le site ATP par l'intermédiaire de la fonction acide carboxylique et des groupements hydroxyles, *via* un réseau de ponts hydrogènes établi au voisinage des résidus Phe49, Gly48, Gly50, Lys67 et Asp186 (**Figure 30**).

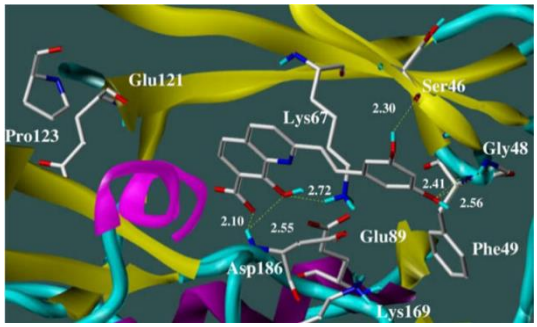
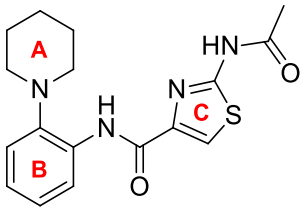


Figure 30. Modélisation du composé XIII au sein du site ATP de *Hs*Pim-1

4. 5-Fluoropicolinamides

La molécule **Pim447**, développée par l'équipe de M.T Burger, a été obtenue en partant du dérivé de thiazole-4-carboxamide **XVIa** (**Figure 31A**), identifié par criblage *in vitro*. Les caractéristiques structurales ainsi que le mode de fixation particulier de ce composé à *Hs*Pim-1 (**Figure 31B**) en ont fait un excellent candidat de départ.[105]

A.



XVIa

Ki (*Hs*Pim-1) = 92 nM
Ki (*Hs*Pim-2) > 12,5 µM
Ki (*Hs*Pim-3) = 230 nM

B.

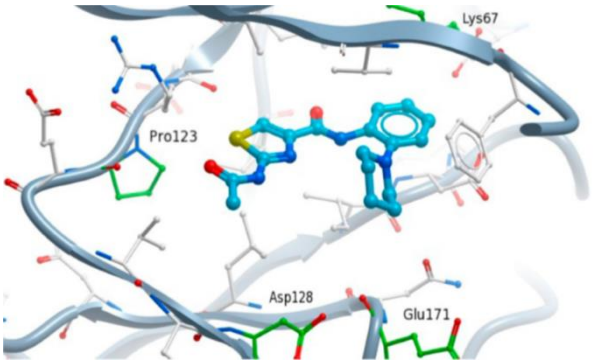
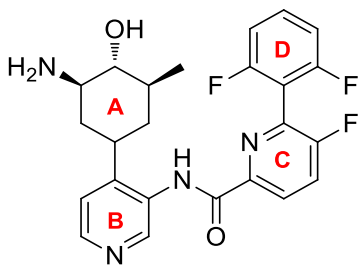


Figure 31. A. Structure et Ki du composé XVIa ; B. Interactions du composé XVIa au sein du site ATP de *Hs*Pim-1

En modulant cette molécule **XVIa** au niveau des cycles A, B et C, l'équipe de M.T. Burger est parvenue à améliorer significativement l'efficacité du composé à l'égard des trois isoformes des kinases Pim, donnant ainsi naissance au composé **XVIb** (**Figure 32A**) qui possède une activité pan-Pim, avec des constantes d'inhibition (Ki) allant de 1 à 3 nM pour les trois isoformes, et un bon profil de sélectivité pour ces kinases. Cette molécule présente une fixation au site catalytique de *Hs*Pim-1 similaire à celle du composé **XVIa** : l'amide central ne crée aucune liaison hydrogène mais contribue à présenter les deux parties de la molécule vers la charnière et la poche catalytique de la Lys67. La fonction amine portée par la pipéridine réalise deux liaisons hydrogènes avec la chaîne secondaire du résidu Asp128 ainsi qu'avec le carbonyle du résidu Glu171. De plus, le groupement méthyle remplit une poche hydrophobe au niveau de la boucle G (riche en glycine) localisée au-dessus. L'azote du cycle pyridinique B réalise une liaison hydrogène avec la Lys67 du site catalytique. Le noyau fluoropyridine C se positionne au niveau du résidu Pro123 sans faire d'interaction et oriente le cycle difluoropyridine D vers le bas de la charnière (**Figure 32B**). [105]

A.



XVIb

Ki (*Hs*Pim-1) = 1 nM
Ki (*Hs*Pim-2) = 2 nM
Ki (*Hs*Pim-3) = 1 nM

B.

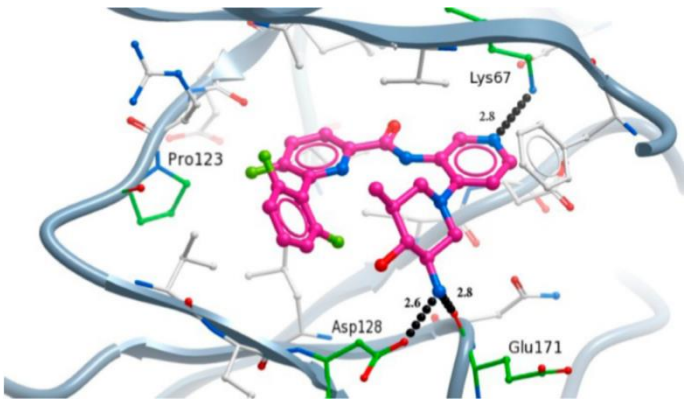
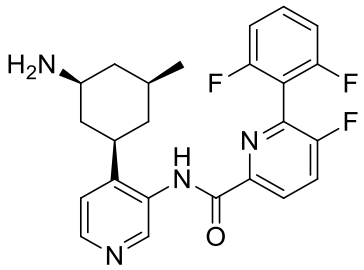


Figure 32. A. Structure et Ki du composé XVIb ; B. Interactions du composé XVIb au sein du site ATP de *Hs*Pim-1

Cette molécule a été optimisée pour améliorer ses propriétés *in vivo*, donnant naissance à l'inhibiteur pan-Pim **LGH447(PIM447)** (**Figures 33**), qui a démarré des essais cliniques prometteurs en 2012 pour traiter des patients atteints de myélomes multiples ou de pathologies hématologiques.[106]

A.



LGH447 (PIM447)
CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 95 nM
CI_{50} (*Hs*Pim-2) = 522 nM
CI_{50} (*Hs*Pim-3) = 369 nM

B.

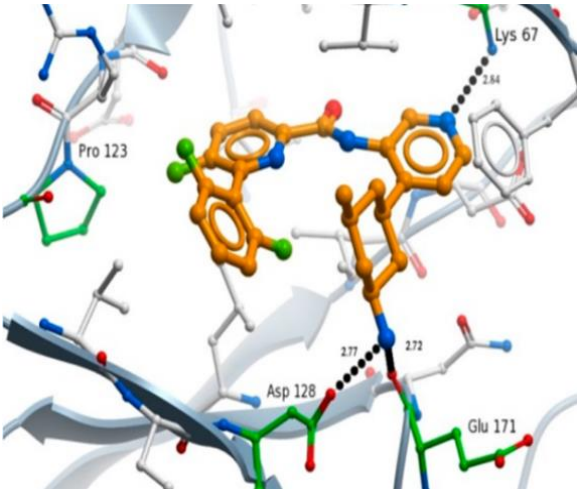
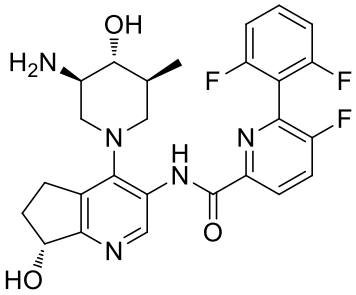


Figure 33. A. Structure et activités du composé LGH447 (PIM447) ; B. Interactions du composé LGH447 (PIM447) au sein du site ATP de *Hs*Pim-1

LGH447 (PIM447) présente également un bon profil de sélectivité, affectant seulement 3 autres kinases (GSK3*β*, PKN1 et PKC*τ*) sur un panel de 68 kinases. Cependant, son action sur ces trois dernières est moindre puisque les CI_{50} respectives de ces kinases sont de l'ordre du micromolaire. Cet inhibiteur a également été testé sur 26 lignées cellulaires, avec des activités allant du submicromolaire à 10 micromolaires. Cette molécule a récemment terminé deux essais cliniques pour deux indications, la première concernant les LAM et syndromes myélodysplasiques de haute grade tandis que la seconde était orientée vers les myélomes multiples.[107–109]

Un autre composé de type 5-fluoropicolinamide est également en cours d'essais cliniques : le **INCB053914** (**Figure 34**), développé par les laboratoires Incyte. Il y est notamment testé en association avec d'autres composés pour le traitement de tumeurs solides (association avec la cytarabine, l'azacitidine ou encore le ruxolitinib) ou des rechutes de DLBCL (en association avec le INC050465, un inhibiteur de la signalisation PI3Kd).[110,111]



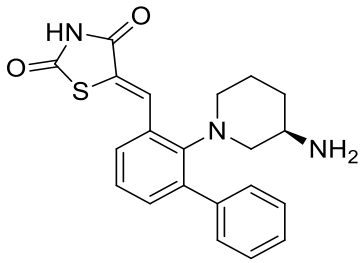
CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 0,24 nM
CI_{50} (*Hs*Pim-2) =30,00 nM
CI_{50} (*Hs*Pim-3) =0,12 nM

INCB053914

Figure 34. Structure et activité du composé INCB053914

5. Thiazolidine-2,4-dione

La molécule **AZD1208** a été développée par les laboratoires AstraZeneca®. Cette benzylidène-1,3-thiazolidine-2,4-dione est un inhibiteur ATP-compétitif puissant des kinases Pim avec des activités sur les trois isoformes du nanomolaire au subnanomolaire (**Figure 35**) et une bonne sélectivité (testé sur un panel de 442 kinases). Le développement de ce composé a cependant été arrêté puisqu'il a démontré un manque d'efficacité lors d'essais cliniques.[90,112]



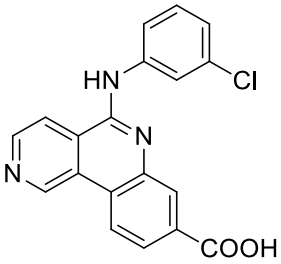
CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 0,4 nM
CI_{50} (*Hs*Pim-2) = 1,9 nM
CI_{50} (*Hs*Pim-3) = 5 nM

AZD1208

Figure 35. Structure et activité du composé AZD1208

6. Benzo[*c*][2,6]naphthyridines

Le **CX-4945** a été développé par l'équipe de F. Pierre (**Figure 36**).[113] Ce composé démontre une activité au nanomolaire sur *Hs*Pim-1 et CK2, une autre enzyme impliquée notamment dans la survie cellulaire et a débuté plusieurs essais cliniques de phase I chez des patients atteints de myélomes multiples en septembre 2010, ou chez des patients atteints d'un carcinome des cellules basales en avril 2019. Il est également employé dans deux essais cliniques de phase II pour des patients atteints de cholangiocarcinomes (mai 2014) ou de médulloblastome (avril 2019).

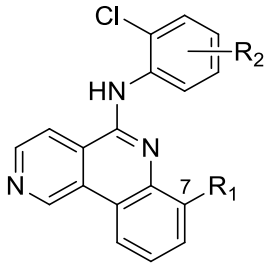


CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 46 nM
CI_{50} (*Hs*Pim-2) = 186 nM
CI_{50} (CK2) = 1 nM

CX-4945

Figure 36. Structure et activité du composé CX-4945

Des analyses structurales ont permis de déterminer que la fonction acide carboxylique en position 8 était essentielle pour la liaison à CK2, et que sa suppression ou son déplacement sur une position adjacente supprimait l'inhibition de cette kinase et affectait également l'activité sur *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 mais dans une moindre mesure. Plusieurs modifications du CX-4945 ont alors été réalisées afin d'améliorer son activité sur les trois isoformes de Pim. Ces modifications ont permis d'obtenir les inhibiteurs pan-Pim **XVIIa-c** (**Figure 37**) qui sont actifs au nanomolaire.



XVIIa-c

Composé	**R_1**	**R_2**	**CI_{50} (nM)**		
			*Hs*Pim-1	*Hs*Pim-2	*Hs*Pim-3
XVIIa	C-(4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)	H	1	6	86
XVIIb	C-(4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)	4'-(2-morpholino éthoxy)	2	14	120
XVIIc	CONHMe	H	16	5	367

Figure 37. Structures et activités des composés XVIIa-c

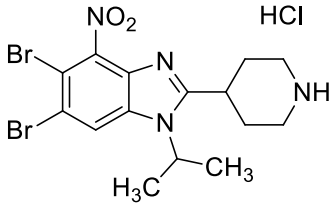
Ces pharmacomodulations ont permis de démontrer que la présence d'un groupement donneur de liaison hydrogène en position 7 permet d'accroitre l'efficacité des composés vis-à-vis des kinases Pim tout en diminuant l'activité de ceux-ci sur CK2.

Le composé **XVIIa** a également démontré une bonne sélectivité puisque seulement 10 kinases ont été inhibées à plus de 90 % sur un panel de 170 kinases. Ces molécules sont également actives sur plusieurs lignées cellulaires, avec des activités du micromolaire au submicromolaire.

7. Benzo[*d*]imidazole

Le composé **SEL24-B489** (**Figure 38**), développé par les laboratoires Selvita®, est un inhibiteur double des kinases Pim et FLT3-ITD avec des Kd (*constante de dissociation*) de 2 à

3 nM pour les kinases Pim et de 16 nM pour la kinase FLT3-ITD, ce qui lui permet d'avoir une activité accrue sur les lignées cellulaires de LAM sans pour autant affecter les cellules saines.[114] Ce composé est actuellement utilisés dans un essai clinique de phase I/II pour une indication dans la LAM.[115]



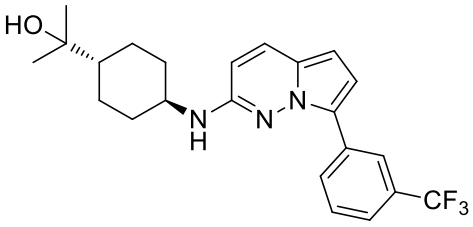
Kd (*Hs*Pim-1) = 2 nM
Kd (*Hs*Pim-2) = 2 nM
Kd (*Hs*Pim-3) = 3 nM
Kd (FLT3-ITD) = 16 nM

SEL24-B489

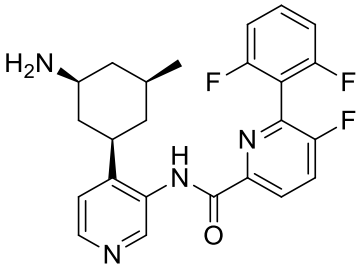
Figure 38. Structure et Kd du composé SEL24-B489

C. Conclusion

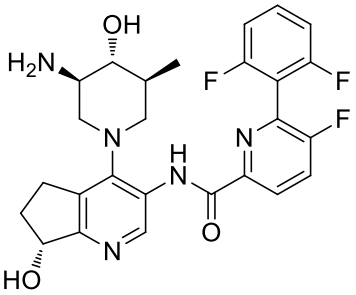
Plusieurs inhibiteurs des kinases Pim ont été développés. Parmi eux, les plus efficaces se sont avérés être des inhibiteurs non-mimétiques de l'ATP, avec quatre composés étant actuellement utilisés dans des essais cliniques de phases I ou II (**Figure 39**). Leur comportement non-ATP-mimétiques permet notamment d'augmenter leur spécificité vis-à-vis des kinases Pim et donc leur efficacité thérapeutique.



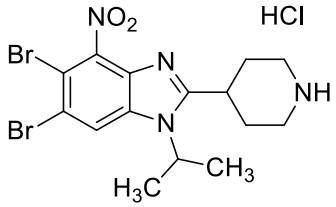
TP-3654
Ki (Pim-1) = 5 nM
Ki (Pim-2) = 239 nM
Ki (Pim-3) = 42 nM
Essai clinique de phase I



LGH447 (PIM447)
CI_{50} (Pim-1) = 95 nM
CI_{50} (Pim-2) = 522 nM
CI_{50} (Pim-3) = 369 nM
Essai clinique de phase I/II



INCB053914
CI_{50} (Pim-1) = 0,24 nM
CI_{50} (Pim-2) =30,00 nM
CI_{50} (Pim-3) =0,12 nM
Essai clinique de phase I



SEL24-B489
Kd (Pim-1) = 2 nM
Kd (Pim-2) = 2 nM
Kd (Pim-3) = 3 nM
Essai clinique de phase I/II

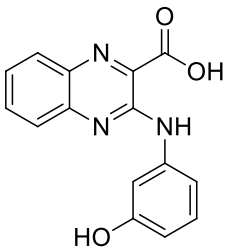
Figure 39. Inhibiteurs des kinase Pim en cours d'essais cliniques

Ainsi, en se basant sur les données issues des inhibiteurs de la littérature ainsi que sur les rôles physiologiques et oncogéniques des kinases Pim, le développement d'inhibiteurs non-mimétiques de l'ATP semble être une stratégie de choix dans la conception de nouveaux composés à visées thérapeutiques dans le domaine de l'oncologie.

OBJECTIFS

I. Travaux antérieurs

Au cours de travaux préliminaires effectués au sein du laboratoire IMT (Innovation Moléculaire et Thérapeutique), un criblage de 30 composés issus de la chimiothèque du GICC (EA7501 - Groupe Innovation et Ciblage Cellulaire) a été réalisé sur un panel de 14 kinases, incluant la kinase *Hs*Pim-1 humaine (*Homo sapiens Hs*Pim-1). Les résultats ont permis d'identifier une nouvelle molécule chef de file : l'acide quinoxaline-2-carboxylique **1** (**Figure 40**).



CI_{50} (Pim-1) = 74 nM

1

Figure 40. Structure de l'acide quinoxaline-2-carboxylique 1

Cette molécule est capable d'inhiber *in vitro* l'activité enzymatique de *Hs*Pim-1 avec une CI_{50} de 74 nM. Elle possède, par ailleurs, un profil de sélectivité intéressant vis-à-vis de la majorité des autres kinases de mammifères testées, avec des CI_{50} supérieures à 10 µM pour *Hs*CDK2/CylinA, *Hs*CDK5/p25, *Hs*CDK9/CyclinT, *Ssc*GSK3α/β, *Pf*GSK3, *Mm*CLK1, *Ssc*CK1δ/ε, *Lm*CK1, *Hs*Haspin, *Hs*AURKB, *Hs*RIPK3 et *Ld*TLKCE. Le composé possède néanmoins une activité résiduelle sur l'enzyme DYRK1A de rat (*Rn*DYRK1A) à des concentrations de l'ordre du submicromolaire mais avec une CI_{50} au moins 3,5 fois supérieure par rapport à celle observée sur *Hs*Pim-1 (CI_{50} (*Rn*DYRK1A) = 270 nM). Enfin, son activité a été confirmée sur des lignées cellulaires de leucémie myéloïde (KU812, LMC ; MV4-11, LAM) avec des CE_{50} de l'ordre du micromolaire (CE_{50} de 38,9 µM et 61,2 µM, respectivement).

Des études de *docking* ont été réalisées par le Dr. C. Logé (IICIMED - EA1155, Nantes) sur le composé chef de file **1** au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 (référence 3A99.pdb) en utilisant le programme GOLD (GOLD version 4.0, CDCC, Cambridge). Ces travaux ont permis de montrer que le composé **1** réalisait trois interactions avec la poche catalytique de *Hs*Pim-1. La première interaction est une liaison hydrogène qui s'effectue entre la fonction hydroxyle du cycle phénolique et le groupement carboxylate du résidu Asp186, un acide aminé qui est impliqué dans les interactions avec les groupements phosphates de la molécule d'ATP. La seconde concerne un pont salin qui se forme entre la fonction carboxylate de la quinoxaline **1** et la fonction amine protonée de la chaîne latérale du résidu Lys67. Ce groupement carboxylate

effectue également une liaison hydrogène avec le groupement NH du résidu Asp186 (**Figure 41**). Ces travaux suggèrent donc que le composé **1** pourrait se comporter comme un inhibiteur compétitif de l'ATP, avec un mode de fixation non mimétique de l'ATP.

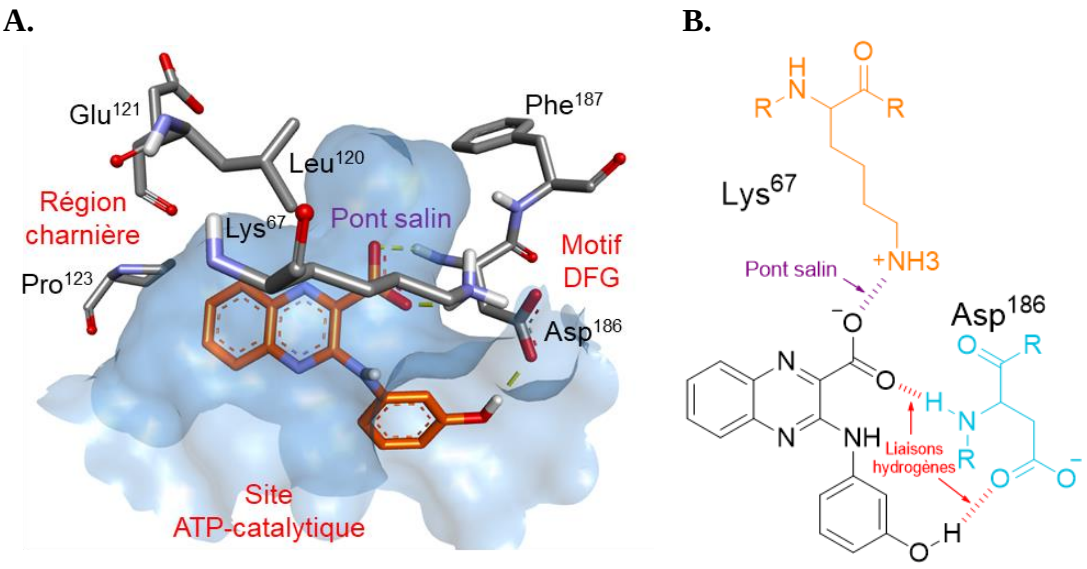


Figure 41. Représentations 3D (A.) et 2D (B.) du *docking* du composé 1 au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 (3A99.pdb)

II. Objectifs

Le but de mon projet de thèse est de développer des inhibiteurs de la kinase *Hs*Pim-1 présentant une activité optimisée sur *Hs*Pim-1 ainsi qu'un bon profil de sélectivité vis-à-vis des autres kinases de mammifères testées. Enfin, ces composés seront testés *in vitro* sur différentes lignées cellulaires humaines de leucémie myéloïde.

Ce projet repose sur des échanges d'informations permanents entre les divers acteurs intervenant dans celui-ci (**Figure 42**). Ainsi, les résultats des études de modélisation moléculaire réalisées par les équipes du Dr. C. Loge (IICIMED - EA1155, Nantes) et du Pr. P. Bonnet (ICOA - UMR7311, Orléans) permettent d'orienter les pharmacomodulations du composé chef de file **1** qui seront réalisées par notre équipe (EA7501 GICC - Equipe IMT). Les résultats des évaluations pharmacologiques des composés synthétisés, réalisées par les équipes du Dr. S. Bach (KISSf, USR3151 CNRS/UPMC, Roscoff) et du Dr. F. Gouilleux (EA7501 GICC - ERL7001 LNOx, Tours) sont ensuite utilisées pour enrichir ces modèles *in silico* afin de les rendre plus performants.

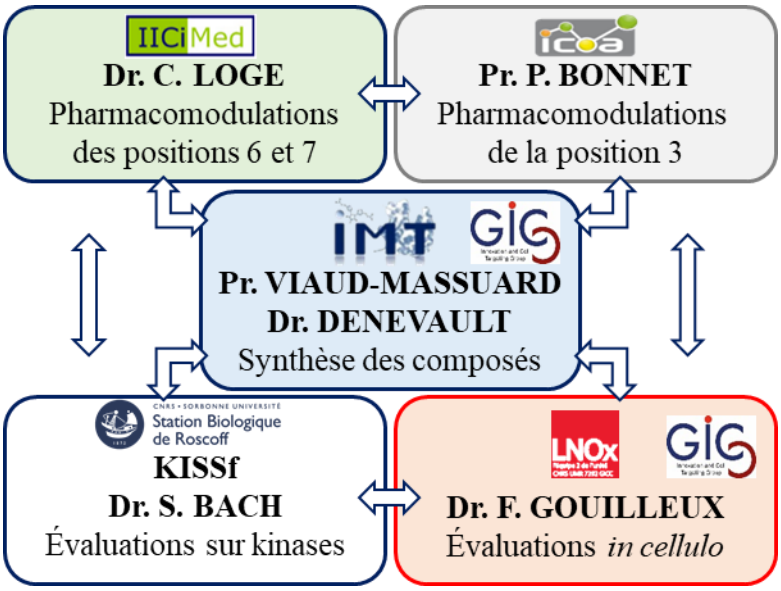


Figure 42. Collaborations mises en place pour ce projet

A. Pharmacomodulations envisagées

Les travaux antérieurs ont permis d'orienter les pharmacomodulations à réaliser autour du modèle structural du composé **1** afin d'optimiser l'activité des inhibiteurs et de déterminer des relations structure/activité (RSA). Nous avon ainsi établi un modèle d'étude chimique, développé à partir de la structure du composé **1**. Ce modèle d'étude peut être scindé en deux axes principaux, selon les positions affectées par les modifications (**Figure 43**).

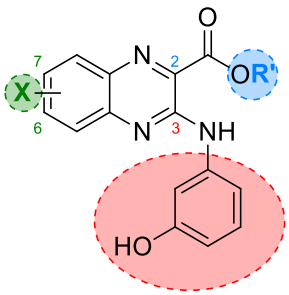


Figure 43. Modèle d'étude chimique général

Les groupements utilisés pour réaliser ces pharmacomodulations ont été sélectionnés en se basant sur les paramètres chémoinformatiques de la règle de Lipinski. Cette règle, établie par Christopher A. Lipinski en 1997, est basée sur le constat que la majorité des principes actifs administrés par voie orale sont des composés lipophiles de taille modérée.[116] Elle permet ainsi d'apprécier rapidement le potentiel d'un composé chimique comme futur médicament en se basant sur les paramètres physico-chimiques suivants :

- La masse molaire, exprimée en Dalton (Da), qui doit être inférieure à 500 Da.

- Le nombre de groupements donneurs et accepteurs de liaisons hydrogènes présents dans la molécule doit être inférieur à 5 et 10, respectivement.
- Le LogP (*coefficient de partage octanol/eau*, calculé *in silico*) ne doit pas excéder une valeur de 5. Ce facteur permet ainsi de déterminer si une molécule est hydrophile ou lipophile.

Lipinksi décrit que les composés présentant une ou plusieurs violations de ces règles sont généralement des biodisponibilités orales plus faibles que ceux les respectant et sont plus sujets à échouer dans les essais cliniques.[116]

Depuis sa parution au début des années 2000, la règle de Lipinski a été agrémentée de paramètres supplémentaires, notamment par Veber.[117] C'est le cas notamment de l'aire de la surface polaire (PSA, *polar aire surface*), exprimée en Å² (ångström²), qui doit être comprise dans l'intervalle [75 - 140].[118] Les composés ayant une PSA supérieure à 120 Å² semblent posséder une plus faible capacité à passer les diffuser à travers les barrières de l'organisme. Enfin, le nombre de liaisons simples (permettant la libre rotation des substituants) ainsi que le nombre de cycles aromatiques sont des paramètres intéressants pour le développement de nouveaux candidats médicaments. Les caractéristiques physico-chimiques classiquement analysées en chémoinformatique sont résumées dans le tableau ci-dessous (**Tableau I**).[117–119]

Paramètre chémoinformatique	Norme
Masse molaire	≤ 500 Da
LogP	≤ 5
Donneurs de liaisons hydrogène	≤ 5
Accepteurs de liaisons hydrogènes	≤ 10
Nombre de liaisons à libre rotation	≤ 10
PSA	75 - 120 Å²

Tableau I. Caractéristiques chémoinformatiques de la règle de Lipinski

L'ensemble des pharmacomodulations présentées ci-dessous ont été sélectionnées en se basant notamment sur le respect de ces paramètres chémoinformatiques.

B. Pharmacomodulations de la position 3 du noyau quinoxaline

L'objectif était dans un premier temps de réaliser des pharmacomodulations en position 3 du noyau quinoxaline afin de déterminer de nouveaux groupements capables de réaliser des interactions avec le résidu Asp186 et d'autres résidus au sein de la poche ATP, dans le but d'augmenter l'affinité des composés à l'égard de *Hs*Pim-1 et donc leur activité.

Les premières modifications envisagées concernent la fonction hydroxyle du phényl en position 3. Nous avons dans un premier temps cherché à évaluer l'impact de la position de ce groupement sur le noyau phényl vis-à-vis de l'activité sur *Hs*Pim-1. Nous avons ensuite cherché à déterminer si la substitution de cette fonction hydroxyle par d'autres groupements, capables ou non de réaliser des liaisons hydrogènes, permettait d'atteindre les résultats escomptés. Enfin, une étude *in silico*, réalisée avec l'équipe du Pr. P. Bonnet (ICOA, UMR7311), consistant en l'arrimage (*docking*) de 70 molécules possédants différents groupements d'intérêt en position 3 au sein du site catalytique de *Hs*Pim-1 (référence : 3A99.pdb) a également été réalisée. Parmi les dérivés testés, quatre groupements ont retenu notre attention. Les études *in silico* ont également mis en avant l'intérêt de tester les précurseurs éthyliques de nos composés. L'ensemble des modifications de la position 3 du noyau quinoxaline est présenté ci-dessous (**Figure 44**).

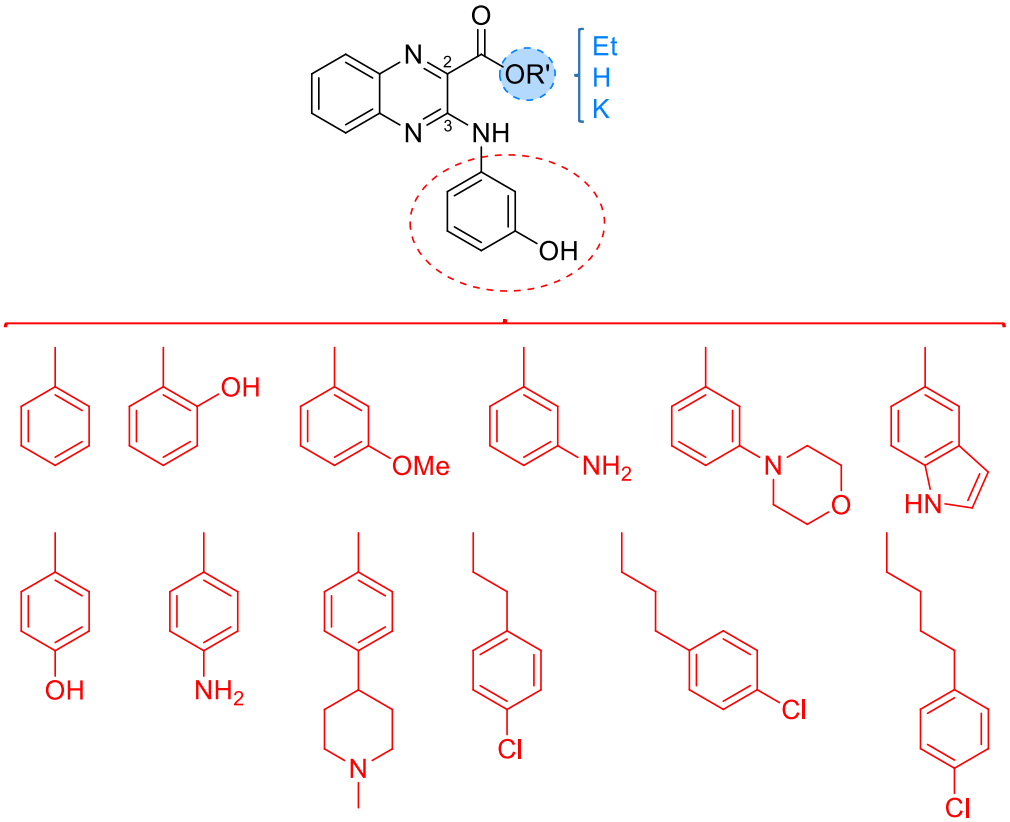


Figure 44. Pharmacomodulations de la position 3 du noyau quinoxaline

C. Pharmacomodulations des positions 6 et 7 du noyau quinoxaline

En parallèle, nous avons envisagé d'exploiter l'environnement hydrophobe unique de la région charnière du site ATP de *Hs*Pim-1, en intégrant des groupements hydrophobes tels que des halogènes ou un groupement trifluorométhyle, en positions 6 ou 7 du noyau quinoxaline dirigées vers la poche hydrophobe de la région charnière afin de concevoir des inhibiteurs sélectifs des kinases Pim (**Figure 45**). Il a ainsi été démontré, dans d'autres séries chimiques, que l'introduction d'un groupement hydrophobe capable d'établir des interactions de faible énergie avec la protéine au niveau de cette région hydrophobe, augmentait l'affinité et donc l'activité inhibitrice à l'égard des kinases Pim.[30,88]

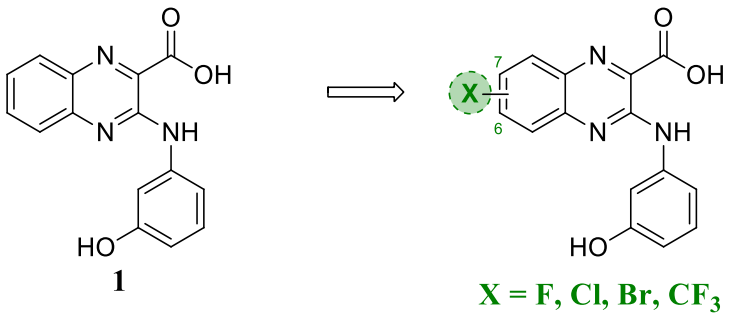


Figure 45. Pharmacomodulations des positions 6 et 7 du noyau quinoxaline

L'ensemble des pharmacomodulations est résumé dans la figure ci-dessous (**Figure 46**).

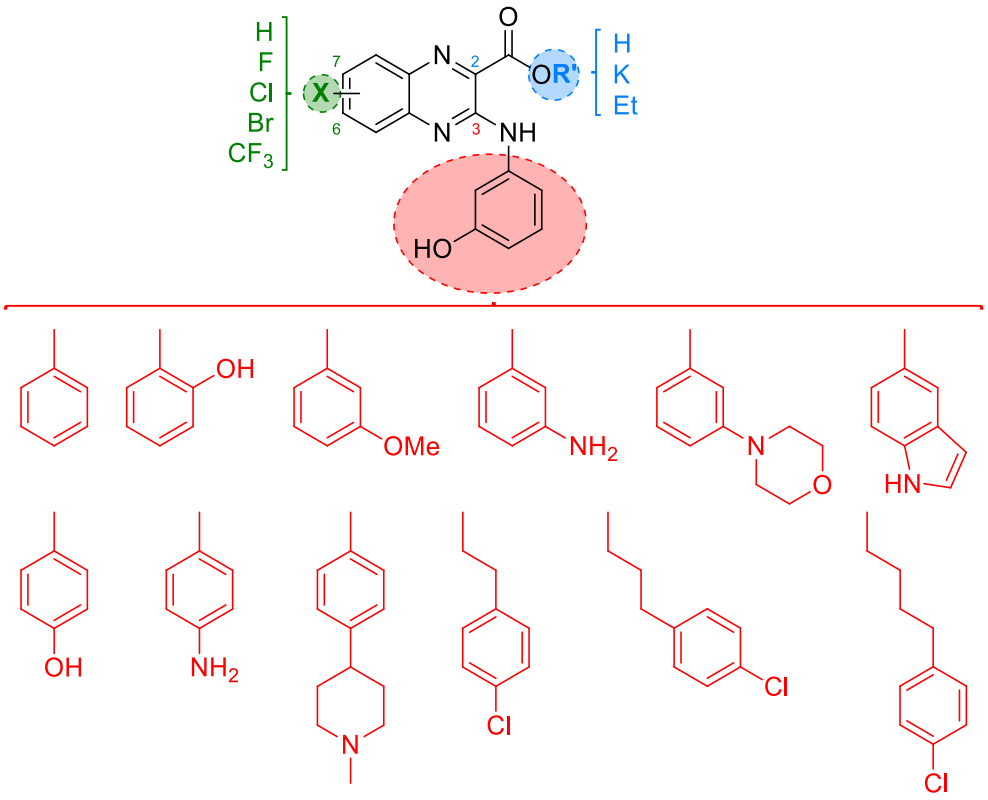
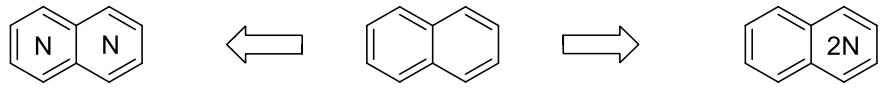


Figure 46. Modèle d'étude chimique général

PARTIE THEORIQUE

I. Aperçu bibliographique

Les diazanaphtalènes sont des dérivés poly-azotés du naphtalène. Cette famille de 10 composés est divisée en deux sous-groupes, selon la localisation des deux atomes d'azote : les naphtyridines, qui possèdent un atome d'azote sur chacun des cycles aromatiques, et les benzodiazines, pour lesquelles les deux azotes sont localisés sur le même cycle (**Schéma 1**). Ces sous-groupes sont constitués de six et quatre membres respectivement.



Naphtyridines **Naphtalène** **Benzodiazines**

Schéma 1. Structures générales des diazanaphtalènes

Le groupe des benzodiazines est composé de quatre isomères : la cinnoline, la phtalazine, la quinazoline et la quinoxaline. Les cinnolines, les quinazolines et les quinoxalines possèdent un atome d'azote en position 1 et le second atome en positons 2, 3 et 4 respectivement. Dans le cas des phtalazine, ces atomes sont localisés en positions 2 et 3 (**Schéma 2**).

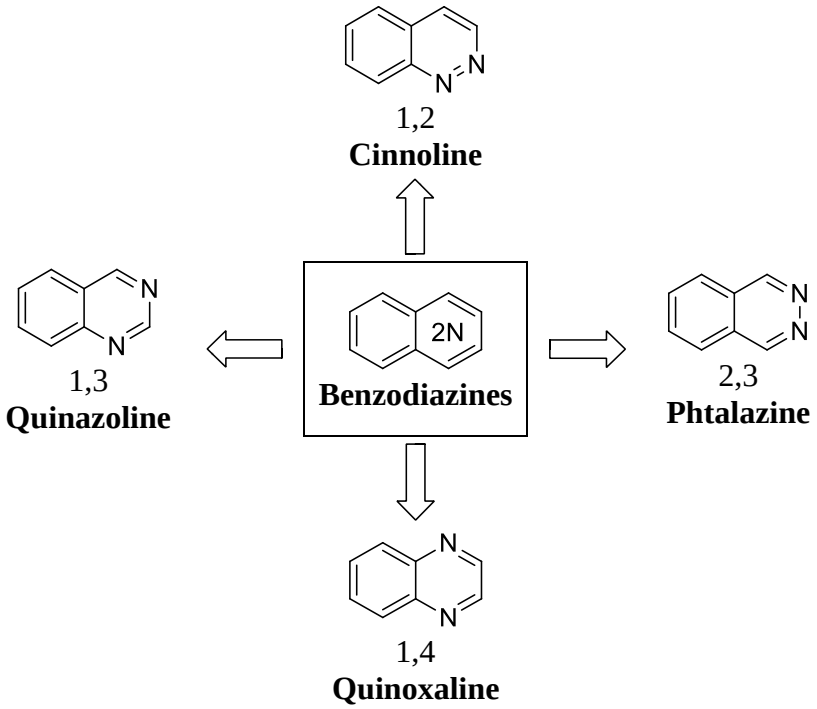


Schéma 2. Structures générales des benzodiazines

Les quinoxalines sont le résultat de la condensation spontanée d'une *o*-phénylènediamine et de composés 1,2-dicarbonylés. Le noyau quinoxaline apparait pour la première fois dans la littérature en 1884 grâce aux travaux de Hinsberg et Körner qui ont observé la condensation du glyoxal avec l'*o*-phénylènediamine (**Schéma 3**).[120,121]

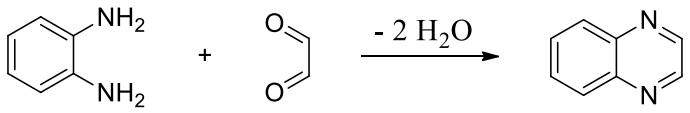


Schéma 3. Méthode de synthèse des quinoxalines employée par Hinsberg et Körner

Depuis sa découverte, le noyau quinoxaline a été, et est toujours, largement employé dans le développement de nouveaux composés synthétiques pour de nombreuses applications dans divers domaines, notamment dans le domaine de la chimie thérapeutique.

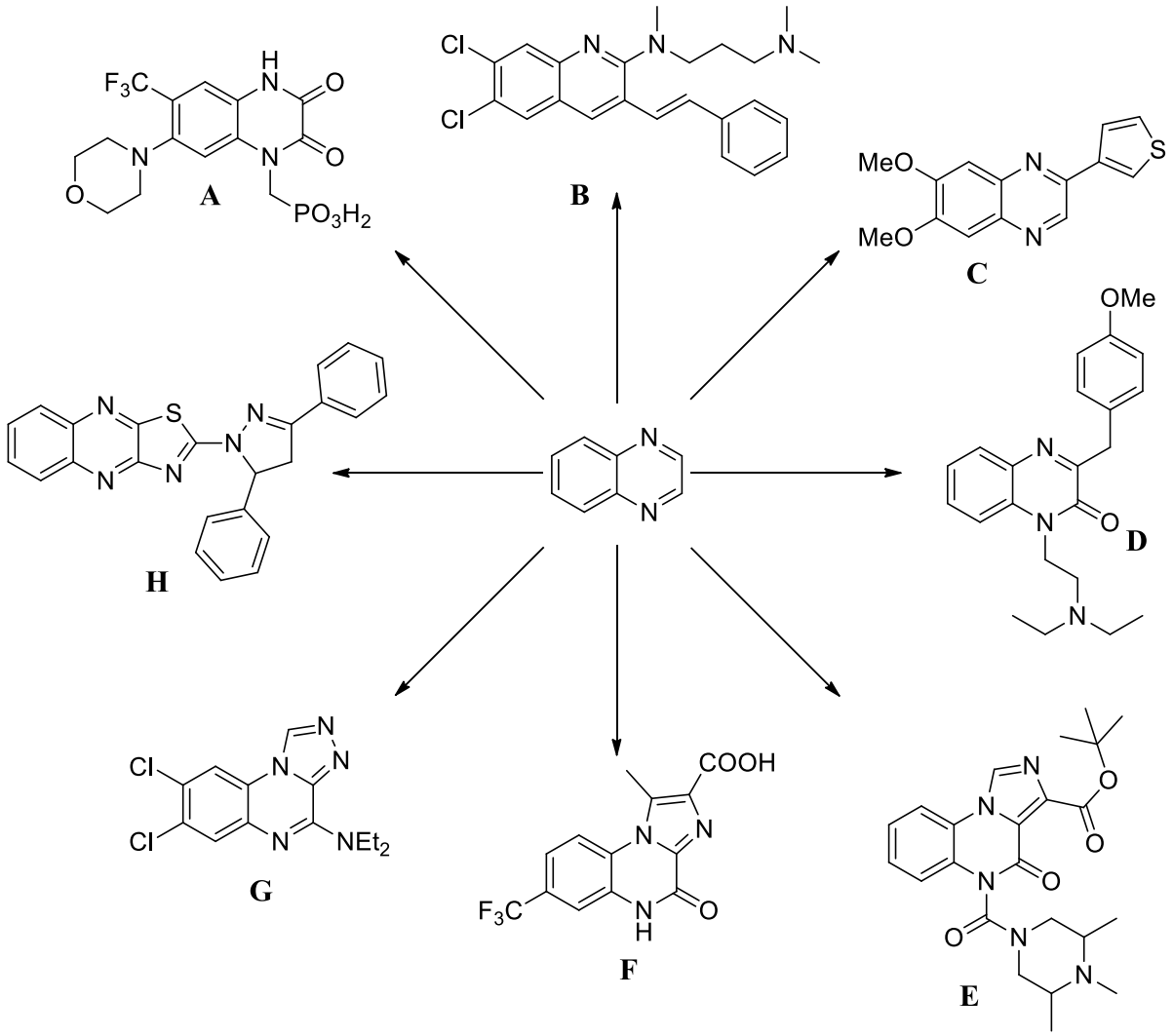
Nous nous proposons de faire, dans un premier temps, un bref récapitulatif de l'utilisation de ce motif dans la chimie médicinale puis de traiter des principales voies d'accès au noyau quinoxaline.

A. Applications en chimie thérapeutique

De nombreux composés avec des activités biologiques possèdent un motif quinoxaline. On peut ainsi retrouver des dérivés quinoxaliniques avec des activités biologiques diverses. Certains de ces composés sont décrits comme ayant des propriétés :

- Antiinfectieuses (antivirales, antibactériennes, antiparasitaires, antifongiques, etc.),[122,123]
- Anti-inflammatoires,[123]
- Anticancéreuses,[124–126]
- Antidépressives,[127]
- Pour des indications dans le diabète,[128]
- Etc.

Des analogues quinoxaliniques ont également été développés pour cibler des intermédiaires des mécaniques cellulaires tels que l'aldose réductase, les complexes benzodiazépine/$GABA_A$ (*acide γ-aminobutirique*), les récepteurs de l'AMPA (*acide α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionique*), de l'adénosine A3 ou de la sérotonine. Les quinoxalines sont également utilisées dans l'industrie (teintures, matériaux électroluminescent, dispositifs photoémetteurs organiques, matériaux fluorescents, semiconducteurs organiques, interrupteurs chimiques contrôlables) et dans l'agriculture (herbicides, fongicides, insecticides). Cette liste n'est pas exhaustive et continue sans cesse de s'étendre, démontrant ainsi l'intérêt que possède le noyau quinoxaline dans la chimie médicinale actuellement. Ce large spectre d'activité du noyau quinoxaline est lié, notamment, aux possibilités de pharmacomodulations qui peuvent être apportées (**Figure 47**).



***A** : antagoniste des récepteurs AMPA (neuroprotecteur) ; **B** : antagoniste des récepteurs au glucagon ; **C** : inhibiteur de tyrosine kinase ; **D** : spasmolytique ; **E** : agoniste des récepteurs $GABA_A$ (anxiolytique) ; **F** : antagoniste des récepteurs Glycine/NMDA ; **G** : antidépresseur ; **H** : antiamibien.*

Figure 47. Exemples de quinoxalines ayant des propriétés biologiques

Ces richesses structurales des dérivés quinoxaliniques expliquent l'effort constant de la recherche pour développer de nouvelles méthodes permettant l'accès à des quinoxalines originales diversement substituées

B. Synthèse et réactivité du noyau quinoxaline

Comme nous avons pu le voir précédemment, les variations structurales possibles des quinoxalines sont multiples. Ainsi, de nombreuses méthodes sont disponibles pour la synthèse de dérivés quinoxaliniques : [129–135]

- Par condensations d'*o*-phénylènediamines avec des réactifs dicarbonés (composés 1,2-dicarbonylés, α-hydroxycétones, des cétones, 2-aminoéthanol, etc. **Schéma 4**, voie **A**),

- Par réaction entre des dérivés de la 2-nitroaniline avec l'éthane-1,2-diol (**Schéma 4**, voie **B**),
- Par auto-condensation de dérivés de la 2-nitroaniline tels que la *N*-éthyl-2-nitroaniline (**Schéma 4**, voie **C**),
- Par condensation de benzo[*c*][1,2,5]oxadiazole avec du 2-aminoéthanol (**Schéma 4**, voie **D**),
- Etc.

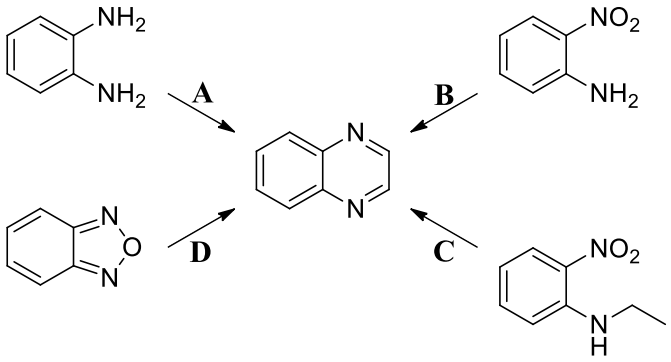


Schéma 4. Exemples de voies d'accès au noyau quinoxaline

L'une des méthodes les plus utilisées est basée sur les travaux parallèles de Hinsberg et Kröner en 1884 et consiste en la condensation d'*o*-phénylènediamines avec des composés 1,2-dicarbonylés. Cette réaction est réalisée dans l'éthanol (EtOH) ou l'acide acétique (AcOH) chauffé au reflux pendant 2 à 12 heures, permettant l'obtention de quinoxalines avec des rendements variant entre **35** et **85** % (**Schéma 5**).[129]

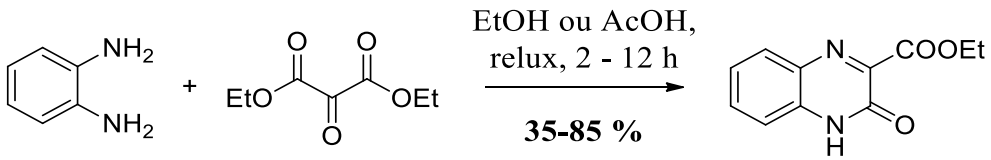


Schéma 5. Principale méthode de synthèse du noyau 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle

De nouvelles méthodes de synthèse ont été développées pour accélérer cette réaction et augmenter son rendement. C'est le cas notamment de la méthodologie décrite par Mahesh *et al.*[136] Cette méthode de synthèse de type chimie verte repose sur l'utilisation de 1,2-phénylènediamines et de composés 1,2-dicarbonylés en présence d'une quantité catalytique d'acide citrique (3 mol%) et permet de s'affranchir des conditions parfois drastiques nécessaires à la synthèse des quinoxalines. Ce protocole permet l'accès à de nombreuses quinoxalines à température ambiante en quelques minutes (**Schéma 6**).

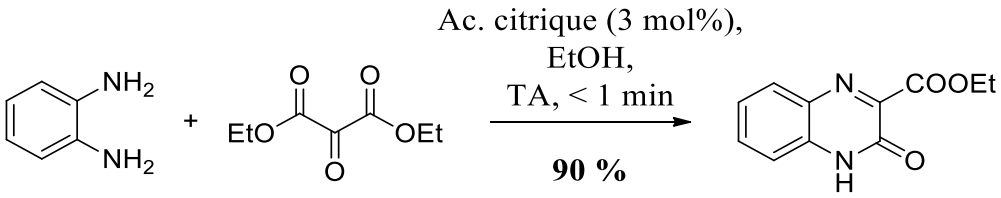


Schéma 6. Synthèse du 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle

Les méthodes d'insertion de groupements d'intérêt sur les différentes positions du noyau quinoxaline sont également nombreuses. Une des méthodes fréquemment employées consiste en l'utilisation d'*o*-phénylènediamines substituées, permettant ainsi de générer des quinoxalines substitués sur les positions 5 à 8. Dans le cas des positions 2 et 3, l'utilisation de dérivés 1,2-dicarbonylés est préconisée (**Schéma 7**).[129,137]

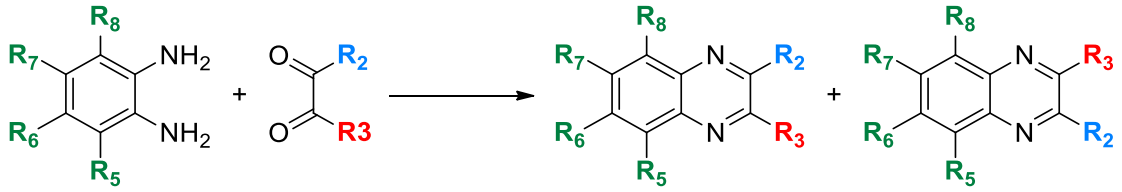


Schéma 7. Fonctionnalisation du noyau quinoxaline

De nombreuses quinoxalines poly-substituées peuvent être trouvées dans la littérature. Par exemple, dans le cas des positions 6 et 7, Takano *et al.* décrivent les synthèses simultanées des 6- et 7-chloro-3-quinoxalinecarboxylates d'éthyles à partir du 4-chloro-1,2-phénylènediamine (**Schéma 8**).[138,139]

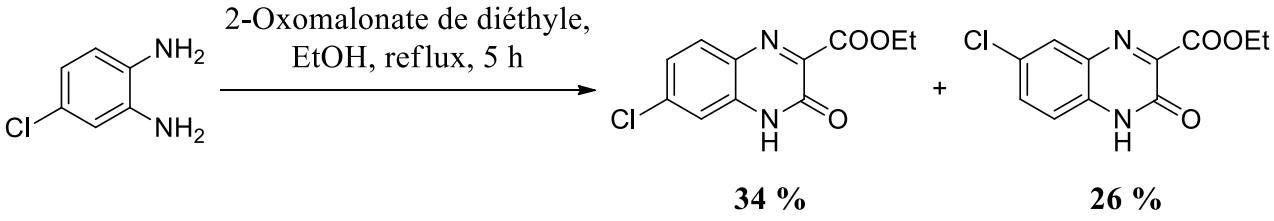


Schéma 8. Synthèse des 6 et 7-chloro-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle

En 2016, Vakhid A. Mamedov a décrit les multiples possibilités permettant d'obtenir des quinoxalines substituées notamment en positions 2 et 3.

II. Travaux réalisés

A. Analyse rétrosynthétique

La plupart des quinoxalines désirées ont été synthétisées selon le schéma rétrosynthétique ci-dessous (**Schéma 9**) à partir de diverses *o*-phénylènediamines et du 2-oxomalonate de diéthyle. Les réactifs de départ étant tous disponibles commercialement, le synthon 3-chloroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle a ainsi été obtenu après cyclisation et chloration en position 3. Une réaction d'amination avec différentes amines d'intérêt a ensuite été réalisée sur cette même position. L'ester est enfin saponifié pour donner l'acide carboxylique ou le carboxylate de potassium correspondant.

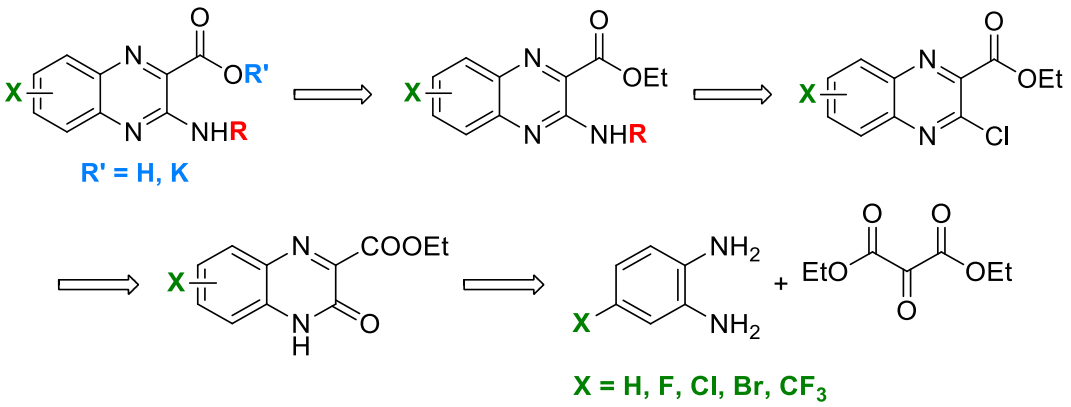


Schéma 9. Analyse rétrosynthétique

B. Accès au noyau 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle

La condensation de l'*o*-phénylènediamine avec le 2-oxomalonate de diéthyle a été effectuée en présence d'acide citrique dans l'éthanol (EtOH) à température ambiante (TA) selon le protocole décrit par Mahesh *et al.* (**Méthode A**).[136] Le 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle **2** a ainsi été obtenu avec un rendement (ρ) de **79** % (**Schéma 10**).

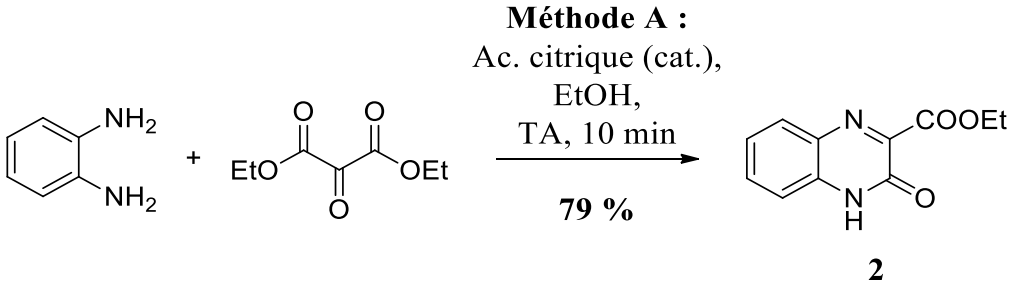


Schéma 10. Obtention du composé 2

Le mécanisme réactionnel supposé de cette réaction (**Schéma 11**) consiste en deux attaques nucléophiles concertées des fonctions amines de l'*o*-phénylènediamine sur le carbonyle en position 2 ainsi que sur l'une des fonctions carboxylate d'éthyle du 2-oxomalonate de diéthyle,

conduisant à la formation de l'intermédiaire 2-hydroxy-3-oxo-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline-2-carboxyalte d'éthyle. Celui-ci subit ensuite une déshydratation spontanée, conduisant à la formation de l'intermédiaire **2**.

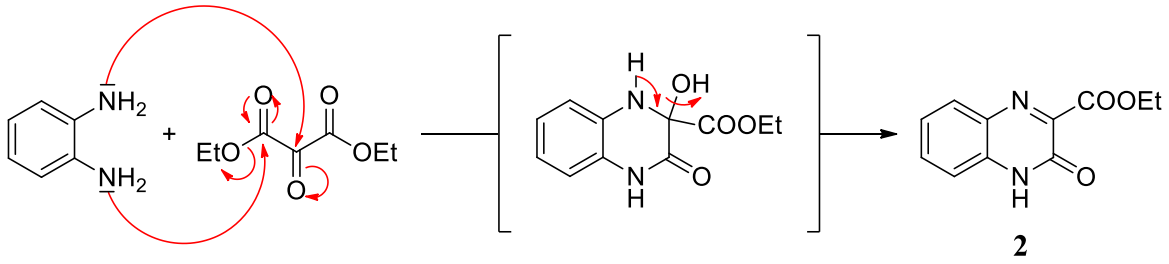


Schéma 11. Mécanisme supposé de la cyclocondensation du composé 2

Le même protocole a été appliqué pour obtenir les 3-oxo-3,4-dihydroquinoxalines substituées en positions 6 ou 7 (**Méthode A**). Cette réaction a ainsi permis d'obtenir, à partir des 1,2-phénylènediamines substituées de façon adéquate en position 4, un mélange contenant les deux isomères de position souhaités avec des rendements allant de **16** à **54 %** (**Schéma 12**, **Tableau II**).

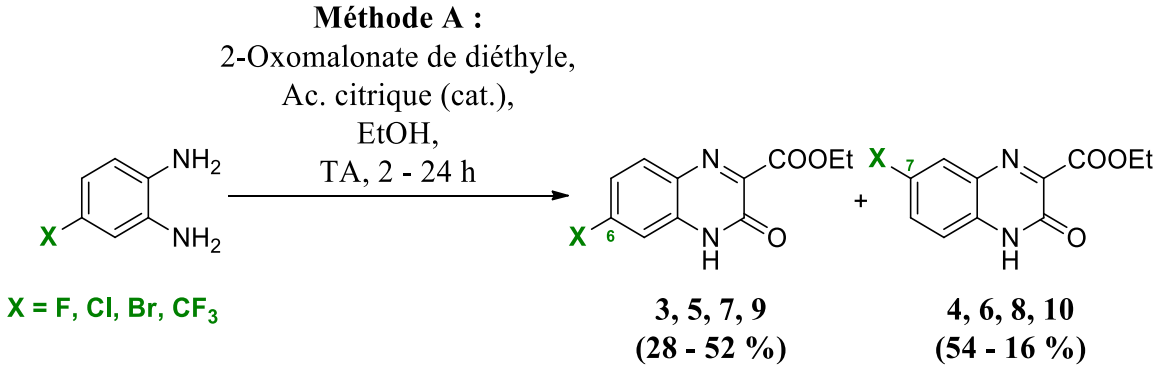


Schéma 12. Obtention des composés 3 à 10

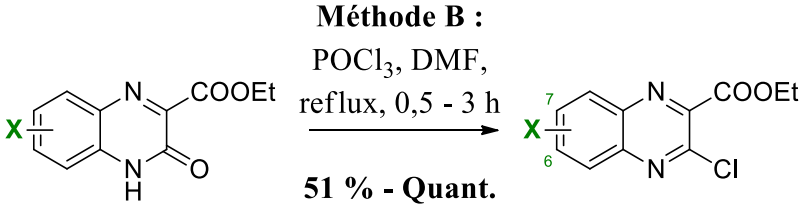
Composé	X	Temps (h)	ρ (%)
3	6-F	18	**28**
4	7-F		**54**
5	6-Cl	2	**32**
6	7-Cl		**54**
7	6-Br	24	**33**
8	7-Br		**26**
9	6-CF_3	18	**52**
10	7-CF_3		**16**

Tableau II. Obtention des composés 3 à 10

Les neuf analogues de 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline ont ensuite été engagés dans l'étape de chloration en position 3, nécessaire à leur amination ultérieure.

C. Chloration en position 3

La chloration des composés **2** à **10** a été réalisée dans les conditions décrites par Mahesh *et al.*,[136] dans du oxychlorure de phosphore ($POCl_3$) au reflux, en présence de *N*,*N*-diméthylformamide (DMF) (**Méthode B, Schéma 13**). Les quinoxalines 11 à 19 ont été obtenues avec des rendements allant de **51 %** à quantitatifs (Quant.) (**Tableau III**).



2 - 10 **11 - 19**

X = H, F, Cl, Br, CF_3

Schéma 13. Obtention des composés 11 à 19

Composé	X	Temps (h)	ρ (%)
11	H	0,5	**Quant.**
12	6-F	3	**74**
13	7-F	3	**Quant.**
14	6-Cl	3	**Quant.**
15	7-Cl	3	**94**
16	6-Br	3	**Quant.**
17	7-Br	3	**Quant.**
18	6-CF_3	3	**Quant.**
19	7-CF_3	3	**51**

Tableau III. Obtention des composés 11 à 19

Le mécanisme de cette réaction de chloration en position 3 du noyau quinoxaline (**Schéma 14**) passe par l'intermédiaire généré dans la réaction de Vilsmeier-Haack à partir du *N*,*N*-diméthylformamide et du oxychlorure de phosphore. Le carbone de cet intermédiaire est attaqué par le carbonyle de l'intermédiaire **2**, conduisant à la formation d'un intermédiaire quinoxalium. Deux cascades électroniques intramoléculaires conduisent à la libération de l'atome de chlore qui va s'insérer en position 3, donnant un nouvel intermédiaire de type quinoxalinide. Celui-ci subit alors à son tour un réarrangement électronique permettant de régénérer le DMF et d'accéder au composé **11** chloré en position 3.

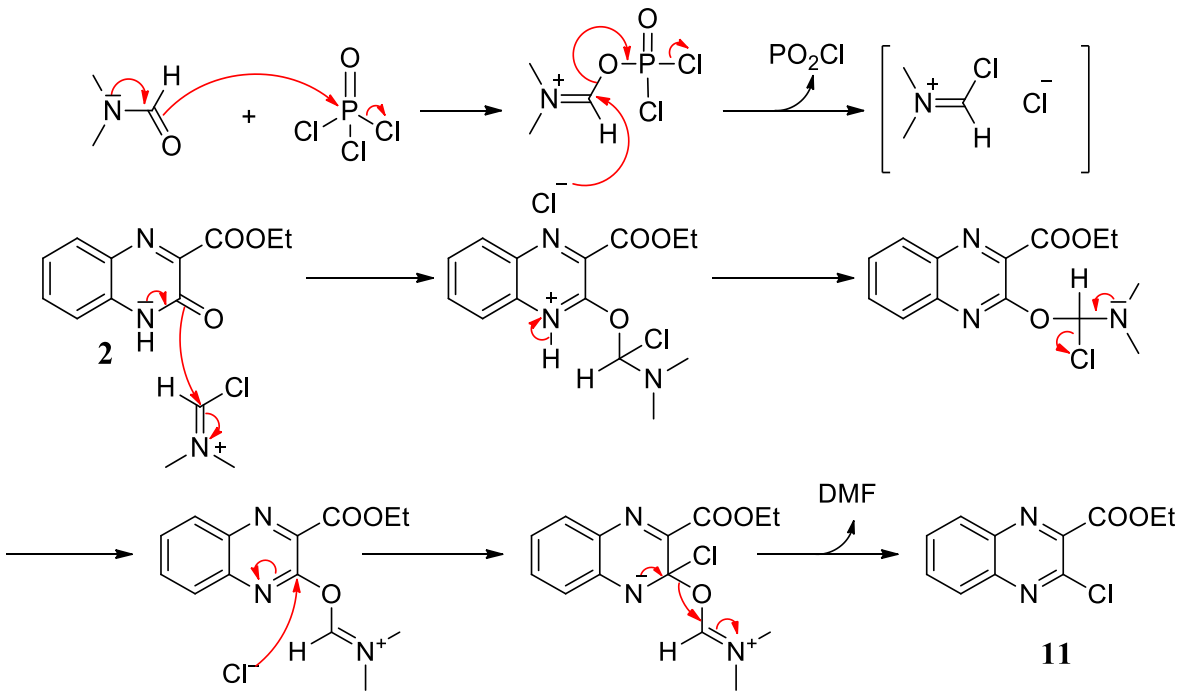


Schéma 14. Mécanisme de chloration du composé 11

Des problèmes de stabilité ont été constatés pour certaines de ces quinoxalines chlorées. Il a donc été décidé d'engager les composés **11** à **19** dans l'étape suivante sans purification et le plus rapidement possible.

D. Synthèse des amines d'intérêt

Certaines des amines ont dû être synthétisées puisqu'elles n'étaient pas disponibles commercialement.

1. Synthèse des (3-aminophényl)carbamate de *tert*-butyle **20** et (4-aminophényl) carbamate de *tert*-butyle **21**

La synthèse des (3-aminophényl)carbamate de *tert*-butyle **20** et (4-aminophényl) carbamate de *tert*-butyle **21** a été effectuée selon le protocole de Jahani *et al.*[140] Les phénylènediamines commerciales ont ainsi été protégées de manière sélective sur l'une des deux fonctions amines en utilisant du chlorhydrate de guanidine (Gu.Cl) comme catalyseur organique dans l'éthanol à 0 °C pendant 1 heure (**Méthode C**). Le chlorure de guanidine permet de diminuer la réactivité d'une des deux fonctions amines en se complexant avec celle-ci. Les composés **20** et **21** ont été obtenus avec des rendements respectifs de **74** et **75 %** (**Schéma 15**).

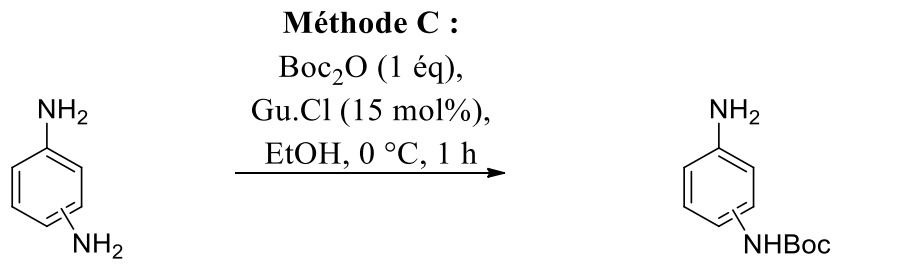


Schéma 15. Obtention des composés 20 et 21

2. Synthèse de la 4-(*N*-méthylpipéridin-4-yl)aniline **23**

La préparation de la 4-(*N*-méthylpipéridin-4-yl)aniline **23** a été effectuée en deux étapes selon les condition de Wurz *et al.*[141] Tout d'abord, une réaction de couplage pallado-catalysée de Suzuki-Miyaura entre la 4-bromoanilline et l'ester boronique approprié a permis d'obtenir l'intermédiaire **22** avec un rendement de **73 %** (**Schéma 16**).

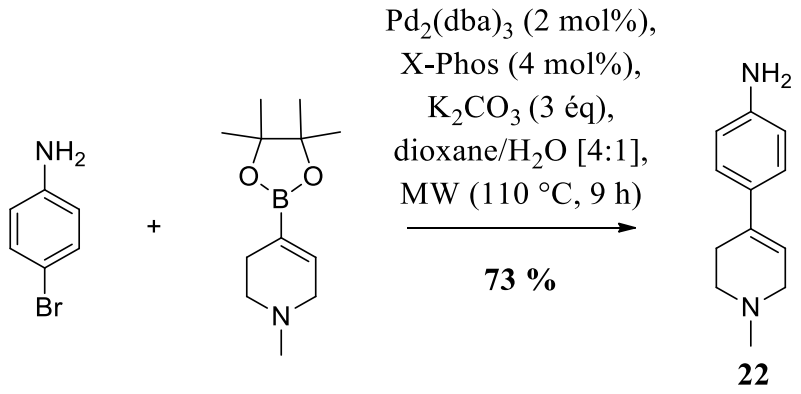


Schéma 16. Obtention du composé 22

Ce composé a ensuite été engagé dans une réaction d'hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon (Pd/C) pour donner l'aniline désirée **23** avec un rendement de **91** % (**Schéma 17**).

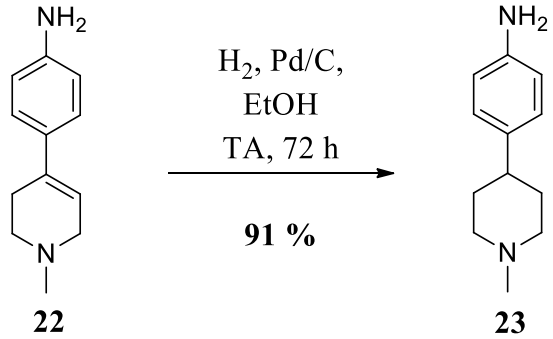
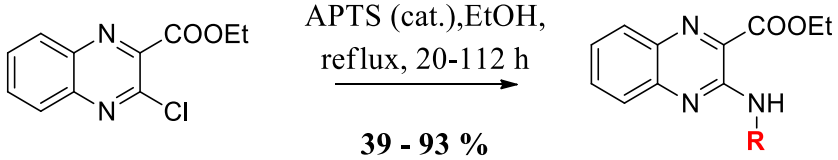


Schéma 17. Obtention du composé 23

Les amines synthétisées et celles disponibles commercialement ont ensuite été utilisées dans la réaction d'amination de la position 3 des composé **11** à **19**.

E. Réaction d'amination

La réaction d'amination, décrite par Kumar *et al.*,[142] consiste à faire réagir différentes amines en excès sur la quinoxaline chlorée **11** en présence d'une quantité catalytique d'acide *para*-toluène sulfonique (APTS) au reflux de l'éthanol (**Méthode D1**), permettant l'accès aux composés souhaités par réaction de substitution nucléophile aromatique (**Schéma 18**). Les composés **24** à **30** ont ainsi été obtenus avec des rendements allant de **39** à **93 %** (**Tableau IV**).



11 **24 - 30**

Schéma 18. Obtention des composés 24 à 30

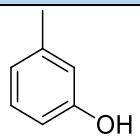
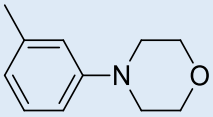
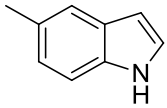
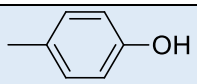
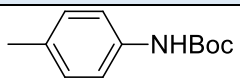
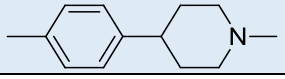
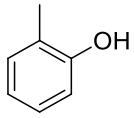
Composé	R	Nombre d'équivalents d'amine	Temps (h)	ρ (%)
24		3,0	110	**69**
25		1,1	110	**76**
26		3,0	36	**73**
27		3,0	20	**39**
28		3,0	64	**93**
29		1,1	112	**63**
30		1,1	110	**50**

Tableau IV. Obtention des composés 24 à 30

Dans la majorité des cas, 3 équivalents d'amine ont été nécessaires afin d'obtenir les composés désirés. Cependant, pour la synthèse des dérivés **25**, **29** et **30**, 1,1 équivalent d'amine

ont permis d'isoler les composés souhaités avec des rendements satisfaisants. Les quantités de produits pour chaque réaction ayant été suffisantes pour achever la synthèse et réaliser les évaluations pharmacologiques de nos composés, les conditions opératoires à ce stade n'ont donc pas été optimisées.

Dans le cas de l'amine **20**, le clivage de la fonction carbamate de *tert*-butyle a eu lieu spontanément au cours de la réaction de couplage, conduisant au composé déprotégé **31** avec un rendement de **32** % (**Schéma 19**).

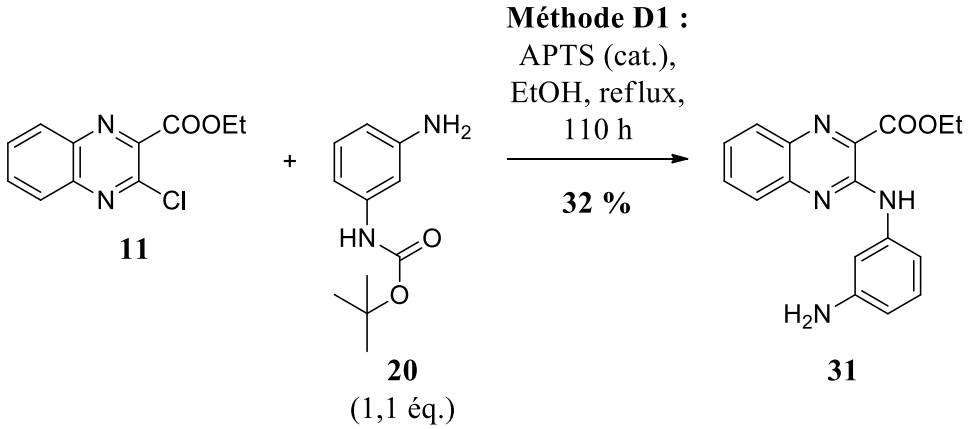


Schéma 19. Obtention du composé 31

La déprotection de la fonction amine du composé **28** a été effectuée selon un protocole classique en utilisant une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) dans le dichlorométhane (DCM) à température ambiante pendant 6 heures, permettant d'obtenir le dérivé **32** avec un rendement de **96** % (**Schéma 20**).

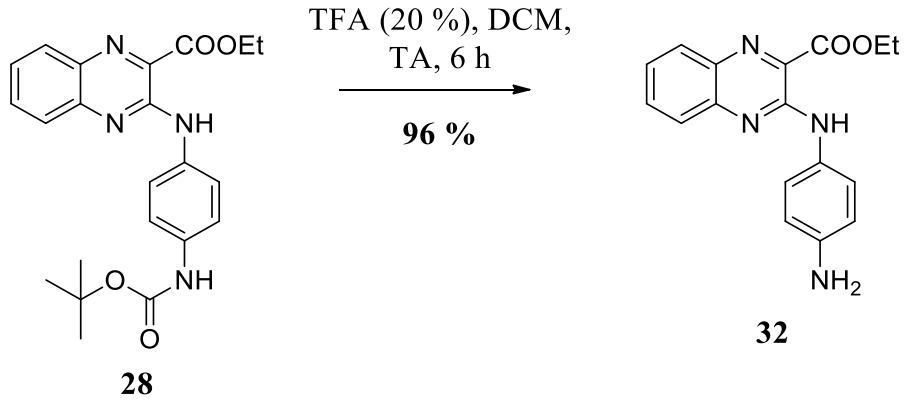


Schéma 20. Obtention du composé 32

Compte tenu du temps important de réaction, des essais ont été réalisés en utilisant une technologie de chauffage par irradiation micro-ondes (MW) à 150 °C pendant 3 heures et sans utiliser d'acide *para*-toluènesulfonique, ce qui nous a permis d'isoler à nouveau le composé **24** avec un rendement de **70 %**. Ce nouveau protocole (**Méthode D2**) a été utilisé avec les

quinoxalines **11** à **19** et d'autres amines d'intérêt, permettant d'obtenir les composés **33** à **45** avec des rendements allant de **30** à **99** % (**Schéma 21**, **Tableau V**).

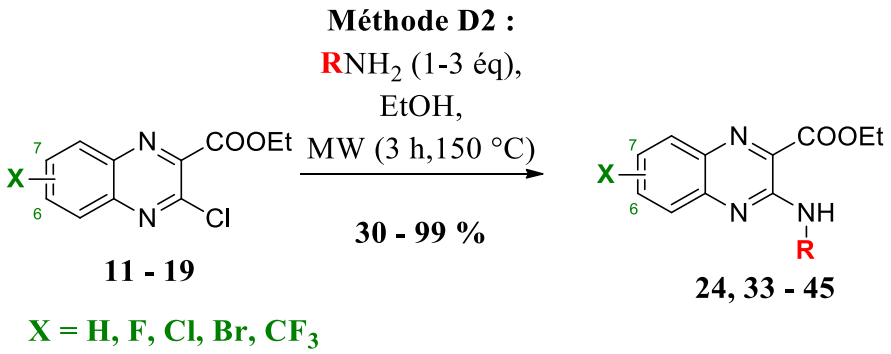


Schéma 21. Obtention des composés 33 à 45

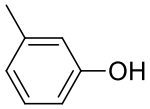
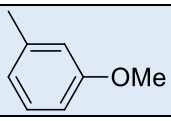
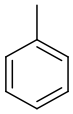
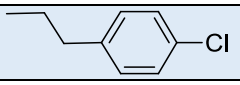
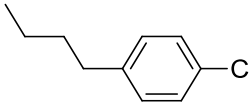
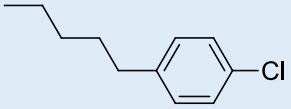
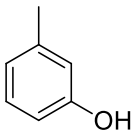
Composé	R	X	Nombre d'équivalents d'amine	ρ (%)
24		H	1,1	**70**
33			1,0	**54**
34			1,1	**49**
35			1,1	**30**
36			1,1	**78**
37			1,1	**49**
38		6-F	1,1	**82**
39		7-F	1,1	**42**
40		6-Cl	3,0	**99**
41		7-Cl	1,1	**51**
42		6-Br	3,0	**29**
43		7-Br	3,0	**34**
44		6-CF_3	3,0	**70**
45		7-CF_3	1,1	**36**

Tableau V. Obtention des composés 33 à 45

Les réactions ont été réalisées en utilisant 1,0 ou 1,1 équivalent d'amine. Cependant, dans les cas où de telles conditions ne permettaient pas d'obtenir avec de bons rendements les produits (composés **40**, **42**, **43** et **44**), celles-ci ont été à nouveau réalisées en augmentant à 3

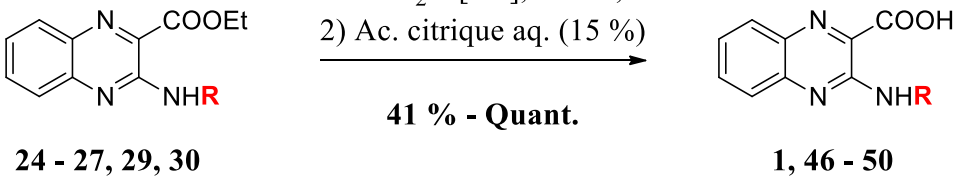
équivalents le nombre d'amine. Les rendements plus faibles observés pour les composés **35**, **39**, **42**, **43** et **45** sont liés à des phénomènes de dégradation de ces composés lors de la purification par colonne chromatographique.

Les 21 esters obtenus ont ensuite été engagés dans une réaction de saponification pour obtenir les acides carboxyliques désirés.

F. Saponification

Trois protocoles ont été utilisés pour la saponification des composés (**Méthodes E1** à **E3**). Ces protocoles diffèrent au niveau du nombre d'équivalents de base utilisée (carbonate de potassium (K_2CO_3), 1 à 4 équivalents) ainsi qu'au niveau du traitement de cette réaction (acidification ou non du milieu réactionnel).

La saponification des composés **24**, **25**, **26**, **27**, **29** et **30** a été réalisée en utilisant un excès de carbonate de potassium (K_2CO_3) dans une solution aqueuse de méthanol à 80 % ($MeOH/H_2O$ [4:1]) chauffée au reflux pendant 4 heures. Le milieu a ensuite été traité avec une solution aqueuse d'acide citrique. Les composés **1** et **46** à **50** ont été isolés avec des rendements allant de **41 %** à quantitatifs (**Schéma 22**, **Tableau VI**).



24 - 27, 29, 30 **1, 46 - 50**

Schéma 22. Obtention des composés 1 et 47 à 50

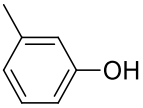
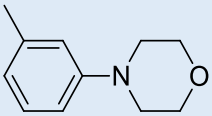
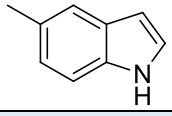
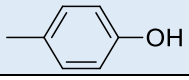
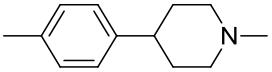
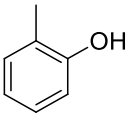
Composé	R	Nombre d'équivalents de K_2CO_3	ρ (%)
1		3	**78**
46		4	**Quant.**
47		3	**41**
48		2	**97**
49		3	**49**
50		3	**65**

Tableau VI. Obtention des composés 1 et 47 à 50

Ces variations de rendements sont liées à des difficultés rencontrées lors des étapes de purification des réactions. Néanmoins, les quantités isolées obtenues pour chacun des produits ont été suffisantes pour la suite des travaux.

La saponification des composés **33** à **45** a été effectuée selon la méthode **E1.** Cependant les premiers essais réalisés avec les composés **33** et **34** ont montré que le traitement de la réaction par l'acide citrique conduisait à des problèmes lors de la purification des acides obtenus. Il a ainsi été décidé pour ces composés de remplacer la solution aqueuse d'acide citrique à 15 % par une solution d'acide chlorhydrique (HCl 1N) (**Méthode E2**, **Schéma 23**). Les composés **51** à **63** ont ainsi été synthétisés avec des rendements allant de **82 %** à quantitatifs (**Tableau VII**).

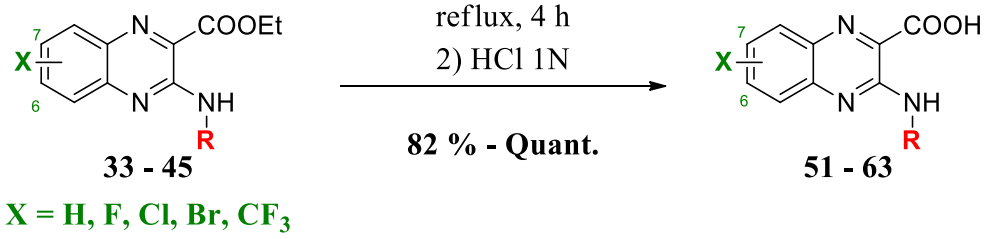


Schéma 23. Obtention des composés 51 à 63

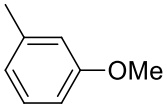
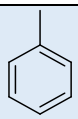
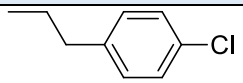
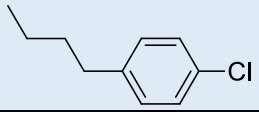
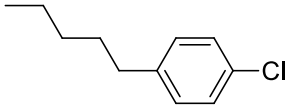
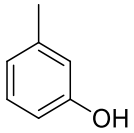
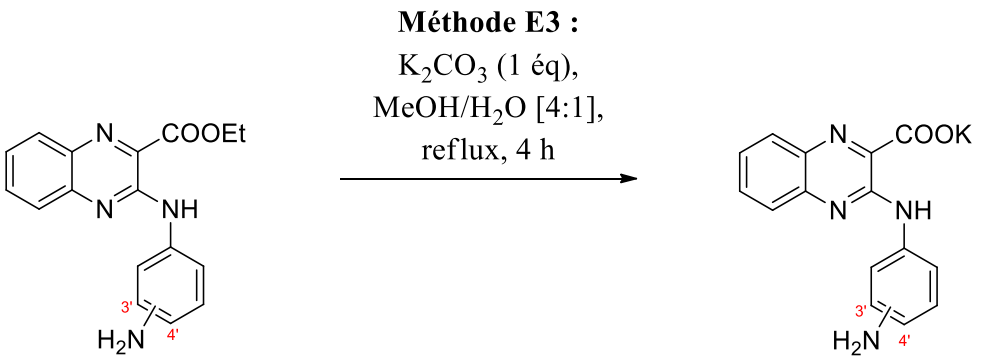
Composé	R	X	ρ (%)
51		H	**82**
52			**Quant.**
53			**Quant.**
54			**Quant.**
55			**97**
56		6-F	**Quant.**
57		7-F	**99**
58		6-Cl	**85**
59		7-Cl	**Quant.**
60		6-Br	**Quant.**
61		7-Br	**Quant.**
62		6-CF_3	**Quant.**
63		7-CF_3	**Quant.**

Tableau VII. Obtention des composés 51 à 63

Cette méthode **E2** a également été utilisée pour saponifier les ester **31** et **32**, cependant, l'acidification du milieu réactionnel conduit à la formation de précipités insolubles dans la plupart des solvants à notre disposition. Nous avons donc décidé de n'utiliser qu'un seul équivalent de K_2CO_3 et de ne pas réaliser de traitement acide de la réaction (**Méthode E3**), permettant ainsi l'accès aux sels potassiques **64** et **65** avec des rendements **quantitatifs** et de **87 %**, respectivement (**Schéma 24**).



31 : 3'-NH_2
32 : 4'-NH_2

64 : 3'-NH_2, **Quant.**
65 : 4'-NH_2, **87 %**

Schéma 24. Obtention des composés 64 et 65

G. Conclusion

Ces travaux de thèse ont permis d'aboutir à une stratégie de synthèse efficace conduisant à la synthèse de 20 dérivés de l'acide 3-((3-hydroxyphényl)amino)quinoxaline-2-carboxylique **1**. Ces composés et leurs esters éthyliques ont été testés sur un panel de kinases comprenant *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2. Les composés présentant une activité intéressante sur *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 ont ensuite été testés sur un panel de kinases de mammifères ainsi que sur trois lignées cellulaires de leucémie myéloïde.

ETUDE ET RESULTATS PHARMACOLOGIQUES

I. Matériels et méthodes

A. Test de perméabilité membranaire

Il existe trois techniques pour quantifier les capacités d'un composé à franchir les membranes cellulaires : le PAMPA (*parallel artificial membrane permeability assay*), l'IAM HPLC (*immobilized artificial membrane high-performance liquid chromatography*) et le Caco-2. Les deux premières permettent d'évaluer rapidement et facilement les capacités de diffusion passive des composés tandis que le Caco-2, appelé ainsi en raison de la lignée cellulaire employée, nécessite un appareillage plus lourd puisqu'il permet d'évaluer également les phénomènes d'efflux et d'absorption active ainsi que la perméabilité para-cellulaire.

Une étude PAMPA a été réalisée sur le composé chef de file **1**. Cette méthode d'analyse, développée par Kansy *et al.*,[143] a été réalisée par la société Creative BioArray basée aux Etats-Unis.

Les solutions-mères ont été réalisées en utilisant du DMSO (*diméthylsulfoxide*) ou de l'acétonitrile à des concentrations de 10 mM. La testostérone et le méthotrexate ont été utilisés comme contrôles lors de cette étude. Les solutions-mères ont été diluées avec du tampon PBS (*phosphaste buffered saline*) (pH 7,4) pour atteindre des concentrations finales de 10 µM. Les analyses ont été réalisées en plaque 96 puits en utilisant le dispositif PAMPA (**Figure 48**) vendu par Merck Millipore et selon le protocole décrit ci-dessous.

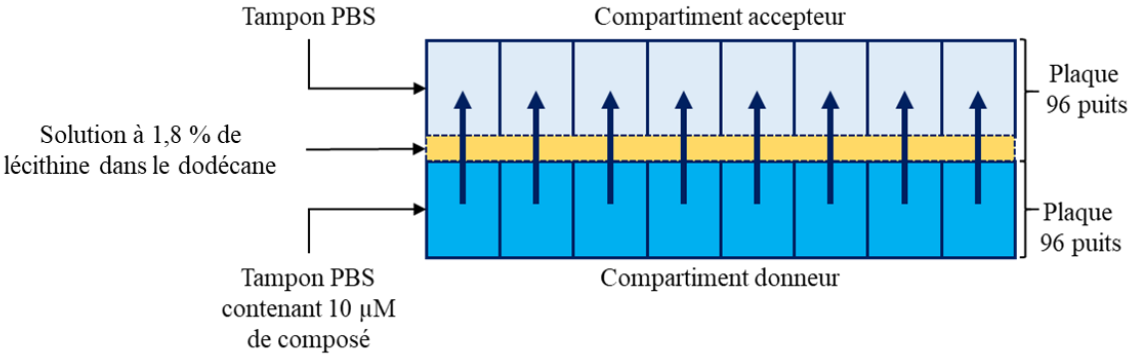


Figure 48. Illustration de l'appareillage PAMPA

Cinq µL (*microlitres*) d'une solution à 1,8 % (m/v) de lécithine dans le dodécane sont versés au moyen d'une micro-pipette dans le compartiment supérieur (compartiment accepteur) de chacun des puits. Immédiatement après l'application de la membrane artificielle, 300 µL de solution de PBS (pH 7,4) sont versés dans le compartiment accepteur des puits, et 300 µL de solution contenant les composés sont versés dans le compartiment inférieur (compartiment donneur) des puits. Les deux compartiments sont ensuite réunis et incubés pendant 16 heures à

25 °C sous agitation (60 tours/minute). Après incubation, 50 µL de chacun des compartiments donneurs et accepteurs sont transférés dans une plaque 96 puits auxquels sont ensuite ajoutés 200 µL de méthanol. La plaque est ensuite vortexée à 750 tours par minute. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 20 minutes à 3220 g avant d'être analysés par LC/MS/MS.

La perméabilité effective (**Pe**), exprimée en centimètres par seconde, est calculée selon l'équation suivante :

$$Log\ Pe = Log(C \times \left(-Ln\left(1 - \frac{[Composé]_{accepteur}}{[Composé]_{équilibre}}\right)\right))$$

Les analyses LC/MS/MS ont été réalisées en utilisant un système chromatographique Shimadzu et un système spectrométrique de masse TripleQuad™ 5500 de AB Inc (Canada).

La perméabilité d'un composé est catégorisée selon la valeur de **-LogPe**. Si celle-ci est inférieure à 6, alors le composé possède une forte perméabilité membranaire. Si **-LogPe** est supérieur à 6, on considère alors que la perméabilité membranaire du composé est faible.

B. Tests enzymatiques

Les tests enzymatiques ont été réalisés par nos collaborateurs de la plateforme de criblage KISSf (*Kinase Inhibitor Specialized Screening facility,* USR3151 CNRS/UPMC) de la station biologique de Roscoff.

Les composés ont tout d'abord été testés sur l'enzyme purifiée *Hs*Pim-1. Les composés présentant une activité inférieure à 1 µM ont ensuite été testés sur *Hs*Pim-2. Enfin, les composés présentant une activité sur ces deux kinases ont été testés sur un panel de kinases de mammifères pour déterminer leur profil de sélectivité.

Les réactions de phosphorylations enzymatiques ont été réalisées en plaques 384 puits en utilisant le kit de test ADP-Glo™ (Promega) selon les recommandations du fabricant (**Figure 49**). Ce test permet de détecter l'ADP par luminescence de façon rapide et homogène. Cela permet ainsi de mesurer l'activité d'une kinase en mesurant les taux d'ADP produit par l'enzyme. Les réactions ont été réalisées dans une solution tampon ADP-Glo™ (pH = 7,5 (KOH)) contenant 40 mM de Tris, du sérum d'albumine bovin à 0,1 % (m/v) et 20 mM de chlorure de magnésium. La réaction de phosphorylation, réalisée dans un volume total de 5 µL, a été déclenchée par l'addition de 25 nM de kinase, en présence de 10 µM de substrat, de 10 µM d'ATP et des composés chimiques à tester à différentes concentrations (solution-mère à 20 mM dans le DMSO) (**Figure 49**, étape **A**). Après 30 minutes d'incubation à 30 °C, la réaction

enzymatique a été stoppée par addition de 5 µL de réactif pour kinase ADP-Glo™ (**Figure 49**, étape **B**). Après 50 minutes d'incubation à température ambiante, 10 µL de réactif de détection pour kinase ont été ajoutés puis le milieu a été incubé 1 heure à température ambiante (**Figure 49, étape** C**)**. Le signal transmis a été mesuré en utilisant un luminomètre pour microplaque Envision (de PerkinElmer) et exprimé en RLU (*relative light unit*).

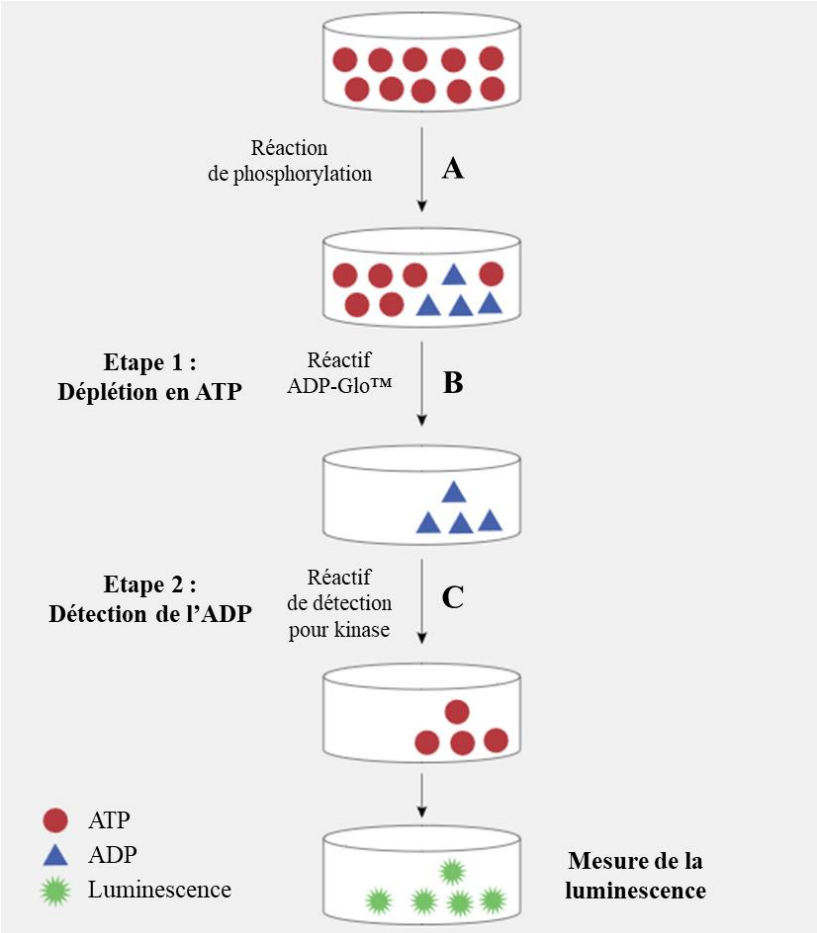


Figure 49. Principe de la méthode ADP-Glo™

Tous les composés ont été testés en duplicat et à 9 dilutions. Les activités ont été exprimées en pourcentage de l'activité maximale (c'est-à-dire en l'absence d'inhibiteur). Quand une activité dose-dépendante a été observée, une régression linéaire a été réalisée, permettant de calculer les CI_{50} des composés correspondants. Les composés présentant une CI_{50} supérieure à 10 µM ont été considérés comme inactifs. Les composés présentant une activité sur *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 ont été testés sur le panel de kinases de mammifères suivant : *Rn*DYRK1A, *Hs*CDK5/p25, *Hs*CDK9/CyclinT, *Hs*Haspin, *Mm*CLK1, *Hs*CK1ε et *Hs*GSK3β.

Au total, 42 composés ont été criblées. Le composé SGI-1776 a été utilisé comme références pour les tests enzymatiques.

C. Tests cellulaires

Les évaluations biologiques sur cellules ont été réalisées par nos collaborateurs de l'équipe LNOx (*Leukemic Niche & redOx metabolism*) du GICC. Ces évaluations ont été menées sur des lignées cellulaires de leucémie myéloïde :

- **KU812** : lignée cellulaire de LMC.
- **K562** : lignée cellulaire de LMC.
- **MV4-11** : lignée cellulaire de LAM.

Ces tests ont été réalisés par des méthodes colorimétriques et les CE_{50} (*concentrations effectrices à 50 %*) de viabilité ont été mesurées pour nos composés.

Les cellules ont été traitées avec une gamme de concentration allant de 100 nM à 50 µM pendant 48 heures. La viabilité cellulaire a ensuite été déterminée par des tests colorimétriques au MTT, et les valeurs des CE_{50} ont été calculées en utilisant le programme Graphpad PRISM 7. Les tests ont été réalisés en triplicat et les données sont exprimées sous le format « moyenne ± écart-type ». Les composés présentant une CE_{50} supérieure à 100 µM ont été considérés comme inactifs sur les lignées cellulaires concernées.

1. Test colorimétrique au MTT

Il existe diverses méthodes pour déterminer la viabilité et la prolifération de cellules en réponse à un stimulus ou à un traitement. Les méthodes indirectes utilisant un réactif colorimétrique et permettant une lecture automatique sont très avantageuses, puisqu'elles sont rapides et simples à mettre en œuvre. Le test colorimétriques MTT développé par Mosmann *et al.*[144] est une méthode pratique et fiable de détermination du nombre de cellules vivantes. Cette méthode est basée sur la réduction enzymatique du sel jaune de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) en cristaux de formazan violet par les enzymes mitochondriales des cellules métaboliquement actives (**Schéma 25**, **Figure 50**).

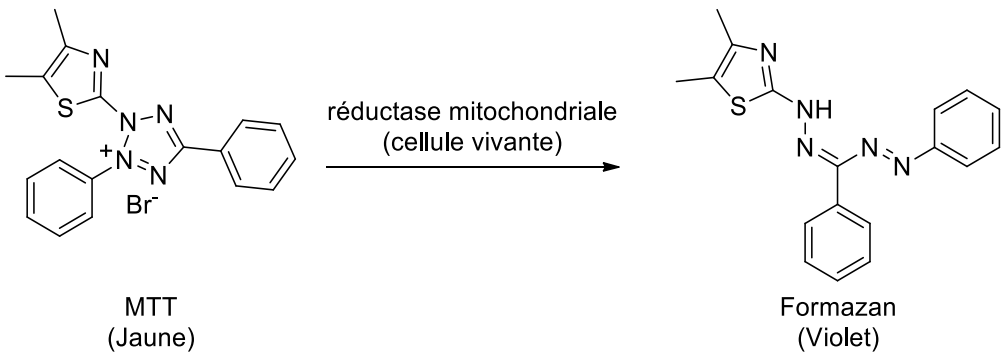


Schéma 25. Réduction du MTT au sein des cellules vivantes

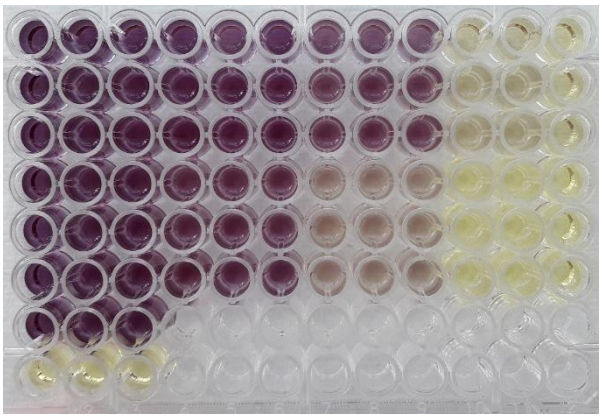


Figure 50. Plaque 96-puits utilisée pour un test MTT

Les cristaux de formazan sont alors solubilisés par une solution de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 10 % avec de l'acide chlorhydrique à 0,037 % pour produire une solution dont l'absorbance à 570 nm est corrélée de façon linéaire à l'activité métabolique et au nombre de cellules vivantes. Le test MTT présente une bonne sensibilité et est réalisable en plaques 96 puits qui peuvent être analysées par un lecteur d'absorbance multiplaques. Enfin, la relation de proportionnalité entre le nombre de cellules et l'absorbance est linéaire jusqu'à 1 million de cellules par puits.

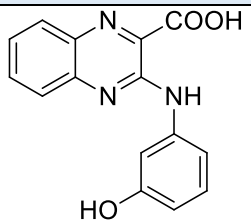
2. Test colorimétrique au bleu trypan

Le bleu trypan est un colorant d'exclusion de la famille des colorants azoïques qui est utilisé pour le comptage des cellules vivantes. Lorsqu'un tel colorant entre dans une cellule vivante, cette dernière active un mécanisme d'exclusion qui va rejeter le colorant à l'extérieur de la cellule. Ce mécanisme est consommateur d'énergie et ne peut avoir lieu dans une cellule morte. Donc les cellules vivantes restent incolores alors que les cellules mortes apparaissent en bleu. Ainsi la prolifération des cellules traitées par les nouveaux analogues est évaluée par comptage sur lame de Malassez des cellules vivantes (incolores) et mortes (bleues) sous microscope optique.

II. Résultats

A. Test de perméabilité membranaire

La perméabilité membranaire du composé chef de file **1** a tout d'abord été évaluée en réalisant un test PAMPA, dont les résultats sont présentés dasn le tableau ci-dessous (**Tableau VIII**).

Composé	-Log(Pe)
Méthotrexate	> 8,06
Testostérone	4,37
 1	7,31

-Log(Pe) < 6 : perméabilité membranaire élevée.
-Log(Pe) > 6 : perméabilité membranaire faible

Tableau VIII. Résultats de l'étude PAMPA du composé 1

La perméabilité d'un composé peut être considérée comme étant élevée ou faible selon la valeur du **–Log(Pe)**. Si celle-ci est inférieure à 6, la perméabilité du composé est considérée comme élevée. A l'inverse, la perméabilité membranaire sera faible si la valeur du **-Log(Pe)** est supérieure à 6.

Le composé **1** présente une valeur de **-Log(Pe)** de **7,31** est peut donc être considéré comme possédant une faible perméabilité membranaire, phénomène fréquent pour les composés présentant une fonction acide carboxylique.

B. Tests enzymatiques

1. Inhibition de l'activité enzymatique de *Hs*Pim-1

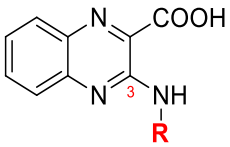
Les 20 composés synthétisés et leurs ester éthyliques ont été évalués par un test ADP-Glo™ sur la kinase *Hs*Pim-1. Ceux présentant une activité inférieure à 1 µM ont ensuite été testés sur *Hs*Pim-2.

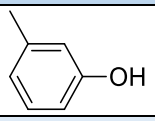
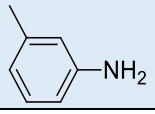
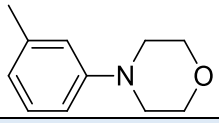
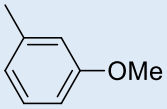
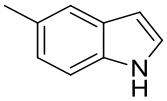
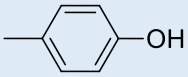
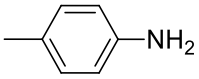
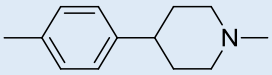
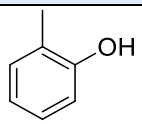
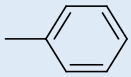
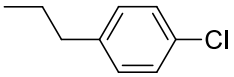
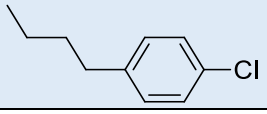
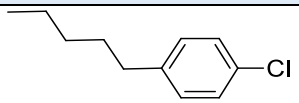
❖ Cas des esters éthyliques

Contrairement à ce que laissaient penser les résultats *in silico*, aucun des esters éthyliques testés, qu'ils soient issus des pharmacomodulations de la position 3 ou de celles des positions 6 ou 7 ne s'est révélé actif sur *Hs*Pim-1 (CI_{50} > 10 µM). Ces résultats mettent en avant le rôle essentiel de la fonction acide carboxylique pour les interactions avec les résidus Lys67 et Asp186 de la poche catalytique de *Hs*Pim-1. Ainsi, les résultats des évaluations sur kinases de ces précurseurs ne sont pas présentés dans les tableaux ci-dessous.

❖ Pharmacomodulations de la position 3 du noyau quinoxaline

La première série d'évaluations a été réalisée sur les dérivés issus des travaux de synthèse portant sur les pharmacomodulations de la position 3. Les CI_{50} des 21 dérivés d'acides quinoxaline-2-carboxyliques sont reportées dans le tableau ci-dessous (**Tableau IX**).



Composé	R	CI_{50} (µM) Pim-1	Pim-2
1		**0,074**	**2,60**
64		**2,80**	ND
46		**1,01**	ND
51		**0,42**	> 10
47		> 10	ND
48		**0,29**	**2,95**
65		> 10	ND
49		> 10	ND
50		**0,76**	**1,99**
52		**1,37**	ND
53		> 10	ND
54		> 10	ND
55		> 10	ND
SGI-1776		**0,054**	**0,10**

ND : non déterminée

Tableau IX. CI_{50} des composés issus des pharmacomodulations de la position 3 du noyau quinoxaline

Ces résultats permettent de mettre en évidence plusieurs éléments pertinents pour l'élucidation des relations structure-activités de nos composés.

Le composé **1** présente une activité sur *Hs*Pim-1 (CI_{50} = 74 nM) similaire à celle du **SGI-1776** (CI_{50} = 54 nM) mais est 26 fois moins actif sur *Hs*Pim-2 que le **SGI-1776** (CI_{50} de 2,60 µm et 100 nM respectivement).

Par ailleurs, l'orientation du groupement hydroxyle du noyau phényle a de fortes répercussions sur l'activité des composés. En effet, quand l'hydroxyle passe de la position méta (composé **1**) à para (composé **48**), il y a une forte réduction du potentiel inhibiteur du composé. Le composé **48** possède toujours une activité de l'ordre du submicromolaire sur *Hs*Pim-1 (CI_{50} = 290 nM) mais reste néanmoins quatre fois moins puissant que le composé chef de file **1** (CI_{50} = 74 nM). Quand ce groupement hydroxyle passe de la positon para à ortho (composé **50**), la perte d'activité est plus marquée (CI_{50} = 760 nM, 10 fois moins actif que le composé **1**).

De façon étonnante, le remplacement de la fonction hydroxyle du composé **1** par une fonction amine, censée être capable de réaliser une liaison hydrogène avec le résidu Asp186, conduit à une perte d'efficacité du composé sur *Hs*Pim-1 (composé **64**, CI_{50} = 2,80 µM, 38 fois moins actif que le composé **1**). Cette perte d'activité est encore plus flagrante quand cette fonction amine passe de la position *ortho* à *para* (composé **65**, CI_{50} > 10 µM).

La substitution du groupement hydroxyle par une morpholine, ne possédant pas de groupement donneur de liaison hydrogène, conduit également à une perte d'activité (composé **47**, CI_{50} = 1,01 µM, 14 fois moins actif que le composé **1**). Le même phénomène est observé quand cette fonction hydroxyle est remplacée par un groupement méthoxy (composé **51**, CI_{50} = 420 nM, 6 fois moins actif que le composé **1**). Enfin, de manière attendue, la suppression de la fonction hydroxyle entraine une perte d'activité (composé **52**, CI_{50} = 1,37 µM, 19 fois moins actif que le composé **1**).

Enfin, le remplacement du groupement 3-hydroxyphényle par une fonction 1*H*-indol-5-yle (composé **46**) ou par une fonction 4-(*N*-méthylpipéridin-4-yl)phényle (composé **49**) entraîne une perte drastique d'efficacité (CI_{50} > 10 µM). L'insertion d'une chaîne alkyle entre la fonction amine en position 3 du noyau quinoxaline et le groupement phényle (composés **53** à **55**) n'est pas favorable à l'activité (CI_{50} > 10 µM).

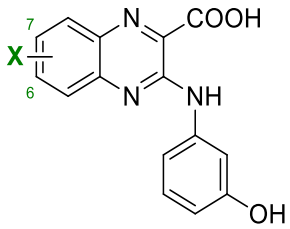
Les 3 composés ayant des CI_{50} inférieures à 1 µM pour *Hs*Pim-1 (composés **48**, **50** et **51**) ont été évalués sur *Hs*Pim-2. Ainsi, contrairement à ce qui a pu être observé sur *Hs*Pim-1, l'orientation du groupement hydroxyle n'a pas d'impact sur l'activité des composés sur

*Hs*Pim-2 comme en témoignent les composés **1**, **48** et **50** qui présentent des valeurs de CI_{50} comparables sur *Hs*Pim-2 (CI_{50} de 2,60 µM, 2,95 µM et 1,99 µM respectivement). Cependant, la substitution de la fonction hydroxyle par un groupement méthoxy (composé **51**) conduit à une suppression de l'activité du composé sur *Hs*Pim-2 (CI_{50} > 10 µM).

Aucune des pharmacomodulations de la position 3 n'a permis d'améliorer le niveau d'activité sur *Hs*Pim-2 des inhibiteurs.

❖ Pharmacomodulations des positions 6 et 7 du noyau quinoxaline

La deuxième série d'évaluations a été réalisée sur les composés fonctionnalisés en positions 6 ou 7 du noyau quinoxaline. Leurs CI_{50} sur *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 sont présentées dans le tableau ci-dessous (**Tableau X**).



Composé	X	CI_{50} (µM) Pim-1	Pim-2
1	H	**0,074**	**2,60**
56	6-F	**0,17**	**0,76**
57	7-F	**1,24**	**4,20**
58	6-Cl	**0,10**	**0,32**
59	7-Cl	**0,13**	**0,17**
60	6-Br	**0,16**	**0,58**
61	7-Br	**0,18**	**2,20**
62	6-CF_3	**0,20**	**1,80**
63	7- CF_3	**3,85**	**6,40**
SGI-1776		**0,054**	**0,10**

Tableau X. CI_{50} des composés issus des pharmacomodulations des positions 6 et 7 du noyau quinoxaline

Les modifications des positions 6 et 7 du noyau quinoxaline ont permis de mettre en avant plusieurs éléments pertinents pour la résolution des RSA de nos composés. Ces éléments sont présentés ci-dessous.

❖ *Quinoxalines substituées en position 7 :*

Pour la position 7, il semble que la nature du groupement halogéné utilisé a d'importantes répercussions sur l'activité des composés. Ainsi, l'introduction sur cette position d'un chlore ou d'un brome (composés **59** et **61**, respectivement) permet de conserver des activités de l'ordre du submicromolaire (CI_{50} de 130 nM et 180 nM, respectivement), similaires à celle observée pour le composé **1** (CI_{50} = 74 nM).

Cependant, tandis que l'insertion d'un brome sur la position 7 n'a pas d'impact sur l'activité sur *Hs*Pim-2 (composé **61**, CI_{50} = 2,20 µM) par rapport à celle de l'analogue non substitué (composé **1**, CI_{50} = 2,60 µM), l'insertion d'un chlore accroit significativement l'activité sur cette isoforme (composé **59**, CI_{50} = 170 nM, 12 fois plus actif que le composé **1**) pour atteindre une valeur semblable à celles du composé de référence SGI-1776 (CI_{50} = 100 nM). En revanche, l'insertion en position 7 d'un groupement fluoré n'est pas favorable pour l'activité, tel que démontré par les composés **57** et **63** (CI_{50} > 1 µM pour ces deux composés sur les kinases *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2).

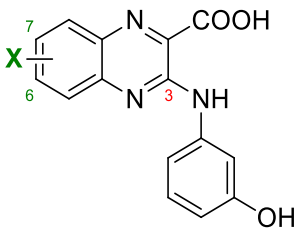
❖ *Quinoxalines substituées en position 6*

Dans le cas de la position 6, les activités sur *Hs*Pim-1 des quatre dérivés halogénés (composés **56**, **58**, **60** et **62**) sur *Hs*Pim-1 sont similaires à celle du composé **1** avec des CI_{50} allant de 100 nM à 200 nM. Cependant, le profil d'inhibition sur *Hs*Pim-2 a été amélioré pour les composés **56**, **58** et **60**, avec des CI_{50} 3 à 7 fois plus faibles pour cette isoforme (CI_{50} de 760 nM, 320 nM et 580 nM, respectivement) par rapport à la molécule chef de file **1** (CI_{50} = 2,60 µM).

Ainsi, sur les 20 analogues de l'acide quinoxaline-2-carboxylique **1** synthétisés, 14 présentent une activité sur *Hs*Pim-1 avec, pour quatre d'entre eux, des CI_{50} inférieures à 1 µM pour *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 (composés **56**, **58**, **59** et **60**). Ces composés ont été sélectionnés pour la détermination de leurs profils de sélectivité.

2. Profil de sélectivité sur kinases de mammifères

Les composés les plus prometteurs (**56**, **58**, **59** et **60**) ont été testés dans un second temps sur un panel de kinases de mammifères comprenant *Rn*DYRK1A, *Hs*CDK5/p25, *Hs*CDK9/CyclinT, *Hs*Haspin, *Mm*CLK1, *Hs*CK1ε et *Hs*GSK3β (**Tableau XI**) afin d'évaluer leur profil de sélectivité.



Composé	X	CI_{50} (µM)								
		Pim-1	Pim-2	DYRK 1A	CDK5/ p25	CDK9/ CyclinT	Haspin	CLK1	CK1ε	GSK3β
1	H	**0,074**	**2,60**	**0,27**	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
56	6-F	**0,17**	**0,76**	**1,13**	> 10	> 10	> 10	**6,78**	> 10	**1,50**
58	6-Cl	**0,10**	**0,32**	**1,30**	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	**2,11**
59	7-Cl	**0,13**	**0,17**	**1,37**	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	**2,80**
60	6-Br	**0,16**	**0,58**	**1,45**	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	**3,21**
SGI-1776		**0,054**	**0,10**	**3,80**	**9,53**	**1,08**	**0,05**	**0,43**	**6,54**	> 10

Tableau XI. Résultats du criblage des composés les plus actifs sur le panel de kinases de mammifères sélectionnées

Comme observé pour le composé **1**, les dérivés **58**, **59** et **60** conservent un profil de sélectivité intéressant avec des CI_{50} supérieures à 10 µM pour les kinases *Hs*CDK5/p25, *Hs*CDK9/CyclinT, *Hs*Haspin, *Mm*CLK1 et *Hs*CK1ε. Le composé **56** possède un profil de sélectivité similaire mais son activité sur *Mm*CLK1 (CI_{50} = 6,78 µM) fait que ce composé présente moins d'intérêt que les autres composés étudiés.

Les 3 autres dérivés halogénés (composés **58**, **59** et **60**) présentent des activités limitées sur *Hs*GSK3β, avec des CI_{50} de l'ordre du micromolaire, contrairement au composé **1** et au **SGI-1776** (CI_{50} > 10 µM). Néanmoins, ces composés sont moins actifs sur *Hs*GSK3β que sur *Hs*Pim-1 (CI_{50} 20 à 22 fois plus élevées) et *Hs*Pim-2 (CI_{50} 6 à 16 fois plus élevées). Le composé **59** présente les écarts les plus importants d'activité entre ces 3 kinases, avec une CI_{50} sur *Hs*GSK3β (CI_{50} = 2,80µM) 22 et 16 fois plus élevée que celles sur *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 respectivement.

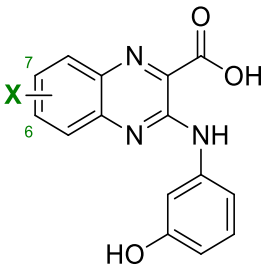
En revanche, tandis que le composé **1** est capable d'inhiber *Rn*DYRK1A (CI_{50} = 270 nM), nos composés les plus actifs (composés **58**, **59** et **60**) possèdent des activités plus faibles pour cette kinase, avec des CI_{50} supérieures à 1 µM. Le composé **59** est notamment 8 et 10 fois plus sélectif de *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2, respectivement, par rapport à *Rn*DYRK1A (CI_{50} = 1,37 µM).

Il est intéressant de noter que les composés **1**, **58**, **59** et **60** présentent des profils de sélectivité plus performants que celui du **SGI-1776**. Celui-ci présente en effet des activités de l'ordre du submicromolaire sur les kinases *Hs*Haspin et *Mm*CLK1 (CI_{50} de 50 nM et 430 nM, respectivement) et de l'ordre du micromolaire sur les kinases *Hs*CDK5/p25, *Hs*CDK9/CyclinT et *Hs*CK1ε (CI_{50} de 9,53 µM, 1,08 µm et 6,54 µm, respectivement) tandis que nos composés sont inactifs sur ces mêmes kinases (CI_{50} > 10 µM).

Ainsi, l'analyse des profils de sélectivité des composés a permis d'isoler trois composés d'intérêts (composés **58**, **59** et **60**) qui ont été testés sur trois lignées cellulaires de leucémie.

C. Tests *in vitro* sur lignées cellulaires

Les composés **58**, **59** et **60** ont été testés sur deux lignées cellulaire de LMC (**KU812** et **K562**) et une lignée cellulaire de LAM (**MV4-11**). Les déterminations des CE_{50} de chacun des composés ont été réalisées au moyen d'un test au MTT et les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau XII**).



Composé	X	CI_{50} (µM)		CE_{50} (µM)		
		Pim-1	Pim-2	KU812	K562	MV4-11
1	H	**0,074**	**2,60**	38,9 ± 3,4	> 100	61,2 ± 3.9
58	6-Cl	**0,10**	**0,32**	48,5 ± 2,1	47,4 ± 14,8	32,2 ± 9,4
59	7-Cl	**0,13**	**0,17**	46,2 ± 1,8	45,0 ± 9,7	35,5 ± 1,1
60	6-Br	**0,16**	**0,58**	45,7 ± 1,8	32,5 ± 1,3	32,9 ± 9,6

Tableau XII. Activités *in cellulo* des composés les plus actifs sur *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2

Il est intéressant de noter que les trois composés (**58**, **59** et **60**) présentent des activités sur la lignée cellulaire **K562** (CE_{50} de 47,4 µM, 45,0 µM et 32,5 µM respectivement), contrairement au composé **1** qui est inactif sur cette lignée (CE_{50} > 100 µM).

Les trois composés testés possèdent les mêmes niveaux d'activité sur la lignée cellulaire **KU812** (CE_{50} comprises entre 38,9 µM et 48,5 µM). Dans le cas de la lignée cellulaire **MV4-11**, les dérivés halogénés sont légèrement plus actifs (CE_{50} allant de 32,2 µM à 35,5 µM) que le composé **1** (CE_{50} = 61,2 µM, 1,7 à 1,9 fois plus élevée que celles des composés **58** à **60**).

Des trois composés sélectionnés, les composés **58** et **59** sont les dérivés les plus pertinents qui ressortent des évaluations biologiques. En effet, ces composés sont les plus actifs sur les deux isoformes des kinases Pim analysées. Ils possèdent également un profil satisfaisant de sélectivité à l'égard des autres kinases de mammifères testées. Enfin, ils présentent des niveaux d'activité équivalents voire supérieurs à ceux du composé **1** sur les trois lignées cellulaires de leucémies testées. Face à ces résultats, des études *in silico* ont été réalisées par le Dr. C. Logé pour comprendre plus précisément comment les modifications structurales apportées au noyau quinoxaline affectent les interactions que réalisent nos composés au sein de la poche catalytique de *Hs*Pim-1.

ETUDES *IN SILICO*

I. Matériel et méthode

Les études de modélisation moléculaires ont été réalisées par le Dr. C. Loge (IICIMED - EA1155, Nantes) en utilisant le programme SYBYL-X 1.3 sur une station de travail Dell *precision* T3400.

Les structures tridimensionnelles des composé **58** et **59** (sous leur forme carboxylate pour mimer les conditions physiologiques) ont été construites à partir d'une librairie de fragments standards et optimisées en utilisant le champ de force Tripos incluant les termes électrostatiques calculés à partir des charges atomiques de Gasteiger et Hückel. La méthode de Powell, disponible dans la procédure Maximin2, a été utilisée pour la minimisation de l'énergie jusqu'à atteindre une valeur de gradient inférieure à 0,001 kcal/(mol.Å).

La structure cristalline de *Hs*Pim-1 compléxée à l'AMP-PNP à une résolution de 1,6 Å (référence PDB : 3A99) a été utilisée comme modèle pour les travaux de *docking*. Les molécules d'eau ont été retirées du modèle puisqu'aucune information n'est connue quant à la conservation de molécules d'eau pour cette série.

Le *docking* flexible des composés **58** et **59** au sein du site ATP-catalytique de *Hs*Pim-1 a été réalisé en utilisant le programme GOLD (GOLD version 4.0, CDCC, Cambridge). Les modèles les plus stables ont été sélectionnés en fonction des meilleures conformations prédites selon les fonctions de notations **Goldscore** et **Chemscore** pour les composés **58** et **59**, respectivement. Enfin, les minimisations d'énergies des deux modèles retenus ont été effectuées en utilisant la méthode de Powell, le champ de force Tripos et une constante diélectrique de 4,0 jusqu'à ce que la valeur de gradient atteigne 0,1 kcal/(mol.Å).

II. Résultats

Pour rappel, le composé **1** réalise trois interactions avec la poche catalytique de *Hs*Pim-1 (**Figure 51**) : une liaison ionique avec la chaîne latérale du résidu Lys67 ainsi que deux liaisons hydrogènes avec le résidu Asp186

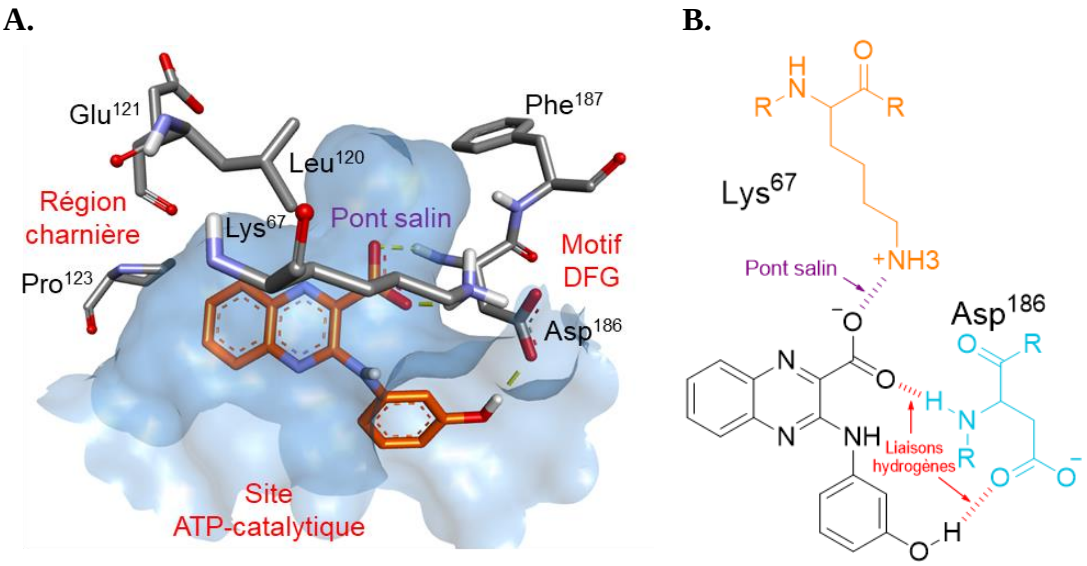
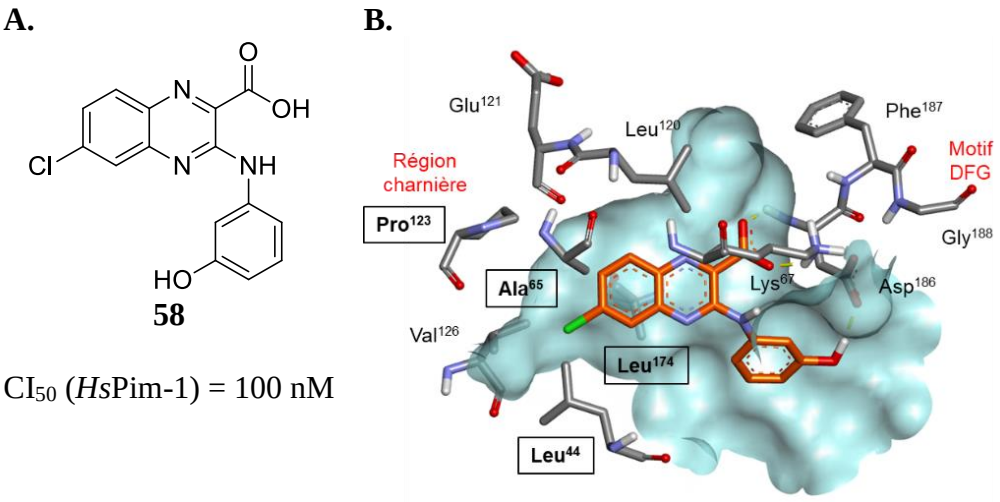


Figure 51. *Docking* du composé 1 au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 (3A99.pdb)

Les études *in silico* réalisées sur les composés **58** et **59** ont permis de mettre en lumière plusieurs éléments pertinents sur les interactions qu'ils effectuent avec les résidus de la poche ATP-catalytique de *Hs*Pim-1.

Ainsi, dans le cas du composé **58**, les interactions avec les résidus Lys67 et Asp186 sont conservées. L'atome de chlore vient, quant à lui, se loger dans la poche hydrophobe délimitée par les résidus Pro123, Pro125, Leu44, Ala65, Arg122 et Leu174 (**Figure 52**).



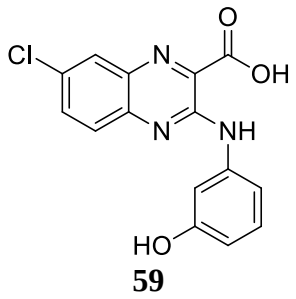
58

CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 100 nM

Figure 52. Structure (A.) et *docking* (B.) du composé 58 au sein du site ATP de *Hs*Pim-1

Dans le cas du composé **59**, d'autres différences existent (**Figure 53**). Premièrement, la fonction acide carboxylique ne forme plus qu'une seule liaison ionique avec l'amine de la chaîne latérale du résidu Lys67. De plus, les interactions que réalisait le composé **1** avec le résidu Asp186 n'existent plus. En effet, dans le cas du composé **59**, deux nouvelles liaisons hydrogènes se forment entre l'hydroxyle porté par le groupement phényle et les résidus Val52 et Leu44. Enfin, l'un des éléments les plus marquants des interactions du composé **59** au sein de la poche ATP de *Hs*Pim-1 est l'existence d'une nouvelle interaction de type liaison halogène avec le carbonyle du résidu Glu121.

A.



59

CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 130 nM

B.

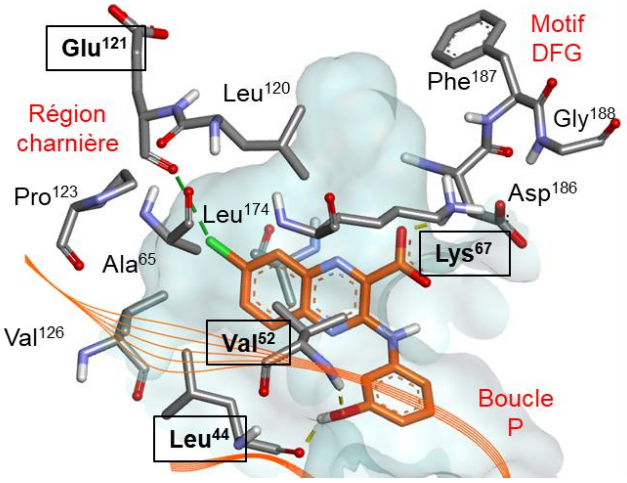


Figure 53. Structure (A.) et *docking* (B.) du composé 59 au sein du site ATP de *Hs*Pim-1

Une liaison halogène est une interaction inter- ou intramoléculaire impliquant un atome d'halogène. Ces liaisons apparaissent quand un réseau d'interactions attractrices se forme entre une région électrophile comportant un atome d'halogène et une zone nucléophile.

Une liaison halogène est classiquement représentée par le symbole « ••• » dans la formule R – X ••• Y.

R-X correspond au groupement donneur de liaison halogène, avec X un atome d'halogène lié de façon covalente au groupement R. Y correspond au groupement accepteur de liaison halogène, qui est typiquement une entité moléculaire possédant au moins une région nucléophile. La formation d'une liaison halogène nécessite que la distance interatomique entre X et Y soit inférieure à la somme des rayons de van der Waals, et que l'angle R – X ••• Y soit compris entre 140 et 180 degrés. Dans le cas d'une liaison halogène entre des atomes de chlore et d'oxygène, la distance Cl•••O doit être inférieure à 3,27 Å. Dans le modèle retenu présenté ci-dessous, cette distance est de 3,241 Å et l'angle formé par la liaison halogène est de 144,44 degrés, ce qui est compatible avec l'existence d'une liaison halogène. L'existence de cette

interaction est supportée par les activités sur *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 des dérivés fluorés (composés **57** et **63**). En effet, la force d'une liaison halogène décroit avec la taille de l'halogène. Ainsi, contrairement au brome et au chlore, le fluor ne peut pas réaliser ce type de liaison.

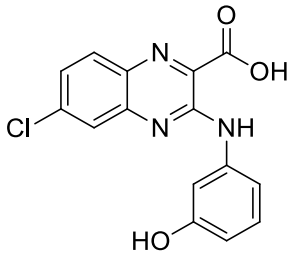
Des travaux similaires sont actuellement en cours pour l'isoforme *Hs*Pim-2 afin de confirmer si ces interactions existent entre cette kinase et nos composés. Ces modèles *in silico* devront être néanmoins confirmés par des études de co-cristallisation des composés avec *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 afin de confirmer l'existence de ces interactions.

CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

I. Conclusion

Ces travaux de thèse ont abouti à la production et à l'évaluation de 21 produits finaux. Leur structure a été conçue en fonction d'études *in silico* qui ont abouti à deux séries d'analogues qui diffèrent selon la position des pharmacomodulations du noyau quinoxaline. Ces deux séries d'analogues ont nécessité la mise en place d'une stratégie de synthèse convergente permettant d'accéder aux composés désirés avec des rendements globaux allant de **5,8** à **61,6** % en quatre à six étapes.

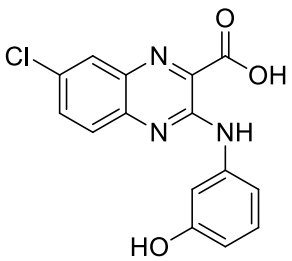
Les 20 dérivés de l'acide quinoxaline-2-carboxylique **1** et leurs analogues esters ont été testés sur la kinase *Hs*Pim-1. Neuf d'entre eux possèdent des CI_{50} inférieures à 1 µM sur cette isoforme et quatre sont actifs à la fois sur *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 à des concentrations de l'ordre du submicromolaire. Les analyses des RSA de ces 42 composés nous ont permis de comprendre que la fonction acide carboxylique était nécessaire pour réaliser un pont salin essentiel avec le résidu Lys67 du site ATP de *Hs*Pim-1. Les pharmacomodulations en position 3 n'ont pas permis d'améliorer l'activité des composés sur *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2. Les travaux effectués sur les positions 6 et 7 du noyau quinoxaline ont permis d'aboutir à l'identification de deux nouveaux composés chefs de file pour de futurs développements de quinoxalines inhibitrices des kinases Pim (**Figure 54**).



Composé 58

26,7 % en 4 étapes

CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 100 nM
CI_{50} (*Hs*Pim-2) = 320 nM



Composé 59

27,5 % en 4 étapes

CI_{50} (*Hs*Pim-1) = 130 nM
CI_{50} (*Hs*Pim-2) = 170 nM

Figure 54. Structures et activités des nouveaux composés chef de file identifiés

Les composés **58** et **59** possèdent des activités de l'ordre du nanomolaires sur *Hs*Pim-1 (CI_{50} de 100 nM et 130 nM, respectivement) et *Hs*Pim-2 (CI_{50} de 320 nM et 170 nM, respectivement).

De nouvelles études *in silico* nous ont permis de comprendre que ces composés réalisent de nouvelles interactions au sein des poches ATP des kinases Pim. Ainsi, l'insertion d'un chlore

en positon 6 (composé **58**) permet de venir remplir la poche hydrophobe dans l'environnement de la région charnière, ce qui permet d'augmenter de façon importante l'activité du composé sur *Hs*Pim-2. Dans le cas du composé **59**, la formation d'une liaison halogène entre le chlore et le résidu Glu121 conduit à l'apparition de nouvelles interactions entre le phénol et les résidus Leu44 et Val52 en plus de la liaison ionique entre le carboxylate et le résidu Lys67.

Ces deux composés présentent également des profils de sélectivité intéressants. En effet, ils sont inactifs sur cinq des sept kinases testées, contrairement au **SGI-1776** qui lui est actif sur six d'entre elles. Les activités résiduelles de ces composés sur *Rn*DYRK1A et *Hs*GSK3β sont néanmoins 10 et 20 fois plus faibles, respectivement, que celles sur *Hs*Pim-1.

Ces composés sont également actifs sur les trois lignées cellulaires de leucémie testées, contrairement au composé **1** qui n'était pas actif sur la lignée cellulaire **K562**. Cette différence est potentiellement liée aux différences d'activités de ces composés sur *Hs*Pim-2 puisque cette isoforme a été décrite comme ayant un rôle majeur dans le développement d'hémopathies cancéreuses.[29] Les niveaux d'activité de ces composés sur les trois lignées cellulaires testées reste toutefois modérés, possiblement à cause de faibles capacités de passages membranaires et/ou de phénomènes de compensation entre les trois isoformes des kinases Pim. En comparaison, le composé **PIM447**, qui a démontré son efficacité dans des essais cliniques avec des niveaux d'activités sur *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 (CI_{50} de 95 nM et 522 nM, respectivement) similaires à ceux des composés **58** et **59**, est capable d'inhiber la croissance des cellules **MV4-11** avec une CI_{50} de 130 nM.[106] Ces différences d'activités *in cellulo* peuvent être liées aux faibles capacités de nos composés à passer les membranes cellulaires.

II. Perspectives de recherche

Plusieurs perspectives de recherche ont été identifiées pour ce projet.

❖ *Analyses cristallographiques et pharmacomodulations*

Les co-cristallisations des composés **58** et **59** avec les kinases Pim seront nécessaires afin de confirmer les conformations déterminées par les études *in silico* réalisées par l'équipe du Dr. C. Loge (IICIMED - EA1155, Nantes).

Les composés **58** et **59** seront également utilisés comme base pour l'édification d'un nouveau modèle d'étude chimique pour accroître l'efficacité de nos composés vis-à-vis des kinases Pim (**Figure 55**). Ce nouveau modèle d'étude repose sur des modifications des positions 2 et 3 du noyau quinoxaline.

Une étude FBDD (*fragment-based drug design*) sur la position 3 du noyau quinoxaline est actuellement en cours de réalisation par l'équipe du Pr. P. Bonnet (ICOA - UMR7311, Orléans) pour identifier de nouvelles fonctions pertinentes capables de réaliser des interactions avec le résidu Asp186 et/ou d'autres acides aminés du site catalytique des kinases Pim.

D'autres pharmacomodulations sont également prévues, notamment sur la position 2 du noyau quinoxaline. En effet, la fonction acide carboxylique est connue pour provoquer une limitation du passage transmembranaire, des instabilités métaboliques ainsi que de potentiels effets secondaires. Afin de contourner ces problèmes, nous souhaitons substituer cette fonction par des bioisostères afin d'améliorer les paramètres physico-chimiques de nos composés tout en conservant l'interaction avec le résidu Lys67. Nous souhaitons également remplacer l'azote en position 3 par un oxygène, permettant ainsi de diminuer le LogP pour accroitre les capacités de passage transmembranaires de nos composés.

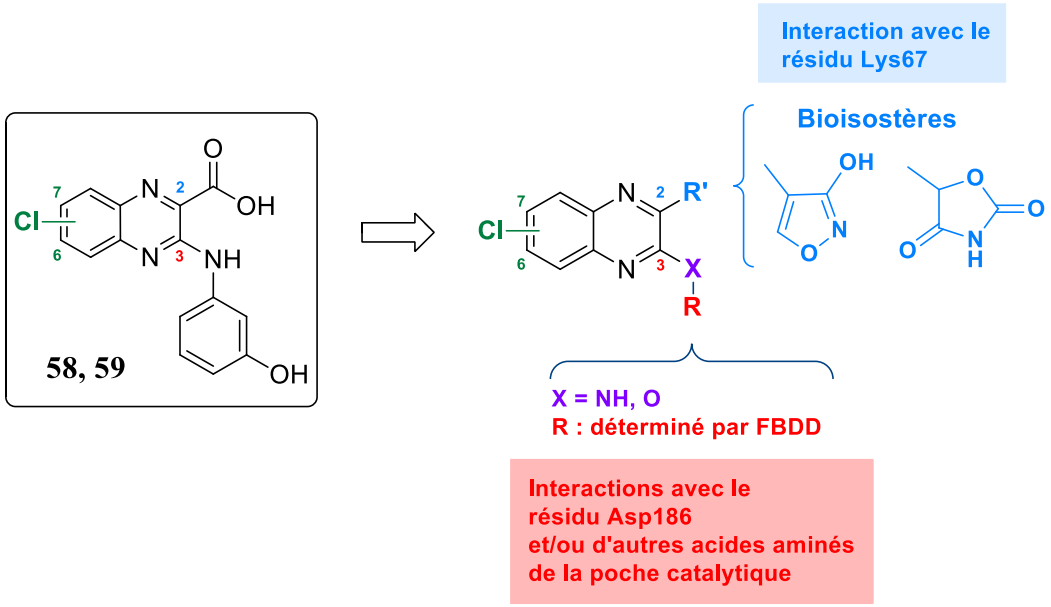


Figure 55. Nouveau modèle d'étude chimique issu des composés 58 et 59

Les composés issus de cette nouvelle étude chimique seront à leur tour évalués sur le panel de kinases incluant notamment les trois isoformes des Pim, ainsi que sur les trois lignées cellulaires de leucémie.

❖ *Evaluations pharmacologiques*

D'autres évaluations pharmacologiques de nos composés ont été envisagées ou sont en cours de réalisations. Ces évaluations sont basées notamment sur les caractéristiques des kinases Pim décrite dans la première partie de ce manuscrit.

Nous évaluons actuellement les capacités de nos composés à inhiber *Hs*Pim-3, en collaboration avec l'équipe du Dr. S. Bach (KISSf, USR3151 CNRS/UPMC, Roscoff). En effet, les redondances fonctionnelles des trois isoformes font qu'il est intéressant à l'heure actuelle d'envisager de concevoir des inhibiteurs pan-Pim, tels que ceux actuellement en cours d'essais cliniques.

Comme expliqué en introduction, les kinases Pim sont des oncogènes faibles. En effet, leur surexpression isolée n'est pas suffisante pour induire la tumorigenèse et nécessite des collaborations avec d'autres oncogènes activés, tels que les membres de la famille de gènes *myc*. C'est pourquoi plusieurs inhibiteurs des kinases Pim sont en cours d'essais cliniques sont actuellement testés en association avec des inhibiteurs d'autres voies oncogènes pour déterminer s'il est possible d'obtenir un effet synergique efficace pour traiter le cancer. C'est le cas notamment du **LGH447** qui est actuellement en cours d'essais cliniques en association avec le **ruxolitinib** (inhibiteur de JAK1/JAK2), le **LEE011** (inhibiteur de CDK4/6), le **BYL719** (inhibiteur de PI3Kα) ou encore la **midostaurine** (inhibiteur de FLT3).[108,109,146,147] De plus, les kinases Pim phosphorylent et stabilisent plusieurs acteurs impliqués dans des phénomènes de chimiorésistance (Pgp, ABCG2, BCRP, etc.). Aussi, nous prévoyons, en collaboration avec l'équipe du Dr. F. Gouilleux (EA7501 GICC - ERL7001 LNOx, Tours), d'évaluer l'activité de nos composés sur des lignées cellulaires de leucémie myéloïde (**K562** et **MV4-11** rendues résistantes à l'Imatinib et à la cytarabine, respectivement). Ces tests permettront de déterminer s'il est possible de réinstaurer la chimiosensibilité au sein de ces cellules en inhibant les kinases Pim.

L'implication des kinases Pim dans de nombreuses tumeurs solides a été largement décrite dans la littérature. C'est pourquoi des essais sur la lignée cellulaire de cancer colorectal **HCT-116** sont en cours en collaboration avec l'équipe du Dr. W. Raoult du GICC.

Enfin, nous envisageons de vérifier que nos composés ne sont pas toxiques pour les cellules saines en déterminant leur CE_{50} sur la lignée cellulaire stromale mésenchymateuse **HS27A**.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Généralités

Dans un souci de conformité avec les publications, les modes opératoires des synthèses et les caractéristiques physicochimiques des produits décrits ont été rédigés en anglais.

Les réactifs et les solvants proviennent des sociétés Aldrich, FluoroChem et AlfaAesar et sont utilisés sans purification.

- **Suivi CCM et purification :**

Le suivi réactionnel a été effectué par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des feuilles d'aluminium recouvertes de silice 60 F_{254} (épaisseur 0,2 mm, Merck) ou d'alumine neutre SDS 50-200µM. La révélation a été effectuée sous une lampe à ultraviolet (UV) à 254 nm ou 365 nm. Les purifications par colonnes de chromatographie sur gel de silice ont été réalisées sur l'automate ISCO Combi Flash RF 75 PSI, avec des colonnes pré-paquées Redisep (60 Å, 230-400 mesh, grade 9385).

- **Spectrométrie de masse :**

Les analyses de spectrométrie de masse haute résolution (*High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS) ont été réalisées en utilisant la méthode d'ionisation par électronébulisation (ESI) avec deux appareils :

- un spectromètre Q-Exactive de Thermo Scientific,
- un spectromètre Acquity-Vion UPLC-H-IMS QTof de Waters.

- **Points de fusion :**

Les points de fusion ont été mesurés à l'aide de tubes capillaires au moyen d'un appareil à point de fusion B-540 (Büchi). Ils ne sont pas corrigés et sont exprimés en degrés Celsius (°C).

- **Chauffage par irradiations micro-ondes :**

Le chauffage par irradiation micro-onde a été réalisé en utilisant un appareil Initiator Astra de Biotage.

II. Résonance magnétique nucléaire

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ^{1}H, du carbone ^{13}C et DEPT 135 ont été réalisés sur un appareil Ultrashield 300 commercialisé par Brücker à 300 MHz pour le proton ^{1}H, 75 MHz pour le carbone ^{13}C et 282 MHz pour le ^{19}F. Les valeurs de déplacement chimique (δ) sont exprimées en partie par million (ppm) par rapport au signal

résiduel du solvant deutéré utilisé. Les constantes de couplages (*J*) sont exprimées en hertz (Hz) et la multiplicité des signaux est décrite de la façon suivante :

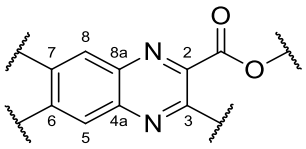
Multiplicité	Abbréviation
Singlet	(s)
Broad signal	(bs)
Doublet	(d)
Doublet of doublet	(dd)
Doublet of doublet of doublet	(ddd)
Doublet of triplet	(dt)
Triplet	(t)
Quadruplet	(q)
Multiplet	(m)

Les signaux des protons et des carbones des solvants résiduels et non deutérés sont utilisés comme références internes respectives pour les spectres du ^{1}H et du ^{13}C :

Solvant deutéré	Signal ^{1}H (ppm)	Signal ^{13}C (ppm)
Chloroforme ($CDCl_3$)	7,26	77,2
Diméthylsulfoxide (DMSO-d_6)	2,50	39,52

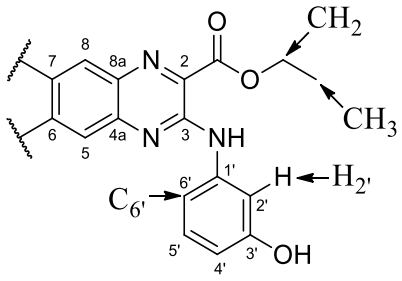
- **Numérotation des molécules**

La numérotation des molécules pour l'attribution en RMN a été effectuée en considérant le noyau quinoxaline comme motif prioritaire et en respectant la nomenclature IUPAC.

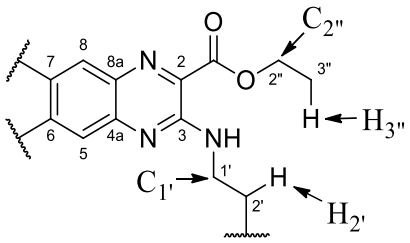


Noyau quinoxaline

Afin de clarifier la lecture des analyses RMN, la numérotation des fonctions localisées en positions 2 et 3 du noyau quinoxaline a été effectuée de façon arbitraire. Les fonctions localisées en position 3 sont numérotées en utilisant le symbole « ' » comme signe distinctif (exemples : **$H_{2'}$**, **$C_{6'}$**). Les signaux de l'éthyle de l'ester en position 2 ont été nommés « **CH_2** » et « **CH_3** » quand ceux-ci ne peuvent pas être confondus avec des éléments présents dans la fonction en position 2.

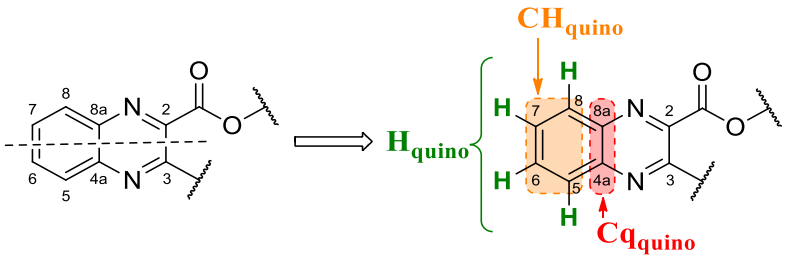


Quand de tels éléments sont présents dans la molécule, l'éthyle est alors numéroté en utilisant le symbole « ’’ » comme signe distinctif (exemples : **C**$_{2''}$, **H**$_{2''}$).



- **Quinoxalines non substituées en positions 6 ou 7**

Dans le cas du noyau quinoxaline non substitué en position 6 ou 7, l'attribution des signaux des protons **H**$_5$ à **H**$_8$ ne peut pas être réalisée de manière précise à cause de la symétrie du noyau quinoxaline. Ainsi, les signaux correspondants à ces atomes seront référencés sous l'appellation « **H**$_{quino}$ » dans la suite de ce document. Pour cette même raison, les signaux des carbones tertiaires **C**$_5$ à **C**$_8$ et ceux des carbones quaternaires **C**$_{4a}$ et **C**$_{8a}$ seront respectivement référencés sous les appellations « **CH**$_{quino}$ » et « **Cq**$_{quino}$. »

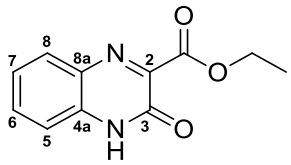


Noyau quinoxaline non substitué en position 6 ou 7

III. Chemistry

A. 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline scaffold synthesis

1. Ethyl 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**2**)



Chemical formula:
$C_{11}H_{10}N_2O_3$
Molecular weight:
218.21 g/mol

Method A: a mixture of *o*-phenylenediamie (708.3 mg, 6.55 mmol), diethyl 2-oxomalonate (1 mL, 6.55 mmol) and citric acid (41.0 mg, 0.20 mmol) in ethanol (13 mL) was stirred magnetically for 10 minutes at room temperature. Ethanol was then evaporated under reduced pressure, and the residue was stirred with crushed ice for 5 minutes, filtered and dried under vacuum to give compound **2** (1129.6 mg, 79%) as a beige solid.

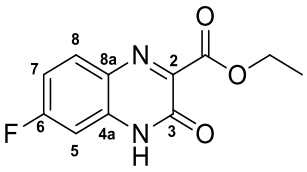
MP: 168.8°C.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 12.85 (bs, 1H, **NH**), 7.97 (dd, 1H, *J* = 8.1, 1.2 Hz, **H_{quino}**), 7.64 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 7.2, 1.2 Hz, **H_{quino}**),7.48 (dd, 1H, *J* = 8.1, 1.2 Hz, **H_{quino}**), 7.42 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 7.2, 1.2 Hz, **H_{quino}**), 4.56 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, **CH_2**), 1.49 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **CH_3**).

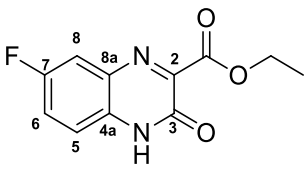
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 163.4 (**C=O**), 154.6 (**C_3***), 148.4 (**C_2***), 132.8 (**Cq_{quino}**), 132.2 (**CH_{quino}**), 132.1 (**Cq_{quino}**), 130.2 (**CH_{quino}**), 125.0 (**CH_{quino}**), 116.5 (**CH_{quino}**), 62.6 (**CH_2**), 14.2 (**CH_3**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{11}H_{11}N_2O_3$: 219.0765; found: 219.0765.

2. Ethyl 6-fluoro-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**3**) and ethyl 4-fluoro-3-oxo -3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**4**)



3



4

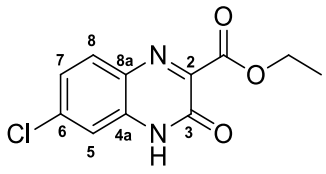
Chemical formula:
$C_{11}H_9FN_2O_3$
Molecular weight:
236.20 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **A** from 4-fluoro-1,2-phenylenediamine (366.8 mg, 2.91 mmol), diethyl 2-oxomalonate (443.5 µL, 506.5 mg, 2.91 mmol) and citric acid (83.8 mg, 0.44 mmol) in ethanol (15 mL). The reaction mixture was stirred magnetically overnight at room temperature. The solvent was then removed under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using a dichloromethane/ethyl acetate gradient (0-30%) and then a cyclohexane/ethyl acetate gradient (0-60%) as eluents to give the desired compounds **3** (190.6 mg, 28%) and **4** (372.0 mg, 54%) as yellow powders.

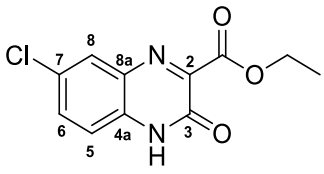
Compound 3: **MP**: 186.8 °C. **^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 12.96 (bs, 1H, **NH**), 7.91 (dd, 1H, *J* = 9.0, 5.7 Hz, **H$_8$**), 7.24 (ddd, 1H, *J* = 9.0, 2.7 Hz, **H$_7$**), 7.07 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.7 Hz, **H$_5$**), 4.36 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.32 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**). **^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 164.0 (d, *J* = 248.9 Hz, **C$_6$**), 163.9 (**C=O**), 152.7 (**C$_3$***), 149.8 (**C$_2$***), 135.0 (d, *J* = 13.0 Hz, **C$_{4a}$**), 132.4 (d, *J* = 11.0 Hz, **C$_8$**), 128.3 (d, *J* = 1.5 Hz, **C$_{8a}$**), 112.7 (d, *J* = 24.2 Hz, **C$_7$**), 102.2 (d, *J* = 26.7 Hz, **C$_5$**), 62.3 (**CH$_2$**), 14.4 (**CH$_3$**). **^{19}F NMR (282 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ - 106.0 (s). **HRMS (ESI) *m/z*:** $[M+H]^+$ calculated for $C_{11}H_{10}FN_2O_3$: 237.0670; found: 237.0668.

Compound 4: **MP**: 207.6 °C. **^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 12.98 (bs, 1H, **NH**), 7.74 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.9 Hz, **H$_8$**), 7.59 (ddd, 1H, *J* = 9.0, 2.9 Hz, **H$_6$**), 7.38 (dd, 1H, *J* = 9.0, 5.1 Hz, **H$_5$**), 4.38 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.32 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**). **^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 163.9 (**C=O**), 158.4 (d, *J* = 239.3 Hz, **C$_7$**), 152.5 (**C$_3$***), 152.3 (**C$_2$***), 131.4 (d, *J* = 11.6 Hz, **C$_{8a}$**), 130.1 (**C$_{4a}$**), 120.9 (d, *J* = 24.6 Hz, **C$_6$**), 117.8 (d, *J* = 9.2 Hz, **C$_5$**), 114.7 (d, *J* = 22.7 Hz, **C$_8$**), 62.4 (**CH$_2$**), 14.4 (**CH$_3$**).**^{19}F NMR (282 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ - 118.4 (s). **HRMS (ESI) *m/z*:** $[M+H]^+$ calculated for $C_{11}H_{10}FN_2O_3$: 237.0670; found: 237.0667.

3. Ethyl 6-chloro-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**5**) and ethyl 7-chloro-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**6**)



5



6

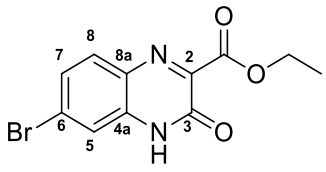
Chemical formula:
$C_{11}H_9ClN_2O_3$
Molecular weight:
252.65 g/mol

The title compounds were synthesized according to the general method **A** from 4-chloro-1,2-phenylenediamine (285.2 mg, 2.00 mmol), diethyl 2-oxomalonate (305.0 µL, 348.3 mg, 2.00 mmol) and citric acid (57.7 mg, 0.30 mmol) in ethanol (10 mL). The reaction mixture was stirred magnetically at room temperature for 2 hours. The solvent was then removed under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using a cyclohexane/ethyl acetate gradient (0-40%) as eluent to give the desired compounds **5** (161.7 mg, 32%) and **6** (274.2 mg, 54%) as yellow powders.

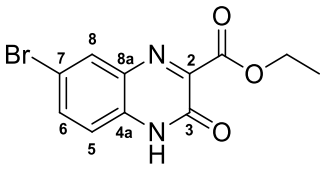
Compound 5: **MP:** 236.0 °C. **^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 12.94 (bs, 1H, **NH**), 7.85 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, **H$_8$**), 7.40 (dd, 1H, *J* = 8.7, 2.2 Hz, **H$_7$**), 7.34 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, **H$_5$**), 4.37 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.32 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**). **^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 163.8 (**C=O**), 152.6 (**C$_3$***), 151.1 (**C$_2$***), 136.8 (**C$_{8a}$**), 134.3 (**C$_6$**), 131.4 (**C$_8$**), 130.0 (**C$_{4a}$**), 124.5 (**C$_7$**), 115.6 (**C$_5$**), 62.3 (**CH$_2$**), 14.4 (**CH$_3$**). **HRMS (ESI) *m/z*:** $[M+H]^+$ calculated for $C_{11}H_{10}ClN_2O_3$: 253.0374; found: 253.0374.

Compound 6: **MP:** 213.2 °C. **^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 13.00 (bs, 1H, **NH**), 7.93 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, **H$_8$**), 7.69 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.3 Hz, **H$_6$**), 7.36 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, **H$_5$**), 4.38 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.32 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**). **^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 163.8 (**C=O**), 152.6 (**C$_3$***), 152.2 (**C$_2$***), 132.6 (**C$_6$**), 132.2 (**C$_{8a}$**), 131.7 (**C$_{4a}$**), 128.6 (**C$_8$**), 128.0 (**C$_7$**), 118.0 (**C$_5$**), 62.4 (**CH$_2$**), 14.4 (**CH$_3$**). **HRMS (ESI) *m/z*:** $[M+H]^+$ calculated for $C_{11}H_{10}ClN_2O_3$: 253.0374; found: 253.0373.

4. Ethyl 6-bromo-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**7**) and ethyl 7-bromo-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**8**)



7



8

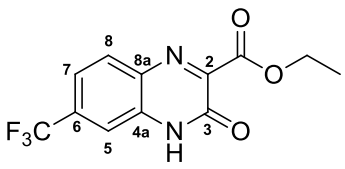
Chemical formula:
$C_{11}H_9BrN_2O_3$
Molecular weight:
297.10 g/mol

The title compounds were synthesized according to the general method **A** from 4-bromo-1,2-phenylenediamine (748.2 mg, 4.00 mmol), diethyl 2-oxomalonate (610.0 µL, 696.6 mg, 4.00 mmol) and citric acid (115.3 mg, 0.60 mmol) in ethanol (15 mL). The reaction mixture was stirred magnetically at room temperature for 24 hours. The solvent was then removed under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using a cyclohexane/ethyl acetate gradient (0-70%) as eluent to give compound **7** (393.5 mg, 33%) as a yellow powder and compound **8** (304.5 mg, 26%) as an orange powder.

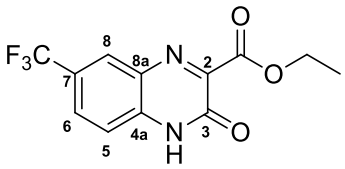
Compound 7: **MP**: 234.8°C. **^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 12.93 (bs, 1H, **NH**), 7.77 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, **H$_8$**), 7.52 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.0 Hz, **H$_7$**), 7.49 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, **H$_5$**), 4.36 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.31 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**). **^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 163.9 (**C=O**), 152.6 (**C$_3$***), 151.3 (**C$_2$***), 134.5 (**C$_{4a}$**), 131.5 (**C$_8$**), 130.2 (**C$_{8a}$**), 127.3 (**C$_7$**), 125.6 (**C$_6$**), 118.6 (**C$_5$**), 62.3 (**CH$_2$**), 14.4 (**CH$_3$**). **HRMS (ESI) *m/z*:** $[M+H]^+$ calculated for $C_{11}H_{10}BrN_2O_3$: 296.9869; found: 296.9869.

Compound 8: **MP**: 204.5 °C. **^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 13.00 (bs, 1H, **NH**), 8.06 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, **H$_8$**), 7.80 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.2 Hz, **H$_6$**), 7.29 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, **H$_5$**), 4.37 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.32 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**). **^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 163.8 (**C=O**), 152.6 (**C$_3$***), 152.1 (**C$_2$***), 135.2 (**C$_6$**), 132.6 (**C$_{8a}$**), 132.1 (**C$_{4a}$**), 131.6 (**C$_8$**), 118.2 (**C$_5$**), 115.6 (**C$_7$**), 62.4 (**CH$_2$**), 14.4 (**CH$_3$**). **HRMS (ESI) *m/z*:** $[M+H]^+$ calculated for $C_{11}H_{10}BrN_2O_3$: 296.9869; found: 296.9868.

5. Ethyl 3-oxo-6-(trifluoromethyl)-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**9**) and ethyl 3-oxo-7-(trifluoromethyl)-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**10**)



9



10

Chemical formula:
$C_{12}H_9F_3N_2O_3$
Molecular weight:
286.21 g/mol

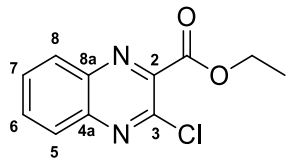
The title compounds were synthesized according to the general method A from 4-trifluoromethyl-1,2-phenylenediamine (387.5 mg, 2.20 mmol), diethyl 2-oxomalonate (335.5 µL, 383.1 mg, 2.20 mmol) and citric acid (63.4 mg, 0.33 mmol) in ethanol (15 mL). The reaction mixture was stirred magnetically at room temperature overnight. The solvent was then removed under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using a dichloromethane and ethyl acetate gradient (0-20%) as eluent to give the desired compounds **9** (325.8 mg, 52%) and **10** (98.9 mg, 16%) as beige powders.

Compound 9: **MP:** 204.1 °C. **^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 13.11 (bs, 1H, **NH**), 8.06 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, **H$_8$**), 7.67 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.8 Hz, **H$_7$**), 7.63 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, **H$_5$**), 4.40 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_2$**), 1.33 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_3$**). **^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 163.7 (**C=O**), 153.6 (**C$_3$***), 152.6 (**C$_2$***), 133.4 (**C$_{4a}$**), 133.0 (**C$_{8a}$**), 131.7 (q, *J* = 32.3 Hz, **C$_6$**), 131.1 (**C$_8$**), 124.0 (q, *J* = 271.0 Hz, **CF$_3$**), 120.3 (q, *J* = 3.5 Hz, **C$_7$**), 113.5 (q, *J* = 3.8 Hz, **C$_5$**), 62.5 (**CH$_2$**), 14.4 (**CH$_3$**). **^{19}F RMN (282 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ - 61.4 (s). **HRMS (ESI) *m/z*:** $[M+H]^+$ calculated for $C_{12}H_{10}F_3N_2O_3$: 287.0638; found: 287.0637.

Compound 10: **MP:** 161.2 °C. **^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 13.18 (bs, 1H, **NH**), 8.20 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, **H$_8$**), 7.96 (dd, 1H, *J* = 8.7, 1.5 Hz, **H$_6$**), 7.51 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, **H$_5$**), 4.39 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_2$**), 1.33 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_3$**). **^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ 163.7 (**C=O**), 152.9 (**C$_3$***), 152.6 (**C$_2$***), 136.1 (**C$_{4a}$**), 130.4 (**C$_{8a}$**), 128.7 (q, *J* = 3.3 Hz, **C$_6$**), 127.0 (q, *J* = 4.1 Hz, **C$_8$**), 124.6 (q, *J* = 32.7 Hz, **C$_7$**), 124.3 (q, *J* = 270.2 Hz, **CF$_3$**), 117.7 (**C$_5$**), 62.5 (**CH$_2$**), 14.4 (**CH$_3$**). **^{19}F NMR (282 MHz, DMSO-*d*$_6$):** δ - 60.4 (s). **HRMS (ESI) *m/z*:** $[M+H]^+$ calculated for $C_{12}H_{10}F_3N_2O_3$: 287.0638; found: 287.0635.

B. Chloration on position 3

1. Ethyl 3-chloroquinoxaline-2-carboxylate (**11**)



Chemical formula:
$C_{11}H_9ClN_2O_2$
Molecular weight:
236.65 g/mol

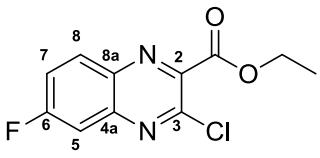
Method B: compound **2** (218.2 mg, 1.00 mmol) is dissolved in a mixture of phosphorous oxychloride (2 mL) and DMF (200 µL) at ice bath temperature. The reaction mixture was then refluxed for 30 minutes. After cooling, the resulting mixture was poured over crushed ice, stirred magnetically at room temperature overnight, and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under reduced pressure to obtain derivative **11** (236.7 mg, 100%) as a beige solid and was directly used in the following reaction.

MP: 46.4 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.18 (m, 1H, **H_{quino}**), 8.07 (m, 1H, **H_{quino}**), 7.92-7.81 (m, 2H, **H_{quino}**), 4.58 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, **CH_2**), 1.49 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **CH_3**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 163.9 (**C=O**), 144.7 (**C_3***), 143.9 (**C_2***), 142.2 (**Cq_{quino}**), 139.7 (**Cq_{quino}**), 132.6 (**CH_{quino}**), 131.0 (**CH_{quino}**), 129.6 (**CH_{quino}**), 128.3 (**CH_{quino}**), 63.0 (**CH_2**), 14.1 (**CH_3**).

2. Ethyl 3-chloro-6-fluoroquinoxaline-2-carboxylate (**12**)



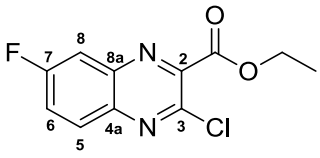
Chemical formula:
$C_{11}H_8ClFN_2O_2$
Molecular weight:
254.64 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **B** from compound **3** (141.3mg, 0.60 mmol), phosphorous oxychloride (1.4 mL) and DMF (140 µL). The reaction mixture was refluxed for 3 hours. Compound **12** was obtained (112.9 mg, 74%) as a brown oil and was directly used in the following reaction.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 8.32 (dd, 1H, *J* = 9.2, 5.8 Hz, **H$_8$**), 8.02-7.90 (m, 2H, **H$_5$**, **H$_7$**), 4.49 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.38 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**).

^{19}F NMR (282 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ -103.6 (s).

3. Ethyl 3-chloro-7-fluoroquinoxaline-2-carboxylate (**13**)



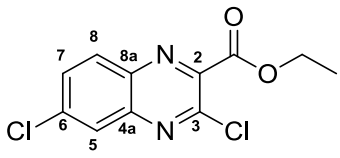
Chemical formula:
$C_{11}H_8ClFN_2O_2$
Molecular weight:
254.64 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **B** from compound **4** (236.2mg, 1.00 mmol), phosphorous oxychloride (2.3 mL) and DMF (230 µL). The reaction mixture was refluxed for 3 hours. Compound **13** was obtained (254.7 mg, 100%) as a brown oil and was directly used in the following reaction.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 8.23 (dd, 1H, *J* = 9.2, 5.6 Hz, 1H, **H$_5$**), 8.09 (dd, 1H, *J* = 9.2, 2.8 Hz, **H$_8$**), 8.00 (ddd, 1H, *J* = 9.2, 5.6, 2.8 Hz, **H$_6$**), 4.50 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.39 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**).

^{19}F NMR (282 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ -105.8 (s).

4. Ethyl 3,6-dichloroquinoxaline-2-carboxylate (**14**)

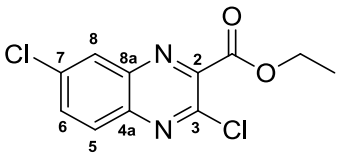


Chemical formula:
$C_{11}H_8Cl_2N_2O_2$
Molecular weight:
271.10 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **B** from compound **5** (50.0 mg, 0.20 mmol), phosphorous oxychloride (461 µL) and DMF (46 µL). The reaction mixture was refluxed for 3 hours. Compound **14** was obtained (53.7 mg, 100%) as a brown oil and was directly used in the following reaction.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 8.29 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, **H$_5$**), 8.26 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, **H$_8$**), 8.03 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.3Hz, **H$_7$**), 4.50 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.39 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**).

5. Ethyl 3,7-dichloroquinoxaline-2-carboxylate (**15**)

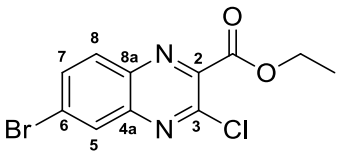


Chemical formula:
$C_{11}H_8Cl_2N_2O_2$
Molecular weight:
271.10 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **B** from compound **6** (200.0 mg, 0.79 mmol), phosphorous oxychloride (1.9 mL) and DMF (185 µL). The reaction mixture was refluxed for 3 hours. Compound **15** was obtained (202.0 mg, 94%) as a brown oil and was directly used in the following reaction.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 8.37 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, **H$_8$**), 8.17 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, **H$_5$**), 8.07 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.2 Hz, **H$_6$**), 4.51 (q, 1H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.39 (t, 1H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**).

6. Ethyl 6-bromo-3-chloroquinoxaline-2-carboxylate (**16**)

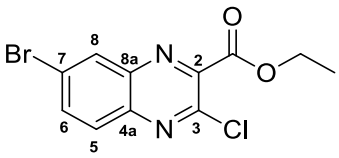


Chemical formula:
$C_{11}H_8BrClN_2O_2$
Molecular weight:
315.55 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **B** from compound **7** (200.0 mg, 0.67 mmol), phosphorous oxychloride (1.6 mL) and DMF (157 µL). The reaction mixture was refluxed for 3 hours. Compound **16** was obtained (212.4 mg, 100%) as a brown oil and was directly used in the following reaction.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 8.39 (dd, 1H, *J* = 1.9, 0.8 Hz, **H_5**), 8.16-8.08 (m, 2H, **H_7**, **H_8**), 4.49 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH_2**), 1.38 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH_3**).

7. Ethyl 7-bromo-3-chloroquinoxaline-2-carboxylate (**17**)

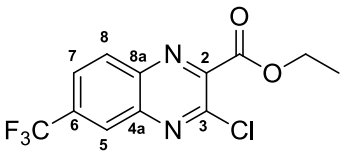


Chemical formula:
$C_{11}H_8BrClN_2O_2$
Molecular weight:
315.55 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **B** from compound **8** (200.0 mg, 0.67 mmol), phosphorous oxychloride (1.6 mL) and DMF (157 µL). The reaction mixture was refluxed for 3 hours. Compound **17** was obtained (212.2 mg, 100%) as a brown oil and was directly used in the following reaction.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 8.52 (dd, 1H¸ *J* = 2.1, 0.50.5 Hz, **H$_8$**), 8.18 (dd, 1H¸ *J* = 9.0, 2.1 Hz, **H$_6$**), 8.08 (dd, 1H, *J* = 9.0, 0.5 Hz, **H$_5$**), 4.50 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.39 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**).

8. Ethyl 3-chloro-6-(trifluoromethyl)quinoxaline-2-carboxylate (**18**)



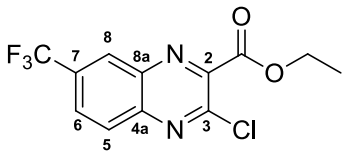
Chemical formula:
$C_{12}H_8ClF_3N_2O_2$
Molecular weight:
304.65 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **B** from compound **9** (278.0 mg, 0.97 mmol), phosphorous oxychloride (2.3 mL) and DMF (230 µL). The reaction mixture was refluxed for 3 hours. Compound **18** was obtained (295.8 mg, 100%) as a yellow oil and was directly used in the following reaction.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 8.57 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, **H$_5$**), 8.44 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, **H$_8$**), 8.25 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.0 Hz, **H$_7$**), 4.52 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.40 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**).

^{19}F NMR (282 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ -61.3 (s).

9. Ethyl 3-chloro-7-(trifluoromethyl)quinoxaline-2-carboxylate (**19**)



Chemical formula:
$C_{12}H_8ClF_3N_2O_2$
Molecular weight:
304.65 g/mol

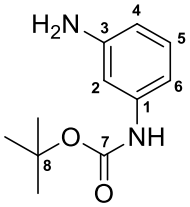
The title compound was synthesized according to the general method **B** from compound **10** (50.0 mg, 0.18 mmol), phosphorous oxychloride (0.4 mL) and DMF (40 µL). The reaction mixture was refluxed for 3 hours. Compound **19** was obtained (27.0 mg, 51%) as a yellow oil and was directly used in the following reaction.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 8.64 (d, 1H, *J* = 0.8 Hz, **H$_8$**), 8.33 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, **H$_5$**), 8.28 (dd, 1H, *J* = 8.9, 0.8 Hz, **H$_6$**), 4.52 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.39 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**).

^{19}F NMR (282 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ -61.3 (s).

C. Amine synthesis

1. *tert*-Butyl (3-aminophenyl)carbamate (**20**)



Chemical formula:
$C_{11}H_{16}N_2O_2$
Molecular weight:
208.26 g/mol

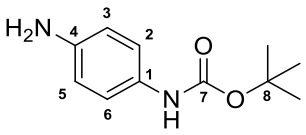
Method C: Into a dry round bottom flask was introduced *m*-phenylenediamine (540.7 mg, 5.00 mmol), di-*tert*-butyle dicarbonate (1091.3 mg, 5.00 mmol) and guanidium chloride (71.6 mg, 0.75 mmol) in ethanol (15 mL) at ice bath temperature. The reaction mixture was magnetically stirred for 1 hour at 0 °C. Ethanol was evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-33%) as eluent to give the desired compound **20** (768.4 mg, 74%) as a white powder.

MP: 110.7 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 8.99 (bs, 1H, **NH**), 6.86 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, **H$_5$**), 6.81 (m, 1H, **H$_2$**), 6.52 (dd, *J* = 7.9, 0.9 Hz, 1H, **H$_6$**), 6.17 (ddd, *J* = 7.9, 2.1, 0.9 Hz, 1H, **H$_4$**), 4.96 (bs, 2H, **NH$_2$**), 1.45 (s, 9H, 3 × **CH$_3$**).

^{13}C RMN (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 153.2 (**C$_7$**), 149.6 (**C$_1$**), 140.5 (**C$_3$**), 129.2 (**C$_5$**), 108.7 (**C$_4$**), 106.8 (**C$_6$**), 104.4 (**C$_2$**), 79.0 (**C$_8$**), 28.6 (3 × C, 3 × **CH$_3$**).

2. *tert*-Butyl (4-aminophenyl)carbamate (**21**)



Chemical formula:
$C_{11}H_{16}N_2O_2$
Molecular weight:
208.26 g/mol

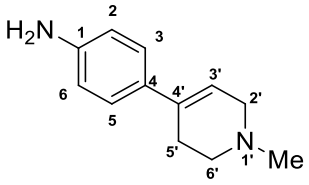
The title compound was synthesized according to the general method **C** from *p*-phenylenediamine (562.3 mg, 5.2 mmol), di-*tert*-butyl dicarbonate (1135.4 mg, 5.2 mmol) and guanidium chloride (74.5 mg, 0.75 mmol) in ethanol (15 mL) at ice bath temperature. The reaction mixture was magnetically stirred for 1 hour at 0 °C. Ethanol was evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-33%) as eluent to give the desired compound **21** (815.6 mg, 75%) as a white solid.

MP: 113.1 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.15 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, **H_3**, **H_5**), 6.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, **H_2**, **H_6**), 6.27 (bs, 1H, **NH**), 3.55 (bs, 2H, **NH_2**), 1.52 (s, 9H, ***t*Bu**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 153.3 (**C_7**), 142.4 (**C_1**), 129.7 (**C_4**), 120.9 (2 × C, **C_2**, **C_6**), 115.6 (2 × C, **C_3**, **C_5**), 80.0 (**C_8**), 28.4 (3 × C, 3 × **CH_3**).

3. 4-(*N*-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)aniline (**22**)



Chemical formula:
$C_{12}H_{16}N_2$
Molecular weight:
188.27 g/mol

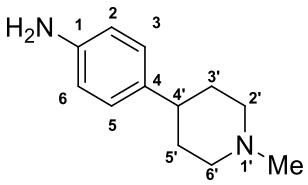
A mixture of 4-bromoaniline (172.0 mg, 1.00 mmol), 1-methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine (223.1 mg, 1.00 mmol), $Pd_2(dba)_3$ (18.3 mg, 0.02 mmol), X-Phos (23.1 mg, 0.04 mmol) and potassium carbonate (414.7 mg, 3.00 mmol) in aqueous dioxane (80%, 4 mL) was microwaved for 9 hours at 110 °C. After cooling, the solvent was removed under reduced pressure. The resulting mixture was extracted with ethyl acetate and washed with water. The combined organic layers were then dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure. After purification by silica column chromatography first using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-60%) then dichloromethane with methanol gradient (0-10%) as eluent, the compound **22** was obtained (137.0 mg, 73%) as a beige solid.

MP: > 375 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, **H_3**, **H_5**), 6.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, **H_2**, **H_6**), 5.95-5.91 (m, 1H, **H_3'**), 3.50 (bs, 2H, **NH_2**), 3.10 (m, 2H, **H_5'***), 2.66 (m, 2H, **H_6'***), 2.58-2.55 (m, 2H, **H_2'***), 2.41 (s, 3H, **CH_3**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 145.5 (**C_1**), 134.2 (**C_4'**), 131.4 (**C_4**), 125.8 (2 × C, **C_3**, **C_5**), 118.9 (**C_3'**), 114.9 (2 × C, **C_2**, **C_6**), 55.0 (**C_5'***), 52.4 (**C_6'***), 45.8 (**CH_3**), 28.1 (**C_2'***).

4. 4-(*N*-methylpiperidin-4-yl)aniline (**23**)



Chemical formula:
$C_{12}H_{18}N_2$
Molecular weight:
190.28 g/mol

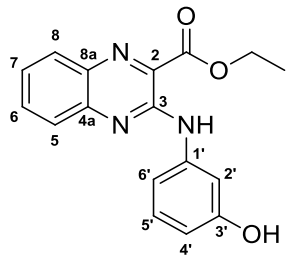
A solution of compound **22** (190 mg, 1.01 mmol) in ethanol (25 mL) was hydrogenated with a balloon filled with H_2 in the presence of Pd/C (10%, 107.4 mg) for 3 days at room temperature. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite® and rinsed with ethanol. The filtrate was condensed to give compound **23** (174 mg, 91%) as a yellow-beige paste.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.00 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, **H_3**, **H_5**), 6.62 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, **H_2**, **H_6**), 3.67 (m, 2H, **CH_2**), 3.45 (bs, 2H, **NH_2**), 2.95 (m, 2H, **CH_2**), 2.45-2.20 (m, 4H, **CH_3**, **$H_{4'}$**), 2.04 (m, 2H, **CH_2**), 1.77 (m, 2H, **CH_2**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 144.5 (**C_1**), 136.4 (**C_4**), 127.6 (2 × C, **C_3**, **C_5**), 115.3 (2 × C, **C_2**, **C_6**), 56.4 (2 × C, **$C_{2'}$**, **$C_{6'}$**), 46.4 (**CH_3**), 41.0 (**$C_{4'}$**), 33.5 (**$C_{3'}$**, **$C_{5'}$**).

D. Amination of the quinoxaline scaffold

1. Ethyl 3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**24**)



Chemical formula:
$C_{17}H_{15}N_3O_3$
Molecular weight:
309.32 g/mol

Method D1: a solution of compound **11** (1.1 g, 4.70 mmol), 3-aminophenol (622.0 mg, 5.70 mmol) and *p*-TSA (146.0 mg, 0.77 mmol), in absolute ethanol (40 mL) was refluxed for 110 hours. Ethanol was then evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-50%) as eluent to give the desired compound **24** (1003.8 mg, 69%) as a red powder.

Method D2: a solution of compound **11** (236.7 mg, 1.00 mmol) and 3-aminophenol (120.0 mg, 1.10 mmol) in absolute ethanol (2 mL) was stirred under microwave irradiation for 1 hour at 150 °C. The precipitate of pure compound **24** formed was filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-50%) as eluent. Compound **24** was obtained (215.5 mg, 70%) as a red powder.

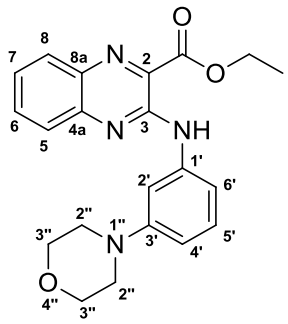
MP: 233.3 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): 10.08 (bs, 1H, **NH**), 9.52 (bs, 1H, **OH**), 7.99 (dd, 1H, *J* = 8.4, 0.6 Hz, **H$_{quino}$**), 7.85-7.75 (m, 2H, **2 H$_{quino}$**), 7.61-7.54 (m, 2H, **H$_{quino}$**, **H$_{2'}$**), 7.24-7.14 (m, 2H, **H$_{5'}$**, **H$_{6'}$**), 6.51 (ddd, 1H, *J* = 7.4, 2.4, 1.5 Hz, **H$_{4'}$**), 4.48 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_2$**), 1.41 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6): δ 166.1 (**C=O**), 158.3 (**C$_{3'}$**), 148.8 (**C$_3$**), 142.4 (**Cq$_{quino}$**), 140.7 (**C$_{1'}$**), 136.0 (**C$_2$**), 133.4 (**CH$_{quino}$**), 132.7 (**Cq$_{quino}$**), 130.0 (2 × C, **CH$_{quino}$**, **C$_{5'}$**), 126.7 (**CH$_{quino}$**), 126.6 (**CH$_{quino}$**), 111.1 (**C$_{6'}$**), 110.6 (**C$_{4'}$**), 107.3 (**C$_{2'}$**), 62.8 (**CH$_2$**), 14.5 (**CH$_3$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{17}H_{16}N_3O_3$: 310.1186; found: 310.1186.

2. Ethyl 3-((3-morpholinophenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**25**)



Chemical formula:
$C_{21}H_{22}N_4O_3$
Molecular weight:
378.42 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D1** from compound **11** (361.3 mg, 1.53 mmol) and 3-morpholinoaniline (299.4 mg, 1.68 mmol) in absolute ethanol (10 mL). The reaction mixture was refluxed for 110 hours. Compound **25** was obtained (439.0 mg, 76%) as an orange powder.

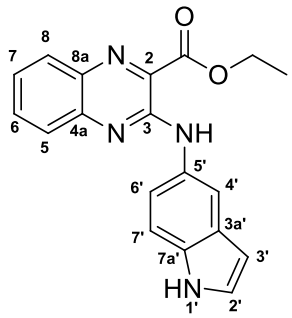
MP: 170.6 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.09 (bs, 1H, **NH**), 7.98 (dd, 1H, *J* = 8.1, 0.9 Hz, **H$_{quino}$**), 7.87-7.70 (m, 2H, **2 H$_{quino}$**), 7.62 (m, 1H, **H$_{2'}$**), 7.57 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 6.4, 1.8 Hz, **H$_{quino}$**), 7.34 (dd, 1H, *J* = 7.8, 0.9 Hz, **H$_{6'}$**), 7.24 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, **H$_{5'}$**), 6.71 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.8 Hz, **H$_{4'}$**), 4.48 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 3.77 (t, 4H, *J* = 4.5 Hz, **2 H$_{3''}$**), 3.16 (t, 4H, *J* = 4.5 Hz, **2 H$_{2''}$**), 1.41 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 166.0 (**C=O**), 152.2 (**C$_{3'}$**), 148.9 (**C$_3$**), 142.4 (**Cq$_{quino}$**), 140.4 (**C$_{1'}$**), 136.0 (**Cq$_{quino}$**), 133.5 (**CH$_{quino}$**), 132.6 (**C$_2$**), 130.0 (**CH$_{quino}$**), 129.8 (**C$_{5'}$**), 126.7 (2 × C, **2 CH$_{quino}$**), 111.5 (**C$_{6'}$**), 110.7 (**C$_{4'}$**), 107.1 (**C$_{2'}$**), 66.6 (2 × C, **C$_{3''}$**), 62.8 (**CH$_2$**), 48.9 (2 × C, **C$_{2''}$**), 14.5 (**CH$_3$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{21}H_{23}N_4O_3$: 379.1765; found: 379.1764.

3. Ethyl 3-((1*H*-indol-5-yl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**26**)



Chemical formula:
$C_{19}H_{16}N_4O_2$
Molecular weight:
332.36 g/mol

The title compound was synthesized according to general method **D1** from compound **11** (237.6 mg, 1.00 mmol) and 5-aminoindole (397.0 mg, 3.00 mmol) in absolute ethanol (10 mL). The reaction mixture was refluxed for 36 hours. Compound **26** was obtained (245.0 mg, 73%) as a red powder.

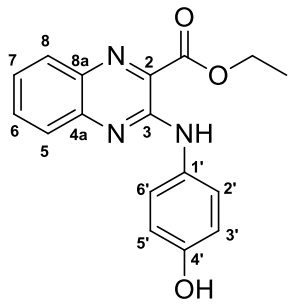
MP: 204.7 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 10.24 (bs, 1H, **$NH_{1'}$**), 8.80 (bs, 1H, **NH**), 8.26 (s, 1H, **$H_{4'}$**), 8.00 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.4 Hz, **H_{quino}**), 7.77 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.4 Hz, **H_{quino}**), 7.66 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 6.9, 1.4 Hz, **H_{quino}**), 7.50-7.38 (m, 3H, **H_{quino}**, **$H_{6'}$**, **$H_{7'}$**), 7.23 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz, **$H_{2'}$**), 6.56 (s, 1H, **$H_{3'}$**), 4.60 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, **CH_2**), 1.53 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, **CH_3**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 166.4 (**C=O**), 150.0 (**C_3**), 143.6 (**Cq_{quino}**), 136.2 (**Cq_{quino}**), 133.0 (**$C_{1'}$**), 132.8 (**$C_{7a'}$**), 131.5 (**CH_{quino}**), 130.6 (**CH_{quino}**), 130.1 (**$C_{3a'}$**), 128.1 (**CH_{quino}**), 126.6 (**CH_{quino}**), 125.4 (**$C_{2'}$**), 125.1 (**C_2**), 117.2 (**$C_{6'}$**), 112.8 (**$C_{7'}$**), 111.2 (**$C_{4'}$**), 102.6 (**$C_{3'}$**), 62.9 (**CH_2**), 14.3 (**CH_3**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{19}H_{17}N_4O_2$: 333.1346; found: 333.1346.

4. Ethyl 3-((4-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**27**)



Chemical formula:
$C_{17}H_{15}N_3O_3$
Molecular weight:
309.32 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D1** from compound **11** (302.0 mg, 1.28 mmol) and 4-aminophenol (418.7 mg, 3.83 mmol) in absolute ethanol (16 mL). The reaction mixture was refluxed for 20 hours. Compound **27** was obtained (155.1 mg, 39%) as a red powder.

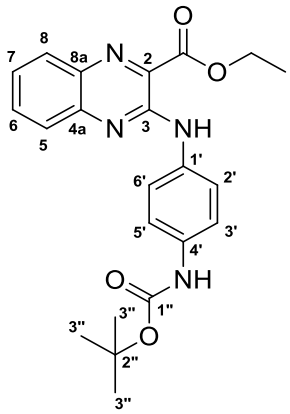
MP: 231.8 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 9.84 (bs, 1H, **NH**), 9.30 (bs, 1H, **OH**), 7.94 (dd, 1H, *J* = 8.1, 0.9 Hz, **H$_{quino}$**), 7.75 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 6.9, 1.5 Hz, **H$_{quino}$**), 7.70-7.60 (m, 3H, **H$_{quino}$**, **H$_{2'}$**, **H$_{6'}$**), 7.51 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.9, 1.5 Hz, **H$_{quino}$**), 6.80 (dd, 2H, *J* = 6.9, 2.0 Hz, **H$_{3'}$**, **H$_{5'}$**), 4.47 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_2$**), 1.41 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 166.0 (**C=O**), 154.0 (**C$_{4'}$**), 149.2 (**C$_3$**), 142.8 (**Cq$_{quino}$**), 135.9 (**Cq$_{quino}$**), 133.3 (**CH$_{quino}$**), 132.5 (**C$_2$**), 131.0 (**C$_{1'}$**), 130.0 (**CH$_{quino}$**), 126.5 (**CH$_{quino}$**), 126.1 (**CH$_{quino}$**), 122.7 (2 × C, **C$_{2'}$**, **C$_{6'}$**), 115.8 (2 × C, **C$_{3'}$**, **C$_{5'}$**), 62.7 (**CH$_2$**), 14.5 (**CH$_3$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{17}H_{16}N_3O_3$: 348.1455; found: 348.1456.

5. Ethyl 3-(((4-((*tert*-butoxycabonyl)amino)phenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**28**)



Chemical formula:
$C_{22}H_{24}N_4O_4$
Molecular weight:
408.45 g/mol

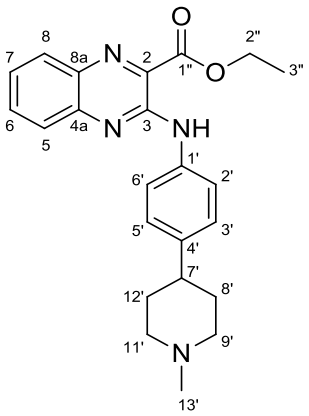
The title compound was synthesized according to the general method **D1** from compound **11** (94.9 mg, 0.40 mmol) and *tert*-butyl (4-aminophenyl)carbamate **21** (249.6 mg, 1.20 mmol) in absolute ethanol (6.5 mL). The reaction mixture was refluxed for 64 hours in a sealed tube. Compound **28** was obtained (152.0 mg, 93%) as an orange powder.

MP: 198.1 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 10.00 (se, 1H, **NH$_{1'}$**), 9.35 (se, 1H, **NH$_{4'}$**),7.96 (dd, 1H, *J* = 8.2, 1.1 Hz, **H$_{quino}$**) 7.82-7.73 (m, 4H, **2 H$_{quino}$, H$_{3'}$, H$_{5'}$**), 7.54 (ddd, 1H, *J* = 8.2, 6.1, 2.0 Hz, **H$_{quino}$**), 7.48 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, **H$_{2'}$, H$_{6'}$**), 4.48 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_2$**), 1.49 (s, 9H, ***t*Bu**), 1.42 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6): δ 166.0 (**C=O**), 153.3 (**C$_{1''}$**), 148.9 (**C$_3$**), 142.6 (**Cq$_{quino}$**), 136.0 (**Cq$_{quino}$**), 135.4 (**C$_{1'}$**), 134.0 (**C$_{4'}$**), 133.3 (**CH$_{quino}$**), 132.6 (**C$_2$**), 130.0 (**CH$_{quino}$**), 126.6 (**CH$_{quino}$**), 126.4 (**CH$_{quino}$**), 121.2 (2 × C, **C$_{3'}$**, **C$_{5'}$**), 119.1 (2 × C, **C$_{2'}$**, **C$_{6'}$**), 79.4 (**C$_{2''}$**), 62.7 (**CH$_2$**), 28.6 (3 × C, 3 × **C$_{3''}$**), 14.5 (**CH$_3$**).

6. Ethyl 3-((4-(*N*-methylpiperidin-4-yl)phenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**29**)



Chemical formula:
$C_{23}H_{26}N_4O_2$
Molecular weight:
390.4781 g/mol

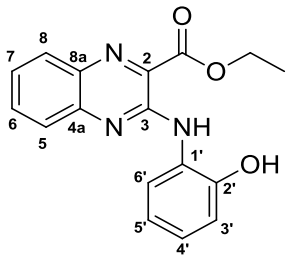
The title compound was synthesized according to the general method **D1** from compound **11** (45.0 mg, 0.19 mmol) and the amine **23** (40.0 mg, 0.21 mmol) in absolute ethanol (1.5 mL) in a sealed tube. The reaction mixture was refluxed for 112 hours in a sealed tube. After purification by silica column chromatography using dichloromethane with methanol (gradient 0-10%) as eluent, the compound **29** was obtained (47.0 mg, 63%) as an orange powder.

MP: 127.0 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 10.28 (bs, 1H, **NH**), 8.02 (dd, 1H, *J* = 8.1, 1.2 Hz, **H$_{quino}$**), 7.84 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, **H$_{2'}$**,**H$_{6'}$**), 7.77 (dd, 1H, *J* = 8.1, 1.2 Hz, **H$_{quino}$**), 7.69 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 6.6, 1.2 Hz, **H$_{quino}$**), 7.47 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 6.6, 1.2 Hz, **H$_{quino}$**), 7.26 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, **H$_{3'}$**, **H$_{5'}$**), 4.59 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, **H$_{2''}$**), 3.30 (d, *J* = 11.7 Hz, 2H, **H$_{8'}$**, **H$_{12'}$**), 2.68-2.62 (m, 1H, **H$_{7'}$**), 2.59 (s, 3H, **H$_{13'}$**), 2,51 (ddd, 2H, *J* = 12.3, 2.8 Hz, **H$_{9'}$**, **H$_{11'}$**), 2.17 (ddd, 2H, *J* = 12.3, 2.8 Hz, **H$_{9'}$**, **H$_{11'}$**), 1.96 (d, 2H, *J* = 11.7 Hz, **H$_{8'}$**, **H$_{12'}$**), 1.53 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **H$_{3''}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 166.4 (**C$_{1''}$**), 149.3 (**C$_3$**), 143.2 (**C$_2$**), 139.4 (**Cq$_{quino}$**), 137.7 (**C$_{1'}$**), 136.4 (**Cq$_{quino}$**), 132.9 (**CH$_{quino}$**), 130.5 (**CH$_{quino}$**), 127.3 (2 × C, **C$_{3'}$**, **C$_{5'}$**), 126.7 (**CH$_{quino}$**), 125.9 (**CH$_{quino}$**), 120.5 (2 × C, **C$_{2'}$**, **C$_{6'}$**), 63.0 (**C$_{2''}$**), 55.7 (2 × C, **C$_{9'}$**, **C$_{11'}$**), 45.1 (**C$_{13'}$**), 40.4 (**C$_{7'}$**), 31.9 (2 × C, **C$_{8'}$**, **C$_{12'}$**), 14.3 (**C$_{3''}$**).

7. Ethyl 3-((2-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**30**)



Chemical formula:
$C_{17}H_{15}N_3O_3$
Molecular weight:
309.3193 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D1** from compound **11** (238.5 mg, 1.01 mmol) and 2-aminophenol (121.0 mg, 1.11 mmol) in absolute ethanol (10 mL). The reaction mixture was refluxed for 110 hours. Compound **30** was obtained (156.1 mg, 50%) as an orange powder.

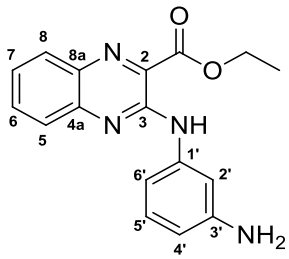
MP: 166.6 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.66 (bs, 1H, **NH**), 10.16 (bs, 1H, **OH**), 8.89 (m, 1H, **H$_{6'}$**), 7.99 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, **H$_{quino}$**), 7.80 (m, 2H, **2 H$_{quino}$**), 7.56 (m, 1H, **H$_{quino}$**), 7.00-6.82 (m, 3H, **H$_{3'}$**, **H$_{4'}$**, **H$_{5'}$**), 4.49 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_2$**), 1.43 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 165.8 (**C=O**), 149.0 (**C$_3$**), 147.0 (**C$_{2'}$**), 142.6 (**Cq$_{quino}$**), 135.9 (**Cq$_{quino}$**), 133.5 (**CH$_{quino}$**), 132.3 (**C$_2$**), 130.1 (**CH$_{quino}$**), 128.4 (**C$_{1'}$**), 126.6 (**CH$_{quino}$**), 126.5 (**CH$_{quino}$**), 123.1 (**C$_{4'}$**), 119.7 (**C$_{6'}$**), 119.6 (**C$_{5'}$**), 114.7 (**C$_{3'}$**), 62.7 (**CH$_2$**), 14.6 (**CH$_3$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{17}H_{16}N_3O_3$: 310.1186 ; found: 310.1187.

8. Ethyl 3-((3-aminophenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**31**)



Chemical formula:
$C_{17}H_{16}N_4O_2$
Molecular weight:
308.33 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D1** from compound **11** (329.9 mg, 1.40 mmol) and amine **20** (312.2 mg, 1.50 mmol) in absolute ethanol (10 mL). The reaction mixture was refluxed for 110 hours. Compound **31** was obtained (139.2 mg, 32%) as a red powder.

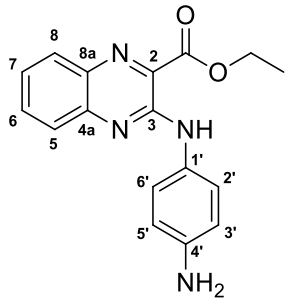
MP: 207.7 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.00 (bs, 1H, **NH**), 7.97 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, **H$_{quino}$**), 7.81-7.77 (m, 2H, **2 H$_{quino}$**), 7.55 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 5.1, 3.2 Hz, **H$_{quino}$**), 7.26 (dd, 1H, *J* = 1.9 Hz, **H$_{2'}$**), 7.09-6.97 (m, 2H, **H$_{5'}$**, **H$_{6'}$**), 6.32 (ddd, 1H, *J* = 7.1, 1.9 Hz, **H$_{4'}$**), 5.17 (bs, 2H, **NH$_2$**), 4.48 (q, 2H *J* = 7.2 Hz, **CH$_2$**), 1.41 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 166.1 (**C=O**), 149.7 (**C$_{3'}$**), 149.0 (**C$_3$**), 142.6 (**Cq$_{quino}$**), 140.3 (**C$_{1'}$**), 135.9 (**Cq$_{quino}$**), 133.3 (**CH$_{quino}$**), 132.5 (**C$_2$**), 130.0 (**CH$_{quino}$**), 129.7 (**C$_{5'}$**), 126.7 (**CH$_{quino}$**), 126.4 (**CH$_{quino}$**), 109.7 (**C$_{4'}$**), 108.2 (**C$_{6'}$**), 105.8 (**C$_{2'}$**), 62.8 (**CH$_2$**), 14.5 (**CH$_3$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{17}H_{17}N_4O_2$: 309.1346; found: 309.1345.

9. Ethyl 3-((4-aminophenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**32**)



Chemical formula:
$C_{17}H_{16}N_4O_2$
Molecular weight:
308.33 g/mol

To a solution of compound **28** (37.0 mg, 0.09 mmol) in dichloromethane (5 mL) was added dropwise trifluoroacetic acid (1 mL, 13.06 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 6 hours. The resulting mixture was made alkaline with a saturated sodium carbonate solution and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under reduced pressure to give the desired derivative **32** (27.0 mg, 96%) as a red powder.

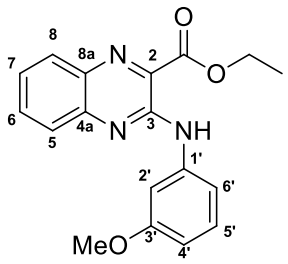
MP: 203.3 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 10.06 (bs, 1H, **NH**), 8.01 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.2 Hz, **H_{quino}**), 7.74 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.2 Hz, **H_{quino}**) 7.70-7.64 (m, 3H, **H_{quino}**, **$H_{2'}$**, **$H_{6'}$**), 7.44 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 6.6, 1.2 Hz, **H_{quino}**), 6.77 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, **$H_{3'}$, $H_{5'}$**), 4.61 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, **CH_2**), 3.70 (bs, 2H, **NH_2**), 1.55 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, **CH_3**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 166.4 (**C=O**), 149.7 (**C_3**), 143.6 (**$C_{4'}$**), 142.6 (**C_2**), 136.2 (**Cq_{quino}**), 132.8 (**Cq_{quino}**), 130.6 (**$C_{1'}$**), 130.5 (**CH_{quino}**), 130.2 (**CH_{quino}**), 126.6 (**CH_{quino}**), 125.4 (**CH_{quino}**), 122.4 (2 × C, **$C_{2'}$**, **$C_{6'}$**), 115.5 (2 × C, **$C_{3'}$**, **$C_{5'}$**), 62.9 (**CH_2**), 14.3 (**CH_3**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[H+M]^+$ calculated for $C_{17}H_{17}N_4O_2$: 309.1346; found: 309.1349.

10. Ethyl 3-((3-methoxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**33**)



Chemical formula:
$C_{18}H_{17}N_3O_3$
Molecular weight:
323.35 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D2** from compound **11** (179.2 mg, 0.76 mmol) and *m*-anisidine (85.1 µL, 93.3 mg, 0.76 mmol) in absolute ethanol. The reaction mixture was stirred under microwave irradiation for 3 hours at 150 °C. After cooling, the reaction mixture was filtered, giving compound **33** (131.5 mg, 54%) as a yellow powder.

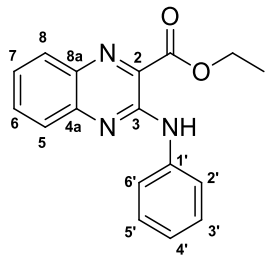
MP: 123.4 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.16 (bs, 1H, **NH**), 7.99 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, **H$_{quino}$**), 7.84-7.79 (m, 2H, **2 H$_{quino}$**), 7.75 (dd, 1H, *J* = 2.1 Hz, **H$_2$'**) 7.58 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 6.3, 2.1 Hz, **H$_{quino}$**), 7.37 (m, 2H, **H$_4$'**, **H$_6$'**), 7.29 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, **H$_5$'**), 6.78 (dd, 1H, *J* = 7.3, 2.8 Hz, **H$_4$'**), 4.49 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 3.81 (s, 3H, **OMe**), 1.42 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 166.0 (**C=O**), 160.2 (**C$_3$'**), 148.8 (**C$_3$**), 142.2 (**Cq$_{quino}$**), 140.8 (**C$_1$'**), 136.1 (**Cq$_{quino}$**), 133.5 (**CH$_{quino}$**), 132.7 (**C$_2$**), 130.1 (**C$_5$'**), 130.0 (**CH$_{quino}$**), 126.8 (**CH$_{quino}$**), 126.7 (**CH$_{quino}$**), 112.7 (**C$_6$'**), 109.0 (**C$_4$'**), 105.9 (**C$_2$'**), 62.8 (**CH$_2$**), 55.5 (**OMe**), 14.5 (**CH$_3$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{18}H_{18}N_3O_3$: 324.1343; found: 324.1345.

11. Ethyl 3-((phenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**34**)



Chemical formula:
$C_{17}H_{15}N_3O_2$
Molecular weight:
293.32 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D2** from compound **11** (370.9 mg, 1.57 mmol) and aniline (157.1 µL, 160.6 mg, 1.72 mmol) in absolute ethanol. The reaction mixture was stirred under microwave irradiation for 3 hours at 150 °C. After cooling, the reaction mixture was filtered, giving compound **34** (224.2 mg, 49%) as a yellow powder.

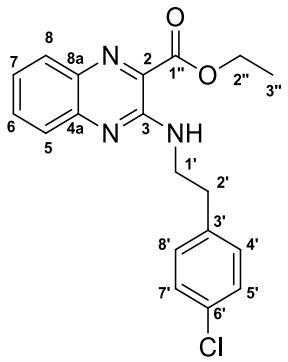
MP: 138.6 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.14 (bs, 1H, **NH**), 8.00 (dd, 1H, *J* = 8.0, 0.7 Hz, **H$_{quino}$**), 7.93 (d, 2H, *J* = 8.7, 1.4 Hz, **H$_{2'}$**, **H$_{6'}$**), 7.84-7.77 (m, 2H, **2 H$_{quino}$**), 7.58 (ddd, 1H, *J* = 8.0, 5.8, 2.4 Hz, **H$_{quino}$**), 7.42 (m, 2H, **H$_{3'}$**, **H$_{5'}$**), 7.11 (ddd, 1H, *J* = 8.6, 7.2, 1.2 Hz, **H$_{4'}$**), 4.49 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_2$**), 1.42 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 166.0 (**C=O**), 148.8 (**C$_3$**), 142.3 (**Cq$_{quino}$**), 139.6 (**C$_{1'}$**), 136.1 (**Cq$_{quino}$**), 133.4 (**CH$_{quino}$**), 132.8 (**C$_2$**), 130.0 (**CH$_{quino}$**), 129.4 (2 × C, **C$_{3'}$**, **C$_{5'}$**), 126.7 (2 × C, **2 CH$_{quino}$**), 123.4 (**C$_{4'}$**), 120.4 (2 × C, **C$_{2'}$**, **C$_{6'}$**), 62.8 (**CH$_2$**), 14.5 (**CH$_3$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{17}H_{16}N_3O_2$: 294.1237; found: 294.1235.

12. Ethyl 3-((2-(4-chlorophenyl)ethyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**35**)



Chemical formula:
$C_{19}H_{18}ClN_3O_2$
Molecular weight:
355.82 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D2** from compound **11** (239.5 mg, 1.01 mmol) and 2-(4-chlorophenyl)ethylamine (155.6 µL, 173.1 mg, 1.11 mmol) in absolute ethanol (5 mL The reaction mixture was stirred under microwave irradiation for 3 hours at 150 °C. Ethanol was then evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-20%) as eluent to give the desired compound **35** was obtained (107.3 mg, 30%) as a yellow powder.

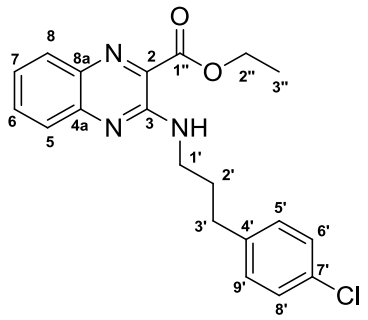
MP: 117.8 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 7.99 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, **NH**), 7.90 (dd, 1H, *J* = 8.3, 0.9 Hz, **H$_{quino}$**), 7.72 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.6, 0.9 Hz, **H$_{quino}$**), 7.66 (dd, 1H, *J* = 8.3, 0.9 Hz, **H$_{quino}$**), 7.44 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.6, 0.9 Hz, **H$_{quino}$**), 7.40-7.31 (m, 4H, **H$_{4'}$**, **H$_{5'}$**, **H$_{7'}$**, **H$_{8'}$**), 4.40 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **H$_{2"}$**), 3.75 (m, 2H, **H$_{1'}$**), 2.96 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, **H$_{2'}$**), 1.36 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **H$_{3"}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 165.7 (**C=O**), 151.5 (**C$_3$**), 143.6 (**Cq$_{quino}$**), 139.1 (**C$_{3'}$**), 135.4 (**C$_2$**), 133.1 (**CH$_{quino}$**), 131.9 (**Cq$_{quino}$**), 131.3 (**C$_{6'}$**), 131.1 (2 × C, **2 CH$_{Ar}$**), 130.1 (**CH$_{quino}$**), 128.8 (2 × C, **2 CH$_{Ar}$**), 126.3 (**CH$_{quino}$**), 125.3 (**CH$_{quino}$**), 62.4 (**C$_{2"}$**), 42.2 (**C$_{1'}$**), 34.1 (**C$_{2'}$**), 14.5 (**C$_{3"}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{19}H_{19}ClN_3O_2$: 356.1160; found: 356.1167.

13. Ethyl 3-((3-(4-chlorophenyl)propyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**36**)



Chemical formula:
$C_{20}H_{20}ClN_3O_2$
Molecular weight:
369.84 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D2** from compound **11** (240.5 mg, 1.02 mmol) and 3-(4-chlorophenyl)propylamine (163.5 µL, 189.7 mg, 1.12 mmol) in absolute ethanol (5 mL). The reaction mixture was stirred under microwave irradiation for 3 hours at 150 °C. Ethanol was then evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-20%) as eluent to give the desired compound **36** (293.7 mg, 78%) as a yellow powder.

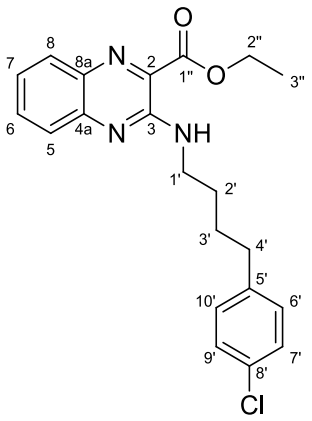
MP: 73.5°C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 7.96 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz, **NH**), 7.88 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.2 Hz, **H$_{quino}$**), 7.69 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.8, 1.2 Hz, **H$_{quino}$**), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.2 Hz, **H$_{quino}$**), 7.42 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.8, 1.2 Hz, **H$_{quino}$**), 7.32 (m, 2H, **2 H$_{Ar}$**), 7.26 (m, 2H, **2 H$_{Ar}$**), 4.41 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **H$_{2''}$**), 3.51 (m, 2H, **H$_{1'}$**), 2.69 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, **H$_{3'}$**), 1.95 (qt, 2H, *J* = 7.3 Hz, **H$_{2'}$**), 1.38 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **H$_{3''}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 165.8 (**C=O**), 151.6 (**C$_3$**), 143.7 (**Cq$_{quino}$**), 141.1 (**C$_{4'}$**), 135.3 (**CH$_{quino}$**), 133.1 (**CH$_{quino}$**), 131.9 (**Cq$_{quino}$**), 130.8 (**C$_{7'}$**), 130.6 (2 × C, **2 CH$_{Ar}$**), 130.0 (**CH$_{quino}$**), 128.6 (2 × C, **2 CH$_{Ar}$**), 126.1 (**CH$_{quino}$**), 125.1 (**CH$_{quino}$**), 62.3 (**C$_{2''}$**), 40.2 (**C$_{1'}$**), 32.4 (**C$_{3'}$**), 30.2 (**C$_{2'}$**), 14.5 (**C$_{3''}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{20}H_{21}ClN_3O_2$: 370.1319; found: 370.1317.

14. Ethyl 3-((4-(4-chlorophenyl)butyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**37**)



Chemical formula:
$C_{21}H_{22}ClN_3O_2$
Molecular weight:
383.87 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D2** from compound **11** (224.9 mg, 0.95 mmol) and 4-(4-chlorophenyl)butylamine (182.7 µL, 191.9 mg, 1.05 mmol) in absolute ethanol (5 mL). The reaction mixture was stirred under microwave irradiation for 3 hours at 150 °C. Ethanol was then evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-20%) as eluent to give compound **37** (177.1 mg, 49%) as a yellow powder.

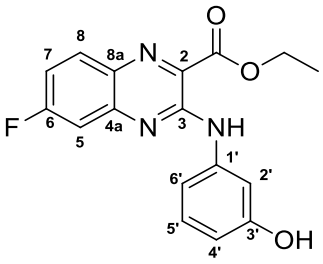
MP: 85.1 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 7.95 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz, **NH**), 7.88 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.3 Hz, **H$_{quino}$**), 7.69 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.8, 1.3 Hz, **H$_{quino}$**), 7.60 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.3 Hz, **H$_{quino}$**), 7.42 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.8, 1.3 Hz, **H$_{quino}$**), 7.33-7.27 (m, 2H, **2 H$_{Ar}$**), 7.26-7.20 (m, 2H, **2 H$_{Ar}$**), 4.41 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **H$_{2"}$**), 3.56-3.49 (m, 2H, **H$_{1'}$**), 2.64 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, **H$_{4'}$**), 1.70-1.62 (m, 4H, **H$_{2'}$**, **H$_{3'}$**), 1.37 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **H$_{3"}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 165.8 (**C=O**), 151.6 (**C$_3$**), 143.7 (**Cq$_{quino}$**), 141.6 (**C$_{8'}$**), 135.3 (**Cq$_{quino}$**), 133.1 (**CH$_{quino}$**), 131.9 (**C$_2$**), 130.7 (**C$_{5'}$**), 130.6 (2 × C, **2 CH$_{Ar}$**), 130.1 (**CH$_{quino}$**), 128.6 (2 × C, **2 CH$_{Ar}$**), 126.1 (**CH$_{quino}$**), 125.1 (**CH$_{quino}$**), 62.3 (**C$_{2"}$**), 40.4 (**C$_{1'}$**), 34.5 (**C$_{4'}$**), 28.7 (**C$_{2'}$**), 28.3 (**C$_{3'}$**), 14.5 (**C$_{3"}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{21}H_{23}ClN_3O_2$: 384.1474; found: 384.1473.

15. Ethyl 6-fluoro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**38**)



Chemical formula:
$C_{17}H_{14}FN_3O_3$
Molecular weight:
327.31 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D2** from compound **12** (84.6 mg, 0.33 mmol) and 3-aminophenol (39.8 mg, 0.37 mmol) in absolute ethanol (2 mL). The reaction mixture was stirred under microwave irradiation for 3 hours at 150 °C. Ethanol was then evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-30%) as eluent to give compound **38** (88.9 mg, 82%) as an orange powder.

MP: 199.8 °C.

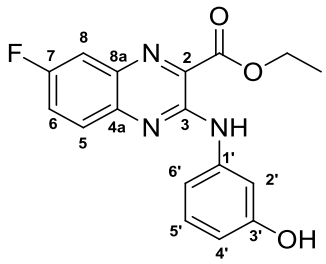
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.15 (bs, 1H, **NH**), 9.49 (bs, 1H, **OH**), 8.06 (ddd, 1H, *J* = 9.1, 6.1, 0.5 Hz, **H$_8$**), 7.55 (t, 1H, *J* = 2.0 Hz, **H$_{2'}$**), 7.53-7.42 (m, 2H, **H$_5$**, **H$_7$**), 7.24-7.14 (m, 2H, **H$_{5'}$**, **H$_{6'}$**), 6.53 (ddd, 1H, *J* = 7.7, 2.0, 1.3 Hz, **H$_{4'}$**), 4.48 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.41 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 165.9 (**C=O**), 164.9 (d, *J* = 247.5 Hz, **C$_6$**), 158.3 (**C$_{3'}$**), 149.2 (**C$_3$**), 143.7 (d, *J* = 14.6 Hz, **C$_{4a}$**), 140.3 (**C$_1$**'), 133.3 (**C$_3$**), 132.7 (d, *J* = 11.0 Hz, **C$_8$**), 132.2 (**C$_2$**), 130.0 (**C$_{5'}$**), 116.5 (d, *J* = 25.6 Hz, **C$_7$**), 111.4 (**C$_{6'}$**), 110.9 (**C$_{4'}$**), 110.4 (d, *J* = 21.8 Hz, **C$_5$**), 107.6 (**C$_{2'}$**), 60.2 (**CH$_2$**), 14.5 (**CH$_3$**).

^{19}F NMR (282 MHz, DSMO-*d*$_6$): δ -105.3 (s).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{17}H_{15}FN_3O_3$: 328.1092; found: 328.1094.

16. Ethyl 7-fluoro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**39**)



Chemical formula:
$C_{17}H_{14}FN_3O_3$
Molecular weight:
327.31 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D2** from compound **13** (254.7 mg, 1.00 mmol) and 3-aminophenol (120.0 mg, 1.10 mmol) in absolute ethanol (5 mL). The reaction mixture was stirred under microwave irradiation for 3 hours at 150 °C. Ethanol was then evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-30%) as eluent to give compound **39B2** (138.6 mg, 42%) as a red powder.

MP: 223.4 °C.

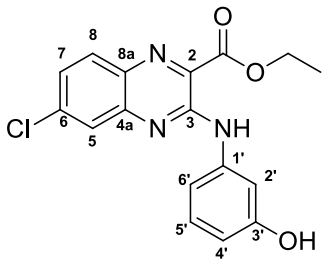
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.01 (bs, 1H, **NH**), 9.47 (bs, 1H, **OH**), 7.85-7.70 (m, 3H, **H$_5$**, **H$_6$**, **H$_8$**), 7.55 (t, 1H, *J* = 1.8 Hz, **H$_{2'}$**), 7.22-7.13 (m, 2H, **H$_{5'}$**, **H$_{6'}$**), 6.51 (ddd, 1H, *J* = 7.3, 1.8 Hz, **H$_{4'}$**), 4.48 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.41 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 165.8 (**C=O**), 160.1 (d, *J* = 243.1 Hz, **C$_7$**), 158.3 (**C$_{3'}$**), 148.5 (d, *J* = 1.8 Hz, **C$_{4a}$**), 140.6 (**C$_{1'}$**), 139.6 (**C$_3$**), 136.0 (d, *J* = 12.8 Hz, **C$_{8a}$**), 133.6 (**C$_2$**), 130.0 (**C$_{5'}$**), 128.7 (d, *J* = 9.6 Hz, **C$_5$**), 123.1 (d, *J* = 26.7 Hz, **C$_6$**), 113.5 (d, *J* = 21.4 Hz, **C$_8$**), 111.2 (**C$_{6'}$**), 110.6 (**C$_{4'}$**), 107.3 (**C$_{2'}$**), 62.9 (**CH$_2$**), 14.5 (**CH$_3$**).

^{19}F NMR (282 MHz, DSMO-*d*$_6$): δ - 114.4 (s).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{17}H_{15}FN_3O_3$: 328.1092; found: 328.1092.

17. Ethyl 6-chloro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**40**)



Chemical formula:
$C_{17}H_{14}ClN_3O_3$
Molecular weight:
343.76 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D2** from compound **14** (203.1 mg, 0.75 mmol) and 3-aminophenol (245.2 mg, 2.25 mmol) in absolute ethanol (5 mL). The reaction mixture was stirred under microwave irradiation for 3 hours at 150 °C. The precipitate of pure compound **40** formed was filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-40%) as eluent. Compound **40** was obtained (253.9 mg, 99%) as an orange powder.

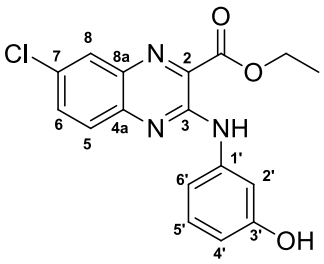
MP: 226.8 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 10.14 (bs, 1H, **NH**), 9.48 (bs, 1H, **OH**), 8.01 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, **H_8**), 7.82 (dd, 1H, *J* = 2.3, 1.0 Hz, **$H_{2'}$**), 7.63 (m, 1H, **H_5**), 7.57 (dd, 1H, *J* = 8.9, 2.2 Hz, **H_7**), 7.22-7.14 (m, 2H, **$H_{5'}$**, **$H_{6'}$**), 6.56-6.50 (m, 1H, **$H_{4'}$**), 4.48 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH_2**), 1.40 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH_3**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6): δ 165.8 (**C=O**), 158.3 (**$C_{3'}$**), 149.2 (**C_3**), 142.9 (**C_6**), 140.3 (**$C_{1'}$**), 137.8 (**C_{4a}**), 134.6 (**C_{8a}**), 133.3 (**C_2**), 131.8 (**C_8**), 130.1 (**$C_{5'}$**), 127.0 (**C_7**), 125.3 (**C_5**), 111.3 (**$C_{6'}$**), 110.9 (**$C_{4'}$**), 107.5 (**$C_{2'}$**), 62.9 (**CH_2**), 14.5 (**CH_3**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{17}H_{15}ClN_3O_3$: 344.0796; found: 344.0794.

18. Ethyl 7-chloro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**41**)



Chemical formula:
$C_{17}H_{14}ClN_3O_3$
Molecular weight:
343.76 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D2** from compound **15** (199.6 mg, 0.74 mmol) and 3-aminophenol (88.4 mg, 0.81 mmol) in absolute ethanol (5 mL). The reaction mixture was stirred under microwave irradiation for 3 hours at 150 °C. Ethanol was then evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using dichloromethane with ethyl acetate gradient (0-10%) as eluent to give the desired compound **41** (128.9 mg, 51 %) as a red powder.

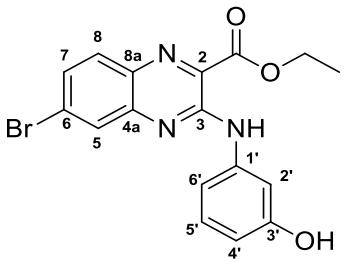
MP: 216.9 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.07 (bs, 1H, **NH**), 9.49 (bs, 1H, **OH**), 8.06 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, **H$_8$**), 7.82 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.2 Hz, **H$_6$**), 7.77 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, **H$_5$**), 7.56 (t, 1H, *J* = 2.1 Hz, **H$_2$'**), 7.22-7.14 (m, 2H, **H$_5$'**, **H$_6$'**), 6.52 (ddd, 1H, *J* = 7.0, 2.1 Hz, **H$_4$'**), 4.48 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.40 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 165.7 (**C=O**), 158.3 (**C$_3$'**), 148.8 (**C$_3$**), 141.1 (**C$_{4a}$**), 140.4 (**C$_1$'**), 136.1 (**C$_{8a}$**), 133.9 (**C$_2$**), 133.6 (**C$_7$**), 130.4 (**C$_8$**), 130.0 (**C$_5$'**), 128.5 (**C$_8$**), 128.3 (**C$_5$**), 111.3 (**C$_6$'**), 110.8 (**C$_4$'**), 107.5 (**C$_2$'**), 62.9 (**CH$_2$**), 14.5 (**CH$_3$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{17}H_{15}ClN_3O_3$: 344.0796; found: 344.0799.

19. Ethyl 6-bromo-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**42**)



Chemical formula:
$C_{17}H_{14}BrN_3O_3$
Molecular weight:
388.22 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D2** from compound **16** (203.2 mg, 0.64 mmol) and 3-aminophenol (210.8 mg, 1.93 mmol) in absolute ethanol (5 mL). The reaction mixture was stirred under microwave irradiation for 3 hours at 150 °C. After cooling, the reaction mixture was filtered, giving compound **42** (72.4 mg, 29%) as a red powder.

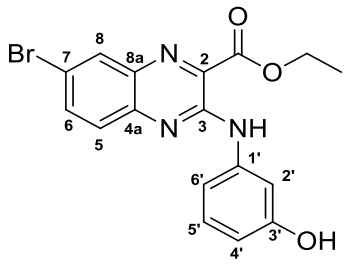
MP: 230.6 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.14 (bs, 1H, **NH**), 9.48 (bs, 1H, **OH**), 7.98 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, **H$_5$**), 7.91 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, **H$_8$**), 7.70-7.64 (m, 2H, **H$_7$**, **H$_{2'}$**), 7.21-7.13 (m, 2H, **H$_{5'}$**, **H$_{6'}$**), 6.55-6.49 (m, 1H, **H$_{4'}$**), 4.47 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.40 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 165.8 (**C=O**), 158.3 (**C$_{3'}$**), 149.1 (**C$_3$**), 143.1 (**C$_6$**), 140.3 (**C$_{1'}$**), 134.8 (**C$_{8a}$**), 133.3 (**C$_2$**), 131.8 (**C$_8$**), 130.1 (**C$_{5'}$**), 129.6 (**C$_7$**), 128.6 (**C$_5$**), 126.7 (**C$_{4a}$**), 111.3 (**C$_{6'}$**), 110.8 (**C$_{4'}$**), 107.5 (**C$_{2'}$**), 62.9 (**CH$_2$**), 14.5 (**CH$_3$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{17}H_{15}BrN_3O_3$: 388.0291; found: 388.0291.

20. Ethyl 7-bromo-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**43**)



Chemical formula:
$C_{17}H_{14}BrN_3O_3$
Molecular weight:
388.22 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D2** from compound **17** (210.9 mg, 0.67 mmol) and 3-aminophenol (218.7 mg, 2.00 mmol) in absolute ethanol (5 mL). The reaction mixture was stirred under microwave irradiation for 3 hours at 150 °C. Ethanol was then evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-50%) as eluent to give compound **43** (88.4 mg, 34%) as a red powder.

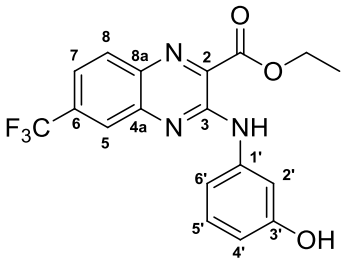
MP: 244.1 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.08 (bs, 1H, **NH**), 9.50 (bs, 1H, **OH**), 8.20 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, **H$_8$**), 7.91 (dd, 1H, *J* = 8.9, 2.2 Hz, **H$_6$**), 7.70 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, **H$_5$**), 7.58-7.56 (m, 1H, **H$_{2'}$**), 7.22-7.14 (m, 2H, **H$_{5'}$**, **H$_{6'}$**), 6.52 (ddd, 1H, *J* = 7.1, 2.1 Hz, **H$_{4'}$**), 4.48 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.40 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 165.7 (**C=O**), 158.3 (**C$_{3'}$**), 148.9 (**C$_3$**), 141.4 (**C$_{4a}$**), 140.4 (**C$_{1'}$**), 136.6 (**C$_7$**), 136.1 (**C$_6$**), 133.8 (**C$_2$**), 131.7 (**C$_8$**), 130.0 (**C$_{5'}$**), 128.5 (**C$_5$**), 118.5 (**C$_{8a}$**), 111.3 (**C$_{6'}$**), 110.8 (**C$_{4'}$**), 107.5 (**C$_{2'}$**), 62.9 (**CH$_2$**), 14.5 (**CH$_3$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{17}H_{15}BrN_3O_3$: 388.0291; found: 388.0290.

21. Ethyl 3-((3-hydroxyphenyl)amino)-6-(trifluoromethyl)quinoxaline-2-carboxylate (**44**)



Chemical formula:
$C_{18}H_{14}F_3N_3O_3$
Molecular weight:
377.32 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D2** from compound **18** (256.9 mg, 0.84 mmol) and 3-aminophenol (276.0 mg, 2.53 mmol) in absolute ethanol (1.5 mL). The reaction mixture was stirred under microwave irradiation for 8 hours at 100 °C. Ethanol was then evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-30%) as eluent to give the desired compound **44** (222.7 mg, 70%) as a red powder.

MP: 184.7 °C.

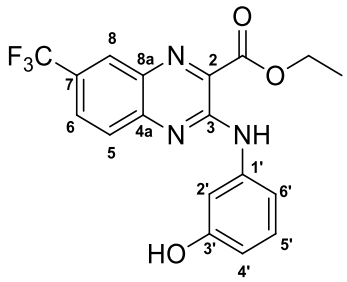
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.16 (bs, 1H, **NH**), 9.52 (bs, 1H, **OH**), 8.20 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, **H$_8$**), 8.10 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, **H$_5$**), 7.79 (dd, 1H, *J* = 8.6, 1.8 Hz, **H$_7$**), 7.67 (m, 1H, **H$_{2'}$**), 7.24-7.16 (m, 2H, **H$_{5'}$**, **H$_{6'}$**), 6.54 (ddd, 1H, *J* = 6.9, 2.4 Hz, **H$_{4'}$**), 4.50 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_2$**), 1.42 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **CH$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 165.5 (**C=O**), 158.3 (**C$_{3'}$**), 149.2 (**C$_3$**), 141.7 (**C$_{4a}$**), 140.2 (**C$_{1'}$**), 137.2 (**C$_{8a}$**), 135.6 (**C$_2$**), 132.5 (q, *J* = 31.9 Hz, **C$_6$**), 131.6 (**C$_8$**), 130.1 (**C$_{5'}$**), 124.2 (q, *J* = 271.1 Hz, **CF$_3$**), 124.1 (q, *J* = 3.5 Hz, **C$_5$**), 121.6 (q, *J* = 4.0 Hz, **C$_7$**), 111.4 (**C$_{6'}$**), 111.0 (**C$_{4'}$**), 107.6 (**C$_{2'}$**), 63.1 (**CH$_2$**), 14.4 (**CH$_3$**).

^{19}F NMR (282 MHz, DSMO-*d*$_6$): δ - 61.4 (s).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{18}H_{15}F_3N_3O_3$: 378.1060; found: 378.1059.

22. Ethyl 3-((3-hydroxyphenyl)amino)-7-(trifluoromethyl)quinoxaline-2-carboxylate (**45**)



Chemical formula:
$C_{18}H_{14}F_3N_3O_3$
Molecular weight:
377.32 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **D2** from compound **19** (86.2 mg, 0.28 mmol) and 3-aminophenol (33.9 mg, 0.31 mmol) in absolute ethanol (2 mL). The reaction mixture was stirred under microwave irradiation for 3 hours at 150 °C. After cooling, ethanol was evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-20%) as eluent to give compound **45** (38.8 mg, 36%) as a yellow powder.

MP: 178.5 °C.

^{1}H NMR (300 MHZ, DMSO-*d*$_6$): δ 10.22 (bs, 1H, **OH**), 9.56 (bs, 1H, **NH**), 8.34 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, **H$_8$**), 8.05 (dd, 1H, *J* = 8.7, 1.8 Hz, **H$_6$**), 7.93 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, **H$_5$**), 7.60 (m, 1H, **H$_{2'}$**), 7.23-7.17 (m, 2H, **H$_{5'}$**, **H$_{6'}$**), 6.56 (ddd, 1H, *J* = 7.2, 1.8 Hz, **H$_{4'}$**), 4,50 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_2$**), 1.42 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, **CH$_3$**).

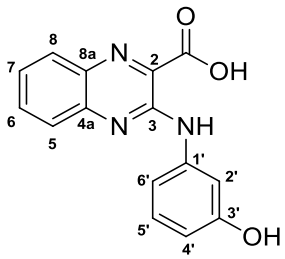
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 165.5 (**C=O**), 158.3 (**C$_{3'}$**), 149.7 (**C$_3$**), 144.2 (**C$_{4a}$**), 140.1 (**C$_{1'}$**), 134.8 (**C$_2$**), 134.7 (**C$_{8a}$**), 130.1 (**C$_{5'}$**), 128.4 (q, *J* = 3.1 Hz, **C$_6$**), 128.1 (**C$_5$**), 127.7 (q, *J* = 4.4 Hz, **C$_8$**), 126.3 (q, *J* = 32.3 Hz, **C$_7$**), 124.4 (q, *J* = 270.0 Hz, **CF$_3$**), 111.6 (**C$_{6'}$**), 111.2 (**C$_{4'}$**), 107.8 (**C$_{2'}$**), 63.0 (**CH$_2$**), 14.4 (**CH$_3$**).

^{19}F NMR (282 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ - 60.6 (t, *J* = 2.9 Hz).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{18}H_{15}F_3N_3O_3$: 378.1060; found: 378.1059.

E. Saponification

1. 3-((3-Hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**1**)



Chemical formula:
$C_{15}H_{11}N_3O_3$
Molecular weight:
281.27 g/mol

Method E1: to ester **24** (618.6 mg, 2.00 mmol) in aqueous methanol (80%, 10 mL), was added potassium carbonate (829.3 mg, 6.00 mmol) and the reaction mixture was refluxed for 4 h. After cooling, the solvent was removed under reduced pressure. Then, the residue was acidified with a 15% citric acid aqueous solution and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under reduced pressure to yield the acid **1** (439.6 mg, 78%) as a red powder.

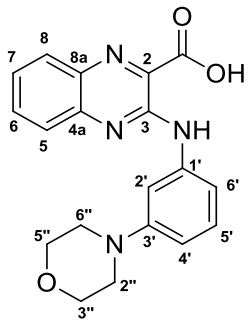
MP: 199.6 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.52 (bs, 1H, **NH**), 9.51 (bs, 1H, **OH**), 7.98 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, **H$_{quino}$**), 7.84-7.76 (m, 2H, **2 H$_{quino}$**), 7.60-7.54 (m, 2H, **H$_{quino}$, H$_2$'**), 7.25-7.14 (m, 2H, **H$_5$'**, **H$_6$'**), 6.50 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, **H$_4$'**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 168.1 (**C=O**), 158.3 (**C$_3$'**), 149.3 (**C$_3$**), 142.5 (**Cq$_{quino}$**), 140.7 (**C$_1$'**), 136.0 (**Cq$_{quino}$**), 133.2 (**CH$_{quino}$**), 132.9 (**C$_2$**), 130.1 (**C$_5$'**), 130.0 (**CH$_{quino}$**), 126.6 (**CH$_{quino}$**), 126.5 (**CH$_{quino}$**), 111.0 (**C$_6$'**), 110.5 (**C$_4$'**), 107.2 (**C$_2$'**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{15}H_{12}N_3O_3$: 282.0873 ; found: 282.0873.

2. 3-((3-Morpholinophenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**46**)



Chemical formula:
$C_{19}H_{18}N_4O_3$
Molecular weight:
350.37 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E1** from compound **25** (150.0 mg, 0.40 mmol) and potassium carbonate (217,9 mg, 1.58 mmol) in aqueous methanol (80%, 5 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **47** was obtained (138.8 mg, 100%) as an orange powder.

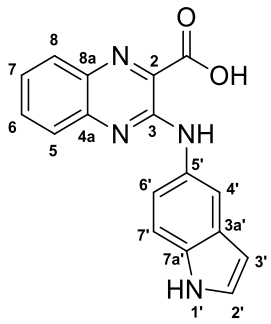
MP: 186.6 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.49 (bs, 1H, **NH**), 7.97 (d, 1H, *J* = 6.5 Hz, **H$_{quino}$**), 7.82-7.74 (m, 2H, **2 H$_{quino}$**), 7.67 (t, 1H, *J* = 2.0 Hz, **H$_{2'}$**), 7.56 (ddd, *J* = 8.4, 6.5, 2.1 Hz, 1H, **H$_{quino}$**), 7.32 (dd, 1H, *J* = 7.9, 2.0 Hz, 1H, **H$_{6'}$**), 7.23 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, **H$_{5'}$**), 6.69 (dd, 1H, *J* = 8.1, 2.0 Hz, **H$_{4'}$**), 3.77 (t, 4H, *J* = 4.5 Hz, **H$_{3"}$**, **H$_{5"}$**), 3.16 (t, 4H, *J* = 4.5 Hz, **H$_{2"}$**, **H$_{6"}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 168.0 (**C=O**), 152.2 (**C$_{3'}$**), 149.4 (**C$_3$**), 142.5 (**Cq$_{quino}$**), 140.5 (**C$_{1'}$**), 135.9 (**Cq$_{quino}$**), 133.2 (**CH$_{quino}$**), 132.9 (**C$_2$**), 129.9 (**CH$_{quino}$**), 129.7 (**C$_{5'}$**), 126.7 (**CH$_{quino}$**), 126.4 (**CH$_{quino}$**), 111.4 (**C$_{6'}$**), 110.5 (**C$_{4'}$**), 106.9 (**C$_{2'}$**), 66.6 (2 × C, **C$_{3"}$**, **C$_{5"}$**), 49.0 (2 × C, **C$_{2"}$**, **C$_{6"}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calcd for $C_{19}H_{19}N_4O_3$: 351.1452; found: 351.1453.

3. 3-((1*H*-Indol5-yl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**47**)



Chemical formula:
$C_{17}H_{12}N_4O_2$
Molecular weight:
304.30 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E1** from compound **26** (80.6 mg, 0.24 mmol) and potassium carbonate (99.5 mg, 0.72 mmol) in aqueous methanol (80%, 5 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **46** was obtained (30.0 mg, 41%) as a red powder.

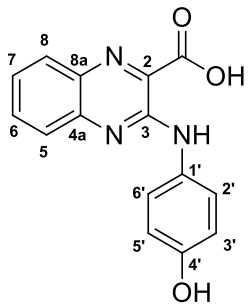
MP: 244.4°C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 12.45 (bs, 1H, **NH$_{1'}$**), 11.07 (bs, 1H, **NH**), 8.70-6.80 (m, 8H, **4 H$_{quino}$ H$_{2'}$**, **H$_{3'}$**, **H$_{4'}$**, **H$_{6'}$**, **H$_{7'}$**), 6.44 (bs, 1H, **NH$_{1'}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 168.6, 151.4, 133.6, 133.1, 132.5, 129.9, 129.4, 129.1 (3 × C), 127.1, 126.9, 125.7, 116.6, 112.9, 111.6, 102.5.

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{17}H_{13}N_4O_2$: 305.1033; found: 305.1034.

4. 3-((4-Hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**48**)



Chemical formula:
$C_{15}H_{11}N_3O_3$
Molecular weight:
281.27 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E1** from compound **27** (89.5 mg, 0.29 mmol) and potassium carbonate (79.9 mg, 0.58 mmol) in aqueous methanol (80%, 10 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **48** was obtained (79.0 mg, 97%) as an orange powder.

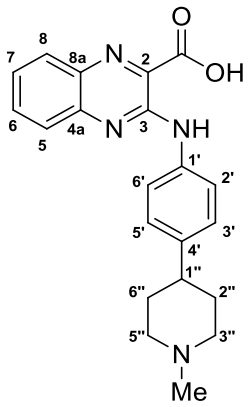
MP: 197.4 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.22 (bs, 1H, **NH**), 9.31 (bs, 1H, **OH**), 7.93 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.3 Hz, **H$_{quino}$**), 7.75 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.7, 1.3, **H$_{quino}$**), 7.70-7.63 (m, 3H, **H$_{quino}$**, **H$_{2'}$**, **H$_{6'}$**), 7.51 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.7, 1.3 Hz, **H$_{quino}$**), 6.80 (m, 2H, **H$_{3'}$**, **H$_{5'}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 168.1 (**C=O**), 153.9 (**C$_{4'}$**), 149.6 (**C$_3$**), 142.9 (**Cq$_{quino}$**), 135.8 (**Cq$_{quino}$**), 133.2 (**CH$_{quino}$**), 132.7 (**C$_2$**), 131.1 (**C$_{1'}$**), 129.9 (**CH$_{quino}$**), 126.4 (**CH$_{quino}$**), 125.9 (**CH$_{quino}$**), 122.5 (2 × C, **C$_{2'}$**, **C$_{6'}$**), 115.8 (2 × C, **C$_{3'}$**, **C$_{5'}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{15}H_{12}N_3O_3$: 282.0873; found: 282.0873.

5. 3-((4-*N*-Methylpiperidin-4-yl)phenyl))aminoquinoxaline-2-carboxylic acid (**49**)



Chemical formula:
$C_{21}H_{22}N_4O_2$
Molecular weight:
362.43 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E1** from compound **29** (42 mg, 0.11 mmol) and potassium carbonate (45 mg, 0.32 mmol) in aqueous methanol (80%, 5 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **49** was obtained (19 mg, 49%) as a yellow powder.

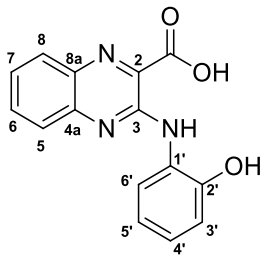
MP: 321.0 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 13.33 (bs, 1H, **NH**), 8.00 (dd, 1H, *J* = 8.1, 1.5 Hz, **H$_{quino}$**), 7.85 (dd, 2H, *J* = 6.5, 2.0 Hz, **H$_{2'}$**, **H$_{6'}$**), 7.68-7.58 (m, 2H, **2 H$_{quino}$**), 7.42 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 6.5, 1.5 Hz, **H$_{quino}$**), 7.23 (dd, 2H, *J* = 6.5, 2.0 Hz, **H$_{3'}$**), 2.86 (ddd, 2H, *J* = 11.7, 3.0 Hz, **H$_{3''}$**, **H$_{5''}$**), 2.46-2.36 (m, 1H, **H$_{1''}$**), 2.19 (s, 3H, **Me**), 1.95 (d, 2H, *J* = 11.7, 3.0 Hz, **H$_{3''}$**, **H$_{5''}$**), 1.77-1.58 (m, 4H, **H$_{2''}$**, **H$_{6''}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 166.9 (**C=O**), 150.4 (**C$_3$**), 142.1 (**C$_2$**), 141.7 (**Cq$_{quino}$**), 140.1 (**C$_{4'}$**), 138.8 (**C$_{1'}$**), 136.4 (**Cq$_{quino}$**), 130.7 (**CH$_{quino}$**), 129.8 (**CH$_{quino}$**), 127.5 (2 × C, **C$_{3'}$**, **C$_{5'}$**), 125.9 (**CH$_{quino}$**), 124.7 (**CH$_{quino}$**), 119.3 (2 × C, **C$_{2'}$**, **C$_{6'}$**), 56.4 (2 × C, **C$_{3''}$**, **C$_{5''}$**), 46.7 (**Me**), 41.2 (**C$_{1''}$**), 33.7 (2 × C, **C$_{2''}$**, **C$_{6''}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: an abundant fragment ion has been observed at *m/z* 213.1022 that have been attributed to the loss of the 1-methylpiperidin-4-yl(phenyl)amino moiety from the quinoxaline rign to forme the ion [$C_9H_6N_2O_2$ + K^+] (*m/z* calculated for $C_9HKN_2O_2$: 213.1022; found: 213.1022).

6. 3-((2-Hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**50**)



Chemical formula:
$C_{15}H_{11}N_3O_3$
Molecular weight:
281.27 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E1** from compound **30** (101 mg, 0.33 mmol) and potassium carbonate (135 mg, 0.98 mmol) in aqueous methanol (80%, 10 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **50** was obtained (60 mg, 65%) as a red powder.

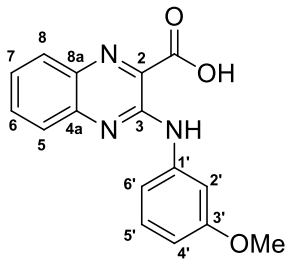
MP: 191.1 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 14.00 (bs, 1H, **COOH**), 10.84 (bs, 1H, **NH**), 10.11 (bs, 1H, **OH**), 8.88 (m, 1H, **H$_{6'}$**), 7.97 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H$_{quino}$**), 7.80 (m, 2H, **2 H$_{quino}$**), 7.56 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 3.7 Hz, **H$_{quino}$**), 7.00-6.68 (m, 3H, **H$_{3'}$**, **H$_{4'}$**, **H$_{6'}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ167.1 (**C=O**), 148.7 (**C$_3$**), 146.5 (**C$_{2'}$**), 142.2 (**Cq$_{quino}$**), 135.3 (**Cq$_{quino}$**), 132.7 (**CH$_{quino}$**), 132.4 (**C$_2$**), 129.4 (**CH$_{quino}$**), 127.9 (**C$_{1'}$**), 126.1 (**CH$_{quino}$**), 125.8 (**CH$_{quino}$**), 122.5 (**C$_{4'}$**), 119.2 (**C$_{6'}$**), 119.0 (**C$_{5'}$**), 114.2 (**C$_{3'}$**).

HRMS (ESI) m/z: $[M+H]^+$ calculated for $C_{15}H_{12}N_3O_3$: 282.0873; found: 282.0871.

7. 3-((Phenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**51**)



Chemical formula:
$C_{16}H_{13}N_3O_3$
Molecular weight:
295.29 g/mol

Method E2: to ester ester **33** (100.0 mg, 0.31 mmol) in aqueous methanol (80%, 10 mL), was added potassium carbonate (128.1 mg, 0.93 mmol) and the reaction mixture was refluxed for 4 hours. After cooling, the solvent was removed under reduced pressure. Then, the residue was acidified with a 15% hydrochloric acid aqueous solution, and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under reduced pressure to yield the acid **51** (74.6 mg, 82%) as a dark red powder.

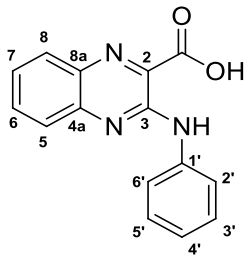
MP: 131.7 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.55 (bs, 1H, **NH**), 7.98 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H$_{quino}$**), 7.82-7.76 (m, 3H, **2 H$_{quino}$, H$_{2'}$**), 7.57 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 5.6, 2.6 Hz, **H$_{quino}$**), 7.36 (ddd, 1H, *J* = 8.0, 1.3 Hz, **H$_{6'}$**), 7.29 (t, 1H, *J* = 8.2 Hz, **H$_{5'}$**), 6.67 (ddd, 1H, *J* = 8.0, 2.6, 1.3 Hz, **H$_{4'}$**), 3.81 (s, 3H, **OMe**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 168.1 (**C=O**), 160.2 (**C$_{3'}$**), 149.2 (**C$_3$**), 142.4 (**Cq$_{quino}$**), 140.9 (**C$_{1'}$**), 136.0 (**Cq$_{quino}$**), 133.3 (**CH$_{quino}$**), 132.9 (**C$_2$**), 130.1 (**C$_{5'}$**), 130.0 (**CH$_{quino}$**), 126.7 (**CH$_{quino}$**), 126.6 (**CH$_{quino}$**), 112.6 (**C$_{6'}$**), 108.9 (**C$_{4'}$**), 105.9 (**C$_{2'}$**), 55.5 (**OMe**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{16}H_{14}N_3O_3$: 296.1030; found: 296.1030.

8. 3-((3-Methoxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**52**)



Chemical formula:
$C_{15}H_{11}N_3O_2$
Molecular weight:
265.27 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E2** from ester **34** (100.0 mg, 0.34 mmol) and potassium carbonate (141.4 mg, 1.02 mmol) in aqueous methanol (80%, 15 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **52** was obtained (90.5 mg, 100%) as an orange powder.

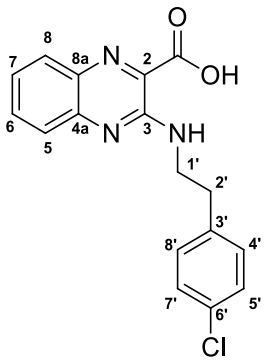
MP: 167.4 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.53 (bs, 1H, **NH**), 7.98 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, **H$_{quino}$**), 7.94 (m, 2H, **H$_{2'}$**, **H$_{6'}$**), 7.83-7.77 (m, 2H, **2 H$_{quino}$**), 7.57 (ddd, 1H, *J* = 7.8 Hz, 5.4, 2.9 Hz, **H$_{quino}$**), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, **H$_{3'}$**, **H$_{5'}$**), 7.10 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz, **H$_{4'}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 168.1 (**C=O**), 149.3 (**C$_3$**), 142.5 (**Cq$_{quino}$**), 139.7 (**C$_1$**), 136.1 (**Cq$_{quino}$**), 133.3 (**CH$_{quino}$**), 132.9 (**C$_2$**), 130.0 (**CH$_{quino}$**), 129.4 (2 × C, **C$_{3'}$**, **C$_{5'}$**), 126.6 (2 × C, **2 CH$_{quino}$**), 123.3 (**C$_{4'}$**), 120.3 (2 × C, **C$_{2'}$**, **C$_{6'}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{15}H_{12}N_3O_2$: 266.0924; found: 266.0924.

9. 3-(((2-(4-chlorophenyl)ethyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**53**)



Chemical formula:
$C_{17}H_{14}ClN_3O_2$
Molecular weight:
327.76 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E2** from compound **35** (75.8 mg, 0.21 mmol) and potassium carbonate (88.3 mg, 0.64 mmol) in aqueous methanol (80%, 10 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **53** was obtained (69.8 mg, 100%) as a yellow powder.

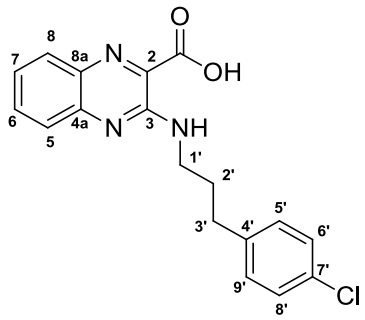
MP: 172.1 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 8.20 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, **NH**), 7.88 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.4 Hz, **H$_{quino}$**), 7.71 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.5, 1.4 Hz, **H$_{quino}$**), 7.65 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.4 Hz, **H$_{quino}$**), 7.44 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.5, 1.4 Hz, **H$_{quino}$**), 7.40-7.31 (m, 4H, **H$_{4'}$**, **H$_{5'}$**, **H$_{7'}$**, **H$_{8'}$**,), 3.75 (m, 2H, **H$_{1'}$**), 2.96 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, **H$_{2'}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 167.6 (**C=O**), 151.8 (**C$_3$**), 143.7 (**Cq$_{quino}$**), 139.1 (**C$_{6'}$**), 135.3 (**Cq$_{quino}$**), 133.0 (**CH$_{quino}$**), 132.1 (**C$_2$**), 131.3 (**C$_{3'}$**), 131.1 (2 × C, **2 CH$_{ar}$**), 130.0 (**CH$_{quino}$**), 128.8 (2 × C, **2 CH$_{ar}$**), 126.2 (**CH$_{quino}$**), 125.2 (**CH$_{quino}$**), 42.1 (**C$_{1'}$**), 34.1 (**C$_{2'}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{17}H_{15}ClN_3O_2$: 328.0847; found: 328.0845.

10. 3-((3-(4-chlorophenyl)propyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**54**)



Chemical formula:
$C_{18}H_{16}ClN_3O_2$
Molecular weight:
341.79 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E2** from compound **36** (100.0 mg, 0.27 mmol) and potassium carbonate (112.0 mg, 0.81 mmol) in aqueous methanol (80%, 15 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **54** was obtained (92.3 mg, 100%) as a pale yellow powder.

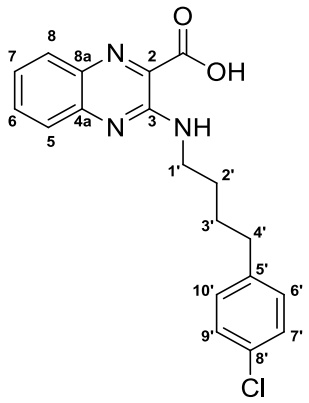
MP: 157.1°C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 13.79 (bs, 1H, **COOH**), 8.20 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz, **NH**), 7.88 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.3 Hz, **H$_{quino}$**), 7.69 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.8, 1.3 Hz, **H$_{quino}$**), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.3 Hz, **H$_{quino}$**), 7.42 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.8, 1.3 Hz, **H$_{quino}$**), 7.33 (m, 2H, 2 **H$_{ar}$**), 7.27 (m, 2H, 2 **H$_{ar}$**), 3.52 (m, 2H, **H$_{1'}$**), 2.69 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, **H$_{3'}$**), 1.95 (qt, 2H, *J* = 7.5 Hz, **H$_{2'}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 167.7 (**C=O**), 151.9 (**C$_2$**), 143.8 (**Cq$_{quino}$**), 141.1 (**C$_{6'}$**), 135.2 (**Cq$_{quino}$**), 132.9 (**CH$_{quino}$**), 132.2 (**C$_3$**), 130.8 (**C$_{4'}$**), 130.7 (2 × C, **2 CH$_{ar}$**), 130.0 (**CH$_{quino}$**), 128.6 (2 × C, **2 CH$_{ar}$**), 126.1 (**CH$_{quino}$**), 125.0 (**CH$_{quino}$**), 40.1 (**C$_{1'}$**), 32.3 (**C$_{3'}$**), 30.3 (**C$_{2'}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{18}H_{17}ClN_3O_2$: 342.1008; found: 342.1006.

11. 3-((4-(4-chlorophenyl)butyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**55**)



Chemical formula:
$C_{19}H_{18}ClN_3O_2$
Molecular weight:
355.82 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E2** from compound **37** (133.2 mg, 0.35 mmol) and potassium carbonate (145.1 mg, 1.05 mmol) in aqueous methanol (80%, 25 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **55** was obtained (120.2 mg, 97%) as a yellow powder.

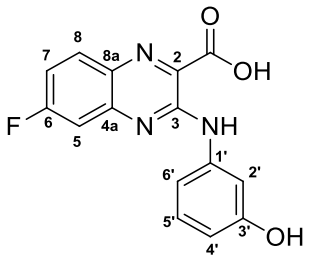
MP: 157.1°C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 13.76 (bs, 1H, **COOH**), 8.15 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, **NH**), 7.87 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.0 Hz, **H$_{quino}$**), 7.69 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.8, 1.0 Hz, **H$_{quino}$**), 7.60 (dd, 1H, *J* = 8.3, 6.8 Hz, **H$_{quino}$**), 7.42 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.8, 1.0 Hz, **H$_{quino}$**), 7.34-7.28 (m, 2H, 2 **H$_{ar}$**), 7.27-7.20 (m, 2H, 2 **H$_{ar}$**), 3.53 (m, 2H, **H$_{1'}$**), 2.64 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, **H$_{3'}$**), 1.77-1.54 (m, 4H, **H$_{2'}$**, **H$_{4'}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 167.7 (**C=O**), 151.9 (**C$_3$**), 143.8 (**Cq$_{quino}$**), 141.6 (**C$_{8'}$**), 135.2 (**Cq$_{quino}$**), 132.9 (**CH$_{quino}$**), 132.2 (**C$_2$**), 130.7 (**C$_{5'}$**), 130.6 (2 × C, **2 CH$_{ar}$**), 130.0 (**CH$_{quino}$**), 128.6 (2 × C, **2 CH$_{ar}$**), 126.1 (**CH$_{quino}$**), 125.0 (**CH$_{quino}$**), 40.3 (**C$_{1'}$**), 34.5 (**C$_{4'}$**), 28.7 (**C$_{3'}$**), 28.4 (**C$_{2'}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{19}H_{19}ClN_3O_2$: 356.1160; found: 356.1161.

12. 6-Fluoro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**56**)



Chemical formula:
$C_{15}H_{10}FN_3O_3$
Molecular weight:
299.26 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E2** from compound **38** (43.2 mg, 0.13 mmol) and potassium carbonate (54.7 mg, 0.40 mmol) in aqueous methanol (80%, 15 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **56** was obtained (39.5 mg, 100%) as an ocher powder.

MP: 200.4 °C.

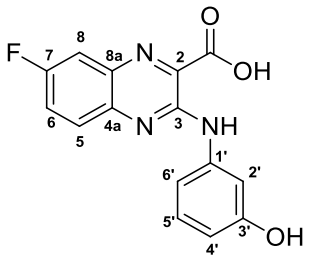
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.59 (bs, 1H, **NH**), 9.47 (bs, 1H, **OH**), 8.04 (m, 1H, **H$_8$**), 7.56 (m, 1H, **H$_{2'}$**), 7.52-7.40 (m, 2H, **H$_5$**, **H$_7$**), 7.24 (ddd, 1H, *J* = 7.9, 2.0, 1.0 Hz, **H$_{6'}$**), 7.17 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, **H$_{5'}$**), 6.52 (ddd, 1H, *J* = 7.9, 2.0, 1.0 Hz, **H$_{4'}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 168.0 (**C=O**), 165.1 (d, *J* = 249.7 Hz, **C$_6$**), 158.3 (**C$_{3'}$**), 149.7 (**C$_3$**), 144.0 (**C$_{8a}$***), 143.8 (**C$_{4a}$***), 140.4 (**C$_{1'}$**), 133.2 (**C$_2$**), 132.5 (d, *J* = 11.6 Hz, **C$_8$**), 130.1 (**C$_{5'}$**), 116.2 (d, *J* = 25.9 Hz, **C$_7$**), 111.2 (**C$_{6'}$**), 110.8 (**C$_{4'}$**), 110.3 (d, *J* = 21.8 Hz, **C$_5$**), 107.4 (**C$_{2'}$**).

^{19}F NMR (282 MHz, DSMO-*d*$_6$): δ -114.7 (s).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculted for $C_{15}H_{11}FN_3O_3$: 300.0779; found: 300.0779.

13. 7-Fluoro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**57**)



Chemical formula:
$C_{15}H_{10}FN_3O_3$
Molecular weight:
299.26 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E2** from compound **39** (107.3 mg, 0.33 mmol) and potassium carbonate (135.9 mg, 0.98 mmol) in aqueous methanol (80%, 15 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **57** was obtained (97.1 mg, 99%) as a red powder.

MP: 180.1 °C.

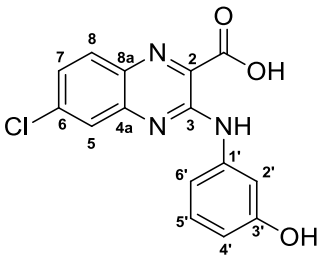
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.44 (bs, 1H, **NH**), 9.47 (bs, 1H, **OH**), 7.85-7.69 (m, 3H, **H$_5$**, **H$_6$**, **H$_8$**), 7.56 (t, 1H, *J* = 2.0 Hz, **H$_{2'}$**), 7.22 (ddd, 1H, *J* = 7.7, 2.0, 1.2 Hz, **H$_{6'}$**), 7.16 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, **H$_{5'}$**), 6.50 (ddd, 1H, *J* = 7.7, 2.0, 1.2 Hz, **H$_{4'}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 167.9 (**C=O**), 160.0 (d, *J* = 243.1 Hz, **C$_7$**), 158.3 (**C$_{3'}$**), 149.0 (**C$_3$**), 140.7 (**C$_{1'}$**), 139.7 (**C$_{4a}$**), 136.0 (d, *J* = 12.2 Hz, **C$_{8a}$**), 133.9 (**C$_2$**), 130.0 (**C$_{5'}$**), 128.6 (d, *J* = 9.5 Hz, **C$_5$**), 122.9 (d, *J* = 25.7 Hz, **C$_6$**), 113.4 (d, *J* = 21.2 Hz, **C$_8$**), 111.0 (**C$_{6'}$**), 110.5 (**C$_{4'}$**), 107.2 (**C$_{2'}$**).

^{19}F NMR (282 MHz, DSMO-*d*$_6$): δ -114.7 (s).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_{11}FN_3O_3$: 300.0779; found: 300.0779.

14. 6-Chloro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**58**)



Chemical formula:
$C_{15}H_{10}ClN_3O_3$
Molecular weight:
315.71 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E2** from compound **40** (80.6 mg, 0.23 mmol) and potassium carbonate (97.0 mg, 0.70 mmol) in aqueous methanol (80%, 15 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **58** was obtained (62.8 mg, 85%) as a dark red powder.

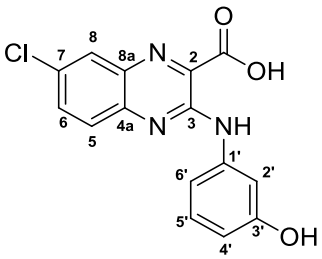
MP: 196.0 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.54 (bs, 1H, **NH**), 9.47 (bs, 1H, **OH**), 7.97 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, **H$_8$**), 7.81 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, **H$_5$**), 7.63 (t, 1H, *J* = 1.9 Hz, **H$_{2'}$**), 7.56 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.2 Hz, **H$_7$**), 7.22-7.13 (m, 2H, **H$_{5'}$**, **H$_{6'}$**), 6.51 (dt, 1H, *J* = 7.2, 1.9 Hz, **H$_{4'}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 167.9 (**C=O**), 158.3 (**C$_{3'}$**), 149.6 (**C$_3$**), 143.1 (**C$_{4a}$**), 140.4 (**C$_{1'}$**), 137.6 (**C$_6$**), 134.5 (**C$_{8a}$**), 133.3 (**C$_2$**), 131.7 (**C$_8$**), 130.1 (**C$_{5'}$**), 126.9 (**C$_7$**), 125.3 (**C$_5$**), 111.2 (**C$_{6'}$**), 110.7 (**C$_{4'}$**), 107.4 (**C$_{2'}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{15}H_{11}ClN_3O_3$: 316.0483; found: 316.0483.

15. 7-Chloro-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**59**)



Chemical formula:
$C_{15}H_{10}ClN_3O_3$
Molecular weight:
315.71 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E2** from compound **41** (29.7 mg, 0.09 mmol) and potassium carbonate (35.7 mg, 0.26 mmol) in aqueous methanol (80%, 5 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **59** was obtained (27.2 mg, 100%) as a dark red powder.

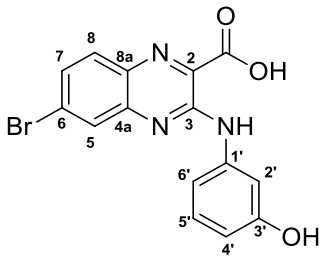
MP: 194.6 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.60 (bs, 1H, **NH**), 9.48 (bs, 1H, **OH**), 7.98 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, **H$_5$**), 7.82 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, **H$_8$**), 7.64 (t, 1H, *J* = 1.9 Hz, **H$_{2'}$**), 7.57 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.3 Hz, **H$_6$**), 7.23-7.13 (m, 2H, **H$_{5'}$**, **H$_{6'}$**), 6.51 (dt, 1H, *J* = 7.2, 1.9 Hz, **H$_{4'}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 167.9 (**C=O**), 158.3 (**C$_{3'}$**), 149.6 (**C$_3$**), 143.1 (**C$_{4a}$**), 140.4 (**C$_{1'}$**), 137.6 (**C$_7$**), 134.6 (**C$_{8a}$**), 133.5 (**C$_2$**), 131.7 (**C$_5$**), 130.1 (**C$_{5'}$**), 126.9 (**C$_6$**), 125.3 (**C$_8$**), 111.2 (**C$_{6'}$**), 110.7 (**C$_{4'}$**), 107.4 (**C$_{2'}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{15}H_{11}ClN_3O_3$: 316.0483; found: 316.0484.

16. 6-Bromo-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**60**)



Chemical formula:
$C_{15}H_{10}BrN_3O_3$
Molecular weight:
360.16 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E2** from compound **42** (39.0 mg, 0.10 mmol) and potassium carbonate (41.5 mg, 0.30 mmol) in aqueous methanol (80%, 5 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **60** was obtained (36.0 mg, 100%) as a red powder.

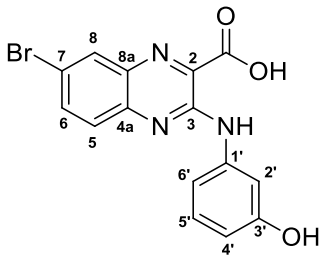
MP: 199.0°C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.54 (bs, 1H, **NH**), 9.43 (bs, 1H, **OH**), 7.98 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, **H$_5$**), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, **H$_8$**), 7.70-7.64 (m, 2H, **H$_7$**, **H$_{2'}$**), 7.22-7.13 (m, 2H, **H$_{5'}$**, **H$_{6'}$**), 6.51 (ddd, 1H, *J* = 6.6, 2.4, 2.4 Hz, **H$_{4'}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 167.9 (**C=O**), 158.3 (**C$_{3'}$**), 149.5 (**C$_3$**), 143.3 (**C$_{4a}$**), 140.4 (**C$_{1'}$**), 134.7 (**C$_{8a}$**), 133.4 (**C$_2$**), 131.7 (**C$_8$**), 130.1 (**C$_{5'}$**), 129.5 (**C$_7$**), 128.6 (**C$_5$**), 126.6 (**C$_6$**), 111.2 (**C$_{6'}$**), 110.7 (**C$_{4'}$**), 110.4 (**C$_{2'}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{15}H_{11}BrN_3O_3$: 359.9978 ; found: 359.9977.

17. 7-Bromo-3-((3-hydroxyphenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylic acid (**61**)



Chemical formula:
$C_{15}H_{10}BrN_3O_3$
Molecular weight:
360.16 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E2** from compound **43** (40.7 mg, 0.11 mmol) and potassium carbonate (43.5 mg, 0.32 mmol) in aqueous methanol (80%, 5 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **61** was obtained (37.8 mg, 100%) as an orange powder.

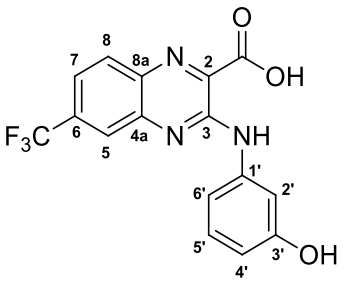
MP: 193.1°C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 10.48 (bs, 1H, **NH**), 9.53 (bs, 1H, **OH**), 8.16 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, **H$_8$**), 7.91 (dd, 1H, *J* = 8.9, 2.3 Hz, **H$_6$**), 7.71 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, **H$_5$**), 7.58 (t, 1H, *J* = 1.9 Hz, **H$_{2'}$**), 7.23-7.13 (m, 2H, **H$_{5'}$**, **H$_{6'}$**), 6.52 (dd, 1H, *J* = 7.5, 1.9 Hz, **H$_{4'}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6): δ 167.8 (**C=O**), 158.3 (**C$_{3'}$**), 149.3 (**C$_3$**), 141.5 (**C$_{4a}$**), 140.4 (**C$_{1'}$**), 136.6 (**C$_7$**), 136.0 (**C$_6$**), 133.9 (**C$_2$**), 131.7 (**C$_8$**), 130.1 (**C$_{5'}$**), 128.5 (**C$_5$**), 118.3 (**C$_{8a}$**), 111.1 (**C$_{6'}$**), 110.7 (**C$_{4'}$**), 107.4 (**C$_{2'}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{15}H_{11}BrN_3O_3$: 359.9978; found:359.9979.

18. 3-((3-Hydroxyphenyl)amino)-6-(trifluoromethyl)quinoxaline-2-carboxylic acid (**62**)



Chemical formula:
$C_{16}H_{10}F_3N_3O_3$
Molecular weight:
349.26 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E2** from ester **44** (30.8 mg, 0.08 mmol) and potassium carbonate (33.6 mg, 0.24 mmol) in aqueous methanol (80%, 15 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **62** was obtained (28.6 mg, 100%) as a dark red powder.

MP: 196.2 °C.

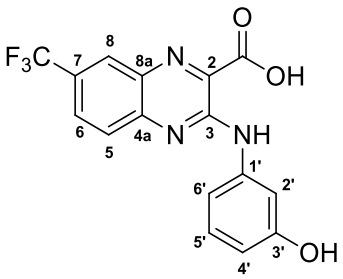
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 10.56 (bs, 1H, **NH**), 9.51 (bs, 1H, **OH**), 8.17 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, **H$_8$**), 8.09 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, **H$_5$**), 7.79 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.8 Hz, **H$_7$**), 7.68 (m, 1H, **H$_{2'}$**), 7.24-7.15 (m, 2H, **H$_{5'}$**, **H$_{6'}$**), 6.54 (ddd, 1H, *J* = 7.2, 1.8 Hz, **H$_{4'}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6): δ 167.7 (**C=O**), 158.3 (**C$_{3'}$**), 149.7 (**C$_3$**), 141.8 (**C$_{4a}$**), 140.3 (**C$_{1'}$**), 137.2 (**C$_{8a}$**), 135.7 (**C$_2$**), 132.4 (q, *J* = 37.5 Hz, **C$_6$**), 131.6 (**C$_8$**), 130.1 (**C$_{5'}$**),124.3 (q, *J* = 270.0 Hz, **CF$_3$**), 124.1 (q, *J* = 3.0 Hz, **C$_5$**), 121.4 (q, *J* = 2.3 Hz, **C$_7$**), 111.3 (**C$_{6'}$**), 110.9 (**C$_{4'}$**), 107.4 (**C$_{2'}$**).

^{19}F NMR (282 MHz, DMSO-d_6): δ -61.4 (s).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{16}H_{11}F_3N_3O_3$: 350.0747; found: 350.0749.

19. 3-((3-Hydroxyphenyl)amino)-7-(trifluoromethyl)quinoxaline-2-carboxylic acid (**63**)



Chemical formula:
$C_{16}H_{10}F_3N_3O_3$
Molecular weight:
349.26 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E2** from ester **45** (30.8 mg, 0.08 mmol) and potassium carbonate (33.6 mg, 0.25 mmol) in aqueous methanol (80%, 15 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **63** (33.2 mg, 100%) as a red ocher powder.

MP: 178.7 °C.

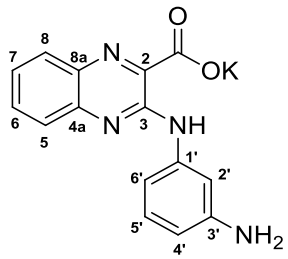
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.90 (bs, 1H, **NH**), 9.52 (bs, 1H, **OH**), 8.29 (s, 1H, **H$_8$**), 8.03 (dd, 1H, *J* = 8.8, 1.7 Hz, **H$_6$**), 7.92 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, **H$_5$**), 7.61 (t, 1H, *J* = 2.0 Hz, **H$_{2'}$**), 7.26-7.16 (m, 2H, **H$_{5'}$**, **H$_{6'}$**), 7.54 (dt, 1H, *J* = 7.7, 1.3 Hz, **H$_{4'}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 167.4 (**C=O**), 158.3 (**C$_{3'}$**), 150.4 (**C$_3$**), 144.4 (**C$_{4a}$**), 140.3 (**C$_{1'}$**), 136.0 (**C$_2$**), 134.6 (**C$_{8a}$**), 130.1 (**C$_{5'}$**), 128.0 (2 × C, **C$_5$**, **C$_6$**), 127.4 (q, *J* = 3.1 Hz, **C$_8$**), 125.9 (q, *J* = 30.2 Hz, **C$_7$**), 124.5 (q, *J* = 269.9 Hz, **CF$_3$**), 111.3 (**C$_{6'}$**), 111.0 (**C$_{4'}$**), 107.5 (**C$_{2'}$**).

^{19}F NMR (282 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ -60.5 (s).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{16}H_{11}F_3N_3O_3$: 350.0747; found: 350.0747.

20. Potassium 3-((3-aminophenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**64**)



Chemical formula:
$C_{15}H_{11}KN_4O_2$
Molecular weight:
318.37 g/mol

Method E3: to ester **31** (81.6 mg, 0.26 mmol) in aqueous methanol (80%, 10 mL) was added potassium carbonate (36.5 mg, 0.26 mmol), and the reaction mixture was refluxed for 4 hours. After cooling, the solvent was removed under reduced pressure, and freeze-dried to obtain compound **64** (84.1 mg, 100%) as an orange powder.

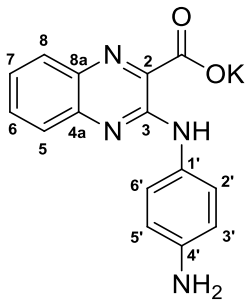
MP: > 375°C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 13.15 (bs, 1H, **NH**), 7.82 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, **H$_{quino}$**), 7.65 (dd, 1H, *J* = 7.2, 1.8 Hz, **H$_{quino}$**), 7.58 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 7.2, 1.8 Hz, **H$_{quino}$**), 7.38 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 7.2, 1.8 Hz, **H$_{quino}$**), 7.21 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, **H$_{2'}$**), 7.14 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.8 Hz, **H$_{6'}$**), 6.97 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, **H$_{5'}$**), 6.22 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H, **H$_{4'}$**), 5.04 (bs, 2H, **NH$_2$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6): δ 166.7 (**C=O**), 150.4 (**C$_{3'}$**), 149.6 (**C$_3$**), 143.2 (**C$_2$**), 141.6 (**Cq$_{quino}$**), 141.5 (**C$_{1'}$**), 136.6 (**Cq$_{quino}$**), 130.2 (**CH$_{quino}$**), 129.5 (2 × C, **CH$_{quino}$**, **C$_{5'}$**), 125.9 (**CH$_{quino}$**), 124.4 (**CH$_{quino}$**), 108.5 (**C$_{4'}$**), 107.5 (**C$_{6'}$**), 104.9 (**C$_{2'}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{15}H_{13}N_4O_2$: 281.1033; found: 281.1032.

21. Potassium 3-((4-aminophenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**65**)



Chemical formula:
$C_{15}H_{11}KN_4O_2$
Molecular weight:
318.37 g/mol

The title compound was synthesized according to the general method **E3** from compound **32** (15.5 mg, 0.05 mmol) and potassium carbonate (6.9 mg, 0.05 mmol) in aqueous methanol (80%, 5 mL). The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Compound **65** was obtained (13.9 mg, 87%) as a red powder.

MP: > 375 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 12.80 (bs, 1H, **NH**), 7.84 (dd, 1H, *J* = 8.1, 1.0 Hz, **H$_{quino}$**), 7.61-7.57 (m, 2H, **H$_{3'}$**, **H$_{5'}$**), 7.55-7.50 (m, 2H, **2 H$_{quino}$**), 7.32 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 5.6, 2.8 Hz, **H$_{quino}$**), 6.60 (m, 2H, **H$_{3'}$**,**H$_{5'}$**), 4.84 (bs, 2H, **NH$_2$**).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6): δ 167.0 (**C=O**), 150.4 (**C$_3$**), 144.2 (**C$_{4'}$**), 143.0 (**C$_2$**), 142.0 (**Cq$_{quino}$**), 136.4 (**Cq$_{quino}$**), 130.4 (**C$_{1'}$**), 130.2 (**CH$_{quino}$**), 129.5 (**CH$_{quino}$**), 125.6 (**CH$_{quino}$**), 123.8 (**CH$_{quino}$**), 120.9 (2 × C,**C$_{2'}$**, **C$_{6'}$**), 114.7 (2 × C, **C$_{3'}$**, **C$_{5'}$**).

HRMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ calculated for $C_{15}H_{13}N_4O_2$: 281.1033; found: 281.1032.

BIBLIOGRAPHIE

1. OMS | Cancer. *WHO* http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/. (21/02/2018)
2. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359–E386 (2015).
3. Collaborators, G. 2015 R. factors. Global, regional and national comparative risk assessment of 79 behavioural environmental and occupational, and metabolic risks or cluster of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *Lancet Glob. Health* **388**, 1659–1724 (2016).
4. Plummer, M. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob. Health* **4**, e609–e616 (2016).
5. Un traitement local - Chirurgie | Institut National Du Cancer. http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Chirurgie/Un-traitement-local. (21/02/2018)
6. Qu'est ce que la radiothérapie ? - Radiothérapie | Institut National Du Cancer. http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Radiotherapie/Qu-est-ce-que-la-radiotherapie. (21/02/2018)
7. Saugues, E. Synthèse de nouveaux inhibiteurs de kinases Pim et de modulateurs des protéines de la famille des Bcl-2, anticancéreux potentiels. (Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II, 2011).
8. Krebs, E. G. & Fischer, E. H. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 150–157 (1956).
9. Walsh, D. A., Perkins, J. P. & Krebs, E. G. An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **243**, 3763–3765 (1968).
10. Graves, J. D. & Krebs, E. G. Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol. Ther.* **82**, 111–121 (1999).
11. Hanks, S. K. & Hunter, T. The Eukaryotic Protein Kinase Superfamily. *FASEB Journal*. **9**, 576-596 (1995).
12. Manning, G. The protein kinase complement of the Human genom. *Science* **298**, 1912–1934 (2002).
13. Buchdunger, E. *et al.* Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* **56**, 100–104 (1996).
14. Druker, B. J. *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* **2**, 561–566 (1996).
15. Gross, S., Rahal, R., Stransky, N., Lengauer, C. & Hoeflich, K. P. Targeting cancer with kinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* **125**, 1780–1789 (2015).

16. Blanco-Aparicio, C. & Carnero, A. Pim kinases in cancer: Diagnostic, prognostic and treatment opportunities. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 629–643 (2013).
17. Nawijn, M. C., Alendar, A. & Berns, A. For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 23–34 (2011).
18. Bullock, A. N., Debreczeni, J., Amos, A. L., Knapp, S. & Turk, B. E. Structure and Substrate Specificity of the Pim-1 Kinase. *J. Biol. Chem.* **280**, 41675–41682 (2005).
19. Bullock, A. N. *et al.* Structural basis of inhibitor specificity of the human protooncogene proviral insertion site in moloney murine leukemia virus (PIM-1) kinase. *J. Med. Chem.* **48**, 7604–7614 (2005).
20. Mukaida, N., Wang, Y.-Y. & Li, Y.-Y. Roles of Pim-3, a novel survival kinase, in tumorigenesis. *Cancer Sci.* **102**, 1437–1442 (2011).
21. Kim, O. *et al.* Synergism of cytoplasmic kinases in IL6-induced ligand-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* **23**, 1838–1844 (2004).
22. Mikkers, H. *et al.* Mice Deficient for All PIM Kinases Display Reduced Body Size and Impaired Responses to Hematopoietic Growth Factors. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6104–6115 (2004).
23. Narlik-Grassow, M. *et al.* The essential role of PIM kinases in sarcoma growth and bone invasion. *Carcinogenesis* **33**, 1479–1486 (2012).
24. Brault, L. *et al.* PIM serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers. *Haematologica* **95**, 1004–1015 (2010).
25. Feldman, J. D. *et al.* KID-1, a protein kinase induced by depolarization in brain. *J. Biol. Chem.* **273**, 16535–16543 (1998).
26. Amson, R. *et al.* The human protooncogene product p33pim is expressed during fetal hematopoiesis and in diverse leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 8857–8861 (1989).
27. Saris, C. J., Domen, J. & Berns, A. The pim-1 oncogene encodes two related protein-serine/threonine kinases by alternative initiation at AUG and CUG. *EMBO J.* **10**, 655–664 (1991).
28. Lilly, M., Sandholm, J., Cooper, J. J., Koskinen, P. J. & Kraft, A. The PIM-1 serine kinase prolongs survival and inhibits apoptosis-related mitochondrial dysfunction in part through a bcl-2-dependent pathway. *Oncogene* **18**, 4022 (1999).
29. Adam, K. Etude de la stabilité et des mécanismes d'action de la protéine kinase oncogénique Pim-2 dans la Leucémie Aigüe Myéloïde. (Université René Descartes - Paris V, 2014).

30. Qian, K. C. *et al.* Structural Basis of Constitutive Activity and a Unique Nucleotide Binding Mode of Human Pim-1 Kinase. *J. Biol. Chem.* **280**, 6130–6137 (2005).
31. Amaravadi, R. The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J. Clin. Invest.* **115**, 2618–2624 (2005).
32. Mizuno, K. *et al.* Regulation of Pim-1 by Hsp90. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 663–669 (2001).
33. Shay, K. P., Wang, Z., Xing, P., McKenzie, I. F. & Magnuson, N. S. Pim-1 kinase stability is regulated by heat shock proteins and the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol. Cancer Res.* **3**, 170–181 (2005).
34. Leverson, J. D. *et al.* Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity. *Mol. Cell* **2**, 417–425 (1998).
35. Wang, Z. *et al.* Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. *J Vet Sci* **2**, 167–169 (2001).
36. White, E. The pims and outs of survival signaling: role for the Pim-2 protein kinase in the suppression of apoptosis by cytokines. *Genes Dev.* **17**, 1813–1816 (2003).
37. Magnuson, N. S., Wang, Z., Ding, G. & Reeves, R. Why target PIM1 for cancer diagnosis and treatment? *Future Oncol.* **6**, 1461–1478 (2010).
38. An, N., Kraft, A. S. & Kang, Y. Abnormal hematopoietic phenotypes in Pim kinase triple knockout mice. *J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol* **6**, 12 (2013).
39. Agrawal, S. *et al.* Pim2 complements Flt3 wild-type receptor in hematopoietic progenitor cell transformation. *Leukemia* **22**, 78 (2008).
40. Santio, N. M. *et al.* Phosphorylation of Notch1 by Pim kinases promotes oncogenic signaling in breast and prostate cancer cells. *Oncotarget* **7**, 43220–43238 (2016).
41. Zhao, Y. *et al.* Kruppel-like factor 5 modulates p53-independent apoptosis through Pim1 survival kinase in cancer cells. *Oncogene* **27**, 1 (2008).
42. Santio, N. M. & Koskinen, P. J. PIM kinases: From survival factors to regulators of cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **93**, 74–85 (2017).
43. Bachmann, M. & Möröy, T. The serine/threonine kinase Pim-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 726–730 (2005).
44. Wang, Z. *et al.* Phosphorylation of the cell cycle inhibitor p21Cip1/WAF1 by Pim-1 kinase. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* **1593**, 45–55 (2002).
45. Bhattacharya, N. *et al.* Pim-1 associates with protein complexes necessary for mitosis. *Chromosoma* **111**, 80–95 (2002).

46. Yuan, L. L. *et al.* Pim kinases phosphorylate Chk1 and regulate its functions in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **28**, 293–301 (2014).

47. Morishita, D., Katayama, R., Sekimizu, K., Tsuruo, T. & Fujita, N. Pim Kinases Promote Cell Cycle Progression by Phosphorylating and Down-regulating p27Kip1 at the Transcriptional and Posttranscriptional Levels. *Cancer Res.* **68**, 5076–5085 (2008).

48. Fujita, N., Sato, S., Katayama, K. & Tsuruo, T. Akt-dependent Phosphorylation of p27 ^{Kip1} Promotes Binding to 14-3-3 and Cytoplasmic Localization. *J. Biol. Chem.* **277**, 28706–28713 (2002).

49. Bachmann, M., Hennemann, H., Xing, P. X., Hoffmann, I. & Möröy, T. The Oncogenic Serine/Threonine Kinase Pim-1 Phosphorylates and Inhibits the Activity of Cdc25C-associated Kinase 1 (C-TAK1): A NOVEL ROLE FOR Pim-1 AT THE G $_2$ /M CELL CYCLE CHECKPOINT. *J. Biol. Chem.* **279**, 48319–48328 (2004).

50. Bachmann, M. *et al.* The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 directly phosphorylates and activates the G2/M specific phosphatase Cdc25C. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 430–443 (2006).

51. Zhou, B. P. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* **3**, 973–982 (2001).

52. Koike, N., Maita, H., Taira, T., Ariga, H. & Iguchi-Ariga, S. M. M. Identification of heterochromatin protein 1 (HP1) as a phosphorylation target by Pim-1 kinase and the effect of phosphorylation on the transcriptional repression function of HP1. *FEBS Lett.* **467**, 17–21 (2000).

53. Macdonald, A. *et al.* Pim kinases phosphorylate multiple sites on Bad and promote 14-3-3 binding and dissociation from Bcl-XL. *BMC Cell Biol.* **7**, 1 (2006).

54. Aho, T. L. T. *et al.* Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser ^{112} gatekeeper site. *FEBS Lett.* **571**, 43–49 (2004).

55. Hogan, C. *et al.* Elevated Levels of Oncogenic Protein Kinase Pim-1 Induce the p53 Pathway in Cultured Cells and Correlate with Increased Mdm2 in Mantle Cell Lymphoma. *J. Biol. Chem.* **283**, 18012–18023 (2008).

56. Michael, D. & Oren, M. The p53–Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin. Cancer Biol.* **13**, 49–58 (2003).

57. Bueso-Ramos, C. E. *et al.* Multiple Patterns of MDM-2 Deregulation in Human Leukemias: Implications in Leukemogenesis and Prognosis. *Leuk. Lymphoma* **17**, 13–18 (1995).

58. Dworakowska, D. *et al.* MDM2 gene amplification: a new independent factor of adverse prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* **43**, 285–295 (2004).

59. Finnegan, M. C. M., Goepel, J. R., Royds, J., Hancock, B. W. & Goyns, M. H. Elevated levels of MDM-2 and p53 expression are associated with high grade non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Lett.* **86**, 215–221 (1994).

60. Kondo, I., Iida, S., Takagi, Y. & Sugihara, K. MDM2 mRNA Expression in the p53 Pathway May Predict the Potential of Invasion and Liver Metastasis in Colorectal Cancer: *Dis. Colon Rectum* **51**, 1395–1402 (2008).

61. Murray, S. A. *et al.* Increased expression of MDM2, cyclin D1, and p27Kip1 in carcinogen-induced rat mammary tumors. *J. Cell. Biochem.* **95**, 875–884 (2005).

62. Jeczen, R. *et al.* P53/MDM2 overexpression in metastatic endometrial cancer: correlation with clinicopathological features and patient outcome. *Clin. Exp. Metastasis* **24**, 503–511 (2007).

63. Quesnel, B. *et al.* Over-expression of the MDM2 gene is found in some cases of haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* **88**, 415–418 (1994).

64. Jiang, T. *et al.* Bi-directional Regulation between Tyrosine Kinase Etk/BMX and Tumor Suppressor p53 in Response to DNA Damage. *J. Biol. Chem.* **279**, 50181–50189 (2004).

65. Xie, Y., Burcu, M., Linn, D. E., Qiu, Y. & Baer, M. R. Pim-1 kinase protects P-glycoprotein from degradation and enables its glycosylation and cell surface expression. *Mol. Pharmacol.* mol–109 (2010).

66. Xie, Y. *et al.* The 44-kDa Pim-1 Kinase Phosphorylates BCRP/ABCG2 and Thereby Promotes Its Multimerization and Drug-resistant Activity in Human Prostate Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 3349–3356 (2008).

67. Suárez-Álvarez, B., López-Vázquez, A. & López-Larrea, C. Mobilization and Homing of Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Transplantation* 152–170 (2012) doi:10.1007/978-1-4614-2098-9_11.

68. Grundler, R. *et al.* Dissection of PIM serine/threonine kinases in FLT3-ITD-induced leukemogenesis reveals PIM1 as regulator of CXCL12-CXCR4-mediated homing and migration. *J. Exp. Med.* **206**, 1957–1970 (2009).

69. Decker, S. *et al.* PIM kinases are essential for chronic lymphocytic leukemia cell survival (PIM2/3) and CXCR4-mediated microenvironmental interactions (PIM1). *Mol. Cancer Ther.* **13**, 1231–1245 (2014).

70. Ben-Baruch, A. Site-specific metastasis formation: chemokines as regulators of tumor cell adhesion, motility and invasion. *Cell Adhes. Migr.* **3**, 328–333 (2009).

71. Vaday, G. G. *et al.* CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in prostate cancer: inhibitory effects of human single chain Fv antibodies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 5630–5639 (2004).

72. Santio, N. M. *et al.* Pim-selective inhibitor DHPCC-9 reveals Pim kinases as potent stimulators of cancer cell migration and invasion. *Mol. Cancer* **9**, 279 (2010).

73. Santio, N. M. *et al.* Pim Kinases Promote Migration and Metastatic Growth of Prostate Cancer Xenografts. *PLOS ONE* **10**, e0130340 (2015).

74. Mancini, M. & Toker, A. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 810–820 (2009).

75. Kawahara, T. *et al.* The role of NFATc1 in prostate cancer progression: cyclosporine A and tacrolimus inhibit cell proliferation, migration, and invasion. *The Prostate* **75**, 573–584 (2015).

76. Manda, K. R. *et al.* NFATc1 promotes prostate tumorigenesis and overcomes PTEN loss-induced senescence. *Oncogene* **35**, 3282–3292 (2016).

77. Hernández, G. L. *et al.* Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J. Exp. Med.* **193**, 607–620 (2001).

78. Santio, N. M. *et al.* The PIM1 kinase promotes prostate cancer cell migration and adhesion via multiple signalling pathways. *Exp. Cell Res.* **342**, 113–124 (2016).

79. Hao, Q. *et al.* FOXP3 inhibits NF-κB activity and hence COX2 expression in gastric cancer cells. *Cell. Signal.* **26**, 564–569 (2014).

80. Thiel, A. *et al.* Expression of cyclooxygenase-2 is regulated by glycogen synthase kinase-3beta in gastric cancer cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 4564–4569 (2006).

81. Basu, S., Golovina, T., Mikheeva, T., June, C. H. & Riley, J. L. Cutting edge: Foxp3-mediated induction of pim 2 allows human T regulatory cells to preferentially expand in rapamycin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 5794–5798 (2008).

82. Wang, L., Liu, R., Ribick, M., Zheng, P. & Liu, Y. FOXP3 as an X-linked tumor suppressor. *Discov. Med.* **10**, 322–328 (2010).

83. Deng, G. *et al.* Pim-2 Kinase Influences Regulatory T Cell Function and Stability by Mediating Foxp3 Protein N-terminal Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **290**, 20211–20220 (2015).

84. Li, Z. *et al.* PIM1 Kinase Phosphorylates the Human Transcription Factor FOXP3 at Serine 422 to Negatively Regulate Its Activity under Inflammation. *J. Biol. Chem.* **289**, 26872–26881 (2014).

85. Andersson, E. R. & Lendahl, U. Therapeutic modulation of Notch signalling--are we there yet? *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 357–378 (2014).

86. Carvalho, F. L. F., Simons, B. W., Eberhart, C. G. & Berman, D. M. Notch signaling in prostate cancer: a moving target. *The Prostate* **74**, 933–945 (2014).

87. Schenone, S., Tintori, C. & Botta, M. Using insights into Pim1 structure to design new anticancer drugs. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3964–3978 (2010).

88. Kumar, A. *et al.* Crystal Structures of Proto-oncogene Kinase Pim1: A Target of Aberrant Somatic Hypermutations in Diffuse Large Cell Lymphoma. *J. Mol. Biol.* **348**, 183–193 (2005).

89. Bullock, A. N. *et al.* Crystal Structure of the PIM2 Kinase in Complex with an Organoruthenium Inhibitor. *PLOS ONE* **4**, e7112 (2009).

90. Keeton, E. K. *et al.* AZD1208, a potent and selective pan-Pim kinase inhibitor, demonstrates efficacy in preclinical models of acute myeloid leukemia. *Blood* **123**, 905–913 (2014).

91. Fedorov, O. *et al.* A systematic interaction map of validated kinase inhibitors with Ser/Thr kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 20523–20528 (2007).

92. Holder, S., Lilly, M. & Brown, M. L. Comparative molecular field analysis of flavonoid inhibitors of the PIM-1 kinase. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 6463–6473 (2007).

93. Debreczeni, J. É. *et al.* Ruthenium Half-Sandwich Complexes Bound to Protein Kinase Pim-1. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 1580–1585 (2006).

94. Atilla-Gokcumen, G. E. *et al.* Extremely Tight Binding of Ruthenium Complex to Glycogen Synthase Kinase 3. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **9**, 2933–2936 (2008).

95. Tong, Y. *et al.* Isoxazolo[3,4-b]quinoline-3,4(1H,9H)-diones as unique, potent and selective inhibitors for Pim-1 and Pim-2 kinases: Chemistry, biological activities, and molecular modeling. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 5206–5208 (2008).

96. Chen, L. S., Redkar, S., Taverna, P., Cortes, J. E. & Gandhi, V. Mechanisms of cytotoxicity to Pim kinase inhibitor, SGI-1776, in acute myeloid leukemia. *Blood* **118**, 693–702 (2011).

97. Chen, L. S., Redkar, S., Bearss, D., Wierda, W. G. & Gandhi, V. Pim kinase inhibitor, SGI-1776, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* **114**, 4150–4157 (2009).

98. Green, A. S., Lacombe, C., Mayeux, P., Bouscary, D. & Tamburini, J. The FLT3 and Pim kinases inhibitor SGI-1776 preferentially target FLT3-ITD AML cells. *Blood* **119**, 1791–1792 (2012).

99. Hou, X. *et al.* Biochemical changes of salivary gland adenoid cystic carcinoma cells induced by SGI-1776. *Exp. Cell Res.* **352**, 403–411 (2017).

100. Yang, Q., Chen, L. S., Neelapu, S. S. & Gandhi, V. Combination of Pim Kinase Inhibitor SGI-1776 and Bendamustine in B-Cell Lymphoma. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **13**, S355–S362 (2013).

101. Foulks, J. M. *et al.* A Small-Molecule Inhibitor of PIM Kinases as a Potential Treatment for Urothelial Carcinomas. *Neoplasia* **16**, 403–412 (2014).

102. Study of TP-3654 in Patients With Advanced Solid Tumors - Full Text View - ClinicalTrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03715504.

103. Grey, R. *et al.* Structure-based design of 3-aryl-6-amino-triazolo[4,3-b]pyridazine inhibitors of Pim-1 kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 3019–3022 (2009).

104. Sliman, F. *et al.* Identification and structure–activity relationship of 8-hydroxy-quinoline-7-carboxylic acid derivatives as inhibitors of Pim-1 kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 2801–2805 (2010).

105. Burger, M. T. *et al.* Structure Guided Optimization, in Vitro Activity, and in Vivo Activity of Pan-PIM Kinase Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **4**, 1193–1197 (2013).

106. Burger, M. T. *et al.* Identification of *N* -(4-((1 *R* ,3 *S* ,5 *S*)-3-Amino-5-methylcyclohexyl)pyridin-3-yl)-6-(2,6-difluorophenyl)-5-fluoropicolinamide (PIM447), a Potent and Selective Proviral Insertion Site of Moloney Murine Leukemia (PIM) 1, 2, and 3 Kinase Inhibitor in Clinical Trials for Hematological Malignancies. *J. Med. Chem.* **58**, 8373–8386 (2015).

107. Study of the Safety of PIM447 in Combination With Ruxolitinib (INC424) and LEE011 in Patients With Myelofibrosis - Full Text View - ClinicalTrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02370706.

108. A Safety and Efficacy Study of LGH447 in Patients With Acute Myeloid Leukemia (AML) or High Risk Myelodysplastic Syndrome (MDS) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02078609.

109. Study of the Safety and Effectiveness of LGH447 and BYL719 in Patients With Relapsed and Refractory Multiple Myeloma - Full Text View - ClinicalTrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02144038.

110. Study of INCB053914 in Subjects With Advanced Malignancies - Full Text View - ClinicalTrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02587598.

111. A Safety and Tolerability Study of INCB053914 in Combination With INCB050465 in Diffuse Large B-Cell Lymphoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03688152.

112. Kirschner, A. N. *et al.* PIM Kinase Inhibitor AZD1208 for Treatment of MYC-Driven Prostate Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **107**, (2015).

113. Pierre, F. *et al.* 7-(4H-1,2,4-Triazol-3-yl)benzo[c][2,6]naphthyridines: A novel class of Pim kinase inhibitors with potent cell antiproliferative activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 6687–6692 (2011).

114. Czardybon, W. *et al.* A novel, dual pan-PIM/FLT3 inhibitor SEL24 exhibits broad therapeutic potential in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **9**, (2018).

115. SEL24/MEN1703 in Patients With Acute Myeloid Leukemia - Full Text View - ClinicalTrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03008187.

116. Lipinski, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **44**, 235–249 (2000).

117. Muchmore, S. W., Edmunds, J. J., Stewart, K. D. & Hajduk, P. J. Cheminformatic Tools for Medicinal Chemists. *J. Med. Chem.* **53**, 4830–4841 (2010).

118. Hughes, J. D. *et al.* Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 4872–4875 (2008).

119. Kelder, J., Grootenhuis, P. D., Bayada, D. M., Delbressine, L. P. & Ploemen, J. P. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharm. Res.* **16**, 1514–1519 (1999).

120. Hinsberg, O. Ueber Chinoxaline. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **17**, 318–323 (1884).

121. Körner, M. Ueber einige umwandlungen des orthonitranilins und der orthodiamine. *Dtsch Chem Ges* **17**, 572–573 (1884).

122. Fonseca, T., Gigante, B., Marques, M. M., Gilchrist, T. L. & De Clercq, E. Synthesis and antiviral evaluation of benzimidazoles, quinoxalines and indoles from dehydroabietic acid. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 103–112 (2004).

123. El-Sabbagh, O., El-Sadek, M., Lashine, S., Yassin, H. & El-Nabtity, S. Synthesis of new 2(1H)-quinoxalinone derivatives for antimicrobial and antiinflammatory evaluation. *Med. Chem. Res.* **18**, 782–797 (2009).

124. Montana, M., Mathias, F., Terme, T. & Vanelle, P. Antitumoral activity of quinoxaline derivatives: A systematic review. *Eur. J. Med. Chem.* **163**, 136–147 (2019).

125. Carta, A., Sanna, P., Gherardini, L., Usai, D. & Zanetti, S. Novel functionalized pyrido[2,3-g]quinoxalinones as antibacterial, antifungal and anticancer agents. *Farm. Soc. Chim. Ital. 1989* **56**, 933–938 (2001).

126. Monge, A. *et al.* Hypoxia-Selective Agents Derived from 2-Quinoxalinecarbonitrile 1,4-Di-N-oxides. 2. *J. Med. Chem.* **38**, 4488–4494 (1995).

127. Sarges, R. & Lyga, J. W. Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of N-1,N-4-disubstituted 3,4-dihydro-2(1H)-quinoxalinone derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **25**, 1475–1479 (1988).

128. Gupta, D., Ghosh, N. N. & Chandra, R. Synthesis and pharmacological evaluation of substituted 5-[4-[2-(6,7-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-2-oxo-4-quinoxalinyl)ethoxy]phenyl]methylene]thiazolidine-2,4-dione derivatives as potent euglycemic and hypolipidemic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 1019–1022 (2005).

129. Mamedov, V. A. *Quinoxalines: synthesis, reactions, mechanisms and structure*. (Springer Berlin Heidelberg, 2016).

130. Kim, S. Y., Park, K. H. & Chung, Y. K. Manganese(IV) dioxide-catalyzed synthesis of quinoxalines under microwave irradiation. *Chem. Commun.* 1321–1323 (2005) doi:10.1039/B417556E.

131. Harms, A. E. An Efficient Synthesis of 2-Quinoxalinecarboxylic Acid. *Org. Process Res. Dev.* **8**, 666–669 (2004).

132. Cho, C. S., Ren, W. X. & Shim, S. C. Ketones as a new synthon for quinoxaline synthesis. *Tetrahedron Lett.* **48**, 4665–4667 (2007).

133. Aparicio, D. *et al.* Straightforward Access to Pyrazines, Piperazinones, and Quinoxalines by Reactions of 1,2-Diaza-1,3-butadienes with 1,2-Diamines under Solution, Solvent-Free, or Solid-Phase Conditions. *J. Org. Chem.* **71**, 5897–5905 (2006).

134. Antoniotti, S. & Duñach, E. Direct and catalytic synthesis of quinoxaline derivatives from epoxides and ene-1,2-diamines. *Tetrahedron Lett.* **43**, 3971–3973 (2002).

135. Das, B., Venkateswarlu, K., Suneel, K. & Majhi, A. An efficient and convenient protocol for the synthesis of quinoxalines and dihydropyrazines via cyclization–oxidation processes using HClO4·SiO2 as a heterogeneous recyclable catalyst. *Tetrahedron Lett.* **48**, 5371–5374 (2007).

136. Mahesh, R., Dhar, A. K., Sasank T.V.N.V., T., Thirunavukkarasu, S. & Devadoss, T. Citric acid: An efficient and green catalyst for rapid one pot synthesis of quinoxaline derivatives at room temperature. *Chin. Chem. Lett.* **22**, 389–392 (2011).

137. J. Bruffaerts *et al. Science of Synthesis Knowledge Update 2016/2*. vol. 2 (Georg Thieme Verlag KG).

138. Takano, Y. *et al.* Synthesis and AMPA receptor antagonistic activity of a novel class of quinoxalinecarboxylic acid with a substituted phenyl group at the C-7 position. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 3521–3525 (2003).

139. Takano, Y. *et al.* Design, synthesis, and AMPA receptor antagonistic activity of a novel 6-nitro-3-oxoquinoxaline-2-carboxylic acid with a substituted phenyl group at the 7 position. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 5841–5863 (2005).

140. Jahani, F., Tajbakhsh, M., Golchoubian, H. & Khaksar, S. Guanidine hydrochloride as an organocatalyst for N-Boc protection of amino groups. *Tetrahedron Lett.* **52**, 1260–1264 (2011).

141. Wurz, R. P. *et al.* Discovery of imidazopyridazines as potent Pim-1/2 kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 5580–5590 (2016).

142. Kumar, A. *et al.* 4-Anilinoquinoline triazines: A novel class of hybrid antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 676–690 (2011).

143. Kansy, M., Avdeef, A. & Fischer, H. Advances in screening for membrane permeability: high-resolution PAMPA for medicinal chemists. *Drug Discov. Today Technol.* **1**, 349–355 (2004).

144. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).

145. Van Lohuizen, M. *et al.* Predisposition to lymphomagenesis in pim-1 transgenic mice: cooperation with c-myc and N-myc in murine leukemia virus-induced tumors. *Cell* **56**, 673–682 (1989).

146. A Study of Oral LGH447 in Patients With Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma - Full Text View - ClinicalTrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01456689.

147. A Safety and Efficacy Study of LGH447 in Patients With Acute Myeloid Leukemia (AML) or High Risk Myelodysplastic Syndrome (MDS) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02078609.

Bruno OYALLON

Conception, synthèse et évaluations biologiques de quinoxalines et d'analogues comme inhibiteurs de la kinase *Hs*Pim-1

Résumé

Les kinases Pim (*proviral integration site for moloney murine leukemia virus*) sont impliquées dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que dans l'apoptose et la chimiorésistance. Elles agissent comme des facteurs de survie oncogéniques. Du fait de leurs particularités structurales et leur implication dans l'oncogénèse, les kinases Pim représentent des cibles de choix pour le développement de nouveaux traitements anti-cancéreux.

Des travaux préliminaires ont permis d'identifier un nouveau chef de file **1** de type acide quinoxalin-2-carboxylique, capable d'inhiber *in vitro* l'activité enzymatique de *Hs*Pim-1 (CI50 = 74 nM). Les études *in silico* suggèrent que ce composé agit comme un inhibiteur non mimétique de l'ATP. L'objectif de ce projet était de concevoir des analogues du composé **1** inhibiteurs de *Hs*Pim-1. Ces composés ont été testés sur un panel de kinases de mammifères incluant *Hs*Pim-1 ainsi que sur 3 lignées cellulaires de leucémie.

Mots-clés : inhibiteur, Pim-1, kinase, quinoxaline, leucémie

Abstract

Pim (*proviral integration site for Moloney murine leukemia virus*) kinases play a crucial role in cell survival, proliferation and cell differentiation as well as in apoptosis and chemoresistance. They act as oncogenic survival factors. Due to their structural features and their role in oncogenesis, Pim kinases are relevant targets for new anti-cancer therapies.

Preliminary studies permitted to identify quinoxaline-2-carboxylic acid **1** as a new lead compound. This compound was able to inhibit *Hs*Pim-1 *in vitro* activity (IC_{50} = 74 nM). *In silico* studies have shown that this compound could act as a non-mimetic ATP inhibitor. Our objective was to design and synthesize analogues of compound **1** with an optimised activity on *Hs*Pim-1. These compounds were tested on a panel of mammalian kinases and on 3 leukemic cell lines.

Keywords: inhibitor, Pim-1, kinase, quinoxaline, leukemia